

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA**

**ANTONIO NARRO**

**DIVICIÓN DE CIENCIA ANIMAL**



**Por:**

Catalina De Jesús Hernández Torres

**TESIS**

Seguimiento de la producción de lactato en quesos adicionados con *Leuconostoc mesenteroides* y su efecto en propiedades organolépticas

**Presentado como requisito parcial para**

**Obtener el título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

**Junio del 2013**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**


Seguimiento de la producción de lactato en quesos adicionados con  
*Leuconostoc mesenteroides* y su efecto en propiedades organolépticas

Presentado por:

**Catalina De Jesús Hernández Torres**

Que se somete a consideración de H. jurado Examinador como requisito parcial para  
obtener el título de

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. María Hernández Gonzales**

**Director**

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Sarahí Rangel Ortega**

**Asesor**

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verastegui**

**Asesor**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Ramiro López Trujillo**

**COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**



**Buenvista, Saltillo, Coahuila, México, Junio del 2013**

## **MANIFIESTO DE HONESTIDAD ACADEMICA**

El suscrito Catalina De Jesús Hernández Torres estudiante de la carrera, Ingeniero en Ciencia y Tecnología de alimentos con matricula 295677 y autor de la siguiente tesis manifiesto que:

1. Reconozco que el plagio académico constituye un delito que está penado en nuestro país
2. Las ideas, opiniones, datos e información publicadas por otros autores y utilizadas en la presente tesis han sido debidamente citadas reconociendo la autoría de la fuente original.
3. Toda la información consultada ha sido analizada e interpretada por el suscrito y redactada según su criterio y apreciación, de tal manera que no ha incurrido en el “copiado y pegado” de dicha información.
4. Reconozco la responsabilidad sobre los derechos del autor de los materiales bibliográficos consultados por cualquier vía y manifiesto no haber hecho mal uso de ninguno de ellos.
5. Entiendo que la función y alcance de mi comité de asesoría está circunscrito a la orientación y guía respecto a la metodología de la investigación realizada para la presente tesis, así como del análisis e interpretación de mis resultados obtenidos, y por lo tanto eximo de toda responsabilidad relacionando al plagio académico a mi comité de asesoría y acepto que cualquier responsabilidad al respecto es únicamente mía.

Atentamente

---

**Catalina De Jesús Hernández Torres**  
**Tesista de licenciatura UAAAN**

## *Agradecimientos*

*“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,  
pero el mar sería menos si le faltara una gota”*

*Madre Teresa de Cancuta.*

*A dios por darme el don de la vida por permitirme llegar tan lejos, por nunca dejarme sola y sobre todo por darle a mi familia tantas bendiciones.*

*A la Universidad Autónoma agraria Antonio Narro, mi **Alma Terra Mater** por haberme abierto sus puertas estos 5 años de mi vida y haberme dado la oportunidad de superarme y ser alguien en la vida.*

*Al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, a todos los profesores que lo integran y que un día tuve la oportunidad de escuchar sus enseñanzas en el salón de clases. A todos aquellos que me brindaron su ayuda cuando lo necesite a lo largo de mi formación, mil gracias.*

*A la M.C. María Hernández González por haberme brindado la oportunidad de realizar esta investigación, por compartir conmigo una parte del gran conocimiento que posee, por haberme apoyado en durante mi formación, mil gracias por el tiempo dedicado en la presente investigación, por sus consejos y sugerencias, pero sobre todo mil gracias por la gran amistad brindada a lo largo de la carrera.*

*A la M.C. Sarahí Rangel Ortega por haberme apoya en la realización de esta investigación y por compartir algo de su gran conocimiento conmigo, por la amistad ofrecida durante este tiempo y sobre todo mil gracias por aceptar ser parte de este trabajo de investigación.*

*A la M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verasteguí por su apoyo y valiosa colaboración para poder concretar este trabajo de investigación, mil gracias.*

*A mi padrino el Sr. Raúl Molano le doy gracias por ser una de las personas que ha formado parte de mis estudios y en la realización de esta tesis. Le agradezco por su confianza y su interés en mí.*

*A mis amigos:*

*A Karol De Jesús García (Karitol) por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por ser una gran amiga y por ser quien eres, aunque a veces eres rara pero así te quiero.*

*A Ruth Betsabe Civas Limón, Janeth A. Acosta Aranda, Carmen L. González Hernández, Alejandra Aguilar Reynosa por ser mis grandes amigas, compañeras de clases, consejeras y muchas cosas más durante la carrera.*

*A Mario García Miranda, Víctor De Jesús García, Marco Antonio Hernández y Elva Patricia Barrientos Días (pato) gracias por todos aquellos momentos que pasaron conmigo, gracias por los consejos que alguna vez me dieron y por siempre haber estado conmigo cuando los necesite.*

*Gracias a todas esas personas que de alguna forma u otra estuvieron conmigo durante toda mi estancia en la universidad.*

## *Dedicatorías*

*A mi hija Heidy Camila Dueñez Hernández mi razón de ser, mi vida, mi todo. La razón por la cual me levanto día a día con ganas de salir a delante, la que me da fuerza para lograr mis metas. A mi hermosa hija quien siempre sabe sacarme una sonrisa, quien siempre ha estado conmigo, la que siempre sabe darme ánimos a pesar de lo que pase. Te amo con todo el corazón.*

*A mis padres:*

*Raquel Torres Rojas*

*José Cruz Hernández Barajas*

*Sé que no ay forma de agradecerles todo lo que and hecho por mí, todos los sacrificios que han hecho para sacar a sus hijos adelante.*

*Gracias por siempre estar a mi lado, por apoyarme en los buenos y en los malos momentos por confiar en mí, gracias por levantarme cada vez que tropezaba porque gracias a ustedes soy lo que soy, gracias a ustedes supe levantarme y salir adelante a pesar de las adversidades que se me presentaran.*

*Gracias mamá por ser la mejor mamá del mundo, por aconsejarme, por apoyarme y a pesar de la distancia siempre saber estar conmigo.*

*Gracias papí por trabajar tan duro para sacarnos adelante, por ser un ejemplo de padre y por siempre preocuparse por nosotros a pesar de la distancia.*

*Hoy les digo que este triunfo en mi vida no es solo mío, sino también de ustedes que son los mejores padres del mundo. Los amo.*

*A mí **Papa Cano** y a mí **Mama Cata** por haberme dado su amor incondicional y ser mis segundos padre en la vida, por haberme cuidado, por siempre animarme cuando sentía caer y por haberme dado aquellos consejos que hasta ahorita me han servido en la vida. Gracias los quiero mucho.*

*A mis hermanos **Guadalupe Hernández Torres** y **Adrián Hernández Torres** quienes a pesar de su edad y de la distancia siempre supieron estar conmigo y me apoyaron en lo que pudieron, y aunque casi nunca les digo que los quiero tengan presente que los adoro y los quiero mucho.*

*A mis tíos **Ana B. Torres Rojas** y **Víctor Serrano Tejada** por haberme apoyado en lo que pudieron, por haber cuidado a mi hija y permitirle ser parte de su familia, tratarla como uno más de sus hijos y gracias a mis primos **Rosa A. Serrano Torres**, **Víctor Serrano Torres** y **Edwín Serrano Torres** por ser como hermanos para mi hija. Gracias tía por ser como otra madre para mí, por haberme aconsejado cuando lo necesite, por haberme regañado cuando lo no necesitaba y a pesar de todo estar conmigo. Gracias los quiero mucho.*

## INDICE

## PÁGINA

CAPITULO 1 .....	4
1.1 Resumen .....	4
1.2 INTRODUCCION .....	5
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	7
1.4 HIPOTESIS.....	8
1.5 OBJETIVOS .....	8
1.5.1 Objetivo General.....	8
1.5.1.1 Objetivos específicos.....	8
CAPITULO 2 .....	9
2.1 REVISIÓN DE LITERATURA.....	9
2.2 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	9
2.3 VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO .....	11
2.3.1 La fase oxidativa .....	11
2.3.1.1 Reacción 1. ....	11
2.3.1.2 Reacción 2. ....	11
2.3.1.3 Reacción 3. ....	11
2.3.2 La fase no oxidativa .....	11
2.4 CARACTERÍSTICAS DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	12
Figura. 1 Observación microscópica de cepa de <i>L. mesenteroides</i> teñida mediante tinción de gram.....	13
Figura 2. Observación de morfología colonial de una cepa de <i>L. mesenteroides</i> en medio MRS.....	14
Tabla 1. Características de <i>Leuconostoc</i> .....	15
Tabla 2. Características de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> .....	15
2.5 Aplicación de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en quesos .....	16
2.8 QUESO EN MÉXICO .....	18
2.7 Clasificación de los quesos.....	19



2.7.1 Quesos frescos .....	20
2.7.2 Quesos de pasta blanda.....	20
2.7.3 Quesos de pasta semidura .....	20
2.7.4 Quesos de pasta dura.....	20
2.7.5 Quesos maduros.....	21
2.8 Propiedades Del Queso .....	22
2.8.1 Proteínas .....	22
2.8.2 Calcio .....	22
2.8.3 Vitaminas.....	22
2.8.4 Grasas.....	22
Figura 3. Estados con mayor actividad quesera en México. ....	23
Capitulo 3.....	24
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1.1 Etapas .....	24
3.1.2 Localización .....	24
3.1.3 Materiales reactivos y equipos de laboratorio .....	24
3.1.3.1 Materiales.....	24
Tabla 4. Materiales .....	25
3.1.3.2 Equipos de laboratorio .....	25
Tabla 5. Equipos de laboratorio.....	25
3.1.3.3 Reactivos.....	26
Tabla 6. Reactivos .....	26
3.1.4 Materia Prima (Quesos) .....	26
3.1.5 Etapa 1. Preparación del inculo .....	26
Tabla 7. Componentes del medio MRS .....	27
Figura 4. Tubos con caldo MRS.....	29
Figura 5. Cresimiento de <i>L. Mesenteroides</i> en el caldo MRS .....	29
3.1.6 Etapa 2. Realización de los quesos y adición del inculo .....	30
Figura 6. Queso inoculado con <i>L. mesenteroides</i> .....	31
Figura 7. Queso panela inoculado en diferentes concentraciones de <i>L. mesenteroides</i> a una temperatura de 28-30 °C.....	32
3.1.7 Etapa 3. Evaluación del proceso fermentativo.....	32

3.1.7.1 Etapa 3.1. Determinación de acidez.....	32
3.1.7.2 Etapa 3.2. Determinación de alcohol .....	33
3.1.7.3 Etapa 3.3. Evaluación física de los quesos .....	33
3.1.8 Análisis estadístico .....	34
Capítulo 4.....	34
4.1 Resultados y conclusiones.....	34
4.1.1 Etapa 1. Preparación del inóculo .....	34
4.1.2 Etapa 2. Realización del queso y adición del inóculo .....	35
4.1.4. Etapa 3. Evaluación del proceso fermentativo .....	36
4.1.4.1 Etapa 3.1. Determinación de acidez.....	36
Figura 8. Porcentaje de acidez producida por los quesos a diferentes concentraciones de inóculo de <i>L. mesenteroides</i> a través de diferentes tiempos de fermentación. ....	38
4.1.4.2 Etapa 3.2. Determinación de alcohol .....	38
Figura 9. Grados de alcohol producido por los quesos a diferentes concentraciones de inóculo de <i>L. mesenteroides</i> a través de diferentes tiempos de fermentación.....	39
4.1.4.3. Etapa 3.3 Evaluación física de los quesos .....	39
Figura 10. Tratamiento 40 con presencia de ojos. ....	40
Figura 11. Cambios en la textura de los quesos a diferentes concentraciones de inóculo de <i>L. mesenteroides</i> a través de diferentes tiempos de fermentación. ....	41
Figura 12. Medición de la textura con un penetrometro manual. ....	42
Conclusión .....	42
Bibliografía .....	44
Anexos .....	48
Anexo 1 .....	48
Anexo 2 .....	49
Anexo 3.....	50

## CAPITULO 1

### 1.1 Resumen

El queso es uno de los alimentos más consumidos en México. De acuerdo a la FAO/OMS: "es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos. Los primeros quesos realizados eran de ovejas y cabras ya que en aquel entonces era más común tener una cabra o una oveja que una vaca. Existe una leyenda muy conocida que dice que el queso fue descubierto por un mercader que colocó la leche en un estomago de un cordero, ya que en aquel entonces se utilizaban las tripas los estómagos o vasijas echas de cuero para trasladar diferentes alimentos entre ellos la leche, se dice que después de haber atravesado el desierto cuando llegó a su destino se dio cuenta que la leche ya estaba solida lo probó y le pareció muy agradable. Las bacterias ácido-lácticas (BAL o LAB por sus siglas en inglés) han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser empleadas en la industria alimentaria, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo coste energético de su producción. *Leuconostoc mesenteroides* está considerada una BAL. Se realizaron 4 quesos con diferentes concentraciones de 0, 40 60 y 120 ml de inculo y se determino la producción de lactato, los grados de alcohol y se observaron los cambios físico químico durante 22 días. Se checaron cada queso a los 0, 7, 15 y 22 días. Se obtuvo un resultado positivo ya que todos los tratamientos tuvieron un incremento constante. La adición de un inculo de iniciador de *L. mesenteroides*, para la maduración de quesos, influyo de manera significativa en dos aspectos principales el nivel de acidez y la textura. Tocante a la textura del producto se observan cambios significativos entre las muestras no tratadas y las inoculadas; no encontrándose cambios significativos entre los tratamientos de las segundas, en lo referente a este aspecto.

**Palabras clave:** *Leuconostoc mesenteroides*, lactato, queso, bacterias ácido lácticas, propiedades organolépticas.

## **1.2 INTRODUCCION**

Los quesos se han convertido en un alimento cotidiano, la mayoría de la población los conoce o los ha consumido en su vida. De acuerdo a la FAO/OMS: “es el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación de suero de la leche, nata, leche parcialmente desnatada, mazada o por una mezcla de estos productos. Por otro lado según el diccionario de la Real academia española,” el queso es el producto obtenido por la maduración de la cuajada de la leche, con características propias para cada uno de los tipos según su origen o método de fabricación”. Por esta razón no existe solo un producto llamado queso, si no que existen muchos productos llamados quesos pero se clasifican de acuerdo a su forma, aspecto, color sabor y origen (Veisseyre, Roger, 1998)

El queso es un alimento principalmente hecho a base de leche. Los quesos se pueden encontrar frescos o maduros, sólidos o semisólidos, estos se obtienen de la separación de suero después de la coagulación de la leche después de la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados. “El queso es leche que se ha vuelto adulta” esto es porque para realizar un queso se necesitan de varios procesos para que la leche pueda convertirse en queso. Los quesos han existido desde hace muchos años, se dice que los quesos fueron descubiertos por sociedades en forma más o menos simultánea (Andre Simon, 1877-1970).

Los primeros quesos realizados eran de ovejas y cabras ya que en aquel entonces era más común tener una cabra o una oveja que una vaca. Existe una leyenda muy conocida que dice que el queso fue descubierto por un mercader que colocó la leche en un estomago de un cordero, ya que en aquel entonces se utilizaban las tripas los estómagos o vasijas echas de cuero para trasladar diferentes alimentos entre ellos la leche, se dice que después de haber atravesado el desierto cuando llegó a su destino se dió cuenta que la leche ya estaba solida lo probó y le pareció muy agradable (Quesos artesanales, 2010).

Desde la época del imperio romano hasta alrededor de 1600, fueron pocos los avances experimentados por la quesería como industria. Sin embargo, el comercio se volvió más sistemático y las tiendas de venta de quesos comenzaron a surgir, de tal forma, que los mercados de quesos eran lugares habituales en las grandes ciudades del siglo XVI. Muchas de las variedades actuales son centenarias por tradición. Así se tiene que el queso Roquefort posee una historia de más de 1000 años y el Cheddar es conocido desde hace ya 500 años (Quesos artesanales, 2010).

Como antes no se sabía sobre la existencia de microorganismos se utilizaba leche fresca para la elaboración de quesos después de un tiempo, cuando Luis Pasteur descubrió la pasteurización fue como la leche se empezó a pasteurizar. No fue sino hasta 1870 en que la tecnología quesera dio un gran salto cuando fue puesto en el mercado un cuajo comercial preparado por Hansen en Dinamarca. Alrededor de 1900 tuvieron lugar cinco mejoras relevantes en la tecnología del queso. Ellas fueron el uso de la acidez titulable como medida del control de la acidez en la elaboración, la introducción de cultivos puros de estreptococos lácticos como iniciadores, el calentamiento moderado o la pasteurización de la leche para destruir los microorganismos indeseables, la maduración o fermentación refrigerada y el comienzo de la fabricación del queso fundido en 1904. (Veisseyre, Roger, 1998)

### 1.3 JUSTIFICACIÓN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL o LAB por sus siglas en inglés) han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser empleadas en la industria alimentaria, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo coste energético de su producción (Jay, J., 2000).

En estudios que han realizado diversos autores se observa que adicionalmente se da un aumento en la vida útil del producto, atribuible a la inhibición de *Pseudomonas spp.* y *coliformes*, lo anterior debido a que *L. mesenteroides* es organismo osmofílico y puede tolerar concentraciones de acidez superiores a las de los organismos antes mencionados inhibiendo así su instalación y/o multiplicación. *L. mesenteroides* se ha empleado en la elaboración de queso tipo cottage, de cabra semi maduros, o como cultivo iniciador para los quesos maduros, de donde los estudios posteriores señalan que se presenta un aumento en la vida de anaquel de los productos, teniendo mayor olor, y mayor cantidad de ojos, debido a la producción de CO<sub>2</sub>.

Por lo tanto el estudio de este microorganismo es importante debido a la producción de los metabolitos producidos durante su crecimiento, y los efectos que estos tienen tanto en su efecto conservador, por ser un microorganismo osmofílico, como en los cambios en las características organolépticas

## 1.4 HIPOTESIS

Los quesos fermentados por *Leuconostoc mesenteroides* darán cambios físico químicos deseables directamente relacionados a los metabolitos producidos.

## 1.5 OBJETIVOS

### 1.5.1 Objetivo General

⌘ Valorar la producción de ac. Lactico en quesos adicionados con *Leuconostoc mesenteroides* y describir sus atributos físico químicos.

### 1.5.1 Objetivos específicos

- ✓ Elaborar quesos y adicionarlos con concentraciones variables y conocidas de un inóculo de *L. mesenteroides*.
- ✓ Valorar a diferentes intervalos de tiempo las concentraciones de lactato para cada uno de los tratamientos.
- ✓ Realizar pruebas de atributos organolépticos.
- ✓ Determinar las condiciones de tratamiento para la obtención del queso con características específicas.

## CAPITULO 2

### 2.1 REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.2 *Leuconostoc mesenteroides*

En el grupo microbiano de las bacterias ácido lácticas (BAL), está incluido *Leuconostoc mesenteroides*, En la actualidad, el grupo de BAL está compuesto por 12 géneros de bacterias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Jay., 2000).

Hacia 1920, Orla Jensen señaló que estas bacterias podían dividirse en dos grupos en función de los productos finales del metabolismo de la glucosa. Los que producen ácido láctico como principal o único producto de la fermentación se denominan homofermentativos (ruta de Embden- Meyerhof), mientras que los que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol son denominados heterofermentativos (ruta oxidativa de Pentosas Fosfato) (Stainer y col.,1992).

Las BAL han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han despertado gran atención al ser empleadas en la industria alimentaria, especialmente para la obtención de ácido láctico, componentes saborizantes, espesantes y bacteriocinas, así como al considerable valor nutritivo que pueden aportar a los productos alimenticios y el bajo coste energético de su producción (Sneath y col., 1986).

En estudios que han realizado diversos autores se observa que adicionalmente se da un aumento en la vida útil del producto, atribuible a la inhibición de *Pseudomonas* spp. y *coliformes*, lo anterior debido a que *L. mesenteroides* es organismo osmofílico y



puede tolerar concentraciones de acidez superiores a las de los organismos antes mencionados inhibiendo así su instalación y/o multiplicación (Sneath y col., 1991)..

*L. mesenteroides* se ha empleado en la elaboración de queso tipo cottage, de cabra semi maduros, o como cultivo iniciador para los quesos maduros, de donde los estudios posteriores señalan que se presenta un aumento en la vida de anaquel de los productos, teniendo mayor olor, y mayor cantidad de ojos, debido a la producción de CO<sub>2</sub>. El género *Leuconostoc*, está ampliamente distribuido en plantas, productos lácteos y otros productos alimenticios. No son patógenos para las plantas ni para los animales, incluido el hombre (Sneath y col., 1991).

El microorganismo objeto de nuestro trabajo, *Leuconostoc mesenteroides*, se desarrolla en un rango de temperatura de 10-37°C, siendo la óptima 20-30°C. En cuanto a la velocidad de crecimiento, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* presenta un tiempo de generación más corto que otras subespecies y un buen crecimiento puede ser obtenido en 24 horas a una temperatura de 30°C. Cuando *L. mesenteroides* crece en medio de cultivo líquido es frecuente observar una importante y uniforme turbidez debido a la formación de largas cadenas celulares que tienden a sedimentar (Sneath y col., 1986).

En cuanto a los requerimientos nutritivos es necesario un medio enriquecido para su crecimiento, que contenga factores de crecimiento y aminoácidos. De hecho, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* precisa ácido glutámico y valina, y de forma adicional, entre el 11–86% de las cepas requieren riboflavina, piridoxal y ácido fólico para su crecimiento. El crecimiento también es dependiente de la presencia de carbohidratos fermentables, como la lactosa, fructosa, sacarosa y la glucosa, que es fermentada por medio de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Los productos finales más importantes resultantes de la fermentación son el lactato, etanol, D (-) ácido láctico y CO<sub>2</sub>. Normalmente los polisacáridos y los alcoholes no son fermentados (Sneath y col., 1991).

## **2.3 VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO**

Ruta de degradación con función de biosíntesis: proporciona NADPH y ribosa-5-fosfato para reacciones de biosíntesis, pero también puede degradar glucosa, o pentosas de los nucleótidos procedentes de la hidrólisis de los ácidos nucleicos de la dieta, hasta  $\text{CO}_2$  y agua. La ruta de las pentosas fosfato tiene dos fases:

### **2.3.1 La fase oxidativa**

Genera por cada molécula de glucosa; 2 moléculas de NADPH, 1 molécula de ribulosa-5-fosfato y una molécula de  $\text{CO}_2$ . Consta de tres reacciones.

#### **2.3.1.1 Reacción 1.**

Oxidación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa).

#### **2.3.1.2 Reacción 2.**

Hidrólisis de la lactona a fosfogluconato (lactonasa).

#### **2.3.1.3 Reacción 3.**

Descarboxilación oxidativa a ribulosa-5-fosfato (6-fosfogluconato deshidrogenasa).

### **2.3.2 La fase no oxidativa**

Convierte 3 azúcares fosfato de 5 carbonos en 2 azúcares fosfato de 6 carbonos y 1 azúcar fosfato de 3 carbonos

Las reacciones de la ribulosa 5- fosfato isomerasa y epimerasa tienen lugar con intervención de intermediarios enediol. En la reacción de la isomerasa, una base situada en el enzima elimina un protón de C1 de Ru5P a fin de formar un 1,2-enediolato y después adiciona un protón a C2 para formar R5P. En la reacción de la epimerasa, una base situada en el enzima elimina un protón en C3 para formar un 2,3-enediolato. A

continuación se añade un protón al mismo átomo de carbono pero con inversión de la configuración para rendir Xu5P.

La rotura de un enlace carbono-carbono deja a menudo un par de electrones libres o carbanión en uno de los productos y la fuerte tendencia del carbanión a formar un nuevo enlace da lugar generalmente a un intermedio inestable. El anillo de tiazolio de la TPP estabiliza el intermedio carbanión al proporcionar una estructura electrofílica (deficiente en electrones) en la que los electrones del carbanión pueden deslocalizarse por resonancia. A las estructuras con estas propiedades se las llama frecuentemente “sumideros de electrones”

La transcetolasa utiliza como coenzima al pirofosfato de tiamina con objeto de estabilizar el carbanión formado en la ruptura del enlace C2-C3 de la Xu5P.

La reacción ocurre con los siguientes pasos:

1) Ataque nucleofílico del radical TPP al carbono carbonilo y posterior protonación.

2) desprotonación de C3 y rotura del enlace C2-C3, que da como productos G3P y el enzima unido a 2- (1,2-dihidroxi-etil)-TPP, que es un carbanión estabilizado por resonancia.

3) El carbanión C2 ataca al carbono aldehído de la R5P formando un aducto S7P-TPP.

4) Se elimina TPP con producción de S7P.

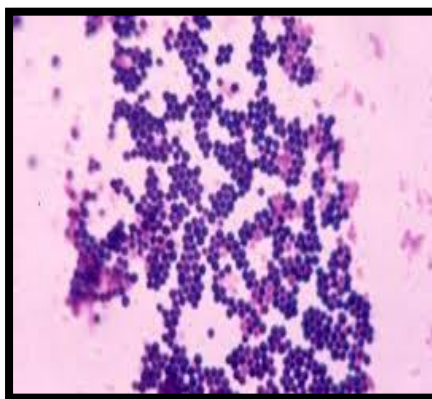
#### **2.4 CARACTERÍSTICAS DE *Leuconostoc mesenteroides***

Las BAL son un conjunto de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, en forma de cocos o bastones y catalasa negativa (aunque en algunos casos pueden encontrarse una pseudo-catalasa) como se muestra en la tabla 1 y 2, con un metabolismo estrictamente fermentativo produciendo ácido láctico como el mayor

producto final de la fermentación de los azúcares vía Embden-Meyer –glucólisis- y en otras ocasiones producen además etanol, acetato y CO<sub>2</sub> (Sneath y col., 1991).

Las bacterias del género *Leuconostoc* pertenecen a la familia *Streptococcaceae*. Son cocobacilos grampositivos no esporulados como se muestra en la Figura. 1, microaerófilicos con grandes exigencias nutricionales para su crecimiento en medios de cultivo e intrínsecamente resistente a glucopéptidos. En la naturaleza están presentes en diversos ecosistemas vegetales y son bien conocidas en el ámbito de la industria alimentaria, dadas sus propiedades fermentadoras y su capacidad para generar compuestos odoríferos (Sneath y col., 1991).

Generalmente *Leuconostoc mesenteroides* suele tener forma cocoide, presentándose en parejas o formando cadenas, como se especifica en la Tabla 2. Esto puede variar de acuerdo a las condiciones de crecimiento que se les brinde. Cuando el medio de cultivo es agar, las células presentan una apariencia esférica, mientras que cuando este microorganismo es cultivado en caldo, las células suelen tener forma bacilar, pudiéndose confundir con lactobacilos y formando largas cadenas (Sneath y col., 1991).



**Figura. 1** Observación microscópica de cepa de *L. mesenteroides* teñida mediante tinción de gram.



**Figura 2. Observación de morfología colonial de una cepa de *L. mesenteroides* en medio MRS.**

Las colonias normalmente son pequeñas, con un diámetro inferior a 1 mm, lisas, redondas y de un color blanco grisáceo como se muestra en la figura. 2. Los productos finales más importantes resultantes de la fermentación son el lactato, etanol, D (-) ácido láctico y CO<sub>2</sub>. Normalmente los polisacáridos y los alcoholes no son fermentados (Sneath y col., 1991).

**Tabla 1. Características de *Leuconostoc***

Características	<i>Leuconostoc</i>
Morfológicas	Cocos: en parejas o en cadenas (ocasionalmente bacilos cortos)
Gram	Gram +
Aerobio estricto	-
Aerobio facultativo	+
Temperatura óptima de crecimiento	20 – 30 °C
pH óptimo	4.0 – 4.3
Colonias en agar	+/-1 mm. Viscosas (en agar con sacarosa)
Formación de esporas	NO
Formación de ácido láctico	D ácido láctico
Producción de gas	SI
Principales productos de fermentación de carbohidratos (anaerobiosis)	Lactato, etanol
Hábitat	Lácteos, plantas y otros alimentos

+: ≥ 90% de las cepas son positivas; -: ≥ 90% de las cepas son negativas; no descrito. Modificada de Stainer y col., 1992.

**Tabla 2. Características de *Leuconostoc mesenteroides***

Características	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Pigmento amarillo	-
Ácido desde:	
L-Arabinosa	+
Fructosa	+
Galactosa	+
Glucosa	+
Lactosa	(d)
Maltosa	+
Manitol	B
Sacarosa	+
Xilosa	B
Dextrano formado desde sacarosa	+
Crecimiento a:	
pH 4.8 (inicial)	-
pH 6.5 (inicial)	-
Crecimiento con:	
3.0% NaCl	+
6.5% NaCl	B
10% etanol	-
Crecimiento a 37 °C	B

pH final en caldo glucosa	4.5
---------------------------	-----

+:  $\geq 90\%$  de las cepas son positivas; (+): 80-89% de las cepas son positivas; B: 11-89% de las cepas son positivas; (-): 11-20% de las cepas son positivas; -:  $\geq 90\%$  de las cepas son negativas; (d): reacción retrasada. Modificada de Stainer y col., 1992.

## 2.5 Aplicación de *Leuconostoc mesenteroides* en quesos

Según algunos autores, el crecimiento de *leuconostoc* en leche es estimulado por la actividad proteolítica de los *lactococos*, lo que indica que las bacterias de este grupo microbiano carecen de un adecuado sistema proteolítico. (Dermici, Y. y Hemme, D.) El principal papel de *leuconostoc* en los quesos es el de metabolizar el citrato a  $\text{CO}_2$ , responsable de la formación de ojos, y diacetilo que es un compuesto de aroma importante en quesos frescos tipo Cottage y blandos. El  $\text{CO}_2$  se origina también a partir de azúcares como consecuencia del metabolismo heterofermentativo de este tipo de microorganismos. En los quesos de tipo suizo (Edam y Gouda), es deseable la presencia de ojos pequeños ( $<1$  cm de diámetro), redondos y brillantes, originados generalmente como consecuencia de la incorporación de *leuconostoc* en los cultivos iniciadores (Nath, K.R. y Kostak, B.J. 1993).

Los ojos se formarán siempre que la cuajada sea suficientemente elástica (Kammerlehner, J. 1996). La producción de diacetilo, fundamentalmente, y acetoína es sin duda la propiedad más utilizada de los *Leuconostocs*. Para ello se seleccionan cepas productoras de buen aroma y de cantidades moderadas de  $\text{CO}_2$ , siendo *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* la especie de este grupo microbiano que produce menos gas en leche. La producción de ácido por parte de los *lactococos* es necesaria para que los *Leuconostoc* puedan convertir los citratos de la leche en compuestos aromáticos.

Además de diacetilo y acetoína, el metabolismo heterofermentativo de los *Leuconostoc* origina la formación de ácidos grasos volátiles, como el acético, y otros compuestos, como el etanol, importantes para el desarrollo completo del aroma y sabor

de productos lácteos fermentados, incluidas ciertas variedades de queso (Vedamuthu, E.R. 1998).

Algunos autores han escrito acerca del efecto que tiene *Leuconostoc mesenteroides* en el queso hecho por diferentes tipos de leche, teniendo resultados favorables. Mather y Babel 1959, desarrollaron un método práctico para obtener queso tipo Cottage graso, con buen aroma y sabor empleando cultivos de *leuconostocs* (*Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*) crecidos en leche suplementada con ácido cítrico (0,15%) y acidificada posteriormente a pH 4,0- 4,3. Los autores observaron adicionalmente un aumento en la vida útil del producto, atribuible a la inhibición de *Pseudomona*.

Requena y col1992. propusieron el empleo de un cultivo iniciador conteniendo *Ln mesenteroides* subsp. *dextranicum* y *Ln. paramesenteroides* para la elaboración de queso de cabra semiduro a partir de leche pasteurizada. Los quesos elaborados con este cultivo mostraron ojos bien distribuidos que los autores atribuyeron a la acción de los *leuconostoc* siendo su apariencia típica y logrando la mayor aceptabilidad en la evaluación de aroma, sabor y textura. En la actualidad son muy pocas las investigaciones que se han hecho sobre *Leuconostoc mesenteroides* en el queso.

El queso es un alimento con excelentes propiedades nutritivas y sensoriales, el cual es un derivado de leche de vaca, cabra, oveja y búfala, principalmente. En pocas palabras es la “concentración de los sólidos totales presentes en la leche”. Uno de los alimentos mas consumidos es el queso ya que existe toda una variedad de tipos que pueden servirse solos o como complemento para incrementar la calidad y mejorar el sabor de los alimentos que los mexicanos comúnmente incluyen en la dieta. Su gran digestibilidad, unida a su exquisito sabor y excelente valor nutritivo, lo hace un alimento importante tanto para la población infantil como para la adulta. (Profeco 2005).



## **2.8 QUESO EN MÉXICO**

La producción en México se remonta a la época de La Colonia con la introducción de los primeros hatos bovinos y rebaños caprinos y ovinos. Actualmente, la producción nacional satisface únicamente 76.5% del mercado interno. México se ubica en el noveno lugar en la producción de quesos a nivel global con una oferta en el 2010 de 244,000 toneladas. La actividad se localiza y concentra en un 53% en seis estados del país, el Estado de México el más importante con una participación del 13%, seguido del DF con 12%, Jalisco con 11%, Michoacán y Guanajuato con 6% respectivamente y Veracruz con 5% como se muestra en la figura 3. (SIAP, 2008)

Por su parte, el consumo de queso en México ha crecido a una Tasa Media Anual de 7.8 por ciento. Esto, durante el periodo del 2006-2010 al pasar de 229,000 a 319,000 toneladas. Lo anterior representa un consumo per cápita de 2.83 Kg. al año. En las tiendas existe una gran variedad de marcas y tipos de queso, imitaciones y productos análogos. Sin embargo, los quesos genuinos son aquellos que en su composición no contienen grasa vegetal, ni derivados proteicos de leche y el mínimo de aditivos permitidos. En el país se producen alrededor de 38 tipos de queso, de los cuales 88.0% es fresco y en su mayoría, de tipo artesanal, elaborado a partir de leche cruda y con variabilidad en su composición, sanidad y atributos sensoriales. La mayoría de los productores de queso en México son medianos y pequeños, con problemas comunes en cuanto al abasto y control de la materia prima, tecnología de elaboración, calidad y comercialización, principalmente. (SIAP, 2008)

El consumo de queso en México ha mostrado un crecimiento del 5.9% en los últimos 10 años. Este incremento ha presentado a su vez un aumento drástico en las importaciones de productos lácteos ya que la producción doméstica es insuficiente para satisfacer la demanda, de forma que los productos importados representaron el 38% del consumo nacional aparente para el año 2007 (SIAP, 2008).

Cabe destacar que el consumo de quesos es elástico a precios de la demanda, lo cual indica que el consumo está en función al precio de venta. Usualmente el precio de los productos importados es inferior al de los locales, éstos se encuentran en desventaja ya que produce pérdidas en las ganancias a los mercaderes mexicanos. Por otro lado, además de los productos importados se encuentra la presencia de productos análogos que también afectan severamente a la producción de quesos debido a que presentan precios inferiores al nacional y al de importación. (SIAP, 2008)

En México se producen aproximadamente 2,354,372 kg de queso anualmente, la producción sólo representó el 1.05% de la producción nacional del 2007 (223,183,000 kg) (SIAP, 2008). La participación en el mercado nacional es baja, pero presenta un potencial gracias a las variedades de quesos tradicionales elaborados en la zona (Cervantes y col., 2008). Cabe mencionar que la industria y las importaciones normalmente no contemplan dentro de sus inventarios quesos como el molido, el tipo batanero con verduras, enchilado, panela y el tipo Oaxaca.

La variedad de queso que más se produce es el Oaxaca con un 67% del volumen, ya que es la variedad preferida por los consumidores debido a que es empleado para elaborar quesadillas o quesos fundidos, le sigue el queso molido con un 20% siendo este el queso más tradicional, y finalmente el queso batanero con verduras y chiles con un 11%. (SIAP, 2008)

Desde 1994 Sigma Alimentos, amplió su mercado en quesos, se expandió a los mercados de Estados Unidos, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Costa Rica, El Salvador, República Dominicana y Perú. Sigma estima que es líder de este mercado, con una participación de 27%, aproximadamente. Entre los principales participantes están: Sigma Alimentos, Chilchota, Lácteos Algil y Lala. (SIGMA Alimentos, 2009)

## **2.7 Clasificación de los quesos**

Como existen diferentes tipos de quesos y no se pueden clasificar como uno solo, existen varias formas para clasificar los quesos. Estas clasificaciones se llevan a cabo de la siguiente forma:

1. De acuerdo al tipo de pasta o del contenido de humedad: fresca, blanda, semidura y dura
2. De acuerdo al método de coagulación de la caseína. Los quesos al cuajo llevan un proceso enzimático, los quesos de coagulación láctica llevan un proceso de ácido láctico y los quesos en los que se llevan a cabo ambas coagulaciones.
3. De acuerdo al microorganismo utilizado en la maduración y la textura del queso. Estos se clasifican en quesos de ojos redondos, granulados y quesos de textura cerrada.

#### **2.7.1 Quesos frescos**

Estos quesos contienen un alto porcentaje de humedad (50-60%), no requieren de un proceso de maduración y deben conservarse a una temperatura de 8°C (Quesos artesanales, 2010).

#### **2.7.2 Quesos de pasta blanda**

Estos quesos son elaborados con leche entera, parcial o enteramente descremada. Estos quesos pueden ser madurados e incluso adicionados con mohos (Quesos artesanales, 2010).

#### **2.7.3 Quesos de pasta semidura**

Son elaborados con leche entera o parcialmente descremada, con presencia de ojos y de color blanco amarillento uniforme (esto depende de la variedad) (Quesos artesanales, 2010).

#### **2.7.4 Quesos de pasta dura**

Estos quesos son de baja humedad (26–34 %), son característicos por su masa compacta y por tener una corteza lisa y bien formada. Deben conservarse a una temperatura no mayor a 18°C (Quesos artesanales, 2010).

Algunos ejemplos de quesos maduros y los microorganismos empleados para que estos concluyan su maduración adecuada se mencionan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Tipos de quesos**

Tipo de Queso	Microorganismos Utilizados
Queso Provolone	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Queso Gouda	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> y <i>Streptococcus diacetylactis</i>
Queso Cheddar	<i>Lactococcus lactis</i> y/o <i>Leuconostoc cremosis</i>
Queso Romano	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
Queso Emmental	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Queso Edam	<i>lactobacillus helveticus</i> , <i>lactobacillus casei</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Queso Camembert	<i>penicillium candidum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Queso Roquefort	<i>Penicillium roqueforti</i>
Queso Cottage	<i>Lactococcus lactis</i>

### 2.7.5 Quesos maduros

Los quesos maduros son aquellos que llevan un proceso de maduración (Tabla. 1) después de su elaboración, este tiempo puede ser por meses o incluso hasta años. Cuantos más años tenga el queso se considera más maduro, partir de los 6 meses los quesos se consideran maduros. Estos quesos contienen menos humedad que los quesos frescos, tienen una pasta firme un sabor y un olor más intenso. Usualmente los quesos maduros son para acompañar los vinos o alguna comida muy exótica o simplemente como bocadillos, en algunos tipos de quesos maduros su sabor es tan fuerte que es necesario acompañarlo con algún otro tipo de alimento o bebida. Este tipo de quesos requiere de algún tipo de microorganismos para poder madurar adecuadamente (dependiendo el tipo de queso que se desee elaborar) y así poder obtener lo deseado (Quesos artesanales, 2010).

## **2.8 Propiedades Del Queso**

El queso contiene diferentes componentes que brindan beneficios a la salud, ya que proviene de la leche de la cual es recomendado su consumo diario. Los más importantes son las proteínas, el calcio, las vitaminas y las grasas (FONAES, 2005).

### **2.8.1 Proteínas**

Los quesos contienen del 10 al 30 % de proteína, dependiendo del método de manufactura (quesos duros o blandos), dando al queso textura y sabor. La digestibilidad de la proteína del queso es de 95 %, muy parecida a la del huevo o algunos productos cárnicos (FONAES, 2005).

### **2.8.2 Calcio**

El queso es una fuente excelente de calcio y varía de acuerdo al contenido de agua y el método de manufactura. Al igual que el calcio de la leche, el del queso también es bien asimilado por el cuerpo humano (FONAES, 2005).

### **2.8.3 Vitaminas**

El contenido de vitaminas A, D, E, depende directamente del contenido de grasa en el producto (de 0 % en los quesos descremados a 70 % en los quesos enriquecidos con crema). El contenido de vitaminas del Complejo B y vitamina C, varían considerablemente de acuerdo al tipo de queso. Esto resulta de dos factores opuestos: la pérdida durante la elaboración y su enriquecimiento durante el proceso de maduración, en donde las bacterias y hongos sintetizan algunas vitaminas como son: riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, ácido fólico, así como también algo de tiamina y B12 (FONAES, 2005).

### **2.8.4 Grasas**

Durante la maduración la grasa juega un papel importante en el aroma del queso. La grasa de la leche está en el queso en forma emulsificada, por lo que son más digeribles (FONAES, 2005).



Figura 3. Estados con mayor actividad quesera en México.

## **Capítulo 3**

### **3.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1 Etapas**

La siguiente investigación se llevo a cabo en tres etapas las cuales consisten en:

1. Preparación del inóculo.
2. Realización de los quesos y adición del inóculo
3. Evaluación del proceso fermentativo
  - 3.1 Determinación de acidez
  - 3.2 Determinación de alcohol
  - 3.3 Evaluación física de los quesos

#### **3.1.2 Localización**

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila, a 8 Km. al sur de la ciudad de Saltillo, presentando una latitud Norte de  $25^{\circ} 23'$ , una longitud Oeste de  $101^{\circ} 02'$  y una altura de 1743 msnm), en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

#### **3.1.3 Materiales reactivos y equipos de laboratorio**

##### **3.1.3.1 Materiales**

En la tabla 4 se muestran los materiales utilizados para esta investigación.

**Tabla 4. Materiales**

Vasos de precipitado de 500ml	Espátula
Gradilla	Micro pipeta
Matraz de aforación	Pipetas
Moldes para queso	Mortero
Termómetro	Celdillas
Tubos de plástico para centrifuga	Cajas Petri
Tubos de ensaye	Tela de manta
Probeta	Matraz Erlenmeyer 1000 ml
Estufon	Un colador
Olla	Cuchillo
Cuchara	Puntillas
Porta objetos	Asa bacteriológica

### 3.1.3.2 Equipos de laboratorio

En la tabla 5 se muestran los equipos de laboratorio que se utilizaron durante la investigación.

**Tabla 5. Equipos de laboratorio**

Refrigerador, marca IEM
Incubadora, Riossa E-71
Vortex
Balanza analítica, OHAUR
Centrifuga, marca UNICO
Espectrofotómetro, Velab™
Agitador magnético, Termolyne
Parrilla, Termo sientific
Microscopio optico
Baño María, Novatech
Micropipeta
Campana de flujo laminar, scorpión scientific.



### 3.1.3.3 Reactivos

En la siguiente tabla se muestran los reactivos utilizados para preparar medio MRS y lo necesario para realizar una tinción de gram.

**Tabla 6. Reactivos**

Peptona de caseína	Acetato de sodio
Extracto de carne	Tween 80
Extracto de levadura	Agar bacteriológico
Dextrosa	Hidróxido de sodio
Fosfato de potasio	Fenoltaleína
Citrato de sodio	Dicromato de potasio
Sulfato de Magnesio	Acido sulfúrico
Sulfato de manganeso	Carbonato de potasio
Safranina	Azul de metileno
Cristal violeta	Acetona

### 3.1.4 Materia Prima (Quesos)

La leche para la realización de los quesos se obtuvo en el establo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, misma donde se realizó esta investigación. Se adquirieron 10 litros de leche fresca para cada uno de los experimentos.

### 3.1.5 Etapa 1. Preparación del inóculo

La cepa de *L. mesenteroides* utilizada en este trabajo se tomó de la colección de bacterias del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Para la reproducción de *L. mesenteroides* se prepararon catorce tubos de ensayo con medio líquido, cada tubo contenía 7 ml de caldo MRS cuya formulación se muestra en la Tabla 7 especificando las cantidades necesarias para preparar un litro de caldo MRS.

**Tabla 7. Componentes del medio MRS**

Reactivo	Gramos/Litro
Peptona de caseína	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Fosfato de potasio	2
Citrato de sodio	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Acetato de sodio	5
Tween 80	1
Agar	12

Se colocaron los reactivos en un matraz de 250 ml agregándole los 100 ml de agua destilada, se colocó un agitador magnético y se colocó el matraz en una parrilla en agitación leve a una temperatura de aproximadamente 50°C y así acelerar la mezcla de los componentes.

Una vez que el medio se ha disuelto totalmente tomando una apariencia anaranjado transparente se colocó en los tubos de ensaye, 7 ml por tubo con la ayuda de una micropipeta en condiciones de esterilidad, posteriormente se colocan las tapas de manera que no se sellen durante el tratamiento térmico, y que a la vez no se derrame el contenido. Se colocan en un vaso de precipitado.

Se colocan en una autoclave para llevar a cabo una esterilización. El procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de 121 °C a 15 Lb de presión por 15 minutos. Una vez concluidos los 15 minutos en estas condiciones se saca el matraz con los tubos de la auto clave y se cierran los tubos para así evitar alguna contaminación. Se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Para poder sembrar en los tubos es necesario una campana de flujo laminar para poder conservar el área estéril y así evitar algún tipo de contaminación. Una vez que los tubos están a temperatura ambiente se limpia la campana y se coloca un

mechero. Se esteriliza la aza bacteriológica llevándola al rojo vivo y enfriándola en un lado del agar cuidando no dañar las colonias. Una vez estéril y enfriada el aza se toma una colonia pequeña y uniforme y se pasa al tubo de ensaye con el medio líquido enjuagando el aza en este. Y así se prosigue hasta llevara a cabo lo anterior en los catorce tubos.

Los tubos se inocularon y taparon dentro de la campana para que no se contaminen, se colocan en una incubadora a 29 °C durante 24 h. La campana se limpio con alcohol para así evitar que quede contaminada, esto se recomienda para evitar contaminaciones cruzadas.

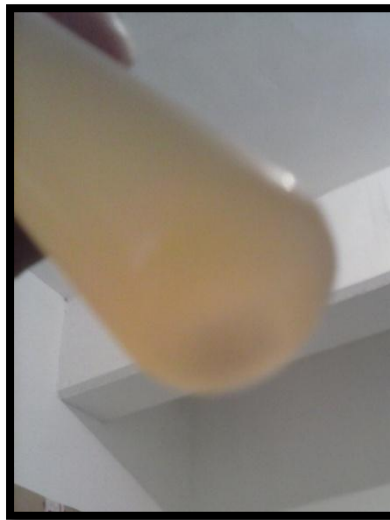
Se preparo agar MRS en cajas petri de tres divisiones. Una vez que los tubos estuvieron 24 h en la incubadora se tomo una muestra de cada tubo y se siembro por estría abierta identificando el numero de tubo que se siembra en cada división. Las cajas se colocan en la incubadora por 24 h.

Una vez transcurridas las 24 h de incubación se realizo un frotis para observar las características en el microscopio y determinar si se encontraba *L. mesenteroides*. Una vez confirmado *L. mesenteroides* se escogen las colonias para así proliferar en medio liquido e inocular los quesos.

Se preparo medio MRS y se coloco en tubos para cultivo, como se observa en la figura 4, se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 min., se deja enfriar y de las colonias previamente evaluadas se toma una muestra e inocula el medio, los tubos se incuban a 28°C durante 24 h. hasta alcanzar la turbidez correspondiente al tubo 4 en la escala de McFarland (Anexo 1). Una vez obtenido lo anterior se guardan en refrigeración para detener el crecimiento e inocular posteriormente los quesos.



**Figura 4. Tubos con caldo MRS**



**Figura 5. Crecimiento de *L. Mesenteroides* en el caldo MRS**

### **3.1.6 Etapa 2. Realización de los quesos y adición del inóculo**

La realización de los quesos fue hecha en el laboratorio de Alimentos I. Se compraron 10 litros de leche bronca en el establo de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Se pasteurizó la leche a 72 °C por 1 minuto, después se bajó la temperatura a 40°C. Una vez que la temperatura llegó a 40°C se le agrega el cloruro de calcio (3ml por cada 10L), diluido en 100 ml de agua, una vez disuelto se le agrega el cuajo (3ml por cada 10L), diluido en 100ml de agua, una vez agregado el cuajo se deja reposar la leche durante 30 minutos asegurando que conserve una temperatura de 40°C.

Una vez ya reposada la leche y separadas las fases sólida y líquida se corta en cuadros de aproximadamente 3ml, manteniendo la temperatura a 40 °C. Se mezcla suavemente y se deja reposar 5 minutos. Ya una vez transcurridos los 5 minutos se desuera. Los moldes y la tela de manta, cortada previamente en cuadros grandes que cubran los moldes, se colocan en una hoyo con agua e hirvieron para así evitar contaminación.

La cuajada se coloca en los moldes y se deja en prensado 12 horas para que la cuajada deseche el suero restante. Posteriormente se sacan de los moldes y se colocan en el refrigerador a una temperatura de aproximadamente 4°C. Una vez listo tanto el inóculo como los quesos, se colocan los quesos en vasos de precipitado de 600 ml cada uno. Se identifican los vasos como testigo, 40, 60 y 120. Una vez identificados se introducen los quesos y el inóculo según la Figura 6.



**Figura 6. Queso inoculado con *L. mesenteroides***

Cada tubo contiene 7ml de inóculo, cada queso tiene diferentes concentraciones de inóculo 40, 60 y 120 ml de caldo MRS con *L.mesenteroides*. Una vez agregado el inóculo en los quesos se tapan los vasos con papel aluminio, como se muestra en la figura 6, se colocan en una incubadora a 28 °C y se dejan por un periodo de 22 días asegurándose que los quesos estén bien tapados, monitoreando el porcentaje de acidez, los grados de alcohol y la evaluación física de los quesos a los 0, 7, 15 y 22 días.



Figura 7. Queso panela inoculado en diferentes concentraciones de *L. mesenteroides* a una temperatura de 28-30 °C.

### 3.1.7 Etapa 3. Evaluación del proceso fermentativo

#### 3.1.7.1 Etapa 3.1. Determinación de acidez

El porcentaje de acidez contenido en la muestra se determina mediante la titulación de la muestra con hidróxido de sodio. Se toma 2 gramos de cada muestra y se le agrega 8 ml de agua destilada y se trituran en el mortero para que se mezclen bien las sustancias contenidas en el queso, después se pasa a un matraz y se le agrega 4 gotas de verde de bromocresol. Se titula con el hidróxido de sodio y se registran los mililitros gastados. Esta determinación se realizó por triplicado. Este procedimiento se hará al día 0, 7, 15 y 22 días para obtener las diferencias en cada queso.

Una vez obtenidos los mililitros gastados se calcula el porcentaje de acidez con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{\text{ml de NAOH gastados} \times \text{normalidad} \times \text{peso molecular}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

El verde de bromocresol se utiliza como indicador para este proceso debido a que su rango de intervalo de transición de pH se encuentra entre 3.8 y 5.4, rango en el que se encuentra el pka del ácido láctico, que es de 3.86 y permite la mejor identificación de las cantidades de este ácido presente en una muestra.

### **3.1.7.2 Etapa 3.2. Determinación de alcohol**

La prueba de grados de alcohol se realizó con la técnica de dicromato de potasio esta prueba consiste en tomar 2 gramos de muestra y se molió en el mortero con 15ml de agua destilada. Se homogenizó con ayuda de un vortex a 1500 rpm. Se tomó una muestra de 2 ml con la pipeta electrónica y se centrifugó a 3200 rpm por 30 min. Una vez terminado el tiempo de la centrifugación se adicionó 2 ml de solución final, se homogenizó en el vortex a 1500 rpm. Se preparó un baño maría a una temperatura de 80 - 85 °C, las muestras fueron colocadas en una rejilla y posteriormente sumergidas en un baño maría durante 30 min. Una vez transcurridos los 30 min se retiraron las muestras del baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, para después leerlas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 440 nm. Las correspondientes lecturas del espectrofotómetro fueron sustituidas en una curva de alcohol bajo la siguiente fórmula

### **3.1.7.3 Etapa 3.3. Evaluación física de los quesos**

La determinación de textura al igual que la acidez y el grado de alcohol también se llevó a cabo a los tiempos 0, 7, 15, y 22 días, se realizó con un penetrometro, este aparato cuenta con una pequeña regla al lado izquierdo, que determina la fuerza aplicada en todas las muestras.



La fórmula a utilizar para determinar la presión aplicada en las muestras, en este caso el queso es la siguiente:

$$presion = \frac{fuerza}{Area}$$

### 3.1.8 Análisis estadístico

Para determinar si los cambios fisicoquímicos presentes en quesos fermentados por *Leuconostoc mesenteroides* tienen relación con los metabolitos producidos se realizó un diseño multifactorial (4x4) mediante un análisis de varianza (ANVA) al 95 % de confianza. Se consideraron las variables fisicoquímicas de acidez, alcohol, textura, ácido láctico y ácido sórbico. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de T de student con un nivel de significancia de 0.05. El análisis de los datos se realizó con el paquete estadístico JMP 5.0.1 2002.

## Capítulo 4

### 4.1 Resultados y conclusiones

Los datos que a continuación se presentan son los resultados generados de la investigación realizada en el laboratorio de alimentos en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, enfocado al seguimiento cuantitativo de la producción de lactato y sorbato en quesos adicionados con *L. mesenteroides* y sus efectos en propiedades organolépticas.

#### 4.1.1 Etapa 1. Preparación del inóculo

*Leuconostoc mesenteroides* pertenece a las bacterias ácido lácticas, las colonias son redondas de aproximadamente 1mm y lisas color blanco grisáceo. Son gran

positivas en forma de cocos y cocobacilos en el caso de caldo MRS. El proceso de siembra y la purificación de *L. Mesenteroides* se repitieron varias veces ya que se observó constantemente una contaminación fúngica durante el proceso. Se realizaron varias pruebas y se trató de aislar la bacteria en varias ocasiones. Se realizaron alrededor de 8 siembras de las cuales 5 se contaminaron. Después de aproximadamente dos semanas se logró purificar al microorganismo, en este caso *L. mesenteroides*. Se realizaron varias muestras tanto en caldo MRS y en agar MRS. Como se menciona en la literatura al analizar las colonias crecidas en agar tenían formas de cocos muy bien definidos, en el caso del caldo MRS al realizar la tinción de gram se observó que formaban largas cadenas de cocos y en algunas ocasiones se podían confundir con coco-bacilos, como lo menciona en la lectura (Sneath y col., 1991).

Las colonias obtenidas en caja con agar MRS fueron colonias uniformes de aproximadamente 0.3 y 0.5 cm, color blanco grisáceo, redondas bien definidas. Como lo menciona Sneath, 1986, fueron gram positivas en forma de cocos y coco bacilos.

#### **4.1.2 Etapa 2. Realización del queso y adición del inóculo**

La realización de los quesos se llevó a cabo en el laboratorio de alimentos 1, se obtuvieron 4 quesos panela de aproximadamente 250g cada uno. De acuerdo a la literatura el queso panela se considera un queso fresco ya que no lleva ningún tipo de maduración. El proceso de elaboración de queso panela es muy simple ya que no requiere de muchos pasos y no necesita tiempo de maduración alguna.

El inóculo se preparó según la literatura, en caldo MRS y agar se adicionan los reactivos correspondientes, tomado a la dextrosa y la peptona como principal fuente de nitrógeno y carbono con un pH final de 6.4, prepararon 250 ml de caldo MRS y se agregaron las cantidades 40, 60 y 120 ml a cada queso.

Los quesos se fermentaron por un periodo de 22 días, cada uno con diferente cantidad de inóculo. En cada queso se observaron diferentes cambios, hubo producción de gas y presencia de ojos excepto en el testigo. El testigo no presentó cambio alguno sin embargo después de los 15 días desprendió un olor a putrefacción.

El tratamiento 40 tuvo poca aparición de ojos, y los pocos que aparecieron fueron pequeños. El tratamiento 60 al igual que el 40 no presentaron producción de gas, pero tuvieron una cantidad mayor de ojos aunque al igual que en el tratamiento 40 eran pequeños. El tratamiento 120 presenta la mayor producción de gas ya que los ojos que se presentaron en este tratamiento fueron de mayor tamaño con respecto a los anteriores tratamientos así mismo se presentaron con mayor cantidad que de tal manera debido a la alta producción de gas que el queso aumentó de volumen siendo insuficiente el espacio en el vaso de precipitado.

Conforme al color el tratamiento 0 obtuvo un color un poco amarillento en la superficie y una consistencia viscosa. En el caso de los tratamientos el de 40 y 60 no obtuvo ningún cambio en la superficie cubierta por el medio, sin embargo en el área no cubierta por el medio presentó los mismos cambios que el testigo, se apreció un color amarillento y viscoso. En el caso del tratamiento 120 se encontraba sumergido completamente en el inóculo no tuvo ningún cambio notorio.

#### **4.1.4. Etapa 3. Evaluación del proceso fermentativo**

##### **4.1.4.1 Etapa 3.1. Determinación de acidez**

El porcentaje de acidez producido por los diferentes tratamientos en los distintos tiempos de fermentación fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ). Mientras que en la prueba de comparación de medias (Anexo 3) el tratamiento 40 a los 22 días de fermentación presentó el mayor porcentaje de acidez de 8.95, por otro lado el tratamiento 0 a los 22 días obtuvo un porcentaje de acidez de 8.15, el tratamiento 120 al 7 día obtuvo 7.42 y los siguientes más altos en el porcentaje de acidez fueron el

tratamiento 60 a los 7 días con 6.38, el 120 a los 15 días con 5.46 y el tratamiento 60 a los 15 días con 4.84 los cuales fueron estadísticamente diferentes.

Se observa en el Anexo 3 que el tratamiento 60 a los 22 días obtuvo 4.60, junto con el tratamiento 40 a los 15 días con 4.53, estadísticamente fueron similares ya que tuvieron rangos muy parecidos, al igual que el tratamiento 120 a los 22 días con 4.41. Los tratamientos siguientes resultaron ser semejantes entre ellos pero tuvieron menor porcentaje de acidez según el anexo 2, el tratamiento 0 a los 15 días con 4.11, el tratamiento 40 a los 7 días con 3.80, el tratamiento 0 a los 7 días con 2.82 y por último los tratamientos 0, 40, 120, y 60 al tiempo 0 con 0.92025 los cuales obtuvieron el mismo porcentaje de acidez debido a que los tratamientos aun no tenían el inóculo agregado.

En la Figura 8 se muestra la media del porcentaje de acidez en el queso panela producido por las diferentes concentraciones de inóculo de *L. mesenteroides* a través de los días de fermentación. El tratamiento 0 y el tratamiento 40 obtuvieron la misma línea de tendencia durante los 22 días, incrementando lentamente, y manteniéndose a la alza durante los 22 días. Mientras los tratamientos 60 y 120 se comportan de la misma manera teniendo un incremento a los 7 días, y descendieron lentamente conforme fueron pasando los días hasta llegar al día 22.

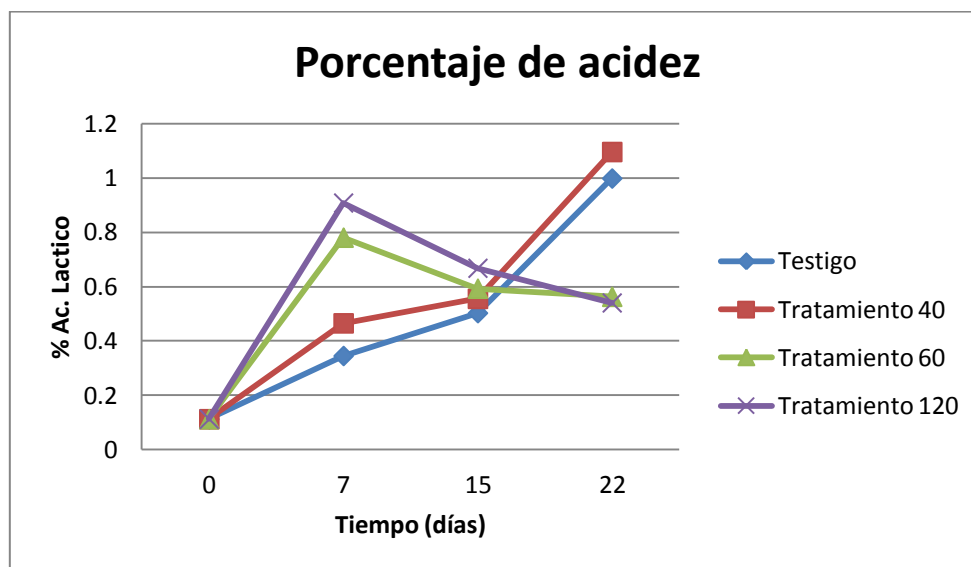
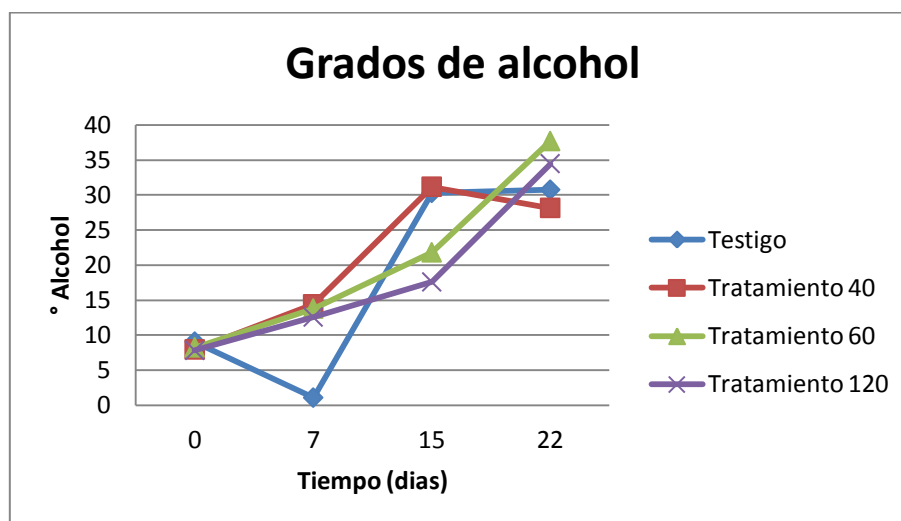


Figura 8. Porcentaje de acidez producida por los quesos a diferentes concentraciones de inóculo de *L. mesenteroides* a través de diferentes tiempos de fermentación.

#### 4.1.4.2 Etapa 3.2. Determinación de alcohol

El grado de alcohol producido por los diferentes tratamientos en los distintos tiempos de fermentación fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ). Todos los tratamientos a los 0 y a los 7 días presentaron la menor cantidad de alcohol, aumentando la cantidad de alcohol conforme fueron pasando los días, como se muestra en el Anexo 4. Siendo el tratamiento 60 a los 22 días el que presentó un mayor grado de alcohol con 0.1528, por otro lado el tratamiento 120 a los 22 días obtuvo un grado de acidez de 0.1526, el tratamiento 40 a los 15 días obtuvo 0.1524 y el tratamiento 0 a los 22 días obtuvo 0.1523, estos tratamientos resultaron ser estadísticamente semejantes al tratamiento 60 a los 22 días según la prueba de comparación de medias. Los siguientes tratamientos más altos en producción de grados de alcohol fueron el tratamiento 0 a los 15 días con 0.1523, al igual que el tratamiento 0 a los 22 días como se muestra en el Anexo 4, el tratamiento 40 a los 22 días con 0.1521 y el tratamiento 40 a los 22 días.

En la Figura 9 se muestra la media del grado de alcohol en el queso panela producido por las diferentes concentraciones de inóculo de *L. mesenteroides* a través de los días de fermentación. El tratamiento 0 presentó un descenso al 7 día, teniendo un incremento al 15 día y manteniéndose constante hasta los 22 días. Los tratamientos 40, 60 y 120 presentaron la misma producción de alcohol los primeros 7 días, después de esto el tratamiento 40 incrementó drásticamente, después del día 15 descendiendo el día 22. Por otro lado los tratamientos 60 y 120 mantuvieron la misma línea de tendencia, sin embargo el tratamiento 60 siempre se mantuvo por encima del tratamiento 120.



**Figura 9. Grados de alcohol producido por los quesos a diferentes concentraciones de inóculo de *L. mesenteroides* a través de diferentes tiempos de fermentación.**

#### 4.1.4.3. Etapa 3.3 Evaluación física de los quesos

En los diferentes tratamientos (excepto en el testigo) se observaron cambios en los quesos, el cambio más notorio que se observó fue la aparición de pequeños orificios en los quesos llamados ojos. Según algunos autores la principal función de

*Leuconostoc mesenteroides* en los quesos es el de metabolizar el citrato a CO<sub>2</sub>, responsable de la formación de ojos (Nath, K.R. y Kostak, B.J.1993).

En el tratamiento 0 (testigo) no se observó producción de gas, ya que el queso no presento ningún tipo de formación de ojos en superficie ni internamente, solo permaneció una pasta amarillenta. En el resto de los tratamientos a partir de los primeros 3 días de incubación, se pudo observar la presencia de ojos. En el tratamiento 40 se presento una gran cantidad de ojos pequeños de aproximadamente 0.2 cm de diámetro, a diferencia del tratamiento 120, los ojos que aparecieron en este tratamiento fueron de un diámetro aproximadamente de 0.6 cm de diámetro pero en menor cantidad.

El tratamiento 120 presento la mayor producción de gas, ya que al tercer día de incubación se observó que el queso se hincho debido a la gran cantidad de gas producido. Los orificios que tenía el queso eran grandes y de un diámetro superior al que presentaron los tratamientos 40 y 60. El tratamiento 60 al igual que el 40 obtuvo poca producción de gas ya que los ojos que se mostraban en el queso fueron más pequeños en relación a los del tratamiento 120, pero aproximadamente la misma cantidad que el tratamiento 120.



**Figura 10. Tratamiento 40 con presencia de ojos.**

Otro de los cambios que se pudo apreciar en los quesos fue el color, en el tratamiento 0 (testigo) el queso tomo un color amarillento y una consistencia viscosa en la superficie del queso. En el caso de el resto de los tratamientos, en el tratamiento 40 y 60 se observo el cambio de color de blanco a amarillento viscoso solo en la parte superior donde no alcanzaba a cubrir el inoculo, sin embargo, en el tratamiento 120 en el cual el medio cubría completamente el queso no se observaron cambios de ningún tipo.

La textura del queso se midió con un penetrometro manual como se observa en la Figura 12, la textura cambio conforme pasaron los días, excepto en el testigo. Como se puede observar en la Figura 11 el testigo se mantuvo constante durante los 22 días, tuvo un cambio mínimo después del 7 día. En el resto de los tratamientos la textura cambio de duro a muy suave. Como se observa en la Figura 11 todos los tratamientos aumentaron gradualmente conforme pasaron los días. Mostrándose la misma tendencia en los tratamiento. El tratamiento 120 fue el que presento los valores mayores en esta característica seguido del 40 y 60 respectivamente.

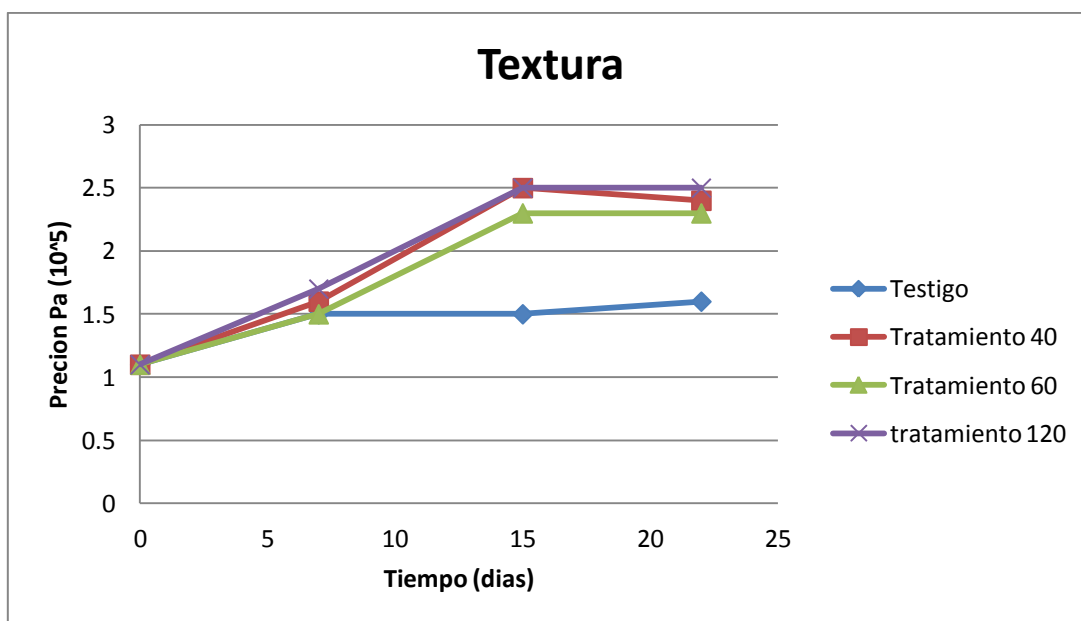


Figura 11. Cambios en la textura de los quesos a diferentes concentraciones de inoculo de *L. mesenteroides* a través de diferentes tiempos de fermentación.



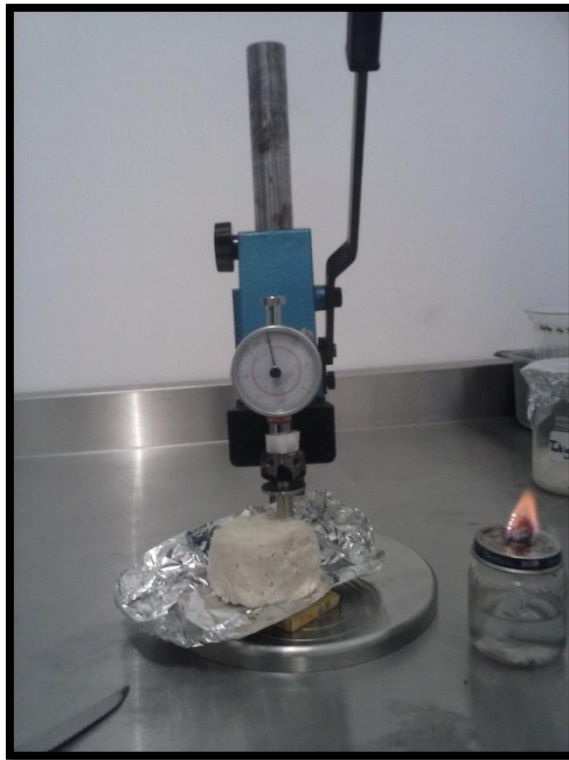


Figura 12. Medición de la textura con un penetrometro manual.

## Conclusión

La adición de un inoculo de iniciador de *L. mesenteroides*, para la maduración de quesos, influyo de manera significativa en dos aspectos principales el nivel de acidez y la textura.

Para el parámetro de acidez, se aprecia que el acido formado mayoritariamente es el acido láctico que presenta un pka de 3.86 y fue eficientemente valorado al utilizar el verde de bromocresol como indicador de vire cuyo rango abarca este pka, encontrándose que la muestra adicionada con 120ml de inoculo iniciador alcanza niveles de acidez similares a los obtenidos en 21 días con los quesos control, permitiendo así una reducción del tiempo de maduración.

Tocante a la textura del producto se observan cambios significativos entre las muestras no tratadas y las inoculadas; no encontrándose cambios significativos entre los tratamientos de las segundas, en lo referente a este aspecto.

El queso obtenido puede identificarse como de pasta suave, con un periodo de maduración de 7 días con formación de ojos de 0.6 cm de diámetro.

## **Bibliografía**

Análisis sensorial de los quesos 2002 (en línea). Ma. Concepción Chamorro, Manuel M. Lozada. Consultado 28 Marzo 2013. Disponible en: <http://books.google.com.mx>

Cervantes E, F., Villegas G, A., Cesín V, A., Espinoza O, A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos. Patrimonio que debe rescatarse. Mundi prensa México.

Clasificación de los quesos. Consultado 24 Abril 2013. Disponible en: <http://www.industrialmecanica.com>

Dermici, Y. y Hemme, D. "Growth of *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from French raw milk cheeses in a reference milk". *Milchwissenschaft* 49, 483-485 (1994).

Dykes, G.A., Britz, T.J. y von Holy, A. 1994a. Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged vienna sausages. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 246-252.

El economista. 20 enero 2011. El negocio del queso. (en línea). J. A Carlos Javier Almanza Gaviña. Consultado 17 Abril 2013. Disponible en: <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2011/01/20/negocio-queso>

Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración del queso manchego e identificación de la microbiota. 1998 (en línea). Antonia García Ruiz. Consultado el 24 de Abril 2013. Disponible en: <http://books.google.com.mx>.

Jay, J. 2000. Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Kammerlehner, J. "Hole formation in cheese by citrate-forming lactic acid bacteria". Deutsche Milchwirtschaft 47, 188-190 (1996).

Marth, E.H. 1974. Fermentations. En: Fundamentals of Dairy Chemistry. Ed. B.H. Webb, A.H. Johnson y J.A. Alford. Capítulo 13. Westport, CT: AVI.

Mather, D.W. y Babel, F.J. "Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with Streptococcus citrovorus". J. Dairy Sci. 42, 1917-1926 (1959).

Microbiología Industrial (en línea). Alicia hernandez. Col. Ileana Alfaro y Ronald Arrieta. Consultado 13 Marzo 2013. Disponible en: <http://books.google.com.mx>

Man, J., Rogosa, M. y Sharpe, M. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., 23, 130-135.

Nath, K.R. y Kostak, B.J. "Method for manufacture of pre-cheese and natural cheese". U. S. Patent 5, 213-827 (1993).

Quesos. Consultado 14 de Abril 2013. Disponible en: [www.fonaes.gob.mx](http://www.fonaes.gob.mx)

Quesos artesanales 2010 (en línea). Pablo Batro. Consultado 13 Marzo 2013. Disponible en: <http://books.google.com.mx>

Requena, T.; De la Fuente, M.A.; Fernández de Palencia, P.; Juárez, M. y Peláez, C. "Evaluation of a specific starter for the production of semi-hard goat's milk cheese". Lait 72, 437-448 (1992).

SIAP. 2008-2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Sagarpa. [En línea, Acceso 30 de septiembre de 2010:] <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>

Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. y Holt, J. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Sneath, P., Staley, J., Brenner, D., Holt, J., Castenholz, R., Schleifer, K., Tully, J., Ursing, J. y Williams, S. 1991. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9ª ed, Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Vedamuthu, E.R. "Engineering flavor into fermented foods". En: "Handbook of Anaerobic Fermentations". Ed. L.E. Erockson y D.Y.C.Fung. Marcel Dekker Inc. New York. 664(1988).

Villegas de G., Abraham 1993. Los Quesos Mexicanos. CIESTAAM. Chapingo, México. Elaboración de productos lácteos.1993. Manuales para educación agropecuaria SEP/trillas. México D.F.



## **Anexos**

### **Anexo 1**

#### **1. Preparación de las soluciones**

##### **1.1 Preparación de hidróxido de sodio**

El hidróxido de sodio se prepara en un matraz de aforación en este caso de 1L. Se toman 4 gramos de hidróxido de sodio sólido para 1 Litro de agua. El hidróxido de sodio se disuelve en un vaso de precipitado con 500ml de agua, se coloca en una parrilla de agitación con un agitador magnético hasta que se disuelva. Una vez disuelto el hidróxido de sodio se pasa al matraz de aforación y se afora con agua destilada.

##### **1.2 Solución oxidante**

Se pesan 4.165 gr de dicromato de potasio (97%) en un vaso de precipitado de 600 ml con mucho cuidado se le agregan 250 ml de ácido sulfúrico, se le agrega el dicromato de potasio y se mezcla con mucho cuidado. Se pasa a un matraz de aforación de 1000 mililitros y se afora con agua destilada.

##### **1.3 Solución de carbonato de potasio**

Se pesan 20 gr de carbonato de potasio (98%) y se colocan en un vaso de precipitado con 250 ml de agua, se coloca en una parrilla agitadora con un agitador magnético hasta que el carbonato de potasio se disuelva. Se pasa a un matraz de aforación de 1000 ml y se afora.

## 1.4 Solución final

La solución final se hace de la combinación de la solución oxidante y la solución de carbonato de potasio. Se colocan 4 ml de solución oxidante en un tubo de ensaye y se adiciona gota a gota 2 ml de solución de carbonato de potasio ( $K_2CO_4$ ) hasta que el burbujeo finalice.

## Anexo 2

### 2 Determinación de Acido láctico

#### Resumen

Rcuadrados	0.994347
Rcuadrados Adj	0.991696
Root Mean Square Error	0.231591
Respuesta de medias	4.325175
Observaciones (or Sum Wgts)	48

#### Análisis de varianza del porcentaje de acidez

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada
Modelo	15	301.86609	20.1244	375.2140
Error	32	1.711630	0.0536	Prob > F
C. Total	47	303.58240		<.0001



Nivel		Media de cuadrados
40,22	A	8.9571000
0,22	B	8.1595500
120,7	C	7.4233500
60,7	D	6.3804000
120,15	E	5.4601500
60,15	F	4.8466500
60,22	F G	4.6012500
40,15	F G	4.5399000
120,22	G H	4.4172000
0,15	H I	4.1104500
40,7	I	3.8037000
0,7	J	2.8221000
120,0	K	0.9202500
40,0	K	0.9202500
60,0	K	0.9202500
0,0	K	0.9202500

Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes.

### Anexo 3

#### 3 Determinación de alcohol

##### Resumen

RCuadrados	0.951022
RSquare Adj	0.905105
Root Mean Square Error	0.00025
Mean of Response	0.151534
Observations (or Sum Wgts)	32

##### Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calculada

<b>Modelo</b>	<b>15</b>	<b>0.00001942</b>	<b>0.0000013</b>	<b>20.7117</b>
<b>Error</b>	<b>16</b>	<b>0.00000100</b>	<b>6.2508</b>	<b>Prob &gt; F</b>
<b>C. Total</b>	<b>31</b>	<b>0.00002042</b>		<b>&lt;.0001</b>

Nivel	Media de cuadrados							
60,22	A						0.15285090	
120,22	A	B					0.15261600	
40,15	A	B					0.15247830	
0,22	A	B					0.15234465	
0,15		B					0.15231225	
40,22		B	C				0.15215565	
60,15			C	D			0.15169395	
120,15				D	E		0.15138615	
40,7					E	F	0.15115260	
60,7					E	F	G	0.15110940
120,7					E	F	G	0.15102030
0,0						F	G	0.15076515
60,0						F	G	0.15070575
40,0						F	G	0.15068415
120,0						F	G	0.15067335
0,7							G	0.15059235

Los niveles no conectados con la misma letra son significativamente diferentes.