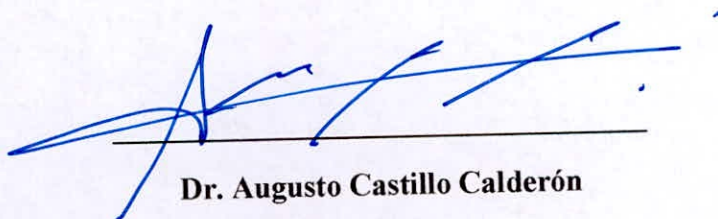


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA  
FACULTAD DE INGENIERIA  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**HOJA DEL AVAL DEL JURADO EVALUADOR**

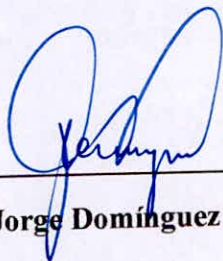
El presente trabajo de tesis titulado "INFLUENCIA DE CEPAS LÁCTICAS Y DOSIS DEL INÓCULO EN EL CONTENIDO DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO DURANTE ELABORACIÓN DE YOGURT" para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por Bach. JOSÉ JONATHAN CÁRDENAS ACOSTA y Bach. DAVID RAFAEL ISIQUE VALVERDE, que tienen como Asesor al docente Ms. Jorge Domínguez Castañeda designado por resolución N° 337-2019-UNS-FI. Ha sido revisado y aprobado el día 27 de setiembre del 2019 por el siguiente jurado evaluador, designado mediante resolución N° 267-2019-UNS-CFI.



---

**Dr. Augusto Castillo Calderón**

**Presidente**



---

**Mg. Jorge Domínguez Castañeda**

**Secretario**



---

**Mg. Rogger Romero Usquiano**

**Integrante**

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 8:00 a.m. del 27 de septiembre del dos mil diecinueve se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 267-2019-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Presidente)
- **Mg. Jorge Marino Domínguez Castañeda** (Secretario)
- **Mg. Rogger Romero Usquiano** (Integrante); para inicio a la

Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

**“INFLUENCIA DE CEPAS LACTICAS Y DOSIS DEL INOCULO EN EL CONTENIDO DE ACIDO LINOLEICO CONJUGADO DURANTE ELABORACION DE YOGURT”**, elaborada por el (los) bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **CARDENAS ACOSTA JOSE JONATHAN**
- **ISIQUE VALVERDE DAVID RAFAEL**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Mg. Jorge Domínguez Castañeda**

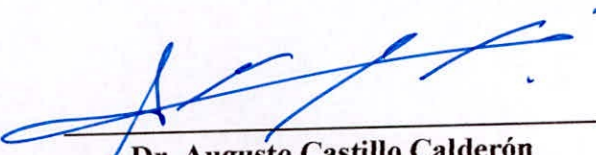
Finalizada la sustentación, el (los) Tesistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

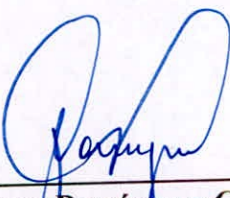
El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:


BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
<b>CÁRDENAS ACOSTA JOSÉ JONATHAN</b>	<b>16</b>	<b>REGULAR</b>

Siendo las 9:00 a.m. del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 27 de septiembre del 2019

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Augusto Castillo Calderón**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Mg. Jorge Domínguez Castañeda**  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
**Mg. Rogger Romero Usquiano**  
Integrante

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 8:00 a.m. del 27 de septiembre del dos mil diecinueve se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 267-2019-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Presidente)
- **Mg. Jorge Marino Domínguez Castañeda** (Secretario)
- **Mg. Rogger Romero Usquiano** (Integrante); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

**“INFLUENCIA DE CEPAS LACTICAS Y DOSIS DEL INOCULO EN EL CONTENIDO DE ACIDO LINOLEICO CONJUGADO DURANTE ELABORACION DE YOGURT”**, elaborada por el (los) bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **CARDENAS ACOSTA JOSE JONATHAN**
- **ISIQUE VALVERDE DAVID RAFAEL**

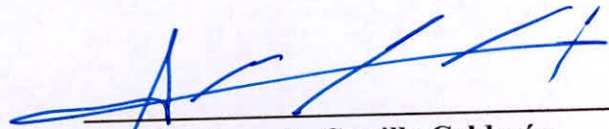
Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Mg. Jorge Domínguez Castañeda**  
Finalizada la sustentación, el (los) Tesistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

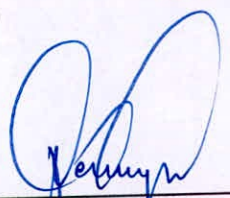
El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:


BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
<b>DAVID RAFAEL ISIQUE VALVERDE</b>	<b>16</b>	<b>REGULAR</b>

Siendo las 9:00 a.m. del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 27 de septiembre del 2019

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Augusto Castillo Calderón**  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
**Mg. Jorge Domínguez Castañeda**  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
**Mg. Rogger Romero Usquiano**  
Integrante

## DEDICATORIA

*A mi madre Susana Acosta y a mi padre Melanio Cárdenas por su apoyo incondicional, el gran esfuerzo y dedicación que pusieron en mi crianza y desarrollo profesional.*

*A mis hermanas Dora, Ángela y Amelia, a Khristell Allemant, a mis sobrinos, a Diego García, Auria Paredes y demás amigos, que forman parte de mi vida, y que me apoyaron y confiaron en mí en todo el proceso de mi desarrollo como persona y profesional.*

*A nuestro asesor, profesores y demás personas que contribuyeron en mi desarrollo profesional y en la realización del presente informe.*

**JOSÉ CÁRDENAS A.**

*A mis padres Marcelo y Martha que sin el apoyo de ellos no estuviera donde estoy, gracias por todo el apoyo dado en estos 5 años de carrera profesional.*

*A mis hermanos Marcelo e Iván que a pesar de todo estuvieron apoyándome en todo sentido, gracias por saber aguantarme y comprenderme en todo lo que esté realizando en mi vida profesional.*

*A Dios y la Sr de Los Milagros por haberme dado la gracia de ser un profesional competente que siempre quise ser, por darme esa dicha muchas gracias.*

*A nuestro asesor, mis compañeros y amigos de la EAP Agroindustria por estos 5 años de experiencias y aprendizajes que serán inolvidables.*

**DAVID ISIQUE V.**

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradecer a Dios, por darnos la fortaleza para lograr esta meta, por haber puesto en el camino a personas que han sido guía y compañía durante todo el periodo del proyecto.

A nuestros padres por infundirnos la perseverancia y el rigor de luchar por nuestros objetivos en el transcurso de nuestras vidas.

A los docentes de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial, por todo el apoyo académico otorgado durante nuestra vida universitaria, en especial a nuestro asesor.

A los encargados de los laboratorios de la escuela de Agroindustria, cuyo apoyo fundamental nos facilitó el manejo de los instrumentos en todo momento e hizo un ambiente grato de trabajo.

A la Srta. Silvia H. encargada de la biblioteca de agroindustria, quien nos apoyó con brindarnos los libros y revistas a través de los años de estudios y para el desarrollo de la presente tesis.

Por el soporte institucional dado para la realización de este trabajo, a la Universidad Nacional del Santa, que nos brindó la formación para ser buenos profesionales.

A todos ellos, gracias

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	16
II. MARCO TEÓRICO.....	18
2.1. LECHE.....	18
2.1.1. PRESENCIA DE ALC EN LECHE.....	20
2.2. ÁCIDOS GRASOS.....	21
2.3. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	22
2.3.1. SÍNTESIS DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO.....	22
2.3.2. CONTENIDO DE ALC EN ALMIENTOS.....	23
2.3.3. EFECTO DEL ALC EN LA COMPOSICIÓN Y EL PESO CORPORAL.....	25
2.4. CEPAS PROBIÓTICAS.....	25
2.4.1. LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS.....	26
2.4.2. BIFIDOBACTERIUM LACTIS.....	27
2.4.3. STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS.....	27
2.4.4. LACTOBACILLUS DELBRUECKII SSP. BULGARICUS.....	28
2.5. FERMENTACIÓN LÁCTICA.....	28
2.6. YOGURT.....	30
2.6.1. TIPOS DE YOGURT.....	31
2.6.2. CONTENIDO DE ALC PRESENTE EN YOGURT.....	32
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1. MATERIALES.....	33
3.1.1. INSUMOS.....	33

3.1.2. REACTIVOS.....	33
3.1.3. CULTIVOS PROBIÓTICOS.....	33
3.1.4. MATERIALES DE VIDRIO.....	34
3.1.5. OTROS MATERIALES.....	34
3.1.6. EQUIPOS E INSTRUMENTOS.....	34
3.2. MÉTODOS.....	36
3.2.1. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS.....	36
3.2.1.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE YOGURT.....	36
3.2.1.1.1. MATERIA PRIMA.....	37
a. MEDICIÓN DE PORCENTAJE GRASO.....	37
b. MEDICIÓN DEL pH.....	37
c. ACIDEZ TITULABLE.....	37
3.2.1.1.2. PREPARACIÓN DE YOGURT.....	38
a. MEZCLA DE INGREDIENTES Y HOMOGENIZACIÓN.....	38
b. PASTEURIZACIÓN Y ENFRIAMIENTO.....	38
c. INOCULACIÓN.....	38
d. INCUBACIÓN.....	39
e. ENFRIAMIENTO Y ALMACENAMIENTO.....	39
3.2.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
3.2.2. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	40
3.2.2.1. EXTRACCIÓN DE MATERIA GRASA (MODIFICACIÓN DEL MÉTODO DE FOLCH ET AL).....	40
3.2.2.2. CUANTIFICACIÓN DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS.....	41



3.2.2.2.1. PREPARACIÓN DE FAME'S.....	41
3.2.2.2.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC) .....	42
3.2.2.3. DETERMINACIÓN DE ACIDEZ.....	43
3.2.2.4. REOLOGÍA DEL YOGURT.....	43
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1. ANÁLISIS EN MATERIA PRIMA.....	44
4.2. ANÁLISIS EN MUESTRAS DE YOGURT.....	46
4.2.1. ACIDEZ DEL YOGURT.....	46
4.2.2. ANÁLISIS REOLÓGICO EN MUESTRAS DE YOGURT.....	48
4.2.3. PORCENTAJE DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO.....	53
4.2.3.1. INFLUENCIA DE CULTIVO Y DOSIS EN CONCENTRACIÓN DE ALC EN YOGURT.....	56
4.2.3.2. INFLUENCIA DE TIEMPO DE FERMENTACIÓN EN CONCENTRACIÓN DE ALC EN YOGURT.....	57
V. CONCLUSIONES.....	59
VI. RECOMENDACIONES .....	60
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES.....	61
VIII. ANEXOS.....	71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de la leche.....	18
Tabla 2. Componentes de la leche según raza.....	19
Tabla 3. Contenido de ALC en diferentes alimentos.....	24
Tabla 4. Características Fisicoquímicas y Microbiológicas del yogurt comercial.....	30
Tabla 5. Tipos de yogurt.....	32
Tabla 6. Diseño experimental de tratamientos.....	40
Tabla 7. Acidez, pH y contenido de ácido graso de leche de establos.....	44
Tabla 8. Resultados de acidez de muestras de yogurt.....	46
Tabla 9. Características Fisicoquímicas y Microbiológicas.....	47
Tabla 10. Valores de coeficiente para cada modelo reológico.....	48
Tabla 11. Índice de consistencia (K), índice de consistencia de flujo (n) y umbral de fluencia ( $\sigma_0$ ) para los tratamientos obtenidos.....	49
Tabla 12. Índice de consistencia (K), índice de consistencia de flujo (n) y umbral de fluencia ( $\sigma_0$ ) para los mejores tratamientos obtenidos con respecto a reología.....	52
Tabla 13. Resultados de análisis de concentración de Ácido Linoleico Conjugado.....	53
Tabla 14. Resumen de datos de cada grupo de muestras.....	56
Tabla 15. Análisis de varianza para los cuatro grupos (S1, S2, V1 y V2).....	57
Tabla 16. Resumen de datos para los 3 tiempos de fermentación (5, 6 y 7 horas).....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica propuesta para la bio isomerización de ALC por L. Acidophilus.....	23
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso para obtención de yogurt.....	36
Figura 3. Reograma de los tratamientos con cultivo probiótico SACCO.....	50
Figura 4. Reograma de los tratamientos con cultivo probiótico VIVOLAC.....	50
Figura 5. Reograma de los mejores tratamientos.....	51
Figura 6. Variación de ALC con cultivo Sacco, a 1 U/l (parte superior) y 2 U/l (parte inferior) vs tiempo de fermentación.....	55
Figura 7. Variación de ALC con cultivo Vivolac, a 1 U/l (parte superior) y 2 U/l (parte inferior) vs tiempo de fermentación.....	55

## ANEXOS

Anexo 1: Proceso de obtención de yogurt.....	71
Anexo 2: Proceso del Método modificado de Folch.....	72
Anexo 3: Cuantificación de ésteres metílicos de ácidos.....	75
Anexo 4: Diagramas de flujo de actividades.....	77
Anexo 5: Cálculos en la obtención del yogurt.....	80
Anexo 6: Cuadros resumen de reología de yogurt.....	81
Anexo 7: Gráficos de resultados de medición de concentración de ALC en Cromatógrafo de Gases.....	83
Anexo 8: Hojas técnicas de cultivos lácticos comerciales y Estándar ALC.....	95

## RESUMEN

El estudio está enfocado en evaluar la influencia de dos cultivos probióticos y la dosis de cultivo durante el tiempo de fermentación, en la composición de ácidos grasos en yogurt, con el fin de seleccionar las condiciones óptimas que garanticen un producto con alto contenido de ácido linoléico conjugado (ALC). La parte experimental consta de 4 etapas: la primera etapa es el análisis fisico-químico de leche de 4 establos para seleccionar el de mayor porcentaje de materia grasa; la segunda etapa consta de la obtención del yogurt en una incubadora, siguiendo un diseño factorial de  $2 \times 2 \times 3$ , el cual tuvo como parámetros al tipo de cultivo (Sacco y Vivolac) y la dosis de cultivo por litro de leche (1 U/l y 2 U/l), en un tiempo de fermentación de 5, 6 y 7 horas; la tercera etapa consta de la extracción de la materia grasa del yogurt, usando una modificación del método de Folch, y en la cuarta etapa se cuantificó los diferentes ácidos grasos en un cromatógrafo de gases (CG). Se obtuvo un yogurt con un contenido promedio de 26.71 mg ALC/g grasa en las muestras elaboradas con cultivo Sacco a una dosis por litro de leche (1 U/l), y 11.51 mg ALC/g grasa en las muestras elaboradas con cultivo Sacco a dos dosis por litro de leche (2 U/l); de los cuales los elaborados a dos dosis, y según el modelo reológico de Herschel – Bulkley, presentan las mejores características de un fluido con comportamiento de tipo plástico general (índice de consistencia de flujo  $n < 1$ ), siendo una característica esencial del yogurt. Los valores de acidez de las muestras (0.77% - 1.20%), están dentro del rango recomendado por la FAO.

## PALABRAS CLAVES

Ácido Linoléico Conjugado, yogurt, cepas lácticas.

## ABSTRACT

The study is focused on evaluating the influence of two probiotic cultures and the dose of culture during the fermentation time, on the composition of fatty acids in yogurt, in order to select the optimal conditions that guarantee a product with a high content of Conjugated linoleic acid (CLA). The experimental part consists of 4 stages: the first stage is the physical-chemical analysis of milk from 4 stables to select the one with the highest percentage of fat; The second stage consists in obtaining yogurt, following a factorial design of 2x2x3, which had as parameters the type of crop (Sacco and Vivolac) and the dose of culture per liter of milk (1 U/l and 2 U/l), in a fermentation time of 5, 6 and 7 hours; the third stage consists of the extraction of the fat material from yogurt, using a modification of the Folch method, and in the fourth stage the different fatty acids were quantified in a gas chromatograph (GC). A yogurt with an average content of 26.71 mg CLA/g fat was obtained in samples made with Sacco culture at a dose per liter of milk (1 U/l), and 11.51 mg CLA/g fat in samples made with Sacco culture at two doses per liter of milk (2 U/l); of which those prepared at two doses, and according to the Herschel-Bulkley rheological model, have the best characteristics of a fluid with a general plastic type behavior (flow consistency index  $n < 1$ ), being an essential characteristic of yogurt. The acid values of the samples (0.77% - 1.20%), are within the range recommended by FAO.

## KEYWORDS

Conjugated linoleic acid, yogurt, lactic strains.

## I. INTRODUCCION

Uno de los principales desafíos de la industria agroindustrial y alimentaria consiste en contribuir a la salud y reducir el riesgo de enfermedades en los consumidores ya que busca la inocuidad de los alimentos y que estos presenten un aporte nutricional mayor. La leche, al igual que sus derivados como el yogurt, ha sido el alimento por excelencia hace mucho tiempo por sus altas propiedades nutricionales. Recientes estudios han mostrado la relevancia de un componente de la leche, que años atrás había sido relegado a un plano inferior de importancia, el Ácido Linoleico Conjugado, conocido por sus siglas en inglés CLA (Koba y Yanagita, 2014).

El ALC está referido a un grupo de ocho isómeros que son estructuralmente similares al ácido linoleico. Las recientes investigaciones siguen descubriendo que el ALC tiene una alta gama de efectos biológicos importantes y es eficaz para prevenir enfermedades relacionadas al estilo de vida o síndromes metabólicos. Además, los informes muestran que los efectos fisiológicos del ALC son distintos entre sus isómeros, por ejemplo, el isómero trans10, cis12 es anticancerígeno, ayuda en problemas de obesidad y es antidiabético, mientras que el isómero cis9, trans11 es principalmente anticancerígeno (Koba y Yanagita, 2014).

La presente investigación tiene su justificación en el hecho de querer lograr un producto novedoso, en el que las personas aprovechen los beneficios del ácido linoleico conjugado en el yogurt, a partir de la fermentación láctea, además de las propiedades probióticas del producto. La investigación está basada en la evaluación de la influencia de dos cultivos probióticos, con 1 y 2 unidades de cultivo por litro de leche (U/l) como dosis de inóculo, para distintos tiempos de fermentación, en la variación del contenido de ácido linoleico conjugado durante la elaboración del yogurt; con el fin de encontrar las mejores condiciones para la elaboración.

El problema formulado para el proyecto fue: ¿Cuáles son los parámetros óptimos del proceso de fermentación en preparación de yogurt para obtener un producto con alto contenido de Ácido Linoleico Conjugado?

En función al problema planteado, se determinó como objetivo general, evaluar la influencia de dos cultivos probióticos y la dosis de concentración durante el tiempo de fermentación, en la cuantificación de la composición de ácidos grasos en yogurt, con el fin de seleccionar las condiciones óptimas para su elaboración con mayor contenido de ALC, y como objetivos específicos: determinar las características fisicoquímicas de la leche a usar en la preparación del yogurt con el fin de seleccionar la más conveniente a la investigación; observar la influencia de los cultivos probióticos (Sacco y Vivolac) y la dosis usada, en el perfil de los ácidos grasos en yogurt, cuantificando el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC); evaluar la influencia de los tiempos de fermentación (5, 6 y 7 horas) en el contenido de ácido linoleico conjugado (ALC), y determinar las características fisicoquímicas de las diferentes muestras de yogurt para determinar si las características son las requeridas para un yogurt.



## II. MARCO TEORICO

### 2.1 Leche

La leche es de los alimentos más complejos que encontramos en la naturaleza, por ser rica en grasas, proteínas, vitaminas y minerales, necesarias para nuestra nutrición. La leche y productos lácteos relacionados, son alimentos nutritivos que contienen numerosos nutrientes esenciales, especialmente las proteínas de la leche, que sirven como una excelente fuente de aminoácidos esenciales. Las proteínas de la leche se componen de caseínas (80%) y proteínas de suero (20%). Las caseínas son conocidas por tener fosfato y calcio, que tienen muchas funciones bioactivas, y contribuyen a una digestión eficiente. (Haug et al., 2007)

**Tabla 1.**

*Parámetros Fisicoquímicos de la leche*

<b>Parámetro</b>	<b>Leche</b>
Proteína	4.86 +/- 0.01
Contenido Graso	3.29 +/- 0.02
Sólidos Totales	13.84 +/- 0.003
Índice crioscópico	-0.527 +/- 0.01
Lactosa	4.81 +/- 0.01
pH	6.52
Acidez	0.16

Fuente: Haug et al., 2007.

La grasa de la leche está formada primordialmente por la combinación de triglicéridos y éstos a la vez están formados por un alcohol (glicerol) además de 14 o más ácidos grasos que mayormente suelen ser saturados, exceptuando al ácido oleico que es insaturado y se encuentra en mayor proporción. La unión del ácido graso con el linoleico, el butírico y caproico hace que la grasa de la leche tenga un punto bajo de fusión. La leche es un líquido, con color blanco opalescente característico por refracción de la luz,

ya que los rayos de luz inciden sobre las partículas coloidales de la leche que está en suspensión. Cuando tiene alto contenido graso, tiene un color cremoso, y se debe al caroteno que está en la grasa, cuando la leche tiene poco contenido de grasa adquiere un color ligeramente azulado (Malajovich, 2012).

Fennema (1996), sugiere que la composición de la leche de vaca varía dependiendo de las diferentes razas del ganado, como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.**  
*Componentes de la leche según razas.*

Componentes	Raza		
	Jersey	Brown swiss	Holstein
Agua	85.47	86.87	87.72
Grasa	5.05	3.85	3.41
Proteína	3.78	3.48	3.32
Lactosa	5.00	5.08	4.87
Cenizas	0.70	0.72	0.68
Sólidos Totales	14.53	13.13	12.28

Fuente: Mendoza, 2015 (De Fennema, 1996).

La leche es de los alimentos más importantes en la dieta humana, no solo en la infancia, sino que también en la juventud, para mujeres embarazadas o lactantes, y para personas mayores. El ingesta de leche y sus derivados es muy alto en los países occidentales, pero mucho menor en los países emergentes de Asia y en algunos países africanos. En los últimos años, se ha puesto en marcha políticas de prevención con respecto al consumo de grasas saturadas en la alimentación cotidiana, dando prioridad, a la necesidad de equilibrar el consumo de productos lácteos grasos, ya que, múltiples estudios, demuestran la relación que existe entre hábitos alimenticios y algunas patologías. Diabetes, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, hiperlipidemia y síndrome metabólico son signos típicos de las sociedades actuales que, normalmente, tienen relación con la forma de alimentación. Pero, la respuesta no ha sido

la óptima con respecto a la leche y sus derivados, ya que el consumo ha aminorado hasta estar por debajo de lo recomendado, pudiendo causar deficiencias de los nutrientes imprescindibles, como el calcio. A pesar de todos estos problemas, se puede concluir que la leche es un alimento indispensable y de consumo mundial (Dehesa, 2011).

### 2.1.1 Presencia de ALC en leche.

Uno de los ácidos grasos también presente en la leche es el ácido linoléico conjugado, pero suele variar la cantidad en el que se encuentra presente. Son varios los factores que determinan la proporción de ALC en la leche, siendo uno de estos factores la estacionalidad del año y el clima. Thorsdottir et al (2004), encontraron valores de ALC de 6.8 mg/g de grasa durante el verano en países europeos nórdicos; siendo estos valores contrastados con Martínez et al (2010), que encontraron valores de 9.81 mg/g de grasa en leche durante el verano en el país de México.

La concentración de ALC en leche también se le puede atribuir a la dieta, por la presencia de alfalfa, siendo ésta rica en ácidos grasos precursores del ALC (linoleico y linolénico). Los forrajes pueden estimular la rumia y la masticación, produciendo saliva que ayuda a mantener el pH ruminal con tendencia hacia la neutralidad, siendo esto indirectamente favorable a la actividad de la bacteria *Butirivibrio fibrisolvens*, responsable de la formación del ALC en el rumen (Martínez et al, 2010).

Otros factores como el nivel de producción de leche, la concentración de grasa, número de partos y la raza, tienen muy poca influencia sobre las concentraciones de ALC en la grasa de la leche, no dándoseles mucha importancia debido a esto (Kelsey, 2003; Lock, 2005).

## 2.2. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son compuestos orgánicos que tienen un grupo funcional carboxilo y una cadena hidrocarbonada larga que puede presentar entre 4 y 36 átomos de carbono. La mayor parte de los ácidos grasos naturales presenta una cantidad par de átomos de carbono que radica entre 12 y 24, siendo generalmente mayoritarios los de 16 y 18 átomos de carbono. El alto porcentaje de los ácidos grasos con número par de átomos de carbono es debido a que sus componentes se generan en las células a partir de dos unidades de carbono. Existen dos tipos principales de ácidos grasos: los ácidos grasos saturados, que son los que no tienen dobles enlaces, y los insaturados, que tienen uno o más dobles enlaces a lo largo de toda la cadena hidrocarbonada. En el grupo de los insaturados, los que más abundan son los monoinsaturados, con solo un enlace doble entre los carbonos 9 y 10. Los ácidos grasos poliinsaturados tienden a presentar un enlace doble entre los carbonos 9 y 10 y los enlaces dobles adicionales ubicados entre éste y el extremo metilo terminal de la cadena hidrocarbonada. La existencia de dobles enlaces hace posible la existencia de isómeros geométricos (cis-trans) según sea la ubicación de los sustituyentes a ambos lados del doble enlace. La mayor parte de los ácidos grasos insaturados existentes en la naturaleza presentan una configuración cis (Bionova, accedido en mayo del 2016).

Dentro de los factores que pueden afectar la composición de los ácidos grasos en la leche, que puede ser la época del año (Lock y Garnsworthy, 2003), la raza del animal (White et al., 2001) y la variación individual (Khanal y Olson, 2004), pudiendo provocar una marcada diferencia en el contenido de ALC en leche entre vacas estando en las mismas condiciones de crianza, la mayoría de autores dan por hecho en que el factor más importante de la variación se pueda deber a la dieta animal (Bauman et al., 2001).

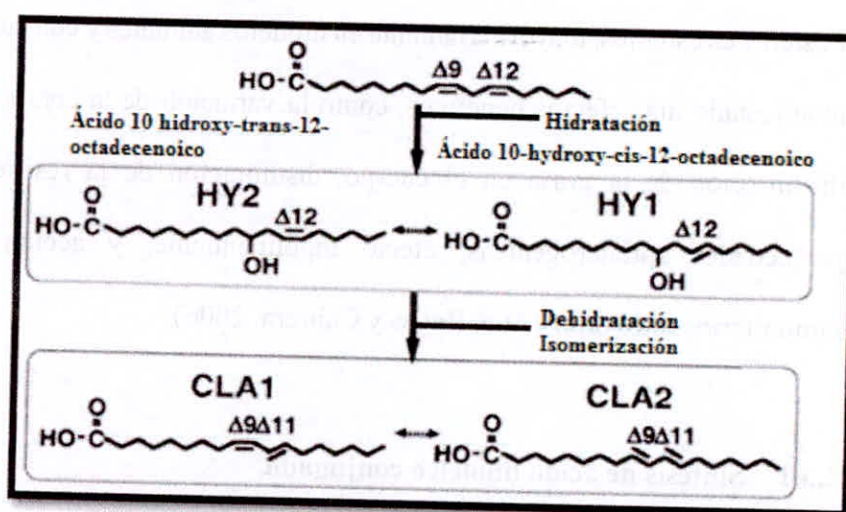
### 2.3 Ácido linoleico conjugado (ALC)

El término ácido linoleico conjugado (ALC) se refiere y contiene un grupo de isómeros posicionales (7,9; 8,10; 9,11; 10,12 y 11,13) y geométricos (cis o trans) del ácido linoleico. Las mayores proveedoras naturales de ALC son la carne de animales rumiantes, la leche y sus derivados. Los 2 isómeros más abundantes, que están de manera natural en los alimentos y que poseen una actividad biológica son el cis-9, trans-11 y el trans-10, cis-12. El ALC es conocido desde los primeros estudios de Pariza et al. en la Universidad de Winsconsin-Madison, de EE.UU., que investigando algunos componentes carcinogénicos en parrilla de carne de ternera, encontraron que ciertos ácidos grasos provenientes del ácido linoleico tenían propiedades anticancerígenas. Posteriores estudios, mayoritariamente en modelos animales y con cultivos celulares, han manifestado más efectos benéficos, como la variación de la composición corporal con disminución de la grasa en el cuerpo, disminución de la resistencia a la insulina, propiedades antiaterogénicas, efecto hipolipemiante, y acción sobre el sistema inmunitario, entre otras (Ana, Reyes y Cabrera, 2006).

#### 2.3.1 Síntesis de ácido linoléico conjugado.

El Ácido Linoleico Conjugado se sintetiza dentro del estómago de los animales rumiantes mediante la acción de microorganismos anaerobios (*Butyrivibrio fibrisolvens*, entre ellos), pudiendo hidrogenar los ácidos grasos poliinsaturados. De esta manera el ácido linoleico, que está en el pasto, pasa a ser ALC dentro del sistema digestivo del animal. Primero, en la panza se genera a partir del ácido linoleico, el isómero cis-9, trans-11, llamado ácido ruménico. El ácido ruménico llega a ser el isómero mayoritariamente más importante en la grasa de la leche y en la carne de los animales rumiantes (aproximadamente un

90% del total de isómeros), y a éste en la actualidad se le considera de una alta importancia fisiológica. A partir del ácido ruménico, por hidrogenación se genera el isómero trans-11 C18:1, llamado ácido vacénico, siendo éste un primordial ácido graso monoinsaturado trans que se encuentra en la grasa animal, en la carne, la leche y otros derivados de ésta. Podríamos decir que esto es el paso inicial para la síntesis de ácidos grasos trans. Recientes estudios muestran que, del mismo modo que pasa en los rumiantes, en el organismo de los humanos (principalmente en la glándula mamaria) el ácido vacénico puede transformarse en ácido ruménico debido a la actividad de la enzima  $\Delta$ -9 desaturasa (Turpeinen, Mutanen y Salminen, 2002).



**Figura 1.** Ruta metabólica propuesta para la bio isomerización de ALC por *Lactobacillus acidophilus*.  
(Fuente: Posible ruta de bioisomerización para la obtención de ALC por *Lactobacillus acidophilus*. Ogawa, 2005.)

### 2.3.2 Contenido de ALC en alimentos.

Los factores primordiales que ocasionan la menor o mayor aparición de ALC están condicionados con las características genéticas o fisiológicas del animal, con la forma de alimentación que se le da y con factores tecnológicos relacionados a los procesos de elaboración y/o conservación de alimentos. Con

relación al factor especie, Zlatanov S. (2002) señala un porcentaje de ALC un poco superior en quesos provenientes de la leche de oveja o cabra que de los provenientes de vaca.

El ALC está presente en muchos de los alimentos que consumimos diariamente, siendo variable el porcentaje encontrado en cada alimento. Los porcentajes de ALC son mayores en los productos de derivados lácteos (Ver tabla 3).

**Tabla 3.**

*Contenido de ALC en diferentes alimentos*

Alimento	(% de EMAG)	Alimento	(% de EMAG)
<b>Producto lácteos</b>		<b>Quesos</b>	
Leche cruda	1,16	Gouda	0,40
Leche pasteurizada	0,98	Emmental	1,16
Leche UHT	0,80	Azul	0,55
Crema	0,77	Procesado	1,11
Leche condensada	0,94	De oveja	1,01
Yogur	0,69	De cabra	0,50
Yogur probiótico	1,05	Cuajada	0,63
Mantequilla	0,94	Brie	0,49
<b>Carnes</b>		<b>Derivados cárnicos</b>	
Filete de cerdo	0,12	Salami	0,42
Chuleta de cerdo	0,15	Mortadela	0,29
Filetes de bovino	0,65	Salchicha Frankfurt	0,36
Hígado de bovino	0,43	Salchicha de hígado	0,33
Cordero	1,20	Salchicha untable	0,44
Pavo	0,20	Jamón cocido	0,27
Conejo	0,11	Jamón ahumado	0,29
Pollo	0,15	Carne picada	0,35
<b>Peces</b>			
Carpa	0,09	Salmón	0,07
Bacalao	0,03	Bagre	0,06
<b>Varios</b>			
Papas fritas	< 0,01	galleta de mantequilla	0,45
Chips de queso	0,25	Torta de mantequilla	0,49
Yogur de chocolate	0,15	Yema de huevo	0,02
Leche chocolatada	0,15	Masa de hojaldre	0,55
Chocolate amargo	< 0,01	Maiz extruido	< 0,01

Fuente: Julián Osorio, 2010 (de Fritsche, 1998).

### **2.3.3 Efecto del ALC en la composición y el peso corporal.**

La ingesta de ALC dentro de la dieta ha mostrado reducir el contenido de grasa corporal total en animales, independientemente de la cantidad de lípidos consumidos, así como de su tipo (Park, 1997; Obregón, 2009). Siendo Park et al. los primeros en mostrar que la ingesta de ALC (50% isómero cis 9, trans 11 y 50% isómero trans 10, cis 12) equivalentes a 0.5% del peso de la dieta producían una disminución de la materia grasa y un aumento de la materia magra. Blankson et al. (2000), evidenció una reducción significativa en la materia grasa en mujeres obesas luego de suplementar la dieta con 3,4 y 6,8 g de ALC (37.5% cis 9, trans 11; 37.5% trans 10, cis 12) por 12 semanas.

## **2.4 Cepas probióticas**

Desde los años 70's es estudiado el posible efecto benéfico de las sustancias probióticas, sustancias no digeribles que aportan benéficamente al consumidor debido a una estimulación selectiva del crecimiento de un grupo pequeño de microorganismos del colon (Macfarlane y Cummings, 2000), y también de las sustancias probióticas, microorganismos que, al ser consumidos como suplementos nutricionales, contribuyen con un efecto positivo en la salud (Amores R. et al, 2004). Son varios los beneficios que han sido relacionados al consumo de los probióticos y a los productos que han sido fermentados; ya que éstos mejoran la digestión de la lactosa, equilibran las funciones del intestino, haciendo fácil la evacuación gástrica, y ayudan al sistema inmune en la producción de macrófagos y anticuerpos (Meydani, 2000; Parvez S. et al, 2006). Otros estudios muestran que los microorganismos probióticas pueden modificar algunos parámetros del sistema inmunitario (Senok et al 2005; Erickson y Hubbard, 2000).



Además es sabido que los productos fermentados de la leche pueden mejorar la digestión de la lactosa y reducir los síntomas de intolerancia en mal absorbedores de la lactosa. Es creído que durante el proceso de la fermentación, que ocurre en yogures frescos y pasteurizados, se puede disminuir la lactosa en un 25-50%, aproximadamente. También, los microorganismos vivos de los yogures frescos pueden seguir generando beta-galactosidasa, pero para que esto sea efectivo dentro del intestino, es necesaria que la pared celular este intacta como forma de protección de estos microorganismos para que puedan vivir al recorrido dentro del conducto digestivo y a la acción de la bilis (Montalto et al, 2006).

La influencia del uso de cepas lácticas en la producción de ALC in vitro ha sido estudiada ampliamente. La concentración de ácido linoleico, el pH, la temperatura y el estado de crecimiento de los microorganismos son los factores que más afectan la bioproducción de ALC (Gorissen et al., 2013). Kishino et al. (2002), estudió La habilidad productora de ALC de más de 250 cepas de los géneros: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Butyrivibrio*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Aquaspirillum*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Lactococcus*.

#### **2.4.1 *Lactobacillus acidophilus*.**

Es conocido como un probiótico y es un buen microorganismo que se encuentran en la boca, tracto intestinal, y también en los genitales de los seres humanos y animales. La cepa bacteriana *Lactobacillus acidophilus* puede sintetizar ácido láctico a partir de la fermentación de la lactosa. La capacidad de hacer esto, ayuda al proceso de la digestión de los alimentos. Con los niveles de acidez incrementados, ayuda a fomentar la absorción de calcio y minerales, y ofrecen niveles bajos de pH. El *Lactobacillus acidophilus* también puede generar

peróxido de hidrógeno y que puede ayudar a suprimir patógenos. Crece a una temperatura de alrededor de 30 °C, las colonias de *Lactobacillus acidophilus* deben ser lo suficientemente grandes, para que ayuden con la digestión. Por el contrario, si las colonias son muy pequeñas, no nos podrán ayudar a obtener todos los nutrientes de los alimentos que hemos consumido, causando problemas gastrointestinales (University of Maryland Medical Center, accedido en mayo de 2016).

Asimismo Wei (2014), reportó altas conversiones (86.4%) de ácido linoleico en ALC utilizando células permeabilizadas de *Lactobacillus acidophilus*; mientras que con células intactas solo se logró una conversión fue de 38.5%

#### **2.4.2 Bifidobacterium lactis.**

El *Bifidobacterium lactis* es un microorganismo beneficioso que tiene varios componentes nutricionales importantes. Ayuda en la lucha contra el daño que provocan las bacterias malas del cuerpo y ayuda en la digestión. Se encuentra generalmente en los intestinos de las personas. El *Bifidobacterium lactis* es de los probióticos más benéficos y se suele añadir a productos lácteos como el yogur (Drugs, accedido en mayo del 2016).

#### **2.4.3 Streptococcus thermophilus.**

El *Streptococcus thermophilus* es un microorganismo gram positivo anaerobia facultativa. Entonces puede crecer con presencia o con ausencia de oxígeno, pudiendo realizar de esta forma tanto la respiración convencional como procesos fermentativos, en el que podemos hablar de la elaboración del yogur. “Por el tipo de fermentación que realiza, es considerada una bacteria ácido láctica y por su capacidad para formar parte de la flora bacteriana se encuentra dentro del grupo

de las bacterias probióticas” (Omicrono, accedido en mayo del 2016).

#### 2.4.4 *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus.*

Las cepas del *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* son sensibles al cambio de pH de la presencia de las enzimas, pero en absoluto valores de pH y en presencia de enzimas de alta concentraciones de células viables se mantuvieron. La supervivencia del probiótico a cepas en el tracto intestinal también está influenciado por las sales biliares. Es bien sabido que aproximadamente 3h después de cada comida la concentración de sales biliares en el intestino delgado alcanza aproximadamente el 0,3%. Esto requiere el estudio de la influencia de diferentes concentraciones de sales biliares en el desarrollo del *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* (Shihata y Shah, 2002).

#### 2.5 Fermentación láctica

La fermentación láctica es provocada por ciertos hongos y bacterias. La bacteria más importante que produce ácido láctico es el *Lactobacillus*. Algunas bacterias que también producen ácido láctico son: *Streptococo lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus cerevisiae* y *Bifidobacterium bifidus* (Ye et al., 2008).

La fermentación láctica es usada alrededor del mundo para producir varias comidas:

- Mundo Occidental: yogur, encurtidos de pepino, chucrut y aceitunas.
- Medio Oriente: verduras en escabeche
- Corea: kimchi (mezcla fermentada de col china, pimienta, rábanos, ajo y jengibre)
- Rusia: kéfir
- Egipto: rayab de laban y zeer de laban (leche fermentada), kishk (mezcla de leche fermentada y cereal)
- Nigeria: gari (mandioca ó yuca fermentada)

- Sudáfrica: magou (avena de maíz fermentada)

Durante la fermentación láctica es producido el ácido láctico, siendo este el causante del sabor amargo, y de mejorar la seguridad y estabilidad microbiológica del alimento. El ácido láctico fermentado es el causante del sabor amargo de productos lácteos como el yogurt, queso y el kéfir. El ácido láctico fermentado también provoca el sabor amargo para fermentar vegetales, tales como los sauerkraut y pikles. El azúcar en las coles es transformada a ácido láctico y es usado como preservante. El ácido láctico (LA) es un producto químico importante que se utiliza ampliamente en las industrias alimentarias, farmacéuticas y químicas (Mazzoli et al, 2014; Jiang et al, 2011). El continuo aumento de la demanda de ácido láctico ha dado lugar a una tasa de crecimiento anual del 15% del mercado mundial (Ye et al., 2008).

La concentración de ALC en productos lácteos, principalmente depende de la concentración de los isómeros en la leche de partida, y de las reacciones que puedan ocurrir durante el proceso de elaboración. A pesar de esto, el hecho de que parte del ALC sea producido en el rumen por la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens*, ha logrado que crezca la expectativa de que otras bacterias, incluidas a las que normalmente son usadas en la industria láctea, también puedan producir ALC (Sieber et al., 2004; Bisig et al., 2007).

Diversas investigaciones han evaluado la influencia de la fermentación láctea en la concentración del ALC. Algunos de estos resultados muestran que durante el proceso fermentativo no se producen cambios en el contenido de ALC (Boylston & Beitz, 2002; Akalin et al., 2007; Dave et al., 2002), mientras que otros autores indican que el uso de bacterias ácido lácticas puede aumentar (Pandit et al., 2012; Shantha et al., 1995; Sieber et al., 2004) o disminuir (Santos-Junior et al., 2012) la concentración de ALC en productos lácteos sometidos a fermentación.

## 2.6 Yogurt.

El yogur o yogurt es un derivado lácteo fermentado, obtenido mediante la fermentación del ácido láctico debido a la acción de *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El ácido láctico resultante reacciona con proteínas de la leche, la promoción de la textura característica y las propiedades sensoriales de este producto (Serafeimidou, Zlatanov, Kritikos, y Tourianis, 2013). Yogures son muy apreciados, y puesto que se consideran importantes en la dieta humana, que se producen y consumen masivamente en muchos países (O'Connell y Fox, 2001; Serafeimidou, 2013; Shori y Baba, 2014).

**Tabla 4.**  
*Características Fisicoquímicas y Microbiológicas del yogurt comercial*

	Entero	Semidescremado	Descremado
Materia Grasa	≤ 2.5	≤ 1.5	≥ 0.8
Sólidos lácteos no grasas	7.0	7.0	7.0
Acidez como ácido láctico % mínimo	0.70 – 1.50	0.70 – 1.50	0.70 – 1.50
Prueba Fosfatasa	negativo	negativo	negativo

Fuente: Resolución 2310/86. Derivados Lácteos.

También se sabe que los productos de la fermentación del yogurt ayudan en la digestión de la lactosa y los síntomas de intolerancia en los mal absorbedores de ésta. Se calcula que en el proceso de fermentación de yogures frescos y pasteurizados, disminuye el porcentaje de lactosa en un 25 a 50%, aproximadamente. También, los microorganismos vivos de los yogures frescos seguirán generando betagalactosidasa, pero para que esto se alcance en el intestino, es necesario que la pared celular este intacta como mecanismo de protección de los microorganismos para que puedan vivir al recorrido del conducto digestivo y a la acción de la bilis (Montalto et al., 2006).

### 2.6.1 Tipos de yogurt.

El yogurt es elaborado con leche generalmente de vaca, y esta puede ser entera o descremada, además de no tener antibióticos. En algunos otros países se elabora de otras especies (cabra, yegua, búfalo). Generalmente la leche puede ser modificada agregando leche descremada en polvo o también otros sólidos de la leche como caseinatos, o por la concentración con un proceso de evaporación normal con un solo efecto, por osmosis inversa o por ultrafiltración (Malajovich, 2012).

Hay dos preparaciones diferentes: la forma clásica que es con bacterias vivas, y sus efectos benéficos vienen, por un lado, de la acción de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus* en la leche que ha sido transformada en yogur (producción de lactasa y generación de ácido láctico mayormente) y, también, a la posible acción benéfica que generan estos microorganismos vivos al quedarse en la microbiota intestinal. La otra forma de elaboración, pasteurizado luego de la fermentación, los efectos benéficos solo provienen exclusivamente del consumo de los productos de fermentación que tiene las bacterias en la leche (Ballesta et al, 2007).

Hernández (2004), menciona que en la actualidad se elaboran diferentes tipos de yogurt, los cuales varían en su composición química, método de producción, sabor, textura, consistencia y proceso post-incubación entre ellos están: yogurt afianado, yogurt batido, yogurt líquido.

**Tabla 5.***Tipos de yogurt.*

Por el contenido graso	Por la consistencia del gel	Por su aroma y sabor	Por su tratamiento post-incubación
Yogurt entero	Yogurt aflanado	Yogurt natural	Yogurt tratado térmicamente
Yogurt semidescremado	Yogurt batido	Yogurt frutado	Yogurt congelado
Yogurt descremado	Yogurt bebible o líquido	Yogurt aromatizado	Yogurt deshidratado Yogurt concentrado

Fuente: Hernández, 2004.

### 2.6.2 Contenido de ALC presente en yogurt.

Prandini (2007), estudió niveles de ácido linoléico conjugado (ALC) en productos de derivados lácteos procedentes de Italia. Las muestras de yogurt mostraron un contenido de ALC de  $5.20 \pm 1.30$  mg ALC/ g grasa, valor superior al encontrado en muestras de probióticos ( $4.99 \pm 1.19$  mg ALC/ g grasa) mostrando diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, las muestras de yogurt elaborado a partir de la leche de oveja presentaron mayor contenido de ALC ( $6.92 \pm 1.48$  mg ALC/ g grasa). En el estudio también se revela sobre la base del contenido de grasa, que las muestras pueden ser divididas en productos bajos en grasa como probióticos y leche fermentada (grasa  $< 2\%$ ), provenientes de animales alimentados con pastos de montaña; productos con contenido de grasa entre 2 y 3 % como el yogurt probiótico; productos relativamente altos en concentración de grasa con promedios de entre 4-5%, como el yogurt estándar y yogurt derivado de leche de animales alimentados con pastos de montaña; y finalmente están los productos ricos en grasa con valores superiores a 6%, estando en esta categoría el yogurt derivado de leche de oveja (Prandini et al, 2007).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Insumos.

- Leche pasteurizada
- Leche en polvo
- Azúcar

##### 3.1.2 Reactivos.

- Sodio Anhidro 0.5M
- Cloruro de potasio (0.88% w/v)
- Ácido Linoleico Conjugado (Estándar)
- Helio (Gas de arrastre)
- Cloroformo – Metanol
- Nitrógeno (forma de gas)
- Isoctano
- Trifloruro de Boro
- Cloruro de sodio
- Hidróxido de sodio 0.5N

##### 3.1.3 Cultivos Probióticos.

- Cepas lácticas (Marca Sacco)
- Cepas lácticas (Marca Vivolac)



### 3.1.4 Materiales de vidrio.

- Probetas (100 y 500ml)
- Vasos precipitados (500 y 1000ml)
- Placas Petri
- Matraces Erlenmeyer (500 ml)
- Tubos de ensayo
- Decantador
- Pipeta de (1, 2, 5, 10) ml
- Viales para Cromatógrafo

### 3.1.5 Otros materiales.

- Bolsas de polipropileno litografiadas.
- Mesa de acero inoxidable
- Jarras plásticas
- Paletas de plástico
- Gradilla de tubos de ensayo para (24,48) tubos
- Termómetro
- Ollas
- Cocina

### 3.1.6 Equipos e Instrumentos.

- **Equipo** : pH-metro  
Marca : Thermo Fisher Scientific.  
Modelo : Orion Versastar

- **Equipo : Estufa**  
 Marca : POL-EKO APARATURA  
 Modelo : SW-17TC
  
- **Equipo : Reómetro rotacional**  
 Marca : BROOKFIELD  
 Modelo : RHEOMETER R/S plus
  
- **Equipo : Cromatógrafo de Gases**  
 Marca : SHIMADZU  
 Modelo : 2010
  
- **Equipo : Balanza Analítica**  
 Marca : ADAM  
 Modelo : PW-254
  
- **Equipo : Rotavapor**  
 Marca : IKA®  
 Modelo : RV 10

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Metodología de Análisis.

#### 3.2.1.1 Obtención de las muestras de yogurt.

Los puntos más relevantes en la preparación de yogurt, y que determinan las características propias de éste como el sabor, aroma y textura, son el inóculo del cultivo probiótico y el tiempo de fermentación. Es en la inoculación en donde se determinó los parámetros para cada muestra. La figura 2 muestra el diagrama de flujo del proceso para la elaboración del yogurt.

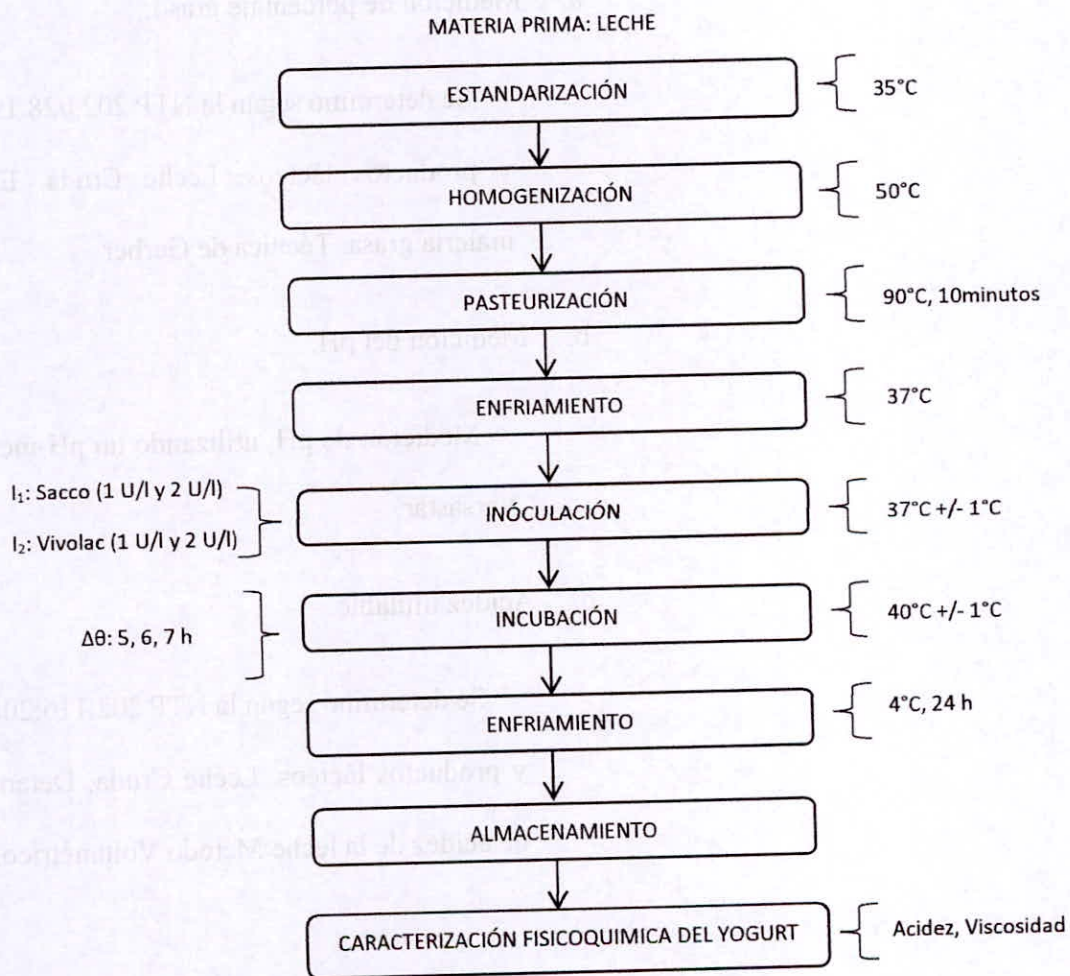


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso para obtención de yogurt

### 3.2.1.1.1 *Materia prima.*

Se utilizó leche de vaca de raza HOLSTEIN Criolla, proveniente de un establo ubicado en el Distrito de Santa (Coordenadas 8°58'59"S 78°36'00"O) provincia de Santa, Ancash. Se compró 20 litros de leche para que los ensayos de laboratorio previstos durante la etapa experimental puedan ser cubiertos. Para la caracterización se usaron los siguientes métodos: Grasa (Técnica de Gerber), pH, Acidez titulable.

#### a. Medición de porcentaje graso.

Se determinó según la NTP 202.028:1998 Leche y productos lácteos. Leche Cruda. Ensayo de materia grasa. Técnica de Gerber.

#### b. Medición del pH.

Medición de pH, utilizando un pH-metro Orion

Versastar.

#### c. Acidez titulable.

Se determinó según la NTP 202.116:2000 Leche y productos lácteos. Leche Cruda. Determinación de acidez de la leche Método Volumétrico.

### 3.2.1.1.2 Preparación del yogurt.

#### a. Estandarización y homogenización.

En la leche se agregó 714 g de leche en polvo y 1.5 Kg de azúcar, estandarizándose a 11% de sólidos totales. Toda la mezcla fue homogenizada a 50°C. Finalmente se fraccionó el volumen obtenido en una cantidad de 500 ml por muestra, de forma que permitiese dos repeticiones para cada experimento.

#### b. Pasteurización y enfriamiento.

Las muestras de leche estandarizada fueron sometidas a un tratamiento térmico de 90 °C durante 10 minutos y fueron enfriadas rápidamente a 37 °C.

#### c. Inoculación.

En forma paralela se disolvieron, mediante una agitación suave, las mezclas de cepas o cultivo. Las dosis usadas fueron una unidad de cultivo por litro de leche (1U/l) y dos unidades de cultivo por litro de leche (2U/l) (Ver Anexo 5).

Se usaron dos fermentos liofilizados VIVOLAC LIOFAST y SACCO LIOFAST. Estos cultivos lácticos termófilos están constituidos por una mezcla ya definida de cepas que contiene principalmente: *Streptococcus thermophilus*,

*Lactobacillus delbruekii* subesp. *bulgaricus* y

*Lactobacillus delbruekii* subesp. *lactis*.

d. Incubación.

Las muestras en reposo fueron colocadas en el equipo de incubación a 40 °C, durante 5, 6 y 7 horas.

e. Enfriamiento y almacenamiento.

Las muestras fueron almacenadas en cámara frigorífica a 4 °C durante 24 horas.

El almacenamiento en frío luego de la fermentación, es realizado para evitar una sobre acidificación y de esta manera garantizar la producción de aromas, textura y consistencia. Por otro lado, entre 24 y 48 horas es el período de estacionamiento en cámara frigorífica que se utiliza generalmente en la industria, antes de que el producto fermentado salga a la venta.

Al cabo de las 24 horas de almacenamiento, se tomaron las muestras de cada yogurt obtenido, previamente homogeneizados.

### 3.2.1.2 *Diseño experimental.*

Se realizó un diseño factorial de 2x2x3, el cual tuvo como factores el tipo de cultivo, la dosis y el tiempo de fermentación. En el análisis de varianza se utilizó el modelo GLM (General Linear Models). En la tabla 6 se observan las muestras resultantes de la combinación de los distintos factores.

**Tabla 6.**

*Diseño experimental de los tratamientos*

<b>Plan de experimentación</b>				
<b>N° Ensayo</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Dosis (U/l leche)</b>	<b>Tiempo de fermentación (horas)</b>	<b>Muestra</b>
1	Sacco	1	5	S15
2	Sacco	1	6	S16
3	Sacco	1	7	S17
4	Sacco	2	5	S25
5	Sacco	2	6	S26
6	Sacco	2	7	S27
7	Vivolac	1	5	V15
8	Vivolac	1	6	V16
9	Vivolac	1	7	V17
10	Vivolac	2	5	V25
11	Vivolac	2	6	V26
12	Vivolac	2	7	V27

### 3.2.2 **Análisis de muestras.**

#### 3.2.2.1 *Extracción de la materia grasa (Modificación al método de Folch et al).*

Las muestras de grasa del yogurt fueron extraídas mediante el método de Folch et al (1957) con algunas modificaciones. Para esto

se toma aproximadamente 15 gr de muestra que son mezclados con 60 ml de cloroformo-metanol (2:1) y centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos, la mezcla es transferida a una pera de decantación y luego se mezcla fuertemente con 18.8 ml de KCl (0.88% w/v). Luego se separa la fase orgánica, y es filtrada y llevada a un rotavapor a 350 mbar a 20 RPM por 15 min, para retirar los solventes a vacío, las muestras son puestas en viales donde se secan con nitrógeno gaseoso y es almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para un posterior análisis.

### **3.2.2.2 Cuantificación de ésteres metílicos de ácidos grasos.**

#### **3.2.2.2.1 Preparación de FAME's.**

Las muestras de grasa son convertidas en sus ésteres metílicos correspondientes de ácidos grasos, conocido por sus siglas en inglés (FAME's), de la siguiente manera: Pesamos aproximadamente 0,025g de muestra en un tubo de ensayo, añadimos 1,5ml de solución de Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,5 N al tubo de ensayo y cubrimos con una tapa de Nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), llevamos a baño maría T ( $80-90^{\circ}\text{C}$ ) durante 5 minutos, enfriamos los tubos de ensayo, añadimos 2ml de Trifluoruro de Boro ( $\text{BF}_3$ ) y cubrimos con una capa de Nitrógeno ( $\text{N}_2$ ). Posteriormente tapamos y agitamos lentamente, luego llevamos a baño maría durante 30 minutos, y enfriamos la muestra hasta  $30 - 40^{\circ}\text{C}$ . Añadiendo después 1ml de isoctano, cubrimos con Nitrógeno ( $\text{N}_2$ ) y agitamos durante 30 segundos. Añadimos 5ml de solución de



Cloruro de Sodio (NaCl) y cubrimos con Nitrógeno (N<sub>2</sub>) y agitamos vigorosamente. Dejamos reposar hasta que se observe 2 fases, extraemos la fase orgánica y cubrimos con Nitrógeno (N<sub>2</sub>).

#### 3.2.2.2.2 *Análisis por Cromatografía de Gases (GC).*

Los FAMES fueron analizados por un cromatografo de gases (CG), usando el equipo SHIMADZU (Modelo 2010). La programación del horno inicia a una temperatura de 60°C (Isotérmico por 1 minuto) y se eleva hasta 190°C a 20°C/min y un periodo isotérmico de 12,5 minutos a 190°C, haciendo un tiempo total de 60 minutos por análisis. El inyector y el detector se encuentran a 250°C y se usa Helio como gas de arrastre con flujo de 2.0 mL/min. La separación de los FAMES es realizada mediante una columna capilar Rt<sup>TM</sup>-2560 (100 m x 0.25 mmID x 0.2 µm df). Los ácidos grasos son identificados por la comparación de los tiempos de retención de los correspondientes estándares de FAME (C4-C20 y ALC) en las mismas condiciones. Las áreas de los picos son integradas usando un software. Se usó el método de estándar interno para la cuantificación e identificación del ácido linoleico conjugado, realizando la curva de calibración.

### 3.2.2.3 *Determinación de acidez*

Se determinó según la NTP 202.116:2000 Leche y productos lácteos. Determinación de acidez del yogurt Método Volumétrico.

### 3.2.2.4 *Reología del yogurt.*

Se realizó con un reómetro rotacional (BROOKFIELD, RHEOMETER R/S plus) (Manual) con cilindros concéntricos. El equipo cuenta con un sistema manual de variación de velocidad del cilindro interno. La tasa de deformación variará entre 4,45 y 445,5 Pa-s<sup>-1</sup>. Los datos ascendentes y descendentes fueron usados para graficar la tasa de deformación (1/s) y el esfuerzo cortante (Pa) y obtener mediante regresión los parámetros del modelo de ley de potencia (K índice de consistencia (Pa/s) y n índice de flujo) (Basak S., 1994; Benezech T., 1994).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Análisis en Materia Prima

Los análisis se realizaron para determinar de qué establo se compraría la leche. El punto más importante a tomar en cuenta fue el contenido graso, ya que de ello dependen nuestros resultados de contenido de ALC. Los 4 establos visitados para adquirir la leche y escoger la mejor opción que se adecue a nuestras exigencias, son:

- Los Álamos (Nuevo Chimbote)
- El Rancho (Santa)
- De la Cruz (Santa)
- Marino (Santa)

Se realizó la caracterización en la leche de los cuatro establos. Los parámetros medidos fueron pH, acidez y % de contenido graso en la leche. A continuación, se presentan los resultados obtenidos

**Tabla 7.**

*Acidez, pH y contenido de ácido graso de leche de establos*

	ACIDEZ		pH	CONTENIDO GRASO (%)
	%	°D		
LOS ALAMOS	0.1665	16.65	6.78	2.5
EL RANCHO	0.1665	16.65	6.77	2.4
DE LA CRUZ	0.1755	17.55	6.82	3.8
MARINO	0.171	17.1	6.82	3.6

En la tabla 7, se observa un contenido graso variable en la leche, oscilando entre 2.5 y 3.6%, en concordancia con Bauman et al. (2006), quienes comentaron que la concentración lipídica y la composición de los ácidos grasos en la leche, presentan diferencias entre e intra especie. Además Ěejna y Chládek (2005), reportaron que el

contenido graso en la leche de vacas Holstein, oscila entre 3.5 y 4.7 %, estando dos de las muestras dentro del rango indicado por estos autores. Esta variación de porcentaje graso varía de una muestra a otra, debido a la forma de alimentación, la lactacia y época del año (Malajovich, 2012). Variaciones en la producción de grasa láctea, dentro de un grupo de vacas alimentadas en similares condiciones, indican que la producción de grasa también depende de la capacidad metabólica individual de cada vaca (Soyeurt et al., 2006).

Se consideró escoger al establo “De la Cruz”, ya que presenta el más alto porcentaje graso (3.8%), siendo ideal para el estudio del ALC; ya que éste al ser un ácido graso, tendrá mayor presencia luego de la fermentación de la leche.

Los análisis de pH y acidez se usaron para determinar la calidad de la leche a usar. Como se observa en la tabla 7, los valores de pH (6.78 - 6.82) y los valores de acidez (16.65 – 17.1 °D) están dentro del rango aceptable de los valores de referencia para considerar leche en estado normal. Así también González et al. (2010), indica que la leche normal presenta una variación de pH de entre 6.6 a 6.8, lo que corresponde a 16-18° en la escala Dornic (°D).

Establo	pH	Acidez (°D)
LOS MARIOS	6.78	16.65
LA PACHA	6.82	17.1
LA CRUZ	6.80	17.0
MARINO	6.81	17.05

## 4.2 Análisis en muestras de yogurt

### 4.2.1 Acidez del yogurt.

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos para las muestras de yogurt, estando todas dentro los parámetros contemplados dentro de la Resolución 2310/86 de derivados lácteos.

**Tabla 8.**

*Resultados de acidez de muestras de yogurt*

<b>Tratamiento</b>	<b>Muestra</b>	<b>%Acidez</b>
Sacco (1 U/l)	S15	0.77 ± 0.02
	S16	0.79 ± 0.004
	S17	0.85 ± 0.04
	S25	0.81 ± 0.01
Sacco (2 U/l)	S26	0.85 ± 0.01
	S27	0.88 ± 0.01
	V15	0.75 ± 0.02
Vivolac (1 U/l)	V16	0.82 ± 0.01
	V17	0.86 ± 0.00
	V25	1.11 ± 0.02
Vivolac (2 U/l)	V26	1.17 ± 0.01
	V27	1.20 ± 0.02

En la tabla se observa que la acidez en las muestras con cultivo Sacco y cultivo Vivolac, a dos dosis (2 U/l), es mayor que la acidez de las muestras con una dosis (1 U/l). Estos resultados son predecibles, ya que a mayor concentración de cultivo, mayor es la acidificación que provocan las cepas en la leche. Los valores de acidez de las muestras de yogurt, se encuentran entre 0.77% y 1.20%; estando por encima de 0.70% que es lo recomendado por la FAO. Como se observa en la tabla 9, según la Resolución 2310/86 Derivados lácteos, el porcentaje de acidez que deben presentar las muestras de un yogurt entero se debe encontrar entre 0.70 y 1.50, estando los valores obtenidos dentro de este rango.

Parra Huertas R., Martínez Coy G y Espinosa Suescún J., encontraron que en muestras de yogurt que contenían stevia, presentaron la concentración de ácido láctico más alta, alcanzando 1,13 % de ácido láctico al final del tiempo de fermentación.

**Tabla 9.**

*Características Fisicoquímicas y Microbiológicas del yogurt*

	Entero	Semidescremado	Descremado
Materia Grasa	≤ 2.5	≤ 1.5	≥ 0.8
Solidos lácteos no grasas	7.0	7.0	7.0
Acidez como ácido láctico % mínimo	0.70 – 1.50	0.70 – 1.50	0.70 – 1.50
Prueba Fosfatasa	negativo	negativo	negativo

Fuente: Resolución 2310/86. Derivados Lácteos.

#### 4.2.2 Análisis reológico en muestras de yogurt.

En la tabla 10 se presenta los 3 modelos reológicos promediando el valor del coeficiente de determinación para observar la mejor regresión.

**Tabla 10.**

*Valores de coeficiente para cada modelo reológico.*

CULTIVO	TRATAM.	MODELOS REOLOGICOS		
		Bingham	Ostwald	Herschel- Bulkley
Vivolac	5°	0.9905	0.89	0.99883
	6°	0.9982	0.9491	0.99755
	7°	0.9956	0.9341	0.99758
Sacco	5°	0.9993	0.9832	0.99794
	6°	0.9987	0.9855	0.99990
	7°	0.9974	0.9785	0.99989
PROMEDIO		0.9966	0.9534	0.99861

De todos los tratamientos usados en el proceso de obtención del yogurt, notamos que la regresión de modelo reológico de Herschel-Bulkley es la mejor y la que más se acerca a 1; siendo este modelo también usado por Skriver et al. (1993), que estudiaron las características reológicas de yogurt batido, variando los contenidos de materia y temperatura de fermentación (32 a 43°C), y un comportamiento plástico del yogurt, el cual fue descrito usando el modelo de Herschel-Bulkley y el modelo de Casson.

Asimismo, Shaker et al. (2000), en la caracterización reológica de yogurt, han demostrado que éste es un fluido que presenta un comportamiento no Newtoniano de tipo plástico general con un esfuerzo de cedencia, además de que los modelos de Casson y el de Herschel-Bulkley son los que mejor describen este comportamiento.

**Tabla 11.**

*Índice de consistencia (K), índice de consistencia de flujo (n) y umbral de fluencia ( $\sigma_0$ ) para los tratamientos*

	Tratamiento	K (Pa.s)	n	$\sigma_0$ (Pa)
VIVOLAC	V5	0.0718	1.0977	1.2171
	V6	0.1215	1.0633	1.5734
	V7	0.1175	1.0651	1.8744
SACCO	S5	0.137	0.9609	0.9042
	S6	0.3097	0.8851	0.6046
	S7	0.3648	0.8717	0.6752

En la tabla 11 se puede apreciar que de todos los tratamientos realizados, los elaborados con el cultivo probiótico SACCO tienen un índice de consistencia de flujo (n) menor a 1, comportándose como fluidos del tipo plástico general y obedeciendo todos a la ecuación de Herschel-Bulkley, mientras que su índice de consistencia (K) es muy diferente, esto se debe a lo completo del gel y a la composición de todos los productos; así entonces, los yogures que han sido elaborados con el cultivo probiótico SACCO generan un yogurt más viscoso y con un coeficiente de consistencia mayor. Asimismo Enriquez et al. (2012), observaron un comportamiento de fluido no newtoniano tipo plástico general en 4 muestras diferentes de yogurt preparadas con cultivos VIVOLAC y SACCO.

Steffe (1996), también señala que el yogurt, es un fluido tixotrópico, siendo esto un fluido no-newtoniano dependiente del tiempo, y cuya viscosidad aparente depende no solo de la velocidad de deformación, sino también del tiempo durante el cual actúa la tensión tangencial,



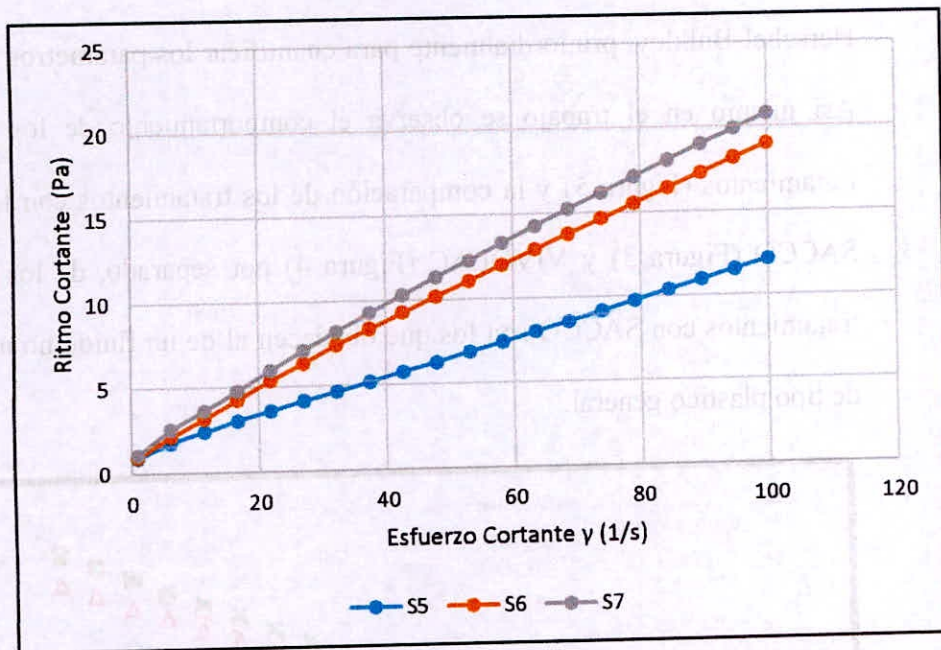


Figura 3. Reograma de los tratamientos con cultivo probiótico SACC0.

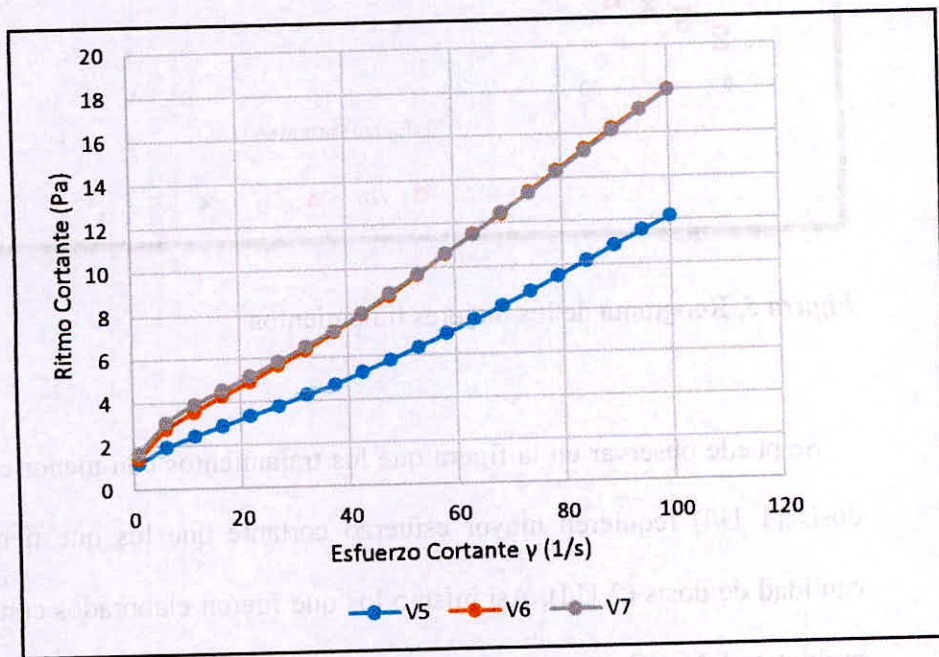
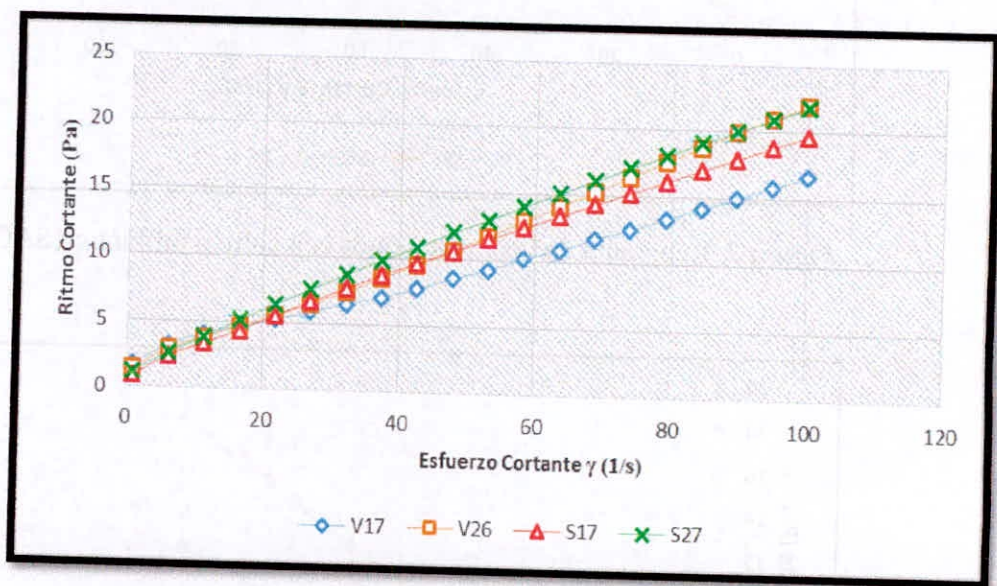


Figura 4. Reograma de los tratamientos con cultivo probiótico VIVOLAC.

En todos los trabajos sobre reología de yogurt fue usado el modelo de Herschel-Bulkley, primordialmente para cuantificar los parámetros reológicos. Así mismo en el trabajo se observa el comportamiento de los 4 mejores tratamientos (Figura 5) y la comparación de los tratamientos con los cultivos SACCO (Figura 3) y VIVOLAC (Figura 4) por separado, de los cuales los tratamientos con SACCO son los que obedecen al de un fluido no newtoniano de tipo plástico general.



**Figura 5.** Reograma de los mejores tratamientos.

Se puede observar en la figura que los tratamientos con menor cantidad de dosis (1 U/l) requieren mayor esfuerzo cortante que los que tienen mayor cantidad de dosis (2 U/l). Así mismo los que fueron elaborados con el cultivo probiótico SACCO presentan menor esfuerzo cortante que los elaborados con el cultivo probiótico VIVOLAC.

Una disminución en la viscosidad aparente con un incremento en el esfuerzo cortante (pseudoplasticidad) también ha sido observada anteriormente en otros estudios, como en yogurt fortificado con salvado de trigo (Aportela et al., 2005)

y yogurt con inulina (Paseephol et al., 2008), yogurt con calcio y fibra (Velez et al., 2012), entre otros; asimismo la sensación de grumosidad o granulosidad que presenta un yogurt, puede estar relacionada con el cultivo que se utiliza; recomendándose en caso de presentarse este defecto, cambiar el cultivo por uno que confiera mayor viscosidad al yogurt (Tamime y Robinson, 1991).

**Tabla 12.**

*Índice de consistencia (K), índice de consistencia de flujo (n) y umbral de fluencia ( $\sigma_0$ ) para los mejores tratamientos obtenidos con respecto a reología.*

	Tratamiento	K (Pa.s)	n	$\sigma_0$ (Pa)
VIVOLAC	V17	0.1282	1.0246	2.0783
	V26	0.1533	1.0637	1.4808
SACCO	S17	0.333	0.8791	0.9122
	S27	0.3965	0.86426	0.7382

En la Tabla 12 se puede apreciar que los 4 mejores tratamientos tienen un índice de consistencia de flujo (n), y que solo dos son menores a 1 comportándose como fluidos del tipo plástico general y obedeciendo todos a la ecuación de Herschel-Bulkley, mientras que su índice de consistencia (K) es muy diferente, esto se debe a la composición de todos los productos, siendo así que los yogures que han sido elaborados con el cultivo probiótico SACCO generan un yogurt más viscoso y con un coeficiente de consistencia mayor. Enriquez et al. (2012), no encontraron diferencias significativas entre el uso del cultivo VIVOLAC o SACCO a altas concentraciones de sólidos totales (15%) en el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento (n).

### 4.2.3 Porcentaje de Ácido Linoleico Conjugado.

El objetivo central del presente trabajo es encontrar el mejor tratamiento para obtener valores altos de ALC, y con ese motivo se compararán todos los resultados obtenidos por tratamiento. Los resultados, que fueron obtenidos usando un Comatógrafo de gases, son expuestos en la siguiente tabla.

**Tabla 13.**

*Resultados de análisis de concentración de Ácido Linoleico Conjugado.*

Nº	Muestra	Tiempo Ret.	ALC (mg/g grasa)	ALC (mg/g yogurt)
1	S15	48.672	41.66	1.533 ± 0.272
2	S16	48.68	23.60	0.868 ± 0.154
3	S17	48.668	14.86	0.547 ± 0.097
4	S25	48.658	20.38	0.750 ± 0.133
5	S26	48.68	14.15	0.521 ± 0.092
6	S27		NO DETECTADO	
7	V15	48.293	1.51	0.055 ± 0.009
8	V16	48.29	1.80	0.066 ± 0.012
9	V17	48.283	2.21	0.081 ± 0.014
10	V25	48.662	11.12	0.409 ± 0.073
11	V26	48.672	16.85	0.620 ± 0.110
12	V27	48.672	18.32	0.674 ± 0.119

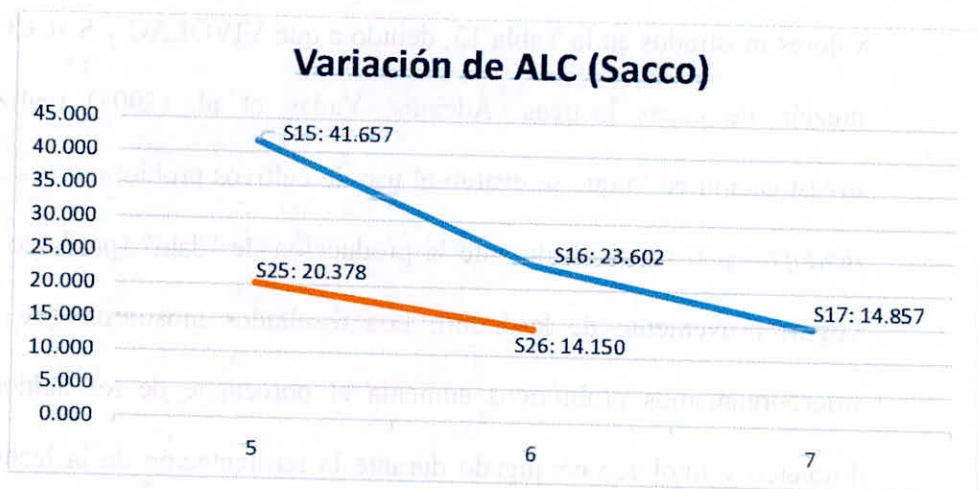
Valores obtenidos para el isómero cis-9, trans-11 ALC.

En la Tabla 13 observamos los resultados obtenidos para todas las muestras de yogurt. Los valores más bajos de concentración de ALC están entre 1.51 – 2.21 mg/g y pertenecen a las muestras con cultivo Vivolac a una dosis, mientras que los valores más altos están entre 11.12 – 41.66 mg/g, siendo valores que superan los resultados obtenidos por diferentes autores, como Serafeimidou y col. (2012) que reportaron 1.28 – 15.01 mg/g grasa; Sieber et al. (2004), 3.82 – 6.22 mg/g y Prandini et al. (2007), 4.42 – 4.99 mg/g, en distintas variedades de yogures.

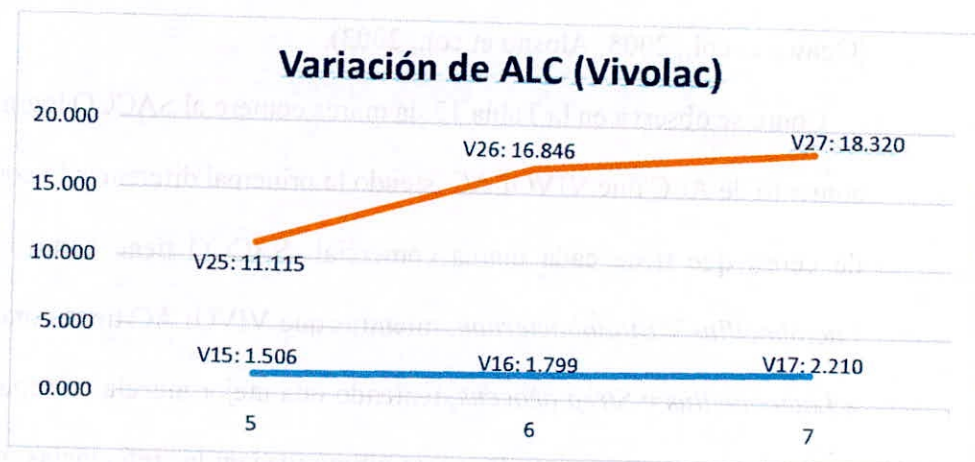
Lin (2003) informó que al usar cultivos mixtos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) en presencia del ácido linoleico, se incrementaba significativamente el contenido de ALC (isómero C18:2 cis9, trans11) (2,95 vs. 1,10 microgramos/g yogur,  $p < 0,05$ ), sin que se desarrollasen características indeseables en la calidad sensorial del producto final, y generando así incrementos de hasta el 200% en el contenido de ALC; siendo, lo dicho por este autor, correspondiente con los altos valores mostrados en la Tabla 13, debido a que VIVOLAC y SACCO, son una mezcla de cepas lácticas. Además, Yadav et al. (2007) realizaron una investigación en la que se evaluó el uso de cultivos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *L. casei*) durante la producción de "dahi" (producto similar al yogur, proveniente de la India). Los resultados mostraron que el uso de microorganismos probióticos aumenta el porcentaje de los ácidos butírico, linoleico y linoleico conjugado durante la fermentación de la leche y que el contenido de ALC se mantiene perenne en el tiempo de almacenamiento. "Estos informes coinciden con otros anteriores que muestran la capacidad que tienen las bacterias del ácido láctico para transformar el ácido linoleico en ALC" (Ogawa et col., 2005; Alosno et col., 2003).

Como se observa en la Tabla 13, la marca comercial SACCO logra un mayor aumento de ALC que VIVOLAC, siendo la principal diferencia la combinación de cepas que tiene cada marca comercial. SACCO tiene como especies al *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras que VIVOLAC tiene como especies a *Lactobacillus* y *Streptococcus*, teniendo una mejor mezcla de cepas la marca comercial SACCO, apoyándose esta última idea en las referencias que se tiene de Sieber (2004), quien afirma que diversas especies de *Lactobacillus*,

*Propionibacterium*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus* pueden ser capaces de formar ALC a partir del ácido linoleico y esto es usado para aumentar los niveles de ALC en alimentos como el yogurt. También Moghadan (2019), optimizó la producción de ALC, en la producción de yogurt, usando fructooligosacáridos y cepas de *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis*. También aplicó sonicación, pero esto decreció la viabilidad de las células.



**Figura 6.** Variación de ALC con cultivo Sacco, a 1 U/l (parte superior) y 2 U/l (parte inferior) vs tiempo de fermentación.



**Figura 7.** Variación de ALC con cultivo Vivolac, a 1 U/l (parte inferior) y 2 U/l (parte superior) vs tiempo de fermentación.

Como se observa en las figuras 6 y 7, las muestras con cultivo Sacco presentan mayor concentración de ALC producido, pero a la vez tienen un decrecimiento de su contenido mientras mayor sea el tiempo de incubación, posiblemente provocado por efectos tóxicos del ácido linoleico en el metabolismo microbiano, demostrado por Lin (1999), cuando estudió varios tipos de bacterias acidolácticas incubadas haciendo una variación de la concentración del ácido linoleico vs la producción de ALC en leche reconstituida.

Las muestras con cultivo VIVOLAC, en cambio, presentan un aumento de la concentración de ALC, pero su porcentaje es menor comparado a las muestras con cultivo Sacco, debido a la diferencia de cepas usadas para cada cultivo, siendo las de SACCO más eficientes en la producción de ALC, como se expuso antes.

#### 4.2.3.1 *Influencia del cultivo y la dosis en la concentración de ALC en el yogurt.*

Los valores promedio de la concentración de ALC para los diferentes cultivos y dosis se presentan en la Tabla 14, siendo la marca SACCO la que presenta un alto grado de varianza. En la Tabla 15 se muestra el valor P (probabilidad), siendo este 0.049. Trabajando a una confiabilidad de 95%, tenemos que  $P \leq 0.05$ .

**Tabla 14.**

*Resumen de datos de cada grupo de muestras.*

Cultivo - Dosis	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Sacco - 1 U/l (S1)	3	80.12	26.71	186.78
Sacco - 2 U/l (S2)	3	34.53	11.51	109.05
Vivolac - 1 U/l (V1)	3	5.51	1.84	0.13
Vivolac - 2 U/l (V2)	3	46.28	15.43	14.49

**Tabla 15.***Análisis de varianza para los cuatro grupos (S1, S2, V1 y V2).*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	952.5143671	3	317.51	4.09	0.049	4.066
Dentro de los grupos	620.8873189	8	77.61			
Total	1573.401686	11				

Usando la prueba de Tukey y obteniendo HSD (23.04) para 4 grupos y con 8 grados de libertad, tenemos que hubo diferencia significativa entre las concentraciones de ALC de las muestras con cultivo SACCO (26.71) y las muestras con cultivo VIVOLAC (1.84) a una dosis (1 U/l). No hubo diferencia significativa entre las otras muestras, pero aun así el promedio del contenido de ALC en muestras con cultivo SACCO a una dosis (1 U/l) es mayor al promedio de las otras muestras, esto debido a la mezcla de cepas que presenta, y que logra aumentar su contenido de ALC.

#### **4.2.3.2 *Influencia del tiempo de fermentación en la concentración de ALC en el yogurt.***

Los valores promedio de la concentración de ALC para los diferentes tiempos no presentaron diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) siendo el valor de la probabilidad 0.555. Los valores son presentados en la Tabla 16.



**Tabla 16.***Resumen de datos para los 3 tiempos de fermentación (5, 6 y 7 horas).*

Tiempo de Fermentación	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
5	4	74.66	18.66	294.33
6	4	56.40	14.10	83.05
7	4	35.39	8.85	82.73

A partir de la tabla 16, se afirma que el tiempo de incubación no determinó una diferencia significativa del ALC en el yogurt, ya que el ácido graso aumentó en unas muestras y en otras disminuyó, sin tener un patrón de cambio similar en los cuatro grupos de muestras; además como ya se expuso, las concentraciones de ALC en el yogurt dependieron del tipo de cepas usadas, así como de su concentración en la leche a fermentar.

## V. CONCLUSIONES

- La composición de la materia grasa en el yogurt varió de una muestra a otra. Todas las muestras contienen ácidos grasos de cadena larga e insaturados, no habiendo diferencia significativa entre sus totales.
- Las muestras obtenidas usando cultivo Sacco a 1 unidad de cultivo por litro de leche presentan mayor contenido de ALC. Se presentó diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre las muestras con Cultivo Sacco a 1U/l (26.71 g/g grasa) y las muestras con Cultivo Vivolac a 1U/l (1.84 g/g grasa). Las concentraciones de ALC por muestra no presentaron diferencia significativa con respecto al tiempo de fermentación.
- El porcentaje de acidez hallado en las muestras de yogurt evaluado se encontró dentro de lo recomendado por la Resolución 2310/86 (0.70 – 1.50), estando el rango de las muestras entre  $0.75 \pm 0.02$  y  $1.20 \pm 0.02$ .
- La consistencia de las muestras de yogurt obtenidas con cultivo SACCO presentan, según el modelo reológico de Herschel – Bulkley, el mejor comportamiento de un fluido no newtoniano de tipo plástico general (índice de consistencia de flujo  $n < 1$ ), siendo característica primordial del yogurt, comportamiento también reportado por diversos autores como Enriquez et al. (2012).
- Se obtuvo un yogurt con un porcentaje elevado de ALC, con un promedio de 26.71 g ALC/g grasa en las muestras con cultivo Sacco, de los cuales los elaborados a dos dosis de cultivo (2 U/l), y en tiempos de fermentación de 5 y 6 horas, presentan las mejores características de un fluido con comportamiento de tipo plástico general. El porcentaje de acidez hallada no es determinante en la elección del mejor tratamiento, debido a que todos los valores obtenidos están dentro de los parámetros generales contemplados por la Resolución 2310/86 de derivados lácteos.

## VI. RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración de ALC, usando ácido linoleico como sustrato, para poder investigar si habría un mayor aumento del ácido graso estudiado, con respecto a los resultados obtenidos en el presente informe.
- Hacer evaluaciones de ALC, a partir de la fermentación con cepas aisladas para hallar una mejor combinación de cepas, para encontrar una alternativa a los cultivos aquí usados en la maximización del contenido de ALC.
- Evaluar sensorialmente productos elaborados a partir de los tratamientos aquí mostrados, para encontrar la aceptabilidad de las personas y observar si sus gustos coinciden con los que tengan mayor concentración de ALC.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES

- Akalin, A.; Tokusoglu, O.; Gonc, S. & Aycan, S. (2007). Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *International Dairy Journal*;17(9):1089-95.
- Alosno, L.; Cuesta, E. & Gilliland, S. (2003). Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*, 86 (6), 1941-1946.
- Amores, R.; Calvo, A.; Maestre, J. & Martínez, D. (2004). Probióticos. *RevEspQuimioter*; 17:131-9.
- Aportela, A.; Sosa, M. & Vélez, J. (2005). Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium. *Journal of Texture Studies*, 36, 333-349.
- Ballesta, S.; Velasco, C.; Borobio, V.; Argüelles, F. & Perea, E. (2007). Yogures frescos frente a pasteurizados: estudio comparativo de sus efectos sobre los parámetros microbiológicos, inmunológicos y el bienestar gastrointestinal. Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla. Sevilla. Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla. España.
- Basu, S. et al. (2000). CLA induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett.* Febrero; 468(1):33-6.
- Bauman, D.; Corlbaumgard, B.; Griinari, J. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. En: *Recent Advances in Animal Nutrition*, 221-250. Ed. P. C. GARNSWORTHY, J. WISEMAN. Nottingham University Press. Nottingham, UK.

- Bauman, D.; Mather, I.; Wall, R. & Lock, A. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J Dairy Sci*, 89: 1235-1243.
- Blankson, H.; Stakkestad, J.; Fagertun, H.; Thom, E.; Wadstein, J. & Gudmundsen, O. (2000). Conjugated Linoleic Acid reduces body fat in overweight and obese humans. *J Nutr*; 130:2943-2948.
- Boylston, T. & Beitz, D. (2002). Conjugated linoleic acid and fatty acid composition of yogurt produced from milk of cows fed soy oil and conjugated linoleic acid. *Journal of Food Science*; 67(5):1973-8.
- Dave, R.; Ramaswamy, N. & Baer, R. (2002). Changes in fatty acid composition during yogurt processing and their effects on yogurt and probiotic bacteria in milk procured from cows fed different diets. *Australian Journal of Dairy Technology*;57(3):197-202.
- Dehesa Santisteban, Francisco (2011). *Tecnología Alimentaria y Salud Humana. El Caso de la Leche y los Productos Lácteos. La Industria Alimentaria como Estrategia Sanitaria. Producciones Artesanales y Seguridad Alimentaria (Discurso de entrada del doctor Francisco Luis Dehesa Santisteban con ocasión de su ingreso en la Real Academia de Medicina del País Vasco en sesión celebrada el 14 de febrero de 2011). Área de Acción Social, Ayuntamiento de Bilbao, Bilbao, España.*
- Drugs <Disponible en: [http://www.drugs.com/mtm\\_esp/bifidobacterium-lactis-gg.html](http://www.drugs.com/mtm_esp/bifidobacterium-lactis-gg.html)>  
(Consulta Mayo, 2016)
- Èejna, V. & Chládek, G. (2005). The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in holstein cows during lactation. *J Cent Eur Agr*, 6: 539 - 546.

- Enriquez, D.; Sánchez, J. & Castro, P. (2012). Efecto de la concentración de sólidos totales de la leche entera y tipo de cultivo comercial en las características reológicas del yogurt natural tipo batido. *Agroind Sci*, 2: 173 – 180.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. [www.fao.org](http://www.fao.org)
- Fennema, O. (1996). *Química de los alimentos*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.
- González, G.; Molina, B. & Coca, R. (2010). Calidad de la Leche cruda. Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz. México.
- González, S. (2009). Diseño mecánico de un equipo para medida de la viscosidad en fluidos no newtonianos. Tesis para obtener el título de Ingeniero Industrial. Cartagena. Universidad Politécnica de Cartagena. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial.
- Gorissen, L.; Leroy, F.; De Vuyst, L.; De Smet, S. & Raes, K. (2013). Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.
- Haro, A.; Reyes, A. & Cabrera, C. (2006). CLA: Interés actual en Nutrición Humana. Unidad de Nutrición Animal. Depto. Nut. Y Bromatología. Facultad de Farmacia Granada. España.
- Haug, A.; Hostmark, A. & Harstad, O. (2007). Bovine milk in human nutrition - A review. *Lipids Health Dis*. 6:25.

- Hernández, P. (2004). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y reológicas del yogurt bajo en grasa enriquecido con fibra y calcio de yogurt. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería, Universidad de las Américas Puebla.
- Houseknecht, K.; VandenHeuvel, J.; Moya, S. & Portocarrero, C. (1998). Dietary CLA normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *BiochemBiophys Res Commun.* 247(3):911.
- Hubbard, N. & Erickson, K. (2000). Probiotic immunomodulation in health and disease. *J Nutr;* 130:403S-9S.
- Jiang, Y.; Marang, L.; Kleerebezem, R.; Muyzer, G. & Van Loosdrecht, M. (2011). Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotechnol. Bioeng.* 108.
- Kelsey, J.; Corl, B.; Collier, R. & Bauman, D. (2003). The effect of Breed, Parity, and Stage of Lactation on Conjugated Linoleic Acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci;* 86: 2588 - 2597.
- Khanal, R. & Olson, K. (2004). Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content in Milk, Meat, and Egg: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition,* 3(2), 82-98.
- Kishino, S.; Ogawa, J.; Omura, Y.; Matsumura, K. & Shimizu, S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of the American Oil Chemists Society;* 79(2):159-63.
- Koba, K. & Yanagita, Y. (2014). Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research & Clinical Practice.* Vol 8: 525 – 532.

- Lewis, S. & Burmeister, S. (2005). A double-blind placebo-controlled study of the effects of Lactobacillus acidophilus on plasma lipids. *Eur J Clin Nutr*; 59: 776-80. 2.
- Lin, T.; Lin, C. & Wang, Y. (2003). Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of Lactobacillus acidophilus CCR 14079. *Food Chemistry* 83, 27-31.
- Lin, T., Lin, C. & Lee, C. (1999). Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chemistry* 67, 1-5.
- Lock, A. & Garnsworthy, P. (2003). Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and delta9-desaturase activity in dairy cows, *Livest. Prod. Sci*, 79, 47-59.
- Macfarlane, G. & Cummings, H. (1999). Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *BMJ*; 318: 999-1003.
- Maiques, A. (2006). ¿Aconsejaríamos los alimentos probióticos para reducir el colesterol? Centro de Salud de Manises. Manises. Valencia. España.
- Malajovich, M. (2012). *Biotecnología – 2da ed. – Bernal: Universidad Nacional de Quilmes.*
- Martínez, A.; Moya, S; González, H.; Hernández, J. & Pinelli, A. (2010). Contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche de ganado lechero Holstein estabulado en el noroeste de México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.*; 1(3):221-235.
- Mazzoli, R.; Bosco, F.; Mizrahi, I. & Bayer, E. (2014). Pessione, E. Towards lactic acid bacteria-based biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 32, 1216–1236.
- Meydani, S. & Ha, W. (2000). Immunologic effects of yogurt. *Am J Clin Nutr*; 71: 861-72.
- Montalto, M.; Curigliano, V.; Santoro, L.; Vastola, M.; Cammarota, G. & Manna, R (2006). Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol*; 12:187-91.



- Moghadam, B.; Keivaninahr, F.; Nazemil, A.; Fouladi, M.; Mokarram, R. & Benis, K. (2019). Optimization of conjugated linoleic acid production by *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* and its application in fermented milk, *LWT - Food Science and Technology*. Vol 108: 344 - 352.
- O'Connell, J.; & Fox, P. (2001). Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11, 103–120.
- Obregón, A.; & Valenzuela, A. (2009). Ácido linoléico conjugado (ALC), Metabolismo de lípidos y enfermedad cardiovascular. *Rev Chil Nutr* Vol. 36, N°3.
- Ogawa, J.; Kishino, S.; Ando, A.; Sugimoto, S.; Mihara, K. & Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (4), 355-364.
- Omicromo <Disponible en: <http://www.omicrono.com/2016/05/streptococcus-thermophilus-bacteria> > (Consulta Mayo, 2016)
- Osorio, J. (2010). Influencia de diferentes cepas probióticas y el tiempo de fermentación en el contenido de Ácido Linoléico Conjugado y el perfil de ácidos grasos durante el almacenamiento del kumis elaborado con dos sustratos diferentes. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
- Pandit, A.; Anand, S.; Kalscheur, K. & Hassan, A. (2012). Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate. *International Journal of Dairy Technology*; 65(4):603-8.
- Park, Y.; Albright, K.; Liu, W.; Storkson, J.; Cook, M. & Pariza, M. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*; 32:853-858

- Parra, R.; Martinez, G. & Espinosa, J. (2011). Comportamiento Físicoquímico de Stevia, fructos, dextrosa y lactosa como endulzantes a diferentes concentraciones durante el tiempo de incubación en la elaboración de Yogurt entero. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. Vol 9(2):15-20.
- Parvez, S.; Malik, K.; Ah Kang, S. & Kim, H. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol*; 100: 1171-85.
- Pasephol, T.; Small, D. & Sherkat, F. (2008). Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition, *Journal of Texture Studies*, 39, 617-634.
- Porto, A. Curso de Biología <Disponible en: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema06.pdf>> (Consulta Mayo, 2016)
- Prandini, A.; Sigolo, S.; Tansini, G.; Brogna, N. & Piva, G. (2007). Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *Journal of food composition and analysis* 20, 472 - 479.
- Resolución 2310/86. Derivados lácteos
- Santos-Junior, O.; Pedrao, M.; Dias, L.; Paula, L.; Coro, F. & De Souza, N. (2012). Fatty acid content of bovine milkfat from raw milk to yoghurt. *Am J Applied Sci.*; 9(8):1300-6.
- Scimeca, J. (1998). Toxicological evaluation of dietary CLA in male Fischer 344 rats. *Food Chem Toxicol.* 36(5): 391-5.
- Senok, A.; Ismaeel, A. & Botta, G. (2005). Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect.* 11: 958-66.

- Serafeimidou, A.; Zlatanov, S.; Laskaridis, K. & Sagredos, A. (2012). Chemical characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of traditional Greek yogurts. *Food Chemistry* 134, 1839-1846.
- Serafeimidou, A.; Zlatanov, S.; Kritikos, G. & Tourianis, A. (2013). Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 24-30.
- Shaker et al. (2000). *Lactología Industrial, leche, preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos*. Editorial Acribia S.A. 3<sup>o</sup> Edición. Zaragoza.
- Shantha, N.; Ram, L.; O'Leary, J.; Hicks, C. & Decker, E. (1995). Conjugated linoleic-acid concentrations in dairy-products as affected by processing and storage. *Journal of Food Science*; 60(4):695-&.
- Shihata, A & Shah, N. (2002). Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal* 12(9):765 - 772.
- Shori, A., & Baba, A. (2014). Comparative antioxidant activity, proteolysis and in vitro  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of *Allium sativum*-yogurts made from cow and camel milk. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18, 456 - 463.
- Sieber, R.; Collomb, M.; Aeschlimann, A.; Jelen, P. & Eyer, H. (2004). Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - A review. *International Dairy Journal*, 14 (1), 1-15

- Skriver, A.; Roemer, H. & Qvist, K. (1993). Rheological characterization of stirred yoghurt; viscometry, *J, Texture Stud.*, 24, 185.
- Soyeurt, H.; Dardenne, P.; Gillon, A.; Croquet, C.; Vanderick, S.; Mayeres, P.; Bertozzi, C. & Gengler, N. (2006). Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *J Dairy Sci*, 89: 4858-4865.
- St Onge, M.; Farnworth, E.; Savard, T.; Chabot, D.; Mafu, A, & Jones, P. (2002). Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med*; 2: 1.
- Steffe, F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering* Freeman Press-East Lansing USA.
- Tamime, A.; & Robinson, R. (1991). *Yogur, ciencia y tecnología*. Zaragoza, ES. Acribia S.A. 368 p.
- Thorsdottir, I.; Hill, J. & Ramel, A. (2004). Seasonal variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from Nordic countries. *J Dairy Sci*;(87):2800-2802.
- Turpeinen, A.; Mutanen, M. & Salminen, I. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr*. 2002 Sep; 76 (3): 504-10.
- University of Maryland Medical Center <Disponible en:  
<http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/lactobacillus-acidophilus>>  
 (Consulta Mayo, 2016).

- Velez, J.; Hernández, P. & Sosa, M. (2012). Physicochemical and flow properties of low fat yogurt fortified with calcium and fiber. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37, 210-221.
- Wei, M.; Ding, X-L.; Xue, Z-L. & Zhao, S-G. (2014). Production of conjugated linoleic acid by permeabilized *Lactobacillus acidophilus* cells. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 108 (0):59-63.
- White, S.; Bertrand, J.; Wade, M.; Washburn, S.; Green, J. & Jenkins, T. (2001). Comparison of fatty acid content of milk from jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*, 84, 2295-2301.
- Xiao, J.; Kondo, S.; Takahashi, N.; Miyaji, K.; Oshida, K. & Hiramatsu, A. (2003). Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J DairySci*; 86: 2452-61. 3.
- Yadav, H.; Jain, S. & Sinha, P. (2007). Production of free fatty acids and conjugated linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *International Dairy Journal*, 17 (8), 1006-1010.
- Ye, Z.; Lu, M.; Zheng, Y.; Li, Y. & Cai, W. (2008). Lactic acid production from dining-hall food waste by *Lactobacillus plantarum* using response surface methodology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1541–1550.
- Zlatanov, S.; Laskaridis, K.; Feist, C. & Sagredos, A. (2002). CLA content and fatty acid composition of Greek Feta and hard cheeses. *Food Chemistry*, 78, 471-477.

## VIII. ANEXOS

### ***ANEXO 1: PROCESO DE OBTENCIÓN DE YOGURT***



***Fotografía i: Mezcla de todos los ingredientes y homogenización a 50 °C***



***Fotografía ii: Inoculación***

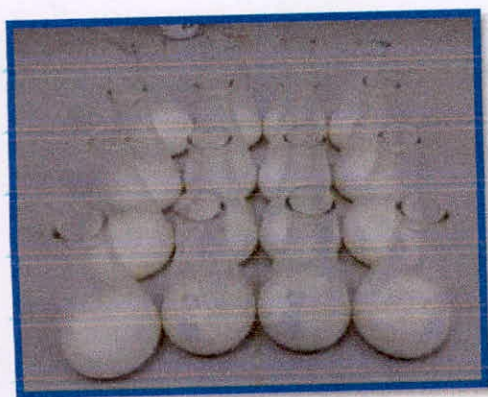


*Fotografía iii:  
Fermentación de la leche  
en estufa*

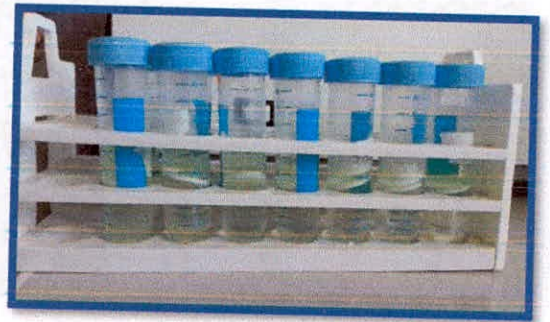


*Fotografía iv: Enfriamiento  
por 24 h a 4 °C*

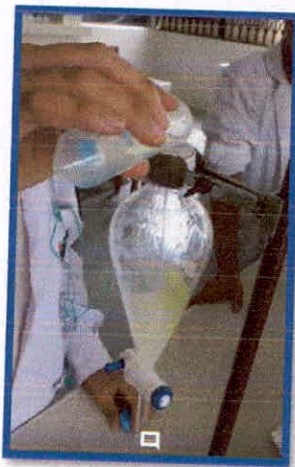
**ANEXO 2: PROCESO DEL METODO MODIFICADO DE FOLCH**



*Fotografías v y vi: Preparación de mezcla cloroformo-metanol, se pesa y agita vigorosamente*



*Fotografías vii y viii: Centrifugar a 4000rpm por 15 min*



*Fotografías ix y x: Trasvasar a una pera de decantación, agitar vigorosamente y agregar 18.8 ml de cloruro de potasio*

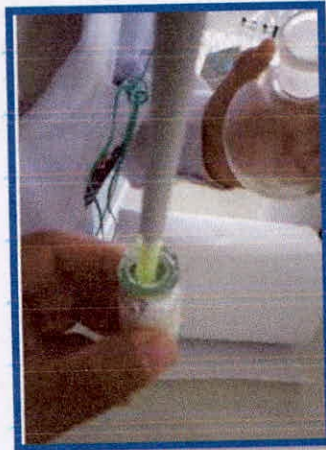


*Fotografías xi y xii: Decantar y llevar a un rota vapor*



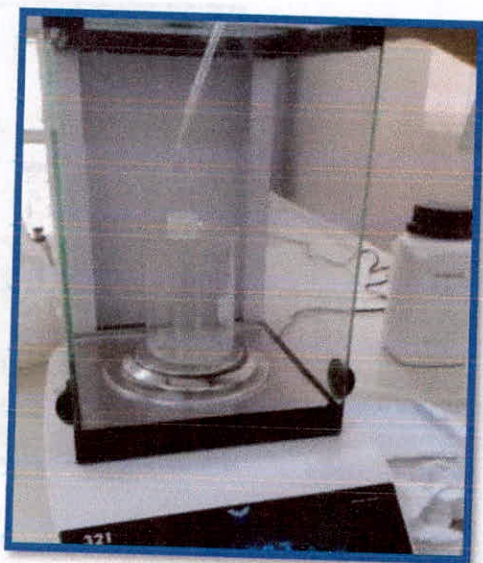


*Fotografías xiii y xiv: Llevamos a un rota vapor para quitar todo el cloroformo -metanol*

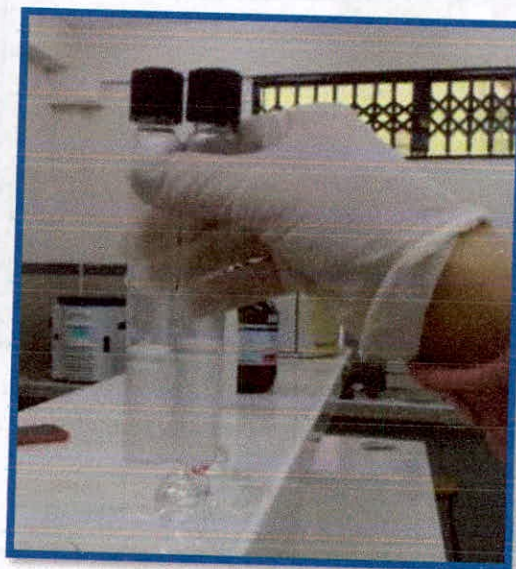


*Fotografía xv y xvi: Luego vertemos la muestra en viales, los sellamos con nitrógeno y almacenamos en congelación*

**ANEXO 3: CUANTIFICACIÓN DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS**



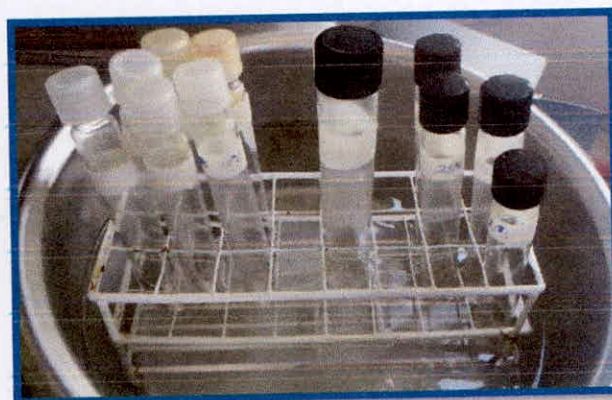
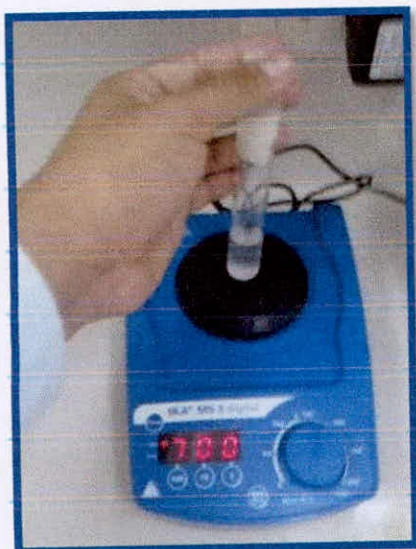
**Fotografía xvii: Pesamos aproximadamente 0,025g de muestra**



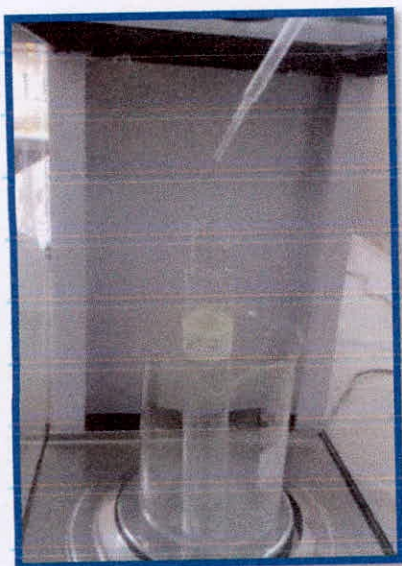
**Fotografía xviii: Añadir 1,5ml de solución de (NaOH) 0,5N + una tapa de Nitrógeno (N<sub>2</sub>),**



**Fotografía xix: Llevar a baño maría T (80-90) °C , enfriamos los tubos de ensayo, añadir 2ml de Trifluoruro de Boro (BF<sub>3</sub>)**



*Fotografías xx y xxi: Posteriormente tapar y agitar lentamente, luego llevar a baño maría durante 30 minutos llevamos a enfriar la muestra hasta 30 - 40°C.*

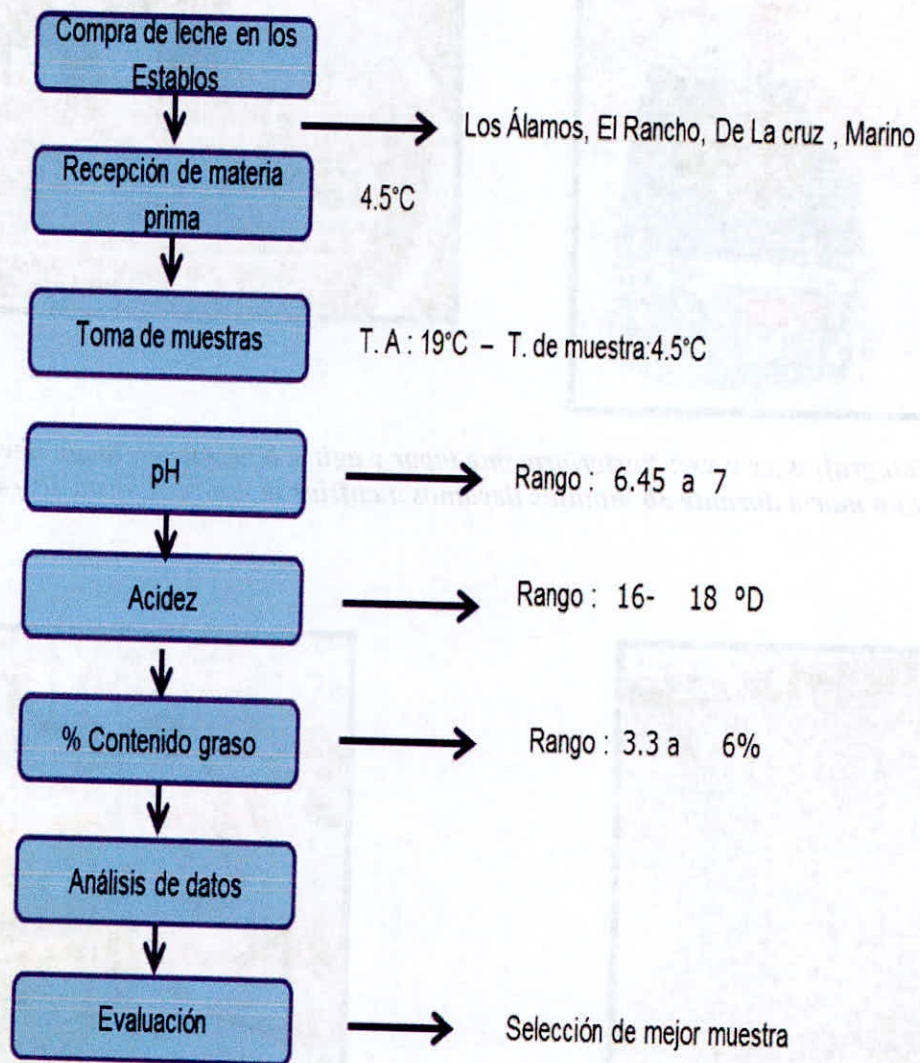


*Fotografía xxii. Añadiendo después 1ml de isooctano, cubrimos con Nitrógeno (N<sub>2</sub>) y agitar durante 30 segundos.*

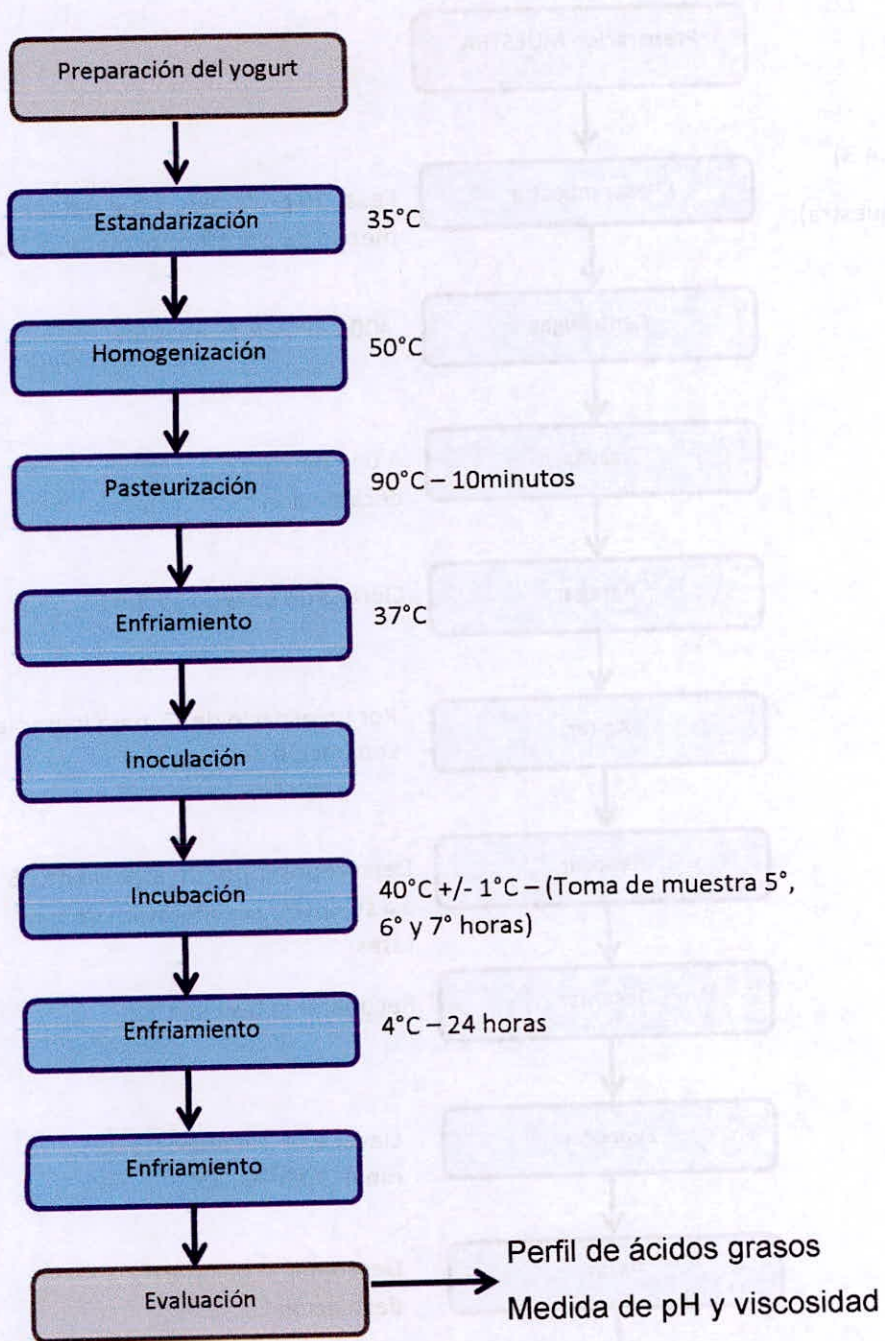


*Fotografía xxiii: Después de preparado la muestra vertemos a los viales y cubrimos con Nitrógeno, posteriormente lo guardamos en refrigeración*

#### ANEXO 4: DIAGRAMAS DE FLUJO DE ACTIVIDADES

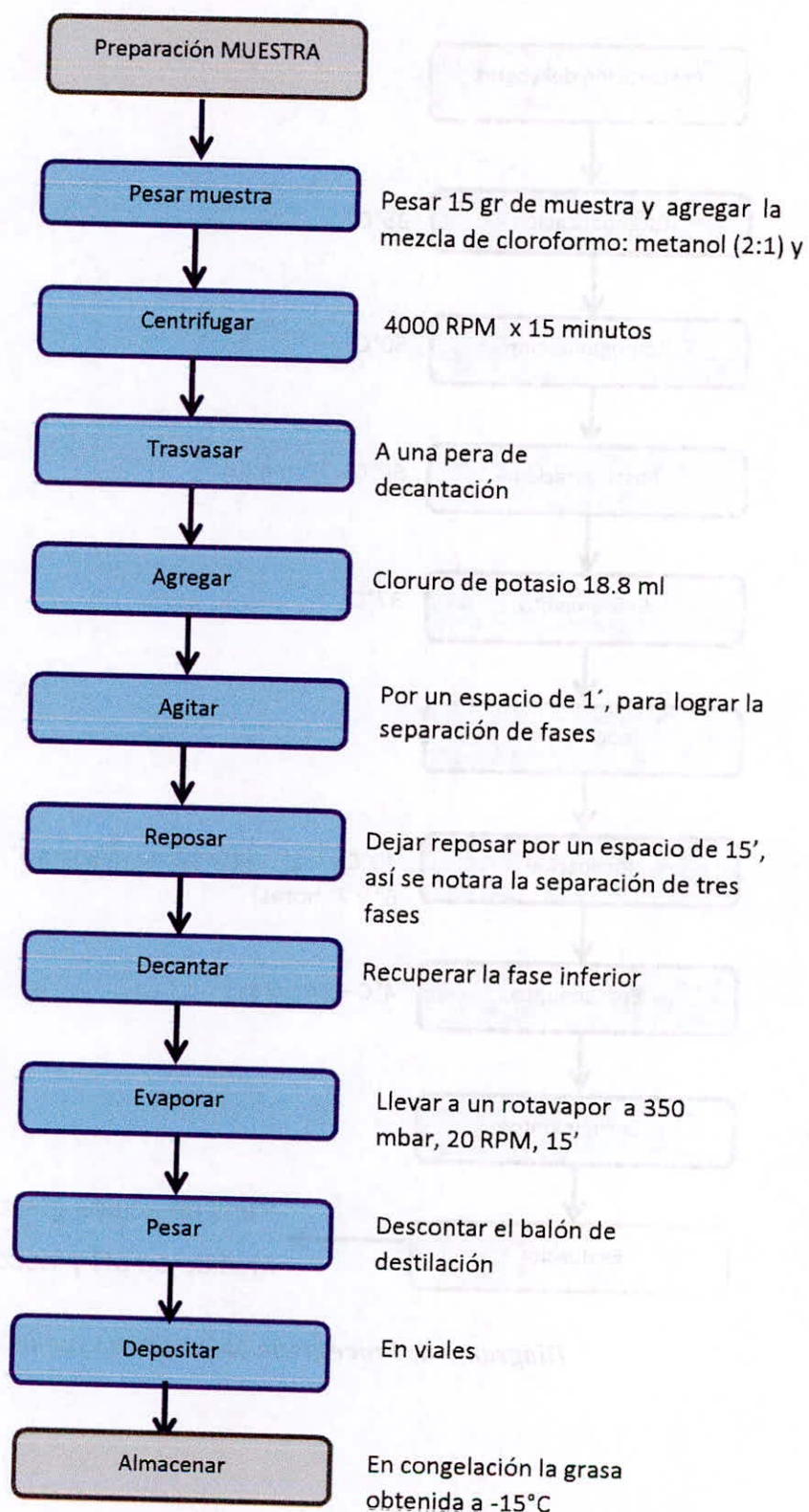


*Diagrama i: Proceso preliminar para selección de leche*



**Diagrama ii: Procesos de obtención de yogurt natural**

Proporciones C: M: W (8:4:3)  
(Cloroformo: metanol: muestra)



*Diagrama iii: Procesos de modificación del método de FOLCH*

## **ANEXO 5: CÁLCULOS EN LA OBTENCIÓN DEL YOGURT**

### **Cálculo para hallar la cantidad de leche en polvo a usar.**

Para la obtención del yogurt se estandarizó a 11% de sólidos totales. Teóricamente la leche presenta 8%. Para aumentar el porcentaje se agregó leche en polvo con 95% de sólidos totales, usando la siguiente fórmula:

$$(LL) (STL) + (LP) (STLP) = (LL + LP) (STM)$$

Donde:

LL: Cantidad de leche en ml

STL: Sólidos totales en la leche (8%)

LP: Leche en polvo en g

STLP: Sólidos totales en la leche en polvo (95%)

STM: Sólidos totales de la mezcla (11%)

$$20000 * 0.08 + LP * 0.95 = (20000 + LP) * 0.11$$

$$84 * LP = 60000 \quad \Rightarrow \quad LP = 714 \text{ g}$$

### **Cálculo para hallar la cantidad de azúcar a usar.**

Se adicionó azúcar (7.5% de la leche).

$$20 * 0.075 = 1.5 \text{ Kg}$$

### **Cálculo para hallar la cantidad de cultivo láctico a usar por cada dosis.**

Cada sobre de cultivo láctico comercial usado, está en proporción de 100 U para ser usado por cada 100 l de leche. Primero se disolvió cada sobre de cultivo láctico (Sacco y Vivolac) en un litro de leche, teniendo una concentración de 100 U/l, siendo cada litro el cultivo madre de cada marca comercial.

Luego se separó cada litro de leche en 100 ml.

Si 1 litro de cultivo madre  $\Rightarrow$  100 litros de leche

Entonces 10 ml de cultivo madre  $\Rightarrow$  1 litro de leche

Cada muestra tiene 500 ml de leche para ser inoculado a una y dos dosis.

Para muestras a una dosis de inóculo:

Si 1 litro de leche => 10 ml de cultivo madre

Entonces 0.5 litro de leche => X

$$X = 0.5 \text{ l} * 10\text{ml}/1\text{l}$$

Siendo 5 ml de cultivo madre la cantidad usada para inocular a 500 ml de muestra, para que ésta se encuentre a una dosis.

Para muestras a dos dosis de inóculo:

Para inocular las muestras a dos dosis, se duplica la cantidad usada en una dosis; por lo tanto es 10 ml de cultivo madre por cada 500 ml de leche.

## **ANEXO 6: CUADROS RESUMEN DE REOLOGIA DE YOGURT**

### **CUADRO RESUMEN DE METODO DE BINGHAM**

#### **CULTIVO PROBIOTICO VIVOLAC**

<b>BINGHAM</b>				
	<b>TIEMPO</b>	<b>Viscosidad (Pa*s)</b>	<b>Umbral de fluencia (Pa)</b>	<b>r2</b>
<b>VIVOLAC</b>	5	0.1272	0.3374	0.9905
	5	0.0906	1.4465	0.9961
	6	0.2074	1.0882	0.9982
	6	0.1209	1.4433	0.9946
	7	0.1761	1.1406	0.9956
	7	0.1442	1.9732	0.9964

#### **CULTIVO PROBIOTICO SACCO**

	<b>TIEMPO</b>	<b>Viscosidad (Pa*s)</b>	<b>Umbral de fluencia (Pa)</b>	<b>r2</b>
<b>SACCO</b>	5	0.1292	0.6987	0.9993
	5	0.0908	1.4645	0.9971
	6	0.205	1.2126	0.9987
	6	0.1546	1.4661	0.9975
	7	0.2063	1.78	0.9974
	7	0.1862	1.4356	0.9979



## CUADRO RESUMEN DE METODO DE OSTWALD

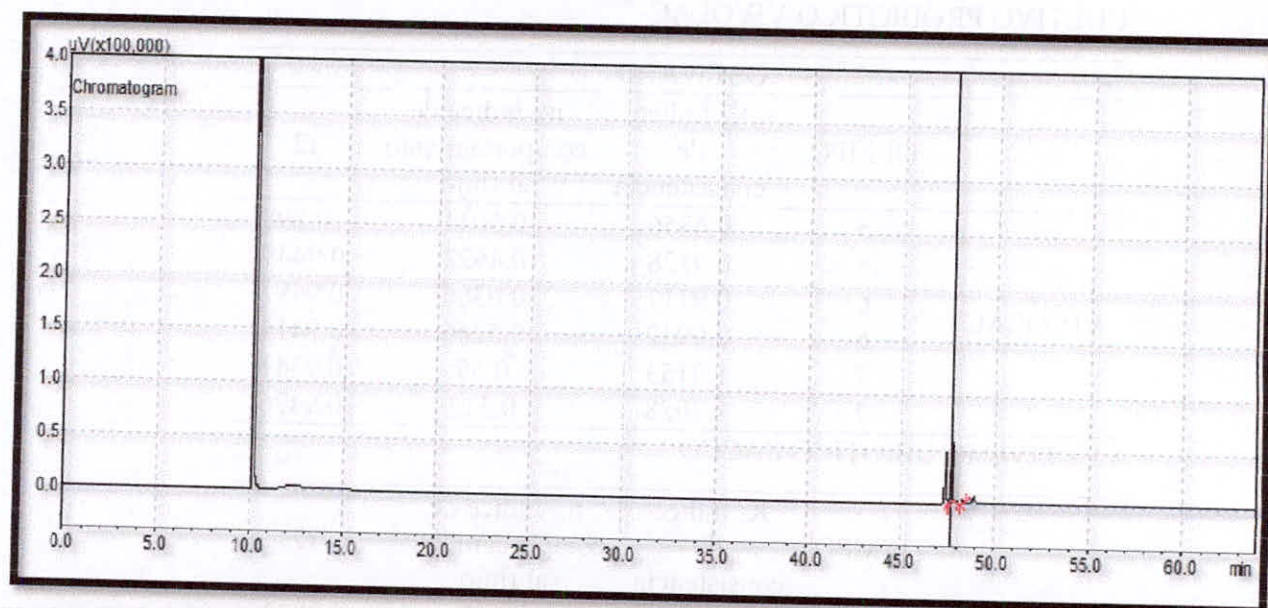
### CULTIVO PROBIOTICO VIVOLAC

OSTWALD				
	TIEMPO	K: Índice de consistencia	n: Índice de comportamiento al flujo	r2
VIVOLAC	5	0.6356	0.6041	0.89
	5	0.9128	0.4922	0.9449
	6	0.9717	0.6366	0.9491
	6	0.9932	0.5266	0.9414
	7	1.0153	0.59	0.9341
	7	1.2928	0.512	0.9426

### CULTIVO PROBIOTICO SACCO

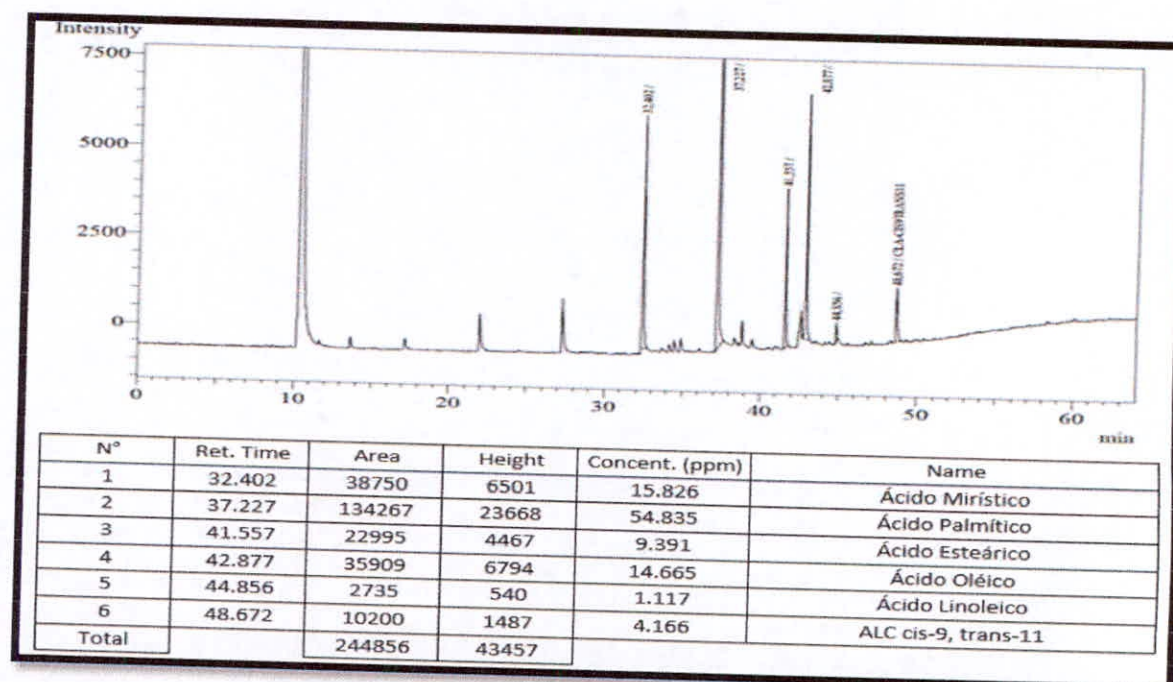
OSTWALD				
	TIEMPO	K: Índice de consistencia	n: Índice de comportamiento al flujo	r2
SACCO	5	0.4169	0.7333	0.9832
	5	0.9208	0.4932	0.9459
	6	0.6528	0.7392	0.9855
	6	0.7697	0.6433	0.9726
	7	0.9076	0.6707	0.9785
	7	0.7151	0.7012	0.987

## ANEXO 7: GRÁFICOS DE RESULTADOS DE MEDICIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ALC EN CROMATÓGRAFO DE GASES



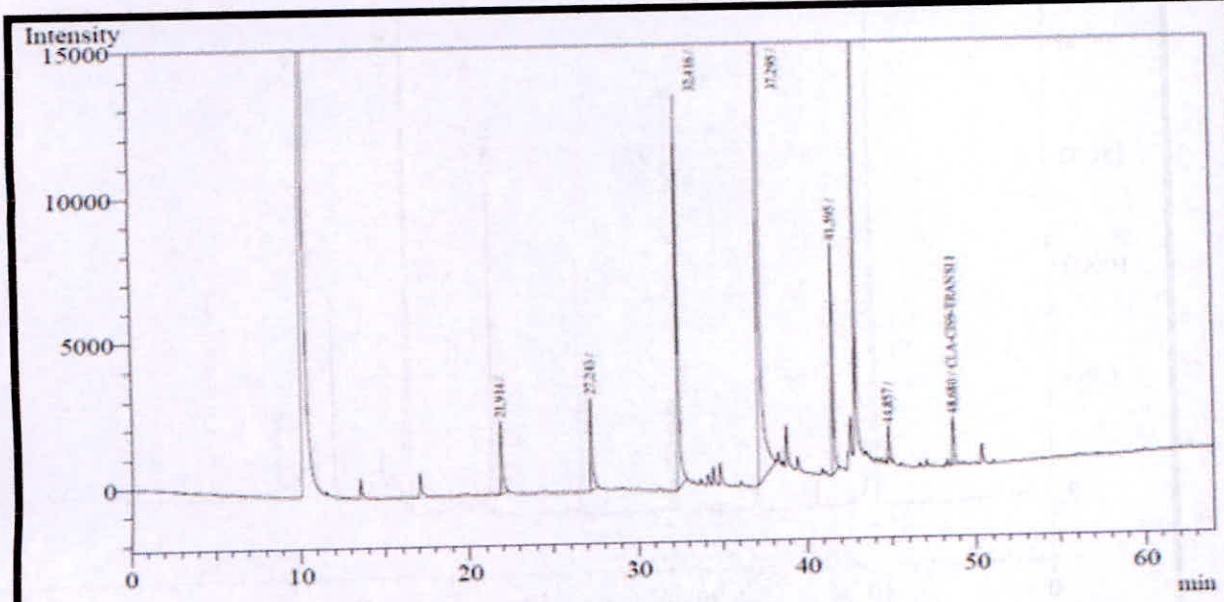
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark	Compound ID#
1	47.740	352332.8	60499.3	96.34956	ppm	S	1
2	48.304	13349.0	2464.3	3.65044	ppm	T	2

Gráfico i: Cromatograma de estándar de ácido linoleico conjugado, donde también se observan los tiempos de retención para dos de sus isómeros.



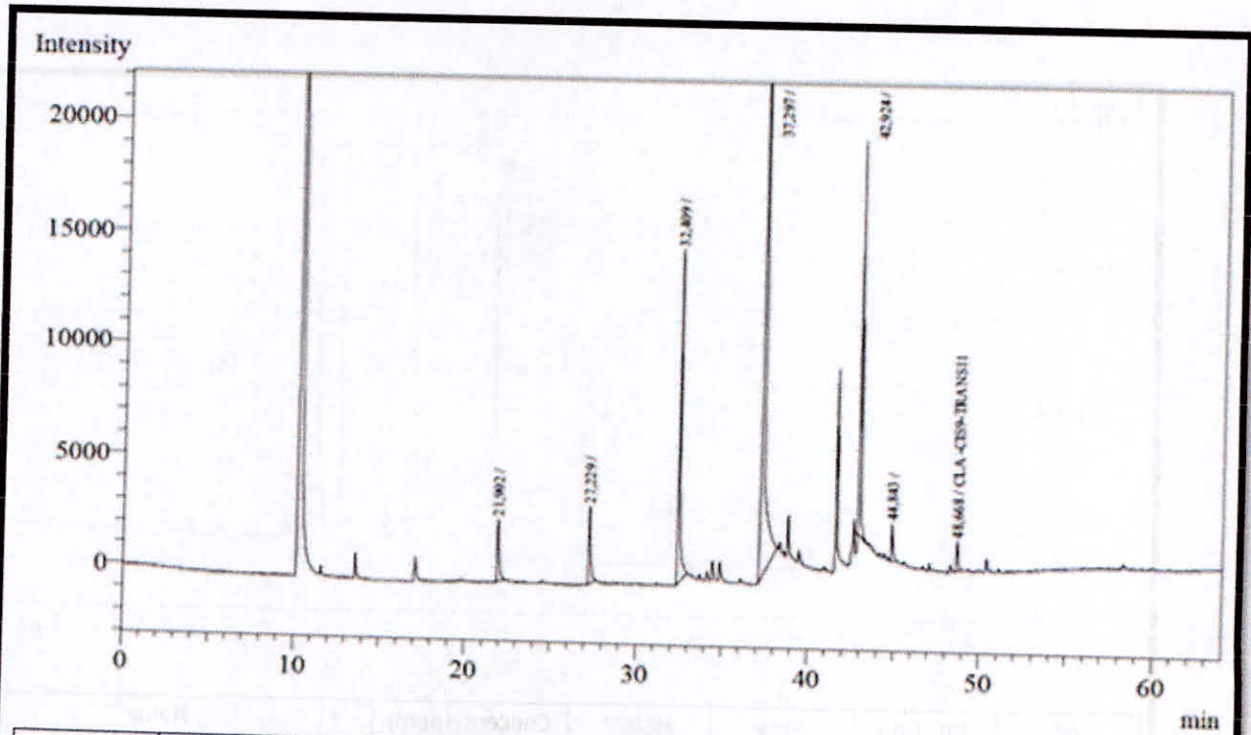
Nº	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	32.402	38750	6501	15.826	Ácido Mirístico
2	37.227	134267	23668	54.835	Ácido Palmítico
3	41.557	22995	4467	9.391	Ácido Esteárico
4	42.877	35909	6794	14.665	Ácido Oléico
5	44.856	2735	540	1.117	Ácido Linoleico
6	48.672	10200	1487	4.166	ALC cis-9, trans-11
Total		244856	43457		

Gráfico ii: ALC en S15



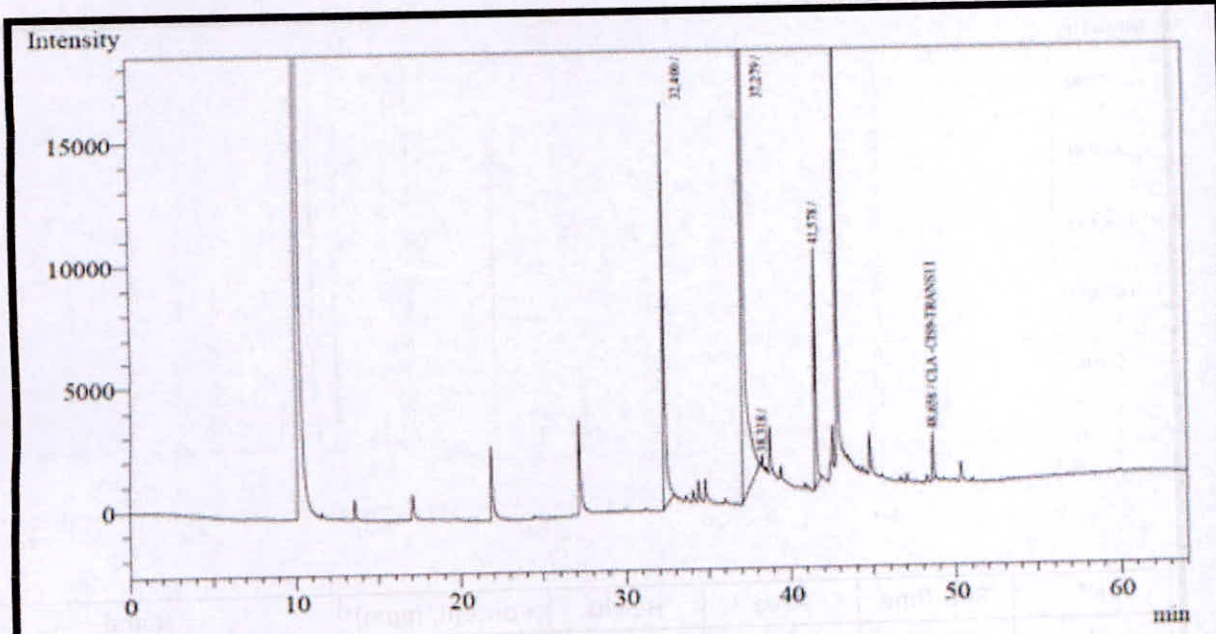
N°	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	21.914	19473	2518	3.950	Ácido Decanoico
2	27.243	24705	3207	5.012	Ácido Láurico
3	32.416	86402	13562	17.528	Ácido Mirístico
4	37.295	298318	38177	60.520	Ácido Palmítico
5	41.595	45998	7915	9.332	Ácido Esteárico
6	44.857	6397	1079	1.298	Ácido Linoleico
7	48.68	11634	1636	2.360	ALC cis-9, trans-11
Total		492927	68094		

Gráfico iii: ALC en S16



N°	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	21.902	21046	2807	3.476	Ácido Decanoico
2	27.229	26410	3459	4.362	Ácido Láurico
3	32.409	99147	14916	16.376	Ácido Mirístico
4	37.297	355698	40135	58.751	Ácido Palmítico
5	42.924	83280	17390	13.755	Ácido Oléico
6	44.843	10855	1688	1.793	Ácido Linoleico
7	48.668	8995	1376	1.486	ALC cis-9, trans-11
Total		605431	81771		

Gráfico iv: ALC en S17



Nº	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	32.4	108633	16514	19.356	Ácido Mirístico
2	37.279	383415	44590	68.317	Ácido Palmítico
3	38.318	2192	451	0.391	Ácido Palmitoleico
4	41.578	55556	9741	9.899	Ácido Esteárico
5	48.658	11437	1916	2.038	ALC cis-9, trans-11
Total		561233	73212		

Gráfico v: ALC en S25

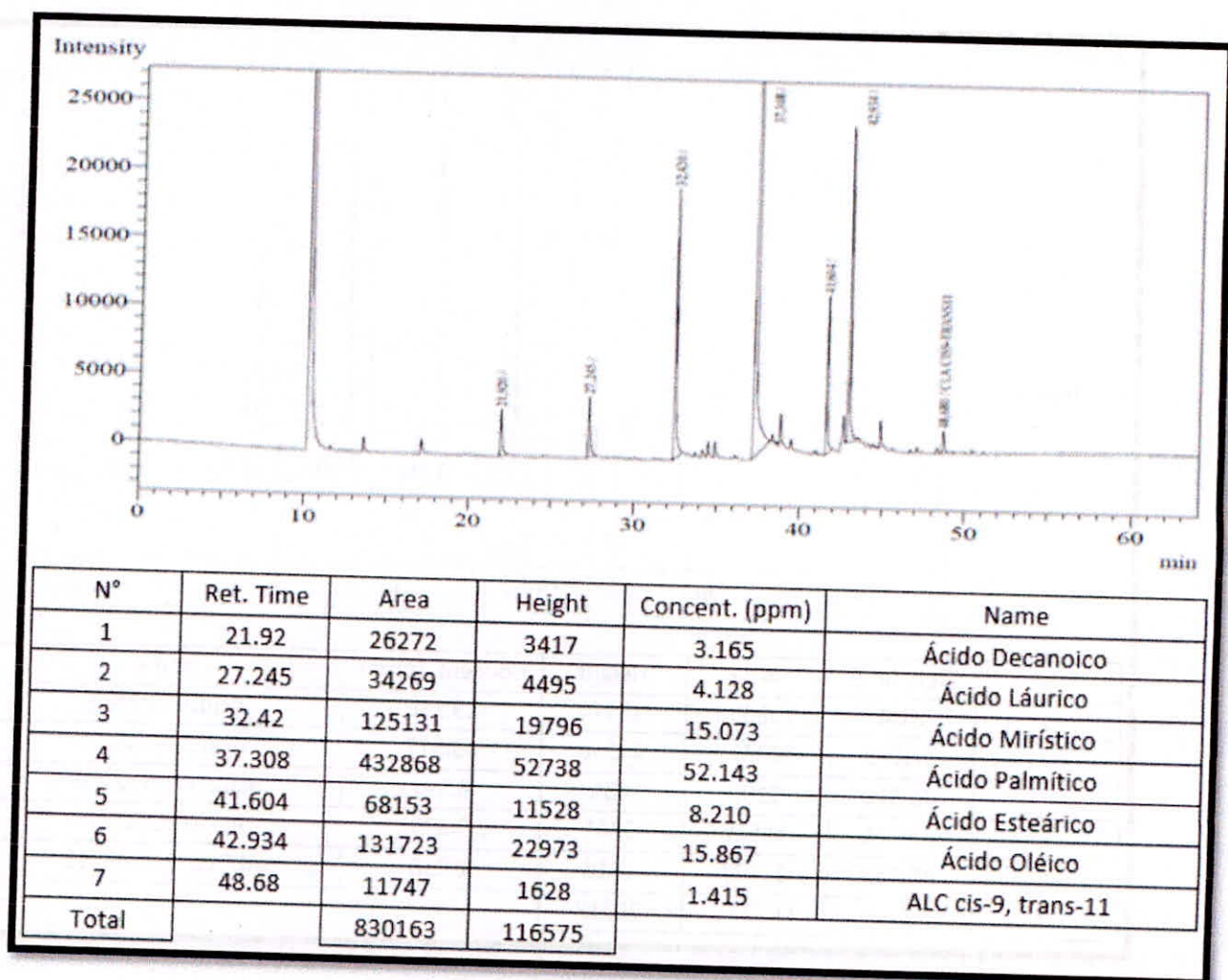
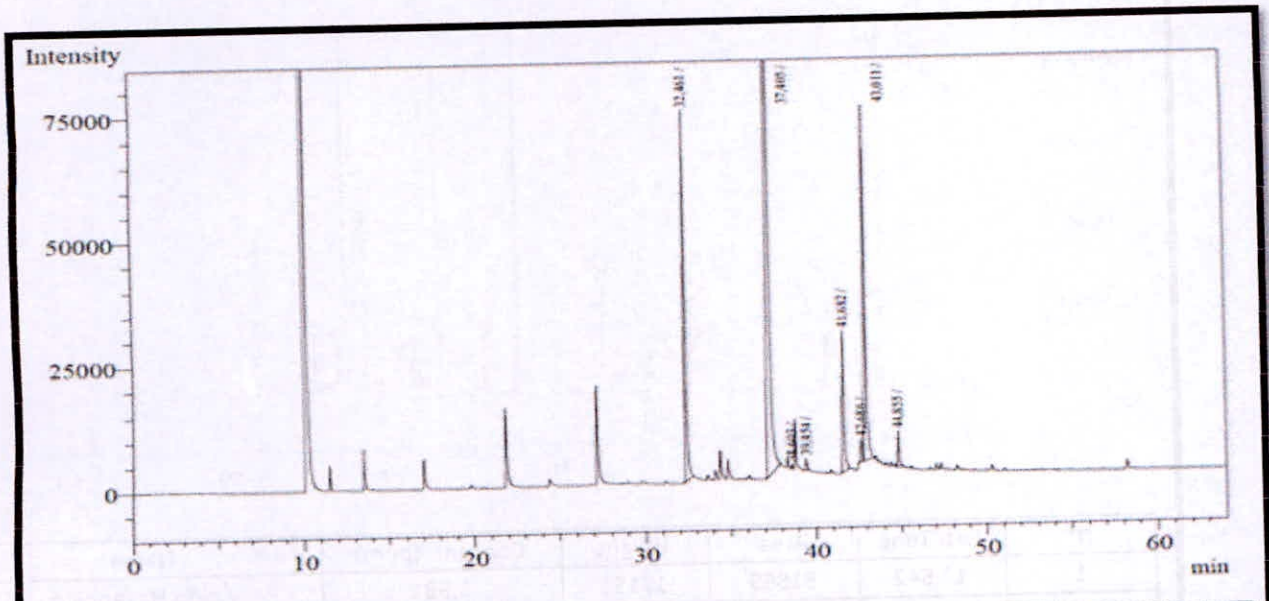
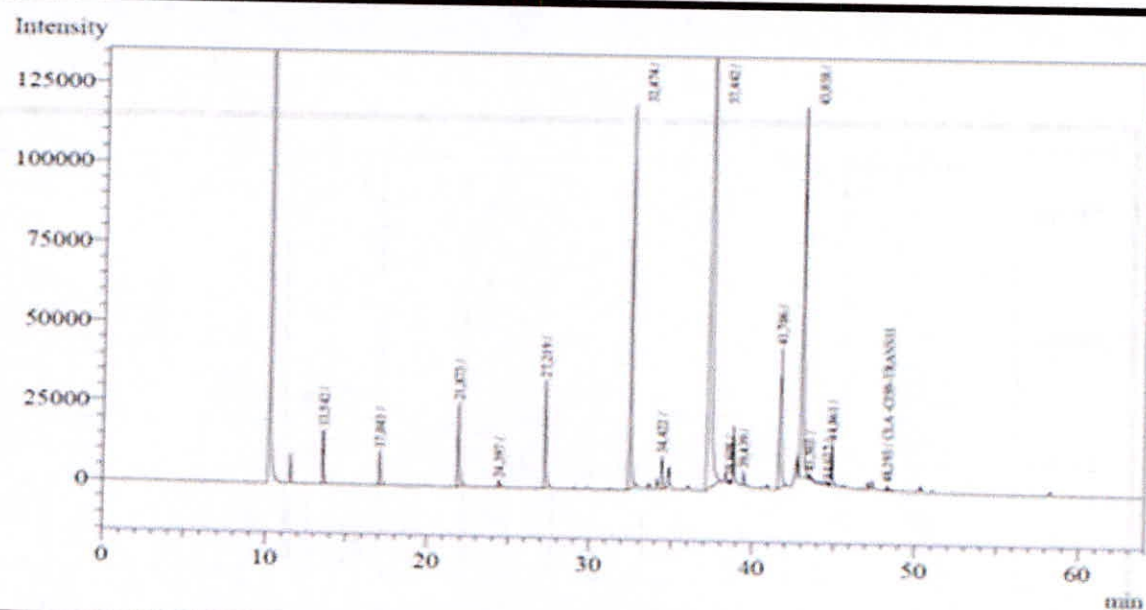


Gráfico vi: ALC en S26



N°	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	32.461	448703	74301	16.280	Ácido Mirístico
2	37.405	1497552	160195	54.336	Ácido Palmítico
3	38.603	3353	765	0.122	Ácido Palmitoleico
4	39.454	13765	2424	0.499	Ácido Heptadecanoico
5	41.682	209000	28247	7.583	Ácido Esteárico
6	42.686	27786	4533	1.008	Ácido Eláidico
7	43.011	515031	71366	18.687	Ácido Oléico
8	44.855	40912	7156	1.484	Ácido Linoleico
Total		2756102	348987		

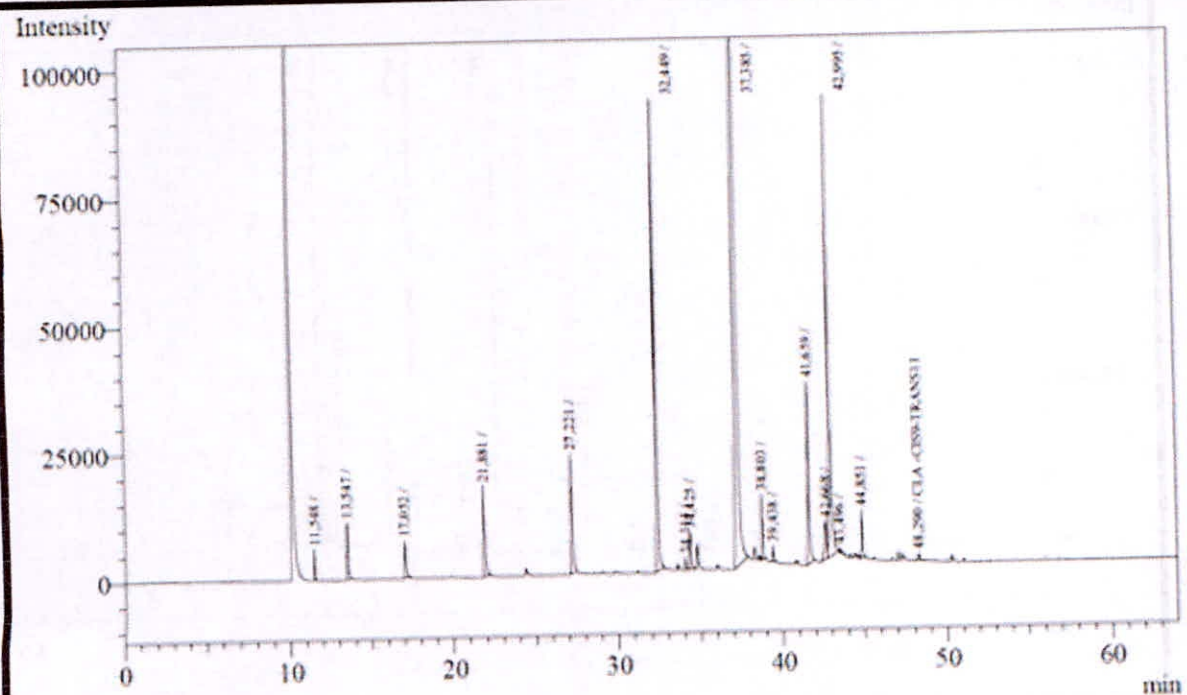
Gráfico vii: ALC en S27



N°	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	13.542	81869	17151	1.531	Ácido Hexanoico
2	17.043	67810	10898	1.268	Ácido Octanoico
3	21.873	176749	26443	3.306	Ácido Decanoico
4	24.397	14753	2144	0.276	
5	27.219	215395	34023	4.028	Ácido Láurico
6	32.474	763949	119990	14.288	Ácido Mirístico
7	34.422	62060	10221	1.161	Ácido Miristólico
8	37.442	2552214	237458	47.733	Ácido Palmítico
9	38.608	6077	1421	0.114	Ácido Palmítico
10	39.439	25954	4518	0.485	Ácido Heptadecanoico
11	41.706	364660	43712	6.820	Ácido Esteárico
12	43.038	921370	115179	17.232	Ácido Eláidico
13	43.503	7701	1452	0.144	Ácido Oléico
14	44.637	4589	968	0.086	Ácido Linoleico
15	44.861	73612	13322	1.377	Ácido Linoleico
16	48.293	8053	1464	0.151	ALC cis-9, trans-11
Total		5346815	640364		

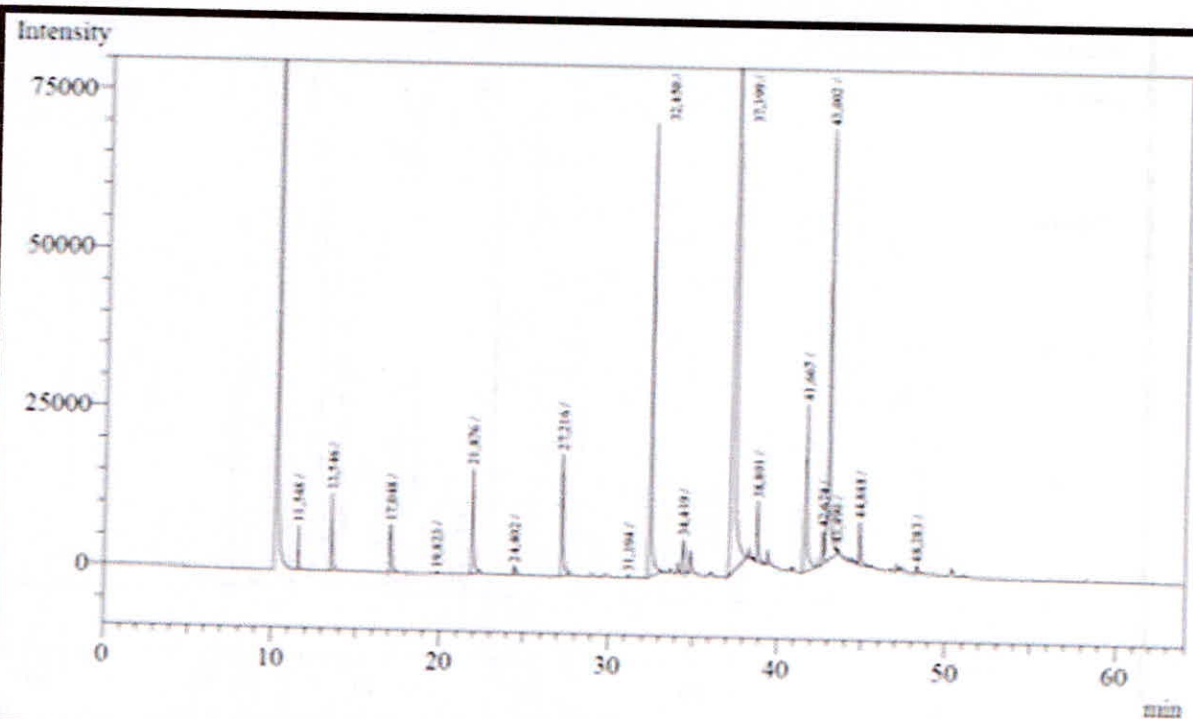
Gráfico viii: ALC en V15





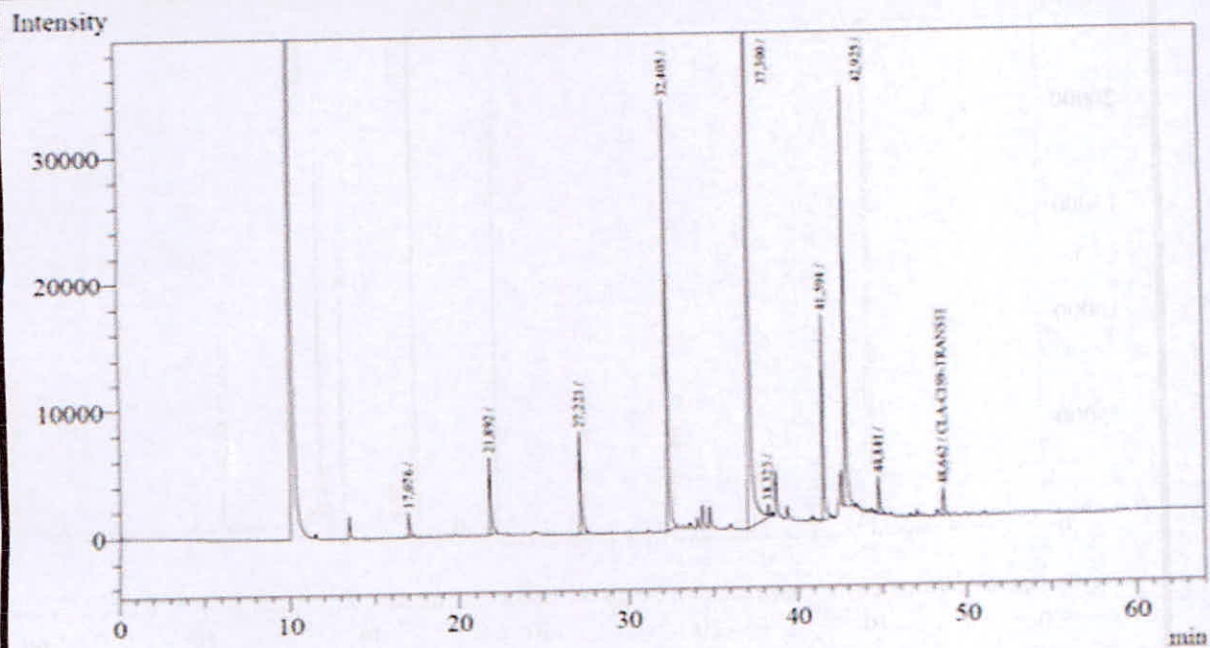
Nº	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	11.548	21701	6072	0.560	Ácido Butírico
2	13.547	53680	11268	1.386	Ácido Hexanoico
3	17.052	46913	7313	1.211	Ácido Octanoico
4	21.881	122242	17954	3.156	Ácido Decanoico
5	27.221	151332	23590	3.907	Ácido Láurico
6	32.449	535913	92660	13.834	Ácido Mirístico
7	34.114	13765	2512	0.355	Ácido Miristólico
8	34.425	43365	7323	1.119	Ácido Pentadecanoico
9	37.385	1768820	189954	45.661	Ácido Palmítico
10	38.803	65092	12740	1.680	Ácido Palmitoleico
11	39.438	17316	3197	0.447	Ácido Heptadecanoico
12	41.659	257202	35705	6.640	Ácido Esteárico
13	42.668	64933	7433	1.676	Ácido Eláídico
14	42.995	656241	90361	16.940	Ácido Oléico
15	44.851	48332	9414	1.248	Ácido Linoleico
16	48.29	6968	1318	0.180	ALC cis-9, trans-11
Total		3873815	518814		

Gráfico ix: ALC en V16



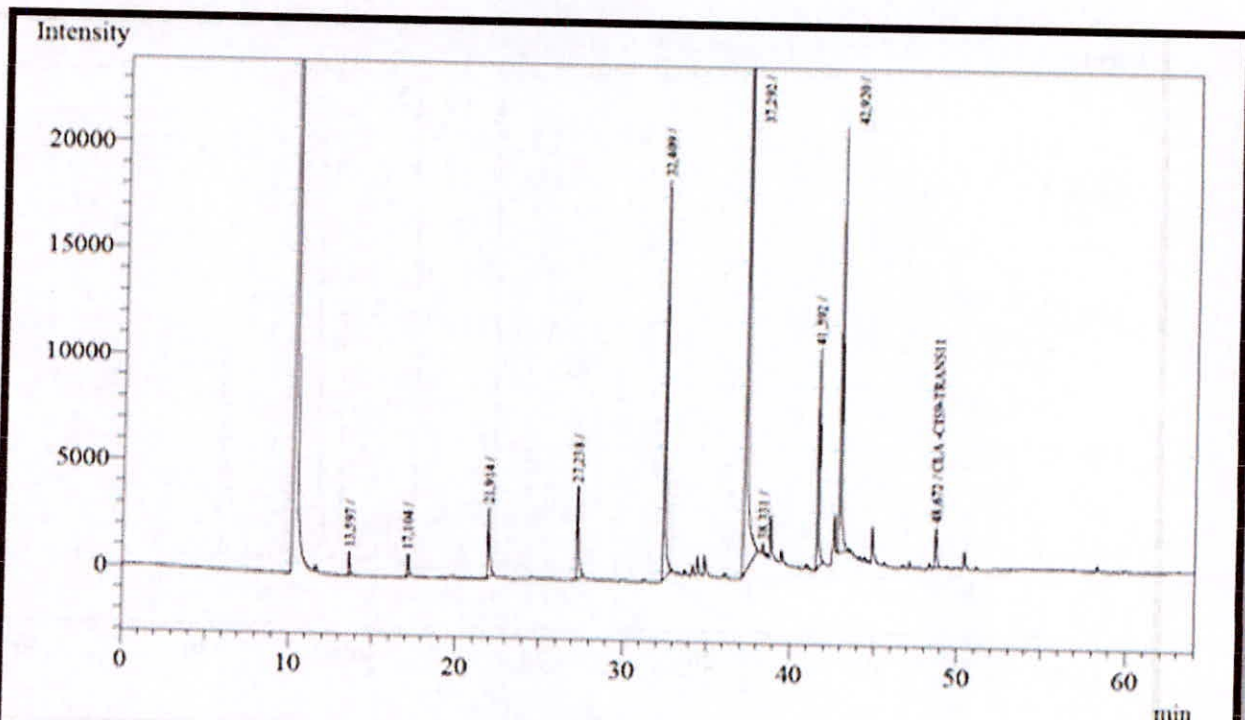
Nº	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	11.548	25463	6072	0.758	Ácido Butírico
2	13.546	59617	11268	1.775	Ácido Hexanoico
3	17.048	50171	11268	1.494	Ácido Octanoico
4	19.823	1816	11268	0.054	
5	21.876	118560	11268	3.530	Ácido Decanoico
6	24.402	9749	11268	0.290	Ácido Undecanoico
7	27.216	136387	11268	4.060	Ácido Láurico
8	31.194	2100	11268	0.063	
9	32.45	471885	11268	14.048	Ácido Miristólico
10	34.419	36715	11268	1.093	Ácido Pentadecanoico
11	37.399	1517799	11268	45.185	Ácido Palmítico
12	38.801	60288	11268	1.795	Ácido Palmitoleico
13	41.667	223728	11268	6.660	Ácido Heptadecanoico
14	42.674	46952	11268	1.398	Ácido Estearico
15	43.002	544417	11268	16.207	Ácido Eláidico
16	43.49	2641	11268	0.079	Ácido Oléico
17	44.848	43386	11268	1.292	Ácido Linoleico
18	48.283	7424	11268	0.221	ALC cis-9, trans-11
Total		3359098	197628		

Gráfico x: ALC en V17



N°	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	17.076	13681	1980	1.032	Ácido Octanoico
2	21.892	45975	6124	3.468	Ácido Decanoico
3	27.221	60604	8080	4.571	Ácido Láurico
4	32.405	203177	33977	15.326	Ácido Mirístico
5	37.3	663427	81229	50.042	Ácido Palmítico
6	38.323	4910	894	0.370	Ácido Palmitoleico
7	41.594	103709	16164	7.823	Ácido Estearico
8	42.925	195504	33090	14.747	Ácido Oléico
9	44.841	20005	2960	1.509	Ácido Linoleico
10	48.662	14736	2152	1.112	ALC cis-9, trans-11
Total		1325728	186650		

Gráfico xi: ALC en V25



Nº	Ret. Time	Area	Height	Concent. (ppm)	Name
1	13.597	5745	1117	0.744	Ácido Hexanoico
2	17.104	6931	1074	0.898	Ácido Octanoico
3	21.914	24102	3270	3.121	Ácido Decanoico
4	27.238	33552	4387	4.345	Ácido Láurico
5	32.409	117905	18744	15.268	Ácido Mirístico
6	37.292	392749	50119	50.858	Ácido Palmítico
7	38.331	2609	488	0.338	Ácido Palmitoleico
8	41.592	60422	10308	7.824	Ácido Estearico
9	42.92	115215	19778	14.920	Ácido Oléico
10	48.672	13009	1939	1.685	ALC cis-9, trans-11
Total		772239	111224		

Gráfico xii: ALC en V26

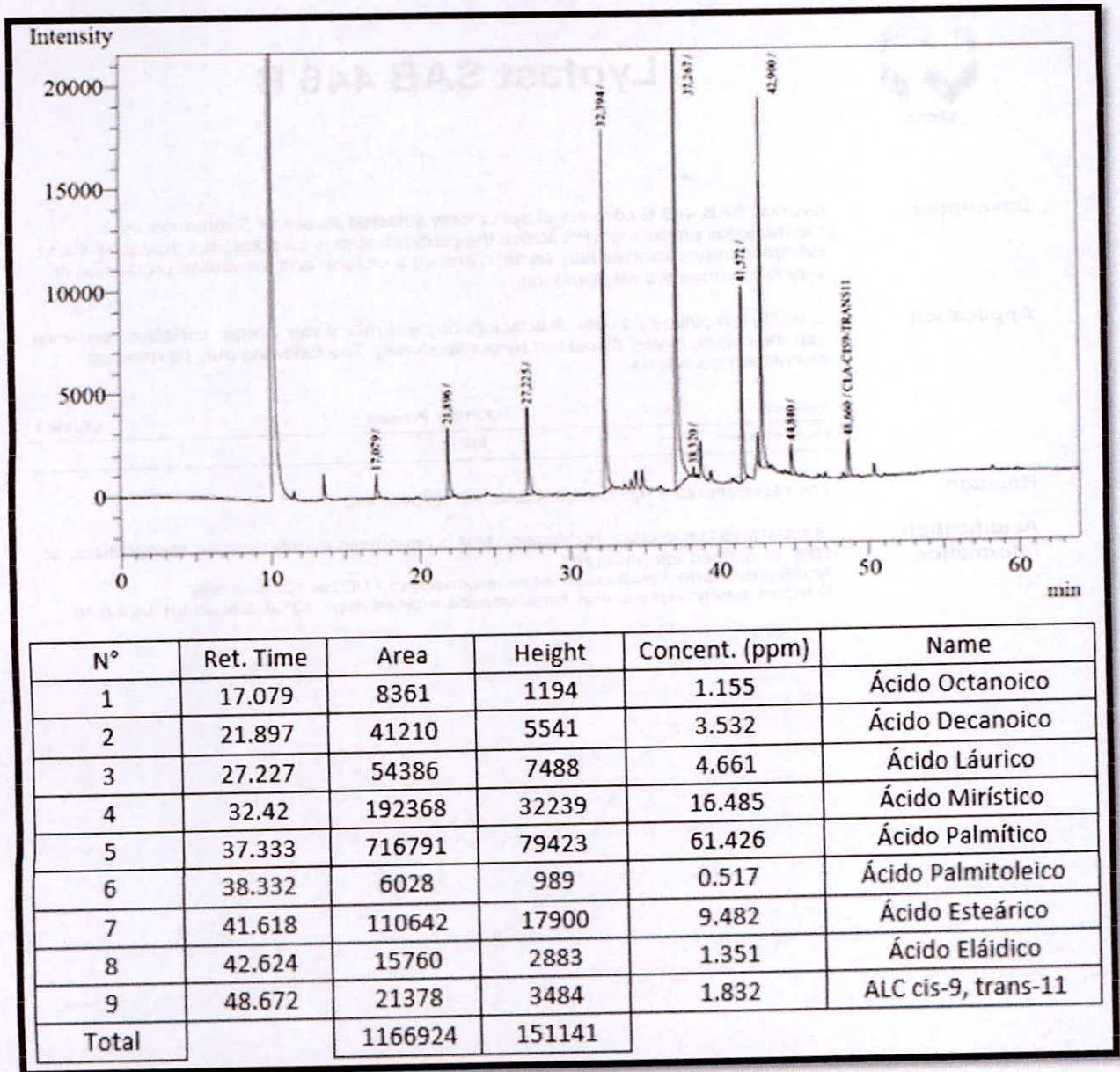


Gráfico xiii: ALC en V27

## ANEXO 8: HOJAS TÉCNICAS DE CULTIVOS LÁCTICOS COMERCIALES Y ESTANDAR ALC

### HOJA TÉCNICA DE CULTIVO SACCO LIOFAST



## Lyofast SAB 446 B

#### Description

**Lyofast SAB 446 B** consists of specifically selected strains of *Streptococcus thermophilus* producing EPS added the probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* to ensure a uniform and controlled production of very mild fermented milk products.

#### Application

Sprinkle the culture powder directly into process milk under aseptic conditions ensuring that the culture is well dispersed by gentle stirring. The following may be used as inoculation guidelines:

Product	UC/100 l Product	UC/100 l
Fermented milk	1.0-5.0	

#### Rotation

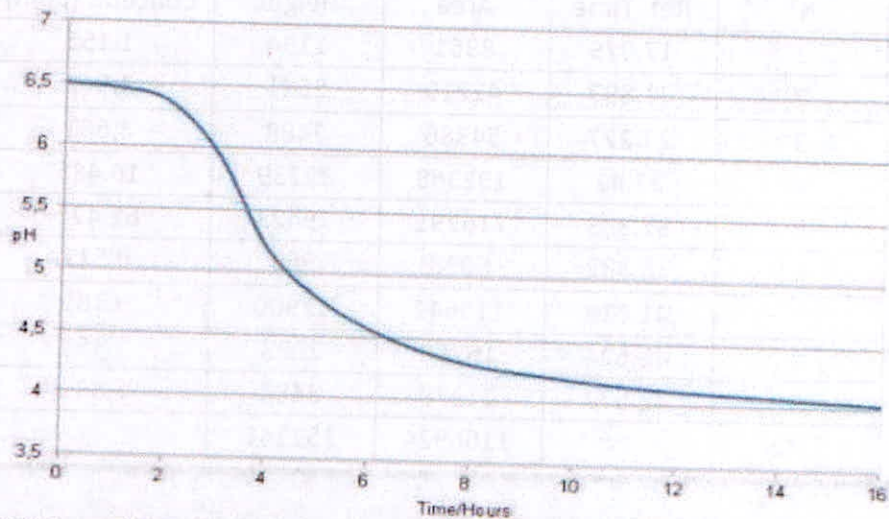
The recommended rotations are SAB 440 B/SAB 442 B.

#### Acidification information

Standardised laboratory acidification test is conducted in milk powder, reconstituted at 10%, at defined temperature.

Acidification profile: inoculation level corresponding to 1 UC per 100 litres milk.

Standard activity: expressed as temperature/time/pH relations: 4.3°C/6.5 hours/pH 4.5 ± 0.15.



#### Culture information

Data are obtained under standardised laboratory conditions, and consequently, should be considered as guidelines.

Optimal temperature for growth	37-45 °C	Scalding temperature	Max. 53°C
Acidification capability	pH 4.3	Adherence test	++
Bile tolerance	++	Acid tolerance	++
Texture formation	5±1 sec/g	Post-acidification	pH 0,2

#### Storage

Unopened pouches should be kept at or below -18°C.



The 400 Series is a premium line of concentrated cultures for the production of fresh bulk, Swiss, and cup-set yogurt, as well as frozen yogurt. Choose from our many 400 Series culture numbers to create a blend for a standard yogurt, or create a custom blend to enhance a specific property. All cultures are designed for viability and consistency to ensure a high active count and reliable set times.

**Product Name:**  
Yoga 400 Series

**Ingredients:**  
Water, Non-Fat dry milk, Lactic acid bacteria  
Cryo-protective agents

**Culture:**  
*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*  
*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

**Appearance:**  
Pellets: Frozen brown pellets with lactic acid odor  
Freeze-Dried: Brown powder with lactic acid odor

**Lactic Count:**  
Not less than  $1.0 \times 10^{10}$  CFU/gram

**Microbial Analysis:**

Coliform	< 1 CFU/gram
E coli	Negative
Salmonella	Negative
Staphylococcus (Coagulase +)	Negative
Yeast / Mold	< 10 CFU/gram

**Packaging:**  
FDA tamper evident foil pouches

**Storage/Shelf-life:**  
< -20°F (-30°C) / 18 months

**Incubation Parameters:**

Pellets	95 - 112°F (35 - 44°C) for 4 - 8 hours
Freeze-Dried	95 - 110°F (35 - 43°C) for 5 - 12 hours

**SIGMA-ALDRICH**

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA


Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

**Certificate of Analysis**Product Name  
Linoleic acid, conjugatedProduct Number: O5607  
Batch Number: MKBX5587V  
Brand: SIGMA  
Formula Weight: 280.4 g/mol  
Storage Temperature: Store at -20 °C  
Quality Release Date: 05 FEB 2010

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Appearance (Turbidity)	Clear	Clear
Proton NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
<sup>13</sup> C NMR Spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Purity (GC)	≥ 98 %	99 %
Impurity	≤ 1 %	≤ 1 %
By GC, Linoleic acid		



Michael Grady, Manager  
Quality Control  
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information provided in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packaging for additional terms and conditions of sale.

Page Number: 1

Page 1 of 1





