

## PRACTICA DE FABRICACION DE YOGUR

M. J. Molina Rubio; M. M. de la Fuente García-Soto

### OBJETIVOS

1. Aplicar y comprobar los fundamentos teóricos estudiados.
2. Fabricar yogur con las bacterias lácticas: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*
3. Comparar las propiedades químicas y organolépticas.
4. Observar al microscopio distintas especies de bacterias lácticas productoras de yogur.

### INTRODUCCIÓN

El yogur es un alimento con un contenido nutricional equilibrado. Es un producto fabricado mediante fermentación y es el resultado de la acidificación controlada de la leche. Tal acidificación ocurre cuando la lactosa (disacárido de la leche de fórmula  $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) (Figura 5), es transformada en ácido láctico, lo que hace que el producto resulte conveniente para la dieta de quienes sufren de intolerancia a la lactosa, enfermedad causada por la carencia del enzima llamada lactasa.

El proceso de fermentación láctica (Figura 7) de la leche es realizado por dos bacterias específicas asociadas: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Estas bacterias lácticas se cultivan en leche previamente pasteurizada, con el fin de eliminar total o parcialmente la flora microbiana preexistente.

Un yogur de calidad debe tener al menos 2 millones de organismos vivos por gramo de producto o bien ( $2 \times 10^6$ - $10^7$  UFC/mL).

La parte lipídica del producto fermentado sigue siendo casi idéntica a la de la leche original, mientras que las proteínas (caseína de la leche) se hidrolizan parcialmente y por lo tanto, resultan más digeribles. En el yogur las proteínas del suero (lactoalbúmina y lactoglobulina) permanecen dentro del producto y la presencia simultánea de lactosa y ácido láctico permite que los oligoelementos tales como calcio y fósforo, que se encuentran en abundancia en la leche y en el yogur, resulten más disponibles para ser asimilados.

### 1. FABRICACION DE YOGUR

#### MATERIAS PRIMAS

- ❖ Leche pasteurizada o esterilizada.
- ❖ Cultivo iniciador de la fermentación : yogur comercial

#### MATERIAL Y REACTIVOS

- ❖ Ácido Láctico :  $CH_3CHOHCOOH$  ( $K_a = 3,16 \times 10^{-4}$ )



- ❖ Solución de hidróxido sódico N/9 (Sosa Dornic): Disolver 4,45 g de NaOH en 600 mL de agua destilada, una vez disueltos, enrasar hasta 1 L
- ❖ Solución de fenolftaleína al 1% en etanol: Disolver 1 g de fenolftaleína en 100 mL de alcohol etílico del 96 %.
- ❖ Etanol al 96%
- ❖ Reactivos para Tinción Gram : Cristal violeta, Lugol, Safranina
- ❖ Agua destilada
- ❖ Papel pH
- ❖ Agar MRS para lactobacilos; formado por peptona, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, tween 80, citrato amónico, acetato sódico, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato dipotásico y agar.
- ❖ Xileno

- ❖ Bureta
- ❖ Matraz Erlenmeyer
- ❖ Pipetas de 10 mL estériles
- ❖ Pipetas desechables de 1 mL
- ❖ Pipetas Pasteur
- ❖ Matraces estériles de 50 mL de capacidad
- ❖ Portaobjetos y cubreobjetos
- ❖ Asas de siembra desechables
- ❖ Mechero bunsen

#### EQUIPOS

- ❖ Baño termostatzado a 41°C con agitación
- ❖ Estufa Bacteriológica de incubación.
- ❖ Microscopio de Contraste de Fases y de Campo claro y aceite de inmersión
- ❖ Balanza de precisión.
- ❖ Agitador de tubos.
- ❖ pH – metro

#### PROCEDIMIENTO

*Nota importante: Todo el material utilizado está esterilizado. Hay que trabajar en ambiente aséptico (junto al mechero).*

1. A una batería de 4 matraces estériles se añade con pipeta estéril 30 mL de leche pasteurizada o esterilizada en cada uno de ellos.
2. Los matraces 1 y 2 son inoculados mediante el asa de siembra con el cultivo iniciador de la fermentación procedente del yogur comercial. El cultivo iniciador (estárter) esta formado por bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

La cantidad mínima de siembra varía, según la vitalidad de los cultivos, entre 0.5 -1% hasta 5 -7%; no deben sobrepasarse estos valores, ya que si no el aporte de ácido láctico y de leche cuajada puede llegar a ser demasiado importante e incluso la acidificación puede ser demasiado rápida.

3. Incubar los matraces 1 y 3 en estufa a 41 °C 24 horas y los matraces 2 y 4 en baño termostatzado a 41 °C y con agitación el mismo tiempo.

La fase de incubación corresponde al desarrollo de la acidez del yogur, y depende de dos factores: la temperatura y el tiempo. La temperatura debe elegirse próxima a la temperatura óptima de desarrollo del *Streptococcus thermophilus*, es decir entre los 41-45°C, más que a una temperatura próxima a la óptima del *Lactobacillus bulgaricus*, 47-50°C ya que es preferible que los *Streptococcus* inicien la fermentación, por otro lado una temperatura entre 41 - 45°C asegura una simbiosis óptima.

4. Pasado el tiempo de incubación se comprueba que ha habido fermentación láctica por la coagulación (por disminución del pH) de la caseína de la leche en los matraces inoculados.
5. Después de la fermentación, el yogur se enfría a una temperatura entre 1-10°C, excluyendo cualquier otro tratamiento térmico.

En los matraces control 3 y 4 se observa el mantenimiento de las características organolépticas propias de la leche.

Tabla 1. Procedimiento de trabajo

MATRAZ	LECHE	INOCULO	INCUBACION
1	30 mL	Lactobacillus spp Streptococcus spp.	Estufa a 41°C
2	30mL	Lactobacillus spp Streptococcus spp.	Baño a 41°C agitación
3	30mL	control	Estufa a 41°C
4	30mL	control	Baño a 41°C agitación

## 2. COMPARACION DE LAS PROPIEDADES DE LOS YOGURES FABRICADOS EN LAS DISTINTAS CONDICIONES

### PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

Observar los distintos productos y anotar sus características organolépticas en la siguiente tabla.

Tabla 2. Propiedades organolépticas

MATRAZ	ACIDEZ	ASPECTO	TEXTURA	Nº DE FASES	OLOR	SABOR
1						
2						
3						
4						

## ✚ DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ

### Fundamento

La acidez es debida fundamentalmente al ácido láctico procedente de la fermentación (figura 7). A fin de determinar el contenido de ácido de los productos lácteos se realiza una valoración ácido-base con NaOH como agente valorante, y empleando como indicador fenolftaleína.

La acidez expresada en grados Dornic es el número de décimas de mL de NaOH N/9 necesarios para neutralizar 10 mL de producto lácteo empleando fenolftaleína como indicador. La acidez expresada en grados de ácido láctico por 100 mL de producto lácteo es el valor en grados Dornic dividido por 100.

$$1^{\circ} D = 0,01 \% \text{ de ácido láctico}$$

### Procedimiento

En un erlenmeyer se disponen 10 mL de leche con pipeta estéril y 3-4 gotas de indicador. A continuación se agrega gota a gota la disolución de sosa Dornic N/9 desde la bureta. Dar por terminada la valoración cuando aparezca una coloración rosa, persistente durante unos segundos, fácilmente perceptible por comparación con un testigo tomado de la misma leche. Se anotan los mililitros consumidos en la valoración.

A continuación en otro erlenmeyer se coloca 1 mL de yogur (con pipeta estéril) y se añaden 9 mL de agua destilada, valorando como en el caso anterior.

### Cálculos

Se realizaran los cálculos necesarios para determinar la acidez de los productos lácteos expresada en grados Dornic ( $^{\circ}D$ ) y en gramos de ácido láctico, considerando el factor de dilución en el caso del yogur. Tener en cuenta que 1 mL de sosa Dornic consumida corresponde a 10  $^{\circ}D$  y a su vez a 0,1 g de ácido láctico por 100 mL de producto lácteo.

Tabla 3. Resultados de la valoración de la acidez en productos lácteos

MATRACES	ACIDEZ: CH <sub>3</sub> CHOHCOOH (°D y gramos de ácido por 100 mL de producto lácteo)
1 (yogur)	
2 (yogur)	
3 (leche)	
4 (leche)	
Ac. Láctico comercial	

### 3. OBSERVACIÓN AL MICROSCÓPIO DE BACTERIAS LACTICAS

#### ✚ Preparación en fresco

Mediante el Microscopio de Contraste de Fases podemos observar las bacterias in vivo y conocer su forma, tamaño, asociación, movilidad, presencia de esporas, formación de mucílago, entre otras características. Para ello hemos de realizar una preparación en fresco.

Sobre un portaobjetos limpio se pone una gota de agua destilada y con el asa de siembra estéril o flameada previamente, se extiende sobre ella una gota de yogur (sólido). Si utilizamos el suero (líquido) el yogur se deposita con el asa directamente en el porta. A continuación se toma un cubreobjetos y apoyándolo por un lado sobre el porta, se deja caer sobre la muestra.

La observación in vivo debe de realizarse inmediatamente después de la preparación de la muestra con el fin de que no se produzca deshidratación.

La preparación se deposita en la platina del microscopio y se enfoca el ocular y a continuación con el macrométrico y el micrométrico se enfoca el objetivo de 40x aumentos, en el microscopio de contraste de fases, una vez enfocado, pasará a observarse con el objetivo de 100x aumentos y con aceite de inmersión (Figuras 1 y 2).

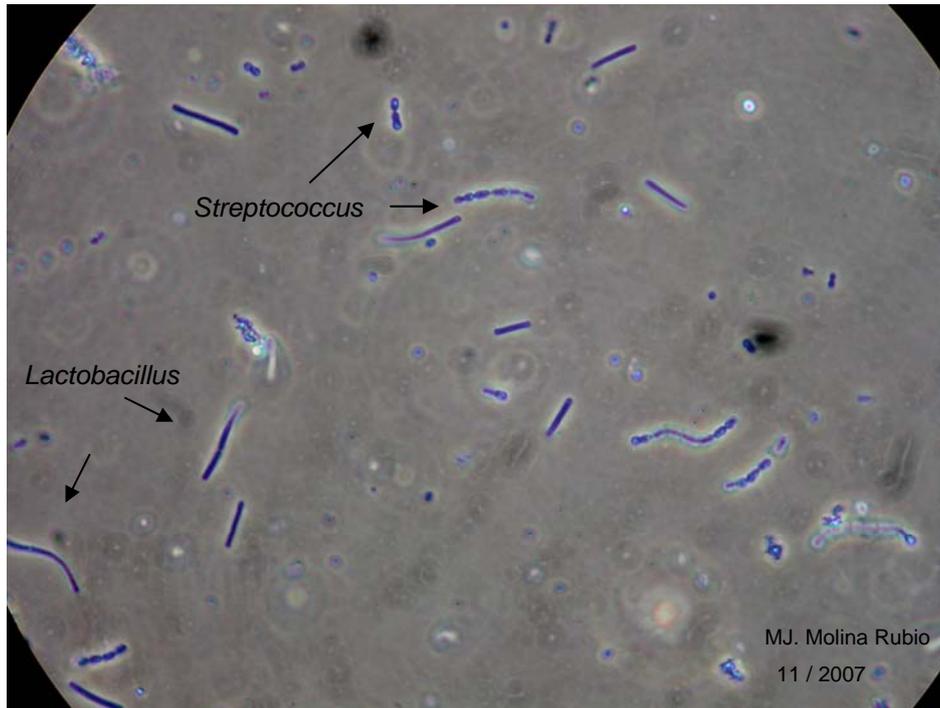


Fig 1. *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* . Contraste de Fases 100x .Yogur de laboratorio 27/11/07. Cultivo iniciado : “activia comercial”.

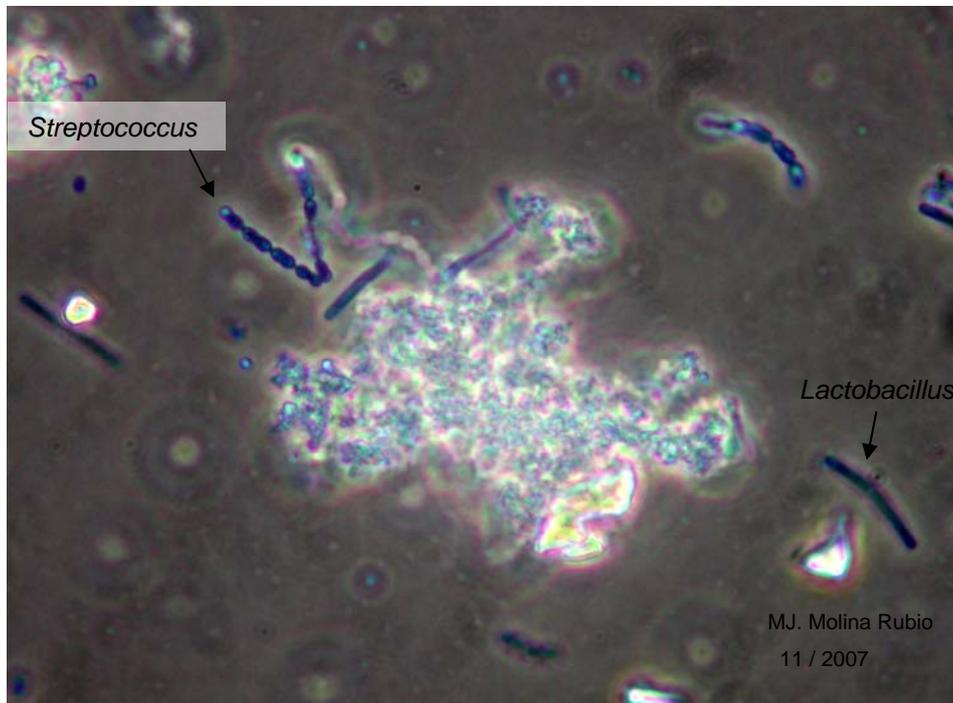


Fig.2 *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Contraste de Fases 100x. Yogur de laboratorio 27/11/07. Cultivo iniciador : “activia comercial”.

### Tinción de Gram

Mediante tinción de Gram (Figura 3) se confirma la presencia de bacilos y cocos responsables de la fermentación.

Preparación de un frotis bacteriano:

1. Colocar una gota de agua en un portaobjetos limpio.
2. Con un asa de siembra estéril tomar una pequeña cantidad de cultivo bacteriano en medio sólido (yogur) y depositarla en la gota mezclándola y extendiéndola para facilitar su secado.
3. Esperar a que la película de agua se evapore. Pasar varias veces el portaobjetos por la llama y dejar enfriar entre pases, quedaran fijadas las bacterias al porta.
4. Para desengrasar la preparación, se cubre con unas gotas de xileno (procedimiento habitual cuando se trabaja con alimentos). Mantener un minuto moviéndolo suavemente. A continuación para eliminar el xileno, se lava la preparación con etanol de 96° durante 30-60 segundos, y después lavar abundantemente con agua.
5. La preparación está lista para la Tinción Gram :
  1. Añadir a la preparación extendida, seca y fijada unas gotas de Cristal Violeta, y teñir 2 minutos.
  2. Añadir Lugol y mantener 1 minuto, lavar con agua.
  3. Decolorar con alcohol de 96°, 30 segundos. Lavar para detener la decoloración
  4. Añadir el colorante de contraste, Safranina, durante 1 minuto
  5. Lavar con agua, y secar
  6. Observar con objetivo de inmersión y con el Microscopio de Campo Claro.

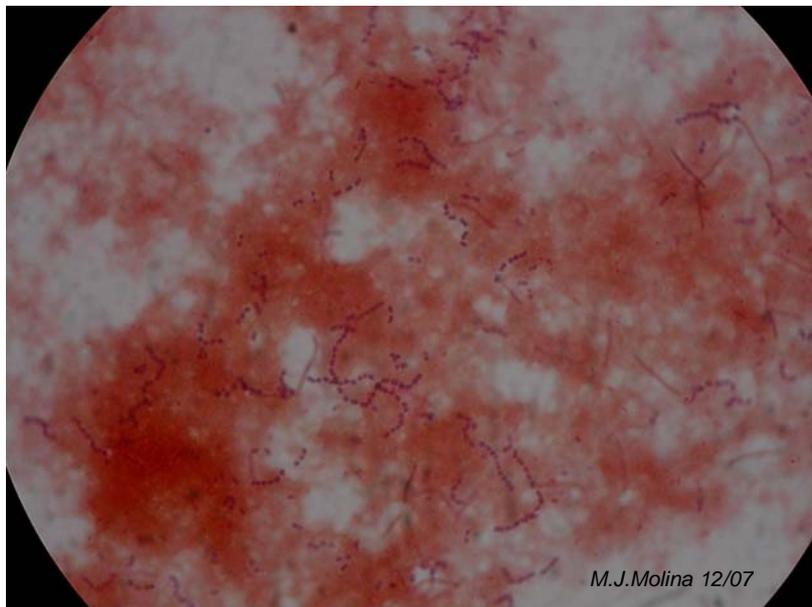


Figura 3. Tinción Gram de Bacterias Lácticas (Lactobacillus y Streptococcus) 20dic07 Campo Claro 100x

## ANEXO TEORICO

### LAS BACTERIAS LÁCTICAS

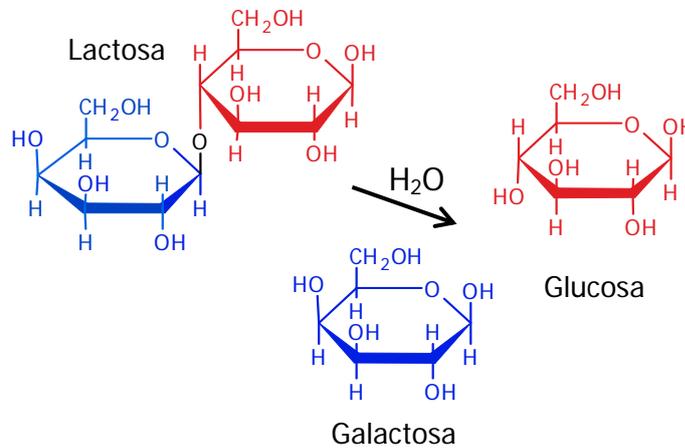
- Constituyen uno de los grupos de bacterias empleadas en las fermentaciones alimentarias. Este grupo está constituido esencialmente por los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.
- Tienen forma de coco o de bastón. Sintetizan su ATP en la fermentación láctica de los glúcidos y el ácido láctico es en algunos casos el único producto final (homofermentación) y en otras ocasiones se produce además etanol, acetato y CO<sub>2</sub> (heterofermentación).
- Son generalmente aerotolerantes. Los individuos menos sensibles al oxígeno son los *Streptococcus*, tienen en general necesidades complejas de factores de crecimiento : vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimidínicas ; esta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche. Los medios de cultivo para estas bacterias han de ser ricos y complejos como el agar MRS.
- Toleran los pH ácidos, incluso a veces pH < 5. Pero conforme el medio se va acidificando se inhiben un mayor número de especies lácticas.

La síntesis de ácido láctico por las bacterias lácticas y su tolerancia para convivir con dicho ácido orgánico son características empleadas en la fabricación de productos fermentados y también en la conservación de alimentos (productos lácteos, cárnicos, vegetales fermentados).

Orla Jensen clasificó las bacterias lácticas en dos grupos según sus características bioquímicas: homofermentativas y heterofermentativas . La diferencia se detecta por la liberación de oxígeno en el metabolismo de las segundas, estas bacterias heterofermentativas no tienen fructosa difosfatoaldolasa y por tanto degradan los glúcidos por la vía de las pentosas.

Muchos *Lactobacillus* homofermentativos además de ácido láctico producen etanol y acetato .Si hay exceso de nutrientes todo el piruvato se transforma en lactato, pero si hay carencia de nutrientes un poco de piruvato se metaboliza a etanol y acetato, este mecanismo es energéticamente favorable para la bacteria pues durante esta conversión se sintetiza ATP.

Figura 5.- Hidrólisis de la **LACTOSA (disacárido): alfa-D-galactopiranosil-beta-D-glucopiranososa**



FUENTE: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose\\_color.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose_color.png)

Los géneros que se van a trabajar en esta práctica son :

- ❖ *Streptococcus*: Son homofermentativos (las hexosas son fermentadas por la ruta metabólica hexosa difosfato). Células coccas en pares o cadenas. Ácido láctico (L+) dextrogiro. y son Gram positivas.
- ❖ *Lactobacillus* subgénero *Thermobacterium*: Son homofermentativos (las hexosas son fermentadas exclusivamente por la ruta metabólica Embden –Meyerhof- Parnas en ácido láctico). Células bacilares individuales o en cadenas. Ácido láctico (DL o L-) mezcla o levógiro. Forman esporas, generalmente inmóviles. La mayoría aerotolerantes y glucidolíticas. y son Gram positivas.  
Su crecimiento es bueno en un medio de pH 6,4 - 4,5 pero se inhibe a pH 4,0-3,6.

**Figura 7. FERMENTACION LACTICA HOMOFERMENTATIVA**

