

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA

**ELABORACIÓN DE CREMA PASTEURIZADA CON LA ADICIÓN DE
BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS NATIVAS DEL DEPARTAMENTO DE
OLANCHO**

POR

HABIB FRANCISCO ALEMAN MEJIA

TESIS

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO
REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

LICENCIADO EN TECNOLOGIA ALIMENTARIA



CATACAMA, OLANCHO

HONDURAS, C.A

DICIEMBRE 2013

**ELABORACIÓN DE CREMA PASTEURIZADA CON LA ADICIÓN DE
BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS NATIVAS DEL DEPARTAMENTO DE
OLANCHO**

POR:

HABIB FRANCISCO ALEMAN MEJIA

**JUAN AMILCAR COLINDRES M. Sc.
Asesor principal**

**ING. RAMON ANTONIO HERRERA
Asesor secundario**

**Dra. NELYS HERRERA FUNEZ
Asesor secundario**

**LOURDES DE MADRID M. Sc
Asesor adjunto UNAH**

**TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

LICENCIADO EN TECNOLOGIA ALIMENTARIA

CATACAMAS, OLANCHO

HONDURAS, C.A

DICIEMBRE, 2013

FICHA CARTOGRÁFICA

Alemán H., Enríquez L., Amílcar C., 2013. (**Elaboración de crema pasteurizada con la adición de bacterias ácido lácticas nativas del departamento de Olancho**) Habib Francisco Alemán Mejía, Lourdes Enríquez de Madrid, Juan Amílcar Colindres, 7 páginas.

Nombre de los autores: Habib Francisco Alemán Mejía, Lourdes Enríquez de Madrid, Juan Amílcar Colindres.

Disertación académica de licenciatura en Tecnología Alimentaria-UNA 2013

DEDICATORIA

A DIOS todo poderoso porque él me permitió escalar hasta este lugar, dirigiéndome de la mejor manera, brindándome sabiduría, confianza en mí mismo, responsabilidades, entrega, coraje y sobre todo las fuerzas para levantarme en las caídas y así poder lograr esta meta en mi vida.

A MI HIJO Habib Francisco Alemán Calix por brindarme la oportunidad de convertirme en padre, por ser la razón de mi vida y el motivo de lograr esta meta gracias Habito man por regalarme esas sonrisas y te quiero papi, gracias hijo por haberme transformado mi vida en alegrías, tú has sido mi motor de arranque desde el día que naciste. Te amo Hábito man!!!

A MIS MADRES, Mirna Edith Alemán Mejía Y Celia Estelina Mejía Escobar por darme la oportunidad de vivir, depositar su confianza en mí, apoyarme siempre que necesite sus consejos y sobre todo por brindarme y demostrarme su amor incondicional en todas las circunstancias de la vida que son las personas que me ha motivado a salir adelante para hacerlas sentir orgullosas.

A MI FAMILIA en especial a mi tío José Bayardo Alemán por brindarme su apoyo incondicional, sus experiencias, sus consejos, su sinceridad y comprensión en varios momentos que fueron duros pero gracias a usted pude salir adelante gracias tío. A mi tía Diana Maritza Alemán y mi tío Cesar Alejandro Matute por apoyarme en todos los momentos que los necesite y nunca dejarme de la mano gracias tía. A Itati por darme su amor sincero y comprensión en el último año de mi carrera, A mi abuelo José Bayardo Alemán por sus valiosos consejos, A mis tías Romina Glenn y Dania Alemán por brindarme su apoyo y consejos,

A MIS HERMANOS Juan José Alemán, Eduardo Mauricio Alemán, Randall Alejandro Matute, Marissa Paola Matute, Sergio Bayardo Matute y Cesar Mauricio Matute porque siempre estuvieron a mi lado aguantando y compartiendo mis malos y buenos momentos. Y por último a mis dos tíos Jaime Alemán y Josué Mejía por ser además mis amigos, mis tíos, mis hermanos y por esos consejos cuando los necesite. Gracias a todos, mi logro es su logro familia, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTO

A DIOS TODO PODEROSO, porque con su amor, ayuda y bendición he podido lograr una de mis metas más en mi vida.

A MIS COMPAÑEROS de cuarto Carlos, Juan, Wilson, José Francisco, Cristian, Mario, Junior, Luis y Ernesto que se convirtieron en mis hermanos y que juntos compartimos el cuarto durante cuatro años brindándonos el apoyo el uno al otro y tantas experiencias vividas entre nosotros.

A MIS ASESORES, por todo su apoyo brindado en la realización de esta tesis.

A TODOS AQUELLOS familiares, maestros, amigos y compañeros que siempre me apoyaron y creyeron en mí.

A la Universidad Nacional de Agricultura, por brindarme la oportunidad de formar parte de esta gran familia que es uno de mis máximos orgullos.

A la Universidad Nacional Autónoma de Honduras, por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo.

Se agradece por su contribución al desarrollo de esta tesis a:

Mis asesores Juan Amílcar Colindres M. Sc., por su apoyo brindado durante el desarrollo de la investigación, por el tiempo que me brindo al momento de asesorarme, A la Dra. Lourdes Enríquez de Madrid, por confiar en mí, brindarme sus conocimientos y por su ardua dedicación al trabajo, al Ing. Ramón Herrera por ser mi asesor y brindarme su amistad sincera. A la Dra. Nelys Herrera Funez por su apoyo.

Un agradecimiento especial a Francisco Alemán por brindarnos su apoyo, por su aporte con logística para la realización de este trabajo.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA por darme la oportunidad de ser un egresado de esta gran casa de estudio y convertirme en una persona responsable, dedicada.

RECONOCIMIENTO

El desarrollo del proyecto se realizó en colaboración entre la Universidad Nacional Autónoma de Honduras y la Universidad Nacional de Agricultura, mediante una beca de investigación otorgada por el Programa Teasdale-Corti Honduras-Canadá, 2007-2012 ***“Fortaleciendo Capacidades para Lograr la Meta No. 6 del Milenio en Honduras: Combatiendo las Enfermedades Infecciosas”***. Dicho proyecto opera con fondos del programa *Teasdale-Corti* para Alianzas para la Investigación en Salud Mundial de la agencia Canadiense **Iniciativa para la Investigación en Salud Mundial** (www.ghri.ca).

A la Doctora Ana L. Sánchez, Ph .D., Líder del Proyecto Teasdale-Cortí, Honduras-Canadá por su apoyo al desarrollo de la investigación multidisciplinaria en Honduras.

Al personal del Laboratorio Teasdale-Cortí, de la Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas, Departamento de Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

INDICE

	Pág.
ACTA DE SUSTENTACION.....	i
FICHA CARTOGRÁFICA	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	v
RECONOCIMIENTO	vii
INDICE.....	viii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 General.....	3
2.2 Específicos	3
III MARCO DE REFERENCIA.....	4
3.1 Panorama general de situación láctea	4
3.2 La leche.....	5
3.2.2 Composición proximal de la leche.....	6
3.2.3 Algunas propiedades físicas de la leche.....	6
3.2.4 Densidad a 20°C.....	6
3.2.6 Viscosidad a 20°C.....	7
3.2.7 Punto de congelación	7
3.3 Composición de la materia grasa de la leche	7
3.3.1 Distribución de tamaños de glóbulos grasos	8
3.4 Clasificación de los productos lácteos	8

3.4.1 Queso.....	8
3.4.2 Queso fresco.....	9
3.4.3 Queso maduro	9
3.4.4 Mantequilla.....	9
3.4.5 La crema.....	10
3.5 Tipos de desnatados	10
3.5.1 Desnatado centrifugo.....	10
3.5.2 Desnatado espontaneo	11
3.6 Generalidades de las bacterias	12
3.6.1 Taxonomía de las bacterias acido lácticas (BAL).....	13
3.6.2 Clasificación BAL.....	14
3.6.3 Homofermentativas	14
3.6.4 Heterofermentativas	15
3.6.5 Aislamiento de bacterias acido lácticas.....	15
3.7 Fermentos lácticos	17
3.8 Evaluación sensorial	18
IV. MATERIALES Y METODOS	19
4.1 Ubicación	19
4.2 Periodo de duración	20
4.3 Materiales I ETAPA	20
4.4 Medios de cultivos y reactivos.....	20
4.5 Equipos	20
4.6 Medios de cultivo.....	21
4.7 Aislamiento.....	21
4.7.1 Tinción de Gram.....	22
4.7.2 Prueba de catalasa	23
4.8 Identificación	23
4.9 Conservación	24
4.10 Materiales II ETAPA	24
4.11 Equipo II ETAPA	24
4.12 Método de preparación de muestras	24

4.12.1 Hoja de evaluación durante la fabricación de la crema.....	26
4.13 Evaluación sensorial	26
4.13.1 Análisis sensorial.....	26
4.13.2 Se realizo la prueba dúo-trío	27
4.13.3 Prueba de Ji cuadrado (χ^2)	27
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1 Resultados microbiológicos	29
5.1.2 Recuento total de bacterias.....	29
5.1.3 Recuento de coliformes totales	30
5.1.4 Recuento Total de Bacterias Acido lácticas	31
5.1.5 Resultados de tinción de gram, morfología colonial y celular para crema.	33
5.1.6 Resultados bioquímico de la prueba de catalasa	34
5.1.7 Resultado del comportamiento de las cepas en leche	34
5.1.8 Resultado del comportamiento en la capacidad de acidificar la leche de las BAL aisladas.....	35
5.2 Resultados del pH en la elaboración de la crema	36
5.2.1 Medición del pH de la primera repetición.....	36
5.2.2 Medición del pH de la segunda repetición	37
5.3 Resultados evaluación sensorial.....	40
VI CONCLUSIONES.....	29
VII RECOMENDACIONES	29
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS	46

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Normas microbiológicas hondureñas.....	11
Cuadro 2 Normas para metales pesados	11
Cuadro 3. Medios de Cultivo más utilizados para aislar las Bacterias Lácticas	16
Cuadro 4. Principales tipos de formas bacterianas.....	17
Cuadro 5. Resultados obtenidos del Agar P.C (plate count) a partir de la crema, queso seco y queso fresco:	29
Cuadro 6. Resultados obtenidos del Agar MacConkey a partir de la crema, queso seco y queso fresco	31
Cuadro 7 Resultados obtenidos del Agar MRS a partir de la crema, queso seco y queso fresco.....	32
Cuadro 8 Resultado de tinción de Gram.....	33
Cuadro 9. Resultados de catalasa positiva.....	34
Cuadro 10. Resultados de coagulación de leche en 24 horas	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Gráfico de recuento total entre muestras de queso y crema.....	30
Figura 2. Gráfico de Coliformes Totales en las muestras.	31
Figura 3. Recuento total de bacterias acido lácticas en muestras de crema y queso.	32
Figura 4. Gráfico de comportamiento de la capacidad de acidificar en la leche.....	35
Figura 5. Tendencia de la bajada de pH en la primera repetición de la crema pasteurizada con inóculo monitoreada cada hora.	36
Figura 6. Tendencias de la bajada de pH de la segunda repetición de la crema pasteurizada con inóculo, monitoreada cada hora.	37
Figura 7. Tendencias de la bajada de pH en la tercera repetición de la crema pasteurizada con inóculo, monitoreada cada hora.	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Hoja de evaluación durante la fabricación de la crema	47
Anexo 2 Cuadro de resultados de la tendencia del pH a la primera repetición en la elaboración de la crema pasteurizada.....	48
Anexo 3 Cuadro de resultados de la tendencia del pH a la segunda repetición en la elaboración de la crema pasteurizada.....	48
Anexo 4 Cuadro de resultados de la tendencia del pH a la tercera repetición en la elaboración de la crema pasteurizada.....	49
Anexo 5 Cuadro de resultados de la tendencia del pH de las tres repeticiones de la crema pasteurizada con inculo y de la crema pasteurizada sin inculo.....	49
Anexo 6 Diagrama de flujo de proceso	50
Anexo 7. Ficha para prueba dúo trío	51
Anexo 8. Medios de Cultivo.....	52
Anexo 9. Fundamento de la Tinción De Gram.....	54
Anexo 10. Fotografías	55

ABREVIATURAS

BAL	Bacterias Ácido Lácticas
MRS	Man, Rogosa, Sharpe
SENASA	Secretaría Nacional de Sanidad Alimentaria
UNA	Universidad Nacional de Agricultura
UNAH	Universidad Nacional Autónoma de Honduras
MEIZ	Maestría en Enfermedades Infecciosas y Zoonóticas
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
USAID	Agencia Internacional para el Desarrollo de Estados Unidos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

I. INTRODUCCIÓN

La producción de leche hondureña es de 800,000 litros diarios, lo que representa un 30 por ciento de la producción de leche de América Central. Por consiguiente el valor de la producción de lácteos es muy importante para la economía del país. (USAID. 2007).

Sin embargo a nivel del corredor lácteo de Olancho, SENASA y la Universidad Nacional de Agricultura reportan que un 60 a 70 por ciento de las plantas artesanales que procesan la leche de la región, no cumplen con los requisitos de infraestructura, equipo y aplicación de las buenas prácticas de manufactura, obligatorios para la producción de alimentos inocuos. (PASELO 2004).

A pesar de todo, la zona de Olancho es una zona donde se elabora productos lácteos con sabores y aromas característicos de la región, con muy buena aceptación al mercado nacional, salvadoreño y el mercado nostálgico hondureño en Estados Unidos.

La industria láctea que compite a nivel nacional e internacional utiliza grandes cantidades de bacterias lácticas, que son las que le dan las características organolépticas a los alimentos fermentados tales como quesos, yogur, mantequilla, crema etc. Las principales especies bacterianas pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Chacón et al., 2000).

Sin embargo, no existe en el mercado cultivos lácticos iniciadores a nivel comercial que den las propiedades organolépticas de los quesos y la crema olanchana, que permitan la fabricación de una crema pasteurizada inocua con probabilidades de competir en el mercado nacional e internacional. En este sentido, identificar, aislar, reproducir y

comercializar estas bacterias nativas, constituye un aspecto relevante para la mejora de la competitividad del sector lácteo de la región y la salud de la población hondureña en general. Por consiguiente, los resultados de esta tesis podrían ser el inicio para la producción de una crema pasteurizada a nivel artesanal e industrial con requisitos microbiológicos acordes a la demanda del mercado nacional e internacional con las características organolépticas originarias de la región con gran demanda a nivel de viajeros, hoteles, hospitales y supermercados entre otros.

II. OBJETIVOS

2.1 General

- Elaboración de crema pasteurizada con la adición de bacterias ácido lácticas nativas del departamento de Olancho.

2.2 Específicos

- Aislar y reproducir bacterias ácido lácticas nativas del departamento de Olancho.
- Producir una crema pasteurizada adicionando las bacterias ácido lácticas nativas del departamento de Olancho con similares parámetros productivos a la crema no pasteurizada artesanal.
- Hacer una prueba de similitud entre la crema pasteurizada con la adición de bacterias ácido lácticas nativas y la crema tradicional no pasteurizada de la región.

III MARCO DE REFERENCIA

3.1 Panorama general de situación láctea

La producción de leche hondureña es de 800,000 litros diarios, lo que representa un 30 por ciento de la producción de leche de América Central. Por consiguiente, el valor de la producción de lácteos es muy importante para la economía del país y de la familia hondureña en particular. Por otro lado, el departamento de Olancho tiene la mayor cantidad de ganado de los 18 departamentos del país y junto al departamento de Atlántida representa una gran parte de la producción de leche y capacidad de procesamiento de Honduras. Con frecuencia, la leche se procesa artesanalmente creando diferentes productos de mucha demanda en el mercado nacional y en menor escala en el mercado de Nicaragua y El Salvador. (USAID. 2007).

La mayoría de los pequeños y medianos procesadores de lácteos en Honduras están operando sus plantas en condiciones que a menudo no reúnen las condiciones sanitarias básicas para asegurar que sus productos sean seguros para el consumo humano. Frecuentemente, estos productores operan tanto el proceso como el empacado de sus productos en sus casas en condiciones extremadamente rústicas y no sanitarias, lo que representa un riesgo serio para los consumidores. Un punto crítico de contaminación es la leche en estado líquido sin analizar, el uso de leche sin pasteurizar, sistemas malos de filtración y el uso de tanques de cemento sin esterilizar para el almacenamiento durante la producción de “cuajo”, el uso de utensilios de madera para remover, mala sanidad de los empleados, animales muy cerca de los lugares de proceso y mal almacenamiento del producto. (PASELO 2004).

La actividad ganadera y lechera, se centra en el valle del Guayape, este valle, tiene una extensión superficial de 93,000 Ha., cuenta con un total de 10,108 fincas de doble propósito, que producen el 68% de la producción de leche del departamento y el 12% de la producción total de leche a nivel nacional. (PASELO 2004).

Existen aproximadamente 49 plantas procesadoras de leche, con una producción en lácteos alrededor de 40,066 libras (14.62 millones de libras por año) producto del procesamiento de 112,270 litros de leche por día (40.98 millones de litros anuales). La inversión en el insumo de la leche se estima en 163.9 millones de Lempiras (9.64 millones de dólares), que deja una producción en lácteos valorada en 264.7 millones de Lempiras (15.57 millones de dólares), anualmente. (PASELO 2004).

SENASA y la UNA reportan que un 60 a 70 por ciento de las plantas artesanales no cumplen con los requisitos de infraestructura, equipo y aplicación de las buenas prácticas de manufactura, a pesar de los grandes esfuerzos hasta ahora realizados. (PASELO 2004).

3.2 La leche

La leche es un medio multifásico: una fase acuosa continua que contiene esencialmente lactosa y minerales y elementos dispersos de naturaleza lipídica (glóbulos grasos) y de naturaleza proteica (micelas de caseína). Las propiedades nutricionales y tecnológicas dependen, en gran parte, de las características fisicoquímicas de cada una de las fases. (Mahaut, M. *et. al* 2003).

3.2.1 Secreción de la leche

La leche es secretada en la glándula mamaria por células epiteliales que tapizan los alveolos, conectadas por medios de canales que permiten la conducción de la leche a la cisterna de la ubre. Las células epiteliales se desarrollan durante la gestación y su actividad,

controlada por hormonas peptídicas y esteroideas, se expresa desde el parto. (Mahaut, M. *et. al* 2003).

3.2.2 Composición proximal de la leche

La leche es un sistema coloidal en el que están disueltos una gran variedad de compuestos: lactosa (5%), grasa (4%), proteínas (3.2%) y sales (0.7%). Sin embargo, la composición exacta no se puede definir en forma general, puesto que varía en función de múltiples factores, como son la raza, el período de lactación y la alimentación del animal entre otros (Guzmán, 2003).

3.2.3 Algunas propiedades físicas de la leche

3.2.4 Densidad a 20°C

Leche entera 1.028 - 1.034 kg.m³

Leche desnatada 1.035 -1.036 kg.m³

Materia grasa 940 kg.m³ (Mahaut, M. *et. al* 2003)

3.2.5 PH de la leche

Una leche normal tiene un valor de pH comprendido entre 6,6 y 6,8. Un valor de pH más bajo en la leche puede ser debido a contaminación por flora acidificante o a la presencia de calostro. Una leche alcalina es una leche patológica (leche con mastitis). (Mahaut, M. *et. al* 2003)

La acidez titulable, expresada en grados Dornic ($^{\circ}\text{D}$) es del orden de 15 a 18 $^{\circ}\text{D}$. (Mahaut, M. *et. al* 2003).

Esta acidez es debida a:

- Las caseínas, por sus grupos de esteres fosfóricos
- Los elementos solubles (Mahaut, M. *et. al* 2003).

3.2.6 Viscosidad a 20°C

La leche natural, fresca, es más viscosa que el agua, tiene valores entre 1.7 a 2.2 centi poise para la leche entera, mientras que una leche descremada tiene una viscosidad de alrededor de 1.2 cp. La viscosidad disminuye con el aumento de la temperatura hasta alrededor de los 70°C, por encima de esta temperatura aumenta su valor. (Mahaut, M. *et. al* 2003).

3.2.7 Punto de congelación

La leche se congela a $-0,555^{\circ}\text{C}$. Es la característica más constante de la leche y su medición se utiliza para detectar el aguado. Si el punto de congelación es superior a -0.53°C , sospecharemos adición de agua. (Mahaut, M. *et. al* 2003).

3.3 Composición de la materia grasa de la leche

La composición lipídica de la leche se muestra en la siguiente tabla. Los triglicéridos (esteres de ácidos grasos y de alcoholes) representan más del 97% de los lípidos y una pequeña parte son di glicéridos, fosfolípidos y sustancias insaponificables.

Composición lipídica global de la leche de vaca

Compuesto	Masa %
<i>Triglicéridos</i>	<i>97-98</i>
<i>Di glicéridos</i>	<i>0,25-0,48</i>
<i>Mono glicéridos</i>	<i>0,016-0,038</i>
<i>Ácidos grasos libres</i>	<i>0,1-0,44</i>
<i>Esteroles</i>	<i>0,22-0,41</i>
<i>Fosfolípidos</i>	<i>0,2-1</i>
<i>Carotenoides</i>	<i>0,008</i>

(Mahaut, M. et. al 2003).

3.3.1 Distribución de tamaños de glóbulos grasos

La leche cruda contiene alrededor de 10^{10} glóbulos grasos por mililitro, cuyos diámetros oscilan entre menos de unas décimas de micrómetro hasta alrededor de 10 μm . Más del 90% de la grasa se encuentra contenida dentro de glóbulos con diámetros de entre alrededor de 1 y 8 μm . (Schlimme, E. et. al. 2002).

3.4 Clasificación de los productos lácteos

3.4.1 Queso

El queso es un alimento concentrado que contiene prácticamente todos los nutrientes esenciales presentes en la leche cruda. Puede ser fresco o haber pasado por un proceso de maduración. Para elaborarlo se coagula la leche y se retira el suero. La coagulación puede llevarse a cabo por diversos métodos, de éstos, el más común es añadir la cuajada, una enzima natural que se encuentra en el cuarto estómago de un rumiante.

La leche se coagula agregándole un ácido, como el vinagre o los extractos de enzimas vegetales. Las características finales del queso dependen, en gran medida, del tipo particular de coagulante utilizado. (Vásquez *et al.*, 2005).

3.4.2 Queso fresco

Está dispuesto para el consumo tras el proceso de fabricación. Se obtiene al coagular la leche, previamente pasteurizada, y esta coagulación puede ser de tipo ácida, enzimática o mixta. Este queso tiene un alto contenido de humedad (>67%) y no ha sufrido un proceso de maduración, por lo que suele tener características gustativas similares a la leche fresca o leche acidificada. Debe consumirse en pocos días y su transporte y comercialización se debe realizar a temperatura de 2 – 10°C. (Vásquez *et al.*, 2005).

3.4.3 Queso maduro

Es un queso que lleva un proceso de maduración después de su fabricación. Para lograr la maduración, previo a la adición del cuajo se agregan cultivos lácticos; la acción bioquímica de estas bacterias sobre los componentes del queso y sobre todo en la grasa, le confieren color, olor y sabor característico al queso. (Vásquez *et al.*, 2005).

3.4.4 Mantequilla

La mantequilla se prepara utilizando el componente de grasa de la leche entera, conocido como nata natural, que se halla dispersa en pequeños glóbulos invisibles. Al elaborarse la mantequilla, los glóbulos de grasa se unen por agitación mecánica. La grasa forma una masa semisólida compuesta por un 80 a 85% de grasa y un 16% de agua. (Menestres 2004).

3.4.5 La crema

Es la parte especialmente rica en grasa de la leche, obtenida por descremado natural o por centrifugación de la leche entera. El uso de la crema es diverso, pero su mayor utilidad es como alimento del hombre y tratada en forma especial, como materia prima en la elaboración de mantequilla. (Chamorro 2000).

El descremado es el proceso por el cual se remueve parcialmente la grasa de la leche, se realiza para obtener la crema y la leche descremada a partir de leche entera. El proceso de descremado se realiza mediante la utilización de una descremadora eléctrica. (FAO 2011).

3.5 Tipos de desnatados

3.5.1 Desnatado centrifugo

Principio

La separación de la grasa se acelera considerablemente al someter la leche a una centrifugación. Para favorecer la separación de las fases, la operación de desnatado centrifugo se realiza a una temperatura de 50 a 60°C (disminución de la viscosidad); también tiene un efecto positivo la disminución del contenido en materia grasa. (Mahaut, M. *et. al* 2004).

En una tambor en rotación, la partícula es despedida arrastrada por la fuerza dispersante y sometida a la acción de la fuerza centrífuga. El sentido del desplazamiento de la partícula es la resultante de estas dos fuerzas. (Mahaut, M. *et. al* 2004).

El desnatado de la leche se realiza en desnatadoras centrifugas y herméticas que están constituidas:

- Un tambor cilíndroconico en el que la leche a desnatar se introduce a presión
- Un conjunto de platillos separados entre sí unos 2 mm e inclinados 45°, que separan la leche en capas muy finas. Estos platos tienen unos orificios que conforman los conductos verticales por los que circula la leche. la leche desnatada y la nata salen por la parte superior del tambor por dos conducciones separadas. (Mahaut, M. *et. al* 2004).

3.5.2 Desnatado espontaneo

La separación de los glóbulos grasos en la leche en reposo es un proceso normal, ya que los glóbulos tiene una masa volumétrica inferior (920 kg.m^{-3}) a la de la fase dispersante (1.034 kg.m^{-3}), esta diferencia se traduce en una ascensión de la materia grasa (fenómeno de desnatado) (Mahaut, M. *et. al* 2004).

Cuadro 1. Normas microbiológicas Hondureñas.

Especificaciones	Límite máximo
Monofilos aerobios	50,000 UFC/g
Coliformes totales	10 UFC/g
Coliformes fecales	Ausencia en 10 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	100 UFC /g
<i>Salmonella spp</i>	Ausencia en 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente

Normativa Senasa

Cuadro 2 Normas para metales pesados

Especificaciones	Límite máximo
Arsénico y hierro	0.2 mg / Kg.
Mercurio	0.005 mg / Kg.
Plomo	0.1 mg / kg

Normativa Senasa

3.6 Generalidades de las bacterias

Son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistas inferiores. Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores: son células procariotas (su núcleo está formado por un único cromosoma y carecen de membrana nuclear (Madigan *et al.*, 2000).

Las BAL son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa), con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis (Universidad Libre, Barranquilla 2006).

La industria de procesamiento de productos lácteos utiliza grandes cantidades de bacterias lácticas, las cuales son empleadas en la preparación de alimentos fermentados tales como quesos, yogur, mantequilla, crema etc. Las principales especies bacterianas pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Chacón *et al.*, 2000).

El empleo de bacterias lácticas en la elaboración de productos lácteos resulta central por las propiedades características de aroma, sabor y textura que estas desarrollan, como también

por la seguridad microbiológica a causa del pH, presencia de bacteriocitas y otros productos con actividad antimicrobiana, ejemplo el peróxido de hidrogeno resultante de su metabolismo, lo que permite prolongar la vida útil del producto. (PASELO 2004).

Las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos. (Carr et al., 2002).

3.6.1 Taxonomía de las bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL comprende un diverso grupo de organismos Gram-positivos, formadores de no esporas, no motilidad y forma de cocos y carencia de catalasa. Son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5 -0.8 μm . Se trata de un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Gram-positiva, son anaerobias facultativas, catalasa negativa, y no formadoras de esporas. Carecen de actividad respiratoria porque les falta una enzima (citocromo catalasa), contiene un grupo hemo, que les permite poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones. (Parra R, 2010).

A pesar de su metabolismo anaerobio, son anaerobios tolerantes y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire. Diferentes factores afectan el crecimiento de BAL en un medio de fermentación. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, como también de las condiciones ambientales; la mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico) y varios aminoácidos. (Parra R, 2010).

Son quimoorganotróficos y solamente crecen en medios complejos. Carbohidratos fermentables y alcoholes pueden ser empleados como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico, a través de la degradación de hexosas a lactato (homofermentativas) y productos adicionales como acetato, etanol, CO₂, formato o succinato (heterofermentativas). (Parra R, 2010).

3.6.2 Clasificación BAL

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *enterococcus*, *Oenococcus*, *tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* son los principales miembros de las BAL, siendo *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros. (Parra R, 2010).

Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (produce sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos. (Parra R, 2010).

3.6.3 Homofermentativas

El grupo homofermentativo compuesto de *lactococcus*, *pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*. Utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico. Además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En contrastes, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, y así solamente generan la mitad de la energía del grupo homofermentativa. (Parra R, 2010).

3.6.4 Heterofermentativas

Producen solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de ácido lactio, 1 mol de etanol y un mol de CO₂. 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa. Este grupo está compuesto de un número de géneros incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa, así que, en lugar de seguir la vía (EMP), utilizan las vías de la hexosa monofosfato o de la pentosa. (Parra R, 2010).

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en mesófilas y termófilas.

Mesófilas: temperatura ideal de incubación 20-25°C, volumen de cultivo líquido 1-2%, tiempo de incubación 18-20 horas, acidez final 0.8% de ácido láctico.

Termófilas: temperatura ideal de incubación 40-45°C, volumen de cultivo 2-3%, tiempo de incubación 2-4 horas, acidez final 0.9% de ácido láctico. (Parra R, 2010).

3.6.5 Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se dispone actualmente de muchos medios de cultivo para el aislamiento y diferenciación de las bacterias lácticas, aunque sólo algunos de ellos se los considera efectivamente selectivos (Stanley, 1998, Hassan y Frank, 2001).

La capacidad diferenciadora se basa en las características bioquímicas (catalasa, oxidasa y Coloración de Gram) y bioproductos (ácido acético, diacetilo, acetona, gas carbónico, etc.) de las especies a aislar (Hassan y Frank, 2001).

Cuadro 3. Medios de Cultivo más utilizados para aislar las Bacterias Lácticas

MICROORGANISMOS	AGAR
<i>Lactobacillus spp.</i> <i>Lactococcus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Echerichae coli</i>	MRS (De Man Rogosa y Sharpe) M17 (Broth) MSE (Mayeux, Sandine y Elliker) EMB (Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose)
<i>Leuconostoc</i>	APT (American Public Health Association)

Fuente: Adaptado de Marth, 2001

Catalasa. Se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno. Entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos frescos almacenados en aerobiosis en refrigeración. (Fung, 1997).

Tinción de Gram. Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en gram positivas y gram negativas según la composición de su pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fuscina o safranina, quedando de color rosado. (Merck, 2005).

Para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL. Sin embargo, otros alimentos son también excelentes medios de crecimiento y producción de metabolitos de bacterias lácticas, entre ellos se encuentran las masas de cereales, los vegetales y la carne (Vázquez).

Cuadro 4. Principales tipos de formas bacterianas

FORMA	ASPECTO
1. Cocos	Células más o menos esféricas.
2. Bacilos	En forma de bastón, alargados, que a su vez pueden tener varios aspectos: <ul style="list-style-type: none">• Cilíndricos• Fusiformes• En forma de maza
3. Espirilos	Atendiendo a los tipos de extremos, éstos pueden ser: <ul style="list-style-type: none">• Redondeados (lo más frecuente)• Cuadrados• Biselados• Afilados
4. Vibrios	Forma de espiral, con una o más de una vuelta de hélice
5. Otros tipos de Formas	Proyectada su imagen sobre el plano tienen forma de coma <ul style="list-style-type: none">• Filamentos, ramificados o no• Anillos casi cerrados y otras formas con prolongaciones

Fuente: Iañez, 1998.

3.7 Fermentos lácticos

Los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca. (Hassan y Frank, 2001).

Estos productos acidificados ya se habían utilizado mucho tiempo antes como inóculo para producir queso, mantequilla y cultivos lácticos, pero las fermentaciones resultantes eran imprevisibles y de calidad desigual. La producción comercial de cultivos iniciadores y su uso crecieron rápidamente en la industria láctea debido a sus numerosas ventajas. (Hassan y Frank, 2001).

Actualmente, muchos productos lácteos se elaboran con cultivos lácticos iniciadores comerciales, que han sido aislados y seleccionados en función de la variedad, de las propiedades deseadas y de la velocidad de producción de ácido láctico. Entre las propiedades deseadas pueden incluirse la producción de sabores, aromas, resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, etc. (Hassan y Frank, 2001).

3.8 Evaluación sensorial

La evaluación sensorial es una disciplina científica utilizada para medir, analizar e interpretar respuestas a las propiedades de los alimentos por medio de los sentidos (vista, olfato, sabor, tacto y oído). La información hedónica que se obtiene es una herramienta valiosa por que provee información más en concordancia con la de los consumidores, que son los únicos que pueden indicar con veracidad el grado de aceptación o rechazo de un producto (Acevedo, 2004).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Ubicación

El presente trabajo de investigación se realizó en dos fases. La primera fase, que consistió en el aislamiento de las bacterias nativas se desarrolló en el laboratorio de Teasdale-Corti, de la maestría en enfermedades infecciosas y zoonóticas (MEIZ), ubicado en el cuarto piso del edificio de ciencias biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras en Tegucigalpa, Francisco Morazán.

La segunda fase, de perfeccionamiento de los parámetros de proceso o desarrollo del producto y la evaluación sensorial, se realizaron en el laboratorio de microbiología de alimentos y laboratorio de evaluación sensorial de la Universidad Nacional de Agricultura en el municipio de Catacamas Olancho, a 83°53 longitud oeste y 14°51 latitud en el departamento de Olancho, con 450 metros sobre el nivel del mar y 215 km carretera que conduce a municipio Dulce nombre de Culmí. La precipitación anual promedio alcanza los 1,343.3mm de los cuales el 88% se registran en los meses lluviosos. Según la clasificación bioclimática de Holdridge, el clima corresponde al de bosque seco tropical, que colinda al norte con los municipios de Gualaco, San Esteban, Dulce Nombre de Culmí y con la República de Nicaragua; al oeste con los municipios de San Francisco de Becerra, Santa María del real y Juticalpa.

La procedencia de las muestras de queso y crema obtenidas para la identificación y aislamiento de bacterias lácticas nativas, así como la leche de donde se obtuvo la crema no pasteurizada utilizada en este trabajo de investigación procedía de las aldeas de la colonia agrícola, la sosa, gualiqueme, el coyote y las agujas, mismas que están dentro de las

condiciones climatológicas del bosque tropical seco descrito, en el cual se encuentra también la Universidad Nacional de Agricultura. Estas comunidades entregan su leche a las plantas de Lácteos el Pataste, Lácteos Jutiquire y Lácteos Alvarado, de donde se llevaron las muestras para el aislamiento de bacterias nativas.

4.2 Periodo de duración

El trabajo de investigación se realizara en el periodo comprendido entre los meses de junio y septiembre de 2013.

4.3 Materiales I ETAPA

De uso personal: Gabacha, Redecilla.

Laboratorio: Cristalería de laboratorio, Mascarilla, Guantes estériles, Placas con agar, Porta Objetos, Asas, Gradillas, algodón, puntas para pipetas, pipeta, mechero, papel toalla, alcohol al 72%, agua destilada, reactivos (identificación de BAL).

4.4 Medios de cultivos y reactivos

Alcohol al 70%, Agar MRS, Agar Tomate, Agar Columbia, Agar Soya Triticasa, Peptona, Caldo Soya Triticasa, Tiras reactivas para identificación de cocos Gram positivos Api 20 Strep, Agua destilada, Etanol, reactivos para la colocacion de Gram, Peróxido de Hidrogeno al 3% (Mac Faddin 2013).

4.5 Equipos

Equipo de Laboratorio de Nivel de Bioseguridad II. Cámara de flujo laminar, incinerador, incubadora con CO₂, autoclave, placa de calentamiento con agitación, destilador, balanza analítica, microscopio, cámara de extracción de gases, vortex para agitación de tubos, dos refrigeradores uno para material limpio y otro para material sucio. (Anexo 10).

Toma de muestra:

Se recolectaron muestras de diferentes plantas procesadoras de lácteos del departamento de Olancho, específicamente del valle de Guayape y el Municipio de Dulce Nombre de Culmi, tomando muestra de crema de cada centro, siguiendo procedimientos higiénicos de recolección, rotulación y transporte en frío estándar.

4.6 Medios de cultivo

Para el aislamiento e identificación de bacterias fue necesario la utilización de medios enriquecidos de diferentes tipos, tales como medio selectivo para bacterias ácido-lácticas Agar MRS y medios enriquecidos como ser Agar Columbia, Agar Soya Tripticasa y algunos caldos para la activación o reproducción y conservación de bacterias tales como Caldo Soya Tripticasa, Agua Peptonada y Leche. (Anexo 10, 11).

4.7 Aislamiento

Para la identificación de bacterias fue necesario obtener aislamiento por colonias específicas a través de diferentes técnicas y medios selectivos, entre ellas la técnica de vaciado en placa en los medios selectivos y diferenciales Agar MRS y Agar Tomate.

De las muestras de crema seleccionadas se tomaran 10 gramos de cada muestra, estas fueron vertidas en 90 mililitros (ml) de una solución peptonada al 1%, después se mezclaron para obtener una distribución uniforme de la muestra en la peptona (dilución 10^1). Se procedió a realizar las diluciones seriadas en tubos de ensayos conteniendo de 9 ml de peptona 1 %, agregando 1 ml de cada dilución hasta llegar a la dilución 10^8 .

Se utilizó la técnica de vaciado en placa con los medios selectivos Agar MRS y Agar Tomate, tomando 1 ml de cada dilución vertiéndolo en placas Petri estériles por duplicado. Al momento de cubrir la dilución con el Agar se mezcló tratando de hacer una distribución

de la muestra en toda superficie interna de la placa antes de que el medio solidificara. Una vez que el medio solidificó las placas Petri fueron llevadas a incubación por 24 horas en una atmósfera con 5-10% CO₂, a 35-37 °C.

Después de 24 horas de incubación se procedió a hacer el recuento total de bacterias. Las colonias características a BAL se aislaron con la técnica frobisher y posteriormente se realizó coloración de gran correspondiente a los géneros de interés: lactococcus sp, Leuconostoc sp y lactobacillus.

4.7.1 Tinción de Gram

Se utilizó la coloración de Gram, que es un tipo de tinción diferencial empleada en el aislamiento, para la visualización de las bacterias obtenidas. La pared celular es responsable de la tinción de gram.

El procedimiento inicio con la colocación del frotis en el puente de coloración, luego cubrir los frotis con Cristal Violeta durante un minuto, después lavar con agua del grifo para eliminar el exceso de colorante. Luego se cubre con Lugol durante un minuto, lavar con agua para eliminar el exceso de Lugol. Seguidamente aplicar gota a gota del Alcohol Cetona, lavar inmediatamente con agua del grifo. Después de esto cubrir el frotis con Safranina durante 30 segundos, seguidamente lavar con agua del grifo. Por ultimo dejar secar los frotis para luego ver en el microscopio.

La técnica de tinción tiene como finalidad crear un contrastes entre la célula y el medio que la rodea, y una de las más importantes, esta técnica nos ayudó a hacer una identificación preliminar de las bacterias que aislamos de las muestras de crema, queso seco y queso fresco es por eso que esta técnica es fundamental en el proyecto de investigación realizada (Anexo 9).

4.7.2 Prueba de catalasa

Luego se procedió a realizar la prueba de catalasa, que se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*.

Posteriormente se preparó Agar sangre para sembrar en este medio, con el fin de purificar las cepas ya obtenidas y luego realizar las pruebas bioquímicas para la identificación de estas cepas aisladas y purificadas.

El Agar sangre es un medio de cultivo enriquecido preparado para la recuperación y aislamiento de toda clase de microorganismos Gram positivos y gram negativos. Al medio le fue adicionado sangre de cordero con el fin de establecer los microorganismos característicos que puedan ayudar a su identificación.

El Agar Sangre de Cordero tubo un estricto control de calidad a lo largo del proceso de producción, luego de prepararlo y vaciarlo en las placas se puso en prueba de esterilidad por 24 horas para asegurar que no estaba contaminado con la sangre agregada o por un microorganismo que estuviera en el área de preparación.

4.8 Identificación

Una vez seleccionados los cultivos característicos de BAL con morfología celular de cocos, se procedió a la identificación mediante la técnica de AP1 20 STREP que permite la identificación de los *estrepococos*, *Leuconostoc* y *Enterococos*. *Biomeriux* (Rivas C., 2007). (Anexo 10).

Luego de obtener cepas jóvenes en el Agar sangre se procedió posteriormente a realizar pruebas bioquímicas para su respectiva identificación.

4.9 Conservación

Las cepas pertenecientes a los géneros de *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* aisladas y clasificadas por su morfología colonial y celular, fueron sembradas en caldo Soya Tripticasa, e incubadas por 24 horas en una atmosfera con 5-10% CO₂, a 35-37 °C, después de las 24 horas de incubación se adiciono en cada vial 20% de glicerol y se almacenaron a 4 °C y 10 °C.

4.10 Materiales II ETAPA

Leche fresca, sal yodada (NaCl), recipiente de acero inoxidable con capacidad para 5, 10 litros. (Tapadera o plástico transparente).

4.11 Equipo II ETAPA

Baldes o yogos, descremadora marca Praba alfa Laval con la capacidad 1000 litros por hora, baño maría marca vwr scientific modelo 1235 wáter Bath, batidor de acero inoxidable, cuchara pequeña, recipientes para almacenamiento.

4.12 Método de preparación de muestras

Primeramente se realizó la recepción de la leche fresca, durante esta etapa se realizaron las pruebas rápidas para medir la acidez grados dornic, porcentaje de grasa, pH, densidad, para ver si su calidad era adecuada para el proceso.

Seguidamente se descremo la leche con la ayuda de una descremadora centrifuga marca Praba Alfa Laval con la capacidad 1000 litros por hora. Posteriormente después de salir del dispensador, se tomó una cantidad de crema para aplicar los tratamientos. Se usó una libra de crema cruda para cada tratamiento (crema cruda artesanal y crema pasteurizada con 4% de cultivo iniciador, ambas saladas al 2%).

También se utilizó una libra de crema pasteurizada sin inóculo para monitorear el desarrollo de acidez, con el objetivo de medir crecimiento bacteriano posterior a la pasteurización.

A continuación se hizo la pasteurización, consistió en llevar la crema a 65 °C por 15 minutos en baño maría marca vwr scientific modelo 1235 wáter Bath y luego bajar la temperatura con agua fría hasta llevarla a 32 °C para que los microorganismos reciban un choque térmico, esto ocasiona que la crema quede libre de cualquier microorganismo no deseado y quede un medio más propicio para la inoculación de las BAL. (Anexo 11).

Posteriormente se inocularon las BAL a 32°C, para ello se agregó un inóculo a un porcentaje de 4%, que corresponde a una cantidad óptima, identificada. Con esta cantidad de inóculo se puede procesar dentro del periodo de horas de trabajo regulares en una planta procesadora de lácteos de la región (8 a 10 horas). Se agito levemente para que el inóculo quedara uniformemente distribuido y empezara a trabajar. Se dejó reposar por un tiempo determinado para que alcance la acidez óptima de una crema artesanal que tiene un pH de 4.67. (Anexo 11).

Una vez alcanzada la acidez adecuada se procedió a salar a un porcentaje de 2%, que corresponde al % de sal utilizado en la crema producida en las plantas artesanales, luego se agito o batió hasta lograr una distribución uniforme en toda la crema. Al momento de agregar la sal, la acidez se detiene, debido a que la sal es un inhibidor de crecimiento bacteriano y por consiguiente se reduce o detiene la producción ácido láctico.

Seguidamente se realiza el batido de la crema que consiste agitar con un batidor mecánico hasta alcanzar la consistencia deseada, decantando el suero saliente continuamente hasta llegar a la consistencia deseada, la cual se mide cruzando un cucharón de extremo a extremo del recipiente. Cuando se forma un surco en la crema es que esta lista.

Conservación o almacenamiento: después de la producción se almacenó en frío a 4°C y mantuvo en la cadena de frío hasta el momento de su evaluación sensorial (Anexo 11).

4.12.1 Hoja de evaluación durante la fabricación de la crema

Durante la fabricación de la crema se utilizó un protocolo de proceso o bitácora con el objetivo de controlar y dejar evidencia de todos los detalles de la etapa de proceso de la crema y así poder estimar un método estandarizado con temperaturas, pH, tiempo entre otros factores. (Anexo 1).

4.13 Evaluación sensorial

Materiales

Vasos desechables, cucharillas desechables, platos desechables, galletas de soda, agua purificada, resma de papel, calculadora, caja de lápiz, tabla de plástico.

4.13.1 Análisis sensorial

La evaluación sensorial se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Sensorial de la Universidad Nacional de Agricultura. Se utilizó el método afectivo para evaluar el olor, color y sabor de la crema pasteurizada versus la artesanal. Para la realización de esta prueba se usaran jueces no entrenados que degustaron el producto y mediante un formato de evaluación hedónica o prueba de consumidor determinaron la aceptación o indiferencia del producto.

Para la realización de este análisis se utilizaron personas entre las edades de 18-32 años, como muestra poblacional. Se entrenaron para que llenaran el formato de aceptabilidad del consumidor y comparación y así determinar la aceptación en cuanto olor, color y sabor de la crema pasteurizada.

4.13.2 Se realizó la prueba dúo-trío

En esta prueba se presentó al juez, una muestra identificada como referencia o control y dos muestras debidamente codificadas, de las cuales una necesariamente tienen que ser igual a la referencia. El par de muestras debe estar dispuesto aleatoriamente, y la tarea del juez es identificar cuál de las muestras incógnitas es igual a la referencia.

4.13.3 Prueba de Ji cuadrado (χ^2)

La prueba ji cuadrado se utiliza para probar de acuerdo con una cierta hipótesis en qué grado una distribución de frecuencia observada se compara con una distribución esperada; permite comparar dos muestras y saber si son diferentes significativamente o no. Puede aplicarse en pruebas pareadas, dúo-trío y triangular.

El procedimiento de la prueba es el siguiente:

- Calcular χ^2 experimental según:

$$\chi_{\text{exp}}^2 = \frac{([X_i - np] - 0.5)^2}{np(1-p)}$$

Dónde:

X_i = Número de respuestas correctas

n = Total de ensayos realizados

p = Probabilidad máxima de respuestas debidas al azar.

0,5 = Factor de corrección, se aplica sólo para 1gl en el cual los resultados se consignan como aciertos o fallos.

Se compara el valor de χ^2 experimental con el valor de χ^2 tabulado en la tabla correspondiente, según los grados de libertad (gl=1) y el nivel de probabilidad establecido.

Si $\chi^2_{exp.} \leq \chi^2_{tab.}$ Se acepta H_0 : No hay diferencia entre las muestras.

$\chi^2_{exp.} > \chi^2_{tab.}$ Se rechaza H_0 : Si hay diferencia entre las muestras

Datos obtenidos:

n =30 (total de juicios)

X_i =23 (juicios correctos)

p =1/2 =0,5 (probabilidad del azar)

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados microbiológicos

La presente sección de este trabajo de investigación muestra los resultados de análisis microbiológicos y resultados de comportamientos en crecimiento y desarrollo de acidez de los diferentes microorganismos encontrados en las muestras de productos lácteos obtenidas del departamento de Olancho.

5.1.2 Recuento total de bacterias

El análisis de recuento total de bacterias se realizó para tener un estimado de la carga microbiana presente en los productos lácteos que se procesan de forma artesanal en el corredor lácteo olanchano.

Cuadro 5. Resultados de recuento total de bacterias en crema artesanal reproducidas en Agar P.C (plate count).

Muestra	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Crema 17-7-13	Incontable	Incontable	Incontable	contable	contable	Pocas colonias	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento
Crema 23-7-13	Incontable	Incontable	Incontable	incontable	incontable	Contable	-	-

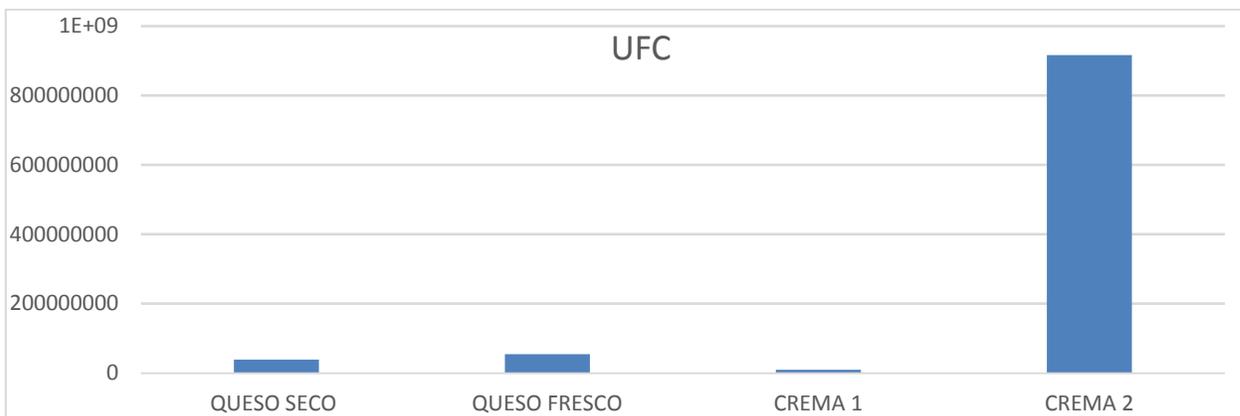


Figura 1. Gráfico de recuento total entre muestras de queso y crema a una dilución de 10^{-6} .

Los resultados del recuento total de bacterias en las muestras de crema obtenidas en campo revelan que existe una población elevada de bacterias (Cuadro 5 y Figura 1), la cual resulta ser incontable hasta una dilución de 10^{-3} . A una dilución de 10^{-6} la segunda muestra de crema del 23-7-13 tenía una lectura de 916,000,000 UFC.

Esto comprueba que los productos lácteos sin pasteurizar constituyen un riesgo potencial para la población hondureña ya que poseen gran cantidad de microorganismos, entre los cuales se puede encontrar el *Staphylococcus aureus*, microorganismo presente en las leches más táticas de la zona hasta en un 89 % de las fincas). Este microorganismo es resistente a las cantidades de sal usadas en los quesos artesanales (W. Rodríguez).

5.1.3 Recuento de coliformes totales

El análisis de Coliformes totales se realizó como complemento a la investigación ya que de esta forma se puede hacer referencia en la cantidad de microorganismos de origen entero presentes en los lácteos. El manejo y la cantidad de trasiegos que se le da a la leche en toda la cadena de producción y las condiciones higiénico-sanitarias en las cuales operan las plantas artesanalmente en el departamento de Olancho introducen grandes cantidades de microorganismos de origen fecal.

Cuadro 6. Resultados del Recuento de Coliformes Totales en crema, obtenidos mediante cultivo en Agar MacConkey.

Muestra	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
Crema 17-7-13	incontable	incontable	Contable	Pocas colonias	Pocas colonias	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento	No hubo crecimiento
Crema 23-7-13	incontable	incontable	Incontable	Incontable	contable	-	-	-

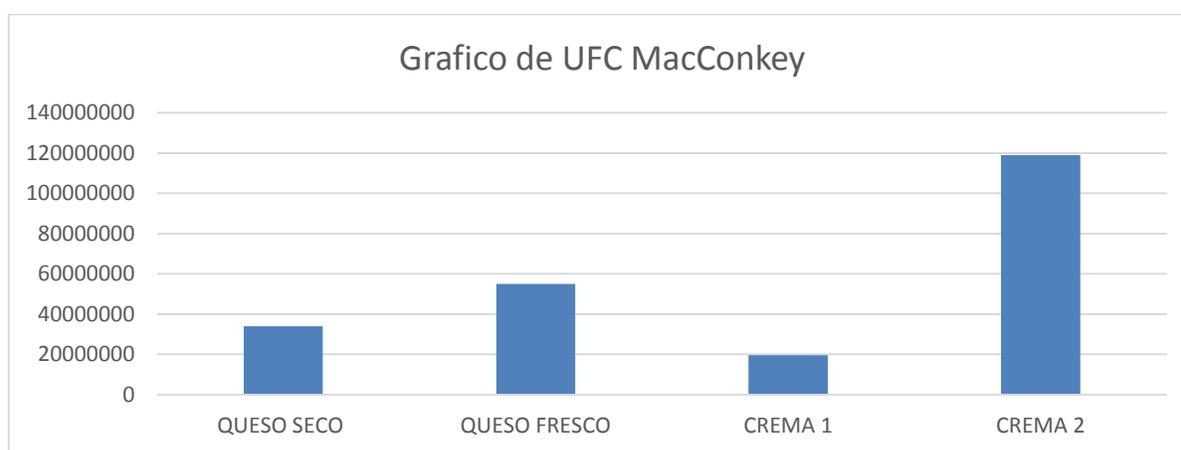


Figura 2. Gráfico de Coliformes Totales en las muestras.

Como se puede observar en el Cuadro 6 y la Figura 2, la mayor carga microbiana la obtuvo el análisis microbiológico que se realizó a la crema 2; a una dilución de 10⁻⁶ se encontró un recuento total 19,000,000 UFC. Al comparar con los niveles aceptables en la norma para cremas, podemos concluir que los productos están altamente contaminados con bacterias fecales dentro de las cuales podrían estar presentes. Figura 2.

5.1.4 Recuento Total de Bacterias Acido lácticas

El medio de cultivo MRS es un medio selectivo en el cual se crean las condiciones propicias para el crecimiento de bacterias ácido lácticas, partiendo de los resultados del desarrollo bacteriológico que obtuvimos se pudo seleccionar las cepas que cumplen con las

características de las bacterias ácido lácticas en su morfología colonial como ser su color, forma, tamaño, traslúcida entre otros, para ser sometidos posteriormente a las pruebas de diferenciación bioquímica como ser prueba de catalasa, y tinción de Gram para la caracterización de su morfología celular.

Cuadro 7. Resultados del recuento total de bacterias ácido lácticas en muestras de crema cultivadas en Agar MRS.

Muestra	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Crema 17-7-13	incontable	Incontable	Incontable	contable	Pocas colonias	Pocas colonias	Pocas colonias	No hubo crecimiento
Crema 23-7-13	incontable	Incontable	Incontable	incontable	incontable	contable	-	-

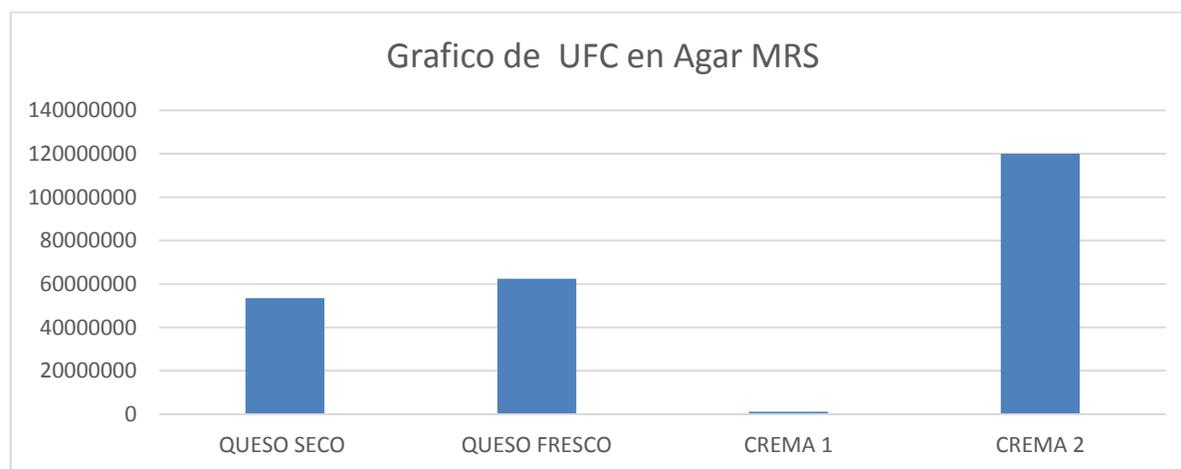


Figura 3. Recuento total de bacterias ácido lácticas en muestras de crema y queso.

En el Cuadro 7 y la Figura 3 de los resultados del Recuento Total de Bacterias Ácido Lácticas se observa que en la muestra de crema del 17-7-13 hay un conteo de 1, 120,000 UFC a una dilución de 10^{-4} y en la crema del 23-7-13 un conteo de 120, 000,000 UFC a 10^{-6} .

Estos resultados del Recuento Total de Bacterias Acido Lácticas en crema muestran una similar tendencia que los resultados del Recuento Total de Bacterias presentados anteriormente. Las cantidades elevadas de Bacterias Acido Lácticas en las muestras nos indican que gran parte del total de bacterias presentes en los productos artesanales corresponde a bacterias Acido Lácticas, condición favorable ya que estas bacterias benéficas se apoderan de los productos e impiden un desarrollo mayor de bacterias patogénicas. Figura 3.

5.1.5 Resultados de tinción de gram, morfología colonial y celular para crema.

Después de realizar el recuento total de bacterias acido lácticas, se realizaron las pruebas de Gram, morfología colonial y celular por medio de observaciones en microscopio, las cuales se presentan a continuación.

Cuadro 8 Resultado de las pruebas de tinción de Gram, forma, agrupación y morfología colonial.

Codificación	Gram	Forma y Agrupación	Morfología colonial
A1	+	cocos, en racimos y cadenas pequeñas	Cremosa, elevada, lisas, puntiforme.
A2	+	cocos, en pares y cadenas pequeñas	Cremosa, convexas, elevada.
B1	+	cocos, en cadenas	blancas, puntiforme, elevada
B2	+	cocobacilos, en cadenas y aislados	Blanquecina, lisas, convexa.
C1	+	cocos, en cadenas y agrupados	Cremosa, irregular, elevada.
C2	+	cocobacilos, en cadenas y aislados	Cremosa, puntiformes, elevada.
C3	+	bacilos en cadenas	Traslucidas, muy pequeñas.
C4	+	Cocos, cocobacilos, racimos y en cadena cortas.	Blanquecinas, colonias grandes.

Los resultados muestran que todas las bacterias aisladas son Gram positiva, con respecto a la forma y agrupación 87.5% de las bacterias son cocos y 12.5% forma de bacilo.

Con respecto a la morfología de las colonias un 62.5% fueron cremosas y elevadas, 25% color blanquecino y un 12.5 % colonias pequeñas.

5.1.6 Resultados bioquímico de la prueba de catalasa

Una vez clasificadas las cepas con referencia en la tinción de Gram por su morfología colonial y celular, se realizó la prueba de catalasa, que establece los criterios de clasificación según Bergey's para la diferenciación de los géneros no incluidos entre las BAL.

Cuadro 9. *Resultados de catalasa positiva*

Codificación	Catalasa
A1	negativa
A2	negativa
B1	negativa
B2	negativa
C1	Positiva
C2	negativa
C3	negativa
C4	negativa

Como se observa en el Cuadro 9, la única colonia catalasa positiva fue la codificada C1, esta cepa fue descartada. Esta condición permite descartarla de las Bacterias Acido Lácticas aun cuando sea Gram positiva, según el criterio de clasificación de Bergey's.

5.1.7 Resultado del comportamiento de las cepas en leche

Para esta prueba fue necesario el uso de una leche estéril UHT de uso comercial, en 6 tubos de ensayo en la cual se le inoculo las cepas a cada tubo y se dejó en incubación por 24 horas en una atmosfera con 5-10% CO₂, a 29-37 °C.

Cuadro 10. Resultados de Coagulación de leche en 24 horas

Codificación	coagulación/ 24 horas
A1	Negativo
A2	Negativo
B1	Positivo
B2	Positivo
C2	Positivo
C3	Positivo
C4	Positivo

Las bacterias positivas a la tinción de Gram, que resultaron ser catalasa negativas y que a su vez tenían morfología colonial y morfología celular identificadas, se sometieron a la prueba de coagulación para determinar su poder de producción de acidez. Las colonias A1 y A2 no produjeron acidez suficiente para coagular la leche y no produjeron características organolépticas a los productos terminados.

5.1.8 Resultado del comportamiento en la capacidad de acidificar la leche de las BAL aisladas.

comportamiento de la capacidad para acidificar la leche

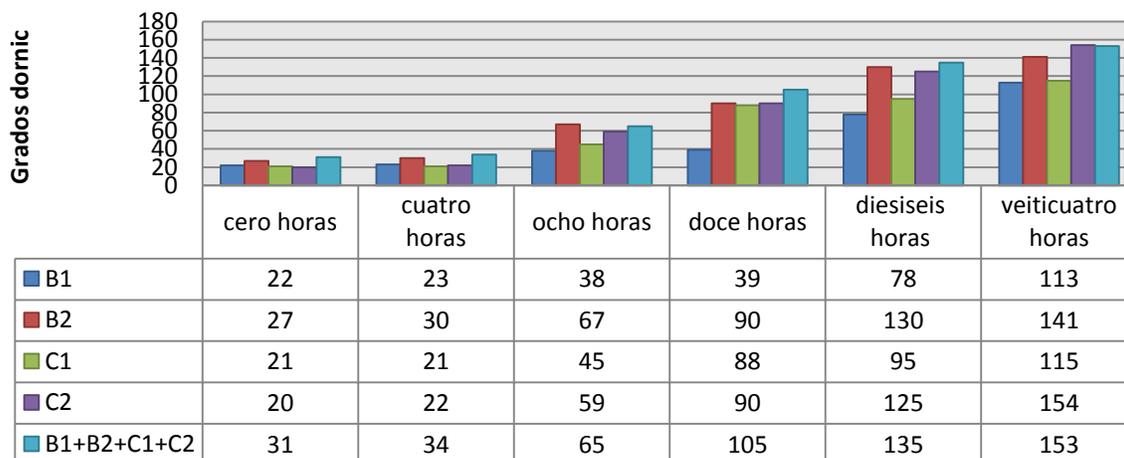


Figura 4. Gráfico de comportamiento de la capacidad de acidificar en la leche

La Figura 4, muestra el comportamiento de las bacterias individualmente, las colonias B2 y C2 son las que tienen mayor poder de acidificación. Así mismo, se puede observar que las todas las bacterias al mezclarlas tienen gran capacidad de acidificar y trabajar en simbiosis.

Esta prueba tenía como objetivo conocer el comportamiento de crecimiento de las bacterias al inocularlas en la leche, y así poder determinar el punto óptimo de inoculación al momento de producir los derivados lácteos. En esta prueba se dio a conocer que la cepa B2 fue la cepa que produjo un olor más fuerte que las cepas B1, C2 y C3.

5.2 Resultados del pH en la elaboración de la crema

5.2.1 Medición del pH de la primera repetición

En la Figura 5 podemos observar la caída del pH de la crema pasteurizada con 4% de inóculo y 2% de sal, reposada a una temperatura de 33°C y monitoreada a cada hora hasta alcanzar el pH óptimo de 4.67. Esta gráfica corresponde a la primera repetición, en ella podemos observar que a la hora 4, el pH desciende a una velocidad mayor que las anteriores horas, cayendo de pH 5.35 hasta 4.9, esto posiblemente es debido a la adaptación y crecimiento de las bacterias que transforman la lactosa a ácido láctico.

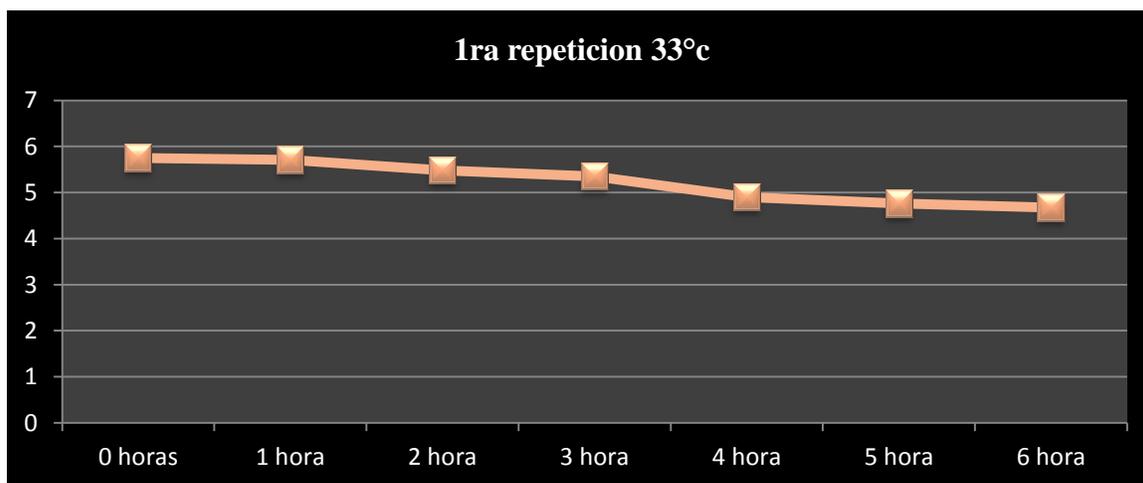


Figura 5. Tendencia de la bajada de pH en la primera repetición de la crema pasteurizada con inóculo monitoreada cada hora.

5.2.2 Medición del pH de la segunda repetición

En la Figura 6 podemos observar la tendencia de la bajada del pH de la crema pasteurizada con el 4% de inóculo y 2% de sal, encubada a una temperatura de 33°C y monitoreada cada hora hasta alcanzar el pH óptimo de 4.67. Se observa que en esta segunda repetición la bajada del pH estuvo más uniforme que la primera repetición, pero utilizando el mismo tiempo de 6 horas en alcanzar el pH óptimo de la crema artesanal.

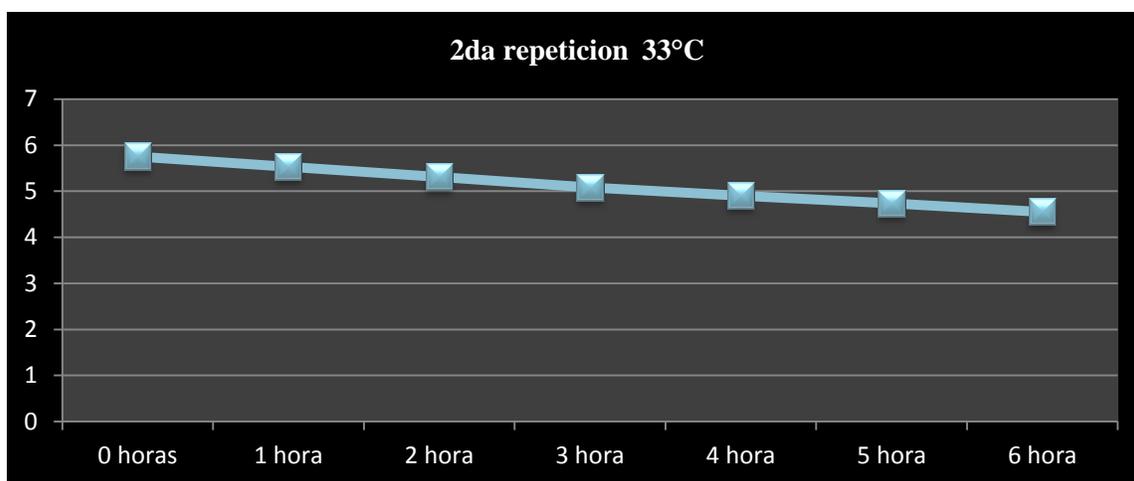


Figura 6. Tendencias de la bajada de pH de la segunda repetición de la crema pasteurizada con inóculo, monitoreada cada hora.

5.2.3 Medición del pH de la tercera repetición

En la figura 3 podemos observar la tendencia de la bajada del pH de la crema pasteurizada con la adición del 4% de inóculo y 2% de sal dejándola reposar una temperatura de 33°C y monitoreada cada hora hasta que alcanzo su pH óptimo de la crema artesanal, observamos que en esta tercera repetición la bajada del pH fue más en la hora número 4 con un 5.1 hasta la hora 5 con un pH de 4.75.

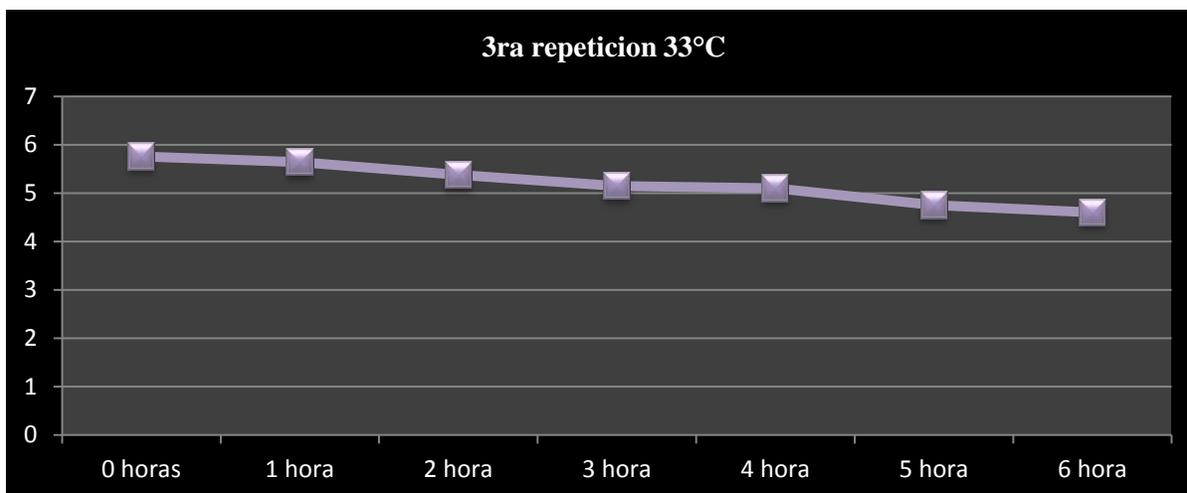


Figura 7. Tendencias de la bajada de pH en la tercera repetición de la crema pasteurizada con inóculo, monitoreada cada hora.

Protocolo para elaborar 10 libras de crema pasteurizada

Recepción de la leche fresca, durante esta etapa se realizaron las pruebas rápidas para medir la acidez grados dornic, porcentaje de grasa, pH, densidad, para ver si su calidad era adecuada para el proceso, luego se descremo la leche con la ayuda de una descremadora centrífuga la cual separo la crema.

Una vez obtenida la crema se procedió a la pasteurización, la cual consistió en llevar la crema a 65°C por 15 minutos en un baño maría para luego bajar la temperatura con agua fría hasta llevarla a 32°C.

La crema a una temperatura de 32°C está lista para la inoculación de las BAL. A un porcentaje de 4% que para 10 libras correspondió 45.4 ml de cada cepa, ya que fueron cuatro cepas suma un total de 181.6 ml de inóculo total, cada vez que se agregue una cepa se agito constantemente hasta que quedo distribuida uniformemente se hizo lo mismo con el resto de las cepas, luego se dejó reposar hasta que alcanzara el pH óptimo de 4.67 se tardó un tiempo de 6 horas.

Posteriormente se procedió a agregar la sal a un porcentaje de 2% esto equivale a 90.8 gramos de sal se agito hasta que la sal quedo distribuida uniforme en la crema. Seguidamente la crema se agita constante durante unos minutos para extraer el suero que a un está en la crema se extrae por decantado, se confirma con la prueba de la cuchara la cual Consiste en cruzar una cuchara de extremo a extremo del recipiente. Cuando se forma un surco en la crema esto quiere decir que la consistencia esta lista.

Luego la crema es empaquetada en bolsas plásticas con la cantidad deseada. Posteriormente se almacena en una recamara refrigerante a una temperatura de 4°C.

Cuadro 11. Resultados de la evaluación sensorial, Prueba Duo Trio Rest

N° de jueces	aciertos	Desaciertos
1	1	0
2	1	0
3	1	0
4	1	0
5	1	0
6	0	1
7	0	1
8	1	0
9	0	1
10	1	0
11	1	0
12	0	1
13	1	0
14	0	1
15	1	0
16	1	0
17	1	0
18	1	0
19	1	0
20	0	1
21	1	0
22	1	0
23	0	1
24	1	0
25	1	0
26	1	0
27	1	0
28	1	0
29	1	0
30	1	0
	23	7

5.3 Resultados evaluación sensorial

Los resultados de la prueba dúo trio se presentan en el Cuadro 11, donde un total de 30 panelistas o jueces se sometieron a evaluar las diferentes cremas pasteurizadas con inoculo y no pasteurizadas sin inoculo. Del total de panelistas 23 determinaron que las muestras eran similares, esto refleja que un 76.66% de los jueces creen que existe similitud entre la crema pasteurizada con inoculo y la crema artesanal, no pasteurizada sin inoculo.

Con los resultados obtenidos de la prueba de Ji cuadrado demostramos que el Ji calculado es 0.204 y el tabulado es 0.454 entonces el calculado es menor que el tabulado esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa.

VI CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos es posible la elaboración de una crema pasteurizada con similares propiedades organolépticas de la crema artesanal no pasteurizada de Olancho mediante la adición de bacterias ácido lácticas nativas.
- Es factible aislar y reproducir bacterias ácido lácticas nativas y mantenerlas vivas a temperatura de refrigeración.
- Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial demuestran que la crema pasteurizada con inóculo B1, B2, C1, C2 en combinación, tienen características organolépticas similares a la crema artesanal olanchana ya que un 76.66% no pudo identificar diferencias entre las muestras.
- Con los resultados obtenidos de la prueba de Ji cuadrado demostramos que el Ji calculado es 0.204 y el tabulado es 0.454 entonces el calculado es menor que el tabulado esto significa que no hay diferencia estadísticamente significativa.
- Las bacterias ácido lácticas nativas aisladas B1, B2, C2, C3 y C4 demostraron tener buen poder de coagulación de la leche en menos de 24 horas
- Las cepas C2 Y B2 fueron las bacterias que tuvieron un mayor potencial de producción de acidez.
- Los resultados demostraron que las bacterias aisladas trabajan en simbiosis.

VII RECOMENDACIONES

- Investigar sobre diferentes métodos de conservación apropiados para bacterias ácido lácticas para su debida comercialización en las diferentes plantas semi industriales en el corredor lácteo de Olancho.
- Realizar un estudio de pre factibilidad para productos lácteos pasteurizados en los diferentes mercados regionales y nacionales con el fin de producir productos pasteurizados con cultivos iniciadores.
- La identificación de bacterias ácido lácticas nativas de Olancho y su utilización en el procesamiento de crema se podrían utilizar para reducir la cantidad de sal de los productos, una de las recomendaciones de la OPS, para reducir enfermedades coronarias.
- Se recomienda realizar análisis microbiológicos a la crema para recuento total de coliformes después de su fabricación.
- Realizar un estudio para medir la vida anaquel del producto terminado.

VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Mahaut, M. Jeantet, R. Brule, G. 2003. Introducción a la tecnología quesera. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pag.189.
2. Schlimme, E. Buchheim, W. 2002. La leche y sus componentes propiedades químicas y físicas. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. Pag.121.
3. Acevedo, M. 2004. Evaluación de los atributos principales de la calidad de la carne de origen local e importado, según se ofrece al consumidor. Tesis de grado (en línea) consultado el 22 de mayo de 2013. Disponible en <http://www.grad.uprm.edutesisacevedosalinas.pdf>
4. Chamorro, M, Losada, M. El Análisis Sensorial de los Quesos. (en línea). Consultado el 24 de abril del 2013. Madrid, España. A. Madrid Vicente, 2000. pag. 8, 38-39. Disponible en <http://books.google.hn/books?id=UNraJqwOlqUC&printsec=frontcover&dq=el+analisis+sensorial+de+los+quesos+Chamorro>.
5. Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology. Pag 370
6. Chacón, Z; López, G. 2000. Evaluación de cepas de *Lactococcus* como cultivos iniciadores en la elaboración de pasta prensada (en línea). Revista Científica, FCV.LUZ Vol., N°5. Consultado el 23 de mayo de 2013. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/>

7. Mahaut, M. Jeantet, R. Brule, G.Schuck, P. 2004. Productos lácteos industriales. Editorial Acibia S.A. Zaragoza, España. Pag.177
8. FAO, 2011. Procesos para la elaboración de productos lácteos. (en línea) consultado el 25 de mayo del 2013. Disponible en <http://coin.fao.org/coin>
9. Guzmán, J. J. 2003. Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la beta galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. PhD thesis IZTAPALAPA México.
10. Mc Faddin. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 era edición Editorial medica panamericana S.A. Buenos Aires Argentina (2013) 850 Pag.
11. Menestres, J., Romero del castillo, R. Productos Lácteos, Tecnología. Barcelona, España, 2004. pag. 116
12. Proyecto de Apoyo al Sub Sector Lácteo de Olancho (PASELO) 2004. En línea. Consultado el 18 de mayo del 2013. Disponible en http://paseolo.rds.hn/html/linea_base/index.html
13. Tamine, A. y Robinson, R. K. Yogur. Ciencia y tecnología. Editorial Acibia, Zaragoza, 1991.
14. Usaid. 2007. Historia de éxito plantas lácteas de Olancho. (en línea) consultado el 16 de mayo del 2013. Disponible en http://www.fintrac.com/docs/red/07_06_USAID_RED_SS_Lacteos_ESP.pdf

15. Vázquez, C., Cos, A., López, C. 2005. Alimentación y nutrición, Manual teórico práctico. (en línea) consultado el 23 de abril del 2013. 2da. ed. Buenos Aires, Argentina. Díaz de Santos, 2005. pag. 443. Disponible en <http://books.google.hn/books?id=F>
16. Vázquez, S.M., Suarez, H. y Zapata, S. 2011. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de alimentos. (en línea) consultado el 17 de mayo del 2013. Revista Chilena de nutrición. Pag. 16.
17. Stanley, g. Microbiología de los productos lácteos fermentados. Tecnología de los productos lácteos. Segunda edición. Editorial acribia Zaragoza-España. 1998.
18. Hassan, A. y Frank. F. Starter cultures and their use. En H.E. Marth y L. Steele; Applied dairy microbiology. Second edition. Revised and expanded. Ed. Marcel Dekker, INC, New York, EEUU. 2001.
19. Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla – Colombia. 15 y 16 de septiembre de 2006
20. Parra R. Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos, Rev. Bio. Agro. vol 8. N° 1. Consultado en línea el 18 de noviembre del 2013 en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol8>

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de evaluación durante la fabricación de la crema

UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA
Catacamas Olancho

REGISTO DE PROCESO PARA CREMA PASTEURIZADA

Producto: _____

Fecha de elaboración: _____

Operador: _____

PH de la crema antes del inoculo: _____ Temperatura de incubación _____

PH de la crema a 0 horas _____ pH de la crema a 1 hora _____

PH de la crema a 2 horas _____ pH de la crema a 3 horas _____

PH de la crema a 4 horas _____ pH de la crema a 5 horas _____

PH de la crema a 6 horas _____ pH de la crema a 7 horas _____

PH de la crema 1 hora después de haber agregado la sal _____

Tempo inicio y final pasteurización: _____

Hora al momento de poner el cultivo: _____

Cantidad de cultivo iniciador utilizado: _____

Tipo de inoculo: _____

Cantidad de crema utilizada: _____ Temperatura de la crema al inicio: _____

Temperatura de Pasteurización de la crema: _____

Tiempo de pasteurización: _____ Porcentaje de sal utilizada _____

Tiempo de reposo para alcanzar la acidez óptima: _____

Hora de inicio de almacén: _____

Temperatura de almacenamiento: _____

Código de Rotulación: _____ (crema=C, Pasteurizada=P, Cultivo=_____, Fecha de elaboración= __/__/__) Ejemplo: CP-R174-06/10/08

Anexo 2 Cuadro de resultados de la tendencia del pH a la primera repetición en la elaboración de la crema pasteurizada

Primera repetición temperaturas, tiempo, cantidad de inóculo 4%.			
	29°C	33°C	37°C
0 horas	5.75	5.75	5.75
1 hora	5.74	5.71	5.72
2 hora	5.48	5.48	5.49
3 hora	5.4	5.35	5.29
4 hora	5.16	4.9	5.25
5 hora	4.86	4.76	4.93
6 hora	4.71	4.67	4.77

Anexo 3 Cuadro de resultados de la tendencia del pH a la segunda repetición en la elaboración de la crema pasteurizada

segunda repetición temperaturas, tiempo, cantidad de inóculo 4%			
	29°C	33°C	37°C
0 horas	5.75	5.75	5.75
1 hora	5.73	5.53	5.74
2 hora	5.69	5.31	5.6
3 hora	5.49	5.08	5.4
4 hora	5.2	4.9	5.2
5 hora	5	4.74	4.93
6 hora	4.89	4.55	4.88

Anexo 4 Cuadro de resultados de la tendencia del pH a la tercera repetición en la elaboración de la crema pasteurizada.

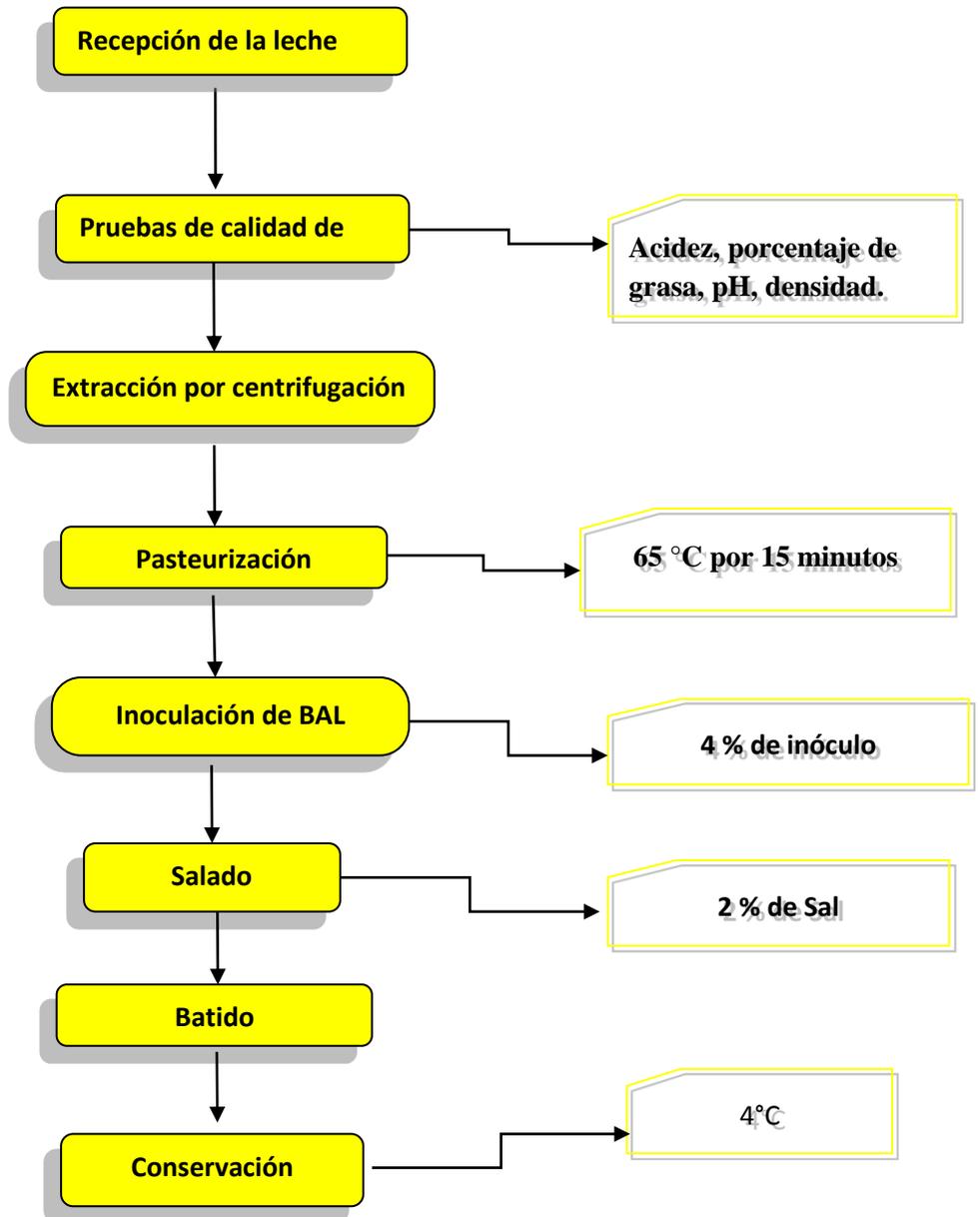
tercera repetición temperaturas, tiempo, cantidad de inocular 4%			
	29°C	33°C	37°C
0 horas	5.76	5.76	5.76
1 hora	5.72	5.64	5.74
2 hora	5.7	5.38	5.65
3 hora	5.68	5.15	5.55
4 hora	5.55	5.1	5.3
5 hora	5.3	4.75	5.1
6 hora	4.98	4.6	4.93

Anexo 5 Cuadro de resultados de la tendencia del pH de las tres repeticiones de la crema pasteurizada con inocular y de la crema pasteurizada sin inocular

1ra, 2da, 3ra repetición crema pasteurizada y crema pasteurizada sin inocular				
Tiempo	PH C.P.S.I	1ra Rep. 33°C	2da Rep. 33°C	3ra Rep. 33°C
0 horas	5.71	5.75	5.75	5.76
1 horas	5.71	5.71	5.53	5.64
2 horas	5.7	5.48	5.31	5.38
3 horas	5.69	5.35	5.08	5.15
4 horas	5.69	4.9	4.9	5.1
5 horas	5.67	4.76	4.74	4.75
6 horas	5.41	4.67	4.55	4.6

C.P.S.I= crema pasteurizada sin inocular

Anexo 6 Diagrama de flujo de proceso



Anexo 7. Ficha para prueba dúo trío

NOMBRE: _____ FECHA _____

NOMBRE DEL PRODUCTO _____

Frente a usted hay tres muestras de crema una de referencia marcada con una R y dos codificadas.

Una de las muestras codificadas es igual a R

¿Cuál de las muestras codificadas es diferente a la de la referencia R? Marque con una X

MUESTRAS	MUESTRAS IGUAL A LA REFERENCIA
7479	
5230	

COMENTARIOS

_____ MUCHAS GRACIAS!!!

Anexo 8. Medios de Cultivo

Agar MRS

Se diluyeron 70 gramos del medio Agar MRS en 1000 ml de agua destilada, se agito constantemente luego fue llevado a ebullición hasta que el medio fue totalmente diluido, seguidamente este se llevó al autoclave a temperatura de 121 ° C por 15 minutos para su esterilización, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura alrededor de 45 ° C para su vertido en placas.

Agar Soya Trypticasa

Se diluyeron 40 gramos del medio agar Soya Trypticasa en 1000 ml de agua destilada, se agito constantemente luego fue llevado a ebullición hasta que el medio fue totalmente diluido, seguidamente este se llevó al autoclave a temperatura de 121 ° C por 15 minutos para su esterilización, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura alrededor de 45 ° C. Este fue descargado en las placas Petri estériles, se dejó en reposo hasta que este solidificara, posteriormente fue sometido a refrigeración hasta su uso.

Para el uso de este agar en la purificación de las bacterias, fue utilizado en tubos de ensayos por lo cual una vez que el medio llego a la ebullición este fue vertido en los tubos de ensayos con sus tapones y luego estos fueron a la autoclave a temperatura de 121 ° C por 15 minutos. Una vez que estos salieron de la autoclave se dejaron enfriar en una plataforma con una pequeña inclinación de unos 45 grados para su posterior uso.

Agar Columbia (con sangre de cordero)

Se diluyeron 40 gramo del medio Agar Columbia en 1000 ml de agua destilada a agitación constantemente, para su dilución completa este se llevó a ebullición, seguidamente se llevó al autoclave a temperatura de 121 ° C por 15 minutos para su esterilización, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura alrededor de 45 ° C, rápidamente fue agregada la sangre de cordero en una proporción de un 5% en agitación constante, luego este fue vaciado en las placas Petri estériles, se dejó solidificar, seguidamente fue llevado a prueba de esterilidad en incubadora a 37 ° C por 24 horas, para su posterior uso.

Caldo Soya Trypticasa

Se diluyeron 30 gramos del caldo Soya Trypticasa en 1000 ml de agua destilada, se agito constantemente hasta que el medio fue diluido totalmente, seguidamente se vertió este caldo en los tubos de ensayo con sus respectivos tapones, se llevaron al autoclave a temperatura de 121 ° C por 15 minutos para su esterilización, se dejó enfriar luego fueron sometidos a refrigeración hasta su uso.

Agua Peptonada

Se diluyó 10 gramos de peptona en 1000 ml de agua destilada, seguidamente fue llevada al autoclave a temperatura de 121 ° C por 15 minutos para su estilización.

Anexo 9. Fundamento De La Tinción De Gram

La pared celular es responsable de la tinción de Gram. El procedimiento se inicia con una tinción de las células bacterianas fijadas mediante el colorante básico cristal violeta. Posteriormente se trata con una disolución de yodo, que a su vez forma un complejo con el cristal violeta insoluble en agua y sólo medianamente soluble en alcohol o acetona. Las células se tratan después con alcohol para diferenciarlas: las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo, por lo que las vemos de color morado-azules; y las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol, por lo que se hacen visibles mediante la coloración de contraste, en este caso la fucsina.

Pasos a seguir para la realización de la tinción de Gram:

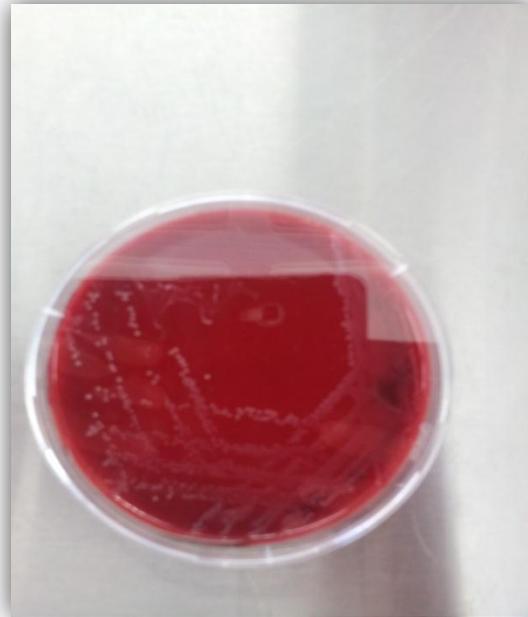
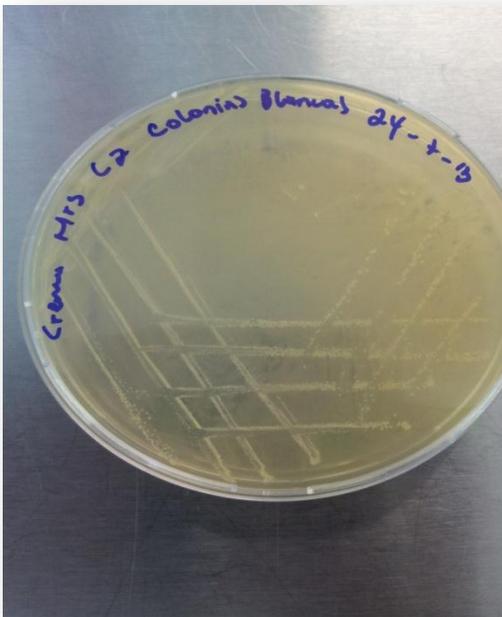
- a) Colocar el frotis correspondiente en el puente de coloración.
- b) Cubrir los frotis con cristal violeta (colorante primario) durante un minuto.
- c) Lavar los frotis con agua de la llave para eliminar el exceso de colorante.
- d) Cubrir los frotis con lugol (mordente) durante un minuto.
- e) Lavar los frotis con agua de la llave.
- f) Aplicar gota a gota el alcohol-acetona (decolorante).
- g) Lavar inmediatamente con agua de la llave.
- h) Cubrir los frotis con safranina (colorante secundario) durante 30 segundos.
- i) Lavar los frotis con agua de la llave.
- j) Dejar secar los frotis, colocar una gota de aceite de inmersión y observarlos al microscopio con el objetivo 100 X.

Fundamento De Prueba Bioquímica BAL

CATALASA: se utiliza para comprobar la presencia de la enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. La principal excepción es *Streptococcus*.

Anexo 10. Fotografías

Recuento de BAL en Agar MRS



Recuento de BAL en Agar Columbia

Observando placas cultivos en Agar MRS y en Agar Columbia



Retirando colonias para realizar pruebas bioquímicas



Preparando medios



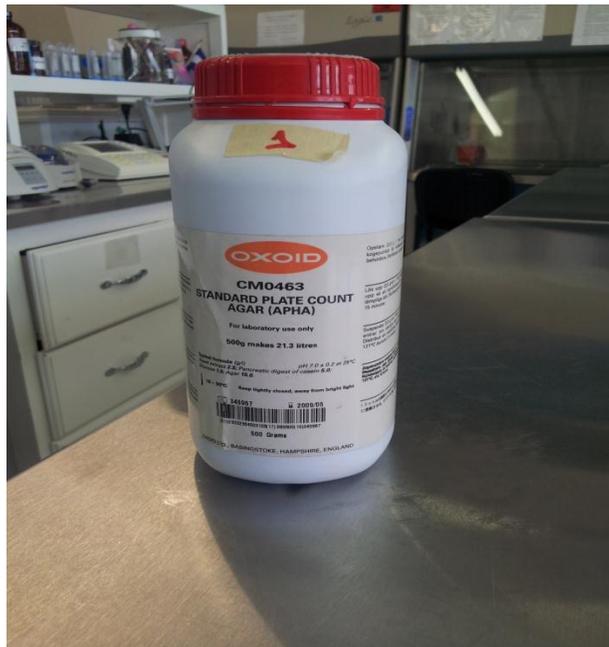
Reproduciendo las bacterias ácido lácticas



Agar Soya Tripticasa



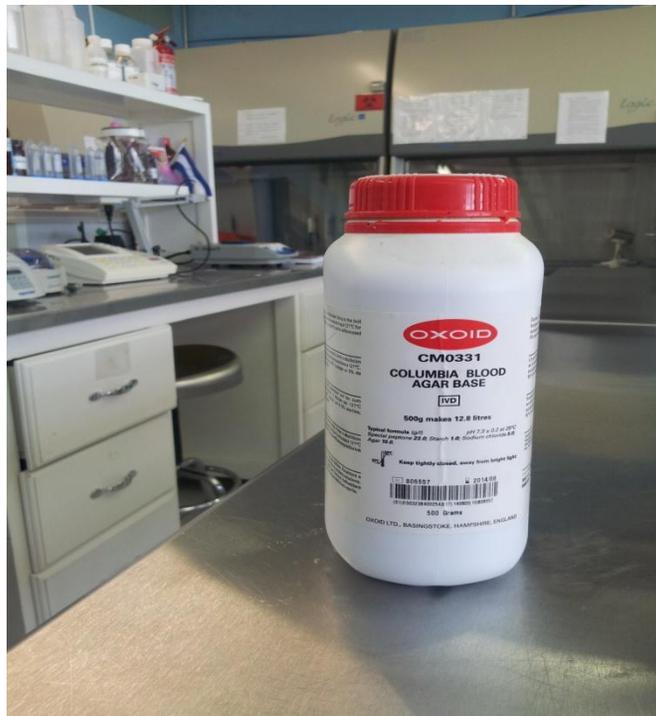
Agar plate count



Agar macconkey



Agar Columbia



Agar soya



Agar MRS



Pasteurización de la crema cruda



Choque térmico con agua fría



Inoculación de bacterias ácido lácticas



Incubación de crema para alcanzar acidez optima



Evaluación sensorial

