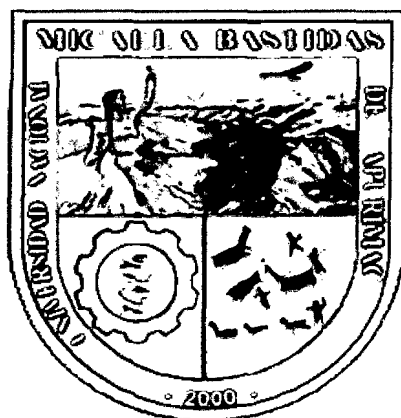


UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL



OBTENCIÓN DE YOGURT BATIDO MEDIANTE SUSTITUCIÓN PARCIAL DE LECHE FRESCA CON EXTRACTO DE KIWICHA (*Amaranthus caudatus*)

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

EDGAR CONDORI VALVERDE

Abancay, setiembre del 2010

PERÚ



| UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURIMAC | |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------|
| CÓDIGO | MFN |
| T IAG C 2010 | |
| | BIBLIOTECA CENTRAL 04 ENE 2011 |
| FECHA DE INGRESO: | |
| Nº DE INGRESO: | 00003 |

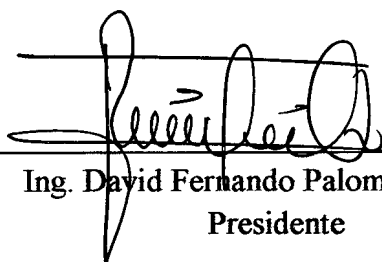


UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

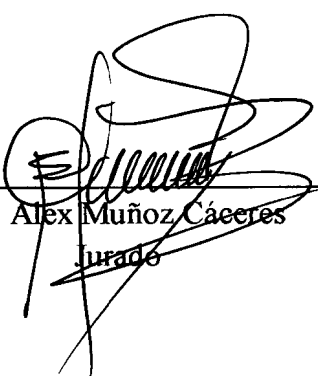
Jurado Calificador Integrado Por:



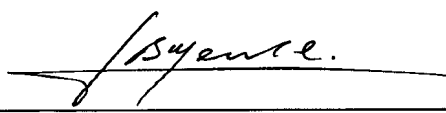
Ing. David Fernando Palomino Quispe
Presidente



Ing. Ruth Mery Ccopa Flores
Jurado



Ing. Alex Muñoz Cáceres
Jurado



Ing. Jorge Mendoza Cáceres
Asesor



DEDICATORIA

A mi querida y estimada madre; Bertha Valverde Arias, por su eterna amabilidad y afecto.

A mi padre; Carlos Condori Sánchez, por el Cariño y comprensión que siempre puso en mi.

A mis hermanos.

A Dios, por guiarme y sostenerme durante todo el tiempo que me queda vivir...



AGRADECIMIENTOS

- *A mi alma mater “Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac”, por el financiamiento en el segundo concurso de anteproyecto de tesis 2009, organizado por la comisión de la unidad de investigación de la UNAMBA.*
- *Al Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres, por ser mi patrocinante durante la ejecución de este trabajo de investigación.*
- *Al Ing. Melquiades Barragán Condori, por la asesoría en el manejo del equipo Kjeldahl.*
- *Al Ing. Justo Arias, por facilitarme y apoyarme en el manejo de algunos equipos.*
- *A la Ing. Guadalupe Chaquilla Quilca, y al Ing. Fulgencio Vilcanqui Pérez, por facilitarme los laboratorios, como director de la facultad de Ingeniería Agroindustrial.*
- *A los miembros del jurado calificador.*
- *A mi hermano Juan Roger Condori Valverde.*
- *A mis colegas, Ingo Marco Juro y Jesús Azurin Cáceres, quienes me apoyaron en los primeros experimentos.*
- *A cada uno de los ingenieros que me impartieron los conocimientos básicos en las clases de la universidad.*
- *A todos mis amigos y compañeros que siempre me motivaron durante mi formación profesional y para realizar el trabajo de investigación.*



ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| RESUMEN | xii |
| SUMMARY | xiii |
| I. INTRODUCCIÓN | 01 |
| II. MARCO TEÓRICO | 04 |
| 2.1. Producción de leche fresca en el Perú y región de Apurímac | 04 |
| 2.2. Características generales de la leche | 06 |
| 2.2.1. Definición | 06 |
| 2.2.2. Composición | 06 |
| 2.2.3. Estructura | 08 |
| 2.2.3.1. Los azúcares de la leche | 10 |
| 2.2.3.2. Proteínas de la leche | 10 |
| 2.2.3.3. Micelas de caseína | 11 |
| 2.2.4. Microbiología de la leche | 16 |
| 2.2.4.1. Microbiología del interior de la ubre | 16 |
| 2.2.4.2. Contaminación externa de la leche | 16 |
| 2.3. Kiwicha (<i>Amaranthus caudatus</i>) | 18 |
| 2.3.1. Clasificación botánica | 18 |
| 2.3.2. Origen | 18 |
| 2.3.3. Características morfológicas | 19 |
| 2.3.4. Estructura y su composición | 20 |
| 2.3.5. Usos y derivados de kiwicha | 22 |
| 2.3.6. Características del almidón de kiwicha | 23 |
| 2.4. Yogurt | 26 |
| 2.4.1. Composición | 26 |
| 2.4.2. Requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas | 30 |
| 2.4.3. Desarrollo de las bacterias lácticas en la leche y estimulación del crecimiento | 31 |
| 2.4.3.1. Desarrollo de las bacterias lácticas | 31 |
| 2.4.3.2. Crecimiento de las bacterias lácticas | 31 |
| 2.4.3.3. Factores que afectan el crecimiento y la reproducción de las bacterias durante la fermentación | 36 |



| | | |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.4.4. | Fermentación láctica | 38 |
| 2.4.4.1. | Metabolitos formados en la fermentación | 40 |
| 2.4.5. | Propiedades dietéticas y nutritivas del yogurt | 42 |
| 2.4.6. | Propiedades físico organolépticas | 43 |
| 2.4.7. | Capacidad de conservación | 44 |
| III. | PARTE EXPERIMENTAL | 45 |
| 3.1. | Materiales | 45 |
| 3.1.1. | Materiales de ensayo | 45 |
| 3.1.2. | Reactivos | 46 |
| 3.1.3. | Equipos | 46 |
| 3.1.4. | Maquinarias | 47 |
| 3.1.5. | Medios de cultivo | 47 |
| 3.1.6. | Utensilios | 47 |
| 3.1.7. | Indumentaria | 48 |
| 3.2. | Métodos de análisis | 48 |
| 3.2.1. | Análisis químico proximal de harina de kiwicha | 48 |
| 3.2.2. | Análisis químico proximal de leche fresca | 49 |
| 3.2.3. | Análisis físicos de leche fresca | 49 |
| 3.2.4. | Análisis fisicoquímico de extracto de kiwicha | 50 |
| 3.2.5. | Análisis fisicoquímico del yogurt | 51 |
| 3.2.6. | Análisis microbiológico de yogurt | 52 |
| 3.3. | Metodología experimental | 53 |
| 3.3.1. | Materia prima | 53 |
| 3.3.2. | Obtención de harina de kiwicha | 53 |
| 3.3.3. | Obtención de extracto de kiwicha | 53 |
| 3.3.4. | Preparación del cultivo madre | 54 |
| 3.3.5. | Evaluación de la fermentabilidad de las bacterias lácticas | 56 |
| 3.3.6. | Obtención de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha | 56 |
| 3.3.7. | Evaluación de análisis sensorial | 60 |
| 3.3.8. | Determinación de análisis químico proximal de yogurt | 63 |



| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.3.9. Determinación de la vida útil del producto | 63 |
| 3.4. Análisis estadístico | 63 |
| 3.4.1. Diseño factorial | 64 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 65 |
| 4.1. Determinación de análisis fisicoquímico de la materia prima | 65 |
| 4.2. Evaluación de cinética de fermentación | 71 |
| 4.3. Análisis sensorial de yogurt | 76 |
| 4.4. Análisis químico proximal de yogurt | 79 |
| 4.4.1. Análisis de varianza del porcentaje de proteína | 81 |
| 4.4.2. Análisis de varianza del porcentaje de grasa | 84 |
| 4.4.3. Análisis de varianza del porcentaje de carbohidratos | 86 |
| 4.5. Determinación de vida útil | 88 |
| 4.5.1. Caracterización preliminar del yogurt óptimo y patrón | 88 |
| 4.5.2. Evaluación de vida útil del yogurt durante el periodo de almacenamiento | 93 |
| 4.5.2.1. Características fisicoquímicas y sensoriales | 93 |
| 4.5.2.2. Determinación de vida útil a temperatura de ambiente | 94 |
| 4.5.2.3. Determinación de vida útil bajo refrigeración | 98 |
| V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 102 |
| 5.1. Conclusiones | 102 |
| 5.2. Recomendaciones | 103 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 104 |
| ANEXOS | |
| APÉNDICES | |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABLA 01. Composición nutricional de la leche fresca | 07 |
| TABLA 02. Composición y estructura de la leche (1 kg) | 09 |
| TABLA 03. Aminoácidos de las proteínas lácteas totales (mg) | 13 |
| TABLA 04. Propiedades de los principales elementos de la leche | 15 |
| TABLA 05. Características de algunos microorganismos y grupos de organismos que son importantes en la leche | 17 |
| TABLA 06. Composición química de la semilla de kiwicha | 21 |
| TABLA 07. Contenido de aminoácidos de la proteína de kiwicha, comparado con leche, huevo y con el patrón de aminoácidos | 22 |
| TABLA 08. Estimación cuantitativa de amilosa y amilopectina del almidón de <i>Amaranthus caudatus</i> Lineo y de <i>Zaea mays</i> | 25 |
| TABLA 09. Concentración de aminoácidos en el yogurt | 27 |
| TABLA 10. Producción de compuestos carbonilo (ppm) por los cultivos estárter del yogurt | 41 |
| TABLA 11. Escala hedónica de valuación sensorial para los atributos de color, sabor y aceptabilidad en general, según análisis descriptivos para categorizar las muestras | 61 |
| TABLA 12. Escala hedónica de valuación sensorial de aceptabilidad en general, según análisis discriminativo para comparar las muestras con respecto al patrón | 62 |
| TABLA 13. Composición química de harina de kiwicha variedad INIA-414 Taray y leche fresca entera | 65 |



| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABLA 14. | Análisis fisicoquímico de leche fresca entera | 67 |
| TABLA 15. | Características físicas y sensoriales de extracto de kiwicha | 68 |
| TABLA 16. | Composición química de extracto de kiwicha | 69 |
| TABLA 17. | Composición química de la mezcla entre extracto de kiwicha al 15 % y leche fresca (en % base húmeda) | 70 |
| TABLA 18. | Composición química de la mezcla entre extracto de kiwicha al 15 % y leche fresca (en % base húmeda) | 71 |
| TABLA 19. | Análisis químico proximal de los yogurts | 80 |
| TABLA 20. | Análisis fisicoquímico y sensorial del yogurt óptimo y el patrón | 93 |
| TABLA 21. | Análisis microbiológico del yogurt con extracto de kiwicha y el patrón (Almacenado a temperatura ambiente) | 96 |
| TABLA 22. | Análisis microbiológico del yogurt óptimo y el patrón (Almacenado bajo refrigeración 5 ± 2 °C) | 100 |
| TABLA 23. | Características organolépticas del yogurt almacenado bajo refrigeración (tres meses con una semana) | 101 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 01 | Producción anual de leche fresca en el Perú | 04 |
| Figura 02 | Producción de leche fresca en el Perú por unidad departamental | 04 |
| Figura 03 | Variación de precio de leche fresca en el Perú | 05 |
| Figura 04 | Producción de leche fresca en la región de Apurímac | 05 |
| Figura 05 | Composición química de la leche | 07 |
| Figura 06 | Observación de la leche a diferentes aumentos | 08 |
| Figura 07 | Formas de lactosa | 10 |
| Figura 08 | Comportamiento de las moléculas de proteínas de leche según el pH | 11 |
| Figura 09 | Modelo esquemático de micela de caseína | 12 |
| Figura 10 | Estructura de una submicela de caseína | 12 |
| Figura 11 | Representación esquemática de la unión de dos submicelas mediante el fosfato cálcico coloidal | 14 |
| Figura 12 | Corte transversal y longitudinal de la estructura de kiwicha | 20 |
| Figura 13 | Proceso de elaboración de yogurt con base en leche y de un yogurt extendido con extracto estéril de garbanzo | 29 |
| Figura 14 | Degradación de la caseína por las bacterias lácticas | 32 |
| Figura 15 | Fenómenos de estimulación e inhibición que se producen durante el crecimiento de las bacterias del yogurt | 32 |



| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 16 | Factores que determinan el crecimiento simbiótico de <i>st. thermophilus</i> y <i>lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> | 33 |
| Figura 17 | Comportamiento de cepas puras y mixtas de cultivos de yogurt sembrado e incubados a 40°C en leche desnatada esterilizada en autoclave y sembrada con un 2,0% de cultivo | 35 |
| Figura 18 | Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas | 39 |
| Figura 19 | Diagrama de bloques para la obtención de extracto de kiwicha | 54 |
| Figura 20 | Diagrama de bloques para la elaboración de cultivo madre | 55 |
| Figura 21 | Diagrama de bloques del proceso de obtención de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha | 59 |
| Figura 22 | Comportamiento de pH en función al tiempo, en los tratamientos y el patrón, durante la fermentación | 72 |
| Figura 23 | Producción de ácido láctico en función al tiempo, en los tratamientos y el patrón, durante la fermentación | 74 |
| Figura 24 | Evaluación de análisis sensorial de aceptabilidad en general, sabor y color de los tratamientos de yogurt | 76 |
| Figura 25 | Evaluación de análisis sensorial de aceptabilidad en general, de los tratamientos de yogurt comparado con respecto al patrón | 77 |



| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 26 | Resumen de la evaluación de análisis sensorial de aceptabilidad en general, de los tratamientos de yogurt comparado con respecto al patrón | 78 |
| Figura 27 | Comportamiento de pH, acidez y viscosidad del yogurt con extracto de kiwicha, en función al tiempo (realizado por siembra directa de cultivo láctico) | 89 |
| Figura 28 | Comportamiento de pH, Viscosidad y acidez del patrón, en función al tiempo (realizado por siembra directa de cultivo láctico) | 90 |
| Figura 29 | Comportamiento de las propiedades fisicoquímicas, del yogurt óptimo y patrón, durante la fermentación en función al tiempo | 91 |
| Figura 30 | Comportamiento de pH, Viscosidad y acidez del yogurt con extracto de kiwicha y patrón en función al tiempo, almacenado a medio ambiente | 95 |
| Figura 31 | Comportamiento de pH, Viscosidad y acidez del yogurt con extracto de kiwicha y el patrón en función al tiempo, almacenado bajo refrigeración | 98 |

RESUMEN

La producción de yogurt en la provincia y la región, hasta la actualidad solo se da en forma artesanal y a pequeña escala, esto debido a la baja producción y el incremento del precio de la leche fresca, los cuales conllevan el reducido consumo de leche y sus derivados, generándose así la existencia de la desnutrición de niños y adultos en la región de Apurímac. Por otro lado, existe un problema a nivel mundial, que es la intolerancia a la lactosa.

Mediante estas problemáticas y necesidades identificadas, el presente trabajo de investigación tiene como finalidad dar alternativas de solución con el derivado lácteo, obteniendo un yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha. Para tal fin se estudió dos variables, el primero fue determinar la cantidad adecuada de dilución de harina de kiwicha en agua, en proporciones de 15 y 20 % para la obtención del extracto de kiwicha filtrada. El segundo variable también fue determinar la cantidad óptima de la sustitución del extracto de kiwicha en leche fresca, en concentraciones de 20 y 40 % para la obtención de yogurt batido. Para lograr el objetivo, se realizó la evaluación de propiedades fisicoquímicas, análisis sensorial y análisis químico proximal de todos los tratamientos con respecto al patrón.

Al concluir el estudio se determinó que el T4 (yogurt obtenido con una dilución de 20 % de harina de kiwicha en agua y con una sustitución de 40 % de extracto de kiwicha en leche fresca), presento las características similares que el patrón (yogurt a base de leche fresca entera). El T4 mostró mejor consistencia, viscosidad y homogeneidad que el patrón, no obstante este tratamiento supero en el contenido de ácido láctico. El yogurt óptimo (T4) presentó: 3,2303% de proteína; 3,2793% de grasa y 14,9655% de carbohidratos. Respecto a la evaluación sensorial, también solamente este tratamiento tuvo un calificativo de aceptabilidad en general igual que el patrón.

Durante el almacenamiento del yogurt, el pH y la acidez no son estables a medida que transcurre el tiempo, en donde el yogurt óptimo presentó una disminución de viscosidad más que el patrón, la mayor pérdida de viscosidad se da cuando el producto es almacenado a medio ambiente que bajo refrigeración.

Se determinó que la vida útil del yogurt utilizando el conservante sorbato de potasio a una concentración de 0,05 % almacenado a temperatura ambiente de 20 ± 2 °C es de 07 semanas y almacenado bajo refrigeración a una temperatura de 5 ± 2 °C la vida útil máxima es de 3 meses.

SUMMARY

The yogurt production in the county and the region, until the present time is given in handmade form and to small scale, this due to the drop production and the increment of the price of the fresh milk, which bear a reduced consumption of milk and its derived, being generated this way the existence of the malnutrition of children and adults in the region of Apurímac. On the other hand, a problem exists at world level that is the intolerance to the lactose.

By means of these problems and identified necessities, the present investigation work has as purpose to give alternative of solution with the one derived milky, obtaining a yogurt beaten by means of partial substitution of fresh milk with kiwicha extract. For such an end it was studied two variables, the first were to determine the appropriate quantity of dilution of kiwicha flour in water, in proportions of 15 and 20% for the obtaining of the extract of filtered kiwicha. The second variable was also to determine the good quantity of the substitution of the kiwicha extract in fresh milk, in concentrations of 20 and 40% for the obtaining of beaten yogurt. To achieve the objective, he/she was carried out the evaluation of physiochemical properties, sensorial analysis and analysis chemical proximal of all the treatments with regard to the pattern.

When concluding the study it was determined that T4 (yogurt obtained with a dilution of 20% of kiwicha flour in water and with a substitution of 40% of kiwicha extract in fresh milk), presented the similar characteristics that the pattern (yogurt with the help of fresh whole milk). T4 showed better consistency, viscosity and homogeneity that the pattern, nevertheless this treatment overcomes in the content of lactic acid. The good yogurt (T4) presented: 3,2303% protein; 3,2793% of fat and 14,9655% of carbohydrates. Regarding the sensorial evaluation, only this treatment also had an acceptability epithet in general the same as the pattern.

During the storage of the yogurt, the pH and the acidity they are not stable as the time where the good yogurt presented a decrease of viscosity lapses more than the pattern, the biggest loss of viscosity is given when the product is stored to environment that I lower refrigeration.

It was determined that the lifespan of the yogurt using the conserving sorbato of potassium to a concentration of 0,05% stored to ambient temperature of 20 ± 2 °C is from 07 weeks and low stored refrigeration to a temperature of 5 ± 2 °C the maximum lifespan it is of 3 months.



I. INTRODUCCIÓN

Según Mahaut y col. (2004), el yogurt presenta varias ventajas para la alimentación humana, por la facilidad de absorción de la lactosa, aumento de la digestibilidad de proteínas, mejora de la digestibilidad de la materia grasa, actividad antimicrobiana, estimulación del sistema inmune, acción preventiva contra los cánceres del sistema digestivo y por la acción anticolesterémica.

Diversas técnicas se han propuesto para aumentar la vida útil del yogurt, aunque existen algunas controversias sobre la corrección de denominar estos productos como “yogurt”, ya que la mayoría de las normas legales establecen que el “yogurt” debe contener un número abundante y viable de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Sin embargo Tamine y Deet, (1980) propusieron que sería razonable reservar el término “yogurt” al producto tradicional y denominar al producto sometido a tratamiento térmico como “yogurt pasteurizado, UHT o de larga duración”.

La diferencia entre el yogurt pasteurizado y el yogurt tradicional es el bajo recuento de microorganismos estarter que se encuentra en el primer tipo. Esta diferencia no obstante es muy relevante en relación con las propiedades nutricionales y terapéuticas del producto (Tamine y Deet 1981).

La producción de yogurt batido en la provincia y la región, hasta la actualidad solo se da en forma artesanal y a pequeña escala, esto debido a la baja producción

y el incremento del precio de la leche fresca, los cuales conllevan el reducido consumo de leche y sus derivados, generándose así la existencia de la desnutrición de niños y adultos en la región de Apurímac. Por otro lado, existe un problema a nivel mundial; que es la intolerancia a la lactosa.

Frente a estas necesidades, la empresa Gloria S.A.A. está promocionando y comercializando yogurt de soya de distintos sabores, con la finalidad de reducir los costos de producción, dar aportes sobre el problema de colesterol, intolerancia y la desnutrición.

Mediante estas problemáticas y necesidades identificadas, el presente trabajo de investigación tiene como finalidad, dar un aporte tecnológico en un derivado lácteo, obteniendo un yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha.

La kiwicha, se utilizó por ser un producto nutritivo y rico en los aminoácidos esenciales que tiene el valor biológico similar a leche fresca. La kiwicha es un producto peruano, que durante los últimos años ha aumentado considerablemente sus derivados en el mercado nacional.

Sin embargo, uno de los atributos de calidad más importante del yogurt es su acidez, pH y viscosidad que determinan la aceptación o rechazo por parte de los consumidores y seguidamente la calidad nutricional. Frente a estas características



y propiedades fisicoquímicas, se planteó realizar la ejecución de este trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

Como objetivo general fue: Determinar los parámetros óptimos de sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha en la obtención de yogurt batido.

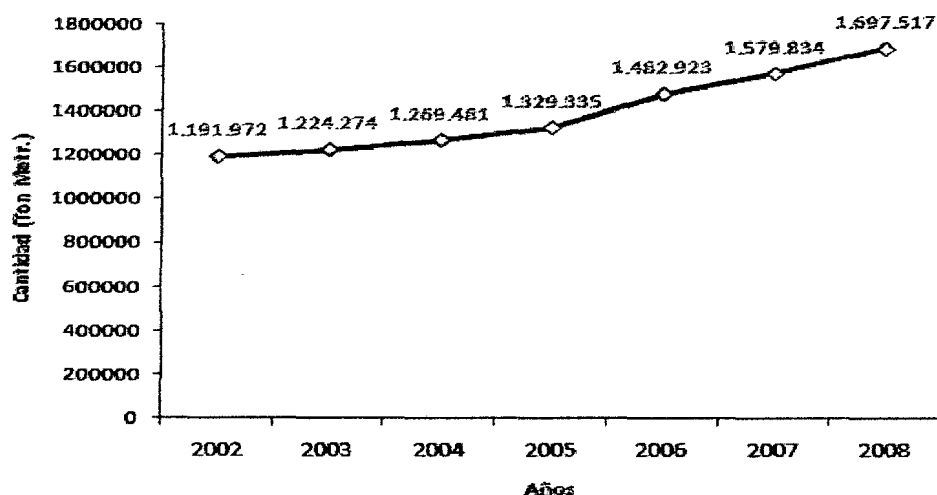
En donde para alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtener las cantidades adecuadas de proporción de la harina de kiwicha y agua para la obtención de extracto.
- Determinar las cantidades óptimas de leche fresca y extracto de kiwicha para la obtención de yogurt batido.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de acidez, pH y viscosidad durante la fermentación en el proceso de incubación.
- Evaluar el análisis sensorial de los tratamientos del yogurt.
- Determinar la vida útil del producto óptimo, utilizando un conservante adecuado.

II. MARCO TEÓRICO

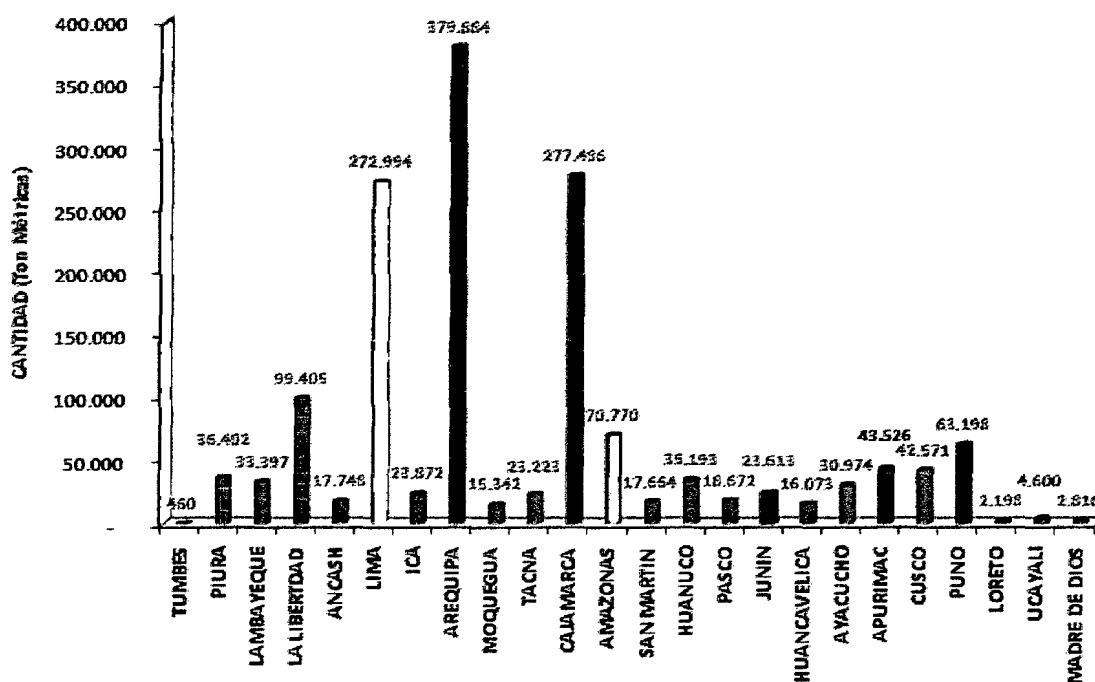
2.1. Producción de leche fresca en el Perú y región de Apurímac

Figura 01. Producción anual de leche fresca en el Perú (2008)



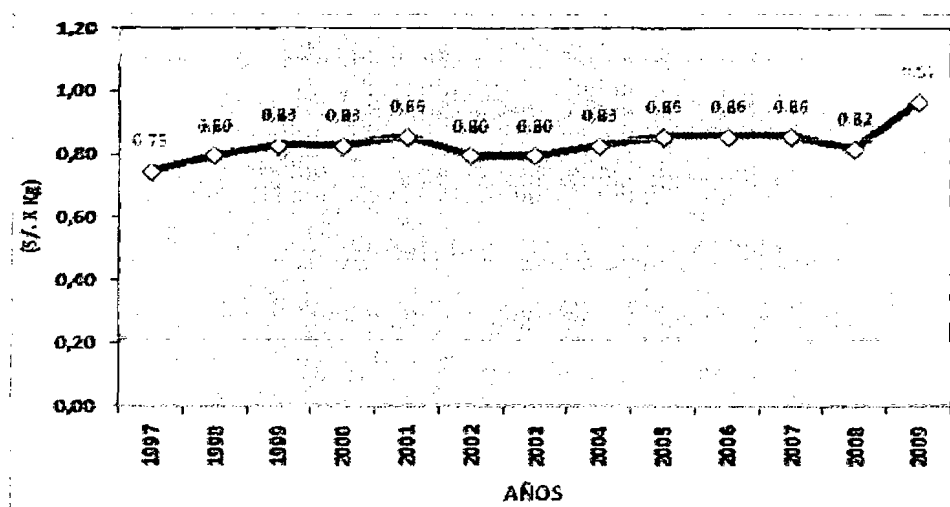
Referencia: Ministerio de Agricultura-Oficina de estudios económicos y estadísticos (Perú: Compendio 2009)

Figura 02. Producción de leche fresca en el Perú (2008).



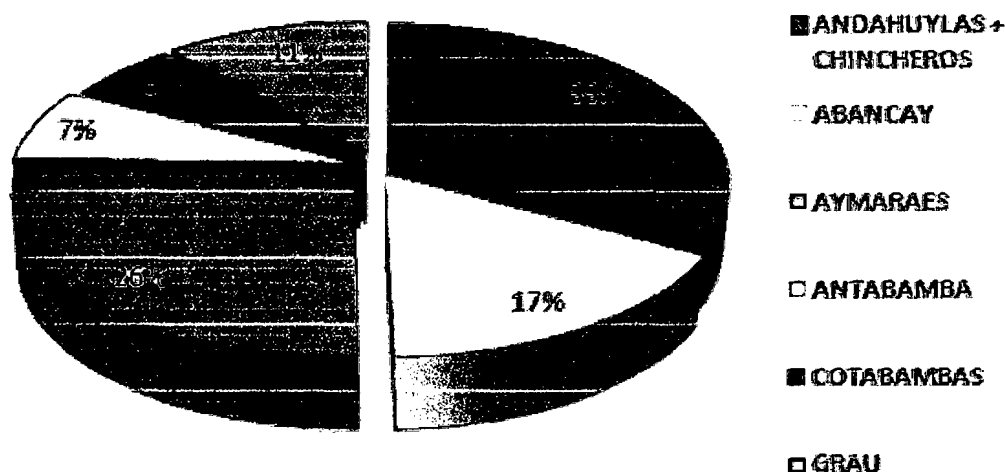
Referencia: Ministerio de Agricultura-Oficina de estudios económicos y estadísticos (Perú: Compendio 2009)

Figura 03. Variación de precio de leche fresca en el Perú (1997-2009)



Referencia: Ministerio de Agricultura-Oficina de estudios económicos y estadísticos
(Perú: Compendio 2009).

Figura 04. Producción de leche fresca en la región de Apurímac (2009)



Referencia: Ministerio de Agricultura – Apurímac, 2009.

La producción de leche fresca en el Perú, en el año 2008 tuvo un crecimiento anual de 7,45 %; por otro lado este crecimiento también se dio en la región de Apurímac considerablemente durante los últimos 03 años, sin embargo la producción de leche fresca no es lo suficiente en la provincia de Abancay para su procesamiento en sus derivados lácteos.

2.2. Características generales de la leche

2.2.1. Definición

Es el producto íntegro no alterado ni adulterado del ordeño higiénico, regular y completo de vacas sanas y bien alimentadas, sin calostro y exento de color, olor, sabor y consistencia anormales y que no ha sido sometido a procesamiento o tratamiento alguno (Vicente, 2001).

Desde el punto de vista biológico, la leche es el producto de la secreción de las glándulas que a tal fin tienen las hembras mamíferas, cuya función natural es la alimentación de los recién nacidos (Ordoñez, 2001).

Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche es una mezcla homogénea de un gran número de sustancias (lactosa, glicéridos, proteínas, sales, vitaminas, enzimas, etc.) que están en forma de una emulsión (la grasa y sustancias asociadas), algunas en suspensión (las caseínas ligadas a sales minerales), y otras en disolución verdadera (lactosa, vitaminas hidrosolubles, proteínas del suero, sales etc.) (Ordoñez, 2001).

2.2.2. Composición

La leche como se puede observar en la siguiente Tabla 01, es completa como se definió anteriormente.

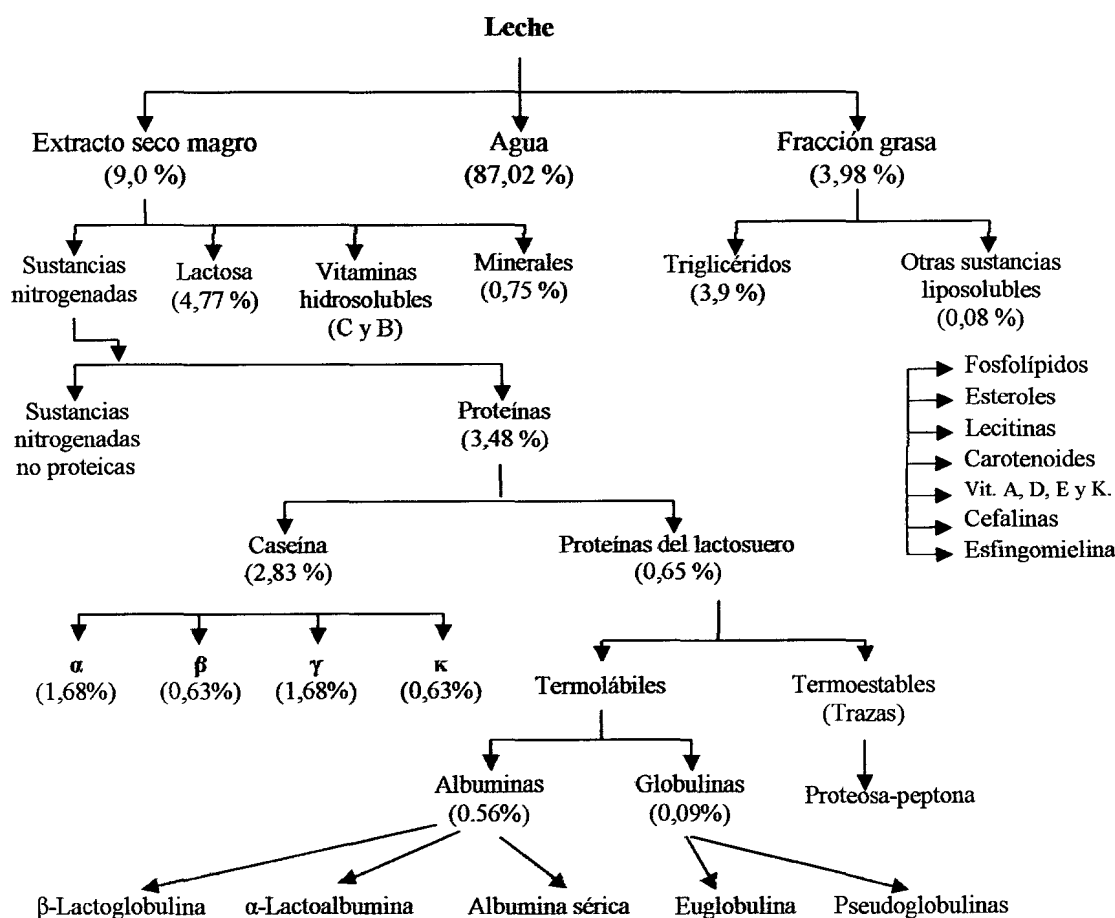
Según Tamime y Robinson (1991), la composición de la leche fresca se presenta a continuación en la figura 05; para diferenciar con más claridad todas sus componentes y sus constituyentes expresados en porcentaje.

Tabla 01. Composición nutricional de la leche fresca

| Componentes | Cantidad |
|------------------------------|----------|
| Energía Kcal | 68 |
| Proteína (%) | 3,3 |
| Grasa (%) | 3,6 |
| Carbohidratos (%) | 4,8 |
| Agua (%) | 87 |
| Cloro (mg) | 109 |
| Calcio (mg) | 140 |
| Fósforo (mg) | 90 |
| Potasio (mg) | 140 |
| Vitamina A (mg) | 0,03 |
| Vitamina B ₁ (mg) | 0,04 |
| Vitamina C (mg) | 1,0 |

Referencia: Vicente, 2001.

Figura 05. Composición química de la leche (%)



Referencia: Tamine v Robinson. 1991.

2.2.3. Estructura

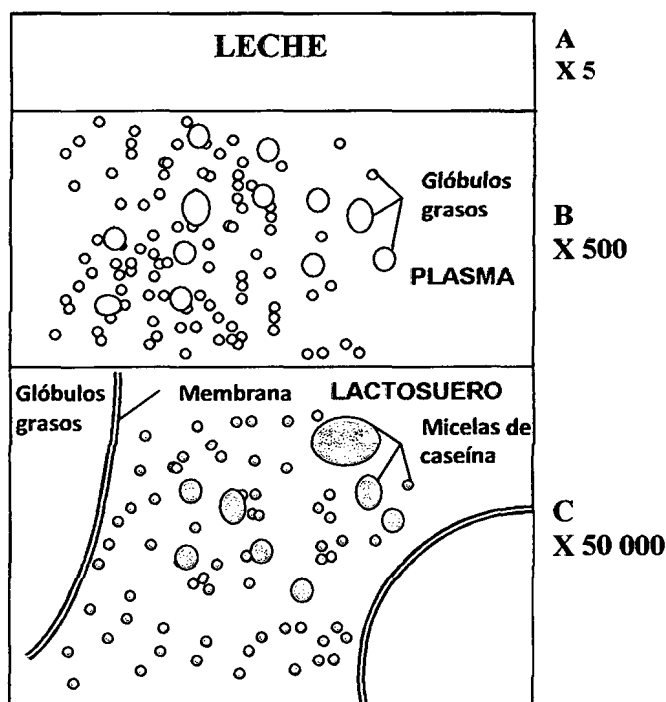
La estructura puede definirse como la disposición física de los componentes químicos en un sistema. La representación de esta se presenta en la figura 06, (Walstra y col., 2001).

(A) Líquido uniforme. Sin embargo este líquido es turbio, lo que significa que no es homogéneo.

(B) Gotitas esféricas de materia grasa. Estos glóbulos flotan en un líquido (plasma), que todavía es turbio.

El plasma contiene partículas proteínicas, que son las micelas de caseína. El líquido resultante (suero) todavía es opalescente, lo que indica que contiene otras partículas. Los glóbulos grasos están rodeados por una fina capa externa (membrana) de diferente composición (H. Mulder y P. Walstra, *The Milk Fat Globule* 1974).

Figura 06. Observación de la leche a diferentes aumentos



Referencia: Walstra y col., 2001.

Tabla 02. Composición y estructura de la leche (cantidades en 1 kg)

| GLÓBULOS GRASOS | | MICELAS DE CASEÍNA | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| Glicéridos Triglicéridos 40 g Di glicéridos 0.1g Mono glicéridos 10 mg Ácidos grasos 60 mg Esteroles 90 mg Carotenoides 0.3mg Vitaminas A, D, E, K Agua 60mg | | Proteína Caseína 26 g Proteosa - p. + Sales 2 g Calcio 850 mg Fosfato 1000 mg Citrato 150 mg K, Mg, Na Agua 80 g Enzimas Lipasa, plasmína | |
| | | MEMBRANA | |
| | | Agua + Proteína 350 mg Fosfolípidos 230 mg Cerebrócidos 30 mg Glicéridos + Ácidos grasos 15 mg Esteroles 15 mg Enzimas Fosfatasa alcalina, xantin oxidasa y muchas otras Cu 4 ug Fe 100 ug | |
| LEUCOCITOS | | PARTÍCULAS LÍPOPROTEICAS | |
| Muchas enzimas Ácidos nucleicos Agua | | Lípidos Proteína Enzimas Agua | |
| LACTOSUERO | | | |
| Agua 790 g Carbohidratos Lactosa 46 g Glucosa 70 mg Otros Minerales Ca ligado 300mg Ca Iónico 90mg Mg 70mg K 1500mg Na 450mg Cl 1100mg Fosfato 1100mg Sulfato 100mg Bicarbonato 100mg Elementos Zn 3 mg Fe 120 ug | Ácidos orgánicos Citrato 1600mg Formato 40 mg Acetato 30 mg Lactato 20 mg Oxalato 20 mg Otros 10 mg Gases Oxígeno 6 mg Nitrógeno 16 mg Lípidos Glicéridos Fosfolípidos 100 mg Cerebrócidos 10 mg Ácidos grasos 20 mg Esteroles 70 mg Otros Vitaminas Grupo B 200 mg Ácido ascórbico 20 mg | Proteínas Caseína + B-lactoglobulina 3.3 g α - lactoalbumina 1.0 g Albumina sérica 0.3 g Inmunoglobulinas 0.7 g Proteosa-peptona + Comp. N no proteicos Péptidos + Aminoácidos 50 mg Urea 250 mg Amoniaco 10 mg Otros 300 mg Enzimas Fosfatasa ácida Per oxidasa Muchas otras Esteres fosfóricos 300 mg Otros | |

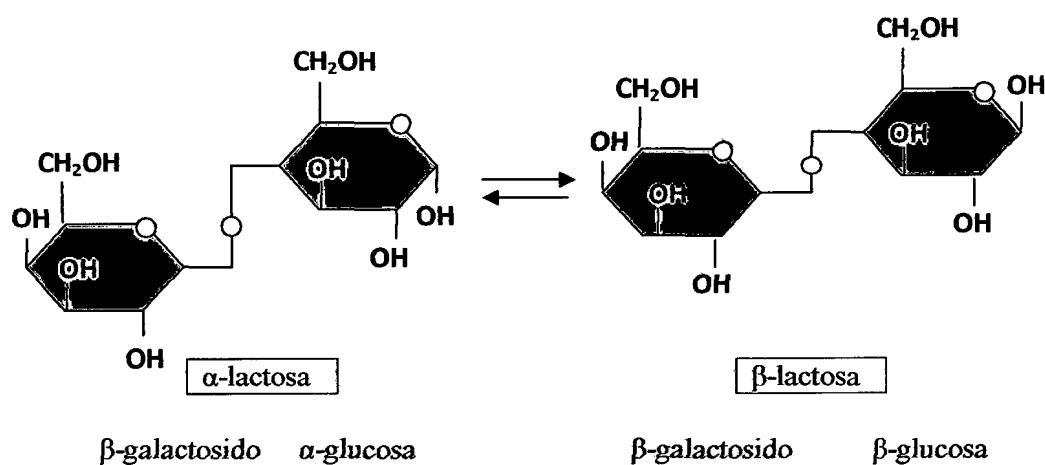
Referencia: Walstra y col., 2001.

2.2.3.1. Los azúcares de la leche

El azúcar principal de la leche es la lactosa, se encuentra entre 40-50 g/l, por eso se añade azúcar a la leche de vaca para lactancia artificial. Otros azúcares que conforman en pequeñas cantidades de mg o ug son (glucosa, galactosa, amino-azúcares, azúcares fosforilados, etc.) (Primo Yúfera, 1998).

Si el suero de la leche se purifica y se concentra, cristaliza la lactosa por debajo de 93,5 °C en forma de α - monohidratada y por encima de 93,5°C cristaliza en forma de β - anhidra, esta forma se disuelve con más facilidad que la primera, la representación se muestra en la siguiente figura 07.

Figura 07. Formas de lactosa



Referencia: Primo Yúfera, 1998.

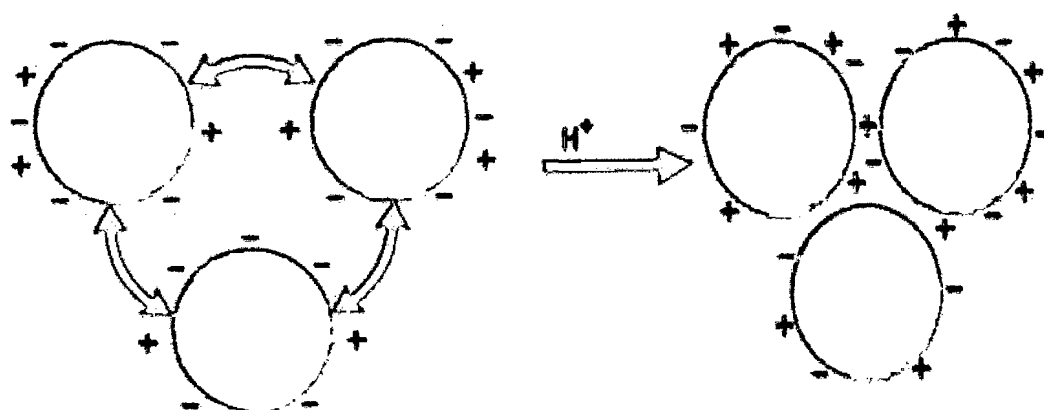
2.2.3.2. Proteínas de la leche

Las proteínas de leche son de dos tipos, la caseína en suspensión coloidal y las del suero, principalmente la lactoglobulina y la lactoalbúmina, la caseína

constituye el 80 % aproximadamente de las proteínas de la leche y las sueltas en el suero el 20 % restante.

Respecto a la pauta de la FAO, las proteínas de la leche son deficientes en metionina + cisteína y ligeramente deficientes en triptófano, sobrepasa notablemente en cuanto al contenido en lisina (Primo Yúfera, 1998).

Figura 08. Comportamiento de las moléculas de proteínas de leche con la variación de pH



a) Molécula de proteínas a pH 6,6
tiene una carga negativa

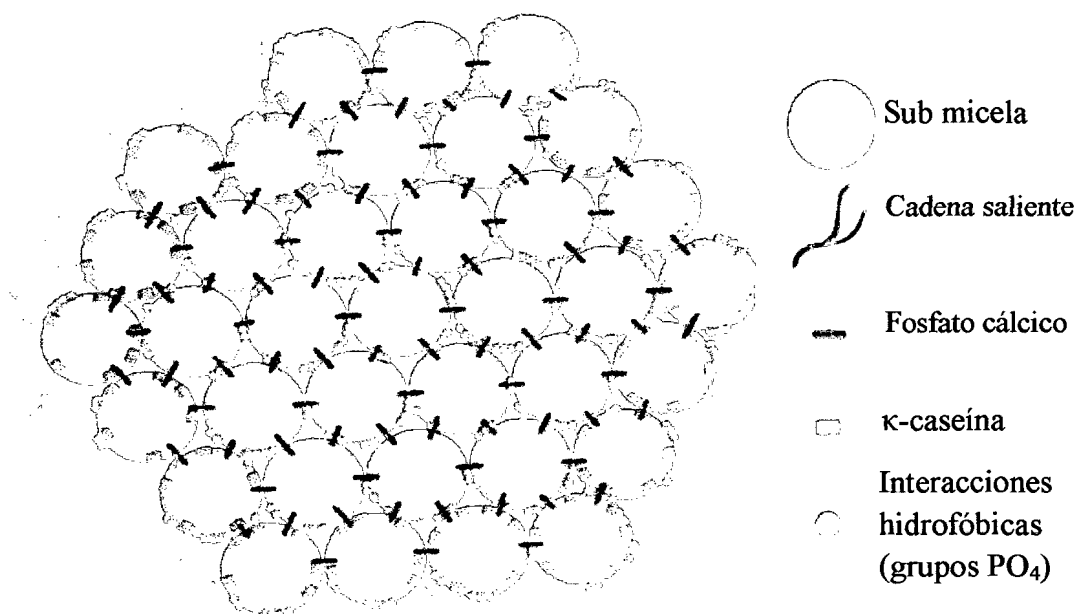
b) Molécula de proteínas a pH 4,7
punto isoeléctrico

Referencia: Madrid Vicente, 2003.

2.2.3.3. Micelas de caseína

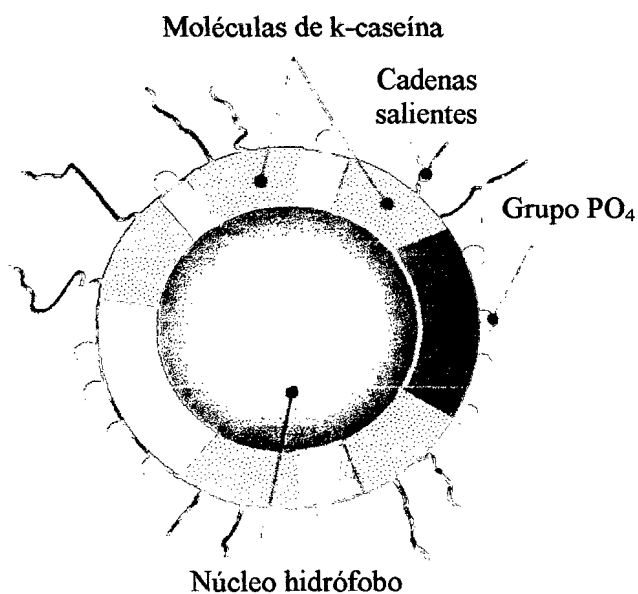
Las caseínas se encuentran en forma dispersión coloidal formando partículas de un tamaño variable. Estas partículas dispersan la luz y por tanto confieren a la leche su característico color blanco, en donde estas reciben el nombre de micelas de caseína (Ordoñez, 2001).

Figura 09. Modelo esquemático de micela de caseína



Referencia: Madrid Vicente, 2003.

Figura 10. Estructura de una submicela de caseína



Referencia: Madrid Vicente, 2003.

El hecho de que la caseína no se encuentre en la leche en disolución sino en forma de micelas, tiene importantes consecuencias sobre las propiedades de la leche. Las micelas de caseína son las responsables de la estabilidad física de los productos lácteos durante el tratamiento térmico, la concentración y el almacenamiento. Las micelas determinan también las propiedades reológicas de los productos fermentados y concentrados (Walstra y col., 2001).

Tabla 03. Aminoácidos de las proteínas lácteas totales (mg / g de proteína)

| Aminoácidos | Valores medios aproximados |
|--------------------|-----------------------------------|
| Ácido glutámico | 240 |
| Prolina | 115 |
| Leucina | 100 |
| Lisina | 80 |
| Ácido aspártico | 75 |
| Valina | 70 |
| Isoleucina | 65 |
| Serina | 60 |
| Tirosina | 50 |
| Fenilalanina | 50 |
| Treonina | 45 |
| Arginina | 35 |
| Alanina | 35 |
| Histidina | 25 |
| Metionina | 25 |
| Glicina | 20 |
| Cisteína | 20 |
| Triptófano | 15 |

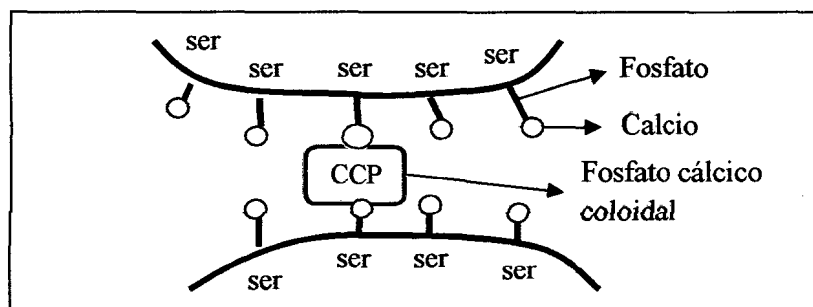
Referencia: Primo Yúfera 1998.



Según Ordoñez (2001), las micelas son estables a los tratamientos térmicos empleados como la pasteurización y esterilización cuando el pH tiene valores alrededor de 6,8; a la compactación y a la homogeneización.

El mismo autor señala que las micelas no son estables a pH ácido de 4,6; a la congelación, en etanol al 40 % y a concentraciones elevadas en calcio.

Figura 11. Representación esquemática de la unión de dos submicelas mediante el fosfato cálcico coloidal (CCP).



Referencia: Ordoñez, 2001.

Durante la conservación de la leche las micelas de caseína se alteran lentamente. La principal modificación es la proteólisis de la β -caseína por la enzima plasmina, con la formación de γ -caseína y proteosa-peptona. Además las micelas de caseína se modifican como consecuencia de cambios en las condiciones externas, especialmente la temperatura y el pH (Walstra y col. 2001).

La acidificación aumenta la solubilidad del fosfato cálcico. A medida que disminuye el pH, el CCP va solubilizándose, de tal forma que, a un pH menor de 4,9; prácticamente todo el CCP estará ya en la fase acuosa (Ordoñez, 2001).

Tabla 04. Propiedades de los principales elementos estructurales de la leche

| Componente principal | Leche | | | |
|-------------------------------------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|
| | Glóbulos grasos | Micelas de caseína | Plasma | |
| | | | Suero | |
| | | | Proteínas globulares | Partículas de lipoproteína |
| En estado de | Grasa | Caseína, agua, sales | Proteínas del suero | Lípidos, proteínas |
| Contenido (% sobre extracto seco) | Emulsión | Fina dispersión | Disolución coloidal | Dispersión coloidal |
| Volumen de la fracción | 4 | 2,8 | 0,6 | 0,01 |
| Diámetro de las partículas ¹ | 0,04 | 0,1 | 0,006 | 10 ⁻⁴ |
| Numero por ml | 0,1-10 nm | 20-300 nm | 3-6 nm | 10 nm |
| Área superficial (cm ² /ml de leche) | 10 ¹⁰ | 10 ¹⁴ | 10 ¹⁷ | 10 ¹⁴ |
| Densidad (20°C, kg/m ³) | 700 | 40.000 | 50.000 | 100 |
| Visibles al | 920 | 1.100 | 1.300 | 1.100 |
| Se separa en | Microscopio | Ultramicroscopio | | Microscopio electrónico |
| Velocidad de difusión (mm en 1 h) ¹ | Desnatadora | Ultracentrifugación | Ultrafiltración | Ultrafiltración |
| pH isoelectrico | 0.0 | 0,1-0,3 | 0,6 | 0,4 |
| | 3,8 | 4,6 | 4-5 | 4 |

Referencia: Walstra y col., 2001.

¹ A efectos comparativos, se considera que el tamaño de la mayor parte de moléculas en solución es de 0,4-1 nm de diámetro y la velocidad de difusión, por ejemplo de 5 mm en 1 hora. 1 mm = 10³um = 10⁶ nm = 10⁷ A.

Nota: los valores son medias aproximadas.

2.2.4. Microbiología de la leche

2.2.4.1. Microbiología del interior de la ubre

En el interior de la ubre, incluso si el animal está sano, existen siempre bacterias banales que contaminan la leche en el momento del ordeño. Esta carga original es escasa y está compuesta principalmente por micrococcos y bacterias coliformes (30-90 %) y estreptococos (0-50 %) aunque también puede existir una gran variedad de bacterias Gran positivas, esporuladas o no, y Gran negativas, aunque en tasas que no suelen ser mayores al 10 % (Ordoñez, 2001).

2.2.4.2. Contaminación externa de la leche

Una vez que la leche abandona la ubre queda expuesta a ulteriores contaminaciones. La tasa original de la leche procedente de un animal sano (aproximadamente 10^3 ufc/ml) se multiplica inmediatamente después de su salida al exterior por un factor de 10 o 100, si la leche se obtiene con cierta higiene, y el número de bacterias puede sobrepasar el nivel 10^6 ufc/ml si no se guardan las mismas condiciones higiénicas.

Las fuentes más importantes de la contaminación de la leche, pueden ser las siguientes: tipo de establo, el aire, el tipo de ordeño y las aguas utilizadas para la limpieza de los materiales (Ordoñez, 2001).

Bacillus subtilis y *B. stearothermophilus*, son suficientemente termoresistentes como para alterar la leche esterilizada que no han recibido un tratamiento adecuado (Walstra y col., 2001).

Tabla 05. Características de algunos microorganismos y grupos de organismos que son importantes en la leche

| Nombre | Fuente | Crecimiento en leche cruda | Resistencia al calor | Patogenicidad | Alteración |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. stearothermophilus</i> | Alimentación, estiércol, suelo, polvo | ++ | + | Probablemente no | Alteración de la leche esterilizada |
| <i>Clostridium botulinum</i> | Suelo, agua contaminada | - | + | Botulismo | No |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Suelo, estiércol, agua contaminada | (+) | + | Desordenes intestinales | No |
| <i>Coliformes</i> | Heces, utensilios de ordeño, agua contaminada | ++ | - | Mastitis, desordenes intestinales | Alteración de leche y queso |
| <i>Pseudomonas</i> | Utensilios, leche refrigerada, agua contaminada | ++ | - | ocasionalmente | Hidrolizan las proteínas y la grasa de leche refrigerada |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | Utensilios de ordeño, leche en cantarás, sala de ordeño | ++ | - | No | Acidificación de la leche |
| <i>Lactococcus lactis</i> | Utensilios de ordeño, leche en cantarás, sala de ordeño | ++ | - | No | Leche acidificada |
| <i>Micrococcus</i> ssp. (2) | Utensilios de ordeño | + | + | No | Crece en productos pasteurizados |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Enfermedad de la vaca o del ordeñador | - | - | Mastitis, tuberculosis | No |
| <i>Salmonella, shigella</i> | Estiércol, agua contaminada | + | - | Desordenes intestinales | No |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Canal del pezón, interior de la ubre, piel, ordeñador | ++ | - | Intoxicación alimentaria, ulcera | Casi nunca |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | Utensilios de ordeño, leche en cantarás, sala de ordeño | ++ | - | No | Acidificación |

Un signo más significa que el organismo no es destruido, en un tratamiento térmico a 63°C durante 30 minutos (Walstra y col, 2001).

2.3. Kiwicha (*Amaranthus caudatus*)

2.3.1. Clasificación botánica

| | |
|-------------------|--------------------------|
| Reino | : Vegetal |
| Nombre Científico | : <i>Amaranthus ssp.</i> |
| División | : Fanerogama |
| Clase | : Dicotiledoneae |
| Orden | : Centrospermales |
| Familia | : Amaranthaceae |
| Género | : Amaranthus |
| Especie | : Caudatus |

Referencia: Mujica, 1997.

2.3.2. Origen

La kiwicha se domesticó en América hace más de 4000 años por culturas precolombinas y de allí posiblemente se difundió a otras partes del mundo. Fue cultivada y utilizada junto al maíz, frijol y calabaza por los Aztecas en el valle de México, por los Mayas en Guatemala y por los Incas en Sudamérica tanto en Perú, Bolivia como Ecuador, junto a la papa, maíz y quinua. (Mujica, 1997).

La kiwicha como verdura por sus hojas fueron utilizados en América y en otras partes del mundo desde la prehistoria en casi todo el mundo incluso desde mucho antes de su domesticación como lo demuestran las excavaciones

arqueológicas, ya que en muchas zonas tropicales y subtropicales el amaranto era una planta importante de recolección sobre todo por sus hojas (Mujica, 1997).

El género *Amaranthus* contiene más de 70 especies, de las cuales la mayoría son nativas de América y sólo 15 especies provienen de Europa, Asia, África y Australia (Robertson, 1981).

Sólo tres especies de kiwicha se utilizan actualmente para la producción de grano: *A. cruentus* L., *A. caudatus* L. y *A. hypochondriacus* L. En tiempos precolombinos *A. cruentus* se encontraba desde el Norte de México a América Central, *A. hypochondriacus* compartía su distribución con *A. cruentus* sólo que esta comenzaba en el sur oeste de Estados Unidos y a diferencia de las otras dos especies, la distribución de *A. caudatus* se encontraba dirigida a la zona andina sudamericana (Mujica, 1997).

2.3.3. Características morfológicas

Es una especie anual, herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias (Mujica, 1997).

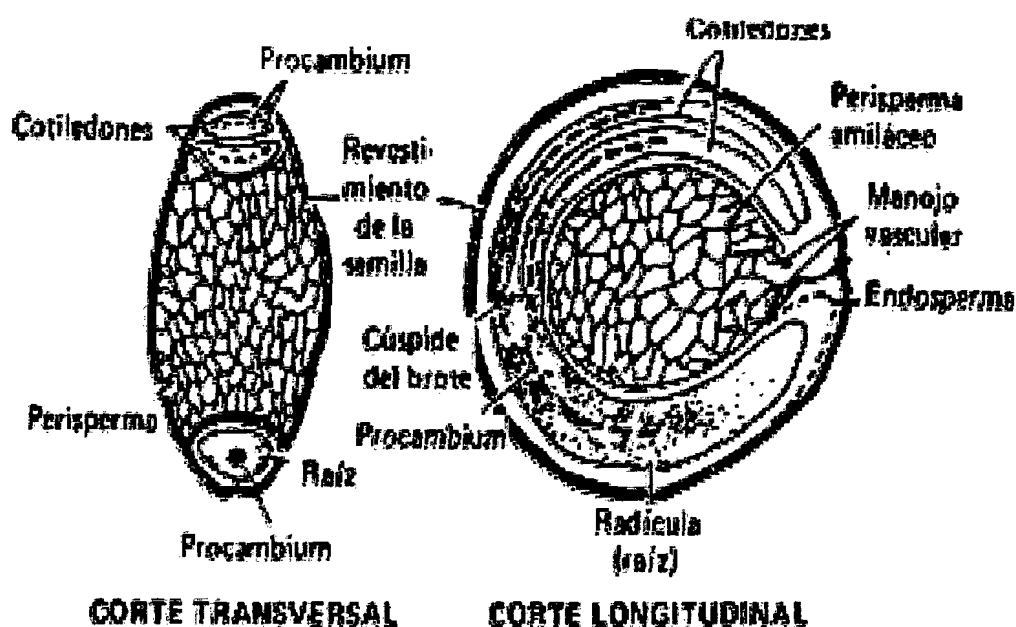
Solano (1993), ha evaluado el germoplasma de amaranto en la Universidad Agraria La Molina, Perú, y encontró seis grupos diferenciados de ecotipos: 3 amarantiformes de plantas de inflorescencias de color blanco rosado y 3 grupos de inflorescencias glomeruladas de color púrpura.



2.3.4. Estructura y su composición

La semilla de kiwicha contiene un nivel promedio más alto de proteína que la mayoría de los granos de uso convencional. Su contenido de lisina, es casi tres veces mayor que el de maíz y casi el doble del que contiene el trigo, de hecho el contenido de este aminoácido en la kiwicha es similar al de la leche (Juan, 1997).

Figura 12. Corte transversal y longitudinal de la estructura de kiwicha



Referencia: Mario Tapia, 2000.

La kiwicha posee, alto contenido de proteínas y un balance adecuado de aminoácidos esenciales en sus semillas, principalmente lisina, metionina y triptófano (Mujica, 1997).

Tabla 06. Composición química de la semilla de kiwicha (g / 100 g base h.)

| Componentes | Cantidad |
|--------------------|-----------------|
| Energía (Kcal) | 391 |
| Proteína (g) | 12 - 19 |
| Carbohidratos (g) | 71,8 |
| Grasa (g) | 6,1 - 8,1 |
| Fibra (g) | 3,5 - 5,0 |
| Cenizas (g) | 3,0 - 3,3 |
| Calcio (mg) | 130 - 164 |
| Fósforo (mg) | 530 |
| Potasio (mg) | 800 |
| Vitamina C (mg) | 1,5 |

Referencia: Nieto, 1990.

La proteína de kiwicha se encuentra principalmente en el embrión (65 %) a diferencia de otros cereales como maíz, arroz y soya que presentan sobre el 80 % de la proteína en el endospermo (Bressani, 1989). Además existe una importante variación en el contenido de proteína en diferentes especies de kiwicha o amaranto. Incluso observaron que el triptófano se encuentra en niveles aún más elevados que en la leche y con respecto a otros aminoácidos esenciales presentes en la proteína de kiwicha, según FAO; solo se han encontrado deficiencias en leucina con respecto al requerimiento para el caso de preescolares. La relación de eficiencia proteínica (PER) para el grano cocido es similar al de la caseína que es de 2,5 con una digestibilidad del 90 % y un valor biológico (BV) de 75 % que es

cercano al balance ideal de aminoácidos esenciales que teóricamente es de 100 % (Mario Tapia, 2000).

Tabla 07. Contenido de aminoácidos de la proteína de kiwicha, comparado con leche, huevo y con el patrón de aminoácidos FAO/OMS/UNU (1985) en (mg de aminoácidos / g de proteína)

| Aminoácidos | Patrón FAO/OMS/UNU (1985) | | Leche entera de vaca ³ | Huevo de gallina ² | <i>Amaranthus caudatus</i> ¹ |
|-------------------------|---------------------------|---------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|
| | Preescolares | Adultos | | | |
| Isoleucina | 28 | 13 | 47 | 63 | 52 |
| Leucina | 66 | 19 | 95 | 88 | 46 |
| Lisina | 58 | 16 | 78 | 70 | 67 |
| Metionina + cisteína | 25 | 17 | 33 | 58 | 35 |
| Fenilalanina + tirosina | 63 | 24 | 101 | 90 | 63 |
| Treonina | 34 | 9 | 45 | 51 | 51 |
| Triptófano | 11 | 5 | 14 | 15 | 11 |
| Valina | 35 | 13 | 58 | 69 | 45 |

Referencia: ¹ Collazos (1975); ² Morris *et al.* (1999) y ³ Fennema (2000).

2.3.5. Usos y derivados de kiwicha

Usos múltiples en la alimentación humana obteniéndose del grano harinas, harinas de semillas germinadas y elaboración de hojuelas o productos para mazamorras, galletas fortificadas, dulces, tamales, tortillas, bebidas refrescantes como néctares etc. y las hojas se consumen al estado tierno en reemplazo de hortalizas de hoja con mayores ventajas nutritivas y económicas (Mujica, 1997).

2.3.6. Características del almidón de kiwicha

En los resultados reportados por Calixto Cotos M. y Arnao Salas I. (2004), indican que en el análisis macroscópico de los granos de *A. caudatus* se encontró una proporción de 9:1 de granos OPA y TRANS respectivamente, estos se trituraron por separado y fueron coloreados con una solución de yodo, obteniéndose una coloración pardo rojiza para OPA y azul para TRANS.

Los mismos autores señalan, que el almidón extraído mediante un tratamiento alcalino y desproteínizado con alcohol isoamílico, permitió obtener un almidón de aspecto blanco, homogéneo e insípido.

La temperatura de gelatinización, es el punto en el cual los gránulos de almidón pierden su cruz de polarización; sin embargo, no todos los gránulos lo hacen de forma simultánea.

La temperatura de gelatinización depende de varios factores tales como: tamaño del gránulo (los más grandes tienden a hincharse y absorben agua antes que los pequeños), variedad de almidón, contenido de amilosa y amilopectina, pH, cantidad de agua y contenido de sales (Paredes, 1994).

La retrogradación, es un proceso de transformación que ocurre cuando el almidón gelatinizado es almacenado a temperatura ambiente o en frío. Las moléculas de almidón gelatinizadas se aglomeran progresivamente mediante enlaces de hidrógeno, incrementándose la cristalinidad dentro del gel; resultando



una estructura ordenada dentro del gel. La velocidad de retrogradación depende de los mismos factores que la gelatinización (Cheftel, 1976).

Los almidones ricos en amilosa expulsan agua adsorbida y los enlaces de hidrógeno, estas moléculas se desplazan entre la amilosa y el agua (Whistier, Bemiller y Paschall, 1984).

Los almidones que contienen 20 a 25% de amilosa están sujetos a la retrogradación y no se aconsejan como agentes espesantes porque puedan dar textura granulosa. Sin embargo, los almidones tipo waxy, retrogradan poco; es por ello que se utilizan como agente espesante (Cheftel J. C. y Cheftel H., 1976).

Según Konishi Yotaro y col. (2006), la temperatura de gelatinización del almidón nativo Opa fue 60,4 °C y para Trans 60,6 °C; mientras que la temperatura de gelatinización del almidón retrogradado fue de 44.6 °C para el Opa y 41.7 °C para Trans respectivamente. Además los mismos investigadores reportaron que los almidones Opa y Trans requirieron de 14 días de almacenamiento a 5 °C para lograr la retrogradación, a diferencia que los almidones con alto contenido de amilosa que requieren menor tiempo (horas) para alcanzar la retrogradación.

Esta característica lo demuestra el estudio realizado por Annison y Topping (1994), quienes indicaron que el proceso de retrogradación puede ocurrir en horas en el caso de almidones con alto contenido de amilosa y varios días en el caso de almidones ricos en amilopectina. Esto es, porque en el primer caso las cadenas lineales de α -glucosa son necesarias para la formación de la estructura cristalina.

Además, la retrogradación puede incrementarse por ciclos repetitivos de calentamiento y enfriamiento alterando la estructura del almidón nativo.

Según Calixto Cotos M. y Arnao Salas I. (2004), demostraron el contenido de amilopectina y amilosa en el almidón de *A. caudatus* comparando con el almidón de maíz como referencia, mediante una estimación cuantitativa usando una solución de yodo, como se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 08. Estimación cuantitativa de amilosa y amilopectina del almidón de *Amaranthus caudatus* Lineo y de *Zaea mays*

| Almidón | | Amilosa (%) | Amilopectina (%) |
|---------|-------|----------------|---------------------|
| Kiwicha | Opa | 6,8 | 93,2 |
| | Trans | 11,3 | 88,7 |
| Maíz | | 24,2 | 75,8 |

Referencia: Calixto Cotos M. y Arnao Salas I., 2004

Yañez y col. (2002), reportaron que los geles de almidón de amaranto podrían tener aplicaciones en sistemas alimenticios que requieran estabilidad en condiciones medias y extremas de calentamiento, agitación y que no formen geles sólidos. Pueden también ser utilizados como agente estabilizante y espesantes en formulaciones de cremas pasteleras, salsas, jaleas, helados, en sopas instantáneas, en alimentos enlatados y congelados.

Por estas razones la gelatinización y la retrogradación son propiedades importantes que se recomiendan para los controles en el proceso industrial de alimentos.



2.4. Yogurt

La legislación define el yogurt como el producto de la leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de los microorganismos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, a partir de la leche pasteurizada, nata pasteurizada, leche concentrada, leche parcial o totalmente desnatada y pasteurizada, con o sin adición de leche en polvo (Vicente, 2001 y Ordoñez, 2001).

Según Ordoñez 1998. Especifica que los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en cantidad mínima de 10^7 colonias por gramo o por mililitro. Esta premisa de microorganismos vivos puede justificarse por: las bacterias viables pueden tener efectos profilácticos y terapéuticos en el consumidor.

El mismo autor sugiere, que la fecha de caducidad, debe expresarse en el envase y no debe sobre pasar en 24 días la de fabricación, siempre que no se abuse de la temperatura de almacenamiento. A más de 10°C , la vida útil se calcula en unos pocos días ya que el producto alcanza un grado de acidez excesivo porque *Lb. Delbrueckii subsp. Bulgaricus* puede continuar metabolizando la lactosa y alcanzarse hasta un 2.5% de ácido láctico.

2.4.1. Composición

La concentración final de aminoácidos en el yogurt elaborado con leche de vaca puede oscilar de 18,7 a 30 mg/100 ml y es posible que la acidez de estos yogures sea de un 1,0-1,4 % de ácido láctico. Es importante señalar que la concentración de aminoácidos en el yogurt depende de la proteólisis y la



asimilación por las bacterias. Algunos aminoácidos, como por ejemplo, el ácido glutámico, la prolina, y en menor grado la alanina y la serina, no son presumiblemente necesarios para los microorganismos del yogurt, por lo que se acumulan en el producto final en cantidades superiores al resto de los aminoácidos, que si son metabolizados por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* durante el crecimiento y la fermentación (Tamine y Robinson, 1991).

Tabla 09. Concentración de aminoácidos libres (mg/ 10 ml) en el yogurt

| Aminoácido | Cantidad |
|-------------------|----------------------|
| Alanina | 1,17 - 3,80 |
| Arginina | 0,70 - 1,39 |
| Ácido aspártico | 0,70 - 1,20 |
| Glicina | 0,28 - 0,45 |
| Ácido glutámico | 4,80 - 7,06 |
| Histidina | 0,80 - 1,70 |
| Isoleucina | 0,15 - 0,40 |
| Leucina | 0,70 - 1,82 |
| Lisina | 0,80 - 1,11 |
| Metionina | 0,08 - 0,20 |
| Fenilalanina | 0,17 - 0,61 |
| Prolina | 5,40 - 7,05 |
| Serina | 1,50 - 2,90 |
| Treonina | 0,24 - 0,70 |
| Triptófano | 0,2 |
| Tirosina | 0,18 - 0,61 |
| Valina | 0,90 - 1,86 |
| Total | 18,77 - 33,06 |

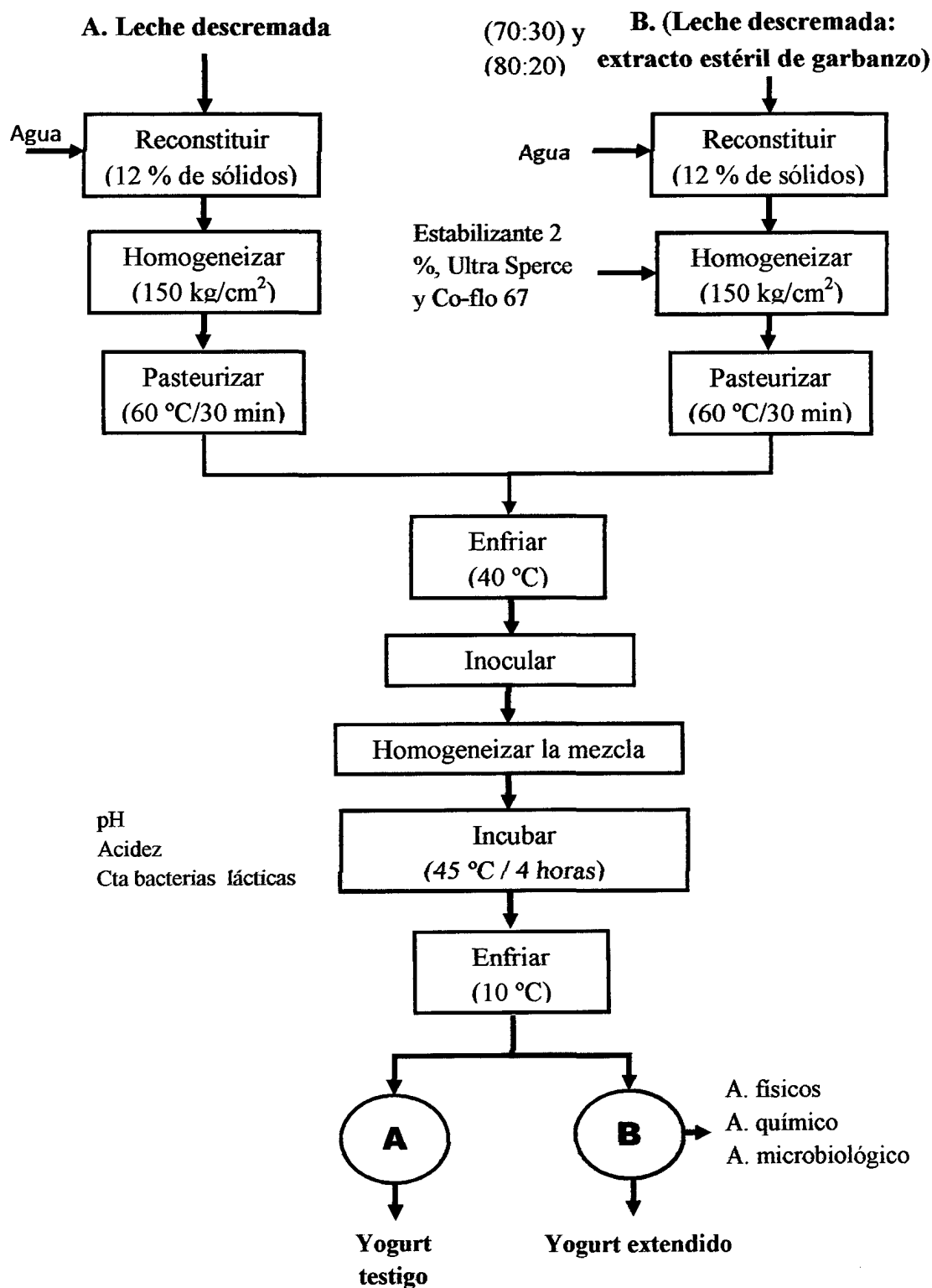
Referencia: Tamine y Robinson, 1991.

El flujograma de la figura 13, se tomó como referencia para realizar el presente proyecto de investigación. En donde, Morales de León J. y col. (1999), tuvo como objetivo determinar las condiciones experimentales de elaboración de un yogurt extendido con garbanzo (*Cicer arietinum L.*), inoculado con *St. thermophilus* y *L. bulgaricus*, para compararlo fisicoquímica, microbiológica y sensorialmente con un yogurt elaborado con base en leche descremada. En donde para este fin, el autor realizó las siguientes formulaciones (50:50, 60:40, 70:30 y 80:20) (leche descremada: extracto estéril de garbanzo).

De ésta se observó que las características físicas y sensoriales de las mezclas de leche descremada más extracto estéril de garbanzo, fueron muy semejantes a las de la leche, no así el sabor, en donde las mezclas (50:50 y 60:40) (leche descremada: extracto estéril de garbanzo), presentaron un marcado sabor a garbanzo y las mezclas (70:30 y 80:20), solamente un ligero sabor a ésta leguminosa; con base en lo anterior, se seleccionaron estas dos últimas mezclas para continuar el estudio.

Los yogurt elaborados con las mezclas 70:30 y 80:20 (leche descremada: extracto estéril de garbanzo) presentaron sinéresis, por lo que se procedió a adicionar los estabilizantes. El yogurt elaborado con la mezcla 70:30 adicionado con 2% de Ultra Spere M, presentó un coágulo firme y poca sinéresis, sin embargo, cuando se utilizó el estabilizante Col-Flo 67, en una concentración de 2%, se observó (visualmente) una mayor sinéresis; al degustarlos sensorialmente, los jueces indicaron que en ambos productos, se percibió una textura granulosa

Figura 13. Proceso de elaboración de yogurt con base en leche y de un yogurt extendido con extracto estéril de garbanzo.



Referencia: Morales de León J. y col., 1999.

con sabor a garbanzo cocido, obteniéndose una media de nivel de agrado de 4,8 (Ni gusta Ni disgusta) lo que representa un 68,6% de aceptación de los jueces.

En el caso del yogurt elaborado con la mezcla 80:20 adicionado con 2% del estabilizante Col-Flo 67 se observó ligera presencia de sinéresis y se percibió una consistencia granulosa, mientras que, con el estabilizante Ultra Sperse M al 2%, se eliminó la sinéresis y se obtuvo un producto de textura suave y con sabor a yogurt. Los yogurt elaborados con la mezcla 80:20 y 70:30 adicionados con el estabilizante Ultra Sperse M (2 %), presentaron una media de nivel de agrado de 5,6 (bueno) y 4,8 (Ni gusta ni Disgusta), respectivamente.

2.4.2. Requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas

- ✓ **Fuente de energía.** Lactosa u otro carbohidrato fermentable.
- ✓ **Fuente de carbono.** Lactosa u otro carbohidrato fermentable.
- ✓ **Fuente de nitrógeno.** Proteínas de la leche, péptidos y una amplia variedad de aminoácidos. *S. thermophilus* requiere en la primavera lisina, leucina, histidina, valina, cisteína y ácido aspártico.
- ✓ **Minerales.** Ca, Mg, P, K, etc.
- ✓ **Vitaminas.** Bitotina, niacina y ácido pantoténico.
- ✓ **Dióxido de carbono y aminoácidos azufrados.** (Gonzales G. 1993).

2.4.3. Desarrollo de las bacterias lácticas en la leche y estimulación del crecimiento

2.4.3.1. Desarrollo de las bacterias lácticas

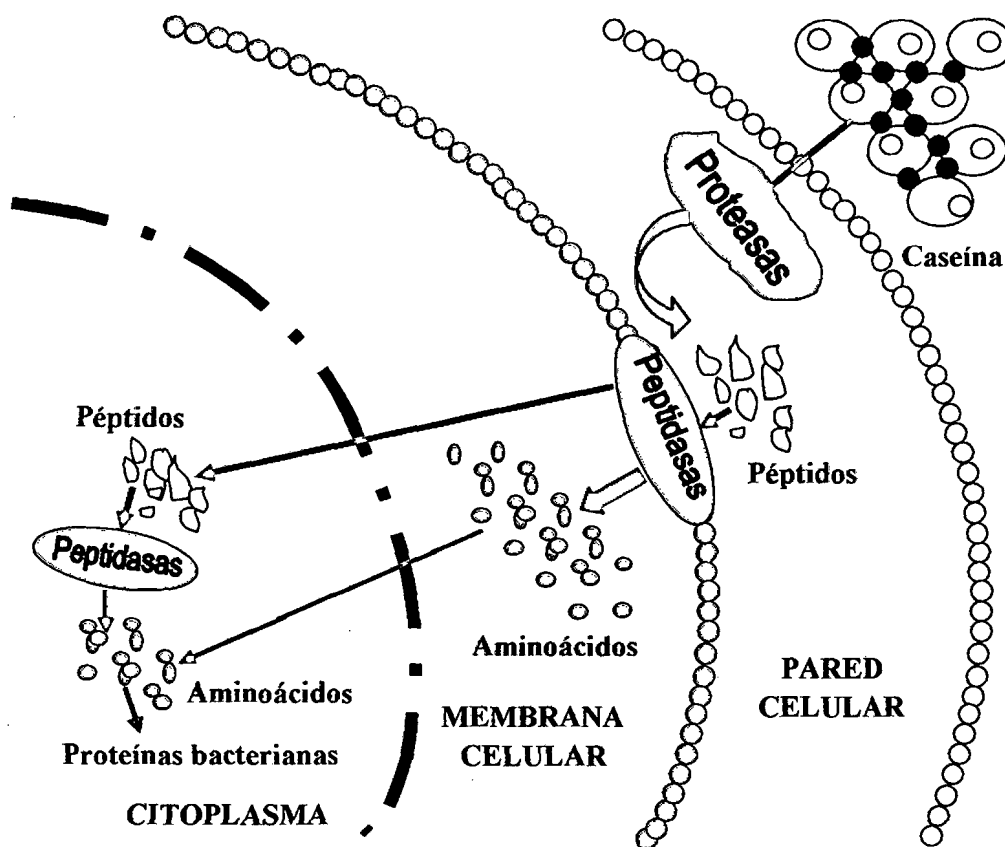
Las bacterias lácticas son muy exigentes en sus necesidades nutritivas, la leche no contiene bastante cantidad de compuestos nitrogenados de disponibilidad inmediata (es decir, péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos) para que las bacterias puedan crecer muy bien. Un requisito necesario para el desarrollo bacteriano es que las células contengan un sistema proteolítico formado por las enzimas asociadas a la pared y enzimas intracelulares. Las enzimas van hidrolizando consecutivamente las grandes moléculas proteicas hasta componentes fáciles de asimilar (ver figura 14). Como es lógico, la presencia de este sistema en las bacterias lácticas y la velocidad de acidificación están muy relacionadas (P. Walstra y col, 2001).

Esta hidrólisis es necesaria para el crecimiento de las bacterias, cuando el medio de cultivo contiene aminoácidos libres, también pueden entrar directamente a la célula.

2.4.3.2. Crecimiento de las bacterias lácticas

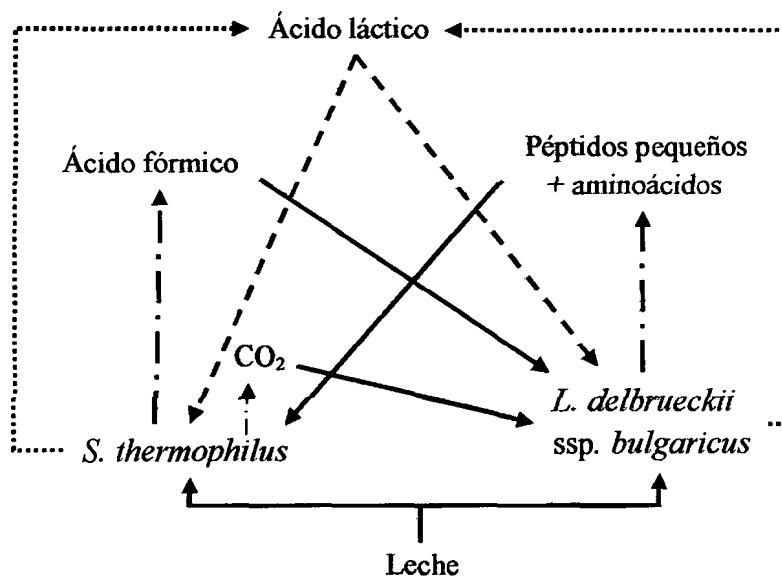
La flora del yogurt está constituido por las bacterias lácticas termófilas *S. thermophilus* y *L. delbruekii* ssp. *bulgaricus*, para que el flavor se desarrolle satisfactoriamente, las dos bacterias deben encontrarse en un numero aproximadamente igual. Entre ellas se establece un fenómeno de mutua estimulación del crecimiento protocooperación, ver figura 15.

Figura 14. Degradación de la caseína por las bacterias lácticas



Referencia: Walstra y col., 2001.

Figura 15. Fenómenos de estimulación e inhibición que se producen durante el crecimiento de las bacterias del yogurt



..... Formación de ácido láctico ——— Estimulación
 - . - - Formación de factores de crecimiento - - - Inhibición

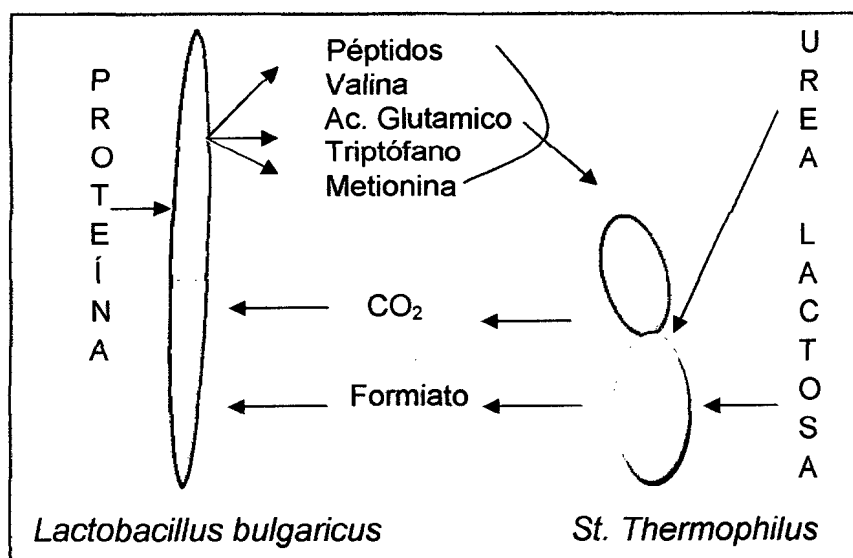
Referencia: Tomado de Walstra y col., 2001.



Las bacterias proteolíticas favorecen el crecimiento de los *S. thermophilus* por la formación de péptidos y aminoácidos, principalmente valina. Mientras que los cocos potencian el desarrollo de *L. bulgaricus* produciendo ácido fórmico a partir del ácido pirúvico en condiciones anaeróbicas y formándose también el CO₂ en este momento (P. Walstra y col, 2001).

Según Ordoñez (1998), *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* libera, a partir de las proteínas de la leche, diversos aminoácidos (entre ellos valina, ácido glutámico, triptófano y metionina) y algunos péptidos que estimulan el crecimiento de *St. Thermophilus*. A su vez esta bacteria produce formiato durante el metabolismo de la lactosa y CO₂ a partir de la urea presente en la leche. Ambos metabolitos estimulan el desarrollo de lactobacilo (ver la figura 16).

Figura 16: Factores que determinan el crecimiento simbiótico de *st. thermophilus* y *lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*



Referencia: Tomado de Ordoñez, 1998.

Bautista, Dahiya y Speck (1996), también investigaron sobre la teoría de la simbiosis, sosteniendo que *L. bulgaricus* estimula el crecimiento de *S. thermophilus* por liberación de glicina e histidina al medio de cultivo. Estos autores concluyeron que la histidina era más importante que la valina.

Accolas, Veaux y Auclair (1971), han señalado que la estimulación de *S. thermophilus* por un filtrado de un cultivo de *L. bulgaricus* se debe a la presencia de valina, leucina, isoleucina e histidina en el mismo.

Bracquart, Lorient y Alais (1978) y Bracquart y Lorient (1979), llegaron a la conclusión de que el agotamiento de valina e histidina, ácido glutámico, triptófano, leucina e isoleucina en el medio reduce la estimulación de *S. thermophilus* en un 50 %.

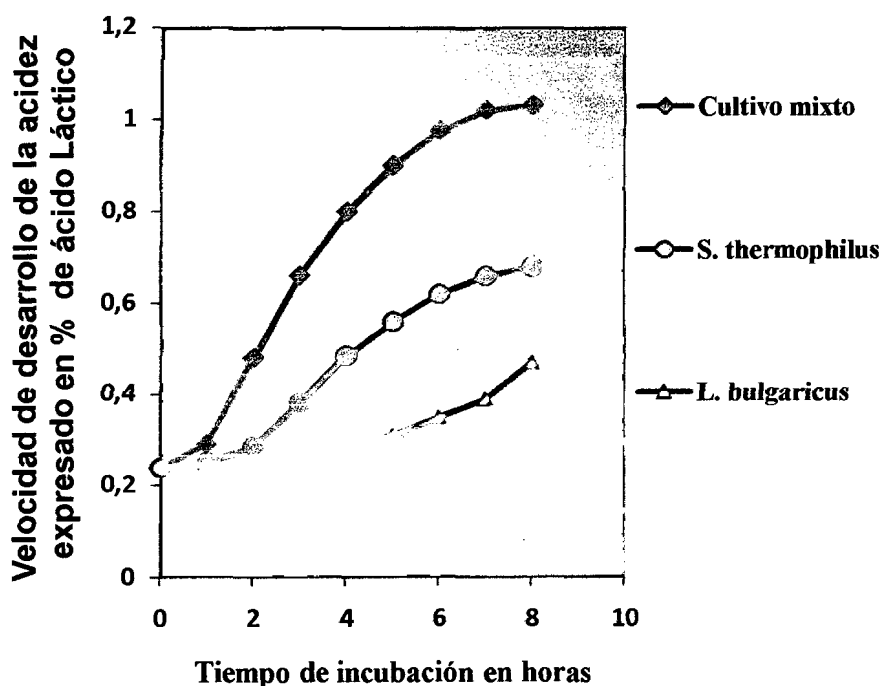
Higashio, Yoshiokan y Kiruchi (1977), obtuvieron resultados similares, incluyendo también la metionina como aminoácido estimulante. Sin embargo, el aminoácido más efectivo es la valina.

Galesloot, Hassing y Veringa (1968), investigaron la relación simbiótica inversa entre *St. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. Sus conclusiones fueron que en condiciones de anaerobiosis el primer microorganismo produce un factor que estimula el crecimiento de *L. bulgaricus*, el cual es igual, o al menos puede ser reemplazado por el ácido fórmico. Además estos mismos autores observaron el efecto de diversos tratamientos térmicos de la

leche, encontrando que en las leches sometidas a un tratamiento térmico intenso, por ejemplo con esterilización de UHT, se veía enmascarada por la formación de un compuesto que podía ser reemplazado con igual efecto por el ácido fórmico.

La proporción óptima entre cocos y bacilos depende de las características de las cepas pero, normalmente es de (1:1). Esta relación se mantiene en el producto final como se ve en la figura 17, en las siguientes condiciones: un porcentaje de inóculo del 2,5 incubación de 2 horas a 45°C, y acidez final aproximada 0,9-1,0 expresado en porcentaje de ácido láctico (Walstra y col., 2001).

Figura 17. Comportamiento de cepas puras y mixtas de cultivos de yogurt sembrado e incubados a 40°C en leche desnatada esterilizada en autoclave y sembrada con un 2,0% de cultivo



Referencia: Tamime y Robinson, 1991.

La proporción entre los dos microorganismos va cambiando, inicialmente los estreptococos crecen más deprisa debido a que los bacilos sintetizan los factores de crecimiento, y también probablemente como consecuencia de la adición de estos compuestos con el inóculo (especialmente en la elaboración del yogurt firme o compacto). Después el desarrollo de los cocos se hace más lento por efecto del ácido producido. Mientras tanto los lactobacilos han empezado a crecer más rápidamente estimulados por los factores de crecimiento (CO_2 y ácido fórmico) producidos por los estreptococos. Como resultado, vuelve restablecerse la proporción inicial, y en ese momento, el yogurt debería haber alcanzado la acidez deseada (Walstra y col., 2001).

2.4.3.3. Factores que afectan el crecimiento y la reproducción de las bacterias durante la fermentación

- ✓ **Tiempo de incubación.** Un tiempo de incubación más corto, que implica una acidez menor, producirá un aumento en la proporción de estreptococos. La repetida transferencia de un cultivo de yogurt después de incubaciones cortas, puede llegar a hacer desaparecer los bacilos del cultivo. Por el contrario, los tiempos de incubación largos desequilibrarán la población con predominio del lactobacilo.

- ✓ **Porcentaje de inóculo.** El aumento del porcentaje del inóculo incrementa la velocidad de acidificación y en consecuencia, se alcanzara antes el nivel de acidez que detiene el crecimiento de los cocos, lo que se traducirá en un mayor número de lactobacilos (para el

mismo tiempo de incubación). Cuando el porcentaje inoculado es menor, la relación entre las bacterias se desplazara a favor de los estreptococos.

- ✓ **Temperatura de incubación.** La temperatura óptima de crecimiento de los bacilos es superior a la de los cocos, la incubación a más de 45°C desplazara el equilibrio a favor de bacilos, la incubación a menor temperatura favorecerá el desarrollo de los cocos (Walstra y col, 2001).

Durante la elaboración de yogurt el crecimiento de *St. thermophilus* es más rápido que el de *lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, por lo que se produce en primer lugar ácido L (+) láctico y a continuación ácido D (-) láctico, siendo el porcentaje entre estos como sigue.

Si el yogurt contiene más de un 70 % de ácido L (+) láctico ello indica que ha sido inoculado con un cultivo estárter consistente principalmente en *St. Thermophilus*, que la fermentación se ha desarrollado a temperaturas inferiores a 40 °C, si el yogurt contiene un 0,8 % o menos de ácido láctico, esta indica que ha sido refrigerado cuando presentaba una acidez baja (Tamine y Robinson, 1991).

Por otro lado, si el yogurt contiene más ácido D (-) láctico que L (+) láctico, ello indica, que ha sido incubado a una temperatura demasiado alta, es decir, de 45°C o superior, que ha sido incubado durante mucho tiempo, por lo que el producto ha alcanzado una acidez muy alta, que ha sido almacenado por un periodo de tiempo prolongado, también se debe cuando el inóculo de estárter fue

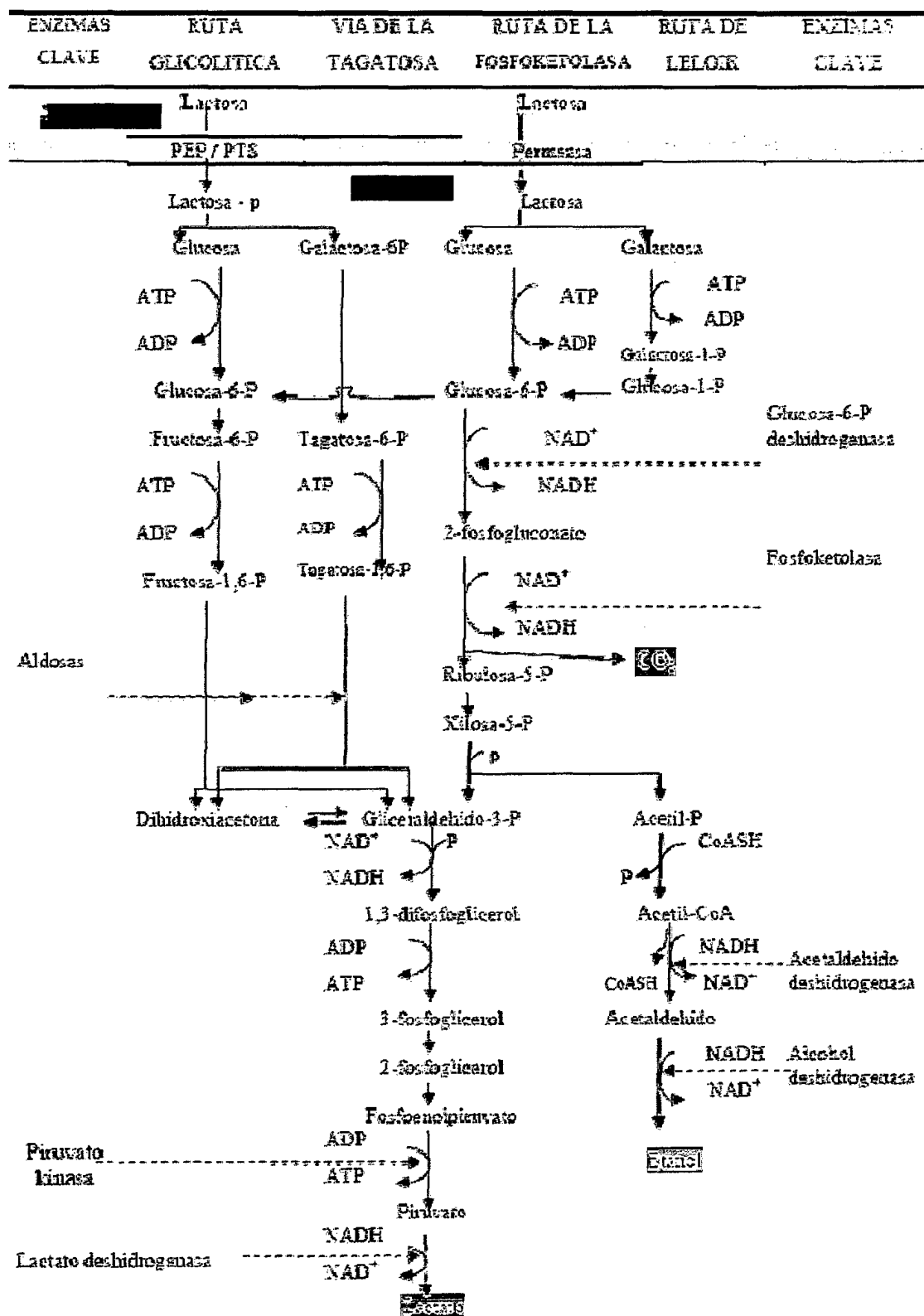
superior al 3 %, o bien cuando el cultivo estárter empleado contenía más bacilos que cocos (Tamine y Robinson, 1991).

2.4.4. Fermentación láctica

Lb. delbrueckii subsp. Bulgaricus, *Lb. Acidophilus* y *St. Thermophilus* solo utilizan la vía Embden- Meyerhof-Parnas, estas fermentan la lactosa homofermentativamente. Mientras que *Leuconostoc spp.* Puede fermentar la lactosa por vía heterofermentativamente (ver figura 18).

- En la fermentación homoláctica, la lactosa entra en la célula mediante el sistema permeasa, por lo que no se encuentra fosforilada. La enzima β -D-galactosidasa escinde o hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa. Esta última se cataboliza hasta lactato y la galactosa se excreta de la célula. Cuando se ha utilizado toda la glucosa disponible, *St. thermophilus* y *Lb. delbrueckii subsp. acidophilus* pueden fermentar la galactosa por la vía de Leloir (Ordoñez, 2001).
- En la fermentación heteroláctica, *leuconostoc spp.* utiliza el sistema permeasa para introducir la lactosa en el interior de la célula y allí la desdobla en glucosa y galactosa mediante la β -D-galactosidasa. En resumen los *leuconostoc* producen equimolecularmente ácido láctico, CO₂ y etanol durante la fermentación (Ordoñez, 2001).

Figura 18. Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas



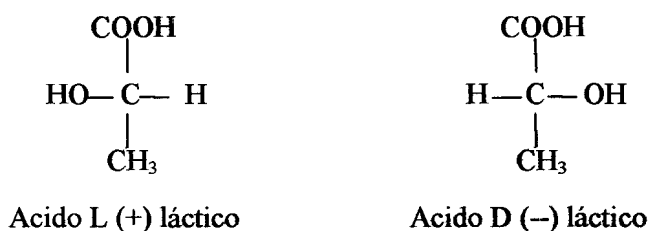
Referencia: Modificado según T.M Cogan y C. Hill. Walstra, 2003.

2.4.4.1. Metabolitos formados en la fermentación

Streptococcus thermophilus y *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, producen sustancias que además de contribuir a la estructura y consistencia del yogurt, determinan su flavor entre los principales compuestos formados son los siguientes.

- ✓ **Ácido láctico.** Los dos microorganismos forman ácido láctico a partir de la glucosa. La galactosa resultante de la hidrólisis de la lactosa no se metaboliza y por tanto, la concentración molar de galactosa aumenta paralelamente a la reducción del contenido de lactosa.

Casi toda la glucosa se descompone via homofermentativa. *St. thermophilus* forma ácido L (+) láctico, mientras que *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, lo produce forma D(-). Ambos isómeros se encuentran aproximadamente en la misma cantidad. El yogurt contiene un 0,7-0,9% p/p (80-100 mM) de ácido láctico. También generan CO₂, ácido acético y etanol, pero en cantidades muy pequeñas (Walstra y col, 2001).



- ✓ **Acetaldehído (etanal).** Este compuesto es fundamental en el aroma característico del yogurt. La mayor parte de este compuesto esta sintetizado por los lactobacilos, principalmente de la treonina, que es un componente que se encuentra en baja concentración de forma natural en la leche. Además, en la proteólisis que se llevan a cabo los lactobacilos también se produce la

treonina. El contenido en acetaldehído del yogurt es de aproximadamente 10 mg/kg (0.2 mM) (Walstra y col., 2001).

- ✓ **Diacetilo** ($\text{CH}_3\cdot\text{CO}\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_3$). *St. Thermophilus* y en menor grado *lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, producen diacetilo por una vía que probablemente sea la misma que siguen los *leuconostoc* y *lactococcus* ssp. *Lactis biovar*. Las bacterias del yogurt no metabolizan el ácido cítrico y por tanto, el ácido pirúvico formado en la fermentación de la lactosa es el único precursor del diacetilo. El yogurt contiene entre 0,8 y 1,3 mg/kg (0,01-0,02 mM) de diacetilo (Walstra y col., 2001).

- ✓ **Polisacáridos**. Las bacterias del yogurt pueden formar una capa (pilosa) o glicocalix, que fundamentalmente son cadenas de polisacáridos constituidos por galactosa y otros glúcidos. Pueden secretarse parcialmente a la leche, en cuyo caso se denominan exopolisacaridos. Los polisacáridos desempeñan un papel importante en la consistencia del yogurt, sobre todo en los yogures batidos (Walstra y col., 2001).

Tabla 10. Producción de compuestos carbonilo (ppm) por los cultivos estándar del yogurt

| Microorganismo | Acetaldehído | Acetona | Acetoina | Diacetilo |
|------------------------|--------------|---------|-----------|-----------|
| <i>S. thermophilus</i> | 1,0-8,3 | 0,2-5,2 | 1,5-7,0 | 0,1-13 |
| <i>L. bulgaricus</i> | 1,4-12,2 | 0,3-3,2 | Traza-2,0 | 0,5-13 |
| Cultivos mixtos | 2,0-41 | 1,3-4,0 | 2,2-5,7 | 0,4-0,9 |

Referencia: Tamine y Robinson, 1991.

2.4.5. Propiedades dietéticas y nutritivas del yogurt

Los principales cambios químicos que afectan a los componentes del producto, están referidos a una disminución en el contenido de la lactosa y consecuente formación de ácido láctico, aumento en el contenido de péptidos y aminoácidos libres y cambios en las proporciones de los ácidos grasos y algunos cambios en el contenido de vitaminas (Jofre H., 1978).

✓ **Lactosa y ácido láctico:** En el caso de los productos lácteos fluidos fermentados, el nivel de lactosa presente en leche es reducido en un 20-30%, lo que convierte al producto en un alimento más aceptable en relación a la leche, en particular en aquellas personas que sufren de intolerancia a la lactosa. La galactosa es normalmente convertida a glucosa siendo utilizada como fuente de energía (FAO, 1983).

✓ **Proteínas:** La digestibilidad de los productos lácteos fermentados como el queso, yogurt, kéfir, leche acidófila y otros es aumentada en relación a aquella de la leche a partir de la cual fueron preparados. Este efecto es ocasionado por los siguientes fenómenos:

La formación de ácido láctico origina, a un determinado nivel, la precipitación de la caseína en finas partículas, las cuales son atacadas más fácilmente por enzimas digestivas presentes en el tracto en comparación con las partículas de caseína de mayor tamaño presentes en la leche no fermentada.

La fermentación de la leche trae consigo un significativo grado de hidrólisis de las proteínas. El consecuente aumento en el contenido de aminoácidos y péptidos favorece la acción de las enzimas digestivas, lo que se traduce en un

aumento del valor biológico y de la digestibilidad de las proteínas (Tamime, A. y Robinson R., 1985).

- ✓ **Materia grasa:** Las bacterias lácticas se caracterizan por poseer una actividad lipolítica restringida. Sin embargo, durante la elaboración y especialmente la maduración de productos fermentados, se manifiesta cierta actividad lipolítica atribuible a los cultivos lácticos empleados, que tiene como consecuencia una moderada liberación de ácidos grasos, lo cual afecta positivamente el valor nutricional del producto final (Anderson, 1968).

- ✓ **Minerales y vitaminas:** En los productos fermentados fluidos no ocurren prácticamente cambios en su contenido mineral en relación a la leche utilizada para su elaboración. Sin embargo, el calcio, fósforo y hierro tienen una mejor utilización, probablemente debido al efecto favorable del ácido láctico en la absorción de estos elementos (Tamime, A. y Robinson R., 1985).

2.4.6. Propiedades físico organolépticas

Entre las características de los productos lácteos fermentados que influyen sobre su aceptación entre los consumidores, se encuentran el sabor, olor, textura y consistencia (FAO, 1983).

La bebida láctea se distingue por un sabor típico y agradable por la presencia de suficientes cantidades de compuestos como diacetilo y acetaldehído y en menor grado a un adecuado balance de ácidos grasos volátiles (FIL-IDF., 1988).



Algunas propiedades físicas como consistencia, viscosidad y textura contribuyen a determinar el grado de aceptación visual del producto y cuando éste toma contacto con el paladar. Así, el yogurt afluado debe poseer una consistencia de tipo firme, sin presentar escurrimiento, en tanto el yogurt batido debe presentar un coágulo suave, sin evidencia de granulosidades y exhibir adecuada viscosidad o resistencia al escurrimiento. Una textura cerrada, característica de ausencia de gas y exclusión de suero en la superficie del envase, son propiedades deseables (Tamime, A. y Robinson R., 1985).

2.4.7. Capacidad de conservación

El ácido láctico producido en la leche a partir de la lactosa por acción de los cultivos lácticos previene el crecimiento de muchas otras especies de bacterias, especialmente putrefactivas, debido a la intolerancia de éstas frente a la acidez. De este modo, el ácido láctico actúa como un preservante, prolongando el periodo de conservación de los productos fermentados. No obstante lo anterior, la elaboración de productos fermentados requiere del cumplimiento de estrictas normas de higiene, con el fin de minimizar cualquier tipo de contaminación, especialmente de hongos y levaduras, en consideración a que estos microorganismos se desarrollan en medios ácidos (Tamime y Robinson, 1985).



III. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de Procesamiento de Productos Agroindustriales, Química y Microbiología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales de ensayo

- Termómetro rango de medición -10 °C hasta 132 °C
- Lactodensímetro quevemne
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 1000 mL
- Placas petri
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 ml
- Pipetas volumétricas de 25 y 50 mL
- Probetas volumétricas de 10, 20, 50 y 100 mL
- Matraces erlenmeyer de 100, 250 y 500 mL
- Fiolas de 100, 250 y 500 ml.
- Matraces de kitasato de 500, 1000 mL
- Baguetas, pinzas
- Crisoles
- Desecador
- Balones de kjeldahl de 100 mL
- Balones de soxhlet de 250 mL
- Embudos de vidrio y porcelana



3.1.2. Reactivos

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a
- Sulfato cúprico pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) p.a
- Sulfato de potasio (K_2SO_4) p.a
- Hidróxido de sodio (NaOH) p.a
- Alcohol etílico (Etanol) (C_2H_6O) 96 °
- Indicador fenoftaleina ($C_{20}H_{14}O_4$) p.a
- Indicador rojo de metilo
- Éter etílico p.a
- Ácido sulfúrico 0.1 N
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Agua destilada

3.1.3. Equipos

- Kjeldahl, marca: Velp Scientifica, modelo: UDK126D
- Soxhlet
- Mufla, marca: Barnstead Thermolyne, modelo: FB1410M, rango de temperatura de 0 – 1100 °C
- Estufa, marca: Memmert, modelo: 200-800, rango de temperatura 30 – 250 °C
- Centrifuga de Gerber
- Viscosímetro rotacional, marca: H W.Kessel, modelo: ST – 2001.
- Balanza analítica, marca: Ohaus, con sensibilidad de 0,0001 g ; máximo de 210 g.



- Potenciómetro, marca: SCHOTT, modelo: Postfach 2480'D con rango de medición -2,0 hasta 19,99
- Bureta semiautomática
- Bomba de filtración a vacío

3.1.4. Maquinarias

- Refrigeradora comercial
- Incubadora
- Molino de disco
- Selladora de bolsas (capacidad de 50 cm de largo con doble sellado)
- Balanza eléctrica capacidad de 200 kg
- Autoclave

3.1.5. Medios de cultivo

- Agar Lactosado con Bilis al Cristal Violeta y Rojo Neutro (VRBL)
- Agar Glucosa y Cloranfenicol (CGA)

3.1.6. Utensilios

- Ollas
- Cocina industrial
- Balón de gas
- Baldes de 5 litros para la incubación
- Telas para la filtración
- Bolsas de polietileno capacidad de 5 kg para harina de kiwicha
- Envases de 1/2 y 1 litro para el envasado de producto terminado
- Envases para el envase de medio de cultivo

- Cucharones para batir
- Balanza comercial capacidad de 1250 g

3.1.7. Indumentaria

- Guantes
- Mandil
- Gorra
- Barbijo
- Botas

3.2. Métodos de análisis

3.2.1. Análisis químico proximal de harina de kiwicha

El análisis proximal de la harina de kiwicha, se determinó según los métodos oficiales de análisis AOAC y NTP, en el Laboratorio de Química de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

- Humedad: Método 209.264 (NTP – 2001)
- Proteína micro kjeldahl: Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)
- Grasa – Soxhlet: Método 31.4.02 (A.O.A.C, 2000).
- Cenizas: Método 209.265 (NTP – 2001)
- Fibra cruda: Método 7.073 (A.O.A.C. 1984)
- Carbohidratos: Diferencia de la composición % de humedad, ceniza, proteína, grasa y fibra bruta.

NOTA: Los procedimientos de los métodos se detallan en el apéndice 01.

3.2.2. Análisis químico proximal de leche fresca

Se realizó de acuerdo al método descrito por la NTP 2001 y AOAC 2000 – 2001, en el Laboratorio de Química de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

- Humedad: Método 209.264 (NTP – 2001)
- Proteína micro kjeldahl: Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)
- Grasa: Método Gerber
- Cenizas: Método 209.265 (NTP – 2001)
- Carbohidratos: Diferencia de la composición % de humedad, ceniza, proteína y grasa.

NOTA: Los procedimientos de los métodos se detallan en el apéndice 02.

3.2.3. Análisis físicos de leche fresca

Los análisis se efectuaron en el Laboratorio de Química y Procesamiento de Productos Agroindustriales de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

- **Densidad.-** Se determino directamente utilizando el lactodensímetro quevenne a 20 °C.
- **pH.-** Para realizar esta medición se usó el potenciómetro digital marca SCHOTT, el cual fue calibrado previamente con buffer a pH = 4,0 y pH = 7,0. El valor se obtuvo introduciendo directamente el electrodo dentro de la muestra.



- **Acidez Titulable.**- Se determinó de acuerdo al método 16.023 (A.O.A.C., 1984). Basado en una titulación con NaOH 0.1 N. Se mide 9 ml de leche fresca en un vaso precipitado de 100 mL, se incorporaron tres gotas de fenolftaleína al 1% y se titula con NaOH 0.1 N, hasta obtener una coloración rosada. La acidez se expresa como porcentaje de ácido láctico, teniendo la siguiente relación:

$$\% \text{ Acidez Titulable} = \frac{G * N * 0.09}{V} * 100$$

Donde:

G: gasto de NaOH, N: normalidad de NaOH 0.1N

V: Volumen tomado de la muestra.

3.2.4. Análisis fisicoquímico de extracto de kiwicha

- **pH.**- Se determinó con el potenciómetro digital marca SCHOTT.
- **Acidez.**- En las muestras se realizó por titulación utilizando el NaOH 0,1 N hasta neutralizar el exceso de ácido en presencia de un indicador fenolftaleína que presenta una coloración rosada a pH neutro, para luego expresar el gasto de mL NaOH 0,1 N a °Dornic, (1 mL de NaOH equivalente a 10 °D).
- El color se evaluó mediante la observación visual y el sabor por análisis organoléptico.
- Los análisis químicos se determinó con los mismos métodos descritos para la leche fresca con excepción de grasa que se efectuó aplicando el método de Soxhlet.



3.2.5. Análisis fisicoquímico del yogurt

- **pH.-** Se determinó con el potenciómetro digital marca SCHOTT.
- **Acidez.-** Se determinó de acuerdo al método 16.023 (A.O.A.C., 1984). Basado en una titulación con NaOH 0,1 N. Se pesa aproximadamente 5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, posteriormente se añadió agua destilada y se agitó vigorosamente, se incorporaron tres gotas de fenolftaleína al 1% y se tituló con NaOH 0,1 N, hasta obtener una coloración rosada. La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico, teniendo la siguiente relación: (1mL de NaOH 0,1N = 0,009 g de ácido láctico).

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(\text{mL de NaOH}) * (\text{Normalidad de NaOH}) * 9}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

- **Densidad.-** La medición de esta propiedad, se realizó a través del un método gravimétrico, empleando picnómetros a temperatura de 20 °C, donde se pesan el picnómetro vacío, el picnómetro con agua destilada y el picnómetro con yogurt.

La densidad se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\rho_{\text{yogurt}} = \frac{\text{peso (picnómetro vacío + yogurt)} - \text{peso (picnómetro vacío)}}{\text{peso (picnómetro vacío + agua)} - \text{peso (picnómetro vacío)}}$$

- **Viscosidad.-** La evaluación de esta propiedad física se efectuó utilizando el viscosímetro rotacional modelo: ST – 2001, a 60 rpm con SD: L₃ en todas las muestras de yogurt, los valores obtenidos de (cps) se expresaron posteriormente en Pa's para facilitar los resultados que se muestran más adelante.

- **Análisis químico.-** Se realizó de acuerdo al método descrito por la NTP 2001 y AOAC 2000 – 2001.
 - ✓ Humedad: Método 209.264 (NTP – 2001)
 - ✓ Proteína micro kjeldahl: Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)
 - ✓ Grasa: Método Gerber
 - ✓ Cenizas: Método 209.265 (NTP – 2001)
 - ✓ Fibra: Método 7.073 (A.O.A.C. 1984)
 - ✓ Carbohidratos: Diferencia de la composición % de humedad, ceniza, proteína, grasa y fibra.

NOTA: Los procedimientos de los métodos se detallan en el apéndice 03.

3.2.6. Análisis microbiológico de yogurt

El análisis microbiológico se determinó en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Para ello se tomó como base los requisitos microbiológicos estipulados por la norma técnica peruana, NTP 209: 038: 2003, (criterios microbiológicos para leches fermentadas) la norma exige determinar siempre los siguientes microorganismos: coliformes totales, levaduras y mohos, esta determinación se realizó aplicando el ISO 4832 julio 1991 para coliformes y según la norma XFV 08-059 Noviembre 1995 para levaduras y mohos.

Nota: Los procedimientos para este ensayo se describen en el apéndice 04.



3.3. Metodología experimental

3.3.1. Materia prima

- La kiwicha variedad INIA-414 Taray, fue adquirida del distrito de Curahuasi de la Provincia de Abancay.
- La leche fresca, se tomó de la planta lechera de FONDEGAB de la Provincia de Abancay.

3.3.2. Obtención de harina de kiwicha

Antes de realizar los procesos de investigación, se procedió la obtención de harina de kiwicha para cuantificar los análisis físicoquímicos, estos procesos se realizaron en la Empresa Agroindustrial el Tambo E.I.R.L.

- **Limpieza de kiwicha.-** Se realizó manualmente sobre la mesa, eliminando los materiales extraños como piedras, palitos, restos de otras plantas que generalmente presenta la materia prima.
- **Molienda.-** Esta operación se efectuó en molino de disco.
- **Empacado y sellado.-** Se empaco manualmente, el sellado se realizó en una selladora manual de doble selle, en bolsas de polietileno de alta densidad.
- **Almacenado.-** Se almacenó a temperatura ambiente, en un lugar seco y seguro, hasta su utilización para la elaboración de yogurt.

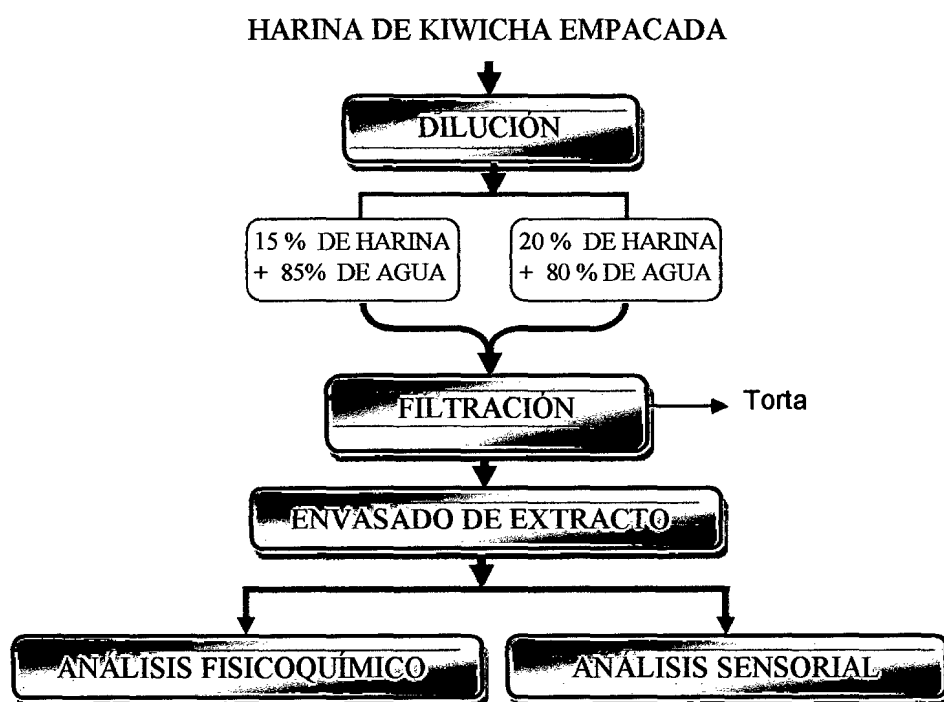
3.3.3. Obtención de extracto de kiwicha

Esta etapa y los posteriores se efectuaron en el Laboratorio de Procesamiento de Productos Agroindustriales de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.



- **Dilución.-** En esta etapa del proceso se estudió una variable para la investigación, donde se realizó la formulación a diferentes proporciones entre (harina de kiwicha: agua hervida tibia).
- **Filtración.-** Esta operación se realizó utilizando una tela fina de color blanca, el extracto de color blanco similar a la leche, se obtiene, ejerciendo una presión a través de la tela con la mano. El extracto se envasa en frascos de botella y se procede a análisis químico proximal.

Figura 19. Diagrama de bloques para la obtención de extracto de kiwicha

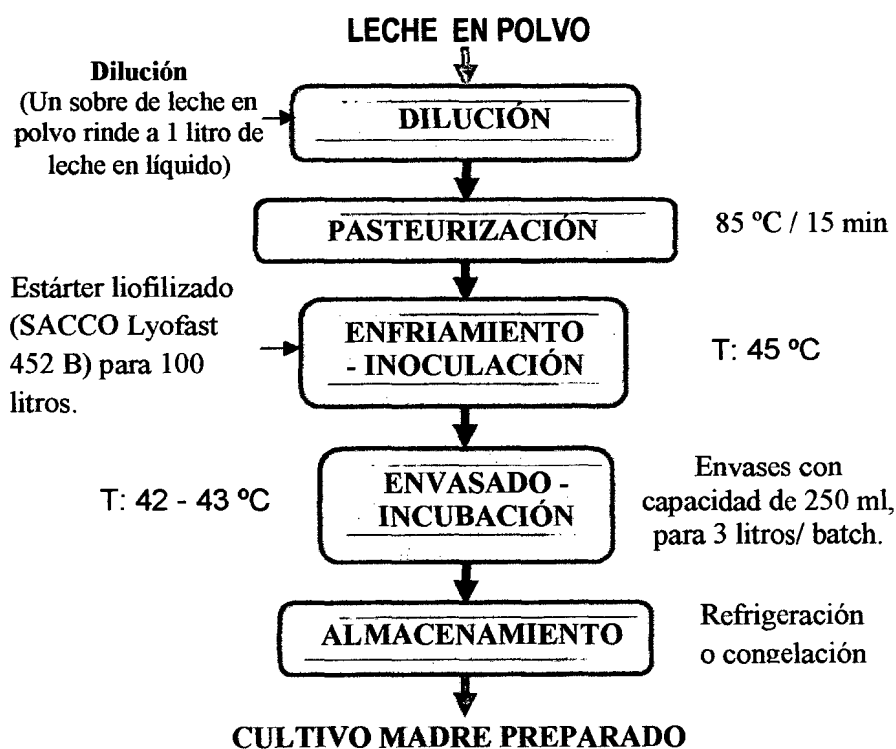


3.3.4. Preparación del cultivo madre

Para la preparación del cultivo madre, se utilizó el cultivo liofilizado comercial marca (SACCO Lyofast 452 B), para ello se procedió según el flujograma descrito en la figura 20.

- **Dilución.-** Se disuelve 1 sobre de leche en polvo descremada de 120 gramos en un litro de agua hervida tibia. Se utiliza leche en polvo descremada por estar exenta de microorganismos patógenos.
- **Pasteurización.-** Esta operación se efectuó en una olla de aluminio, sometiendo a un tratamiento térmico la leche a una temperatura de 85 °C por 15 minutos.
- **Enfriamiento e inoculación.-** Se enfrió hasta una temperatura de 45 °C y se inoculó rápidamente el estárter liofilizado (SACCO Lyofast 452 B).
- **Envasado e incubación.-** Un sobre de starter rinde a 100 litros, para elaborar en pequeñas cantidades, el cultivo preparado se envasó en envases de 250 ml para elaborar 03 litros/ batch, inmediatamente se incubó a temperatura de 43 °C por 2,5 - 3 horas; para que la relación de cocos: bacilos sea (1:1).

Figura 20. Diagrama de bloques para la elaboración de cultivo madre



- **Almacenamiento.-** El cultivo madre preparado se refrigeró a 5 – 7 °C, para no activar las bacterias lácticas hasta el momento de su utilización. Si se quiere almacenar el cultivo por semanas o meses, se recomienda su congelación.

3.3.5. Evaluación de la fermentabilidad de las bacterias lácticas

Antes de realizar el procesamiento final, se evaluó la fermentabilidad de las bacterias lácticas, tomando 150 mL de muestra cada una hora, para determinar la producción de ácido láctico, pH y el comportamiento de la viscosidad en función al tiempo durante la fermentación en el proceso de incubación, los cuales determinan la aceptabilidad del producto terminado.

- La acidez se determinó por titulación con NaOH 0,1 N, expresado en porcentaje de ácido láctico.
- El pH se determinó, con el potenciómetro modelo Posfach 2480.D marca SCHOTT y la viscosidad con el viscosímetro rotacional modelo ST-2001.

3.3.6. Obtención de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha

Esta etapa de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Procesamiento de Productos Agroindustriales de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la UNAMBA, las operaciones unitarias se aplicó teniendo como base, el proceso de la elaboración de yogurt con base en una mezcla de leche y extracto estéril de garbanzo propuesto por (Morales de León J. y col, 1999). Los

procesos para este trabajo se efectuaron, siguiendo el flujograma descrito en la figura 21.

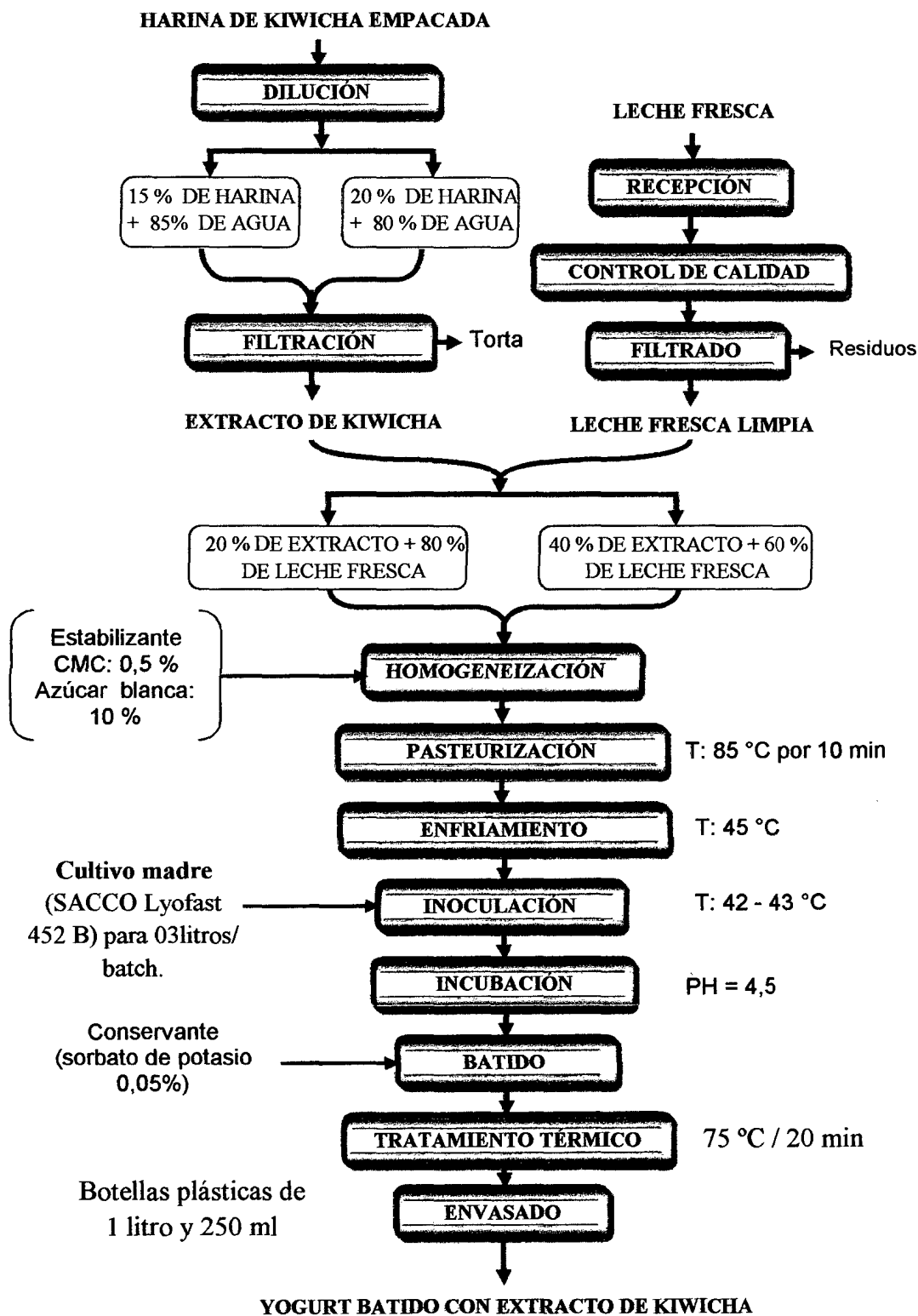
- **Materia prima e insumos**
 - Leche fresca y extracto de kiwicha
 - Azúcar blanca refinada
 - Leche en polvo
 - Cultivo láctico (SACCO LYOFAST)
 - Estabilizante (CMC)
 - Conservante (sorbato de potasio)
- **Recepción y control de calidad.-** En esta etapa del proceso se determinó la calidad de la leche fresca, mediante los análisis fisicoquímicos de Acidez, pH y densidad regulando la temperatura a 20 °C.
- **Filtración de leche fresca.-** Se filtro la leche con la ayuda de una tela especial para eliminar pelos, impurezas macroscópicas, etc.
- **Pasteurización.-** La leche fresca y el extracto se somete al tratamiento térmico a una temperatura de 85 °C por 10 minutos, para destruir los microorganismos patógenos. Este proceso se desarrolló en ollas de aluminio mediante agitación continua, donde también se adicionó el estabilizante CMC y azúcar blanca, previamente homogeneizada.
- **Enfriamiento.-** Se enfrió rápidamente hasta 45 °C.
- **Inoculación.-** Se adicionó el cultivo madre preparado, y se agitó cuidadosamente.



- **Incubación.-** Se efectuó en una incubadora de material diseñado con tecnopor, controlando la temperatura de 42 a 43 °C por un tiempo de 4 - 4,5 horas, realizado la inoculación con cultivo madre preparado y también se determinó un tiempo de 6,0 - 6,5 inoculado con siembra directa de cultivo láctico, hasta que el pH de yogurt alcance un valor de 4,5. La acidez del yogurt con extracto de kiwicha alcanzó hasta 0,60 % de ácido láctico, mientras que el patrón presentó un valor de 0,84 %. El proceso para elaborar el yogurt patrón o control de referencia, se efectuó utilizando leche fresca entera, azúcar, estabilizante y conservante; bajo las mismas condiciones establecidas para los tratamientos de la investigación.
- **Batido.-** El yogurt se homogeneizó cuidadosamente y se adicionó el conservante sorbato de potasio.
- **Tratamiento térmico o segundo pasteurización.-** Se realizó en una olla a una temperatura de 75 °C por un tiempo de 20 minutos, mediante una ligera agitación continua.
- **Envasado.-** El producto terminado se envasó rápidamente por hexausting en botellas plásticas de yogurt de 250 ml y de 1 litro, a una temperatura de 60-65 °C y se enfrió en un baño de agua fría para evitar la deformación del envase.
- **Empaquetado y almacenamiento.-** El yogurt se almacenó en las siguientes condiciones: Almacenamiento a temperatura ambiente, la temperatura del almacén varió de 18 °C hasta 22 °C, con una humedad relativa de 70 % hasta 65% respectivamente. Almacenamiento bajo temperatura de refrigeración a 5 ± 2 °C, en refrigeradora comercial marca Coldex.



Figura 21. Diagrama de bloques del proceso de obtención de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha.



3.3.7. Evaluación de análisis sensorial

La evaluación sensorial de las muestras del yogurt obtenido se efectuó aplicando el análisis sensorial orientado hacia el producto, que son: análisis discriminativos para determinar diferencias entre las muestras con respecto al patrón, descriptivos para categorizar entre todos los tratamientos, mediante jueces para análisis discriminativos sencillos.

La degustación de las muestras se realizó, con 25 jueces no entrenados previamente adiestrados en la técnica a emplearse en la evaluación sensorial, los jueces fueron los estudiantes regulares y 06 estudiantes egresados de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, que pertenecen al tipo de juez para análisis discriminativos sencillos.

En este tipo de evaluación sensorial, los datos numéricos que representan nombres posicionados según una escala adimensionada, se presentan a los jueces en una hoja para la evaluación del producto y su calificación, a través de los cuales se obtienen nuevos datos para realizar su tratamiento estadístico, el cual facilita la evaluación de determinados respuestas que se desea obtener.

Para esta investigación se aplicó la primera etapa de optimización (SCREENING), reportando los resultados en superficie respuesta, para determinar cuál de los variables presenta mejores resultados y así obtener el producto óptimo para su posterior estudio de la evaluación de vida útil. Las técnicas utilizadas se presentan en las siguientes tablas:



Tabla 11. Escala hedónica de la evaluación sensorial para los atributos de color, sabor y aceptabilidad en general según análisis descriptivos para categorizar las muestras

| Aceptabilidad General | |
|------------------------------|--------------------------|
| Puntaje | Escala |
| 7 | Me agrada muchísimo |
| 6 | Me agrada mucho |
| 5 | Me agrada poco |
| 4 | Ni me gusta ni me agrada |
| 3 | Me desagrada poco |
| 2 | Me desagrada mucho |
| 1 | Me desagrada muchísimo |

| Sabor | |
|----------------|-------------------------------|
| Puntaje | Escala |
| 5 | Extremadamente Característico |
| 4 | Muy Característico |
| 3 | Característico |
| 2 | Poco Característico |
| 1 | Nada Característico |

| Color | |
|----------------|-------------------------|
| Puntaje | Escala |
| 5 | Homogeneo |
| 4 | Poco homogeneo |
| 3 | Disperso con partículas |
| 2 | Oscuro |
| 1 | Sin color |

Tabla 12. Escala hedónica adimensionada de la evaluación sensorial para aceptabilidad en general, según análisis discriminativo para comparar las muestras con respecto al patrón

| Escala 1 | Clasificación de Muestras |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Me agrada más que P | |
| Me agrada igual que P | |
| Me agrada menos que P | |
| Escala 2 | Clasificación de muestras que son más o menos agradables que "P" |
| Extremadamente diferente | |
| Muy diferente | |
| Moderadamente diferente | |
| Ligeramente diferente | |

Las ponderaciones se califican como sigue:

- Cuando el juez indica que no hay diferencias entre las muestras y el patrón, se le asigna a dicha muestra la calificación de 5.
- Si el juez califica que la muestra es más agradable que el patrón se dará a la muestra una calificación entre 6 y 9 puntos.
- Si el juez califica que la muestra es menos agradable que el patrón se dará a la muestra una calificación entre 1 y 4 puntos.

| Escala | Puntaje 1 (si es más agradable que patrón) | Puntaje 2 (si es menos agradable que patrón) |
|--------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Extremadamente diferente | 9 | 1 |
| Muy diferente | 8 | 2 |
| Moderadamente diferente | 7 | 3 |
| Ligeramente diferente | 6 | 4 |

3.3.8. Determinación de análisis químico proximal de yogurt

La cuantificación de análisis químico proximal, se realizó aplicando la técnica descrita por la AOAC - 1984, 2000 y NTP-2001. Los procedimientos se presentan en el apéndice 03.

3.3.9. Determinación de la vida útil del producto

La determinación de la vida útil del producto, se realizó a través de análisis fisicoquímico, microbiológico y evaluación organoléptica. Los productos se almacenaron en dos diferentes condiciones: Bajo refrigeración a una temperatura de 5 ± 2 °C y el segundo a temperatura ambiente que varió de 20 ± 2 °C.

Los análisis fisicoquímicos se realizaron evaluando la acidez, pH y viscosidad respectivamente. En el análisis microbiológico, se determinó los siguientes microorganismos: coliformes totales, levaduras y mohos. Por otra parte el análisis organoléptico, se efectuó evaluando el olor, color, sabor y aceptabilidad en general.

3.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando la media aritmética. Además se aplicó el diseño experimental de primer orden con superficie de respuesta, para en el análisis sensorial con 25 panelistas, utilizando el diseño factorial de (2x2), por otro lado; se aplicó el análisis de varianza a cada tratamiento de los yogures, con un nivel de confianza de 95 % para ver si existen diferencias significativas entre la cantidad de dilución de harina de kiwicha en agua y la cantidad de sustitución del extracto en leche fresca, sobre las variables

dependientes que son: % de proteína, % de grasa y % de carbohidratos en los yogurts.

Para el procesamiento y análisis de los datos se utilizó el programa de Software STATISTICA versión 7.0, que permite reportar los resultados con un manejo sencillo y alta precisión.

3.4.1. Diseño factorial

Se realizó, con un diseño factorial de 2x2 con tres repeticiones para todos los tratamientos. Además se elaboró el control de referencia con tres replicas, para comparar con los tratamientos en las evaluaciones.

| Variables | Niveles | | | | control |
|--------------------------------|---------|----|----|----|--------------|
| | 15 | | 20 | | |
| 1. Dilución de harina (%) | | | | | Leche fresca |
| 2. Sustitución de extracto (%) | 20 | 40 | 20 | 40 | |
| N: Número de tratamientos | T1 | T2 | T3 | T4 | P |
| r: Número de repeticiones | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

T1: Tratamiento uno (15% de dilución de harina de kiwicha en agua y 20% de sustitución de extracto en leche fresca)

T2: Tratamiento dos (15% de dilución de harina de kiwicha en agua y 40% de sustitución de extracto en leche fresca)

T3: Tratamiento tres (20% de dilución de harina de kiwicha en agua y 20% de sustitución de extracto en leche fresca)

T4: Tratamiento cuatro (20% de dilución de harina de kiwicha en agua y 40% de sustitución de extracto en leche fresca)

P: Patrón o control de referencia.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de análisis fisicoquímico de la materia prima

Tabla 13. Composición química de harina de kiwicha variedad INIA-414 Taray y leche fresca entera (en % base húmeda)

| Composición química | Harina de kiwicha | Leche fresca entera |
|---------------------|-------------------|---------------------|
| Energía Kcal | 396,504 | 97,102 |
| Agua | 6,9362 ± 0,720 | 87,2029 ± 0,254 |
| Proteína * | 14,3554 ± 0,186 | 3,3507 ± 0,238 |
| Grasa | 6,6613 ± 0,023 | 3,6200 ± 0,040 |
| Carbohidratos | 66,4597 ± 0,062 | 5,0283 ± 0,054 |
| Fibra | 3,5452 ± 0,031 | - |
| Cenizas | 2,0422 ± 0,032 | 0,7981 ± 0,008 |

* Nitrógeno x 6,25 para kiwicha; Nitrógeno x 6,38 para leche

Según Nieto (1990), la composición química de los *amaranthus spp.* tienen: proteína 12-19 %, grasa 6,1-8,1 % y carbohidratos 71,8 % respectivamente. En el presente trabajo de investigación, la kiwicha (*Amaranthus caudatus*) variedad INIA-414 taray, presentó dentro de estos rangos como se observa en la tabla 13. Sin embargo, según Tapia Blácido (2005), la harina de kiwicha está compuesta por 74 % de almidón (7,58 % ± 0,40 de amilosa y aproximadamente 67 % de amilopectina); 8,93 % ± 0,03 de lípidos; 14,21 % ± 0,77 de proteína; 7,97 % ± 0,18 de agua y 2,14 % ± 0,03 de cenizas respectivamente. Según los datos observados existen diferencia en el contenido de carbohidratos, esto se debe a la variedad de la kiwicha utilizada.

La composición de leche fresca y sus derivados han sido ampliamente estudiadas por distintos autores, según Mahaut Michel y col. (2004), se tiene 3,4 % de proteína; 3,7 % de grasa; 4,8 % de carbohidratos y 0,7 % de minerales. Mientras que Vicente (2001), reportó 3,3 % de proteína; 3,6 % de grasa y 4,8 % de hidratos de carbono.

Por otro lado Tamine y Robinson (1991), citan 3,48 % de proteínas; 3,98 % de grasa; 4,77 % de glúcidos; 0,75 % de minerales y 87,02 % de agua respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación fueron: 3,3507 % \pm 0,238 de proteína; 3,6200 % \pm 0,040 de grasa; 5,0283 % \pm 0,054 de carbohidratos y 0,7981 % \pm 0,008 de cenizas respectivamente. Esta diferencia pequeña de la composición, se debe a que la leche fresca fue obtenida de la planta lechera de FONDEGAB, donde esta conforma una mezcla de diferentes razas y de varios productores.

En la tabla 14, se detalla los resultados de análisis fisicoquímicos determinados de la leche fresca para la investigación, estos valores se encuentran dentro de límite permitido por Norma Técnica Peruana NTP 202.001: 2003 (Leche y productos lácteos). Leche cruda – Requisitos. 4^{ta} edición, que es mínimo de 1,0296 y máximo de 1,034 g/cm³ con respecto a la densidad. Por otro lado, según Walstra y col. (2001), la densidad depende de la temperatura y de su composición química, así para leche fresca entera a 20 °C es de aproximadamente 1,030 Kg/m³.



Tabla 14. Análisis fisicoquímico de leche fresca entera

| Características fisicoquímicas | Valores |
|---------------------------------------------------------------|----------------|
| pH | 6,80 |
| Densidad a 20 °C (g / ml) | 1,030 |
| % de Acidez, expresado en g de ácido láctico / 100 g de leche | 0,17 |
| % sólidos totales | 12,7971 |

La acidez de leche fresca según la Norma Técnica Peruana NTP 202.001: 2003. (Leche y productos lácteos). Leche cruda – Requisitos. 4^{ta} Edición, está dado como mínimo de 0,14 % y máximo hasta 0,18 %; en este trabajo realizado se determinó 0,17 %. Los sólidos totales de la leche fue 12,7971 %; esta propiedad según la norma técnica peruana, como mínimo es 11,4 % en la leche fresca entera. Según estos resultados la leche fresca analizada, tiene las características fisicoquímicas adecuadas para su transformación en sus derivados, especialmente para el yogurt tipo batido.

Según los resultados de la tabla 15, el pH de extracto obtenido, con una dilución de 15 % de harina de kiwicha en agua fue de 6,70 y el extracto de una dilución de 20 % de harina de kiwicha en agua es 6,64; los valores son similares que la leche fresca, esto se debe porque sus componentes constituyentes son también similares al de la leche fresca, pero que existe diferencia en cuanto a valor de acidez, según a la cantidad de la dilución de harina. En cuanto al contenido de sólidos totales el extracto tiene valores inferiores que la leche fresca,

esta diferencia se debe a que durante la etapa de filtración del extracto, se utilizó una tela con diámetro muy fina, en donde esta; solo permitió el paso de las moléculas más pequeñas.

Tabla 15: Características físicas y sensoriales de extracto de kiwicha

| Características físicas y sensoriales | Dilución (%) (Harina de kiwicha filtrada : Agua) | |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|
| | (15 : 85) | (20 : 80) |
| | Extracto al 15% | Extracto al 20% |
| pH | 6,70 | 6,64 |
| Acidez (° Dornic) | 5,0 | 8,0 |
| % Sólidos totales | 6,1921 | 8,0463 |
| Color | Blanco | Blanco |
| Sabor | Ligeramente a kiwicha | Ligeramente a kiwicha |

La composición nutricional del extracto de kiwicha al 15 %, fue 93,8079 % \pm 0,05 de agua; 1,5103 \pm 0,08 % de proteína; 1,6200 % \pm 0,09 de grasa; 2,9043 % \pm 0,04 de carbohidratos; 0,0501 % \pm 0,02 de fibra y 0,1074 % \pm 0,02 de cenizas respectivamente. Mientras que para el extracto de kiwicha al 20 % fue 91,9537 % \pm 0,03 de agua; 1,6034 % \pm 0,10 de proteína; 1,6800 % \pm 0,08 de grasa; 4,5824 % \pm 0,06 de carbohidratos; 0,0623 % \pm 0,03 de fibra; 0,1182 % \pm 0,02 de cenizas.

La formulación, con una dilución de 20 % de harina de kiwicha en agua (extracto al 20 %), presenta datos similares en cuanto a grasa y sólidos totales a licuado o

extracto de soja reportado por Cruz Cansino N. (2008), que tiene $3,82 \% \pm 0,02$ de proteína; $1,78 \% \pm 0,016$ de grasa; $1,86 \% \pm 0,30$ de carbohidratos; $0,68 \pm 0,15$ de cenizas y $8,27 \pm 0,40$ de extracto seco. Esta diferencia se debe a que la soja es una leguminosa rica en proteína, mientras que la kiwicha es un pseudocereal rico en almidón.

Tabla 16. Composición química de extracto de kiwicha (% base húmeda)

| Composición química | Dilución (%) | |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| | (Harina de kiwicha filtrada : Agua) | |
| | (15 : 85) Extracto al 15% | (20 : 80) Extracto al 20% |
| Energía Kcal | 32,8193 | 40,7796 |
| Agua | 93,8079 \pm 0,05 | 91,9537 \pm 0,03 |
| Proteína | 1,5103 \pm 0,08 | 1,6034 \pm 0,10 |
| Grasa | 1,6200 \pm 0,09 | 1,6800 \pm 0,08 |
| Carbohidratos | 2,9043 \pm 0,04 | 4,5824 \pm 0,06 |
| Fibra | 0,0501 \pm 0,02 | 0,0623 \pm 0,03 |
| Cenizas | 0,1074 \pm 0,02 | 0,1182 \pm 0,02 |

El bajo contenido en proteína en ambas formulaciones, se debe a que la mayoría de los aminoácidos de kiwicha son hidrofóbicos, es decir son poco solubles en agua, además este producto presenta ciertos compuestos como taninos que forman complejos, los cuales hacen que el producto tenga un rendimiento bajo en contenido proteico.

Tabla 17. Composición química de la mezcla entre extracto de kiwicha al 15 % y leche fresca (en % base húmeda)

| Composición química | Sustitución de extracto (%) | |
|---------------------|---------------------------------------------|---------------|
| | (Extracto de kiwicha al 15% : Leche fresca) | |
| | (20 % : 80 %) | (40 % : 60 %) |
| Energía Kcal | 84,2455 | 71,3889 |
| Agua | 88,5239 | 89,8449 |
| Proteína | 2,9826 | 2,6145 |
| Grasa | 3,2200 | 2,8200 |
| Carbohidratos | 4,6035 | 4,1787 |
| Fibra | 0,0100 | 0,0200 |
| Cenizas | 0,6600 | 0,5218 |
| % Sólidos totales | 11,4761 | 10,1551 |

En las tablas 17 y 18, se presentan las formulaciones cuantitativas de la mezcla entre extracto de kiwicha filtrada y leche fresca entera.

Según la Norma Técnica Peruana, para la obtención de un yogurt batido, el porcentaje de sólidos totales como mínimo es 11,4 % y 3,2 % de grasa en leche fresca entera. Así para la primera sustitución en dos concentraciones, se tiene un valor de 11, 4761 % S.T. (20 % de extracto: 80 % de leche fresca) y 10,1551 % de sólidos totales de (40 % de extracto: 60 % de leche fresca) respectivamente. Mientras que para la segunda sustitución, ver tabla 18 se tiene 11,8469 % de sólidos totales para (20 % de extracto: 80 % de leche fresca) y 10,8969 % de sólidos totales para (40 % de extracto: 60 % de leche fresca) respectivamente.

Según esta mezcla, se tiene que solamente las primeras formulaciones del porcentaje de sustitución de extracto en leche en ambos casos, cumplen con los valores establecidos por Norma Técnica Peruana.

Tabla 18. Composición química de la mezcla entre extracto de kiwicha al 20 % y leche fresca (en % base húmeda)

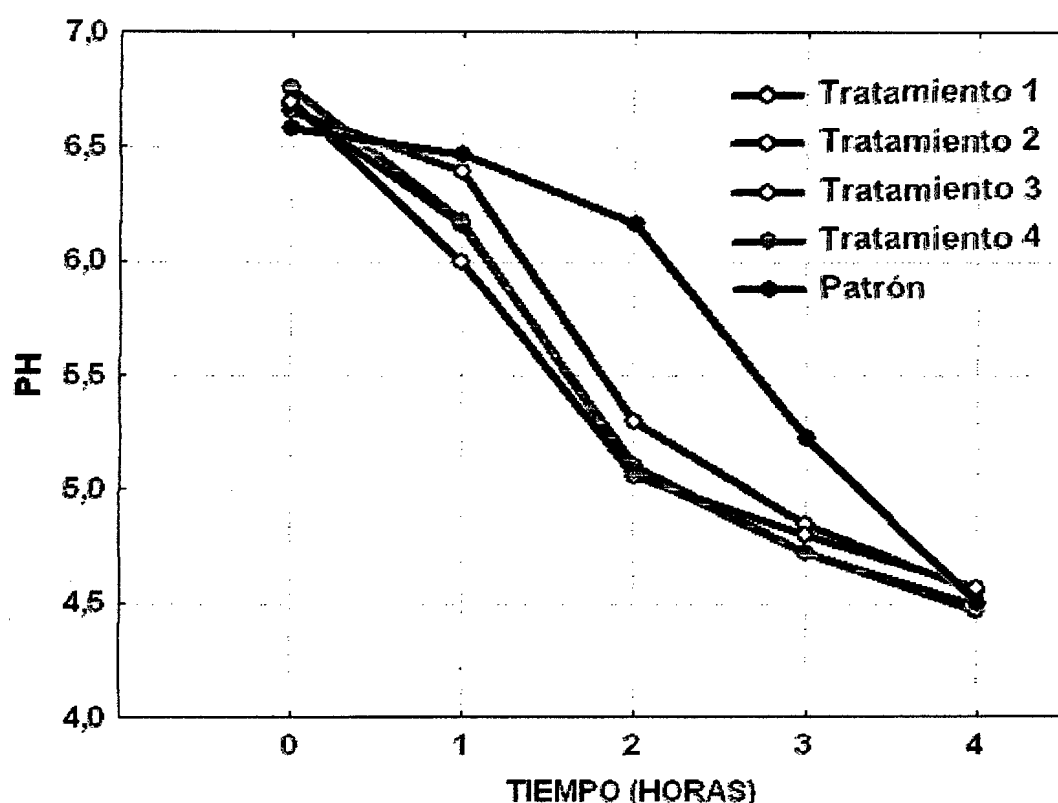
| Composición química | Sustitución de extracto (%) | |
|---------------------|--------------------------------------|---------------|
| | (Extracto de kiwicha + Leche fresca) | |
| | (20 % : 80 %) | (40 % : 60 %) |
| Energía Kcal | 85,8375 | 74,5731 |
| Agua | 88,1531 | 89,1032 |
| Proteína | 3,0012 | 2,6518 |
| Grasa | 3,2320 | 2,8440 |
| Carbohidratos | 4,9391 | 4,8499 |
| Fibra | 0,0125 | 0,0249 |
| Cenizas | 0,6621 | 0,5261 |
| % Sólidos totales | 11,8469 | 10,8968 |

4.2. Resultados de la evaluación de cinética de fermentación

En esta etapa de investigación, se estudió sobre la cinética de fermentación, porque la leche fresca ha sido sustituida parcialmente con nuevo producto, para ello; se evaluó la formación de ácido láctico y el comportamiento de pH en los diferentes tratamientos de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche

fresca con extracto de kiwicha, en función al tiempo. Esta evaluación se realizó en cada hora, durante la fermentación en el proceso de incubado a una temperatura de 42 – 43 °C, inoculado con 3 % de cultivo mixto de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* realizado la siembra con medio de cultivo previamente preparado.

Figura 22. Comportamiento de pH en función al tiempo en los tratamientos y el patrón durante la fermentación.



Donde:

Tratamiento 1: Muestra formulada con 15 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 20 % de sustitución de extracto en leche fresca.

Tratamiento 2: Muestra formulada con 15 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 40 % de sustitución de extracto en leche fresca.

Tratamiento 3: Muestra formulada con 20 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 20 % de sustitución de extracto en leche fresca.

Tratamiento 4: Muestra formulada con 20 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 40 % de sustitución de extracto en leche fresca.

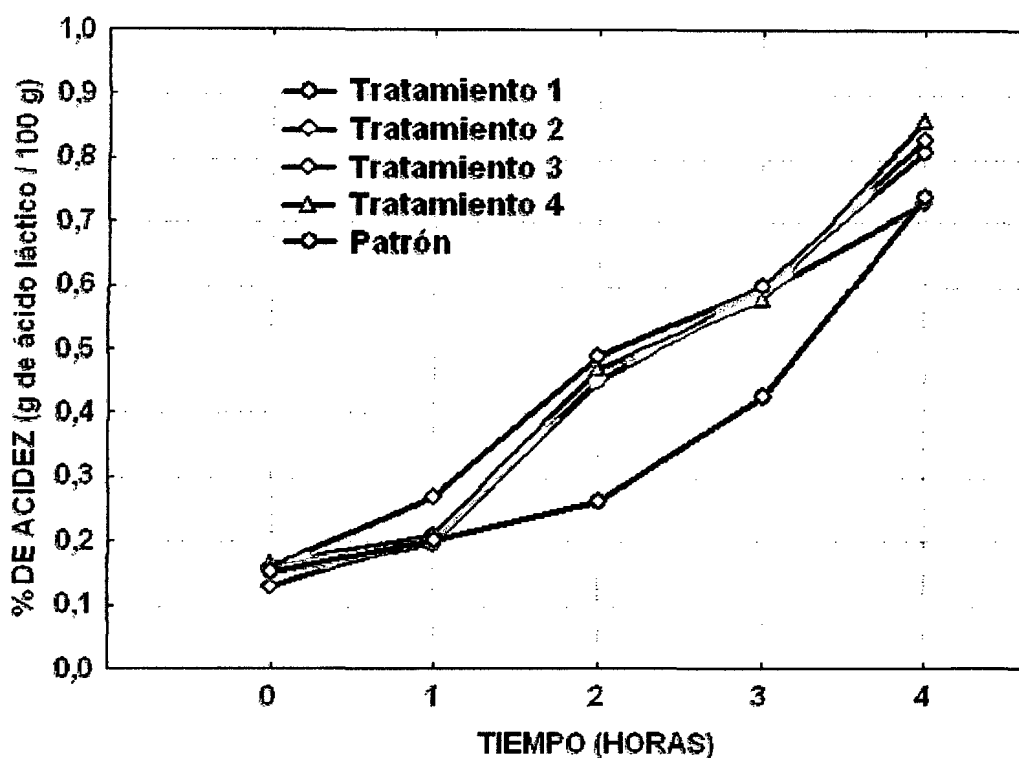
Patrón: Muestra leche fresca entera.

La variación de pH, durante la fermentación en función al tiempo de los cuatro tratamientos es mínima a excepción del control. Los valores de pH en 4 horas de incubación fueron 4,55 en tratamiento 1; 4,49 en tratamiento 2, 4,57 en tratamiento 3; 4,47 en tratamiento 4 y 4,50 en el patrón respectivamente. La disminución del pH tiene una relación inversa con la producción de acidez, este efecto se da cuando se produce la simbiosis durante la reproducción entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (Tamine y Robinson 1991, Ordoñez 1998, Walstra 2001 y Mahaut, 2004).

El pH juega un rol muy importante, porque a través ello se produce la desnaturalización de las proteínas y la solubilidad del fosfato cálcico coloidal, en donde a pH menores de 4,9 ocurre la reacción entre la caseína y el calcio, la primera tiene carga negativa y el segundo una carga positiva, formándose así una agregación a la que se llama el coagulo. Además se dan otras reacciones bioquímicas y fisicoquímicas como la interacción entre proteína-proteína, proteína-grasa llegando al punto isoelectrico de la leche (Ordoñez 1998, Walstra y col., 2001).



Figura 23. Producción de ácido láctico en función al tiempo en los tratamientos y el patrón, durante la fermentación.



La evaluación sobre la producción de ácido láctico ha sido ampliamente estudiado por varios autores, entre los principales tenemos. Según Mahaut M. y col. (2004), las dos especies durante la incubación viven en simbiosis y existe un sinergismo entre las dos bacterias basado en una estimulación mutua. Este efecto se aprecia especialmente en el crecimiento, la acidificación y la producción de compuestos aromáticos.

En el presente trabajo de investigación, la producción de ácido láctico en función al tiempo; se efectuó hasta que % de acidez tenga como mínimo un 0,6 % según la NTP 202.092: (Leche y productos lácteos). Yogur o yogurt, este valor alcanzó a los 4,0 horas de incubación a una temperatura de 42 - 43 °C inoculados con cultivo madre previamente preparado. Los resultados fueron, 0.81 % de

acidez en tratamiento 1; 0.73 % de acidez en tratamiento 2, 0.83 % en tratamiento 3, 0.86 % en tratamiento 4 y 0.74 % de ácido láctico en el patrón respectivamente.

Además Mahaut y col. (2004), citan que la incubación se realiza a temperaturas entre 42 y 45 °C durante un tiempo entre 2 horas 30 minutos y 3 horas 30 minutos. El objetivo de esta fase es alcanzar una acidez de 100 – 120 °D en los yogures batidos. Sin embargo, en el presente trabajo, los resultados del patrón o control de referencia no concuerdan en la producción de ácido láctico en el tiempo mencionado con una incubación a la misma temperatura.

La producción rápida de ácido láctico y la disminución del pH en los yogures con extracto de kiwicha, posiblemente se debe a que los medios ya tienen los aminoácidos y péptidos pequeños aportados por el mismo extracto que facilita la reproducción inmediata de *S. thermophilus* y posterior estimulación de este a *L. bulgaricus*.

Tamine (1977), estudió el comportamiento de cepas puras y mixtas de cultivos de yogurt sembrado e incubados a 40 °C en leche desnatada esterilizada en autoclave y sembrada con un 2,0% de cultivo. La mayor producción de acidez de 1,02 % de ácido láctico se llegó con siembra de cultivo mixto. *S. thermophilus* tuvo 0,65 % y *L. bulgaricus* 0,45 % después de 8 horas de incubación. Además cuando la incubación tiene 4 horas la producción de ácido láctico presenta 0,81 %, este valor es similar a los datos obtenidos en la mayoría de los tratamientos de yogurt obtenido en la presente investigación. Por otro lado Ordoñez (1998), coincide con los resultados obtenidos por Tamine (1977), sobre la producción de ácido láctico,

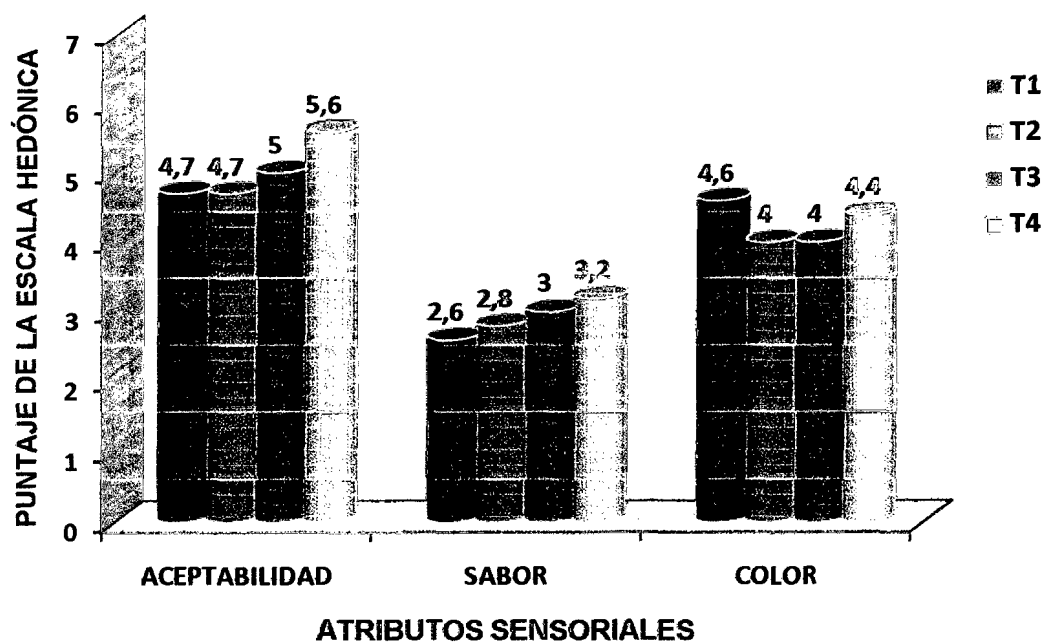
quien estudio el crecimiento simbiótico de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

4.3. Resultados de análisis sensorial

4.3.1. Evaluación de análisis sensorial descriptivo para categorizar los tratamientos de yogurt

En la figura 24, se muestra que la máxima aceptación del yogurt, se tiene del tratamiento 4, que formulada con una dilución de 20 % de harina de kiwicha en agua y con una sustitución de 40 % de extracto en leche fresca. El valor que alcanza al máximo puntaje es de 5,6 el cual representa a una calificación de entre “me agrada poco y me agrada mucho” respectivamente.

Figura 24: Evaluación de análisis sensorial, de los atributos de aceptabilidad en general, sabor y color de los tratamientos de yogurt.

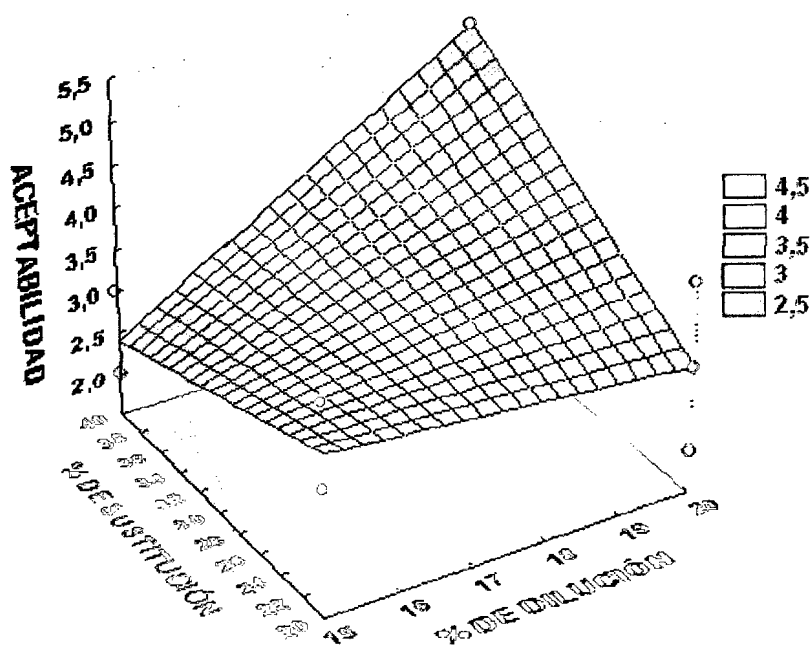


Por otro lado, este mismo tratamiento tuvo mejor calificación con respecto al sabor, teniendo un valor de 3,2; donde esta calificación según la escala corresponde a característico, asimismo le sigue el tratamiento 3 en ambos atributos sensoriales.

En cuanto al atributo de color, los tratamientos 1 y 4 presentaron mejores resultados, los valores máximos son 4,6 y 4,4 que se encuentran dentro del rango de la escala de calificación de “poco homogéneo y homogéneo” para ambos tratamientos.

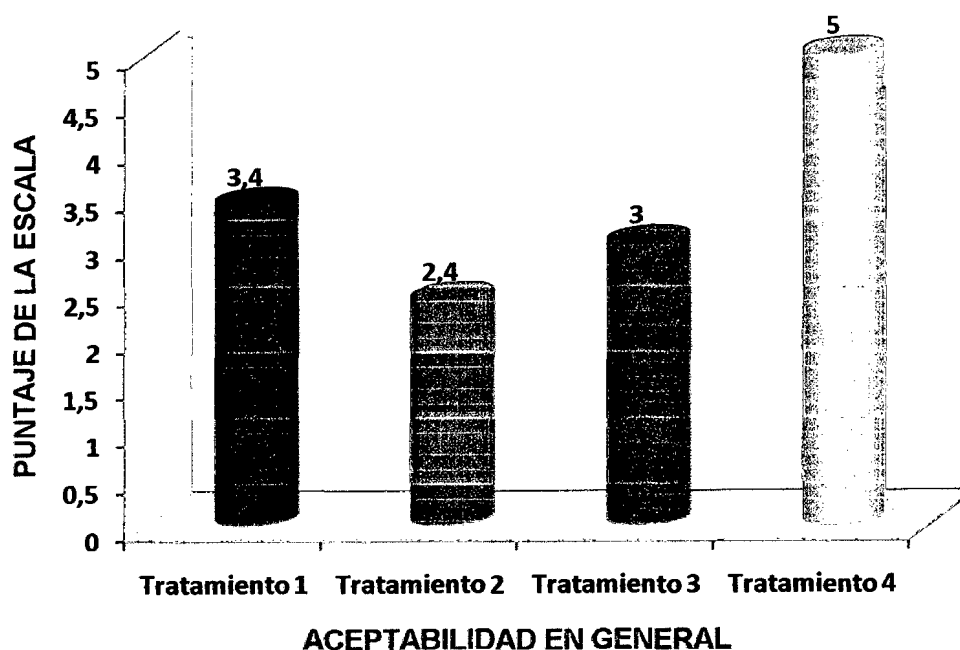
4.3.2. Evaluación de análisis sensorial discriminativo para comparar los tratamientos con respecto al patrón

Figura 25. Evaluación de análisis sensorial de aceptabilidad en general, de los tratamientos de yogurt comparado con respecto al patrón.



En la figura 25 y 26, se presenta que la mejor aceptabilidad de los tratamientos comparado con respecto al patrón, fue el tratamiento 4 (con una dilución de 20 % de harina de kiwicha en agua y con 40 % de sustitución de extracto en leche fresca). La evaluación de este tratamiento tuvo un calificativo igual al control de referencia, teniendo un puntaje de 5,0. Mientras que, el tratamiento 1 tiene un valor de 3,4; tratamiento 3 un valor de 3,0 y por último el tratamiento 2 presento el valor de 2,4; que todos estos tratamientos presentan un calificativo de aceptabilidad en general inferior que el patrón.

Figura 26. Resumen de la evaluación de análisis sensorial de aceptabilidad en general, de los tratamientos de yogurt comparado con respecto al patrón.



4.4. Resultados de análisis químico proximal

Los resultados de análisis químico proximal se presenta en la tabla 19, los tratamientos que presentan mayor contenido nutricional son T3, T4 y T1 respectivamente, el incremento de la composición nutricional con respecto a la mezcla inicial se debe a que el producto se pasteurizó dos veces, la primera se realizó antes de inocular el cultivo láctico a una temperatura de 85 °C por 15 minutos y la segunda pasteurización se efectuó después del batido o antes de envasar el producto por 75 °C por 10 minutos, razón por el cual el producto pierde el agua al evaporarse y se concentra en el contenido de los otros nutrientes.



Tabla 19. Análisis químico proximal de los tratamientos y el patrón (g / 100 g base húmeda)

| COMPONENTES | UNIDAD | MUESTRAS | | | | |
|----------------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Tratamiento 1 | Tratamiento 2 | Tratamiento 3 | Tratamiento 4 | P |
| Energía | Kcal | 99,7984 | 82,7472 | 106,0671 | 105,2904 | 107,3239 |
| Proteína | g | 3,0540 ± 0,13 | 2,4093 ± 0,14 | 3,6207 ± 0,03 | 3,2303 ± 0,02 | 3,7610 ± 0,03 |
| Grasa | g | 3,5625 ± 0,25 | 2,2779 ± 0,09 | 3,5953 ± 0,01 | 3,2793 ± 0,09 | 3,6728 ± 0,09 |
| Carbohidratos | g | 13,2191 ± 0,05 | 12,5259 ± 0,08 | 14,1016 ± 0,09 | 14,9655 ± 0,12 | 14,1012 ± 0,08 |
| Humedad | g | 79,2365 ± 0,07 | 82,0307 ± 0,10 | 77,6741 ± 0,10 | 77,5352 ± 0,06 | 77,8080 ± 0,05 |
| Fibra | g | 0,2715 ± 0,02 | 0,2977 ± 0,02 | 0,3757 ± 0,05 | 0,3923 ± 0,01 | 0 |
| Cenizas | g | 0,6565 ± 0,03 | 0,4585 ± 0,01 | 0,6326 ± 0,02 | 0,5973 ± 0,05 | 0,6570 ± 0,06 |

Donde:

Tratamiento 1: Muestra formulada con 15 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 20 % de sustitución del extracto en leche fresca.

Tratamiento 2: Muestra formulada con 15 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 40 % de sustitución del extracto en leche fresca.

Tratamiento 3: Muestra formulada con 20 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 20 % de sustitución del extracto en leche fresca.

Tratamiento 4: Muestra formulada con 20 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 40 % de sustitución del extracto en leche fresca.

Patrón o Control: Muestra con leche fresca entera.

4.4.1. Análisis de Varianza (ANVA) para los resultados de análisis químico proximal del yogurt

Prueba de hipótesis:

Hipótesis nula (Ho): Todos los tratamientos del yogurt obtenido con extracto de kiwicha son iguales en sus características estadísticamente.

Hipótesis alterna (Ha): Al menos uno de los tratamientos del yogurt obtenido con extracto de kiwicha es diferente de los demás.

Si: $P < \alpha$, se rechaza la Ho y se acepta la Ha; por lo tanto existe diferencias y es significativa sobre la variable respuesta.

Si: $P > \alpha$, se acepta la Ho y se rechaza la Ha; por lo tanto no existe diferencias todos son iguales y no influye en la variable respuesta.

4.4.1.1. Análisis de Varianza para contenido de proteína

| Variables | G.L | S.C | C.M | Fc | P | Sign. |
|---------------------|-----|---------|---------|---------|----------|-------|
| A: % de dilución | 1 | 1,44435 | 1,44435 | 119,114 | 0,000004 | ** |
| B: % de sustitución | 1 | 0,80352 | 0,80352 | 66,2653 | 0,000039 | * |
| AxB | 1 | 0,04849 | 0,04849 | 3,99879 | 0,080554 | N.S |
| Error | 8 | 0,09701 | 0,01213 | | | |
| TOTAL | 11 | 2,39337 | | | | |

Nivel de significancia ($\alpha = 0,05$)

La cantidad de dilución de harina de kiwicha en agua, influye más que la cantidad de sustitución de extracto de kiwicha en leche fresca sobre el contenido proteico en el yogurt, porque la harina contiene más proteína antes de adicionar agua. Sin embargo la interacción de ambos variables no influye sobre este componente. Es decir, el primer variable es altamente significativo que la segunda y la interacción de ambos presenta no significativa.



- **Coefficiente de variabilidad**

$$CV = \left(\frac{\sqrt{CME}}{\frac{\sum Y \dots}{Tr}} \right) 100$$

Donde:

CME: Cuadrado medio del error

$\sum y \dots$: Sumatoria de todos los resultados

T: Numero de tratamientos

r: Numero de replicas

$$CV = \left(\frac{\sqrt{0,01213}}{\frac{36,9428}{4 \times 3}} \right) 100 \quad CV = 3,577 \%$$

El coeficiente de variación es $3,577 \% < 9 \%$; este valor indica que los resultados obtenidos así, tienen buena precisión y es aceptable los experimentos realizados.

- **Pruebas de comparación de medias por Duncan (% de proteína)**

- ✓ Determinar el test de Duncan

$$S_{x_i - x_j} = \sqrt{\frac{CME}{r}} = \sqrt{\frac{0,01213}{3}} = 0,064$$

- ✓ Nivel de significancia: $\alpha = 5 \%$
- ✓ Buscar en la tabla de Duncan los valores de AES(D) con los grados de libertad del error: GLE = 8

| P | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|-------|-------|-------|
| AES(D) | 3,260 | 3,390 | 3,470 |
| $S_{x_i - x_j}$ | 0,064 | 0,064 | 0,064 |
| ALS(D) | 0,209 | 0,217 | 0,222 |

$$ALS(D) = S_{x_i - x_j} \cdot AES(D)$$

- **Ordenamiento de los promedios de tratamientos**

| Replicas | Tratamientos | | | |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | T 1 | T2 | T3 | T4 |
| I | 2,8965 | 2,3128 | 3,6225 | 3,2085 |
| II | 3,1022 | 2,6006 | 3,6534 | 3,2476 |
| III | 3,1632 | 2,3145 | 3,5862 | 3,2348 |
| Promedio | 3,0540 | 2,4093 | 3,6207 | 3,2303 |

Se clasifican los promedios de tratamientos en orden creciente.

| Tratamientos | T2 | T1 | T4 | T3 |
|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| Promedio | 2,4093 | 3,054 | 3,2303 | 3,6207 |

- **Contrastación**

Se considera significativa, si excede la respectiva amplitud limite de significación ALS(D). Entonces existen diferencias entre los tratamientos.

| | | | | | | | | | | |
|---------|--------|---|--------|---|--------|---|------------|---|-------|-----|
| T3 – T2 | 3,6207 | - | 2,4093 | = | 1,2114 | > | ALS(D) [4] | = | 0,222 | * |
| T3 – T1 | 3,6207 | - | 3,0540 | = | 0,5667 | > | ALS(D) [3] | = | 0,217 | * |
| T3 – T4 | 3,6207 | - | 3,2303 | = | 0,3904 | > | ALS(D) [2] | = | 0,209 | * |
| T4 – T2 | 3,2303 | - | 2,4093 | = | 0,8210 | > | ALS(D) [3] | = | 0,217 | * |
| T4 – T1 | 3,2303 | - | 3,0540 | = | 0,1763 | < | ALS(D) [2] | = | 0,209 | N.S |
| T1 – T2 | 3,0540 | - | 2,4093 | = | 0,6447 | > | ALS(D) [2] | = | 0,209 | * |

- **Presentación de la prueba de Duncan**

| Tratamientos | r | Promedio | Duncan (P<0,05) |
|--------------|---|----------|-----------------|
| T3 | 3 | 3,6207 | a |
| T4 | 3 | 3,2303 | b |
| T1 | 3 | 3,0540 | bc |
| T2 | 3 | 2,4093 | d |

El tratamiento T3, presenta mayor contenido proteico, seguido de T4 y T1, el tratamiento T2 presenta el contenido proteico más bajo.

4.4.1.2. Análisis de Varianza para contenido de Grasa

| Variables | G.L | S.C | C.M | Fc | P | Sign. |
|---------------------|-----|--------|--------|---------|----------|-------|
| A: % de dilución | 1 | 0,8022 | 0,8022 | 26,1230 | 0,000917 | * |
| B: % de sustitución | 1 | 1,9214 | 1,9214 | 62,5652 | 0,000047 | ** |
| AxB | 1 | 0,7037 | 0,7037 | 22,9142 | 0,001378 | * |
| Error | 8 | 0,2457 | 0,0307 | | | |
| TOTAL | 11 | 3,6730 | | | | |

La cantidad de sustitución de extracto de kiwicha en leche fresca, influye más que la cantidad de dilución de harina de kiwicha en agua, sobre el contenido de grasa en el yogurt. Además la interacción de ambos variables también influye sobre este compuesto. Es decir, las dos variables y la interacción de ambos son significativas. Esto se debe a que; el hecho de sustituir de 20 hasta 40 % de extracto en leche fresca disminuye en el contenido de grasa en el yogurt.

- Coeficiente de variabilidad

$$CV = \left(\frac{\sqrt{0,0307}}{\frac{38,145}{4 \times 3}} \right) 100 \quad CV = 5,5129 \%$$

Los resultados obtenidos así, son estadísticamente aceptables en el experimento.

- Pruebas de comparación de medias por Duncan (% de grasa)

- ✓ Determinar el test de Duncan

$$S_{x_i - x_j} = \sqrt{\frac{CME}{r}} = \sqrt{\frac{0,0307}{3}} = 0,1012$$

- ✓ Nivel de significancia: $\alpha = 5 \%$
- ✓ Buscar en la tabla de Duncan los valores de AES(D) con los grados de libertad del error: GLE = 8

| P | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|--------|--------|--------|
| AES(D) | 3,260 | 3,390 | 3,470 |
| $S_{x_i - x_j}$ | 0,1012 | 0,1012 | 0,1012 |

$$\frac{\text{ALS(D)} \quad 0,330 \quad 0,343 \quad 0,351}{\text{ALS(D)} = S_{x_i - x_j} \cdot \text{AES(D)}}$$

- Ordenamiento de los promedios de tratamientos

Se clasifican los promedios de tratamientos en orden creciente.

| Tratamientos | T2 | T4 | T1 | T3 |
|--------------|--------|--------|--------|--------|
| Promedio | 2,2779 | 3,2793 | 3,5625 | 3,5953 |

- Contrastación

Se considera significativa, si excede la respectiva amplitud limite de significación ALS(D).

| | | | | | | | | | |
|---------|--------|---|--------|---|--------|---|--------------|-------|-----|
| T3 – T2 | 3,5953 | - | 2,2779 | = | 1,3174 | > | ALS(D) [4] = | 0,351 | * |
| T3 – T4 | 3,5953 | - | 3,2793 | = | 0,3160 | < | ALS(D) [3] = | 0,343 | N.S |
| T3 – T1 | 3,5953 | - | 3,5625 | = | 0,0328 | < | ALS(D) [2] = | 0,330 | N.S |
| T1 – T2 | 3,5625 | - | 2,2779 | = | 1,2846 | > | ALS(D) [3] = | 0,343 | * |
| T1 – T4 | 3,5625 | - | 3,2793 | = | 0,2832 | < | ALS(D) [2] = | 0,330 | N.S |
| T4 – T2 | 3,2793 | - | 2,2779 | = | 1,0014 | > | ALS(D) [2] = | 0,330 | * |

- Presentación de la prueba de Duncan

| Tratamientos | r | Promedio | Duncan (P<0,05) |
|--------------|---|----------|-----------------|
| T3 | 3 | 3,5953 | a |
| T1 | 3 | 3,5625 | a |
| T4 | 3 | 3,2793 | ab |
| T2 | 3 | 2,2779 | c |

El tratamiento T3, presenta mayor contenido de grasa, seguido de T1 y T4, el tratamiento T2 presenta el contenido más bajo en grasa. Por tanto para obtener un yogurt con mayor contenido en grasa, es conveniente utilizar el tratamiento 3 con la formulación de (20 % de dilución de harina y con 20 % de sustitución de extracto en leche fresca).

4.4.1.3. Análisis de Varianza para contenido de Carbohidratos

| Variables | G.L | S.C | C.M | Fc | P | Sign. |
|---------------------|-----|-----------|--------|---------|----------|-------|
| A: % de dilución | 1 | 8,112187 | 8,1122 | 741,995 | 0,000000 | ** |
| B: % de sustitución | 1 | 0,0312508 | 0,0313 | 2,8584 | 0,129364 | N.S |
| AxB | 1 | 1,7413072 | 1,7413 | 159,272 | 0,000001 | ** |
| Error | 8 | 0,0874636 | 0,0109 | | | |
| TOTAL | 11 | 9,9722085 | | | | |

El porcentaje de dilución de harina influye más sobre el contenido de carbohidratos en el yogurt, el hecho de diluir de 15 hasta 20 % de harina de kiwicha en agua aumenta en el contenido de carbohidratos en el extracto y por ende en el yogurt. Por otro lado; la interacción de ambos variables también influye sobre este componente.

- **Coefficiente de variabilidad**

$$CV = \left(\frac{\sqrt{0,0109}}{\frac{164,54}{4 \times 3}} \right) 100 \quad CV = 0,7625 \%$$

El coeficiente de variación es muy inferior a 9 %, esto significa que los resultados obtenidos tienen una alta precisión.

- **Pruebas de comparación de medias por Duncan (% de carbohidratos)**

- ✓ Determinar el test de Duncan

$$S_{x_i - x_j} = \sqrt{\frac{CME}{r}} = \sqrt{\frac{0,0109}{3}} = 0,0604$$

- ✓ Nivel de significancia: $\alpha = 0,05$
- ✓ Buscar en la tabla de Duncan los valores de AES(D) con los grados de libertad del error: GLE = 8

| P | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|--------|--------|--------|
| AES(D) | 3,260 | 3,390 | 3,470 |
| $S_{x_i - x_j}$ | 0,0604 | 0,0604 | 0,0604 |
| ALS(D) | 0,197 | 0,205 | 0,210 |

$$ALS(D) = S_{x_i - x_j} \cdot AES(D)$$

- **Ordenamiento de los promedios de tratamientos**

Se clasifican los promedios de tratamientos en orden creciente.

| Tratamientos | T2 | T1 | T3 | T4 |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| Promedio | 12,5593 | 13,2191 | 14,1016 | 14,9655 |

- **Contrastación**

Se considera significativa, si excede la respectiva amplitud limite de significación ALS(D).

| | | | | | | | | | | |
|---------|---------|---|---------|---|--------|---|------------|---|-------|---|
| T4 – T2 | 14,9655 | - | 12,5593 | = | 2,4062 | > | ALS(D) [4] | = | 0,210 | * |
| T4 – T1 | 14,9655 | - | 13,2191 | = | 1,7464 | > | ALS(D) [3] | = | 0,205 | * |
| T4 – T3 | 14,9655 | - | 14,1016 | = | 0,8639 | > | ALS(D) [2] | = | 0,197 | * |
| T3 – T2 | 14,1016 | - | 12,5593 | = | 1,5423 | > | ALS(D) [3] | = | 0,205 | * |
| T3 – T1 | 14,1016 | - | 13,2191 | = | 0,8825 | > | ALS(D) [2] | = | 0,197 | * |
| T1 – T2 | 13,2191 | - | 12,5593 | = | 0,6598 | > | ALS(D) [2] | = | 0,197 | * |

✓ **Presentación de la prueba de Duncan**

| Tratamientos | r | Promedio | Duncan (P<0,05) |
|--------------|---|----------|-----------------|
| T4 | 3 | 14,9655 | a |
| T3 | 3 | 14,1016 | b |
| T1 | 3 | 13,2191 | c |
| T2 | 3 | 12,5593 | d |

El tratamiento 4 con (20 % de dilución de harina de kiwicha en agua y con 40 % de sustitución de extracto en leche fresca) presenta mayor contenido de carbohidratos, seguido de T3 y T1 respectivamente. Este compuesto está constituido de amilosa y en mayor proporción por amilopectina el cual confiere una viscosidad adecuada al yogurt.

4.5. Determinación de la vida útil

Para evaluar la vida útil del yogurt, se eligió solamente al producto óptimo (Tratamiento 4) que se determinó mediante la evaluación de análisis sensoriales y análisis físicoquímicos detallados anteriormente.

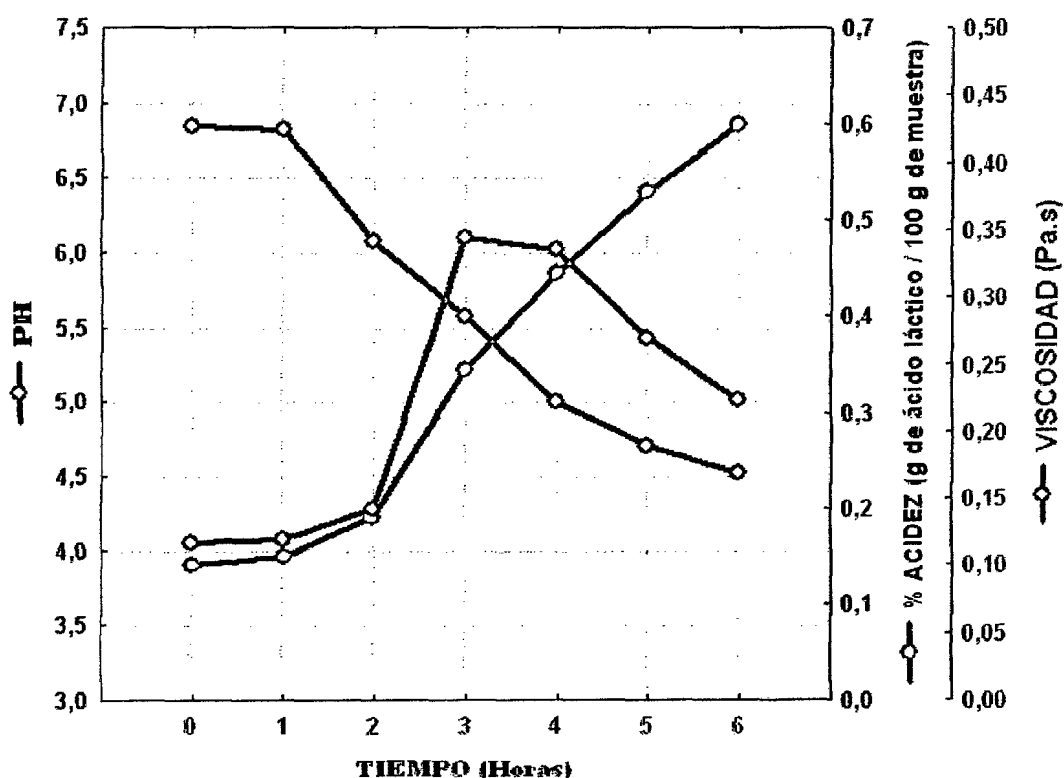
4.5.1. Caracterización preliminar del yogurt óptimo y patrón

En esta etapa de investigación, se realizó primeramente una caracterización preliminar del yogurt óptimo y el patrón, antes de proceder la elaboración final de los yogurts para determinar su vida útil. Esta caracterización se realizó, mediante una evaluación de análisis físicoquímico de pH, acidez y viscosidad en función al tiempo, durante la fermentación en el proceso de incubación a una temperatura de 42 – 43 °C, inoculado con 3 % de cultivo mixto de bacterias lácticas *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, realizado por siembra directa.

En la figura 27, se ve que las bacterias lácticas inoculadas directamente en el Tratamiento 4 (yogurt óptimo), se activan lentamente durante la primera hora; después las bacterias se reproducen rápidamente produciendo el ácido láctico hasta 0,6 % y llegando el pH a 4,52 en un tiempo de 6,0 horas, generalmente a este valor de PH se recomienda detener el proceso de incubación. Datos similares fueron reportados por Cruz Cansino N. (2008), en un producto fermentado con licuado de soja a diferentes tratamientos de homogeneización y ultra alta pasteurización alcanzando valores de 0,44 – 0,51 % de ácido láctico y 4,6 de pH después de 6,0 horas de fermentación.

Con respecto al comportamiento en la viscosidad del yogurt óptimo, las dos primeras horas tiene un ligero aumento porque las bacterias recién comienzan a hidrolizar los sustratos, el incremento máximo de la viscosidad se produce cuando las bacterias lácticas están en la fase exponencial que se realiza durante la tercera y la cuarta hora durante la incubación llegando hasta un máximo de 0,345 Pa.s, por otro lado, la viscosidad posteriormente tiende a disminuir esto se debe por el efecto de pH que presenta el yogurt.

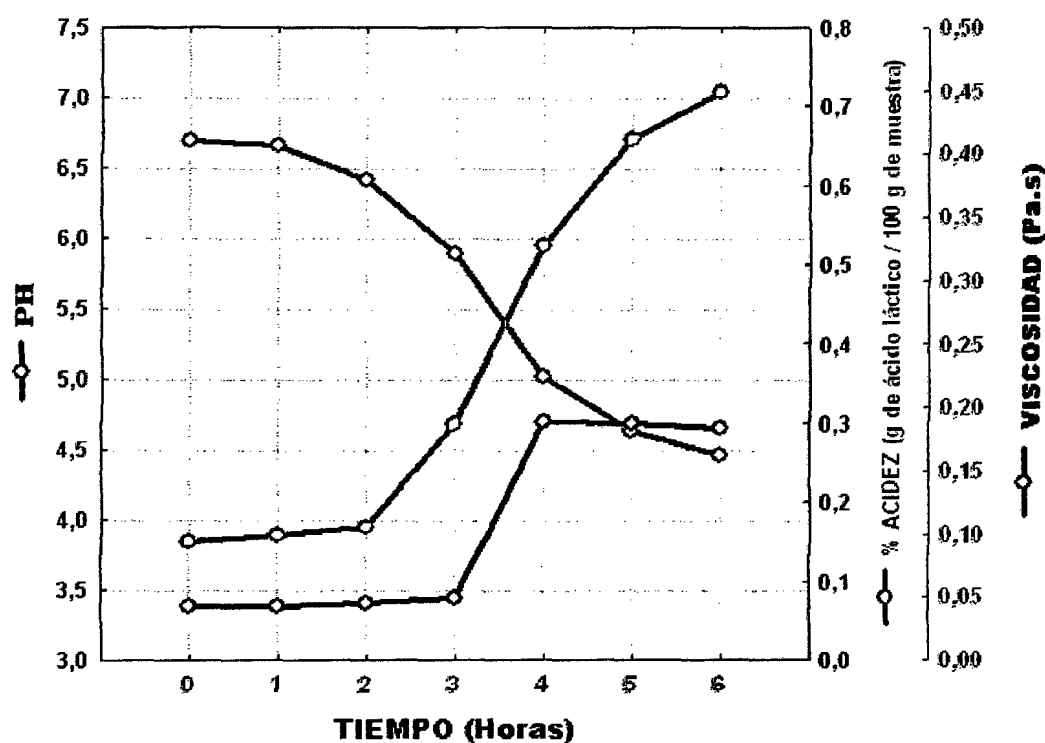
Figura 27. Comportamiento de pH, acidez y viscosidad del yogurt óptimo, en función al tiempo (realizado por siembra directa de cultivo láctico).



Por otro lado, para fines de evaluar y comparar la muestra se elaboró un control de referencia o patrón a base de leche fresca entera, los resultados

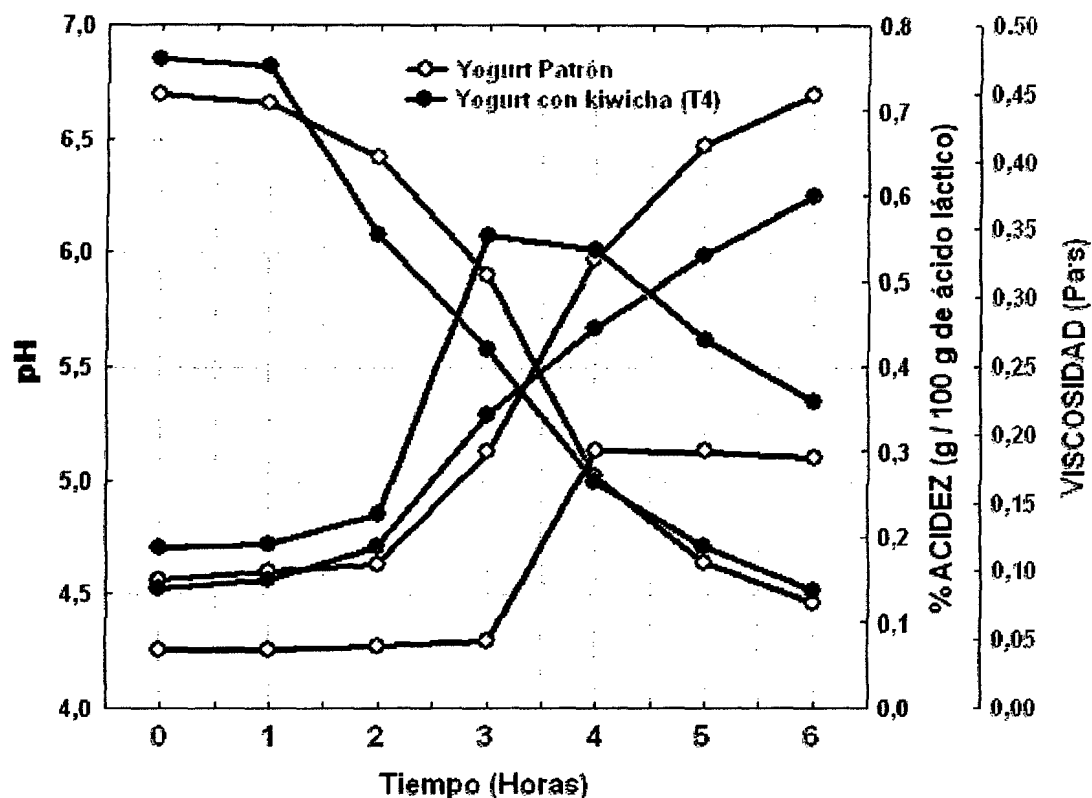
obtenidos se presentan en la figura 28, que son similares en las propiedades fisicoquímicas con los reportados por (Tamine y Robinson 1991, Ordoñez 1998, Walstra 2001, y Mahaut 2004).

Figura 28. Comportamiento de pH, Viscosidad y acidez del yogurt patrón, en función al tiempo (realizado por siembra directa de cultivo láctico).



En la figura 29, se observa que la producción de ácido láctico de 0,6 % y el pH de 4,5; valores mínimos recomendados por la norma técnica peruana NTP 202.092: (Leche y productos lácteos), se obtienen con un tiempo de incubación de 6,0 horas, en donde estos resultados coinciden con los mencionados por (Walstra 2001, Ordoñez 1998, y Tamine y Robinson 1991).

Figura 29. Comportamiento de las propiedades fisicoquímicas, del yogurt óptimo y patrón, durante la fermentación en función al tiempo.



En la figura 29, se ve que las bacterias lácticas inoculadas directamente en la leche fresca se activan más lentamente durante las primeras horas que en la leche sustituida con extracto de kiwicha, la producción de acidez alcanza en 6,0 horas de incubación a una concentración de 0,72 % en el patrón y 0,60 % en el yogurt óptimo, expresado en gramos de ácido láctico. Estos resultados coinciden con los datos reportados por Tamine y Robinson (1991), quienes señalaron la formación de 0,92 % de ácido láctico después de 6,0 horas inoculadas a 42 °C pero con siembra de cultivo madre preparado.

La diferencia mínima que existe en la producción de ácido láctico entre el yogurt óptimo y el patrón, se debe a que en la primera, la lactosa disponible se encuentra en menor proporción que el patrón. Según Walstra y col. (2001), en el yogurt batido la relación comienza casi al mismo pH, pero transcurre más tiempo hasta que el gel es lo suficientemente firme como para proceder al batido. El yogurt es más consistente cuanto más bajo es su pH. Los valores normales oscilan entre 4,1 y 4,6.

La disminución de pH a 4,5 alcanzó en 6,0 horas de incubación tanto en el yogurt óptimo y el patrón de referencia. En la leche fresca se da más lentamente que con la leche sustituido parcialmente con extracto de kiwicha, durante las primeras horas. Esta diferencia se debe a que en la primera ya existe los aminoácidos libres y algunos péptidos que estimulan el crecimiento de los cocos, en donde posteriormente este último estimula el crecimiento de los bacilos, tal como fue citado por (Tamine y Robinson 1991, Ordoñez 1998, Walstra 2001 y Mahaut 2004).

La viscosidad del yogurt patrón a diferencia que el yogurt con extracto de kiwicha, inicialmente es casi tres veces más baja y se mantiene casi constante durante las tres primeras horas y luego posteriormente alcanza hasta 0,188 Pa.s. Después de está la variación es mínima. La mayor viscosidad del yogurt con extracto de kiwicha con respecto al patrón, se debe a que esta contiene el almidón como la amilopectina, el cual produce un gel al recibir un tratamiento térmico de 55 - 60 °C. Sin embargo, esta propiedad tiende a disminuir por el efecto de pH. Según Cheftel J.C. (1976), los almidones presentan el efecto de pH, por la presencia de sacarosa que ejerce un efecto plastificante disminuyendo la fuerza de

gel del almidón. Además las grasas también ejercen una función plastificante debido a que forman complejos, los cuales hacen que el gel sea menos resistente.

4.5.2. Determinación de la vida útil de yogurt durante el periodo de almacenamiento

La determinación de la vida útil de los yogurts se realizara bajo dos condiciones de almacenamiento: a temperatura ambiental y bajo refrigeración.

4.5.2.1. Características fisicoquímicas y sensoriales

Tabla 20. Características fisicoquímicas y sensoriales del yogurt óptimo y el patrón

| Propiedades | Yogurt óptimo | Yogurt patrón |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| pH | 4,47 | 4,35 |
| Viscosidad con SD: L3 (60 rpm) | 1166,13 ± 10,2 | 742,73 ± 8,2 |
| Acidez en % de ácido láctico | 0,60 | 0,84 |
| Densidad a 20 °C (g/cm³) | 1,0777 | 1,0732 |
| Aceptabilidad | Buena, la mayoría de los catadores prefirieron más que el control | Buena |
| Sabor | Característico, desaparece el sabor de kiwicha, coagulo firme, mejor viscosidad y consistencia muy buena | Característico, coagulo firme, viscosidad adecuada y consistente. |
| Aroma | Característico | Característico |
| Color | Blanco ligero | Blanco cremosa |
| Olor | Característico | Muy característico |
| Consistencia | Muy buena | Buena |

Muestra evaluada después de 24 horas de elaboración.



Según la tabla 20, la viscosidad del yogurt batido con extracto de kiwicha presentó mejores resultados que el patrón de referencia que es obtenida con leche fresca entera, asimismo el yogurt óptimo es más denso que el control, sin embargo no supera en el contenido de ácido láctico.

Benavidez y Quilcazán (2009), reportaron que la acidez de una bebida fermentada a base de soya presentó de 0,34 - 4,0 % de ácido láctico. Sin embargo en el presente trabajo de investigación, la producción de acidez fue 0,6 % de ácido láctico, este valor es bastante apreciable y además cumple con límite mínimo permitido por la norma oficial peruana.

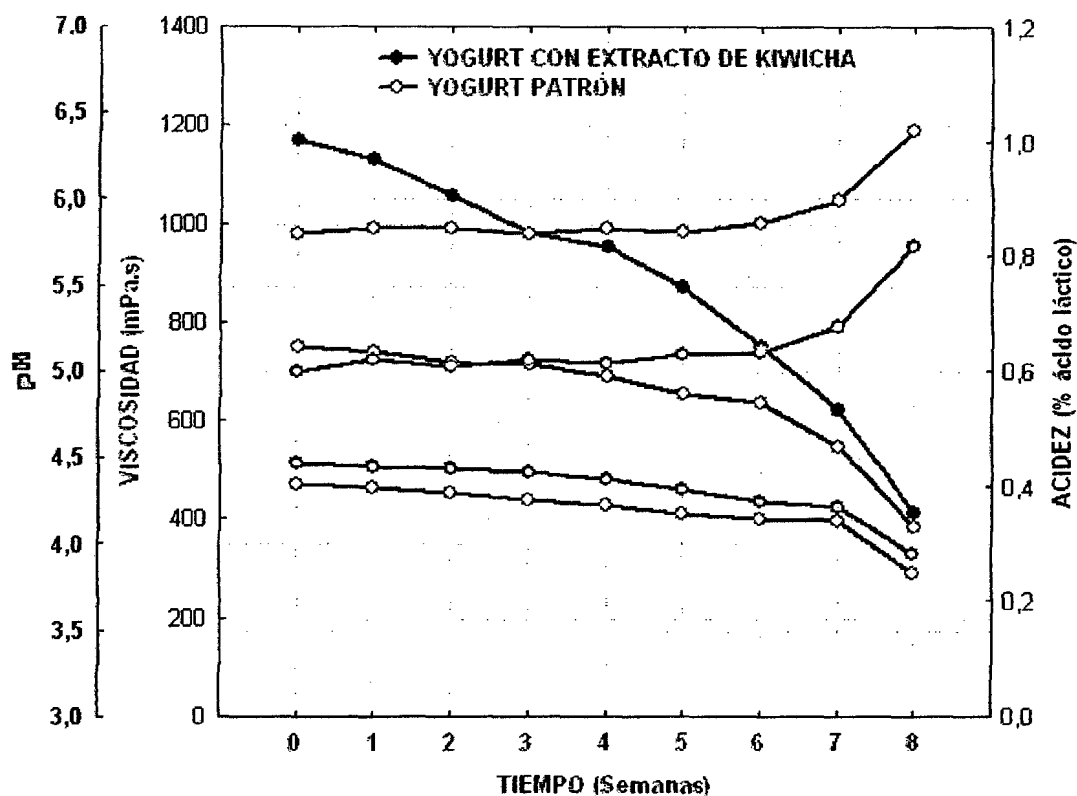
También se realizó el análisis sensorial de los productos, para controlar y evaluar los cambios producidos a través del tiempo de almacenamiento bajo las dos condiciones definidas.

4.5.2.2. Determinación de vida útil almacenado a temperatura de ambiente

Para determinar la vida útil en función al periodo de almacenamiento, se evaluaron el comportamiento de acidez, viscosidad y la variación de pH como se aprecia en la figura 30, para ello las muestras se evaluaron cada semana. Estas propiedades presentan uno de las características más importantes que determinan la aceptación por el consumidor y además son los indicadores de descomposición, por la posible existencia de algunos microorganismos como las levaduras, mohos y coliformes que se habitan a pH bajos y que producen, el ácido láctico, H_2 , CO_2 y NH_3 , estos últimos generan olores y sabores anormales de descomposición.



Figura 30. Comportamiento de pH, Viscosidad y acidez del yogurt con extracto de kiwicha y patrón en función al tiempo, almacenado a medio ambiente.



El pH disminuye en 0,05 a través del tiempo por cada semana y la acidez aumenta en 0,0185 % en la muestra de yogurt con extracto de kiwicha. Mientras que en el control de referencia el pH disminuye en 0,05 y la acidez aumenta en 0,015 expresado en % de ácido láctico por cada semana, durante el tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente de 20 ± 2 °C, para esta interpretación los datos se ajustaron mediante una regresión lineal.

Con respecto a la viscosidad, el yogurt con extracto de kiwicha es más afectado que el control, puesto que el primer producto presenta una disminución en 87,92 mPa's ó cps por cada semana y el control en 37,78 mPa's respectivamente. Según el grafico podemos decir que ambos productos sufren la

perdida de esta propiedad, que es producido por el efecto de pH, grasa y la presencia de azúcar que conllevan a exudar agua, llamado también sinéresis y posterior sedimentación del producto.

Tabla 21. Análisis microbiológico del yogurt con extracto de kiwicha y el patrón (Almacenado a temperatura ambiente)

| Tiempo (meses) | Microorganismos determinados | Yogurt con extracto kiwicha | Control (yogurt de leche fresca entera) | Max. Nivel permitido |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| 0 | Coliformes totales | 0 | 0 | < 0 ² ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | 0 | 03 | <10 ² ufc/ ml |
| 1 | Coliformes totales | 03 | 05 | <10 ² ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | 05 | 20 | <10 ² ufc/ ml |
| 2 | Coliformes totales | 14 | 43 | <10 ² ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | > 50 | > 100 | <10 ² ufc/ ml |

Muestra evaluada con un periodo de dos meses.

La determinación de análisis microbiológico se efectuó cada mes como se observa en la tabla 21, los resultados indican que después de 2 meses el producto presenta límites superiores permitidos por la norma oficial peruana, en el yogurt control y también el yogurt con extracto de kiwicha presenta su inicio de deterioro

por el desarrollo de las levaduras identificadas según su morfología a través el microscopio.

Ambos productos presentan buenas condiciones y aceptables para el consumo hasta los 7 semanas, observándose posteriormente un cambio significativo en la octava semana por la presencia de levaduras y en pequeñas cantidades de coliformes totales que producen CO₂ y otros compuestos. Sin embargo, Mulcahy (1972), determinó que el envasado en caliente permite mantener la vida útil del yogurt hasta 1 mes almacenado a temperatura ambiente. Además según Vanderpoorten and Martens (1976), calentando el yogurt a 64 °C durante 5 minutos envasando en caliente y enfriando a 5 °C, manteniendo esta temperatura durante una noche se consigue que la acidez del producto no aumente hasta 3 semanas almacenado a 20 °C. Por otro lado, Rakshy (1966), reportó que la pasteurización del yogurt a 50 – 55 °C durante 30 minutos permite conservar el producto 3 semanas a 15 °C.

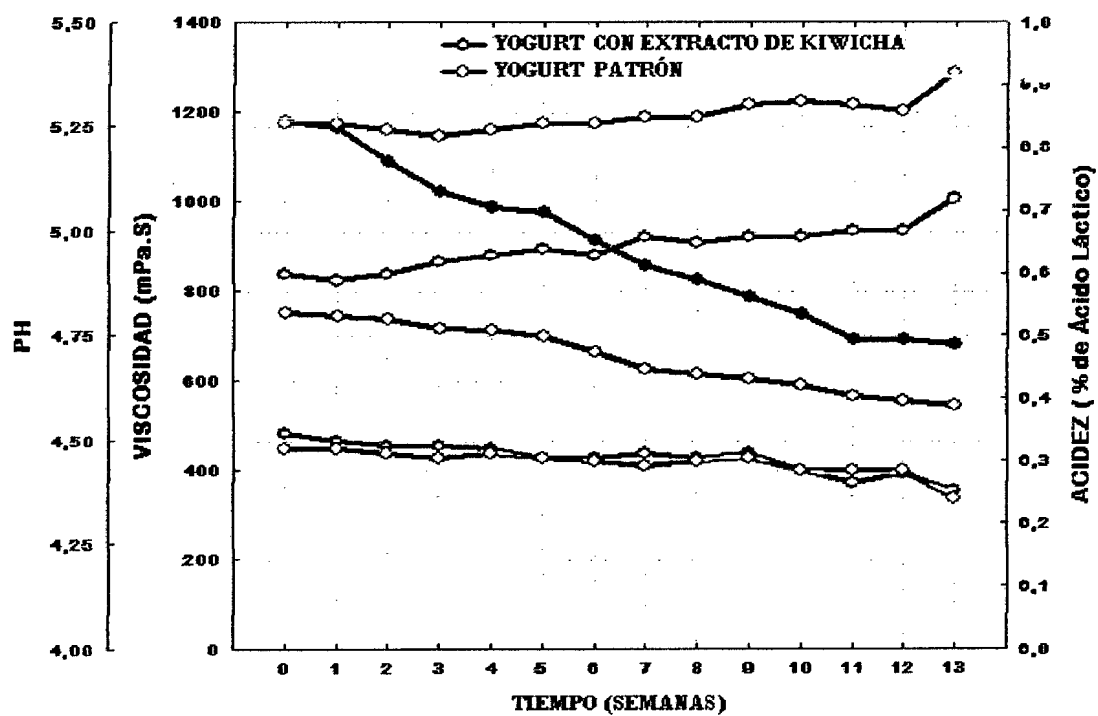
Por otro lado Bake (1971) y Anon (1977), reportan que pasteurizar el yogurt a 75 °C durante unos segundos (5 – 10 minutos en el caso del yogurt tradicional), enfriar a 20 ó 10 – 15 °C, añadir las frutas en condiciones asépticas envasar el producto en recipientes estériles para su comercialización, permite conservar el producto 4 - 6 semanas a 20 °C. Sin embargo en esta investigación pasteurizando el yogurt a 75 °C por 10 minutos y adicionando el conservante sorbato de potasio, el producto se conservo hasta 07 semanas a 20 ± 2 °C y almacenado en refrigeración de 5 ± 2 °C el producto se conserva como máximo hasta 3 meses.



Luck and Mosthert (1971), citan que la pasteurización discontinua del yogurt a 65 °C durante 20 minutos, envasando en caliente, la vida útil de este producto es de 7 días a 27 °C. Además según Holdt (1978), el calentamiento del yogurt en un intercambiador de calor de placas con rascador de superficie ondulada a 85 °C aumenta la vida útil del producto hasta 4 semanas a temperatura ambiente.

4.5.2.3. Determinación de vida útil almacenado bajo refrigeración

Figura 31. Comportamiento de pH, Viscosidad y acidez del yogurt óptimo y el patrón en función al tiempo, almacenado bajo refrigeración.



Durante el tiempo de almacenamiento en cámara de refrigeración a 5 ± 2 °C. El valor de pH disminuye en 0,0087 por cada semana y la acidez aumenta en 0,0078 % de ácido láctico en el yogurt con extracto de kiwicha. Mientras que en el

control de referencia el pH disminuye en 0,006 y la acidez aumenta en 0,005 expresado en % de ácido láctico por cada semana. Esta variación es mínima durante los tres primeros meses y después de esta ya existe un inicio de cambio especialmente en la producción de acidez y CO₂, por la existencia de levaduras que se determinó en el laboratorio.

La viscosidad del yogurt con extracto de kiwicha, disminuye más que el patrón; el primero disminuye en 41,011 mPa's por cada semana y el control en 17,617 mPa's respectivamente. Por otro lado en las investigaciones realizadas por Valdez Arana J. y Ludeña Urquiza F. (2005), sobre el efecto del tiempo de almacenamiento de la leche cruda y la adición de cloruro de calcio en la viscosidad del yogurt batido; reportaron que existe una disminución de la viscosidad del yogurt a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento, con excepción de la muestra que permaneció 12 horas en almacenamiento.

El yogurt con extracto de kiwicha (yogurt óptimo) y el patrón, presentan buenas condiciones para la alimentación humana como máximo dentro de tres meses almacenado bajo refrigeración de 5 ± 2 °C, ya que a tiempos mayores a esta el producto puede ocasionar serios problemas como: dolores estomacales, gases y diarreas al consumidor.

Según Neirinckx (1972), realizando la pasteurización a 60 - 65 °C, refrigeración y envasado. La vida útil de este producto es de 6 - 8 semanas a 12 °C. Sin embargo en este trabajo de investigación, pasteurizando el yogurt a 75 °C

por 10 minutos y adicionando el conservante sorbato de potasio, almacenando en refrigeración a 5 ± 2 °C el producto se conserva como máximo hasta 3 meses.

**Tabla 22. Análisis microbiológico del yogurt óptimo y el patrón
(Almacenado bajo refrigeración 5 ± 2 °C)**

| Tiempo (meses) | Microorganismos determinados | Yogurt con extracto de kiwicha | Patrón (yogurt de leche fresca entera) | Max. Nivel permitido |
|----------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------|----------------------|
| 0 | Coliformes totales | 0 | 0 | $<10^2$ ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | 0 | 01 | $<10^2$ ufc/ ml |
| 1 | Coliformes totales | 0 | 02 | $<10^2$ ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | 02 | 03 | $<10^2$ ufc/ ml |
| 2 | Coliformes totales | 05 | 07 | $<10^2$ ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | 08 | 20 | $<10^2$ ufc/ ml |
| 3 | Coliformes totales | 08 | 15 | $<10^2$ ufc/ ml |
| | Levaduras y mohos | 94 | > 100 | $<10^2$ ufc/ ml |

Muestra evaluada con un periodo de tres meses más una semana.

Las características organolépticas fueron evaluadas cada semana, durante todo el tiempo que se evaluó los análisis fisicoquímicas de ambos productos, los resultados de la tabla 23, se describen cuando el producto tenía tres meses con una semana almacenado bajo refrigeración, la variación de cambios de cualquier

sabor y olor anormal no se percibió durante los tres primeros meses, con excepción de la facilidad de detección de la pérdida de viscosidad, textura y la firmeza de gel. Durante esta evaluación, los productos almacenados a temperatura ambiente fueron los más afectados en la disminución de la firmeza de gel. Sin embargo, las características sensoriales de sabor, olor, color y aroma presentaron resultados similares al de la refrigeración.

Tabla 23. Características organolépticas del yogurt almacenado bajo refrigeración (tres meses con una semana)

| Propiedades | Yogurt óptimo | Yogurt patrón |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Aceptabilidad | Menos agradable, debido a baja consistencia y viscosidad reducida en el almacenamiento, presenta características similares que el yogurt bebible. | Menos agradable. |
| Sabor | Se aprecia el inicio de cambio en acidez y presenta una textura débil | Se percibe el aumento de acidez y textura granulosa. |
| Aroma | Ligeramente característico | Característico |
| Color | Blanco ligero | Blanco cremosa |
| Olor | Ligeramente característico | Ligeramente característico |
| Consistencia | Débil, por la disminución de la viscosidad que presenta un gel débil debido por el efecto de pH bajo y el fenómeno de retrogradación de almidón. | Suave, también el patrón es afectado debido al aumento de acidez. |

Muestra evaluada con un periodo de tres meses más una semana.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se determinó que el extracto de kiwicha filtrada puede ser utilizado en la elaboración de una bebida fermentada como es el yogurt batido, siempre y cuando la sustitución del extracto no sea mayor al 40 % en leche fresca entera.

Se estableció que las cantidades de 20 % de harina de kiwicha y 80 % de agua, es la proporción adecuada para obtener el extracto de kiwicha filtrada, en donde además esta presentó las mejores características fisicoquímicas.

Se determinó las cantidades óptimas para la obtención de yogurt batido, es de 40 % de extracto de kiwicha filtrada y 60 % de leche fresca entera. En donde esta mezcla difiere de los otros tratamientos en el contenido de proteína, grasa y carbohidratos respectivamente.

En la fermentación homoláctica, las propiedades fisicoquímicas como: % de acidez y el pH, incubados a una temperatura de 42- 43 °C, presentó valores similares en todos los tratamientos y el patrón, realizado la siembra con cultivo madre. Por otro lado, estos mismos valores de pH y acidez, se producen en 6 horas de incubación inoculada por siembra directa de cultivo láctico, bajo las mismas condiciones. En cuanto a las propiedades reológicas, los tratamientos presentaron mayor viscosidad que el patrón, por contener el almidón gelificado.

La adición del extracto de kiwicha en diferentes concentraciones, afecta en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales.

Durante el almacenamiento, el yogurt con extracto de kiwicha presentó una disminución de viscosidad más que el patrón. La mayor pérdida de viscosidad se da cuando el producto es almacenado a medio ambiente que bajo refrigeración.

Se determinó que la vida útil del yogurt, utilizando el conservante sorbato de potasio a una concentración de 0,05 % almacenado a temperatura ambiente es de 07 semanas y almacenado bajo refrigeración la vida útil máxima es de 3 meses.

5.2. Recomendaciones

Realizar el tratamiento térmico del yogurt a temperaturas menores de 75 °C por tiempos equivalentes a la de pasteurización, porque a temperaturas superiores a esta existe mayor pérdida de la viscosidad, consistencia y el aroma del mismo.

Realizar la cuantificación de aminoácidos del yogurt, la digestibilidad y el valor biológico del mismo, con el fin de completar el estudio de investigación y así ofrecer el producto al mercado.

Para obtener el yogurt con mayor contenido proteico, realizar la dilución con harina de kiwicha finamente pulverizada y filtrar el extracto con telas o tamices no menor a 50 μm . También se recomienda remojar el extracto antes de filtrar por un tiempo de 10 horas a más, para conseguir la mayor solubilidad de sus proteínas.

Utilizar los saborizantes naturales, con el fin de difundir el producto a los consumidores.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala J. y Pardo R. (1995). Optimización por Diseños Experimentales. Impreso en Lima – Perú.
2. Annison, G. y Topping, D. L. (1994). Nutritional Role of Resistant Starch in Ann. Revista de Nutrition.
3. Allaert V. Corrie y Escola R. Martha (2002). “Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos”. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid – España.
4. Anon (1977). Fermented Milk Process Guide. Alfa Laval Technical Bulletin W M 60779E. Lund Sweden.
5. Benjamín Castañeda P, Renán Manrique M., Fabricio Gamarra Castillo, Ana Muñoz Jáuregui, Fernando Ramos E., Frank Lizaraso Caparó y Jorge Martínez H. (2008). Formulación y elaboración preliminar de un yogurt mediante sustitución parcial con harina de tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*). Instituto de Investigación. Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres. Lima – Perú.
6. Benavidez Martin M. A. y Quilcazán de Cuenca M. C. (2009). Valoración de diferentes indicadores de la fermentación de la bebida de soja y de leche de vaca utilizando cultivos prebióticos. Brazilian Journal of food technology, VII BMCFB, Colombia.
7. Calixto Cotos María Rosario e Arnao Salas Inés (2004). Aislamiento y Caracterización Parcial del Almidón Nativo de (*Amaranthus caudatus Lineo*). Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición UNMSM-Perú.



8. Cruz Cansino Nelly. (2008). Efecto de la ultra alta presión de homogeneización en licuado de soja y su comportamiento en el desarrollo de un producto fermentado. Memoria presentada para optar el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona.
9. Cheftel J.C. (1976). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Editorial Acribia – España.
10. FAO (1983). Equipo Regional de fomento y capacitación en lechería para América latina. Manual de cultivos lácticos y productos fermentados.
11. FIL-IDF. (1988). Quality control of fermented milks. Capítulo X. Doc 227. Centro experimental de la leche. Milano.
12. Gonzales Guitya, F. Pablo (1993). Factores que Afectan la Fermentación Láctica en el Yogurt Batido Sabor Fresa. Tesis profesional para optar el título de Ingeniero Agrónomo, especialidad Industrias Agrícolas, UACH – México.
13. Hernández Carranza, Paola. (2004). Evaluación de las Propiedades Fisicoquímicas y Reológicas de Yogurt Bajo en Grasa Enriquecido Con Fibra y Calcio de Yogurt. Tesis profesional presentada de la Escuela de Ingeniería del Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas Puebla. Cholula, Puebla, México.
14. Henao Caro, Patricia. (2002). diseño y desarrollo de una bebida láctea, tipo yogurt, con sabor a café. Trabajo de grado para optar el título de especialista en ciencia y tecnología de alimentos, Universidad Nacional de Colombia.
15. Juan Izquierdo (1997). El Cultivo del Amaranto (*Amaranthus spp.*) Producción, mejoramiento genético y utilización. Chile – FAO.



16. Jofre, H. (1978). Algunos productos fermentados y su tecnología de elaboración. Centro tecnológico de la leche. Valdivia. Chile.
17. Mahaut Michel, Jeantet R., brulé G. y Schuck Pierre (2004). Productos Lácteos Industriales. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza-España,
18. Mario E. Tapia (2000). Cultivos andinos sub-explotados y su aporte a la alimentación. 1ra - 2da Edición.
19. Madrid Vicente A. (2003). Manual de Industrias Lácteas. Editorial Mundi - Prensa. Madrid – España.
20. Morales de León J., Cassis Nosthas M. y Cortes Penedo Elizabeth (1999). Elaboración de un yogurt con base en una mezcla de leche y garbanzo (*Cicer arietinum*). Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ), México.
21. Madrid Vicente A. y Madrid Cenzano J. (2001). Nuevo Manual de Industrias alimentarias. Editorial Mundi - Prensa. Madrid – España.
22. Nieto C. (1990). El cultivo de amaranto (*Amaranthus spp*) una alternativa agronómica para Ecuador. INIAP, EE. Santa Catalina. Publicación Miscelánea N°52. Quito, Ecuador.
23. Ordoñez A. Juan (2001). Tecnología de los Alimentos. Editorial Síntesis. Vol. II. Madrid – España.
24. Primo Yúfera Eduardo (1998). Química de los Alimentos. Editorial Síntesis, Madrid – España.
25. Tamime A. y Robinson R. (1985). Yoghurt Science and Technology. Pergamon Press Ltd. Oxford, England.



26. El Cultivo del Amaranto (*Amaranthus* spp.). Editado en la (UNA), Puno-Perú.
27. Tapia Blácido, Delia (2005). Estudio de la Cristalinidad, Micro estructura, Propiedades Mecánicas y de Barrera de las Películas de Amaranto (*Amaranthus caudatus*), UNICAMP, Campinas – Brasil.
28. Paredes-López, O. (1994). "Amaranth Biology, Chemistry, and Technology".
29. Konishi Yotaro, Arnao Salas Inés y Calixto Cotos María Rosario (2006). Caracterización del almidón de *Amaranthus caudatus* por barrido calorimétrico diferencia. Revista de la Sociedad Química del Perú.
30. Ureña Peralta M. (1999). Evaluación Sensorial de los Alimentos. Editorial Agraria. 1ra Edición, Lima – Perú.
31. Valdez Arana Jenny y Ludeña Urquizo Fanny (2005). Efecto del tiempo de almacenamiento de la leche cruda y la adición de cloruro de calcio en la viscosidad del yogurt batido. Anales científicos, Volumen LXI. Editorial Agraria. Lima - Perú.
32. Walstra P., Geurts T., Noomen A., Jellena A. y Van Boekel M.A.J.S. (2001). Ciencia de la Leche y Tecnología de Productos lácteos. Editorial Acribia, S.A. (Zaragoza-España).
33. Whistier, L. R., Bemiller, J. y Paschall, E. F. (1984). Starch: "Chemistry and Tecnology" Ed. Segunda. Academic Press New York.



ANEXOS Y APÉNDICES

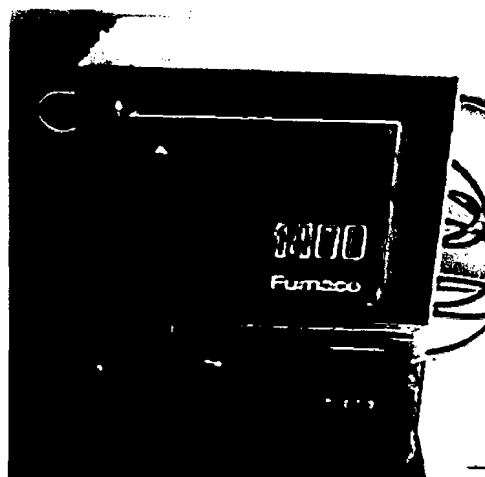


ANEXOS

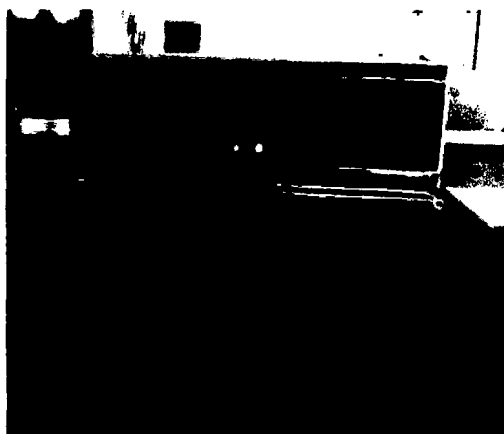
ANEXO 01. FOTOGRAFÍAS DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS EN LOS ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS



Balanza analítica marca: Ohaus, con sensibilidad de 0,0001 g



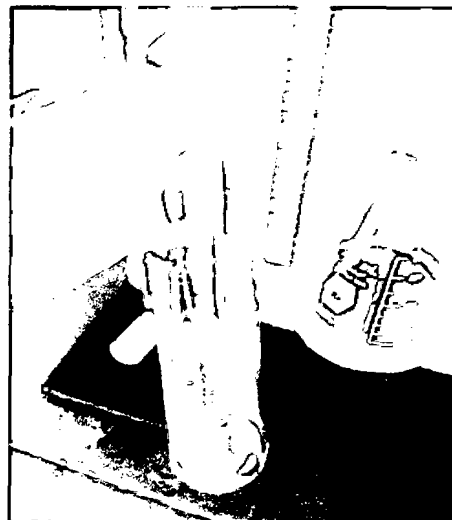
Mufla marca: Barnstead Thermolyne, modelo: FB1410M, rango de temperatura de 0 – 1100 °C



Estufa, marca: Memmert, rango de temperatura 30 – 250 °C



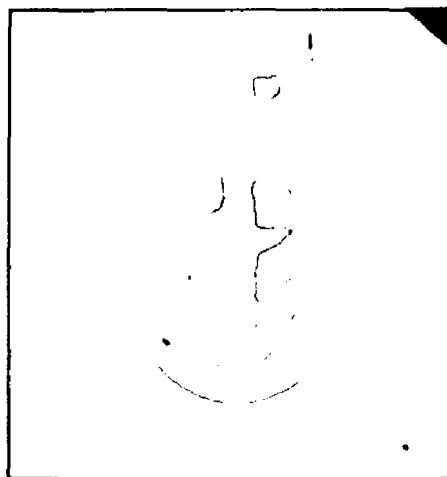
Hidrólisis acida y alcalina / filtración a vacío para determinar fibra cruda.



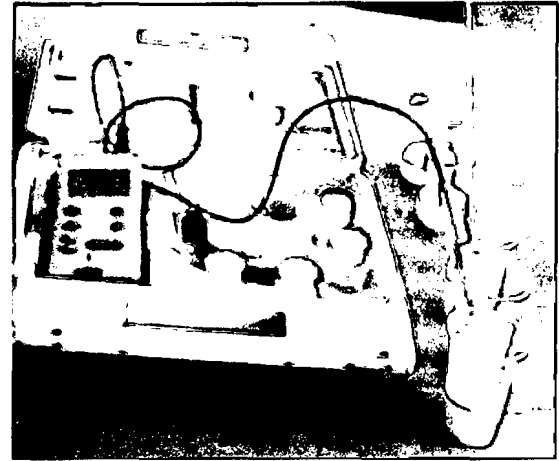
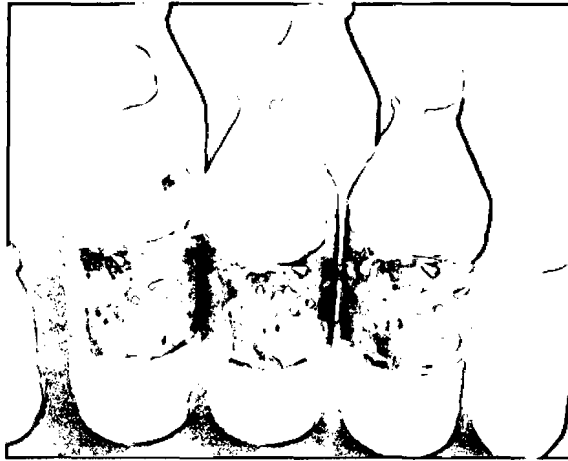
**Destilador Kjeldahl, marca: Velp Scientifica, modelo: UDK126D
(determinación de proteína en alimentos en general)**



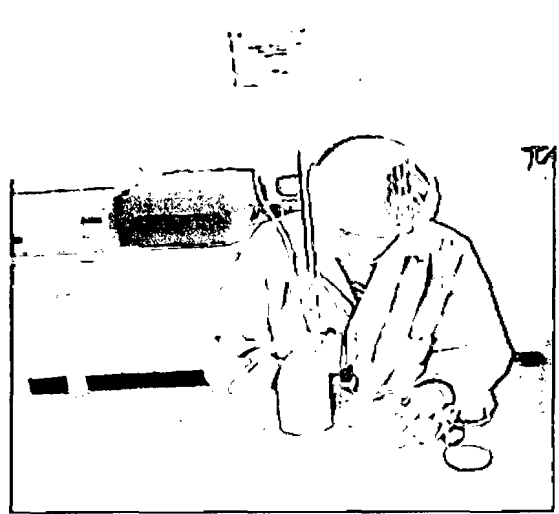
Centrifuga de Gerber, determinación de grasa leche - yogurt.



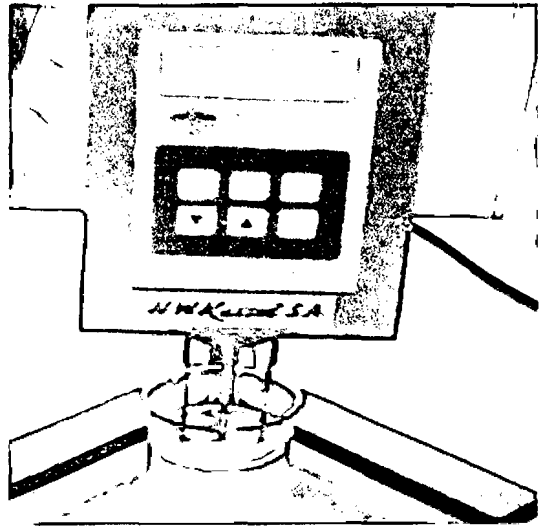
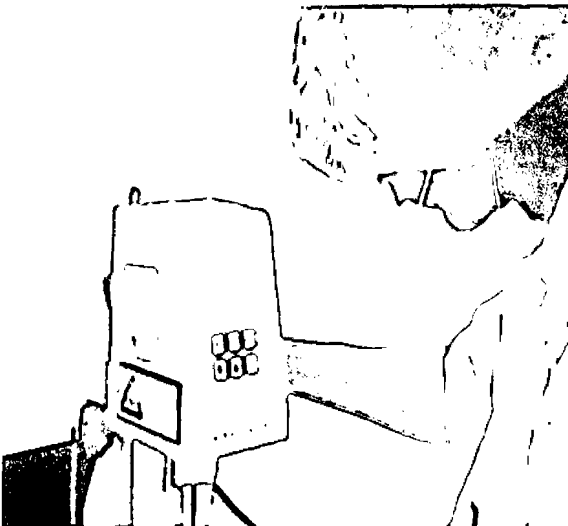
Equipo de Soxhlet (determinación de grasa productos en general)



Yogurts con extracto de kiwicha - Potenciómetro marca: SCHOTT



Determinación de pH y % de ácido láctico



Determinación de viscosidad (Viscosímetro rotacional modelo: ST – 2001).

ANEXO 02. FOTOGRAFÍAS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS (Muestras de 3 meses + 1 semana, almacenado bajo refrigeración)



**Preparación de medio YGC / CGA
(para determinar levaduras y mohos)**



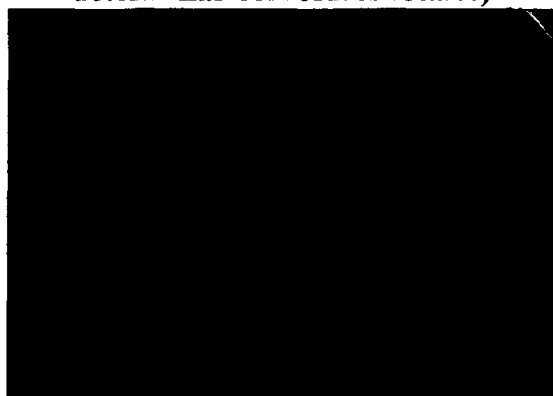
medio YGC preparado



**medio VRB preparado (para
determinar coliformes totales)**



**Medios de VRB sembradas a diferentes
diluciones**



**Resultado de muestra yogurt ML 10⁻²
(coliformes totales)**



**Resultado de muestra ML 10⁻²
(levaduras y mohos)**

Los resultados fueron determinados por conteo directo UFC/ ml, de las dos muestras ML y el control, con un tiempo de almacenamiento bajo refrigeración 3 meses + 1 semana.

ANEXO 03: CARTILLAS UTILIZADAS EN LA EVALUACIÓN SENSORIAL

Formato 01. Comparación pareada múltiple (diferencia escalar con respecto a una muestra patrón)

Nombre del juez: _____ Fecha: _____

Muestra evaluada: _____ Prueba N° _____

Se le presenta cuatro muestras de yogurt para que las compare en cuanto a su aceptabilidad. Una de las muestras está marcada con “P” y las otras con códigos. Deguste cada muestra y compárela con el patrón “P”, clasificándola según la escala 1 escribiendo su código en el casillero correspondiente. Si resulta diferente que “P”, clasifíquela con la escala 2 según sea su menor o mayor diferencia con la muestra patrón “P”.

| Escala 1 | Clasificación de Muestras | | | |
|-----------------------|---------------------------|--|--|--|
| Me agrada más que P | | | | |
| Me agrada igual que P | | | | |
| Me agrada menos que P | | | | |

| Escala 2 | Clasificación de muestras que son más o menos agradables que “P” | | | |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------|--|--|--|
| Extremadamente diferente | | | | |
| Muy diferente | | | | |
| Moderadamente diferente | | | | |
| Ligeramente diferente | | | | |

Nota: Por favor enjuagarse la boca después de cada prueba, por lo menos unos 10 segundos.

Comentario: _____

Muchas Gracias.



Formato 02. Hoja de calificaciones para una categorización cualitativa según apreciaciones hedónicas

Nombre del juez: _____ Fecha: _____

Muestra evaluada: _____ Prueba N° _____

Clasifique las cinco muestras según la escala que se presenta, escribiendo su código en el casillero correspondiente.

Acceptabilidad

| Escala | Clasificación de Muestras | | | | |
|--------------------------|---------------------------|--|--|--|--|
| Me agrada muchísimo | | | | | |
| Me agrada mucho | | | | | |
| Me agrada poco | | | | | |
| Ni me gusta ni me agrada | | | | | |
| Me desagrada poco | | | | | |
| Me desagrada mucho | | | | | |
| Me desagrada muchísimo | | | | | |

Sabor

| Escala | Clasificación de Muestras | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|--|--|--|--|
| Extremadamente Característico | | | | | |
| Muy Característico | | | | | |
| Característico | | | | | |
| Poco Característico | | | | | |
| Nada Característico | | | | | |

Color

| Escala | Clasificación de Muestras | | | | |
|-------------------------|---------------------------|--|--|--|--|
| Homogeneo | | | | | |
| Poco homogeneo | | | | | |
| Disperso con partículas | | | | | |
| Oscuro | | | | | |
| Sin color | | | | | |

Nota: Por favor enjuagarse la boca después de cada prueba, por lo menos unos 10 segundos.

Comentario: _____

Muchas Gracias.



APÉNDICE

APÉNDICE 01.

DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS QUÍMICO DE HARINA DE KIWICHA

1. Determinación de proteínas por micro Kjeldahl

Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)

1.1. Alcance y campo de aplicación

El método es aplicable a alimentos en general.

1.2. Fundamento

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en:

a) Ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, o

b) Ácido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico.

1.3. Materiales y equipos

- Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg.
- Equipo Kjeldahl
- Manto calefactor o cocina para digestión
- pH metro
- matraz erlenmeyer
- probeta y bureta

1.4. Reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado, p.a.
- Sulfato de potasio o sulfato de sodio, p.a.
- Sulfato cúprico, p.a.
- Solución de ácido sulfúrico 0,1 N.
- Solución de hidróxido de sodio al 30%. Disolver 300 g de NaOH y completar a 1 litro.
- Solución indicadora de rojo de metilo al 1% en etanol. Disolver 1g de rojo de metilo en 100 mL de etanol (95 %).
- Solución de hidróxido de sodio 0,1N. Tomar 4 g de NaOH y enrasar a 1 litro con agua recientemente hervida y enfriada. Valorar con ácido succínico.

1.5. Procedimiento del método

1.5.1. Digestión

- Realizar la muestra en triplicado.
- Efectuar un ensayo en blanco usando una sustancia orgánica sin nitrógeno (sacarosa) que sea capaz de provocar la reducción de los derivados nítricos y nitrosos eventualmente presentes en los reactivos.
- Pesar 0,2 g de muestra homogeneizada (m), con una precisión de 0,1 mg en un matraz de digestión Kjeldahl.
- Agregar 3 perlas de vidrio, 1g de sulfato de potasio o sulfato de sodio, 0,5 g de sulfato cúprico y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Calentar en manta calefactora y una vez que la solución esté transparente, dejar en ebullición 15 a 20 min. más. Si la muestra tiende a formar espuma agregar ácido esteárico o gotas de silicona antiespumante y comenzar el calentamiento lentamente.
- Enfriar y agregar 5 mL de agua.

1.5.2. Destilación

- Preparar las soluciones de NaOH al 40 % y 50mL de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N para un ensayo.
- Conectar el refrigerante y las soluciones correspondientes como NaOH al 40 % y agua destilada al equipo destilador kjeldahl.
- Finalmente poner el matraz al aparato de destilación, agregar lentamente en exceso NaOH al 40% al matraz, el equipo de kjeldahl es automático para este caso, solo se debe prender y presionar el botón de NaOH. antes de iniciar la destilación conectar 50 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.1 N, con 4 a 5 gotas de rojo de metilo en un vaso de 250 ml para recibir el destilado. Finalmente destilar no menos de 150 ml.

1.5.3. Titulación

Titular el exceso de ácido con NaOH 0.1 N hasta color amarillo.

1.6. Cálculo y expresión de resultados

$$\%N = \frac{14 * N * (Vb - Vm) * (Factor)}{M * 1000} * 100$$

Donde:

N: Normalidad del H₂SO₄

Vb: Gasto NaOH 0,1 N en el blanco y Vm: Gasto NaOH 0,1 N en la muestra.

M: Masa de la muestra, en gramos

Factor:

6,25: para carne, pescado, huevo, leguminosas y proteínas en general

5,70: para cereales y derivados de soya

6,38: leche

Repetibilidad del método: La diferencia entre los resultados de dos determinaciones efectuadas una después de otra, por el mismo analista, no debe exceder 0,06 % de Nitrógeno o 0,38 % de proteína.

2. Determinación de carbohidratos

Este compuesto se determino por diferencia según la AOAC, como sigue:

$$\% \text{ carbohidratos} = 100 - (\% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \text{fibra bruta})$$



3. Determinación de grasa (Método Soxhlet)

Método 31.4.02 (A.O.A.C, 2000).

3.1. Campo de aplicación

El método es aplicable a alimentos que han sido sometidos a tratamientos térmicos y granos previamente molidos, para los cuales se desea extraer la totalidad de la grasa.

3.2. Principio

Una cantidad previamente homogeneizada, medida o pesada del alimento se somete a una hidrólisis ácida con HCL concentrado para separar la materia grasa de los hidratos de carbono o proteínas, la que luego es absorbida por la celite. Posteriormente, se realiza la extracción total de la materia grasa por soxhlet.

3.3. Materiales y Equipos

- Matraz erlenmeyer de 250 ml
- Perlas de vidrio
- Sistema refrigerante
- Papel filtro o dedal de celulosa, pipeta
- Sistema extractor Soxhlet
- Estufa de aire a $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Balanza analítica
- *Material usual de laboratorio*

3.4. Reactivos

- Éter de petróleo P.E. 40-60 °C p.a

3.5. Determinación

- Secar un matraz de soxhlet de 250 ml en estufa a peso constante a 120°C por 15 min y enfriar en el desecador y pesar en la balanza.
- Pesar 2 a 5 gramos de muestra, previamente homogeneizada y incorporar la muestra seca a un dedal de celulosa o envolver en papel filtro.

- Colocar el dedal en el tubo de extracción y adicionar el solvente al matraz previamente tarado.
- Extraer la muestra con solvente por 6 a 8 horas a una velocidad de condensación de 3-6 gotas/seg. Cuando se completa la extracción eliminar el solvente en rota vapor o evaporando con precaución bajo campana, hasta que se evapore todo el éter.
- Secar el matraz en estufa a $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30min, enfriar en desecador y pesar.

3.6. Cálculo y expresión de resultados

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{M2 - M1}{M} * 100$$

Donde:

M: peso de la muestra

M1: peso del matraz solo

M2: peso matraz con grasa.

Los resultados se informan en % de materia grasa.

Repetibilidad: La diferencia de los 3 resultados no debe ser superior al 2 % del promedio.

4. Determinación de humedad (Método gravimétrico)

Método aplicado (NTP 209.264 – 2001)

4.1. Alcance y campo de aplicación

El método es aplicable a alimentos sólidos, líquidos o pastosos no susceptibles a degradación al ser sometidos a temperaturas superiores a 105°C , hasta su peso constante. El contenido de agua de un producto se define como la pérdida de masa que experimenta en condiciones determinadas.

4.2. Fundamento

El método se basa en la determinación gravimetría de la pérdida de masa, de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire.



4.3. Materiales y equipos

- Balanza analítica, sensibilidad 0.1 mg
- Capsulas de vidrio con tapa
- Desecador
- Estufa regulada a 103 ± 2 °C
- Espátula y pinzas

4.4. Procedimiento

- Colocar la cápsula destapada y la tapa durante al menos 1 hora en la estufa a la temperatura de secado del producto.
- Empleando pinzas, trasladar la cápsula tapada al desecador y dejar enfriar durante 30 a 45 min. Pesar la cápsula con tapa con una aproximación de 0,1mg registrar (m_1).
- Pesar 2g de muestra previamente homogeneizada. Registrar (m_2).
- Colocar la muestra con cápsula destapada y la tapa en la estufa a la temperatura y tiempo recomendado 105 °C x 5 horas.
- Tapar la cápsula con la muestra, sacarla de la estufa, enfriar en desecador durante 30 a 45 min.
- Repetir el procedimiento de secado por una hora adicional, hasta que las variaciones entre tres pesadas sucesivas no excedan de 5 mg (m_3).

4.5. Cálculo y expresión de resultados

La humedad del producto expresada en porcentaje, es igual a:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} * 100$$

Donde:

m_1 : masa de la cápsula vacía y de su tapa, en gramos

m_2 : masa de la cápsula tapada con la muestra antes del secado, en gramos

m_3 : masa de la cápsula con tapa más la muestra desecada, en gramos

5. Determinación de cenizas

Método (NTP 209.265 – 2001)

5.1. Materiales

- crisoles
- 1 desecador
- 1 pinzas largas
- 1 par de guantes de asbesto
- 1 mufla
- 1 balanza analítica
- 1 espátula
- Muestra de harina seca
- 1 mechero de Bunsen
- Cerillos
- 1 tela de alambre
- 1 soporte con anillo

5.2. Procedimiento

- Maneje siempre los crisoles con pinzas
- Ponga a peso constante un crisol o cápsula de porcelana por cada muestra que se va a analizar, lo cual significa dejarlo durante 15 minutos en la mufla a una temperatura de 550 a 600 °C.
- Deje enfriar el crisol en un desecador durante 15 a 20 minutos. Procure no cerrar el desecador totalmente, ya que el calor de los crisoles puede provocar que la tapa se proyecte y se rompa.
- Pese el crisol en balanza analítica e identifíquelo con el número que tiene marcado en la parte inferior. Pese en el crisol 1-2 gramos de la muestra (sobre todo si va a determinar Ca y P) de la muestra seca. Registre el peso exacto.
- Pre incinere la muestra exponiéndola a la flama del mechero de Bunsen
- Incinere la muestra en la mufla precalentada entre 550 y 600°C durante 2 horas.
- Pese el crisol con cenizas (ya no deben estar negras, si lo están incinere otra media hora) en la misma balanza que utilizó inicialmente. Anote el peso.

5.3. Cálculo y expresión de resultados

$$\% \text{ Cenizas} = \left(\frac{P_1}{P} \right) * 100$$

Donde:

P: Peso de la muestra = (Peso del crisol con muestra - Peso del crisol vacío)

P₁: Peso de las cenizas = (Peso del crisol con cenizas - Peso del crisol vacío)

% de materia orgánica = 100 - % Cenizas base seca



6. Determinación de fibra cruda

Método 7.073 (A.O.A.C. 1984)

El simple término de fibra puede ser tomado como indicativo de fibra cruda. La fibra cruda es el residuo orgánico que no es digerido en una hidrólisis ácida o básica en condiciones estandarizadas, el residuo consiste fundamentalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina, pero no contabiliza cuantitativamente las cantidades totales de celulosa y lignina presentes en la muestra

6.1. Procedimiento

A 2 g de muestra se le extrae la grasa, si es menor del 1 % se puede omitir la extracción.

Transferir a un vaso de 600 mL y evitar la contaminación con la fibra del papel. Adicionar 200 mL de ácido sulfúrico al 1,25 % hirviendo, colocar el vaso en el aparato sobre la placa caliente pre ajustada para que hierva exactamente 30 minutos girar el vaso periódicamente para evitar que los sólidos se adhieran a las paredes, quitar el vaso y filtrar a través de papel, enjuagar el vaso con 50 – 70 mL de agua hirviendo y verterla sobre una tela de algodón, lavar el residuo tantas veces como sea necesario, hasta que las aguas de lavado tengan un pH igual al del agua destilada, transferir el residuo al vaso con ayuda de 200 mL de sosa al 1,25 % hirviendo y calentar a ebullición exactamente 30 min. Quitar el vaso y filtrar en buchner con papel filtro de peso conocido. Lavar con agua hasta que las aguas de lavado tengan un pH igual al del agua, transferir el residuo a un crisol a peso constante y secar a 130 °C por 2 hrs enfriar y determinar el peso. Calcinar a 600 °C durante 3 - 5 horas, enfriar y determinar el peso.

6.2. Cálculo y expresión de resultados

El % de fibra cruda se calcula de la siguiente manera.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \frac{P1 - P2 - P3}{M} * 100$$

Donde:

P1: Peso de crisol despues de estufa

P2: peso de papel filtro

P3: peso de crisol despues de mufla

M: peso de muestra.



APÉNDICE 02.

DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS QUÍMICO DE LA LECHE FRESCA ENTERA

1. Determinación de humedad

Método (NTP 209.264 – 2001)

2. Determinación de cenizas

Método (NTP 209.265 – 2001)

2.1. Tratamiento de la muestra

Para la determinación de cenizas, en la leche se deberá realizar un tratamiento especial, es decir evaporar y luego carbonizar antes de introducir al equipo de mufla, los pasos de operación y cálculo, son las mismas ya descritos anteriormente.

3. Determinación de proteínas por micro Kjeldahl

Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)

3.1. Preparación de la muestra

Pesar 1g de muestra en un vaso limpio seco y tarado, una vez pesado adicionar 3-5 ml de agua destilada y agitar para su homogeneización, este se realiza para facilitar el ingreso de la muestra a matraz de digestión de kjeldahl. Los pasos siguientes se aplica según el método descrito anteriormente.

4. Determinación de grasa

Norma Internacional FIL-IDF 22: 1963. (Método Gerber)

4.1. Principio

Liberación total de la grasa por disolución de las sustancias proteicas, separación de la grasa por centrifugación y posterior medida volumétrica de ésta. Aplicable a leche natural, pasterizada y esterilizada.



4.2. Material y aparatos

- ✓ Pipetas aforadas de 11 ml.
- ✓ Dosificador de émbolo de 10 ml para el ácido sulfúrico.
- ✓ Baño de agua regulable a 65°C.
- ✓ Centrífuga Gerber.
- ✓ Butirómetros original Gerber.
- ✓ Tapones de caucho.
- ✓ Centrífuga de gerber
- ✓ Empujador metálico.

4.3. Reactivos

- ✓ Acido Sulfúrico 90-91% según Gerber RE
- ✓ Alcohol iso-Amílico según Gerber mezcla de isómeros RE

4.4. Procedimiento

Colocar en el butirómetro 10 ml de Ácido Sulfúrico 90-91% según Gerber RE y agregar 11 ml de leche con cuidado y lentamente para que no se mezclen, observándose claramente la separación de ambas capas, ácida y de leche.

Agregar a continuación 1 ml de Alcohol iso-Amílico según Gerber mezcla de isómeros RE (con dosificador) y cerrar el butirómetro. Agitar enérgicamente, envuelto en un paño para evitar posibles proyecciones hasta la total disolución de la fase proteica de la leche. Verter y dejar en reposo algún tiempo para observar mejor si la disolución ha sido completa. Llevar a la centrífuga durante 5 minutos. Sacar de la centrífuga con cuidado para no mover la capa superior de grasa ya separada. Colocar en el baño (65 °C) durante 5 minutos. Sacar y leer rápidamente.

4.5. Cálculo

Se lee con rapidez directamente en la escala del butirómetro.

5. Determinación de carbohidratos

Por diferencia de la composición % de humedad, ceniza, proteína y grasa.

APÉNDICE 03.

DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS QUÍMICO DEL YOGURT

1. Determinación de humedad

Método (NTP 209.264 – 2001)

2. Determinación de cenizas

Método (NTP 209.265 – 2001)

2.1. Preparación de la muestra

Para la determinación de cenizas, en el yogurt se deberá realizar un tratamiento especial similar a la leche fresca, es decir evaporar y luego carbonizar antes de introducir al equipo de mufla, los pasos de operación y cálculo, son las mismas ya descritos anteriormente.

3. Determinación de proteínas por micro Kjeldahl

Método 12.1.07 (A.O.A.C, 2000)

3.1. Preparación de la muestra

Pesar 1g de muestra en un vaso limpio seco y tarado, posteriormente adicionar 5 ml de agua destilada y agitar para su homogeneización, este se realiza para facilitar el ingreso eficaz de la muestra al matraz de digestión de kjeldahl. Los pasos siguientes se aplica según el método descrito anteriormente.

4. Determinación de fibra cruda

Método 7.073 (A.O.A.C. 1984)

Para este análisis, después de realizar la hidrólisis alcalina y filtración, se filtró nuevamente con etanol caliente para eliminar el residuo de la grasa que puede contener la fibra, luego el procedimiento para su cálculo es el mismo descrito en el apéndice 01.

5. Determinación de carbohidratos

Por diferencia según la AOAC.



6. Determinación de grasa

(Método Acido-Butirométrico, Norma Chimie Ministerio de Agricultura francés XIV- 3).

Elaborado por PANREAC QUIMICA, S.A. Métodos oficiales de análisis de alimentos. Leche y productos lácteos. 2009. Pág. 113.

6.1. Preparación de la muestra

Dentro de un frasco aforado, pesar con precisión aproximada de 2 mg, alrededor de 50 g de muestra preparada. Completar a 100 mL con Agua PA-ACS. Agitar y proceder a transvasamientos sucesivos para obtener la solución lo más homogénea posible.

6.2. Determinación

Los procedimientos una vez preparado la muestra se realiza similar a la leche fresca, según el método de Gerber.

6.3. Expresión de resultados

El contenido en materia grasa del producto examinado, expresado en porcentaje en masa se obtiene aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{n1 - n}{M} * 100$$

Donde:

n1: representa el valor alcanzado por el nivel superior de la columna grasa.

n : representa el valor alcanzado por el nivel inferior de la columna grasa.

M : la masa en g del producto.

6.3.1. Precisión

La desviación máxima entre los resultados obtenidos de determinaciones paralelas efectuadas por dos operadores debe ser de 0,05 g por 100 g de producto.

APÉNDICE 04.

1. DETERMINACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se determina los microorganismos en ufc/g existentes en leches fermentadas por los siguientes métodos.

1.1. Método horizontal para el recuento de levaduras y mohos

PNT – AL – 006 Basado en la norma XF V 08-059 (Noviembre 1995)

a) Definición

Levaduras: Microorganismos aerobios mesófilos que, en cinco días, a 25°C, se desarrollan en la superficie del medio sólido, formando colonias mates o brillantes, presentando frecuentemente contorno regular y una superficie más o menos convexa cuando el ensayo se realiza según el siguiente método, (ver figura A).

Mohos: Microorganismos aerobios mesófilos, filamentosos, que en la superficie de medio sólido a 25°C, desarrollan colonias cuando el ensayo se realiza según el siguiente método, este desarrollo puede proceder de la germinación de esporas o del crecimiento de fragmentos micelares.

b) Medio de cultivo

Agar glucosa y cloranfenicol (CGA) con gentamicina.

c) Siembra

- ✓ Sembrar 0.1 ml de muestra líquida o 0.1 ml de dilución madre en placas petri con el medio CGA.
- ✓ Extender con asa de Drigalki
- ✓ Repetir la operación con las siguientes diluciones decimales
- ✓ Incubar a 25°C ± 1°C durante 5 días.

d) Recuento

- ✓ Contar las colonias de cada placa a los 3, 4 y 5 días de incubación.

e) Expresión de resultados

- ✓ Después de 5 días de incubación, retener las placas que contengan un máximo de 100 colonias, al nivel de dos diluciones sucesivas.
- ✓ Calcular el número N de levaduras y mohos por mililitro o por gramo con la expresión:

$$N = \frac{\sum C}{0.11 * d}$$

Donde:

- ✓ $\sum C$: suma de las colonias contadas en todas las placas retenidas
- ✓ d: nivel de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

1.2. Método horizontal para el recuento de coliformes totales – técnica por recuento de colonias

PNT – AL – 011 Basado en la norma ISO 4832 (Julio 1991)

Coliformes: Bacterias que a 30 °C son capaces de fermentar la lactosa cuando el ensayo se realiza según el siguiente método, (ver figura B).

a) Medio de cultivo

Agar lactosado con bilis al cristal violeta y rojo neutro (VRBL).

b) Siembra

- ✓ Sembrar por duplicado 1 ml de muestra líquida o 1 ml de dilución madre en placas petri estériles.
- ✓ Repetir esta operación con 1 ml de cada una de las siguientes diluciones decimales
- ✓ Verter 15 ml de VRBL a 45°C ± 2°C
- ✓ Mezclar y dejar solidificar
- ✓ Preparar de la misma manera una placa testigo, para controlar la esterilidad del medio
- ✓ Cubrir con 4 ml del mismo medio a 45°C ± 2°C
- ✓ Dejar solidificar e incubar a 30°C ± 1°C durante 24 h ± 2 h.

c) Recuento

- ✓ Contar las colonias características de coliformes (de diámetro ≥ 0.5 mm, de color rojo-violeta y a veces rodeadas de un halo de precipitación) en las placas que contengan menos de 100 colonias características y/o no características.

d) Expresión de resultados

- ✓ Retener las placas que contengan un máximo de 100 colonias características, al nivel de dos diluciones sucesivas.
- ✓ Calcular el número N de coliformes por mililitro o por gramo de producto con la expresión:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1 * n_2) * d}$$

Donde:

- ✓ $\sum C$: suma de las colonias contadas en todas las placas retenidas
- ✓ n_1 : numero de placas retenidas en la primera dilución
- ✓ n_2 : numero de placas retenidas en la segunda dilución
- ✓ d: nivel de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

e) Referencia

- Allaert V. Corrie y Escola R. Martha (2002). “Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos”. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid – España.

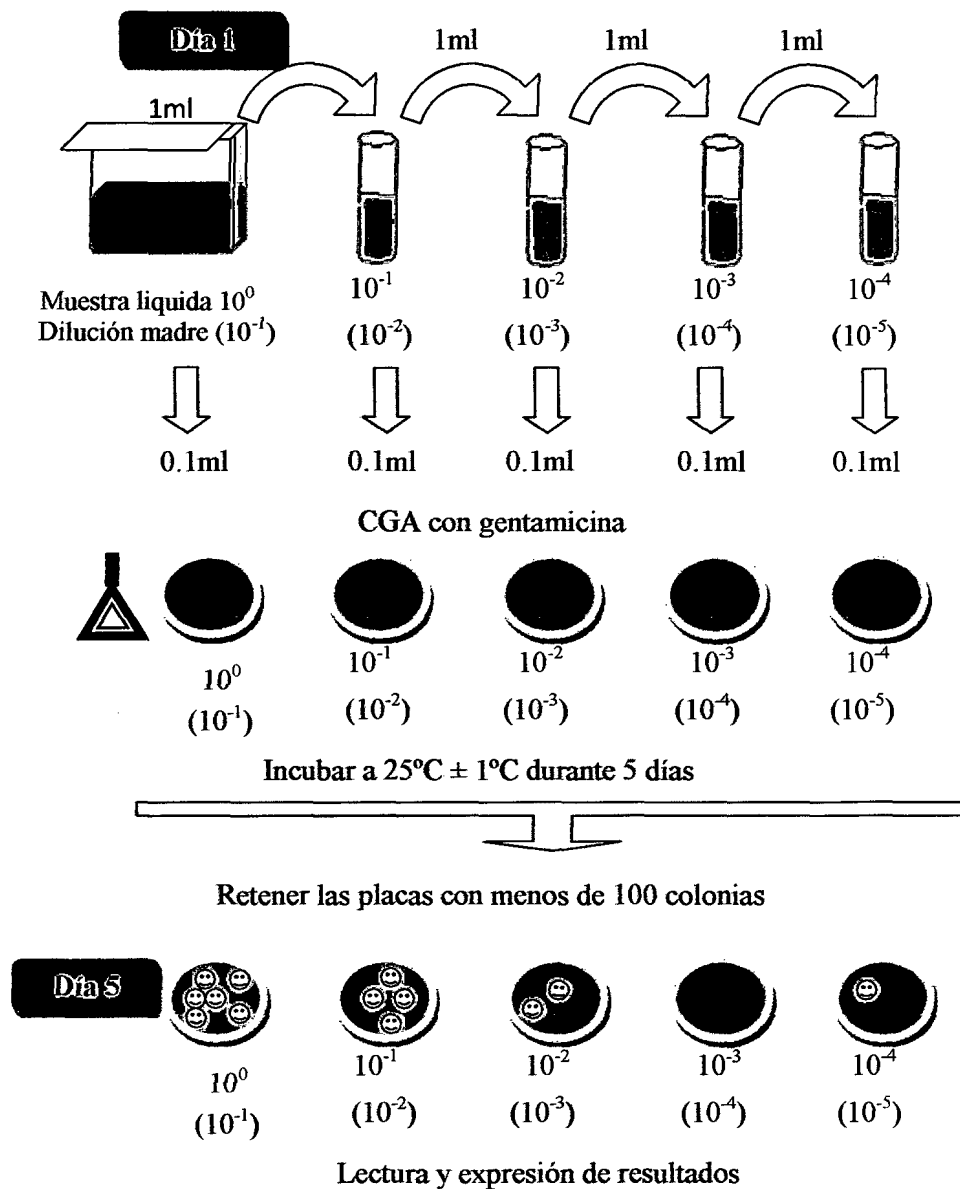


Figura A: Procedimiento para recuento de levaduras y mohos

f) Referencia

- Allaert V. Corrie y Escola R. Martha (2002). “Métodos de Análisis Microbiológicos de Alimentos”. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid – España.

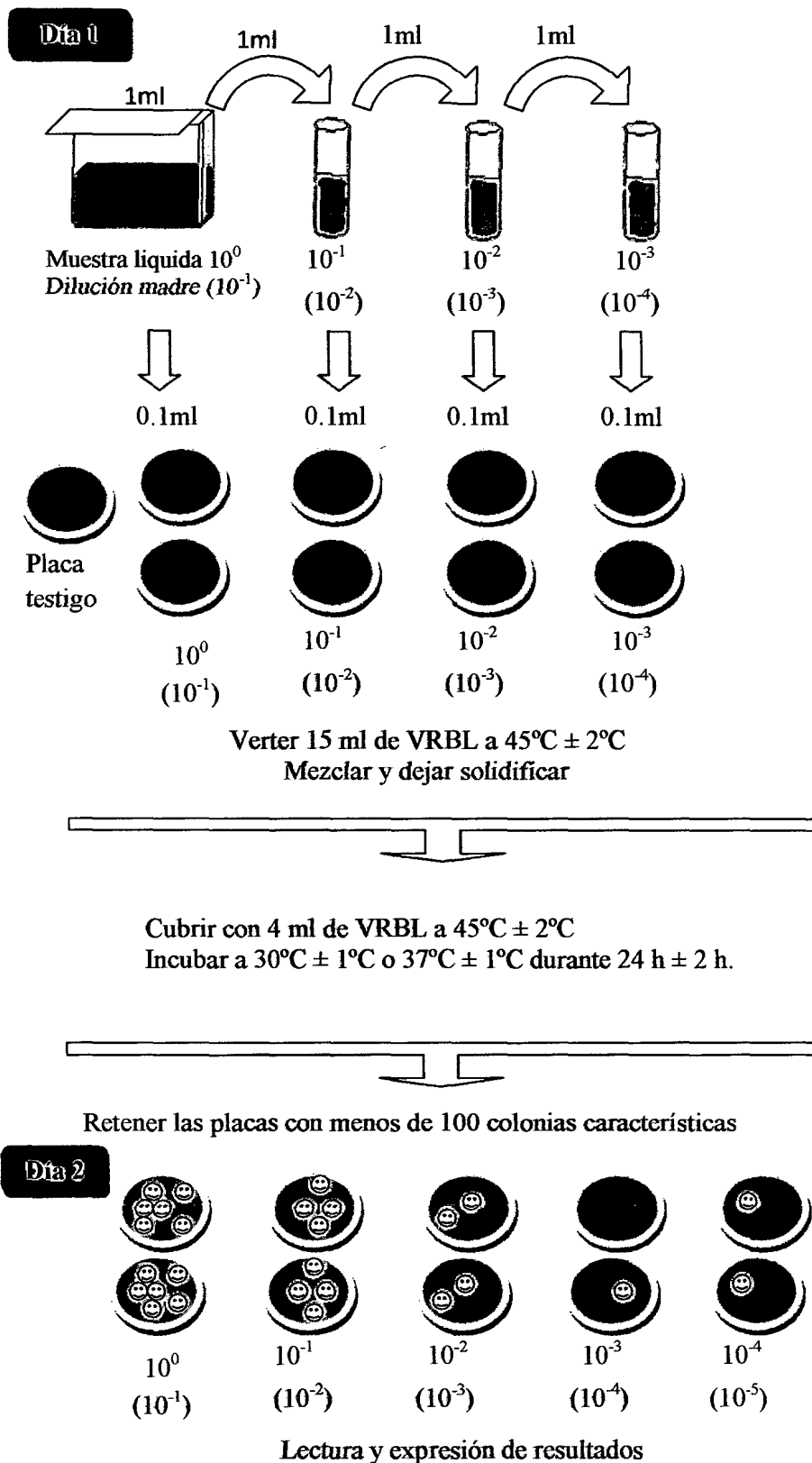


Figura B: Procedimiento para el recuento de coliformes totales – técnica por recuento de colonias

APÉNDICE 05.

LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. Yogur o yogurt

Requisitos

1. OBJETIVO

Esta norma técnica peruana establece los requisitos para el yogur o yogurt

2. REFERENCIAS NORMATIVAS

- 2.1. Norma técnica peruana
NTP 209: 038: 2003 ALIMENTOS ENVASADOS. Etiqueta
- 2.2. FIL-IDF 94B:1190 MILK AND MILK PRODUCTS. Enumeration Of Yeats & Moulds, Colony Count Technique At 25 °C.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma técnica peruana se aplica a las diversas etapas de producción y comercialización de yogur.

4. DEFINICIONES

4.1. Yogur o yogurt:

Se define como "el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada pasteurizada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo, proteínas de suero, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de leche". Cultivos de bacterias adecuadas productoras de ácido láctico, además de los cultivos esenciales como son el *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, los microorganismos presentes en el producto final deberán ser apropiadas y abundantes.

El yogurt puede ser clasificado según el método de elaboración, por el sabor y el contenido de grasa.

4.2. Por el método de elaboración

- a) **Yogurt aflanado.**- Es el yogurt con apariencia de flan que posee una consistencia firme, gelificada, que deja una superficie limpia al cortarlo, puede

contener colorantes, edulcorantes y saborizantes que se añaden antes de la inoculación; en este tipo de yogurt, la fermentación se realiza luego del envasado en el recipiente de venta al consumidor. Se elabora con leche cuyo contenido de sólidos totales es de 15 a 16 %.

- b) **Yogurt batido.**- Es un producto de consistencia suave y espesa, suficientemente viscosa para mantener en suspensión la fruta durante la vida útil del producto. Luego de la fermentación en grandes tanques se procede a romper el coagulo mediante batido, se le adiciona fruta jarabeada, edulcorantes y colorantes, y finalmente se procede al envasado. Se elabora con leche con un contenido de sólidos totales de hasta 14 %.
- c) **Yogurt bebible o para beber.**- Llamado también yogurt liquido, es una bebida fluida, de baja densidad que se separa mezclando yogurt con zumo de fruta y/o saborizante y azúcar. Resulta claramente refrescante y suele contener muy poca grasa. Luego de la fermentación se rompe el coagulo batiéndolo y se añade zumo de fruta o saborizante, azúcar y un estabilizador, seguidamente se pasteuriza y envasa. Se elabora con leche con un contenido de sólidos totales de hasta 12,5%.

4.3. Por el sabor

- a) **Yogurt natural.**- Es aquel que no tiene adición de azúcar, fruta, saborizantes y colorantes, permitiéndose solo la adición de estabilizantes y conservadores.
- b) **Yogurt azucarado.**- El anterior pero que ha sido añadido con azúcar
- c) **Yogurt edulcorado.**- El primero en donde que se le ha añadido edulcorantes autorizantes.
- d) **Yogurt saborizado o aromatizado.**- Es aquel que tiene saborizantes naturales o artificiales y otros aditivos permitidos por la autoridad sanitaria.
- e) **Yogurt frutado.**- Es aquel que tiene el agregado de fruta jarabeada, ya sea en trozos o en forma de pulpa o zumo.

4.4. Por el contenido de grasa

- a) **Yogurt entero.**- Es aquel que se prepara con leche en el cual el contenido de grasa es igual o más de 3 %.
- b) **Yogurt semidescremado.**- Es el que se prepara con leche cuyo contenido de grasa se encuentra entre 1 y 2,9 %.
- c) **Yogurt descremado.**- Es el yogurt que se prepara con leche con un contenido de grasa menor a 1 %.

5. REQUISITOS

5.1. Requisitos generales

- 5.1.1. La grasa de la leche no podrá ser sustituida por grasa de origen no lácteo.
- 5.1.2. Inmediatamente después de su elaboración se deberá mantener el producto en refrigeración hasta su consumo, a una temperatura de 7 °C o menos.
- 5.1.3. Al yogurt frutado o saborizado naturalmente se les podrá añadir hasta un 25 % como máximo de ingredientes no lácteos especificados en el apartado 6.4 de esta NTP.

5.2. Requisitos de identidad

| Requisito | Recuento | Método |
|--------------------------------------|---------------|--------------------|
| Bacterias lácticas totales (ufc / g) | Mínimo 10^7 | FIL-IDF 117B: 1997 |

5.3. REQUISITOS FISICOQUÍMICOS

| Requisito | Yogurt entero | Yogurt parcialmente descremado | Yogurt descremado | Métodos de ensayo |
|------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------------|---------------------|
| Materia grasa % (m/m) | Mínimo 3.0 | Mayor | Máximo 0.5 | FIL-IDF 116A : 1987 |
| Sólidos no grasos % (m/m) | Mínimo 8.2 | Mínimo 8.2 | Mínimo 8.2 | (*) |
| Acidez expresado en g de ácido láctico % (m/m) | 0.6 - 1.5 | 0.6 - 1.5 | 0.6 - 1.5 | FIL-IDF 150 : 1991 |

5.4. Ingredientes

Al yogurt se le podrá agregar frutas, pulpa de frutas, compota, zumo (jugo) de frutas, miel, chocolate, cacao, nueces, café, azúcar, especias y otros ingredientes aromatizantes naturales inocuos.

5.5. Aditivos alimentarios

Se podrán utilizar los saborizantes, colorantes, estabilizantes y conservadores permitidos por el *Codex Alimentarios* en su versión vigente para este producto, así como aquellos permitidos por la entidad sanitaria nacional competente.

5.6. Requisitos microbiológicos

| Requisitos | n | m | M | c | Método de ensayo |
|---------------------------|---|----|-----|---|-------------------|
| Coliformes ((NMP/ g ó ml) | 5 | <3 | 10 | | FIL-IDF 73B: 1998 |
| Mohos (ufc/ g ó ml) | 5 | 10 | 100 | 1 | FIL-IDF 94B:1990 |
| Levaduras (ufc/ g ó ml) | 5 | 10 | 100 | 1 | FIL-IDF 94B:1990 |

DONDE:

n: es el número de unidades de muestra de un lote de alimentos que deben ser examinados, para satisfacer los requerimientos de un plan de muestreo particular.

m: es un criterio microbiológico, el cual en una plan de muestreo de dos clases, separa buena calidad de calidad defectuosa, o en otro plan de tres clases, separa buena calidad de calidad marginalmente aceptable. En general "m" representa un nivel aceptable y valores sobre el mismo que son marginalmente aceptables o inaceptables.

M: Es un criterio microbiológico, que en un plan de muestreo de tres clases, separa calidad marginalmente aceptable de calidad defectuosa. Valores mayores a "M" son inaceptables.

c: Es el número máximo permitido de unidades de muestra defectuosa. Cuando se encuentra cantidades mayores de este número el lote es rechazado.

Plan de muestreo: Es la relación de los criterios de aceptación d que se aplicaran a un lote basados en el análisis, por métodos específicos, del número necesario de unidades de muestra.

Nota: Si es un plan de muestreo de dos clases se requieren los valores de n, c y m y en uno de tres clases se requieren los valores de n, c, m, y M.

5.7. INSPECCIÓN, MUESTREO Y ANÁLISIS

Tomar de lote 200 envases en forma aleatoria para inspeccionar los cierres y el hinchamiento. Si no se encuentran envases defectuosos se procederá a efectuar el muestreo para los ensayos correspondientes.

Para el muestreo de los requisitos fisicoquímicos se utilizarán los planes de muestreo establecidos en la norma FIL-IDF 113 A: 1991.

Para el muestreo de los requisitos microbiológicos y sensoriales, se tomara una muestra de 10 envases para los ensayos de laboratorio (cinco para cada

análisis, respectivamente), debiendo tomarse muestras similares para las partes interesadas.

Si durante la inspección de los 200 envases, se encontraran unidades defectuosas, las partes interesadas podrán acordar someter el lote a una inspección total. Si el número de envases defectuosos es igual o mayor que 1 % se rechaza el lote.

5.8. ENVASE Y ROTULADO

5.8.1. ENVASE

El yogurt deberá estar envasado herméticamente de tal forma que durante su almacenamiento, transporte y comercialización, quede protegido de alteraciones que disminuyan la calidad del producto. La inocuidad del material de envase se sujetara a lo señalado por la autoridad sanitaria competente.

5.8.2. ROTULADO

El rotulo deberá cumplir con lo especificado en la NTP 209.038 y en las disposiciones legales vigentes sobre rotulado.

5.9. ANTECEDENTE

NTP 202.092: 2002 LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS. Yogur o yogurt. Requisitos.