



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
LICENCIATURA EN NUTRICIÓN**

**FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO FERMENTADO TIPO  
YOGURT A BASE DE SOYA Y EVALUACIÓN DE SUS  
PROPIEDADES NUTRIMENTALES, FISICOQUÍMICAS Y  
ORGANOLÉPTICAS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADO EN NUTRICIÓN**

**PRESENTAN:**

**CALLEJAS RAMÍREZ MARÍA LUISA  
LUGO SILVA MARÍA LETICIA**

**DIRIGIDA POR  
M.C. RODOLFO GÓMEZ RAMÍREZ**

**CENTRO UNIVERSITARIO  
SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. MÉXICO.  
2000**

**BIBLIOTECA CENTRAL UAQ  
"ROBERTO RUIZ OBREGÓN"**

No. Reg. 465027

TS

Clas. 664.07

C1574.

**Este trabajo se realizó en el laboratorio de Bromatología de la Licenciatura en Nutrición, en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Poscosecha de Frutas y Hortalizas del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) de la Facultad de Química y en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, bajo la Dirección del M. en C. Rodolfo Gómez Ramírez.**

## - RESUMEN -

Al producto de leche de soya fermentada por bacterias lácticas se le cita en la literatura científica como sogurt. La mezcla de bacterias lácticas utilizada para la producción comercial de yogurt, constituida por *Lactobacillus delbrueckii* población *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, también se han empleado para la preparación de sogurt. *L. bulgaricus* que no utiliza la leche de soya como sustrato, mientras que *S. thermophilus* utiliza eficientemente la leche de soya, sobre todo cuando se utiliza en mezcla con otras bacterias lácticas.

En los trabajos publicados sobre la producción de sogurt, se utilizan otros ingredientes para mejorar la producción de ácido, tales como leche descremada en polvo, lactosa, glucosa, leche evaporada y fructosa.

El objetivo de este trabajo fue elaborar un sogurt utilizando la leche de soya como único sustrato y dos diferentes cultivos: 1) cultivo comercial, constituido por *S. thermophilus*, *L. delbrueckii lactis subsp.* y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (S.C) y 2) Gránulos de kéfir, constituidos por *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp* y *Saccharomyces unisporus* (S. B).

La leche de soya se inoculó con cada uno de los cultivos y se incubó a 45 °C hasta lograr una acidez de 60 °D y se evaluaron las actividades proteolítica y lipolítica, la composición proximal del sogurt, la utilización neta proteica (UNP), así como la calidad organoléptica mediante las pruebas de rango y de nivel de agrado.

Los resultados del trabajo indican que el S.B. crece más rápido en la leche de soya, ya que alcanzó los 60 °D a las 8 horas, mientras que el S.C. lo hizo a las 13 horas.

El S.C. mostró una actividad proteolítica de 2.66, a diferencia del S. B que presentó un índice de proteólisis de -6.85, lo cual indica que tras la incubación se llevó a cabo una síntesis proteica.

El S.B. presentó una mayor actividad lipolítica (921.05) que el S.C. (121.79). La composición proximal fue muy parecida, presentando los siguientes valores para el S.B y S.C, respectivamente: proteína (3.03 y 3.31%), grasa (2.14 y 2.18%), fibra cruda (4.28 y 3.19%), cenizas (0.41 y 0.39%), hidratos de carbono (0.08 y 0.83%) y sólidos (9.94 y 9.90%).

La UNP se evaluó por duplicado, sin embargo, solamente la primera repetición arrojó resultados consistentes, obteniéndose los valores de 35.37 para el S.C y de 60.29 para el S.B.

La evaluación sensorial se comparó el sogurt con yogurt de leche de vaca (Y.A), tanto en forma natural como con azúcar. La prueba de rango mostró que el Y.A. con y sin azúcar presentó la mayor calificación, mientras que los dos tipos de sogurt presentaron la misma calificación cuando se probaron sin azúcar. Cuando se agregó azúcar, el S.C. tuvo mayor aceptación que el preparado con gránulos de kéfir. La prueba de nivel de agrado indica que al agregar azúcar se mejora la aceptabilidad del sogurt pero no se logra igualar la calificación del Y.A. con azúcar. Sin embargo, se puede apreciar que el S.K. con azúcar presentó buena calificación.

## *AGRADECIMIENTOS*

*Antes que nada doy gracias a Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida, asimismo agradezco infinitamente a mis padres J. Pueblito y Ma. Guadalupe, por ayudarme y alentarme a seguir adelante. También a mis hermanos Pola, Carmela, Porfirio, J. Pueblito, Juan, Rufina, Ma. De Jesús y Alicia, por apoyarme y darme ánimos en cada momento, de igual manera a Lety por su esfuerzo y dedicación en la realización de este trabajo.*

*Al M. en C. Rodolfo Gómez Ramírez, por compartir sus conocimientos y el brindarnos un poco de su valioso tiempo para la realización de esta investigación.*

*A todos mis asesores que en cada revisión me ayudaron a mejorar mi trabajo, gracias a su experiencia y conocimiento sobre el área: M.C. Ofelia Puga Sánchez, M. C. Juana Isela Rojas Molina y L.N. Laura Regina Ojeda Navarro.*

*Agradezco enormemente a la M.C. Guadalupe Zanella Vargas, por donarme parte de los gránulos de kéfir que ella identifico, de igual manera al SDAyR del estado de Guanajuato por la aportación de la semilla de soya, especialmente al Ing. Felipe de Jesús Rivera Palacios.*

*Por último agradezco a todas aquellas personas, que de algún modo me apoyaron para la realización de este trabajo.*

*MARÍA LUISA CALLEJAS RAMÍREZ.*

*A mis padres Socorro y Patrocinio por haberme dado la vida, amor, comprensión y sobre todo por haberme brindado la oportunidad de estudiar.*

*A mis hermanos Jaime, Alfredo, Guadalupe y Martín por brindarme su compañía y amor.*

*Al M. C. Rodolfo Gómez por haberme brindado mucho de sus conocimientos, por su paciencia y sobre todo por todo el tiempo que nos dedicó para la realización de la tesis.*

*A la M. C. Juana Isela Rojas por apoyarnos en la realización de la tesis, sobre todo por permitirnos que el maestro Rodolfo nos mandará información a su correo y que con mucho gusto nos la entregaba.*

*A la M. C. Ofelia Puga y L. N. Laura Regina Ojeda por haber participado como asesoras y hacer posible la culminación de la tesis.*

*A mi amiga y compañera de tesis Luisa por brindarme su amistad, por su comprensión y paciencia.*

*MARÍA LETICIA LUGO SILVA.*

<b>INDICE GENERAL.</b>	<b>Página</b>
RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
I. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
III. JUSTIFICACIÓN.....	5
IV. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	6
A. Información general sobre la soya ( <i>Glicine max</i> ).....	6
1. Descripción botánica de la soya.....	6
2. Composición química de la soya.....	7
3. Biodisponibilidad de Zn, Fe, Cu, Mn, Mg, en la proteína de soya.....	8
4. Constituyentes de la soya que afectan la biodisponibilidad de los minerales.....	8
5. Propiedades funcionales de la soya.....	10
6. Factores que tienden a desalentar el consumo de la soya.....	10
6.1. Sabor.....	10
6.2. Factores antifisiológicos.....	11
6.2.1. Inhibidores de tripsina (IT).....	11
6.2.2. Hemaglutininas.....	13
6.2.3. Otros factores antifisiológicos.....	13
6.3. Producción de flatulencia.....	14
7. Usos de la soya y sus derivados.....	14
7.1. Alimentos de soya para consumo humano.....	16

<b>B. El yogurt.....</b>	<b>16</b>
1. Definición y tipos de yogurt.....	16
2. Proceso de elaboración del yogurt.....	17
2.1. Aumento de la concentración de sólidos.....	17
2.1.1. Adición de leche en polvo.....	18
2.1.2. Concentración por evaporación.....	18
2.1.3. Adición de suero de leche en polvo.....	18
2.1.4. Concentración por ultrafiltración (UF) y ósmosis inversa (OI).....	18
2.1.5. Comparación de los métodos de adición.....	19
2.2. Homogeneización.....	19
2.3. Pasteurización.....	20
2.4. Siembra de fermentos lácticos.....	20
2.4.1. Clasificación de la bacteria iniciadora.....	21
2.4.2. Simbiosis y factores estimuladores e inhibidores....	21
2.5. Envasado.....	22
2.6. Incubación.....	22
2.7. Tapada, refrigeración y transporte.....	23
3. Cambios bioquímicos en el yogurt.....	23
3.1. Metabolismo de los carbohidratos.....	23
3.1.1. Producción de ácido láctico.....	23
3.1.2. Hidrólisis de la lactosa por la galactosidasa.....	24
3.1.3. Producción de compuestos responsables del sabor.....	25

3.2. Proteólisis.....	26
3.2.1. Condiciones que afectan la proteólisis.....	26
3.2.2. Productos de la proteólisis.....	27
3.3. Lipólisis.....	27
C. Productos fermentados a base de soya “sogurt”.....	27
1. Métodos para la preparación de la leche de soya.....	28
2. Microorganismos que fermentan la leche de soya.....	28
3. Ingredientes utilizados en la elaboración del sogurt.....	32
D. Kéfir.....	33
1. Definición.....	33
2. Beneficios a la salud por consumo de kéfir.....	35
E. Evaluación sensorial.....	35
1. Prueba de rango.....	36
2. Prueba de nivel de agrado.....	36
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
VI. METODOLOGÍA.....	38
A. Preparación de la “leche de soya”.....	38
A.1. Materia prima.....	38
A.1.1. Variedad de soya cajeme.....	38
A.1.2. Características del cultivo iniciador.....	38
A.2. Procedimiento de preparación de la leche de soya.....	39
B. Preparación del sogurt.....	39
C. Evaluación de la utilización del sustrato.....	40

C.1. Utilización de carbohidratos.....	40
C.2. Actividad proteolítica.....	40
C.3. Actividad lipolítica.....	41
C.3.1. Determinación de ácidos grasos libres (A.G.L).....	41
C.3.2. Cálculo de la actividad lipolítica.....	41
D. Análisis proximal del yogurt de soya.....	42
D.1. Sólidos totales.....	42
D.2. Cenizas.....	42
D.3. Nitrógeno total.....	42
D.4. Grasa.....	42
D.5. Determinación de fibra cruda.....	43
E. Evaluación de la calidad de la proteína. Utilización Neta Proteica (NPU), técnica del nitrógeno corporal.....	44
F. Evaluación sensorial del yogurt de soya.....	46
F.1. Selección de jueces consumidores.....	46
F.2. Prueba de rango.....	49
F.3. Prueba de nivel de agrado.....	50
VII. RESULTADOS.....	53
A. Utilización del sustrato.....	53
A.1. Acidez.....	53
A.2. Actividad proteolítica.....	53
A.3. Actividad lipolítica.....	54
B. Análisis químico proximal.....	55

C. Calidad de la proteína (Utilización Neta Proteica).....	56
D. Evaluación sensorial.....	57
D.1. Prueba de rango.....	57
D.1.1. Prueba de rango en yogurt de soya sin azúcar.....	57
D.1.2. Prueba de rango en yogurt de soya con azúcar (6%).....	58
D.2. Evaluación sensorial con la prueba de nivel de agrado.....	59
VIII. DISCUSIÓN.....	61
A. Utilización del sustrato.....	61
A.1. Acidez.....	61
A.2. Actividad proteolítica.....	62
A.3. Actividad lipolítica.....	62
B. Análisis proximal.....	63
C. Calidad de la proteína (Utilización Neta Proteica).....	65
D. Evaluación sensorial.....	65
D. 1. Prueba de rango.....	65
D.2. Prueba de nivel de agrado.....	66
IX. CONCLUSIONES.....	68
X. POSIBLES APLICACIONES Y USOS.....	69
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
ANEXOS.....	72

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
01 Usos de la soya y derivados.....	15
02 Clasificación basada en el estado físico del producto.....	17
03 Diferentes métodos de preparación de la leche de soya.....	29
04 Microorganismos utilizados para la fermentación de la leche de soya...31	31
05 Ingredientes utilizados para la elaboración del sogurt.....	32
06 Orden de presentación de muestras para la prueba de rango (con y sin azúcar).....	48
07 Orden de presentación de muestras para la prueba de nivel de agrado con y sin azúcar.....	51
08 Resultados de las concentraciones de proteína de los sogures a tiempo cero y después de la incubación.....	54
09 Resultados de la actividad proteolítica en los dos tipos de sogurt.....	54
10 Resultados de actividad lipolítica de los dos tipos de sogurt después del período de incubación.....	55
11 Resultados del análisis proximal en los dos sogures.....	55
12 Valores de UNP obtenidos en el ensayo biológico.....	57
13 Puntuación obtenida por las diferentes muestras de yogurt sin azúcar en la prueba de orden de rango.....	57
14 Puntuación obtenida por las diferentes muestras de yogurt con azúcar en la prueba de rango.....	58
15 Resultados de la prueba de nivel de agrado.....	60

16	Resultados del análisis de varianza en la prueba de nivel de agrado en los tres productos con y sin azúcar.....	62
17	Información nutrimental de los tipos de yogurt A, B, C y porcentaje cubierto de la ingesta diaria recomendada (% IDR) de 2000 kcal por el I.N.N.S.Z y 30 g de fibra.....	65

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
01	Planta de soya.....	6
02	Curva de desarrollo de la acidez de los dos sogurt.....	53
03	Evolución del peso corporal de las ratas del ensayo biológico.....	56

## **I. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.**

Debido a la dificultad que representa para la mayoría de las personas que cambian de un régimen omnívoro a uno vegetariano, adaptarse a no consumir productos convencionales tales como carnes, jamones, chorizo, quesos, etc., se ha recurrido a la elaboración de productos análogos preparados a base de sustitutos de origen vegetal. Uno de los ingredientes de origen vegetal más ampliamente utilizado es la proteína de soya, de tal manera que actualmente es posible encontrar casi cualquier tipo de alimento preparado a base de soya, existiendo incluso productos de este tipo a nivel comercial.

A pesar del auge de productos de soya, existen algunos que no se han estudiado lo suficiente. Tal es el caso del yogurt de soya el cual es preparado de manera artesanal entre algunos grupos vegetarianos, sin la aplicación de una metodología definida y sin que se cuente con una descripción fisicoquímica del producto. Tampoco tenemos mucha información acerca de sus propiedades químicas, nutricias y organolépticas. Los principales intentos de producir un yogurt de soya han utilizado como cultivo iniciador la mezcla comercial de bacterias lácticas, así como una gran variedad de ingredientes y aditivos intentando mejorar la producción de acidez, la estabilidad y la aceptabilidad. Sin embargo, no se han utilizado otros tipos de cultivos iniciadores como los gránulos de kéfir los cuales están constituidos por una mezcla de levaduras y bacterias sobre un soporte inerte.

## II. ANTECEDENTES.

Al producto de leche de soya fermentado por bacterias lácticas se le cita en la literatura científica como Sogurt (Cheng y col, 1990), como producto de soya parecido al yogurt o yogurt a base de soya (Cheng y col. , 1990, Nsofor y Chukwu, 1992. , Lee y col., 1990., Shirai y col., 1992., Pinthong y col., 1980).

Entre los microorganismos que se han utilizado para la fermentación de la leche de soya se encuentra la mezcla comercial compuesta por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Shirai y col., 1992; Mital y col., 1974; Wang y col., 1974; Lee y col., 1990; Nsofor y Chukwu, 1992; Nsofor y col. , 1992). En realidad, el *L. bulgaricus* no es capaz de utilizar la soya como sustrato sino más bien algunos otros ingredientes de la formulación, tales como la lactosa, glucosa o sacarosa (Wang y col., 1974; Pinthong y col., 1980). Otras bacterias que utilizan la soya son *Lactobacillus casei* (Cheng y col., 1990) y *L. acidophilus* (Wang y col., 1974). Mital y col., (1974) demostraron que *L. acidophilus*, *L. buchneri*, *L. cellobiosis*, *L. fermenti* y *L. plantarum* utilizan parcialmente la soya, pero cuando se forman mezclas binarias con *S. thermophilus* se mejora la producción de acidez. Mital y col. (1974) demostraron que *L. cellobiosis* utiliza la rafinosa y la sacarosa pero solo utiliza parcialmente la estaquiosa; *L. fermenti* utiliza completamente la rafinosa y estaquiosa, pero no es capaz de utilizar la sacarosa, mientras *L. plantarum* utiliza la sacarosa completamente, pero solo parcialmente utiliza la rafinosa y la estaquiosa.

Angeles y col. (1970) demostraron que *S. thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus pentosus* utilizan eficientemente la leche de soya mientras que otros microorganismos como *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc citrovorum*, *Pediococcus cerevisiae*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. Fermenti* y *L. brevis* solo utilizan parcialmente la leche de soya.

Los trabajos de investigación sobre yogurt de soya se orientan hacia la búsqueda de una buena estabilidad y aceptabilidad (Wang y col., 1974; Pinthong y col., 1980; Lee y col., 1990; Karleskind y col., 1991; Shirai y col., 1992)., así como un incrementó en la viscosidad y en la producción de acidez (Pinthong y col ., 1980; Lee y col., 1990; Cheng y col., 1990 Karleskind y col., 1991).

En realidad, en muchos de los trabajos publicados, los sólidos de la soya no representan el componente más abundante en la formulación final. Por ejemplo, en el trabajo de Shirai y col.(1992) los sólidos de la soya representan solamente un 18.3 % de los sólidos totales, contra un 47.7 % de harina de avena y 34.0 % de suero en polvo. Karleskind y col (1990) sustituyeron hasta un 75 % de la proteína de soya con proteína de suero de queso. Lee y col (1990) empleó un contenido de la soya de 52.2 a 56.5 % y un contenido de 46.8 a 43.5 % de proteína de suero concentrada, en ambos casos estos valores representan los porcentajes con respecto a los sólidos totales del yogurt. Para incrementar el valor proteico del producto se utilizó la harina de avena y suero de queso (Shirai y col., 1992), proteína de suero concentrada (Lee y col., 1990), leche descremada en polvo, proteína aislada de soya y harina de cacahuete (Schmidt y col., 1980).

Para incrementar la producción de acidez se emplearon ingredientes como la leche descremada en polvo (Lee y col., 1990), lactosa (Cheng y col., 1990),

glucosa (Pinthong y col., 1980), leche evaporada (Bouno y col., 1990) y fructosa (Bouno y col., 1990; Karleskind y col., 1991).

Se utilizaron ingredientes como sacarosa (Pinthong y col., 1980; Wang y col., 1974), sulfato de calcio (Shirai y col., 1992) y mermelada de fresa para mejorar la aceptabilidad general del yogurt de soya (Pinthong y col., 1980).

Para mejorar la estabilidad del yogurt se utiliza el acetato y el citrato de sodio así como la fécula de maíz (Lee y col., 1990) y extracto de levadura (Pinthong y col., 1980); todos estos ingredientes lo que hacen es inhibir la sinéresis. El cloruro de calcio se utiliza para favorecer la unión de las proteínas de la soya (Lee y col., 1990), la gelatina se utiliza como estabilizante (Schmidt y col., 1980) y el acetato de calcio como coagulante (Cheng y col., 1990).

Utilizando una mezcla de sustratos, consistente en leche de soya, harina de avena y suero de queso en polvo, Shirai y col (1992) obtuvieron un producto con viscosidad similar a la del yogurt, mediante calentamiento a 80 °C durante 20 minutos. Tras una incubación de la mezcla de sustratos con el cultivo láctico comercial (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) durante 7 horas, se obtuvo un producto con acidez y pH similares a las del yogurt con leche de vaca., además los dos sustratos tuvieron un comportamiento similar en la utilización de carbohidratos y proteínas.

Pinthong y col (1980 a) obtuvieron una mayor producción de acidez cuando utilizaron una mezcla de sustrato compuesta por 1% de glucosa, 0.1 % de extracto de levadura y leche de soya y la fermentaron con *L. bulgaricus*, que cuando la fermentaron con la mezcla *L. bulgaricus* / *S. thermophilus*. Se obtuvo un producto en forma de coágulo firme y homogéneo y con poca separación de suero. El producto de la fermentación con *L. bulgaricus* tuvo una mejor calificación que el fermentado con la mezcla *S. thermophilus* / *L. bulgaricus*, en una prueba de orden de rango., ambos productos tuvieron una menor calificación que el yogurt de leche de vaca pero una mayor calificación que la leche de soya no fermentada, acidificada con ácido láctico. La menor aceptabilidad de la leche de soya acidificada se relaciona con la presencia de n- hexanal, mientras que la baja aceptabilidad de los productos fermentados con *S. thermophilus* se relaciona con la producción de n-pentanal por esta bacteria. Por su parte, el *L. bulgaricus* produce cantidades mínimas de n-pentanal y reduce la concentración de n- hexanal presente en la leche de soya sin fermentar (Pinthong y col., 1980 b).

Shirai y col. (1992) hicieron una mezcla constituida por sustratos de leche de soya, harina de avena y suero seco de queso (82, 10 y 7% respectivamente) con una concentración de lactosa y proteínas similar a la leche usada para la manufactura de yogurt. Además usaron un tratamiento térmico por 20 minutos a 80 °C resultando una viscosidad parecida a la que el yogurt requiere para remover coliformes y bacterias mesofílicas aeróbicas, mohos y levaduras. La fermentación se hizo con las mismas bacterias usadas en el yogurt tradicional y obteniendo un producto final con acidez y textura similar al yogurt. Se observó el desarrollo ácido, gasto de hidratos de carbono y proteólisis.

Karleskind y col. (1991) prepararon yogures a base de proteína aislada de soya (yogurt ISP) y de leche de soya (yogurt SM) utilizando *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* como cultivos iniciadores. Observaron una mayor producción de

acidez en el yogurt ISP que en el yogurt SM. La sustitución parcial de ISP con suero de queso fresco, proteína aislada de suero, y la adición de fosfato y citrato, resultaron en defectos de la estabilidad física del yogurt ISP. Además, no encontraron mejoría en la producción de acidez ni en el sabor del yogurt ISP. La adición de caseinato de sodio comercial estimuló el desarrollo de acidez en el yogurt SM.

Leslie y col. (1992) hicieron una evaluación sensorial del yogurt a base de leche de soya, en donde trataron de mejorar sus características sensoriales al ser preparados con 22% de sólidos del grano de soya, 4% de sacarosa, 2% de fécula de maíz, 0.3% de citrato de sodio, agua y fermento de 5% de actividad mezclada con el cultivo iniciador (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*). Se realizó la evaluación sensorial comparando con el yogurt de leche de vaca, se utilizó una escala hedónica de 9 puntos. Las calificaciones promedio para los yogures de leche de vaca y de leche de soya fueron de 6.2 y 5.9 respectivamente siendo diferentes estadísticamente ( $\alpha = 0.01$ ). El 73% de los jueces rechazaron el yogurt de soya como una alternativa ante yogurt a base de leche de vaca. La adición de citrato mejora la textura del yogurt, mientras que la adición de un 4% de sacarosa antes del inóculo mejoró el sabor. También concluyeron que el tratamiento de remojo con solución de bicarbonato durante la preparación de la leche produjo un yogurt sin el sabor a frijol de soya.

Buono y col. (1990) incorporaron al yogurt de soya 25% de fructosa (SOYF), leche evaporada (SOYEM) o leche seca desgrasada (SOYN) y los diferentes productos se sometieron a pruebas sensoriales tomando como principales parámetros el sabor y la viscosidad, en base a una escala del 1 a 10, resultando valores significativos relacionados con otro tipo de yogures. El yogurt al que se le incorporó leche seca desgrasada obtuvo valores de 8 para sabor y 9 para viscosidad, siendo el que tuvo mayor aceptación.

Cheng y col. (1991) prepararon dos productos de yogurt de soya, por fermentación con *L. casei* y *S. thermophilus*, de la formulación conteniendo leche de soya, 0.15% de acetato de calcio, 0.5% gelatina y lactosa (0 ó 2%). El yogurt comercial normal fue usado como control. Los yogures de soya fueron evaluados por su aroma, sabor, textura, acidez titulable, pH y color. El yogurt de soya tiene un aroma penetrante, amargo y sabor astringente que el yogurt y con una sensación más arenosa. Los yogures de soya no tienen muchas diferencias ( $P < 0.05$ ) en la intensidad de aroma a mantequilla. También el yogurt con lactosa no tiene mucha diferencia ( $P < 0.05$ ) en cuanto a la acidez del yogurt. Los yogures de soya resultaron amarillentos y con más firmeza semejante a un yogurt convencional. Lee y col. (1990), compararon yogures a base de leche de soya y de leche de vaca. Trataron la leche de soya con carbón activado en una proporción de 3-5% (p/p); añadieron proteína concentrada de suero (WPC) o leche en polvo desengrasada (NFDM) y fermentaron con cultivo para yogurt comercial. El tratamiento con carbón activado fue relativamente inefectivo para remover compuestos fenólicos y el mal sabor de la leche de soya. WPC y NFDM no funcionaron bien como ingredientes para la formulación de yogurt a base de leche de soya.

### III. JUSTIFICACIÓN.

En base a lo anterior, es importante contar con información objetiva acerca de los productos análogos o alternativos, dado que éstos son consumidos por un número de personas cada vez mayor. Si tomamos en cuenta que en muchas ocasiones las personas con regímenes vegetarianos, con intolerancia a la lactosa o pacientes con enfermedades crónico degenerativas suelen consumir este tipo de alimentos, es importante asegurarse que cumplan con las expectativas nutrimentales por las cuales son elegidos. Además, es de vital importancia aumentar la variedad de alimentos alternativos de bajo costo, que puedan ser adquiridos por la población de bajo poder adquisitivo y formar parte de su alimentación, contribuyendo con esto a mejorar su estado de nutrición, especialmente en los niños menores de cinco años, quienes pueden ver afectado su crecimiento y desarrollo a causa de la desnutrición.

Es necesario, también, contar con una metodología estandarizada y de fácil aplicación, sobre la elaboración de estos productos, que nos conduzca a obtener un alimento de calidad que cumpla con las expectativas nutrimentales y sensoriales. En base a la metodología propuesta en esta investigación, el costo que representa obtener un litro de leche de soya es aproximadamente la tercera parte del costo de un litro de leche de vaca, lo cual nos indica la conveniencia económica de la utilización de este producto. Las técnicas concretas de preparación de la leche y el yogurt de soya aquí propuestas, pretenden ser sencillas de tal manera que puedan realizarse con materiales y utensilios de fácil acceso, aún no para el ama de casa. Sin embargo, se recalca la importancia de la caracterización físico-química para evaluar el potencial de este producto en cuanto a su fabricación comercial. Se pretende, finalmente, tener una metodología sencilla y eficiente que nos conduzca a obtener un producto de buena calidad química, nutricia y organoléptica, de buena aceptabilidad general, fácil de prepararse a nivel casero y con potencial para ser fabricado a nivel comercial.

Se han realizado muchos trabajos encaminados a la obtención de yogurt de soya, la mayoría plantean la utilización de ingredientes que tienden a incrementar su costo, tales como proteína aislada de soya, suero de queso, leche en polvo desengrasada, etc., los cuales son utilizados para mejorar la producción de acidez y para ocultar el sabor a frijol de soya. Sin embargo, los resultados no han sido completamente satisfactorios. Otro aspecto importante de este trabajo es que plantea la utilización de un cultivo iniciador como son los gránulos de kéfir (formados por *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Sacaromyces unisporus*), diferente a los utilizados en la mayoría de los trabajos publicados sobre el tema.

## IV.- FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.

### A. INFORMACIÓN GENERAL SOBRE LA SOYA (*Glicine max*).

#### 1. Descripción botánica de la soya.

La semilla de soya se produce en vainas que contienen entre cuatro y seis centímetros de longitud y cada vaina contiene de dos a tres granos que pueden ser ovales o esféricos y de color amarillo o negro, pasando por varias tonalidades de café (Fig. 1).



La planta alcanza aproximadamente 60 cm. de altura, da frutos una sola vez al año y es muy sensible a la luz, por lo que la cantidad de radiación solar que recibe determina en buena medida tanto la velocidad de crecimiento durante la etapa de maduración como el período de floración, que en condiciones habituales se da 120 días después de la siembra.

Existen más de tres mil variedades de soya, las cuales pueden adaptarse a muy diversos climas, altitudes y tipos de suelo; sin embargo, los mejores rendimientos se obtienen en regiones cálidas y tropicales a menos de mil metros de altura. Se recomienda usar la soya en la rotación de los cultivos ya que al igual que el resto de las leguminosas, promueve la fijación del nitrógeno y por lo tanto enriquece las tierras de siembra.

La soya es una planta que por sus múltiples usos ha sido muy apreciada desde tiempos antiguos; es muy eficiente en la producción de aceites y de proteínas de alto valor para la alimentación humana y animal. Es originaria de China, donde ya se aprovechaba desde antes del nacimiento de Cristo (siglo XI a. de C). Desde entonces ha jugado un papel crucial en la alimentación de pueblos orientales como el chino y el japonés. Se empezó a cultivar hace aproximadamente tres mil años en Asia y Europa; su introducción a América se ubica alrededor de 1712, en el estado de Pensylvania, Estados Unidos.

Pocos países de América producen soya. Sólo en Estados Unidos, Brasil, Argentina, México y Colombia. Los primeros intentos en México para introducir la soya datan de 1911, pero fue hasta 1958 cuando se sembró por primera vez en forma comercial, 300 ha en el Valle del Yaqui, en Sonora; desde esa fecha, la superficie sembrada en el país se fue incrementando constantemente, hasta superar las 100,000 ha en 1968 (124,000 ha). Sin embargo, la superficie sembrada con soya ha sufrido importantes fluctuaciones de un año al otro. La

disponibilidad de agua ha sido considerada como la principal causa de las fluctuaciones.

Las principales zonas productoras de soya en México son: Valle del fuerte de Sinaloa; Valle del Yaqui, Valle del Mayo y Costa de Hermosillo en Sonora; Las Huastecas en Tamaulipas, la región del Soconusco en Chiapas y Ciudad Delicias Chihuahua. En ellas se producen más del 90% de la soya en el país (Dehesa, 1989).

## **2. Composición química de la soya.**

La cascarilla, el hipocótilo y el cotiledón de la soya están constituidos fundamentalmente por proteínas, grasas y carbohidratos. En los cotiledones, el aceite está almacenado en pequeños compartimentos llamados esferosomas, mientras que la proteína se localiza en cuerpos de mayor tamaño llamados aleuronas o cuerpos proteicos. Los esferosomas se encuentran dispersos entre los cuerpos proteicos, que a su vez consisten en aproximadamente 98% de proteína, con pequeñas cantidades de lípidos y ácido fítico, y suman aproximadamente 60-70% de la proteína total de la soya desgrasada. Las proteínas de las aleuronas tienen como función principal el ser una fuente de reserva que le sirve a la planta durante su germinación. Las proteínas de la soya son fundamentalmente globulinas, por lo que son solubles en soluciones diluidas de varias sales, insolubles en agua y precipitan en su punto isoeléctrico, generalmente en el intervalo de 4.2 - 4.8.

Los carbohidratos de la soya están compuestos por polisacáridos, algunos oligosacáridos como estaquiosa (3.8%), rafinosa (1.1%) y sacarosa (4.5%), y monosacáridos como arabinosa y glucosa en muy pequeñas concentraciones. Los polisacáridos de la soya son insolubles en agua y en alcohol, y son polímeros de arabinogalactanos, arabinanos, xilano, galactomananos, celulosa y un polisacárido ácido muy parecido a las sustancias pépticas, que suman aproximadamente 50% de los hidratos de carbono totales. La acumulación de aceites en las oleaginosas viene acompañada de un decremento de los hidratos de carbono, lo que indica que es muy probable que éstos sean los precursores en la síntesis de los lípidos en este tipo de granos. Los ácidos nucleicos se encuentran en muy baja concentración y son incluidos como nitrógeno total cuando la determinación de proteína se hace por el método de Kjeldahl.

La proteína de soya es de buena calidad porque tiene un NPU (Utilización Neta Proteica) de 61%, en comparación con la leche de vaca que es de un 82% y tiene propiedades funcionales adecuadas para utilizarla como sustituto de proteínas animales en la fabricación de algunos alimentos. En la mayoría de los países los productos lácteos en sus diferentes formas, al igual que los derivados de productos cárnicos, son cada día más difíciles de obtener a bajo precio, por lo que la industria alimentaria ha tenido que buscar sustitutos de estas proteínas tradicionales, y han encontrado en la soya uno muy adecuado. Aproximadamente el 70% del total de fósforo en el frijol de soya y productos de proteína de frijol de soya están en forma de fitato, inositol hexafosfato. El grano entero de frijol de soya contiene menos de 3g de átomos de calcio por mol de fitato. La proteína aislada de soya no contiene fibra (Badui, 1994).

### **3. Biodisponibilidad de Zn, Fe, Cu, Mn, Mg, en la proteína de soya.**

#### **Zinc.**

Las primeras observaciones de que la proteína de soya afecta la biodisponibilidad de los elementos traza surgió de los estudios sobre requerimientos de zinc. Pollos alimentados con proteína de soya tenían requerimientos más altos de zinc que aquellos alimentados con caseína y gelatina. Pronto se demostró que tanto el tratamiento en autoclave como la adición de EDTA (ácido etilendiamin tetracético) reducía los requerimientos de zinc de pavos, cerdos, y ratas alimentadas con dietas a base de proteína de soya.

En otros estudios sustituyeron 30% de la carne del lunch de mujeres adolescentes por proteína de soya desengrasada y no encontraron efecto alguno sobre la eliminación fecal y urinaria de zinc.

En general, el zinc de los productos animales es más disponible que el de los productos vegetales. La disponibilidad de zinc en la soya es de 50 a 65% (Wilcke, 1979).

#### **Hierro.**

En general el hierro del grupo hemo presente en los alimentos de origen animal tiene una biodisponibilidad más alta que el hierro de los alimentos de origen vegetal. La absorción de hierro es más baja en monos Rhesus alimentados con proteína de soya que en aquellos alimentados con caseína. Sin embargo, la biodisponibilidad evaluada mediante el método del aumento en la concentración de hemoglobina en ratas, sugiere una biodisponibilidad relativamente alta.

El hierro tiene una biodisponibilidad promedio de 61% en el hierro de la proteína aislada de soya. A diferencia de lo que ocurre con el zinc, la adición de EDTA a la proteína aislada de soya, no mejora la biodisponibilidad del hierro. Aunque el fitato presente en la soya puede tener efecto sobre la biodisponibilidad del hierro, este parece no ser el único factor involucrado (Wilcke, 1979).

#### **Cobre y manganeso.**

La adición de EDTA mejora la respuesta en pollos alimentados con proteína de soya y cantidades limitantes de cobre y manganeso; sin embargo, no tiene efecto cuando las concentraciones de cobre y manganeso en la dieta son suficientes (Wilcke, 1979).

### **4. Constituyentes de la soya que afectan la biodisponibilidad de los minerales.**

#### **Fitato.**

Hay suficiente evidencia de que la adición de fitato soluble a las dietas purificadas disminuye la biodisponibilidad del zinc en pollos, cerdos, ratas y hombres.

En presencia de fitato, una concentración alta de calcio afecta aún más la biodisponibilidad del zinc, mientras que en ausencia de fitato, el exceso de calcio no tiene ningún efecto. Se cree que el calcio, el zinc y el fitato interactúan formando un complejo altamente soluble que reduce la absorción del zinc en mayor grado a como lo hace el fitato sólo. La adición de EDTA a las dietas que

contienen fitato soluble incrementa la absorción de zinc. De esto se deduce que la biodisponibilidad del zinc depende, entre otras cosas, de la presencia de agentes quelantes y de la concentración de calcio en la dieta.

Al evaluar el efecto del fitato sobre la biodisponibilidad del zinc, es importante considerar la relación molar entre el fitato y el zinc, teniendo en cuenta también la relación entre el fitato y el calcio.

Aunque no está suficientemente establecida una relación fitato : zinc que sea tolerable, probablemente dicha relación debe ser menor de 20:1. El fitato de zinc es bien absorbido. En este sentido es significativo apartar que los niveles altos de fitato en la dieta reducen la vida media del zinc en las ratas, posiblemente inhibiendo la absorción del zinc endógeno y, de esta manera, promoviendo pérdidas de zinc, diferentes a aquellas asociadas con la presencia de fitato en la dieta.

Hay resultados contradictorios en relación al efecto del fitato sobre la biodisponibilidad del hierro. En un estudio con hombres adolescentes se observó que la adición de fitato de sodio a la leche, en concentración de 0.2 g en 200 ml, disminuyó la absorción de hierro hasta 15 veces. Sin embargo, la misma cantidad de fitato en la forma de harina de avena tuvo mucho menos efecto. En un estudio con ratas la adición de 1% de fitato a una dieta de albúmina de huevo reduce significativamente la retención corporal de hierro, zinc, cobre y manganeso. Otros investigadores no encontraron efecto del fitato sobre la utilización de hierro, pero encontraron que el hierro del fitato monoférrico se utiliza muy bien, pero el fitato férrico insoluble tiene una biodisponibilidad mucho más baja (Wilcke, 1979).

### **Fibra.**

Hay suficientes evidencias de que la fibra disminuye la absorción de zinc, calcio, magnesio y fósforo. La adición de 10 g de celulosa a una dieta con un contenido de 0.35% de fitato y 3.6% de fibra cruda disminuye la retención de estos minerales. La adición de celulosa incrementa la cantidad de excremento y, sin duda, la tasa de tránsito a través del tracto intestinal. En estudios hechos con cinco fuentes de fibra dietaria, incluyendo salvado de trigo, obtienen que la fibra no altera el balance de zinc en hombres adultos. De igual forma al evaluar el balance de zinc en mujeres jóvenes, con y sin suplementos diarios de salvado de trigo (14g/día), no se encontraron diferencias generales en el metabolismo del zinc (Wilcke, 1979).

### **Interacción fitato – proteína.**

El fitato forma complejos estables con algunas proteínas; éstos complejos son menos susceptibles a la proteólisis que la proteína libre. El calcio también interactúa con los fitatos y la proteína. En vista de estos hechos, es concebible que el complejo fitato-proteína enlace al zinc y otros cationes más fuertemente que el fitato sólo. Sin embargo, no es necesaria la presencia de proteína para que el fitato afecte la utilización.

No se conoce el grado en que los complejos fitato-proteína afectan la biodisponibilidad del zinc. De hecho, no se sabe si estos complejos se forman de manera natural en la semilla o si solamente son artefactos. Con objeto de que sean capaces de afectar la absorción de zinc en mayor proporción a como lo hace

el fitato sólo, los complejos fitato-proteína deberían ser indigeribles; sin embargo, en experimentos de eliminación fecal de nitrógeno no se observaron diferencias en pollos alimentados con proteína de soya y caseína. Al parecer, los complejos fitato-proteína tienen poco significado nutrimental.

Se puede intentar la eliminación del fitato de la soya mediante mejoramiento genético, tratamiento químico o tratamiento enzimático con la fitasa presente en algunas levaduras.

Se puede eliminar el fitato a partir de la proteína soluble, pasándola a través de una resina de intercambio iónico o mediante tratamiento en autoclave, pero estos métodos son de poca importancia práctica. También se puede eliminar el fitato manejando las condiciones de extracción de la proteína, principalmente el pH y la concentración de calcio, por ejemplo, pH de 3.5 |- 4.0 y concentración de calcio de 0.04 M o pH de 5.0 - 5.5 y concentración de calcio de 0.0025 M. Usando estas últimas condiciones, se puede preparar una cuajada de harina de soya que contenga solamente el 10% de la concentración original de fitato (Wilcke, 1979).

## **5. Propiedades funcionales de la soya.**

Entre las propiedades funcionales más importantes de las proteínas de la soya se encuentran las de emulsificantes, absorbente de grasas, absorbente de agua, controlador de la textura y espumante. Se utiliza en la industria de la carne en la elaboración de embutidos, salchichas, hamburguesas, etc., ya que ayudan a formar emulsiones estables al producir una estructura tridimensional cuando gelifican. Controlan la absorción de agua en pastas de tipo de macarrones, dulces y productos de confitería en general. Debido a que producen espumas, las proteínas de soya se pueden utilizar como sustitutos de la clara de huevo en las industrias de dulces, helados y confitería. Además, la soya y sus derivados se emplean para controlar la textura de los alimentos gracias a sus propiedades de gelificación, elasticidad y de formación de fibras (Badui, 1994).

## **6. Factores que tienden a desalentar el consumo de la soya.**

### **6.1.- Sabor.**

El más importante problema ha sido el sabor pastoso y amargo del frijol de soya crudo. Estos sabores pueden reducirse en alto grado por medio de la cocción controlada o por medio de varios procesos de extracción. El nivel al cual pueden ser detectados e indeseables los sabores residuales de la soya, depende de la clase de alimento al que se incorpore. Entre los alimentos más difíciles de duplicar o ampliar están los muy blandos, tales como la leche o sus productos. Con alimentos cuyo sabor es naturalmente fuerte, se encuentran menores problemas. (Rabell, 1991).

## **6.2.- Factores antifisiológicos.**

### **6.2.1. Inhibidores de tripsina (IT).**

Los inhibidores de tripsina de la soya pertenecen a una clase muy extensa de proteínas, las cuales inhiben enzimas proteolíticas. En la soya están presentes muchos y diferentes inhibidores de tripsina, pero mucha de la actividad se debe a la proteína SBTI-A2.

La destrucción de los IT y la transformación de la proteína cruda en una forma más digerible resulta en un producto con excelente calidad de proteína y en la eliminación de su efecto hipertrófico sobre el páncreas.

El tostado, que consiste en un tratamiento con calor húmedo, es un medio muy efectivo para destruir los inhibidores de tripsina de la soya. Un control preciso del calentamiento y otras variables de procesamiento aseguran una destrucción adecuada de estos factores.

Los inhibidores de proteasas están presentes en fluidos y tejidos animales. Están distribuidos ampliamente en el reino de las plantas y están presentes en grandes cantidades en las leguminosas, gramíneas y solanáceas. Dentro de estas familias, un gran número de especies son una fuente alimentaria importante, y se consumen ya sea en forma cruda o cocidas. Las papas, chícharos, frijoles, cacahuates, soya, maíz, trigo, cebada y muchos vegetales populares en estado no cocinado tienen altos contenidos de IT.

Los múltiples inhibidores de tripsina de la soya son variantes controladas genéticamente. Estudios sobre la naturaleza polimórfica de la proteína SBTI-A2 revelaron la presencia de tres formas distinguibles electroforéticamente denominadas  $Ti_1$ ,  $Ti_2$  y  $Ti_3$ .

### **Significado biológico.**

Se pueden eliminar los inhibidores de tripsina de un extracto crudo de harina de soya, pasándolo a través de una columna de cromatografía de afinidad que contiene tripsina enlazada con sefarosa.

Cuando se alimentaron dos grupos de ratas con un extracto crudo y con un extracto libre de IT se observó que aproximadamente 40% de la disminución del crecimiento corporal y de la hipertrofia del páncreas, es atribuible a los IT. El restante 60% se debe a la pobre digestibilidad de la proteína cruda.

Los efectos sobresalientes de los inhibidores de tripsina, esto es, la hipertrofia pancreática y la inhibición del crecimiento, representan la inhabilidad del organismo para digerir la proteína y utilizar los aminoácidos de una manera eficiente, más que una respuesta irreversible a una sustancia tóxica; esto a efectos se pueden revertir reemplazando la harina de soya cruda por harina de soya tostada.

No se observó hipertrofia pancreática en ratas alimentadas con harina de soya grado alimentario, proteína concentrada o proteína aislada de soya durante un período de 300 días, aproximadamente la mitad de la vida de la rata. El contenido de IT fue de 170 a 320 mg/100 g de alimento. El tamaño y la apariencia de todos los órganos fueron normales.

Existe evidencia de que la alimentación con harina cruda de soya o con IT obtenidos de la soya aceleran la síntesis de proteínas en el páncreas y estimula la

hipersecreción de enzimas pancreáticas dentro del tracto intestinal. La estimulación continúa del páncreas causa hipertrofia pancreática y una pérdida fecal excesiva de la proteína secretada por el páncreas. En el animal joven, se presenta la inhibición del crecimiento. Sin embargo, en el animal adulto, debido a que tiene un menor requerimiento de aminoácidos, no se presenta la pérdida de peso, pero si se presenta la hipertrofia pancreática. Los IT de otros alimentos tienen efectos similares.

La respuesta secretoria del páncreas, ante los IT de la dieta, es una respuesta indirecta que se inicia en el intestino y no en la sangre. Experimentos con ratas demostraron que la secreción de enzimas pancreáticas se suprime mediante retroalimentación negativa como respuesta a la presencia de tripsina y quimotripsina en el tracto intestinal. Los inhibidores de tripsina evocan la secreción de enzimas pancreáticas mediante la formación de un complejo inactivo tripsina-IT, con esto, se disminuye la inhibición por retroalimentación ejercida por la tripsina libre. La retroinhibición también ocurre en humanos y en cerdos, pero no en perros.

Una dieta alta en caseína (18%) también estimula la secreción pancreática en la rata, pero la adición de IT de soya a esta dieta incrementa la secreción por enzima de lo que hace la caseína sola. La caseína forma un complejo con la tripsina durante la digestión, por lo tanto, disminuye la inhibición por retroalimentación, resultando esto en una secreción adicional de tripsina hacia el intestino delgado. La presencia de proteína e IT en el duodeno resulta en la liberación de colecistocinina (cck) de sus sitios de enlazamiento en la mucosa. CCK, la cual tiene efecto inhibitorio sobre la tripsina, es una hormona involucrada en la regulación del páncreas. Inyecciones repetidas de CCK causan hipertrofia pancreática e inhiben el crecimiento de la rata. Parece ser que los IT y la proteína dietaria estimulan la actividad pancreática mediante un mecanismo común.

Al parecer, las estructuras celulares no sufren alteraciones por el consumo de harina de soya cruda, aparte de un incremento en los gránulos de zimógeno de las células acinares, debido al incremento en la síntesis de proteínas. El páncreas hipertrofiado no sufre daño o bloqueo en su capacidad de secreción enzimática en respuesta a la estimulación por CCK. Los IT de la soya no agravan la pancreatitis inducida químicamente, y la hipertrofia pancreática se puede revertir. Todos estos hechos indican que la hipertrofia pancreática inducida por los IT es una respuesta biológica reversible que ni daña permanentemente el páncreas ni daña su funcionamiento. Los ensayos para evaluar el efecto de los IT generalmente utilizan tripsina bovina, sin embargo, los IT sólo causan una inhibición débil de la tripsina humana en ensayos in vitro (Badui, 1994).

### **Umbral de significancia nutricional.**

En un experimento con ratas alimentadas con harina de soya desengrasada se observó que después de un tratamiento con vapor a 100 ° C durante 9 minutos se logró eliminar hasta un 80% de los IT, además con el harina que se sometió a este tratamiento se obtuvo el valor más alto del índice de eficiencia proteica (PER). Cuando se aplicó un tratamiento de 20 minutos con vapor a 100 ° C se logró una disminución de hasta un 90% de los IT, sin embargo, el índice de eficiencia proteica disminuye en relación al obtenido con la soya sometida a 9 minutos de tratamiento. Con un tratamiento de 3 minutos a 100 ° C

se elimina un 54 % de la actividad de los IT; las ratas alimentadas con esta harina no desarrollaron hipertrofia pancreática, pero tampoco se obtuvo el mayor PER, aunque sí se observó una mejoría notable con respecto a la harina de soya cruda. Se sugirió que después del punto donde no se observa hipertrofia pancreática, el incremento en el valor del PER se debe a un incremento en la digestibilidad de la proteína más que a la disminución de los IT (Badui, 1994).

### **6.2.2 Hemaglutininas.**

Las fitohemaglutininas son compuestos que causan aglutinación de eritrocitos animales y de varios grupos sanguíneos humanos. La soya contiene una gran cantidad de hemaglutininas, las cuales representan un estimado de 1 a 3 % en harinas de soya desengrasadas y presentan una gran variabilidad en su actividad aglutinante entre las diferentes variedades. Las hemaglutininas de la soya son glucoproteínas con un peso molecular de aproximadamente 110,000; y contienen aproximadamente un 5% de carbohidratos, principalmente N-acetil-D-glucosamina.

Las hemaglutininas, alguna vez consideradas como responsables de aproximadamente la mitad de la inhibición del crecimiento de la rata atribuible al consumo de harina cruda de soya, realmente sufre inactivación *in vitro* por efecto del calor y la pepsina. La inactivación total de las hemaglutininas se logra cuando se han destruido aproximadamente un 12% de los enlaces peptídicos.

Las hemaglutininas contribuyen muy poco a la inhibición del crecimiento en pollos y ratas alimentados con harina cruda de soya. Dos resultados conducen a esta conclusión: a) el HCl (pH = 1.6) o la pepsina destruyen las hemaglutininas, y b) la inhibición del crecimiento causada por una harina cruda de soya fue solamente un 33% mayor que la inhibición causada por una harina de soya a la cual se le había disminuido su actividad hemaglutinante hasta en 70 veces; las dos harinas presentaron similares actividades de IT (Badui, 1994).

### **6.2.3. Otros factores antifisiológicos.**

#### **Estrógenos.**

Los glucósidos de isoflavona genistina (1644 ppm), daidzin (581 ppm) y la gliciteína-7-O-Beta-glucosa (338 ppm) son los principales compuestos fenólicos de la soya, también se han detectado la 6,7,4'-trihidroxiflavona y el coumestrol (0.4 ppm). Aunque los isoflavonoides de la soya exhiben actividad estrógena, el dietilestilbestrol es 10-5 veces más activo que la genistina y la daidzina tiene 0.75 veces la actividad de la genistina. Aun cuando el coumestrol es 35 veces más estrogénico que la genistina, su contribución a la actividad total es muy pequeña debido a su mínima concentración.

Mucha de la actividad estrogénica de la harina de soya se atribuye a la genistina, la cual es estable ante el calentamiento en autoclave, pero se extrae fácilmente con soluciones acuosas de alcohol. Altos niveles de genistina en la dieta disminuye el crecimiento en ratas (Wilcke, 1979).

#### **Agentes bociogénicos.**

Se sabe. Desde hace tiempo, que las ratas alimentadas con grandes cantidades de harina de soya desarrollan bocio. Cuando se adicionan pequeñas

cantidades de yodo a la dieta se previene el alargamiento de la tiroides, sin embargo, el bajo contenido de yodo en la soya no es la única causa del desarrollo de bocio. La harina cruda de soya produce una mayor hipertrofia de la tiroides que cuando se alimenta a las ratas con harina tostada, harina desengrasada o proteína aislada de soya, aún cuando el contenido de yodo fue más alto en la harina cruda que en las otras dietas a base de soya.

El desengrasado y el tostado de la soya disminuyen su efecto bociogénico hasta un nivel comparable al obtenido con la proteína aislada de soya. La adición de yodo para suplementar la pequeña cantidad de yodo endógeno y compensar el factor bociogénico de la soya, previene el desarrollo de bocio en ratas. Además, el agrandamiento de la tiroides debido al consumo de soya es completamente reversible.

Un agente bociogénico obtenido mediante fraccionamiento de la harina de soya. Parece ser un péptido compuesto de dos o tres residuos de aminoácidos o de un glucopéptido que contiene uno o dos aminoácidos unidos a un residuo de azúcar. El mecanismo de acción del agente bociogénico puede involucrar la inhibición de la reabsorción intestinal de tiroxina (Badui, 1994).

### **6.3. Producción de flatulencia.**

Debido a la ausencia de alfa-galactosidasa en el intestino delgado del ser humano, los galactosido-oligosacáridos tales como la rafinosa, estaquiosa y verbascosa no se pueden digerir. La fermentación de estos azúcares por los microorganismos en el intestino grueso produce grandes cantidades de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

Tanto la harina cruda como la harina desengrasada causan un alto grado de flatulencia, mientras que la proteína aislada y los polisacáridos de alto peso molecular no provocan mayor grado de flatulencia que el provocado por una dieta basal. Cuando la harina de soya se somete a extracción con etanol al 80% para producir un concentrado proteico, la flatulencia se reduce. El extracto alcohólico y los sólidos del suero de soya, los cuales contienen muchos de los oligosacáridos, son responsables de gran cantidad de la flatulencia.

Estos oligosacáridos se pueden remover pasando la leche de soya a través de cartuchos porosos con enzima alfa-galactosidasa inmovilizada.

La ebullición con agua o con solución de bicarbonato al 0.5% puede eliminar hasta un 60% de los polisacáridos, aunque con ligeras pérdidas de proteína que van desde 1 hasta 6.8%; el mejor de estos tratamientos es la ebullición con agua durante 60 minutos, el cual elimina un 60% de los oligosacáridos, con una pérdida de 26% de la proteína (Badui, 1994).

## **7. Usos de la soya y sus derivados.**

La soya tiene múltiples usos, desde usos industriales para la fabricación de fertilizantes, aerosoles, papel para cubrir, cubrimientos de construcción, linóleo, adhesivo, pinturas, levadura, medicinas y plásticos; producción de alimentos para animales; hasta la producción de alimentos para consumo humano. En el cuadro 1 se enumeran los usos más comunes de la soya.

**Cuadro 1. Usos de la soya y derivados \***

<i>Soya y sus derivados</i>	<i>Usos</i>
Frijol:	Combinado con el frijol común mejora el valor nutritivo en una ración. Nixtamalizado o con el maíz al 8% mejora la calidad de las proteínas de la tortilla. Se extrae la bebida de soya.
Aceite:	Margarinas, aceites líquidos, aderezos para ensaladas, mayonesas, etc.
Harina:	Para productos de panificación usándola al 6%. Fortificación de pastas, atoles y sopas.
Soya texturizada:	En preparaciones culinarias desde el entremés hasta el postre. En platillos fríos y calientes.
Concentrados y aislados:	Embutidos.
Aceite uni-refinado:	Refinadoras de aceite de soya y la industria de recubrimientos para productos variados .
Aceite refinado y blanqueado:	Fabricantes de pintura y linóleos.
Aceite hidrogenado:	Fabricación de margarinas, manteca, freído de papas, harinas preparadas para el pan.
Aceite refinado completo y deodorizado:	Aceite comestible para aderezos; para mantecas, margarinas, ensaladas y enlatado de pescado.
Escurrimientos de aceite:	Subproductos de la deodorización; utilizado en la industria farmacéutica.
Ácidos grasos de la destilación:	Otro subproducto de la deodorización; utilizado en la industria farmacéutica.
Jabón acidulado:	Jabones tratados con ácido producto de la refinación del aceite; utilizado en la industria de ácidos grasos.
Harina de soya 44% de proteína:	Productos básicos de la extracción de frijol soya: contiene 44% de proteína, ingredientes para alimentación de ganado, aves y porcinos.
Harina de soya , alta proteína:	Reducida la cantidad de fibra y aumentado en ingrediente proteico para alimento de pollos y guajolotes.
Harina fina de soya:	Harina de soya fina y desgrasada, vendida a las industrias fabricantes de goma para el pegamento de madera en lámina triplay.
Hojuelas para fermentación:	Productó de la pasta acondicionado a temperatura y malla especial para uso en la fermentación de cerveza.
Residuos de molienda:	Cáscara de soya tratada y molida con residuos de almendra utilizados en la formulación de alimentos para animales.
Aceite crudo:	Producto básico de la extracción frijol-soya; aceite para refinarse.
Aceite desgomado:	Separación de las gomas (sólidas que no contienen aceite) del aceite crudo. Vendido a refinadoras para procesamiento subsecuente.
Gomas:	Sólidos que no contienen aceite separados del aceite crudo; para la fabricación de lecitina.

\* Rabell, 1991.

## 7.1. Alimentos de soya para consumo humano.

La mayor parte de los productos del frijol de soya usados para consumo humano son la harina de soya deshidratada, la proteína concentrada y la proteína aislada. La proteína aislada consiste de proteínas solubles en agua y carbohidratos libres. A continuación se enlistan los alimentos para consumo humano más comunes:

a) Productos sustitutos y sintéticos, tales como la imitación de la carne utilizando soya texturizada y las soyas malteadas, a las que se le dan colores y sabores diversos para producir atoles, cereales y otros, así como edulcorantes sintéticos.

b) Margarina.

c) Otros sustitutos, como sustitutos de lácteos y en cereales que refuerzan su valor proteico con la adición de soya.

d) Alimentos terminados como harinas de soya, Isolac (sustituto de leche), atoles, sopas, bebidas de sabores, soya texturizada, Nutrilac (sustituto de leche para becerro), chorizo de soya y otros que en general contienen el doble del valor proteínico normal con precios atractivos al mercado (Rabell, 1991).

## B. E L YOGURT.

### 1. Definición y tipos de yogurt.

El yogurt es el nombre turco para la leche fermentada por el cultivo láctico. La palabra "yogurt" deriva de la palabra turca "jugurt". Se conoce en Armenia como metzoon, en Egipto como leben, en Bulgaria como naja, en Italia como gioddu y en la India como dahdi. La acidificación de la leche por fermentación es uno de los métodos más antiguos de preservación de la misma, impartiendo cualidades organolépticas favorables. Hay diferentes métodos de llevar la fermentación en varias partes del mundo, ampliando un rango de productos de leche fermentados incluyendo kummis, kéfir, leche ácida y yogurt. Estos productos varían considerablemente en composición, sabor y textura, naturaleza de los organismos fermentadores, tipo de leche y el proceso de manufactura usado.

Aunque existe controversia con respecto a la exacta definición de yogurt en términos de su composición química y tipos de organismos, en este trabajo se define como el resultado de la fermentación de la leche con una mezcla de cultivos iniciadores consistiendo de *S. thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, no siendo así existen estándares de yogurt en muchos países.

Los varios tipos de yogurt difieren en su composición química, método de producción y el procesamiento de su post-incubación. El propósito legal de los estándares para la composición química del yogurt en varios países esta basada en tres tipos de yogurt clasificados de acuerdo al contenido de grasa (alta, media y baja) del producto. Tal clasificación es usada en estándares de composición

para facilitar la estandarización del producto y así proteger al consumidor.

De manera que los dos principales tipos de yogurt: reposados y mezclados, están basados en el método de producción y estructura química del coágulo. El yogurt reposado es el producto formado por la fermentación / coagulación de la leche alcanzada fuera del recipiente de venta, y el yogurt produce una continua masa semi-sólida. En contraste, el yogurt mezclado resulta cuando el coágulo es producido en una estructura de masa - gel y la rotura es antes de la refrigeración y envasado. El yogurt líquido, puede ser considerado como yogurt mezclado, por la baja viscosidad, dicha clasificación se menciona en el cuadro 2. De cualquier modo la manufactura por una mezcla de cantidades iguales de yogurt y agua, una de las características de tal producto es la separación de una fase de sólidos y suero. Por esto se recomienda agitar el producto antes de consumirlo.

El introducir aditivos es otro método utilizado frecuentemente para diferenciar los tipos de yogurt. Así también los sabores son básicamente divididos dentro de tres categorías (claro o natural, fruta y con aditivos). El primer tipo, claro o natural es el yogurt tradicional con sabor a fruta seca, algunas veces su marcada acidez es prueba de un producto natural enmascarado por la adición de azúcar. Los yogurt de fruta son hechos por la adición de frutas conservadas, purés o mermelada. El yogurt adicionado es preparado por la adición de azúcar y otros agentes edulcorantes, aditivos sintéticos y colorantes para el yogurt claro o natural.

**Cuadro 2.** Clasificación basada en el estado físico del producto.

<b>Estado físico.</b>	<b>Tipo de producto.</b>
Líquido/ poco viscoso.	Yogurt para beber.
Semi-sólido	Yogurt concentrado/condensado
Sólido	Congelado (blando, duro y mouse).

## **2. Proceso de elaboración del yogurt.**

El yogurt se elabora a partir de leche entera o descremada. Este producto también se conoce como leche cuajada búlgara. La técnica de fabricación es simple, comprende las siguientes operaciones: Aumento de la concentración de sólidos; homogeneización; pasteurización; siembra de fermentos lácticos específicos (*Lactobacillus bulgaricus* y *S. thermophilus*); envasado; incubación; tapado; refrigeración y transporte.

### **2.1. Aumento de la concentración de sólidos.**

El nivel total de sólidos en la leche para la manufactura del yogurt puede variar desde un bajo contenido de 9 % en yogurt espuma y sobre 20 % en otros tipos de yogurt. También se recomienda un rango entre 14 y 18 %. Para un mejor yogurt hecho con leche contiene 15.5 y 16.0% total de sólidos.

Los niveles por arriba de 25% afectan la disponibilidad de humedad e impide la actividad del cultivo. Los niveles de sólidos totales solamente afectan la

acidez titulable de la mezcla de leche amortiguando la acción de las proteínas, fosfatos, citratos, lactatos y misceláneos constituyentes de la leche. Un incremento en los sólidos totales trae como consecuencia un aumento en la acidez titulable y una reducción del tiempo de coagulación, tal efecto puede ser llevado a cabo por muchos métodos, como los que se discuten a continuación.

### **2.1.1. Adición de leche en polvo.**

La adición de leche en polvo (perfectamente soluble y de gusto franco) está destinada a aumentar la materia seca no grasa de la leche a 12%, mejorando así la consistencia, viscosidad del producto y reduciendo la posibilidad de separación del suero. La leche en polvo (crema entera, espuma o suero de leche) es muy usada en la industria para mejorar la consistencia de la leche líquida para así hacer un yogurt espeso y suave. La proporción de leche en polvo añadida a la mezcla base puede oscilar de un 1 a un 6 %, recomendándose por lo general valores de 3 a 4 %, ya que si se añaden porcentajes superiores ello puede conferir al yogurt "sabor a polvo".

### **2.1.2. Concentración por evaporación.**

Con la excepción de pérdidas menores de componentes volátiles en la condensada, todos los constituyentes de la leche son retenidos y concentrados. La cantidad promedio de agua removida es entre 10 y 25 %, y el total de sólidos es incrementado del 2 – 4 % correspondiente a lo recomendado para la adición con la leche en polvo.

Durante la elaboración del yogurt con leche de cabra el proceso de evaporación mejora la consistencia y reduce el "sabor a cabra" del producto final. Además si se realiza al vacío reduce la entrada de aire en la mezcla base y al dar vueltas reduce la sinéresis mejorando la estabilidad de la leche fermentada sobre almacenamiento.

### **2.1.3. Adición de suero de leche en polvo.**

Lo recomendado para la adición en la mezcla base es de 1 – 2 %. Niveles más altos imparten un indeseable sabor a suero en el yogurt. Si bien una adición de suero en polvo al 0.3% a la mezcla base mejora la viscosidad del yogurt y acelera el desarrollo de acidez.

### **2.1.4. Concentración por ultrafiltración (UF) y ósmosis inversa (OI).**

Estos tipos de concentraciones forman parte de la concentración de filtración por membranas que es un proceso desarrollado para concentrar y/o separar los sólidos de una mezcla acuosa, siendo los tipos más comunes de filtración por membranas la UF Y OI. Esta concentración de la leche por UF y OI es llevada a temperatura ambiente y por lo tanto evita el daño químico de los constituyentes de la leche causada por el calentamiento. Aunque la aplicación de este método es principal para el procesamiento con suero, también se da para producir varios cultivos con productos de lechería.

La leche concentrada por UF a 18-20% de total de sólidos es reportada

para producir una buena calidad de yogures (suave crema y el típico sabor ácido) con o sin la necesidad de homogeneización. Mientras que el yogurt hecho con UF concentra la espuma de la leche con lactosa ajustada al 2%, siendo superior que el yogurt comercial ordinario, resultando un sabor suave y los niveles de ácido láctico no incrementaron durante el almacén. La concentración total de sólidos de la leche del 13 o 15 % es sugerida para la producción por UF o OI.

De igual forma otros autores concluyen que no existe una marcada diferencia en las calidades de yogurt producida por leche concentrada por OI (12.5 y 15% de total de sólidos) y leche fortificada con espuma de leche en polvo.

### **2.1.5. Comparación de los métodos de adición.**

La adición con la leche en polvo (espuma o entera) puede tener desventajas., por ejemplo causar desviaciones y una excesiva producción de ácido. La alta producción de ácido es atribuida a los altos niveles de lactosa que incrementa la concentración de otros nutrimentos para las bacterias. La concentración de lactosa puede ser reducida por la hidrólisis usando la enzima B-D-galactosidasa.

La viscosidad del yogurt es casi completamente dependiente del contenido de proteína de la leche y aumenta el nivel de lactosa. La concentración por UF puede utilizarse para aumentar los niveles de proteína con o sin elevar los niveles de lactosa.

Otro camino para incrementar los niveles de proteína pero no de lactosa es el uso de caseinato en polvo, esta adición aumenta la naturaleza hidrofílica de la proteína en la mezcla actual y con un estabilizador. Al aumentar la viscosidad disminuye el problema de sinéresis. La eficacia del caseinato de sodio contra espuma de leche en polvo es aumentar la viscosidad.

## **2.2. Homogeneización.**

La homogeneización consiste literalmente en la formación de una emulsión homogénea de 2 líquidos inmiscibles, esto es, aceite - grasa y agua. Esta tiene dos ventajas, evitar la separación de la materia grasa a la superficie, y aumentar la consistencia del producto (200 atmósferas de 55°C parecen dar los mejores resultados). Es parte integral del proceso de manufactura del yogurt. Usualmente es llevada antes o fuera del tratamiento térmico, pero en algunos casos puede tomar lugar después. El efecto chlefly de dispersión homogénea es llevado fuera de los constituyentes de la mezcla de leche e incrementa la viscosidad y estabilidad del coágulo del yogurt. También mejora el sabor de boca del producto y esto aumenta su calidad organoléptica. Algunos de los efectos físico-químicos de la homogeneización de la leche es su relevancia en la manufactura del yogurt.

La homogeneización es importante en la manufactura del yogurt en la leche que contiene grasa (de 1-2% de crema de leche entera). El proceso de homogeneización divide los glóbulos de grasa dentro de glóbulos pequeños hasta llegar a ser sacos con membranas nuevas incluyendo en gran parte submicelas de caseína. Este proceso efectivamente incrementa la densidad de los glóbulos

de grasa y reduce su tendencia a aglutinarse. Esta es esencial cuando la leche en polvo es usada para la fortificación de las leches, ya que rompe las partículas de polvo y las micelas lisas de caseína agregadas. Normalmente las micelas de caseína individuales no afectan. La alta presión de homogeneización es requerida para romper el tamaño normal de las micelas.

El incremento en la viscosidad causada por la homogeneización es relacionada por el cambio en las propiedades del agua y la capacidad de las proteínas de la leche. Esto solamente tiende a reducir la sinéresis. La capacidad de las propiedades del agua puede mejorar por el incremento en la cantidad de glóbulos de grasa de la leche y el material de membrana (fosfolípidos y proteínas) en la fase de espuma. La viscosidad del yogurt depende de ambas tanto de temperatura como de presión de homogeneización, con los mejores resultados logrados a 100 - 200 Kg/cm<sup>2</sup> y a 50 - 60 °C.

### **2.3. Pasteurización.**

Desde el punto de vista bacteriológico, la pasteurización es de primordial importancia en la fabricación del yogurt, pero el tratamiento térmico también es importante en las propiedades físico-químicas del producto resultante.

\* Se obtiene una cuajada consistente, homogénea y que no deje exudar el suero, bajo las siguientes condiciones:

\* Si la leche es calentada 15 segundos a 80 °C y mantenida durante 15 minutos a esa temperatura.

\* Si se calienta a 90 °C en 15 segundos y se mantiene así durante 5 minutos.

\* Si es calentada en 4 minutos a 84 °C sin que haya necesidad de mantener más tiempo la temperatura.

Los cambios más importantes en la manufactura del yogurt son los físico-químicos de las proteínas, el bajo pH y el efecto en las propiedades nutricionales tanto para el crecimiento del cultivo de bacterias como para la salud humana. Los cambios en la proteína envuelven la fracción de la proteína tanto el suero como la caseína son muy importantes para determinar la estabilidad del gel de yogurt. De aquí se reconoce la Beta - lactoglobulina (B-Lg) que interactúa recíprocamente con la K-caseína que indica que la alfa-lactoalbúmina (alfa-La) también está implicada.

El tratamiento térmico ordinario permite la eliminación de algunos sabores no deseables, pero determinados tratamientos pueden ser así mismo origen de sabores anómalos, por ejemplo "sabor caramelo", como resultado de reacciones de Maillard entre la lactosa y los grupos amino de las proteínas. Algunas vitaminas son destruidas por el tratamiento térmico. Esto afecta al ácido ascórbico y algunas vitaminas del grupo B (B1, B6, B12, ácido fólico). La cantidad destruida depende en gran parte del contenido de oxígeno de la leche. En la ausencia de oxígeno la pérdida de vitaminas es muy baja.

### **2.4. Siembra de fermentos lácticos.**

La leche, ya pasteurizada, es inmediatamente enfriada a la temperatura de siembra (45 °C), para agregar los fermentos en una proporción de 2 a 3%. Estos

pueden ser adicionados en cultivos separados o en uno mixto y la ventaja que puede tener el primer sistema sobre el segundo es el siguiente:

#### 2.4.1. Clasificación de la bacteria iniciadora.

La clasificación de estas bacterias por Orla-Jensen reconocidas como un método estándar, en la edición 7ª. del Manual de Bergey's (1957) dónde fueron agrupadas en la familia *Lactobacillaceae*, con subdivisión dentro de dos tipos la *Streptococceae* (forma coccal) y la *Lactobacilleae* (forma de bastón). Posteriormente en la edición 8ª(1974) se reclasificó las bacterias en dos familias: la *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*.

Las bacterias iniciadoras del yogurt: *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* son termodúricas, ácido lácticas homofermentativas. Mientras que *S. thermophilus* se distingue por otros miembros de su género *Streptococcus*, por su crecimiento a 45 °C y el fracaso al ser cultivado a 10 °C. *L. bulgaricus* fermenta menos azúcares que *L. lactis*. Estas dos especies juntas con *L. delbrückii* y *L. leichmanii* tiende a ser recientemente agrupadas juntas por ser semejantes.

Los cultivos iniciadores de yogurt son una mezcla de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* que son normalmente propagados juntos alrededor de 42 °C Por subcultivo puede conducir a mutación de un organismo sobre otro en sobrecrecimiento.

#### 2.4.2. Simbiosis y factores estimuladores e inhibidores.

Se ha demostrado que la actividad de crecimiento de *S. thermophilus* en el contenido de leche filtrada con *L. bulgaricus*, este último provee requerimientos esenciales para el crecimiento y estimulación de *S. thermophilus*, además sugieren que la leche obtenida en diferentes años puede ser deficiente en aminoácidos. Por ejemplo, seis aminoácidos (leucina, lisina, cistina, ácido aspártico, histidina y valina) son esenciales para *Streptococcus* durante los meses de primavera y once aminoácidos además de los ya mencionados son esenciales en el otoño. Valina es presentada como estimuladora.

Lo opuesto a lo relacionado, *S. thermophilus* bajo condiciones anaerobias produce una substancia estimuladora para *L. bulgaricus* que es semejante o puede ser reemplazada por ácido fórmico.

De esta manera un tratamiento térmico de la leche es usado para el yogurt, por ejemplo, 85 - 90°C. *L. bulgaricus* definitivamente necesita del factor estimulador producido por el *S. thermophilus*. Mientras que el ácido fórmico puede ser producido por *S. thermophilus*. Por lo que *L. bulgaricus* es estimulado por ácido fórmico y pirúvico, ácidos producidos por *S. thermophilus*. *L. bulgaricus* puede ser estimulado por purina, adenina, guanina, uracil y adenosina.

En algunas etapas durante el periodo de incubación *L. bulgaricus* provee los aminoácidos esenciales requeridos por *S. thermophilus* y este provee compuestos de ácido fórmico que estimulan a *L. bulgaricus*. Es improbable que *L. bulgaricus* sea estimulado por péptidos, purinas y pirimidinas durante la producción de yogurt.

Otros factores que pueden influenciar en la cantidad de la estimulación de los organismo iniciador son los niveles de total de sólidos en el yogurt y el

tratamiento térmico de la leche, ya que cerca del 21% del total de sólidos en el yogurt resulta una inhibición para *L. bulgaricus*.

Las sustancias inhibitorias en la leche pueden originarse por varias fuentes, incluyendo la terapia con antibióticos usada en las vacas lecheras, desinfectantes, residuos de detergente o equipamiento y bacteriófagos. Los inhibitorios naturales pueden también estar presentes en la leche (Tamine y col, 1980).

## 2.5. Envasado.

Una vez sembrados los fermentos, se procederá de inmediato al envasado del producto y en este momento puede ser llevado a la operación del tapado, si se hace así, sobre la tapadera suelen producirse condensaciones que al caer sobre la superficie del producto, lo estrellarán, por el contrario, si esperamos a que el producto esté frío para tapanlo, debemos recordar que es durante este período, que se producen las contaminaciones de levaduras y hongos.

## 2. 6. Incubación.

Los envases llenos, tapados o no, son puestos en incubación, para esto se pueden usar estufa de cultivos a baño María, la temperatura de incubación nos permite actuar sobre la producción de la mezcla de los dos fermentos lácticos.

*S. thermophilus* se desarrolla entre 30 y 50°C, pero su temperatura óptima es de 40 a 42°C. *Lactobacillus bulgaricus* vive entre 30 y 55°C pero la temperatura óptima es de 40 a 42°C, mientras para que obtenerlo más ácido la incubación nos permite actuar sobre la proporción de la mezcla de los dos fermentos lácticos.

Para tener un yogurt suave y de sabor agradable, se hará la incubación entre 40 y 42°C, mientras que para obtenerlo más ácido sin cambiar el tiempo de incubación, se aumentará la temperatura a 45°C.

El tiempo de incubación es de aproximadamente una hora y media a dos horas. Es necesario detener el trabajo microbiano por medio del enfriamiento, en cuanto a la acidez alcance de 0.8 a 0.9% de ácido láctico. Si la rapidez de enfriamiento es insuficiente, es preferible sacarlos de incubación con una acidez más baja (0.6 a 0.7%), a fin de compensar el aumento de acidez durante el período que tardará el producto en alcanzar su temperatura inferior a la de las dos especies. La acidez tiene también gran influencia sobre la firmeza del producto, sobre su viscosidad y sobre la exudación del suero. Es prudente atenderse a las cifras mencionadas, con ellas se obtienen mejores yogures. El *streptococo* produce más aroma y el bacilo más acidez. Para tener un yogurt dulce y aromático que responda a las exigencias del consumidor, hace falta que predomine el *streptococo*, pero para tener un yogurt ácido se aumentará el bacilo. Por medio de la temperatura se puede lograr en parte la proporción deseada, pero es mejor contar con un medio suplementario que nos proporcione la cantidad necesaria de cada una de las especies.

## 2.7. Tapada, refrigeración y transporte.

Si aún no han sido, los envases serán tapados y llevados a cámara fría (0 a 5°C), para evitar el desarrollo de las especies susceptibles de contaminar la superficie.

El transporte deberá hacerse sin sacudidas que rompan la leche cuajada, precipitando la exudación del suero (Navarrete, 1990).

## 3. Cambios bioquímicos en el yogurt.

### 3.1. Metabolismo de carbohidratos.

Los microorganismos cubren sus necesidades energéticas por diferentes vías, por ejemplo el sistema citocromo de transporte de electrones, las enzimas de las rutas anapleróticas, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o la fermentación. Las bacterias ácido-lácticas no poseen ninguno de los tres primeros sistemas mencionados, por lo que sólo pueden obtener la energía a través de la fermentación de los carbohidratos; siendo la lactosa el único azúcar presente en la leche y utilizado para este fin por los microorganismos del yogurt. El catabolismo de la lactosa por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* tiene lugar en el interior de la célula microbiana, por lo que el paso inicial es el transporte de las moléculas de lactosa a través de la pared celular. En los estreptococos homofermentativos del grupo N, el transporte de lactosa a través de la pared celular implica la participación del sistema fosfotransferasa (SPT); dependiente del fosfoenolpiruvato (PEP), siendo fosforilada la lactosa a glucosil B-(1,4)-galactosa-6P (Lactosa-P) durante esta incorporación. Una vez en el interior de la célula la lactosa-P es hidrolizada hasta D-glucosa y galactosa-6P por acción de la enzima B-D-fosfogalactosidasa (B-P gal.). La glucosa es metabolizada hasta piruvato por la vía de Embden Meyerhof (EMP) y el piruvato convertido en ácido láctico por la lactato deshidrogenasa. El metabolismo de la galactosa-6P se diferencia del de la glucosa en que, en primer lugar, es convertida en gliceraldehído-3P por la ruta D-tagatosa-6P y, en segundo lugar, el gliceraldehído-3P es catabolizado hasta piruvato y ácido láctico por el ciclo glucolítico. Si estas rutas metabólicas y de transporte son las que tienen lugar los microorganismos del yogurt es un hecho que todavía no se conoce con seguridad.

#### 3.1.1. Producción de ácido láctico.

La importancia del ácido láctico en la elaboración del yogurt contribuye a la desestabilización de las micelas de caseína mediante el paso del fosfato y del calcio de un estado coloidal (en las micelas) a una forma soluble, que difunde en la fracción acuosa de la leche, lo que determina una progresiva depleción de calcio de las micelas que conduce a la precipitación de la caseína a valores de pH de 4.6 a 4.7, dando lugar a la formación del gel que constituye el yogurt. Una vez alcanzada esta condición, se forma lactato cálcico soluble.



El ácido láctico proporciona al yogurt su sabor característico, es decir ácido. Las bacterias ácido-lácticas poseen la enzima lactico-deshidrogenasa (LDH), que cataboliza la síntesis de lactato a partir del ácido pirúvico. Se pueden producir distintos isómeros de ácido láctico, L(+), D(-) y D(+ -) los cuales difieren en la configuración del segundo átomo de carbono.

En los cultivos estárter de yogurt, *S. thermophilus* produce principalmente ácido L(+) láctico, mientras que *L. bulgaricus* produce ácido D(-) láctico.

Durante la elaboración del yogurt el crecimiento de *S. thermophilus* es más rápido que el de *L. bulgaricus*, por lo que se produce en primer lugar ácido L(+) láctico y a continuación ácido D(-) láctico, siendo el porcentaje entre estos isómeros indicativo de los siguientes hechos:

- 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 *S. thermophilus*, y la fermentación se ha desarrollado a temperaturas inferiores a 40°C o, si el yogurt contiene un 0.8% o menos de ácido láctico, que ha sido refrigerado cuando presentaba una acidez baja.
- Si el yogurt contiene más ácido D(-) láctico que L(+), 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 período de tiempo prolongado, que el inóculo de estárter fue superior al 3%, o bien que el cultivo estárter empleado contenía más bacilos que cocos.
- El yogurt contiene normalmente un 45-60% de ácido L(+) láctico y un 40-55% de ácido D(-) láctico, pudiendo emplearse la relación entre el contenido en las formas L(+) y D(-) como control de calidad del producto. No obstante, al analizar 269 muestras de yogurt comercial se encuentra que la relación L(+):D(-) oscilaba de 0.34 (en los productos muy ácidos) a 8.28, es decir, con un claro predominio de la forma L(+). Para un yogurt de buena calidad el valor del cociente debería ser de 2.
- La adición de glucosa o sacarosa no afecta la proporción de lactato L (+) y D (-) producido en el yogurt. Aunque se reporta una escasa reducción en la producción total de ácido láctico cuando un 6% de azúcar fue adicionado en la mezcla base. El factor que puede ser más importante en la producción de yogurt comercial es la adición de azúcar antes del calentamiento, la incubación, y la adición de fruta antes del empaque.

### 3.1.2. Hidrólisis de la lactosa por la galactosidasa.

Durante la manufactura de yogurt la lactosa no es fermentada totalmente. El exceso de lactosa puede ser utilizada para endulzar el yogurt con o sin incremento en su valor calorífico. Además, la reducción de los niveles de lactosa pueden hidrolizarse por preparaciones comerciales de B-D-galactosidasa (lactasa), que son producidas por *Aspergillus niger*, *Saccharomyces lactis* y *E.*

*coli*. Cuando una enzima da a lugar a una hidrólisis de la lactosa, glucosa y galactosa son producidas en igual cantidad. Aunque en la práctica esto no sucede, porque otros oligosacáridos, son formados en la adición de glucosa y galactosa. El porcentaje de conversión de lactosa por oligosacáridos incrementa la concentración. Esto alcanza una máxima cuando la lactosa fue de 35% (w/v) y el % de conversión de oligosacáridos fue entonces de 44.6 %. La formación de oligosacáridos durante la acción de una preparación comercial de B-D-galactosidasa en lactosa de la leche. La estimulación del yogurt puede ser atribuida a la glucosa libre en la leche por *lactic streptococci*. En algunos trabajos se observó una cepa de cultivo de yogurt iniciador donde la lactosa fue utilizada en la etapa posterior durante la fermentación. Esto sugiere que cepas de *L. bulgaricus* son capaces de catabolizar galactosa.

También se ha reportado que la galactosa se acumula en la leche fermentada porque *S. thermophilus* presenta una capacidad para utilizar solamente glucosa y galactosa. Por lo que es necesario otra investigación sobre el metabolismo de la galactosa en el yogurt.

Tecnológicamente la manufactura viable del yogurt para leche hidrolizada-lactosa, es el proceso de hidrólisis que puede tomar lugar durante el almacén de noche, de enfriar la leche antes del tratamiento térmico a la temperatura óptima de la enzima, por ejemplo, 35 - 37 °C. Esto reconoce que la manufactura para leche hidrolizada-lactosa es suave y dulce en la presencia de monosacáridos y es conveniente para la producción del sabor de yogurt.

### 3.1.3. Producción de compuestos responsables del sabor.

Los cultivos estériles son los principales responsables de la producción de los compuestos que contribuyen al aroma del yogurt, los cuales pueden ser agrupados en cuatro categorías:

- Ácidos no volátiles, como el láctico, pirúvico, oxálico o succínico.
- Ácidos volátiles, como el fórmico, acético, propiónico o butírico.
- Compuestos con grupos carbonilo, como acetaldehído, acetona, acetoína o diacetilo.
- Un grupo heterogéneo de sustancias, entre las que se incluyen algunos aminoácidos y/u otros compuestos formados por degradación de las proteínas, la grasa o la lactosa por acción de la temperatura.

Existe un acuerdo general en la literatura sobre el hecho de que el aroma y el sabor del yogurt se debe básicamente a la producción de ácido láctico y de compuestos carbonilo. Sin embargo en otra investigación se llegó a la conclusión de que el aroma era debido a la presencia de acetaldehído y de otros compuestos no identificados. También observaron que la producción de acetaldehído era muy superior en cultivos mixtos, debido a la simbiosis establecida entre los microorganismos del yogurt, si bien *L. bulgaricus* juega el papel más importante.

### 3.2. Proteólisis.

La proteólisis enzimática de las proteínas de la leche determina la liberación de péptidos de tamaño variable y de aminoácidos libres y estos cambios afectan a la estructura física del yogurt. Como ya se ha estudiado, la liberación de aminoácidos en la leche resulta esencial para el crecimiento de *S. thermophilus*. Aunque los aminoácidos y péptidos no contribuyen directamente al desarrollo del sabor del yogurt, actúan como precursores de multitud de reacciones que conducen a la formación de compuestos responsables del mismo.

Los datos recopilados sobre la actividad proteolítica de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* indican que ambos microorganismos poseen diversas peptidasas y proteasas. La actividad peptidasa de los primeros es superior a la de *L. bulgaricus*, pero sólo presentan una débil actividad proteásica mientras que la capacidad de *L. bulgaricus* para hidrolizar la caseína confirma una actividad proteasa muy superior en los lactobacilos. Este modelo de hidrólisis peptídica por parte de los microorganismos del yogurt evidencia la relación simbiótica existente entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Por tanto, la actividad proteásica de *L. bulgaricus* hidroliza las caseínas, dando lugar a polipéptidos que son degradados por las peptidasas de *S. thermophilus* hasta la liberación de los aminoácidos constituyentes.

#### 3.2.1. Condiciones que afectan la proteólisis.

La más intensa proteólisis ocurrida es durante la fase logarítmica de crecimiento de los microorganismos del yogurt. Después de esto se declina en la fase estacionaria.

La concentración de aminoácidos en el yogurt depende de la relación entre *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en los cultivos estériles. Por ejemplo, para una relación 1:1 se liberan 70 mg % a 1:2 50 mg % y 2:1 41 mg % y es posible que la elevada concentración de aminoácidos liberados en el producto esté asociada con la actividad proteolítica de *L. bulgaricus*, que se convierte en el microorganismo dominante en los medios ácidos.

En el yogurt (tras 24 horas de incubación) el espectro de aminoácidos varía en función de la relación cocos:bacilos. A una relación de 1:1 el 56% de los aminoácidos corresponden a tirosina, fenilalanina y leucina, pero para una relación de 3:1, la prolina representa el 7.1% los aminoácidos libres.

Los ácidos grasos libres, por ejemplo el ácido cáprico y en menor grado el ácido oleico, pueden reducir la actividad proteolítica de los cultivos estériles, afectando a la textura del coágulo.

El sabor amargo del yogurt se atribuye normalmente a la formación de péptidos amargos como consecuencia de la actividad proteolítica de *L. bulgaricus*. Sin embargo, la fermentación de la leche a temperaturas de 44 °C da lugar a un producto con menos probabilidad de resultar amargo que los productos incubados a temperaturas de 38°C.

### 3.2.2. Productos de la proteólisis.

Los microorganismos del yogurt difieren en su actividad proteolítica y las cantidades de nitrógeno dializable liberadas por *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (490 y 302 mg/100 ml) confirman que el primero de estos microorganismos es más proteolítico que *S. thermophilus*. Esta misma tendencia se observa en relación con las cantidades de aminoácidos, urea y péptidos pero la capacidad de *S. thermophilus* para aumentar la concentración de amoníaco en las leches incubadas se debe a su capacidad para degradar la urea.

Cuando la fermentación se realiza a 42°C durante 2-3 horas se obtienen concentraciones ligeramente superiores de aminoácidos que cuando esta tiene lugar a 42°C durante 1 hora, seguida de un período de 5-6 horas a 30-32°C, siendo el contenido total de aminoácidos en dichos productos de 23.6 y 19.4 mg/100 ml respectivamente. *L. bulgaricus* presenta una actividad proteolítica superior a la de *S. thermophilus*, cuanto mayor es la relación bacilos:cocos en el cultivo estérter, mayor es la concentración de aminoácidos en el yogurt.

La temperatura de almacenamiento del yogurt condiciona la concentración de aminoácidos libres en el producto. Cuanto mayor es la temperatura de conservación mayor es la concentración de aminoácidos libres.

### 3.3. Lipólisis.

Aunque el metabolismo de las grasas ocurre en un pequeño grado en el yogurt, está contribuye al sabor. La lipólisis que ocurre en el yogurt es atribuida a las enzimas lipolíticas de la bacteria iniciadora, la lipasa natural de la leche existe completamente inactivada por la pasteurización.

Las lipasas de bacterias ácido lácticas usualmente presentan una preferencia por cadenas cortas de triacilglicéridos, y son reportadas con una alta actividad parcial a glicéridos que a triacilglicéridos. Ambos cultivos usados en la producción de yogurt reportan una cantidad y especificidad de actividad de lipasa medible, aunque también difiere según las pruebas empleadas. *S. thermophilus* presenta actividad de tributirinaasa, trioleinasa y baja actividad contra la grasa de leche y Tween 40 y 60. *L. bulgaricus* presenta actividad de tributirinaasa aunque de menor grado que *S. thermophilus*. Tal parece que un pequeño grado de lipólisis puede tomar lugar en el yogurt, más del contenido de ácidos volátiles de yogurt es derivado de componentes no-grasos. La alta producción de ácidos volátiles por *L. bulgaricus* es probable que se relacione con su alta actividad proteolítica (Tamine y col., 1980).

## C. PRODUCTOS FERMENTADOS A BASE DE SOYA "SOGURT".

Es un producto elaborado a partir de la fermentación en la leche de soya por bacterias ácido lácticas y da como resultado un producto conocido en la bibliografía como "sogurt". Del cual se han hecho diferentes formas para prepararlo, así como se han empleado una variedad de ingredientes para mayor aceptabilidad del consumidor.

## 1. Métodos para la preparación de la leche de soya.

Se han publicado muchos métodos para la preparación de la leche de soya. La mayoría de estos métodos buscan reducir o eliminar el sabor amargo del frijol de soya y mejorar su aceptación por el consumidor. En general, se pueden enumerar los siguientes pasos en la elaboración de la leche de soya: remojo; tratamiento térmico-químico; lavado y enjuague; molienda; filtración; pasteurización; homogeneización; ajuste de pH. En el cuadro 3 se presentan los métodos utilizados para la elaboración de la leche de soya.

## 2. Microorganismos que fermentan la leche de soya.

Se ha demostrado que los cultivos utilizados a nivel comercial para la producción de yogurt (*S. thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*), son capaces de fermentar la "leche" de soya (Mital y col., 1974; Wang y col., 1974, Shirai y col., 1992). Entre otros se encuentra el *Lactobacillus delbrueckii*, *L. pentosus* y *L. mesenteroides* los cuales producen una considerable cantidad de acidez en leche de soya, así como *S. thermophilus* aunque no es suficiente para coagular la leche de soya. El crecimiento en la leche de soya por *Streptococcus lactis* II, *S. thermophilus*, *S. diacetylactis* producen suficiente acidez para coagular la leche de soya siendo más notoria en *S. thermophilus*. El *Lactobacillus delbrueckii* desarrolla poca acidez (Angeles y col., 1971).

En la leche de soya se observó la acción de *L. acidophilus* con un alto crecimiento en esta cuando se suplementó con glucosa o lactosa pero fue lento su crecimiento cuando se enriqueció con sacarosa sola. Esto sugiere la preferencia de usar glucosa y lactosa para este cultivo por lo que la leche de soya no provee de un buen crecimiento, mientras que la sacarosa no tiene un efecto significativo. Por lo tanto *L. bulgaricus* no presentó crecimiento en la leche de soya después de 48 horas de incubación además la adición de glucosa o lactosa estimula su crecimiento pero la carencia de estos azúcares en la leche de soya limita su crecimiento (Wang y col., 1974). Entre los microorganismos que fermentan los azúcares presentes en la leche de soya como la rafinosa se encuentran *L. cellobiosis*, *L. fermenti* y *S. thermophilus*; así también la sacarosa es fermentada por *L. cellobiosis*, *L. plantarum* y por último la estaquiosa fue fermentada por *L. plantarum*, *L. fermenti* y *S. thermophilus* (Mital y col., 1974).

Pinthong y col. (1980b), encontró una alta aceptabilidad, cuando la leche de soya fue fermentada con *L. delbrueckii*, spp *bulgaricus*, *S. salivaricus*, spp, *thermophilus* o una combinación de ambos fue usada por este autor. Otros microorganismos que fermentan la leche de soya se mencionan en el cuadro 4.

**Cuadro 3.** Diferentes métodos de preparación de la leche de soya.

Referencia	Remojo y/o tratamiento térmico-químico	Lavado y enjuague	Molienda	Filtración	Pasteurización y homogeneización	Ajuste de pH
Karleskind y col., 1991.	Hervir 30 min. en NaHCO <sub>3</sub> al 0.25% en una proporción frijol de soya : solución de 1:5.	Con agua de la llave.	Moler en un molino DLC-X Plus con agua de la llave	A través de gasa.	Calentar a 82 °C por 5 min. Homogeneizar por 5 min. a 12,000 rpm en un equipo Polytron.	6.8 - 7.2
Lee y col., 1990.	Remojar por 6 - 8 horas con agua destilada a 60 °C.	Con agua destilada hirviendo.	Moler en licuadora	A través de gasa.		
Angeles y col., 1971	Lavar y remojar con agua destilada por 6-8 horas a 5°C, hasta absorber 1 ml /g de peso seco.		Moler en licuadora por 3 min.	Filtrar 2 veces a través de 3 capas de gasa delgada.	En autoclave a 120 °C por 15 min.	
Khaleque A. y col., 1970.	Remojo a 17- 21°C por 18-24 horas en hidróxido, carbonato o bicarbonato de sodio 0.4 M.	Con agua de la llave.	Moler por 3 a 4 min.		Hervir por 30 min.	6.8 - 7.0
Mital y col., 1974.	Lavar y remojar con agua de la llave a 60 °C, hasta absorber 1 ml /g de peso seco.	Con agua de la llave.	Moler en licuadora por 5 min. con agua hirviendo.	Filtrado a presión por un embudo Buchner.	En autoclave a 121 °C por 15 min.	
Wang L.H. y col., 1974.	Remojar toda la noche en agua a temperatura ambiente, previo lavado y descascarillado.		Moler en una licuadora con agua de la llave por 2 min.	Filtrar a través de 2 capas de gasa.	Hervir	
Shirai y col., 1992.	Hervir 5 min. con agua destilada en una relación 1:2 y remojar durante 17 horas. Descascarillar y hervir 5 min. en agua destilada.		Moler en una licuadora con agua de la llave.	A través de gasa	Hervir por 5 min.	

**Cuadro 3.** Diferentes métodos de preparación de la leche de soya. (continuación).

Referencia	Remojo y/o tratamiento térmico-químico	Lavado y enjuague	Molienda	Filtración	Pasteurización y homogeneización	Ajuste de pH
Nsofor y col., 1992.	Remojar por 8 horas en NaHCO <sub>3</sub> al 0.5% y hervir 5 min. con agua de la llave.	Lavado y descascarillado.	Moler en licuadora con agua a 80 °C	Filtrar a través de tela de algodón.	En autoclave a 121 °C por 15 min.	
Kwok y col., 1993.	Remojar con agua (frijol:agua, 1:10) por 14 h a 5°C.		Moler en un molino Habart vertical mod. mcv-12) por 5 min. con el agua de remojo.	Filtrar a presión.		6.5 - 7.5
Bourne y col., 1976.	Remojar 8 horas con agua a temperatura ambiente.	Con agua de la llave.	Triturar con agua hirviendo, hasta tamaño de partícula < 2 pulg.	Filtrar a presión.		6.6, 7.0, 7.5 y 8.0
Nsofor y col., 1992	Hervir por 30 min. en NaHCO <sub>3</sub> al 0.25%.	Descascarillar y enjuagar con agua de la llave	Moler en licuadora con agua caliente.	Filtrar a través de una malla metálica y tela de algodón.	Hervir por 30 min. y calentar a 63 °C por 30 min.	
Tuitemwong, 1993			Triturar el frijol de soya, separar la cáscara y moler hasta tamaño de partícula < 0.51 mm.		Mezclar con agua a 95-98 °C por 30 seg. Calentar a 105-157 °C con vapor a alta presión por 20-120 seg.	

**Cuadro 4. Microorganismos utilizados para la fermentación de la leche de soya.**

Microorganismo	Temperatura de incubación (°C).	Tiempo (horas)	Trabajo realizado por:	Observaciones
<i>L. casei</i> y <i>S. Thermophilus</i> .	30	18	Cheng y col., 1990.	Utilizados al 2%.
<i>Streptococcus lactis</i> II.	30	16	Angeles y col. 1971	Crece en leche de soya.
<i>S. thermophilus</i> .	45	16	Angeles y col., 1971	Crece, produce acidez y coagula la leche de soya.
<i>S. cremoris</i>	30	16	Angeles y col., 1971	
<i>S. diacetylactis</i>	30	16	Angeles y col., 1971	Crece en leche de soya.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> .	30	16	Angeles y col., 1971	Desarrolla poca acidez en leche de soya.
<i>L. citrovorum</i> .	30	16	Angeles y col., 1971	
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	30	16	Angeles y col., 1971	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	37	16	Angeles y col., 1971	Desarrolla poca acidez en leche de soya.
<i>L. casei</i> .	30	16	Angeles y col., 1971	
<i>L. helveticus</i>	37	16	Angeles y col., 1971	
<i>L. fermenti</i>	37	16	Angeles y col., 1971	
<i>L. pentosus</i>	30	16	Angeles y col, 1971	Desarrolla poca acidez en leche de soya.
<i>L. brevis</i>	30	16	Angeles y col, 1971	
<i>L. bulgaricus</i>	43 37	24 24	1.Pinthong y col.,1980. 2.Lee y col., 1990.	1. Utilizado al 2% en combinación con <i>S. thermophilus</i> .
<i>L. acidophilus</i> .	37	16	Wang y col 1974.	
<i>L. plantarum</i>	30	16-18	Mital y col., 1974.	

### 3. Ingredientes utilizados en la elaboración del sogurt.

Se han realizado muchas investigaciones, principalmente para mejorar la estabilidad y aceptabilidad de los productos fermentados de soya (Wang y col., 1974; Pinthong y col., 1980; Lee y col., 1990; Karleskind y col., 1991; Shirai y col., 1992). Otros esfuerzos se han orientado hacia la utilización de ingredientes que incrementen la producción de acidez y la viscosidad del producto final (Pinthong y col., 1980; Lee y col., 1990; Cheng y col., 1990; Karleskind y col., 1991). En el cuadro 5 se presenta un resumen de los diferentes ingredientes utilizados en la preparación del sogurt (yogurt de soya), así como la función de cada uno de ellos.

**Cuadro 5. Ingredientes utilizados para la elaboración del sogurt.**

Ingrediente	Concentración (%)	Efecto	Referencia
Leche en polvo descremada	2.01g/30ml de leche de soya (L.S).	Aumenta la viscosidad. Para mejor sabor y acidez.	Karleskind y col., 1991. Lee y col., 1990.
Fructosa	25%	Enmascara el sabor amargo del frijol de soya.	Karleskind y col., 1991.
Avena y suero de queso.		Aumento del valor proteico.	Shirai y col., 1992.
Cloruro de calcio.	0.02 y 0.14%	Mejor unión de las proteínas de la leche de soya.	Lee y col., 1990.
Fécula de maíz.	2%	Para prevenir la sinéresis e inhibir la separación del suero.	Lee y col., 1990.
Lactosa	2%	Incremento de acidez.	Cheng y col., 1990.
Azúcar	100g 4% (m/v)	Para una mejor aceptación.	Pinthong y col., 1980. 2. Wang y col., 1974.
Citrato de sodio.	0.1 y 0.5%.	Una conc. De 0.1% produce un mínimo cambio en el sabor y aroma, y al 0.5% produce un inaceptable sabor. Mejor textura.	1. Lee y col., 1990.
Acetato de sodio.	0.3%.	Junto con el citrato previenen la sinéresis y son precursores de compuestos aromáticos.	Lee y col., 1990.
Glucosa con extracto de levadura.	1% (m/v) glucosa. 0.1% (m/v) de extracto de levadura.	Favorece el desarrollo de acidez y da firmeza al producto final. Previene la sinéresis.	Pinthong y col., 1980.
Sulfato de calcio.	0.04%	Para mejorar la aceptabilidad del yogurt hecho con leche de soya y suero	Shirai y col., 1992.
Mermelada de fresa.	250g	Para una mejor aceptación.	Shirai y col., 1992.
Leche descremada en polvo Fructosa al 25%L. evaporada		Para enmascarar el sabor a frijol de soya.	Bouno y col., 1990.

Proteína de suero concentrada	54% en base seca	aumenta el valor proteico	Lee y col., 1990.
Emulsificador monoglicérido (DUR-EM).	1.0%	Emulsificador	Karleskind y col., 1991.
Granos de maíz, hojas de espinaca y raíz de yuca fermentados		Mejorar la producción de ácido y el aroma.	Nsofor y col., 1992.
Leche descremada en polvo Proteína aislada de soja Harina de cacahuete	6.4% 10.0% 7.5%	Aumentar el valor proteico	Schmidt y col., 1980.
Gelatina	0.1%	Estabilizador	Schmidt y col., 1980.
Acetato de calcio	0.15%	Coagulante	Cheng y col., 1990.

## D. KÉFIR.

### 1. Definición.

El kéfir es una leche fermentada que tiene su origen en las montañas del Cáucaso en Rusia. Se caracteriza por ser una bebida ácida, efervescente, alcohólica, gaseosa y refrescante. Este producto se elabora con la semilla de kéfir, conocida en nuestro país como búlgaros. Generalmente se presenta en pequeños granos blanquecinos con aspecto de trozos de coliflor; conformados por un polisacárido de glucosa y galactosa (kefiran), insoluble en agua.

Se cree que la palabra kéfir proviene de "keif", voz turca que significa "agradable sensación", o causa de la sensación de bienestar, refiriéndose al efecto que experimenta al ingerirlo. El kéfir también es llamado el "champan de la leche", bebida de profeta", o yogurt casero. Las semillas de kéfir tienen el aspecto de pequeños granos en forma de trozos de coliflor o corales. Están formados por un polisacárido de glucosa y galactosa (kefiran) que es insoluble en agua; al contacto con ella se hinchan como sucede con las gomas, el agar o hidrocoloides similares. La composición química de las semillas de kéfir consiste en 890 - 900 g/kg de agua, 2 g/kg de lípidos, 30 g/kg de proteína, 60 g/kg azúcar y 7 g/kg cenizas. Aunque el microorganismo responsable de la formación del polisacárido es *Lactobacillus kefirianofaciens*.

Las semillas de kéfir varían de tamaño, desde 0.5 cm de diámetro hasta 10 cm o más, que se pueden conformar en una sola unidad. El color varía de blanquecino a amarillento. Debido al carácter artesanal o familiar con el que este producto es generalmente obtenido, su microbiología es variada o más bien indefinida; pero consiste fundamentalmente en levaduras y bacterias lácticas en relación simbiótica. La microbiología de los granos de kéfir ha sido estudiada por Freudenreich, que ha demostrado la gran variedad de gérmenes implicados. Es probable que la flora varíe de un grano a otro, aunque siempre se encuentran levaduras (*Saccharomyces kefir*) parecidas a la levadura de la cerveza y bacterias

lácticas como *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus caucasicus*. Esta flora fundamental se asocia con una flora accesoría de gérmenes de polución (*Acetobacter* y *Klebsiella*, etc). Los lactobacilos hidrolizan la lactosa en glucosa y galactosa y estos azúcares pueden ser transformados en alcohol por las levaduras. Por otra parte, el *lactobacillus caucasicus* encuentra los factores de crecimiento que necesita entre los productos de degradación resultantes de la lisis de ciertas células de levadura que desaparecen del medio. (Veisseyre, 1972). Los organismos activos del kéfir son tres especies diferentes de levaduras (*levaduras lácticas*), *Streptococcus ácido lácticos* (*Streptococcus lactis* y *S. cremoris*), bacterias ácido lácticas baciliformes (con frecuencia cuatro especies distintas, entre ellas el *Streptobacterium casei* y *Betabacterium caucasicum*), así como el bacilo del kéfir, retorcido en forma típica (*Bacillus caucasi*, *Pick*), que rodea con su larga cadena celular a los restantes microorganismos y con ello da lugar a los nódulos de kéfir, en forma de coliflor.

Entre otras especies de *Lactobacillus* se encuentran presentes; estos incluyen *Saccharomyces kefir*, *S. exiguus*, *S. unisporus* y *Candida kefir*, y otras bacterias como *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus caucasicus*. Eventualmente se recuperan bacterias como *Micrococcus*, coliformes y bacilos esporulados cuyo papel en los procesos fermentativos suele ser nulo (Veisseyre, 1972).

Típicamente el kéfir se caracteriza por su contenido de ácido láctico, etanol y CO<sub>2</sub> y otros componentes menos abundantes. El kéfir puede presentar una acidez de 0.8 a 1.0% de ácido láctico, mientras que el porcentaje de etanoles es muy variado. Diversos autores reportan cantidades de etanol que van desde 0.01 hasta 3.6%. Estos límites resultan principalmente del tiempo que se deja madurar al producto. En nuestro país el kéfir es consumido sin este tratamiento complementario.

La viscosidad varía dependiendo del tipo de leche empleada así como del tiempo y cantidad de inóculo. Estudios realizados en la antigua Unión Soviética señalan que una buena muestra de kéfir fluye como mínimo en 30s., y una de consistencia aceptable en 20s (Esain, 1971). En cuanto al valor nutricional no se ha demostrado que exista una diferencia importante entre los valores nutritivos de la leche fresca y el producto fermentado.

Así la fase inicial de preparación del cultivo implica la inoculación de la leche pretratada con granos de kéfir y después la incubación de la mezcla a unos 23 °C aproximadamente. Transcurridas unas 20 horas los granos se separan de la leche por filtración y se lavan cuidadosamente en agua fría antes de volver a emplearlos. La leche restante constituye el iniciador final para la fermentación a escala comercial y se adiciona a la leche a procesar a una concentración del 3-5%. La incubación final a 23 °C dura unas 20 horas y el kéfir después de enfriado se deja estar varias horas para que "madure". Esta última fase permite la máxima estabilidad del coágulo y la etapa final de envasado debe diseñarse de forma tal que el daño mecánico del producto sea mínimo. Si bien el kéfir es utilizado como bebida refrescante, tiene una viscosidad muy particular que los aficionados al mismo consideran como un factor esencial de buena calidad del producto.

Este cultivo se comporta biológicamente como un organismo vivo. Crece, se multiplica y transmite sus características y estructura a las siguientes generaciones (Esain, 1971).

## **2. Beneficios a la salud por consumo de kéfir.**

Se ha observado en algunos estudios, que niños alimentados con kéfir retenían mayor cantidad de nitrógeno, fósforo, calcio, hierro y grasa que los niños alimentados con leche fresca. El kéfir tiene una tensión de cuajo muy baja; esto quiere decir que el cuajo se fragmenta muy fácilmente en partículas extremadamente pequeñas. El pequeño tamaño de la partícula de cuajada de kéfir facilita su digestión. Por la acción del bacilo del kéfir la caseína es modificada químicamente de manera ligera resultando más digerible. Esta facilidad para ser digerido ha hecho que se recomiende al kéfir como un alimento particularmente benéfico para los niños convalecientes, personas de edad avanzada o con insuficiente actividad digestiva. El kéfir estimula la secreción salival, probablemente a causa de su contenido ácido y escasa cantidad de carbonatos, aumenta la secreción de jugos digestivos en el tracto gastrointestinal y estimula la peristalsis. Por este motivo, ha sido recomendado como alimento postoperatorio, dado que muchas operaciones abdominales van acompañadas del cese temporal de la peristalsis y de dolores motivados por gases. Un importante bacteriólogo lácteo danés, el doctor Orla-Jensen, expresó su opinión de que el kéfir tenía mayor valor nutritivo que el yogurt, debido a su abundancia en células digeridas de levaduras y de un efecto benéfico sobre la flora intestinal. El kéfir es laxante, y en Alemania y en Ex-Unión Soviética, se utiliza ampliamente en casos de estreñimiento crónico.

Las semillas de kéfir se pueden conseguir bajo diferentes formas: mantenidas en leche, congeladas o liofilizadas. Se pueden utilizar para preparar gran variedad de fermentos como crema casera, queso de kéfir casero, refresco de kéfir para verano, batido de kéfir, sopa de kéfir, sorbete de kéfir, postre rápido de kéfir, manzana asadas con kéfir, Aliño para macedonia de frutas o salsa de kéfir .

Como puede advertirse la microbiología del kéfir no se encuentra bien establecida. De hecho, y debido fundamentalmente al carácter artesanal del producto, no puede evitarse el ingreso ulterior e incorporación de diversos microorganismos tanto bacterias lácticas (BAL) como levaduras a la propia semilla y de ahí al producto.

## **E. EVALUACIÓN SENSORIAL.**

La evaluación sensorial se ocupa de la medición y cuantificación de las características de un producto, ingrediente o modelo, las cuales son percibidas por los sentidos humanos. Entre dichas características se pueden mencionar, por su importancia: apariencia, olor, gusto, textura, sonido. Los métodos de evaluación sensorial fundamentales: sensitivo, cuantitativo, cualitativo y afectivo. Es importante observar que los tres primeros son pruebas de tipo analítico que deben efectuarse en laboratorios, ejecutados por jueces entrenados, mientras que el último es una prueba de consumidor, la cual se lleva a cabo con individuos representantes de quienes finalmente se empleará el producto. De esta manera existen las pruebas de tipo afectiva que son al nivel consumidor, para comprender la importancia de las propiedades sensoriales de aceptación-rechazo, así como

de preferencia o rango y nivel de agrado, en relación con los atributos del mismo producto. Entre dichos atributos se puede mencionar, además de la aceptabilidad sensorial : precio, empaque, publicidad, valor nutritivo, etcétera. Por lo que en este trabajo se tomaron en cuenta dos tipos de prueba afectivas las cuales son la prueba de preferencia o de rango y la de nivel de agrado.

### **1. Prueba de rango.**

Este tipo de prueba tiene por objetivo, ordenar según las opiniones de un grupo de consumidores, un par o una serie de muestras de acuerdo con un aprecio personal o una preferencia. Las oraciones que ejemplifican esta prueba son: a) Ordenar, de izquierda a derecha, las muestras que se presentan, desde la que menos se prefiera hasta la que más se prefiera. b) Indique en secuencia numerada (del 1 al 3) el orden de menor a mayor preferencia.

Las muestras que se manejan son por lo menos un par o, si no, una serie de muestras que serán objeto de un arreglo por el juez-afectivo, según su preferencia. De acuerdo con el objetivo de la evaluación sensorial, las muestras no necesariamente deben ser homogéneas, una prueba afectiva permite que se comparen peras con manzanas. El mínimo de muestras que deben ser evaluadas por sesión se determina por la naturaleza del estímulo, el tipo de consumidor e incluso la ambientación en la que dicha prueba se desarrolle.

El tipo de juez-afectivo, en la población elegida para la evaluación debe corresponder a los consumidores potenciales o habituales del producto en estudio. Estas personas no deben conocer la problemática del estudio, sino sólo entender el procedimiento de la prueba y responder a ella.

El análisis de datos se expresa por medio del análisis de ordenamiento por rangos.

### **2. Prueba de nivel de agrado.**

El objetivo de esta prueba es localizar el nivel de agrado o desagrado que provoca una muestra específica. Se utiliza una escala no estructurada (también llamada escala hedónica), sin mayores descriptores que los extremos de la escala, en los cuales se puntualiza las características de agrado. Esta escala debe contar con un indicador del punto medio, a fin de facilitar al juez consumidor la localización de un punto de indiferencia a la muestra.

Las muestras que se presentan pueden ser una o más, según la naturaleza del estímulo, para que cada una se ubique por separado en la escala hedónica. Es recomendable que estas muestras se presenten como un consumidor las confrontaría habitualmente.

El análisis de datos: La escala hedónica se convierte en numérica transformando a centímetros la distancia entre dos extremos del continuo, y midiendo el punto de respuesta indicado por el consumidor. Cuando se trate de dos o más productos, las calificaciones de la prueba hedónica se tabulan por juez-consumidor (filas) y por producto (columnas), totalizando la sumatoria de cada columna y cada fila para obtener un gran total. Para analizar (comparar) dos productos se recomienda utilizar a t de Student, y al tratarse de tres o más productos es necesario aplicar el análisis de varianza (Pedrero, 1989).

## V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

### HIPÓTESIS.

Es posible formular un producto fermentado de soya, sin la utilización de otras fuentes de carbono, con buena calidad química, nutrimental y organoléptica.

### OBJETIVOS.

#### OBJETIVO GENERAL

Elaborar un *sogurt* utilizando la leche de soya como único sustrato y dos diferentes cultivos: 1) cultivo comercial, constituido por *S. thermophilus*, *L. delbrueckii lactis subsp.* y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (S.C) y 2) Gránulos de *kéfir*, constituidos por *Leuconostoc subsp.*, *Lactobacillus subsp* y *Saccharomyces unisporus* (S.B) y evaluar sus propiedades químicas, nutrimentales y organolépticas.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar la capacidad de utilización del sustrato por el cultivo iniciador comercial (*S. Thermophilus* y *L. Bulgaricus*) y los búlgaros caseros (mezcla de levaduras y bacterias lácticas), mediante la evaluación de sus actividades lipolíticas y proteolíticas, así como el desarrollo de acidez.
- 2) Realizar el análisis proximal de los dos productos, que incluye proteína, grasa, fibra, cenizas y humedad.
- 3) Evaluar la calidad de la proteína de los dos productos obtenidos, en base a la utilización neta de la proteína (UNP).
- 4) Realizar la evaluación sensorial utilizando la prueba de rango y de nivel de agrado de los dos productos, comparando contra un *yogurt* de leche de vaca.

## VI. METODOLOGÍA.

### A. PREPARACIÓN DE LA 'LECHE' DE SOYA.

#### A.1. Materia prima:

##### A.1.1. Variedad de soya cajeme.

En este estudio se trabajó con el frijol de soya entero variedad cajeme, que proviene de una cruce que se hizo en 1961 en el Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO), entre la línea N-44-92 x Lee. Su ciclo vegetativo es de 120 - 150 días presenta una altura de planta de 90 cm y altura de la primera vaina de 15 cm., su flor morada y pubescencia café, es resistente al acañe y al desgrané y tolera el amacollamiento en suelos pesados con mal drenaje, su siembra se sugiere para los ciclos de verano e invierno, donada por la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Rural (SDAYR) del estado de Guanajuato, de la siembra de verano del 16 de junio - 5 de julio, cosecha octubre de 1998.

##### A.1.2. Características del cultivo iniciador.

###### Gránulos de kéfir.

La semilla que se utilizó fue donada por la M. en C. Guadalupe Zanella Vargas del Posgrado en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), quien la caracterizó observando variabilidad en la longitud de los bacilos; algunos bacilos cortos y delgados de aproximadamente 3 micras de longitud muy semejantes a los anteriores, no empalizados; no muestran granulación. Otros bacilos rectos y escasas cadenas con no más de 9 unidades. Levaduras pequeñas y alargadas frecuentemente en gemación. Cocos aislados y diplococos.

El tipo de bacterias y levaduras que contiene son:

- *Leuconostoc*.
- *Lactobacillus*: tanto homofermentativos y heterofermentativos.
- Levaduras: *Saccharomyces unisporus*.

###### Características físicas:

El color que poseen es un blanco cremoso, con un tamaño del grano de 1 a 3 cm, y un aspecto de coliflor. (Zanella, 1998).

##### A.1.3. Cultivo comercial (MY - 800).

El tipo de cultivo comercial que se utilizó contiene 3 tipos de bacterias:

- Streptococcus thermophilus*.
- Lactobacillus delbrueckii* subpoblación *Lactis*.
- Lactobacillus delbrueckii* subpoblación *Bulgaricus*.

En presentación de 10 unidades para inocular 125 litros de leche de vaca. Marca comercial EZAL.

## **A.2. Procedimiento de preparación de la leche de soya.**

- \* El frijol de soya se remojó durante toda la noche en una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 0.5 % en una proporción de 1:3, soya: solución con agua potable.
- \* Posteriormente se eliminó el agua de remojo.
- \* El frijol de soya se sometió a ebullición por 30 minutos en una solución de agua potable con  $\text{NaHCO}_3$  al 0.5% en una proporción (1:3).
- \* Se enjuagó con suficiente agua y se le quitó la cáscara.
- \* Se molió en una licuadora Osterizer de 3 a 5 minutos agregando poca agua. Se pasó por una coladera de paso fino, y el residuo sobrante se volvió a moler por 5 minutos.
- \* Posteriormente la leche de soya se pasó por una mantilla para eliminar las partículas grandes.
- \* Se dejó enfriar y se ajustó el pH de 6.8 a 7.2, utilizando HCl (ácido clorhídrico) 1 N ó NaOH (hidróxido de sodio) 0.1 N.
- \* Se calentó la lechada a 93 ° C o a temperatura de ebullición por 15 minutos.
- \* De los 100 gramos de frijol iniciales se obtuvieron 300 mililitros de leche de soya (Nelson y col, 1976).

## **B. PREPARACIÓN DEL SOGURT.**

- \* Se preparó la leche de soya con 10 % de sólidos totales.
- \* Se llevó a 45 ° C y se agregó el cultivo al 8 %, ya sea cultivo comercial (MY - 800) o gránulos de kéfir.
- \* Se incubó a 45 °C y se monitoreo el desarrollo de la acidez a intervalos de 1 hora.
- \* Posteriormente se detuvo la fermentación hasta alcanzar una acidez aceptable 60 a 65 °D (calculando la acidez Dornic como se indica en el punto C.1).
- \* Se almacenó en refrigeración (Navarrete, 1990).

## C. EVALUACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DEL SUSTRATO.

### C.1. Utilización de carbohidratos.

La utilización de carbohidratos se evaluó mediante la producción de acidez (Método 947.05 AOAC) atribuible a la fermentación láctica.

Se midió o pesó una cantidad adecuada de yogurt de soya (20 ml o 20g) en un matraz EM de 250 ml y se diluyó con dos volúmenes de agua libre de CO<sub>2</sub>. Se agregaron 2 ml de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.1 N hasta el primer viraje rosa persistente o bien por medio del potenciómetro (calibrado) para detener la titulación cuando se alcance una lectura estable de pH de 8.3. Se reportó la acidez en grados Dornic (°D), que expresan el contenido de ácido láctico de la leche. La acidez Dornic, se expresa como porcentaje de ácido láctico por peso de muestra (1 ml de NaOH 0.1N = 0.0090 g de ácido láctico). Los resultados también se pueden expresar como ml de NaOH 0.1N/100g de muestra.

### C.2. Actividad proteolítica. Método de enlace de pigmento orange-G.

Se secó el pigmento en una estufa a 110 °C hasta peso constante. Se pesó 1 g del pigmento junto con 21 g de ácido cítrico, se agregaron 2.5 ml de una solución de timol al 10% en alcohol, se disolvió y aforó hasta 1 litro con agua destilada. El pH de esta solución deberá ser de  $2.0 \pm 0.2$ .

Se colocaron 20 ml de la solución anterior en un vaso de precipitados y se adicionó 1 ml de la muestra, se mezcló y se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente. Se proceso de la misma manera un blanco con 1 ml de agua destilada y 20 ml de solución. Después del período de incubación se filtró la muestra y el blanco y se diluyeron en razón de 1:50 con agua destilada. Para el cálculo de la actividad proteolítica se utilizó el siguiente método:

#### Método de Dolby:

Los filtrados se leen al espectrofotómetro utilizando agua destilada para el cero del aparato. Se miden las absorbancias de la muestra y el blanco y se calcula la diferencia entre el blanco (representa el pigmento total, en solución) y la muestra (representa el pigmento no enlazado, que permanece en solución). Esta diferencia es equivalente al pigmento enlazado por las proteínas de la muestra. El contenido de proteína se calcula a partir de una curva estándar.

La curva estándar es una gráfica de las diferencias de absorbancia entre el blanco y una serie de muestras con diferentes contenidos de proteína (Ab-Am), contra la concentración de proteína de cada una de las muestras. Se utilizó yogurt de soya, iniciando con 1 g de yogurt de soya y diluciones preparadas con 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5 y 0.4 g, ajustando el volumen total a 1 ml con agua destilada. El contenido de proteína del yogurt de soya se evalúa con el método microKjeldahl, utilizando el factor de 5.71 (Angeles, 1971).

$$\text{Índice de Proteólisis} = \frac{PO - P1}{PO} \times 100$$

donde:

PO = Concentración de proteína a tiempo "0".

P1 = Concentración de proteína después de incubar.

### **C.3. Actividad lipolítica.**

#### **C.3.1. Determinación de ácidos grasos libres (A.G.L.) (AOCS, 1975).**

Se utilizó aceite extraído de 10 g de yogurt de soya en base seca por el método Soxhlet. El aceite extraído se pesó en un matraz erlenmeyer de 50 ml, se le añadieron 5 ml de alcohol etílico (95%) neutralizado caliente (baño maría), se valoró la solución con hidróxido de sodio 0.01 N agitando vigorosamente hasta la aparición de color rosa permanente de la misma intensidad que el alcohol neutralizado antes de la adición de la muestra. , asegurando que el color permaneciera 30 segundos. Los valores obtenidos se reportan como porcentaje de ácidos grasos libres (como oleico) y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácidos Grasos Libres} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N del NaOH} \times \text{Eq. Q. (282)}}{\text{Gramos de muestra}} \times 100.$$

#### **C.3.2. Cálculo de la actividad lipolítica.**

La actividad lipolítica se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad lipolítica} = \frac{[(A.G.L. t1 - A.G.L. t0)]}{(A.G.L. t0)} \times 100$$

donde:

t0 : Antes de la incubación.

t1 : Después de la incubación.

## D. ANÁLISIS PROXIMAL DEL YOGURT DE SOYA.

### D.1. Sólidos totales. Método 925.23 A. IDF-ISO-AOAC

Se pesó de 2.5-3.0 g de muestra en una cápsula de platino de fondo plano de 5 o más cm de diámetro (peso inicial). Se calentó en un baño de agua 10-15 minutos, aprovechando toda la superficie de exposición de la cápsula. Se calentó durante 3 horas en un horno con circulación de aire a 98-100 °C. Se enfrió en un desecador, se pesó rápidamente (peso final) y el residuo se reportó como sólidos totales.

% de sólidos totales =  $\frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso real de la muestra.}}$  X 100

Peso real de la muestra.

\* Otra opción que se utilizó fue por medio de la termobalanza a 150°C durante 30 minutos.

### D.2. Cenizas. Método 945.56 AOAC.

Se pesaron 5 g de muestra en una cápsula de platino y se evaporó a sequedad en un baño de agua. Se incineró en una mufla a 550 ° C o más hasta obtener cenizas libres de nitrógeno. Se enfrió en desecador, se pesó y se calculó el porcentaje de cenizas.

### D.3. Nitrógeno total. Método 920.105 AOAC

Se pesó 0.3 g de muestra en el tubo de digestión. Se adicionaron 5 g de mezcla catalítica de selenio y 12 ml de ácido sulfúrico concentrado en posición inclinada y se calentó ligeramente hasta que cesó la formación de espuma (si es necesario, se agregan pequeñas cantidades de parafina para reducir la formación de espuma); se digiere la muestra hasta obtener una solución clara y se continuó calentando 30 minutos o más, se dejó enfriar y se agregaron 40 ml de agua destilada y 50 ml de NaOH al 50 % y se destiló. Se recibió el destilado en un matraz erlenmeyer (EM) de 250 ml con 25 ml de una solución de ácido bórico al 4% con verde de bromocresol y rojo de metilo como indicadores. Se destiló un volumen de 150 ml o más. Se tituló el destilado con ácido clorhídrico 0.05 M hasta un color rojo-rosa y se anotan los ml gastados y se sustituyen en la siguiente ecuación:

% de Nitrógeno =  $\frac{14.01 \times \text{ml de ácido titulante} \times \text{molaridad del ácido.}}{\text{Peso de la muestra en gramos} \times 10}$

Peso de la muestra en gramos X 10

% de Proteína = Porcentaje de Nitrógeno X Factor de Proteína de soya (5.71).

### D.4. Grasa.

Método Soxhlet.

Se empleó un aparato soxhlet o goldfish para extraer la grasa de aproximadamente 2 g de muestra seca con éter dietílico anhidro o hexano en un dedal de papel filtro que permita el paso rápido del disolvente. El tiempo de

extracción puede variar desde 4 horas a velocidad de condensación de 5 a 6 gotas por segundo, hasta 16 horas, 2 a 3 gotas por segundo. Se recuperó el éter y se evaporó el éter residual sobre baño maría en lugar bien ventilado, se secó el residuo a 100 °C durante 30 minutos, se enfrió y se pesó.

#### **D.5. Determinación de fibra cruda.**

Este método cuantifica las sustancias resistentes a la digestión ácida y alcalina de la muestra.

##### Material y reactivos:

Solución 0.255 N de  $H_2SO_4$  (1.25g  $H_2SO_4$ /100 ml agua).

Solución 0.313 N de NaOH (1.25% en agua libre de carbonatos).

Preparación del asbesto. Se calienta a 600 °C por 16 horas, asbesto de fibra media o larga. Se hierve 30 minutos con la solución de  $H_2SO_4$ , se filtra y se lava una vez con solución de  $H_2SO_4$ , seguido de abundante agua, se seca y se calcina 2 horas a 600 °C. El asbesto lavado con ácido comercial es adecuado y no necesita preparación.

Alcohol metílico o etílico.

Antiespumante. "Down Corning Antifoam A" diluido 1+ 4 con éter de petróleo o emulsionado con agua en la misma porción.

Fragmentos de porcelana u otro material apropiado para regular la ebullición.

##### Digestión ácida:

Se pesó con exactitud aprox. 2 g de muestra seca extraída con éter etílico y se transfirió a un vaso de precipitado de 600 ml. Si la muestra original contiene menos del 1% de grasa, la extracción se puede omitir.

Se añadió aprox. 1 g de asbesto, 200 ml de solución sulfúrica hirviendo y una gota de solución antiespumante. Si se desea también puede introducirse algunos gránulos para regular la ebullición (estos dos últimos pasos se pueden omitir). Se colocó inmediatamente el vaso en el digestor precalentado y se hirvió exactamente por 30 min.

Se filtró el contenido del vaso a través de una capa delgada de asbesto en un crisol de Gooch y se lavó con 4 porciones de agua hirviendo de 50 ml c/u. El filtrado también puede llevarse a cabo sobre embudos tipo Buchner cubiertos con un círculo de alguna tela resistente o de tela de alambre de malla del No. 200. Los embudos tipo Oklahoma o California son adecuados.

##### Digestión alcalina:

Se transfiere el residuo de la filtración anterior al mismo vaso de precipitado, se agregan 200 ml de solución de NaOH hirviendo y se hierve exactamente por 30 min.

78.90 %, aceite de maíz 5 %, alfa celulosa 2 %, vitaminas y minerales 1.1 %, glucosa 15 %) y a los dos grupos restantes de 10 ratas cada uno con las dietas problema (glucosa 15 %, almidón de maíz 62.95 %, aceite de maíz 4.89 %, alfa celulosa 1.50 %, vitaminas y minerales 1.1 % y proteína 10 %). Se proporcionó agua y alimento a voluntad. Las dietas en polvo previamente equilibradas a humedad ambiental se proporcionaron en pequeñas cantidades pesadas para evitar desperdicios. El peso del alimento consumido se registró todos los días y la ganancia de peso de los animales dos veces por semana.

Al final de los 10 días experimentales se sacrificó a los animales con éter etílico o cloroformo. Se abrieron de la cabeza, tórax y abdomen con bisturí y tijeras para facilitar el secado. El secado se llevó a cabo colocando los cadáveres en pequeñas charolas de papel aluminio, en estufa de aire forzado a 105 ° C por 48 horas. Se pesó el contenido de las charolas y se calculó el agua y la materia seca corporal.

Los cadáveres secos se molieron en una licuadora osterizer por 5 minutos. Y se almacenó el residuo seco en un desecador hasta su análisis. Se separó el alimento que haya sobre las heces y junto con el alimento restante en los comederos se secó y se pesó. Se determinó la humedad al alimento para calcular el consumo en base seca.

Se determinó el nitrógeno en las heces y las dietas por el método Kjeldhal.

La utilización neta de la proteína se calcula con la siguiente ecuación:

$$NPU = \frac{N_p - N_c + I_c}{I}$$

donde:

$N_p$  = Nitrógeno corporal, en base seca, de los animales alimentados con la dieta problema.

$N_c$  = Nitrógeno corporal, en base seca, de los animales alimentados con la dieta control, libre de proteína.

$I_c$  = Nitrógeno ingerido, en base seca, por los animales alimentados con la dieta control, libre de proteína.

$I$  = Nitrógeno ingerido, en base seca, por los animales alimentados con la dieta problema.

Todas las dietas se estudian por duplicado con distintos grupos de ratas en diferentes tiempos, si las diferencias son mayores de 0.04, hay que hacer una tercera repetición. Los resultados se rechazan si las curvas de evolución de peso son quebradas.

Las dietas deben reunir los requerimientos nutrimentales de los animales y tener una composición muy parecida, con objeto de no tener diferencias por deficiencias en otros nutrimentos además de la proteína.

## F. EVALUACIÓN SENSORIAL DEL YOGURT DE SOYA.

### F.1. Selección de jueces consumidores.

Esta evaluación se realizó con jueces consumidores los cuales se eligieron por medio de un cuestionario que a continuación se describe y de esta manera se realizaron las pruebas de rango y de nivel de agrado:

NOMBRE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_

ESCOLARIDAD MAXIMA: \_\_\_\_\_

¿ Padece alguna enfermedad que pueda afectar sus sentidos ?

¿ Con que frecuencia? \_\_\_\_\_

HÁBITOS:

¿ Fuma?

SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_ cuantos / día: \_\_\_\_\_

HORARIO DE CLASES: \_\_\_\_\_

HORARIO DE ALIMENTOS:

Désayuno: \_\_\_\_\_ Comida: \_\_\_\_\_ Cena: \_\_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_\_

Indique que alimentos le causan intolerancia, alergia o desagrado.

Queso(especifique) \_\_\_\_\_

Soya \_\_\_\_\_

Chocolate \_\_\_\_\_

Huevo \_\_\_\_\_

Fruta(especifique) \_\_\_\_\_

Leche \_\_\_\_\_

Verdura(especifique) \_\_\_\_\_

Yogurt \_\_\_\_\_

Carne (especifique) \_\_\_\_\_

\* Indique si tiene o lleva una dieta especial.

Diabetes \_\_\_\_\_

Baja en sal \_\_\_\_\_

Alta en calorías \_\_\_\_\_

Baja en calorías \_\_\_\_\_

Otra (especifique)\_\_\_\_\_

¿Estaría dispuesto a participar en degustaciones de alimentos ?

SI\_\_\_\_\_ NO\_\_\_\_\_

#### FIRMA DE ACEPTACIÓN

Posteriormente se les indicó el día de la prueba de degustación y de esta forma se asignó el número de cada juez de acuerdo al orden de llegada o de inicio de la prueba.

El orden de los productos se ofreció al azar, es decir, no siempre fue el mismo orden de evaluación de los productos.

A continuación en el cuadro 6. se describe orden de degustación de las muestras para la prueba de rango.

**Cuadro 6.** Orden de presentación de muestras para la prueba de rango (con y sin azúcar).

No. Juez	1a.	2a.	3a.	No. Juez	1a.	2a.	3a.
1	C	B	A	26	B	A	C
2	A	C	B	27	B	A	C
3	A	B	C	28	B	C	A
4	A	B	C	29	B	A	C
5	B	A	C	30	A	C	B
6	A	C	B	31	B	C	A
7	B	C	A	32	B	A	C
8	A	C	B	33	A	C	B
9	B	A	C	34	A	B	C
10	B	A	C	35	B	A	C
11	A	C	B	36	C	A	B
12	C	A	B	37	A	C	B
13	C	A	B	38	C	A	B
14	B	A	C	39	A	B	C
15	C	B	A	40	C	B	A
16	A	C	B	41	C	B	A
17	B	C	A	42	C	B	A
18	A	B	C	43	C	A	B
19	A	B	C	44	A	B	C
20	A	C	B	45	A	B	C
21	B	C	A	46	A	B	C
22	B	A	C	47	A	C	B
23	A	C	B	48	B	A	C
24	A	B	C	49	C	A	B
25	B	A	C	50	C	B	A

Donde

Muestra A = Yogurt natural de leche de vaca (Y.A).

Muestra B = Sogurt incubado con gránulos de kéfir (S.B).

Muestra C = Sogurt incubado con cultivo comercial (S.C).

## F.2. Prueba de rango.

Los yogurtes se almacenaron a 4°C por 10 hr antes de servir. Todas las muestras se sirvieron en vasos de plástico, y se agregó colorante artificial amarillo para uniformar todas las muestras y de esta manera el color no influya en la evaluación. Las muestras se etiquetaron con códigos desconocidos usando letras al azar.

Las instrucciones y pruebas en el panel sensorial se llevaron a cabo en una habitación. Se usaron cabinas divididas, bien iluminadas. Se dejó disponible para el panelista, una copa para espectorar, una copa con agua destilada y cucharas de plástico.

Se abasteció de galletas para cuando sea necesaria ayuda para remover el sabor a frijol, entre cada degustación (Buono y col., 1990).

### HOJA DE RESPUESTAS

Nombre: \_\_\_\_\_ No. de juez \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

REGISTRO DE ORDEN DE RANGO		
1	2	3

Escala de Valores:

1. No gusta.                      2. Gusta más o menos.                      3. Gusta más.

NOTA: Las diferentes muestras no pueden obtener la misma calificación.

¿ Le fue difícil asignar el valor a cada muestra ? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

Comentarios y / o sugerencias \_\_\_\_\_

Posteriormente cada juez evaluó las tres muestras y los enumeró progresivamente como 1, 2 o 3 según el grado de aceptación de cada uno. En la tabla se registra, para cada producto, el número de veces que fue evaluado como número 1, 2 o 3 (Pinthong y col., 1980). Es importante mencionar que las tres muestras se dieron a degustar con y sin azúcar (6 %).

Los datos obtenidos de la información de juez-afectivo se analizaron por medio de la prueba de ordenamiento por rangos, que se presentan en el cuadro 14.

### **F.3. Prueba de nivel de agrado.**

Las muestras se dan a los jueces en las mismas condiciones que para la prueba de rango. En este caso, cada uno de los jueces calificará las muestras en alguna de las tres categorías: gusta, indiferente o disgusta (Pinthong y col., 1980). En el cuadro 7 se muestra el orden en que se presentaron las muestras para esta prueba.

**Cuadro 7.** Orden de presentación de muestras para la prueba de nivel de agrado con y sin azúcar.

No. JUEZ	1a.	2a.	3a.	No. JUEZ	1a.	2a.	3a.
1	B	C	A	26	B	A	C
2	C	B	A	27	A	C	B
3	A	B	C	28	A	B	C
4	B	C	A	29	B	C	A
5	A	C	B	30	B	C	A
6	A	B	C	31	B	C	A
7	A	C	B	32	A	C	B
8	B	A	C	33	B	C	A
9	A	C	B	34	C	A	B
10	A	B	C	35	B	A	C
11	A	C	B	36	C	B	A
12	B	A	C	37	C	A	B
13	A	B	C	38	B	C	A
14	C	B	A	39	A	C	B
15	B	A	C	40	C	A	B
16	C	B	A	41	A	B	C
17	C	B	A	42	B	C	A
18	B	A	C	43	A	C	B
19	C	A	B	44	B	C	A
20	A	B	C	45	A	C	B
21	C	B	A	46	B	C	A
22	A	B	C	47	B	C	A
13	C	A	B	48	A	B	C
24	C	A	B	49	C	A	B
25	B	C	A	50	B	C	A

donde:

Muestra A = Yogurt natural de leche de vaca (Y.A).

Muestra B = Sogurt incubado con gránulos de kéfir(S.B).

Muestra C = Sogurt incubado con cultivo comercial (S.C).



## VII. RESULTADOS.

### A. UTILIZACIÓN DEL SUSTRATO.

#### A.1. Acidez.

Los cultivos utilizados en este trabajo MY 800 (C) y gránulos de kéfir (B), fermentaron en diferentes proporciones la leche de soya, dado que el cultivo C desarrolló una acidez promedio de 0.60 % y un pH de 3.5 a las 13 horas de incubación a 45 °C, mientras que el cultivo B mostró una mayor velocidad de producción de ácido, ya que a las ocho horas de incubación a 45 °C llegó a una acidez de 0.62 % y un pH de 3.86, ambos resultados de evolución de acidez se presentan en la figura 2 y en el anexo A.

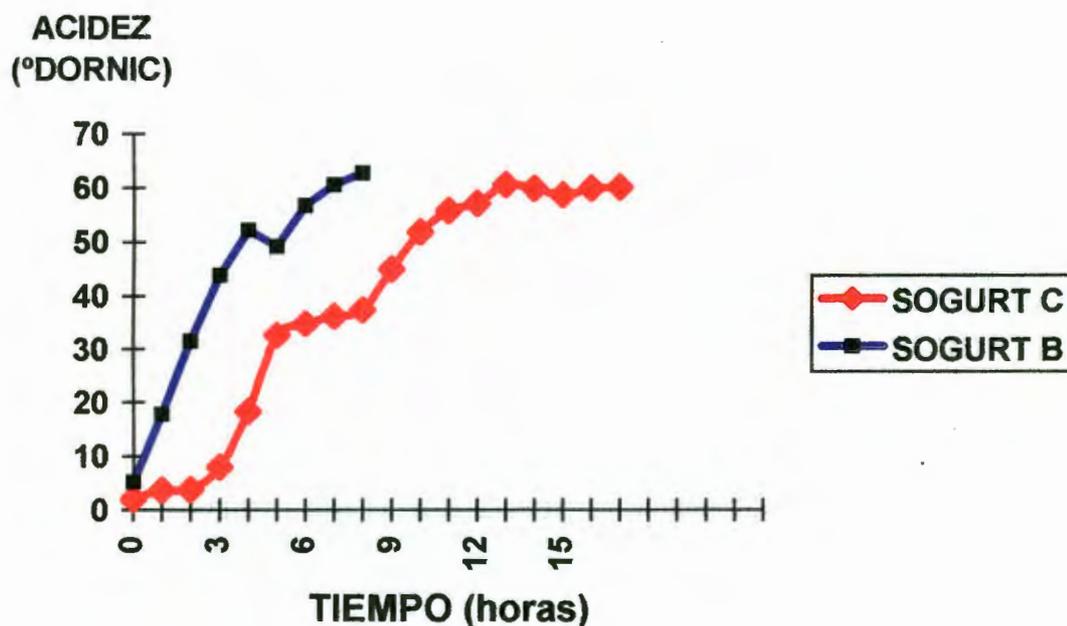


Figura 2. Curva de desarrollo de la acidez de los dos yogur.

#### A.2. Actividad proteolítica.

Para evaluar la actividad proteolítica primero se realizó un barrido espectrofotométrico para encontrar la longitud de onda de máxima absorbancia, el cual se muestra en el anexo B.

Posteriormente se realizó una curva de calibrador utilizando leche de soya previamente analizada por el método Kjeldahl. Con esta curva se calculó la concentración de proteína en el yogur antes y después de la incubación. Los datos de concentración de proteína se muestran en el cuadro 8, el yogur B (S.B)

presentó una concentración de 0.4387 al tiempo cero, mientras que al final de la incubación presentó una concentración de 0.4771. Los resultados para el yogurt C (S.C) fueron de 0.4550 y 0.4382 al tiempo cero y al final de la incubación respectivamente.

**Cuadro 8.** Resultados de las concentraciones de proteína de los yogurtes a tiempo cero y después de la incubación. \*

Tipo de yogurt.	Concentración de Proteína a tiempo cero.	Concentración de Proteína después de la incubación.
Sogurt B.	0.4387 ± 0.0064575	0.4771 ± 0.0133229
Sogurt C.	0.4550 ± 0.0094021	0.4382 ± 0.011113

\* Promedio de 3 preparaciones.

El índice de proteólisis que se presenta en el cuadro 9, indica que para el S.B fue de -8.753 después de ser incubado a 45° C durante 8 horas, lo cual indica que existe una concentración de proteína mayor al final de la incubación y no al inicio como se esperaba, esto se debe probablemente a que los gránulos de Kéfir sintetizan aminoácidos o péptidos a partir de compuestos presentes en la leche de soya. En cuanto al S.C. tuvo un índice de actividad proteolítica de 3.692 después de ser incubado a 45° C durante 17 hrs. Esto muestra que en este yogurt hay hidrólisis mínima de las proteínas presentes en el medio y por consiguiente la liberación de aminoácidos. Estos resultados fueron diferentes estadísticamente con un nivel de confianza del 95 %.

**Cuadro 9.** Resultados de la actividad proteolítica en los dos tipos de yogurt.

Muestra	Preparación 1	Preparación 2	Preparación 3	Promedio ± D. E.
Sogurt B.	- 7.84	- 11.51	- 6.85	- 8.75 ± 2.45
Sogurt C.	3.68	4.74	2.66	3.69 ± 1.04

### A.3. Actividad lipolítica.

La actividad lipolítica para el S. C fue de 121.79, mientras que la del S. B fue de 921.79, en el que mostraron diferencia estadística a un nivel de significancia del 99 %. Es decir el S. B tuvo mayor actividad lipolítica, ya que esto representa la cantidad de ácidos grasos libres en el yogurt después de la incubación, mismos que se representan en el cuadro 10.

**Cuadro 10.** Resultados de Actividad lipolítica de los dos tipos de sogurt después del período de incubación.

Muestra	Promedio $\pm$ D. E.
Sogurt C.	121.79 $\pm$ 79.36 *
Sogurt B.	921.05 $\pm$ 21.05 **

\* Promedio de 4 resultados.

\*\* Promedio de 2 resultados.

La obtención de los promedios para cada tipo de sogurt, se elaboró en base a la aplicación de la prueba Q para rechazo de datos a un nivel de confianza del 90 % (Skoog, 1990).

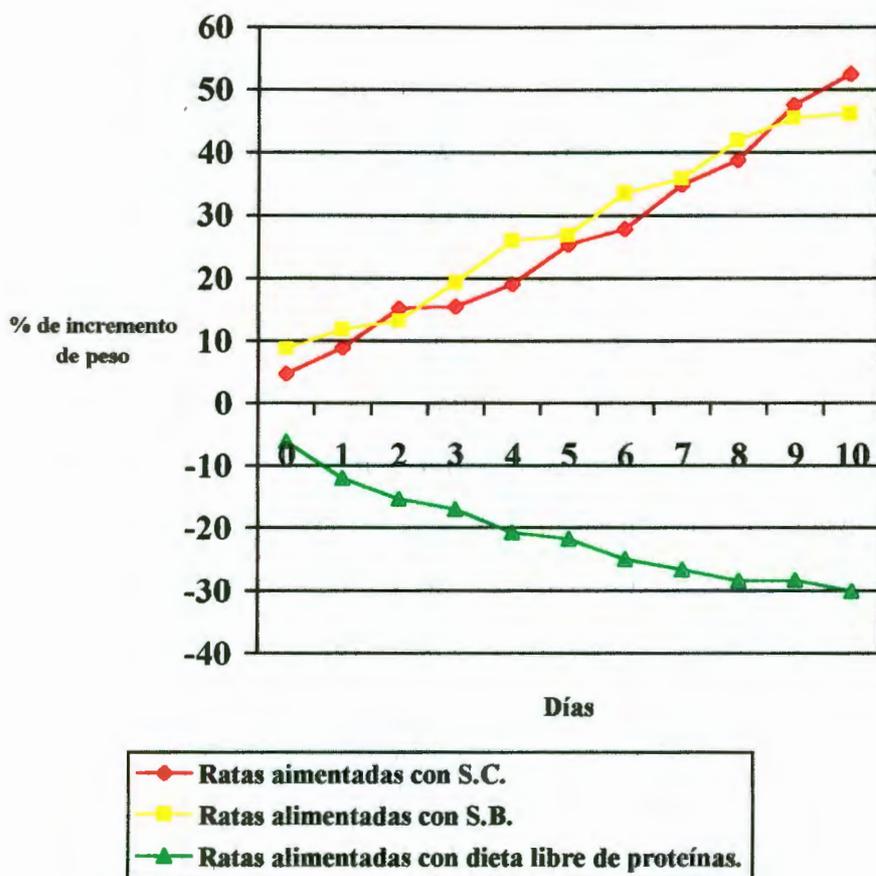
## B. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL.

El análisis químico proximal de los sogures (cuadro 11) mostró los siguientes resultados para el S. B: 3.03 % de proteína, 2.14 de grasa, 4.28 de fibra, 0.08 % de carbohidratos y 0.41% de cenizas. Por su parte, el S. C presentó 3.31 % de proteína, 2.18 de grasa, 3.19 % de fibra, 0.83 % de carbohidratos y 0.39 % de cenizas. Estos resultados son muy parecidos, lo cual no es de extrañar, ya que en todas las repeticiones que se realizaron de la preparación de los yogures se ajustó el contenido de sólidos de la leche de soya a un valor de 10.

**Cuadro 11.** Resultados del análisis proximal en los dos sogures.

	Sogurt B. *		Sogurt C. *	
	Base seca. Prom. $\pm$ D. E.	Base húmeda. Prom. $\pm$ D. E.	Base seca. Prom. $\pm$ D. E.	Base húmeda Prom. $\pm$ D. E.
Proteína	30.56 $\pm$ 1.86	3.03 $\pm$ 0.185	33.47 $\pm$ 1.29	3.31 $\pm$ 0.127
Grasa	21.56 $\pm$ 1.02	2.14 $\pm$ 0.101	22.07 $\pm$ 0.31	2.18 $\pm$ 0.032
Fibra cruda	43.08 $\pm$ 19.30	4.28 $\pm$ 0.185	32.30 $\pm$ 15.14	3.19 $\pm$ 0.127
Cenizas	4.16 $\pm$ 0.55	0.41 $\pm$ 0.055	3.97 $\pm$ 0.16	0.39 $\pm$ 0.017
Carbohidratos	0.64	0.08	8.19	0.83
% Sólidos		9.94 $\pm$ 0.67		9.90 $\pm$ 2.10

\* Promedio de 3 mediciones.



**Figura 3.** Evolución del peso corporal de las ratas del ensayo biológico.

### C. CALIDAD DE LA PROTEINA (UTILIZACIÓN NETA PROTEICA).

En la figura 3 se observa la evolución del peso de las ratas durante el experimento biológico, el cual tuvo una duración de 10 días. Los dos grupos alimentados con sogurt aumentaron igual de peso, mientras que el grupo alimentado con una dieta sin proteína presentó una considerable pérdida de peso, lo cual es normal, dado que éste grupo de ratas no consumió proteínas en su dieta.

La utilización neta proteica obtenida con el grupo de ratas alimentadas con S. C fue de 35.37, mientras que el grupo de ratas alimentadas con S. B presentó

un valor de 60.29 (cuadro 12). Es importante señalar que los datos que se presentan corresponden a la primera repetición del experimento. Se realizó una segunda repetición que arrojó resultados inconsistentes con los cuales no fue posible calcular los valores de UNP, probablemente, esto se puede atribuir a que no fue posible formar los grupos de ratas con los rangos de diferencia de peso recomendados.

**Cuadro 12.** Valores de UNP obtenidos en el ensayo biológico

Sogurt C	Sogurt B
40.81	59.14
26.15	66.34
31.37	58.44
35.14	62.48
43.40	55.03
Promedio: 35.37 ± 6.9845	Promedio: 60.29 ± 4.2955

## D. EVALUACION SENSORIAL.

### D.1. Prueba de rango.

#### D.1.1. Prueba de rango en yogurt de soya sin azúcar.

En el cuadro 13 se muestran el número de puntuaciones obtenidas en las que cada juez asignó a cada muestra los valores de 1, 2 y 3, correspondientes a 1 igual a no gusta, 2 a gusta más o menos y 3 gusta más. Es decir el yogurt A que fue utilizado como control obtuvo 30 puntuaciones que lo asignaron como el número 3, mientras que el S.C presentó 25 puntuaciones como gusta más o menos y por último el que no gustó fue el S. B con 21 puntuaciones.

**Cuadro 13.** Puntuación obtenida por las diferentes muestras sin azúcar en la prueba de rango.

Muestras	REGISTRO DE RANGO		
	1	2	3
Yogurt A	9	2	30
Sogurt B	21	14	6
Sogurt C	11	25	5

### Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con la prueba de ordenamiento por rangos, calculando el valor absoluto de las diferencias de las puntuaciones totales para cada pareja de comparaciones posibles (A:B, A:C y B:C). Los valores absolutos obtenidos se compararon con el valor crítico obtenido de anexo C, de donde se obtiene que para 41 jueces y 3 muestras, la diferencia absoluta crítica es de 22 para un nivel de significancia (N.S.) del 5 %.

$$|A - B| = |103 - 67| = 36$$

$$|A - C| = |103 - 76| = 27$$

$$|B - C| = |167 - 76| = 9$$

$$\text{Valor crítico (N.S. 5 \%)} = 22$$

$$|A - B| = 36 > 22.$$

$$|A - C| = 27 > 22.$$

$$|B - C| = 9 < 22.$$

Estos datos nos indican que la muestra A (yogurt A) es mejor que las muestras B (sogurt B) y C (sogurt C), mientras que las muestras B y C son iguales estadísticamente.

#### D.1.2. Prueba de orden de rango en yogurt de soya con azúcar (6 %).

El cuadro 14 muestra la puntuación de los jueces para cada tipo de yogurt, es decir, el Y. A tuvo la mayor puntuación de 27, para ser considerado como 3, el S. C presentó 23 puntuaciones que lo asignaron como 2 y al S. B obtuvo 24 evaluaciones de no gusta.

**Cuadro 14.** Puntuación obtenida por las diferentes muestras con azúcar en la prueba de rango.

REGISTRO DE ORDEN DE RANGO			
Muestra	1	2	3
Yogurt A	1	1	27
Sogurt B	24	5	-
Sogurt C	4	23	2

## **Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó con la prueba de ordenamiento por rangos, calculando el valor absoluto de las diferencias de las puntuaciones totales para cada pareja de comparaciones posibles (A:B, A:C y B:C). Los valores absolutos obtenidos se compararon con el valor crítico obtenido del anexo C, de donde se obtiene que para 29 jueces y 3 muestras, la diferencia absoluta crítica es de 18 para un nivel de significancia del 5 %.

$$|A - B| = |84 - 34| = 50$$

$$|A - C| = |84 - 56| = 28$$

$$|B - C| = |34 - 56| = 22$$

$$\text{Valor crítico (N.S. 5 \%)} = 18$$

$$|A - B| = 50 > 18.$$

$$|A - C| = 28 > 18.$$

$$|B - C| = 22 > 18.$$

Entonces la muestra A es mejor que las muestras B y C. Mientras que si comparamos las muestras B y C son diferentes con un nivel de significancia del 95 % en muestras con azúcar.

## **D.2. Evaluación sensorial con la prueba de nivel de agrado.**

En la prueba de nivel de agrado se compararon los dos soguees con un yogurt natural comercial y además, se compararon los tres productos con y sin azúcar. Como se observa en el cuadro 15, hubo una completa separación entre los productos sin azúcar y aquellos a los cuales se les agregó este edulcorante. Los tres productos sin azúcar fueron iguales estadísticamente, pero al agregarles azúcar obtuvieron una mayor calificación y se separaron estadísticamente, logrando una mayor calificación el yogurt A con una calificación de 2.75. En cuanto a los productos de soya, fue el S. B. el que logró la mayor calificación con un valor de 1.06. Es importante resaltar que los tres productos sin azúcar presentaron calificaciones negativas, situación que se revirtió al agregarles el azúcar.

**Cuadro 15.** Resultados de la prueba de nivel de agrado.

Muestra	Calificación (Promedio $\pm$ D. E).	
Sogurt C sin azúcar	-1.47 $\pm$ 0.45	a
Sogurt B sin azúcar	-1.19 $\pm$ 0.51	a
Yogurt A sin azúcar	-0.28 $\pm$ 0.50	ab
Sogurt C con azúcar	0.63 $\pm$ 0.39	bc
Sogurt B con azúcar	1.06 $\pm$ 0.42	c
Yogurt A con azúcar	2.75 $\pm$ 0.41	d

Al realizar el análisis estadístico de la varianza se comprueba que existe diferencia significativa de 0.001 entre y dentro de los grupos de yogurt con leche de vaca, S. C y S. B, al ser evaluados con y sin azúcar.

**Cuadro 16.** Resultados del análisis de varianza en la prueba de nivel de agrado en los tres productos con y sin azúcar.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	Nivel de significancia
Entre grupos	395.31	5	79.06	12.268	< 0.001
Dentro de grupos	1198.69	186	6.44	12.268	< 0.001

## VIII. DISCUSIÓN.

### A. Utilización de sustrato.

#### A. 1. Acidez.

Al hacer referencia a estudios realizados por otros autores, tenemos que Karleskind (1991) reportó una acidez titulable de 0.65 a 0.77 % en formulaciones a base de leche de soya, adicionada con proteína aislada de soya y suero de leche concentrado, incubando con *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* durante 14 hrs. De aquí inferimos que este autor utiliza el suero concentrado para favorecer el desarrollo de acidez. Por otra parte, Cheng y col. (1990) adicionaron con lactosa la leche de soya para mejorar la acidez, obteniendo un valor de 1.86 %, a diferencia del valor de 1.21 % obtenido en el yogurt sin adición de lactosa, ambas preparaciones se incubaron con cultivos de *S. thermophilus* y *L. casei* al 2 % durante 18 horas a 30 °C.

De esta manera debido a que la leche de soya no provee de los nutrimentos esenciales para el crecimiento de bacterias ácido lácticas y con ello la producción de ácido láctico, diferentes autores recomiendan el uso de caseinato para favorecer la acidez (Karleskind y col., 1991). Así mismo, se han utilizado diferentes ingredientes para desarrollar la acidez, tal como proteína concentrada del suero o bien leche en polvo descremada, obteniendo valores de 1.00 a 1.19 % y pH de 4.0 a 4.2, a partir de la incubación de la leche de soya con *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* al 1% durante 16 horas a 37 °C (Cheng, 1990). Dado que al ajustar la concentración con proteína de suero concentrada y leche en polvo descremada en las formulaciones de yogurt a base de leche de soya se provee una concentración de lactosa similar a la de leche de vaca, con ello las bacterias lácticas producen ácido láctico en cantidades similares a las obtenidas en los yogures comerciales. Aunque también cabe mencionar que azúcares como rafinosa y estaquiosa u otros compuestos presentes en la leche de soya pueden inhibir el crecimiento y producción de ácido en el yogurt (Lee, 1990).

Sin embargo, no solamente se han utilizado este tipo de sustratos, también se ha empleado extracto de levadura al 0.1 % (m/v) desarrollando una acidez de 0.8 % (pH 3.8) después de la incubación a 43 °C durante 24 horas con *L. bulgaricus* (Pinthong, 1980).

De tal manera, las investigaciones hasta ahora reportadas en la literatura utilizan la leche de soya además de otro tipo de sustratos para favorecer la acidez, tales como caseinato (Karleskind y col., 1991), proteína concentrada del suero o leche descremada (Lee, 1990), extracto de levadura y glucosa (Pinthong y col., 1980).

Además utilizan como cultivos *L. bulgaricus* (Pinthong, 1980), *S. thermophilus* y *L. casei* (Cheng y col., 1990), *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* (Karleskind y col., 1991), obteniendo con ello resultados favorables en cuanto a la acidez.

En esta investigación se utilizó únicamente la leche de soya junto con el cultivo

comercial (S. C) o con la cepa de kéfir (S. B), para desarrollar la acidez deseada de 0.6 % sin la adición de algún otro sustrato. Además en experimentos realizados con la cepa de kéfir aquí utilizada, ésta desarrolló una acidez de 0.6 a 1.3 % después de una fermentación a  $22 \pm 0.5$  °C durante 24 horas en leche entera rehidratada al 13 %, así como un pH de 3.7 a 4.0 (Zanella, 1998). Esto corrobora que la cepa de kéfir desarrolla una acidez similar en la leche de soya que en la desarrollada en la leche de vaca. En la literatura no se reporta la utilización de cepas de kéfir para la fermentación de leche de soya, por lo que este trabajo representa una aportación interesante en esta área de investigación.

## A.2. Actividad proteolítica.

El índice de actividad proteolítica obtenido en el S. C. (MY 800 constituido principalmente por *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*) es de 3.692, el cual es muy semejante al obtenido por Angeles y col. (1970), ellos determinaron la actividad proteolítica por medio del método Dolby al igual que en el presente trabajo, usando varios cultivos entre ellos *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*, los cuales se encuentran presentes en el cultivo comercial (MY 800), obteniendo un índice de actividad proteolítica de 2.6 para *S. thermophilus* y de 5.4 para *L. delbrueckii* en un lapso de fermentación de 1 día, también se menciona que existe relación entre la actividad proteolítica y el pH; ya que se reporta que el pH óptimo para la actividad de las proteinasas en un rango de 6 a 8.5, esto se ve reflejado en el índice de actividad proteolítica obtenido para *S. thermophilus* porque produce más ácido que *L. delbrueckii*, al parecer la producción de ácido inhibe parcialmente la actividad proteolítica. También observaron que sobre los 14 días de prueba obtuvieron un índice de actividad proteolítica de 11.2 para *S. thermophilus* y de 23.9 para *L. delbrueckii*.

## A.3. Actividad lipolítica.

Los resultados del análisis estadístico del cuadro 10, muestra que existe una diferencia estadística significativa entre el sogurt C y el sogurt B a un nivel de significancia de 0.05 %, es decir que los microorganismos presentes en los gránulos de kéfir (*leuconostoc*, *lactobacillus*, *sacaromyces unisporus*) hidrolizan en mayor proporción los triglicéridos dando lugar a una mayor liberación de ácidos grasos libres a diferencia de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* (*subsp. Lactis* y *subsp. bulgaricus*) presentes en el cultivo (MY 800). Al comparar con el estudio realizado por Angeles y col. (1971), utilizando el método de sílica gel en el que se cuantifican los ácidos grasos libres como resultado de la actividad lipolítica de los cultivos lácticos en emulsiones de grasa, utilizando 3 diferentes tipos de microorganismos: dos de ellos *L. delbrueckii* y *S. thermophilus*, utilizados con mayor frecuencia en la elaboración de productos fermentados de leche de soya, así mismo *L. casei* debido a su desarrollo de sabor en quesos cheddar más que en algún otro cultivo láctico, y de esta manera se comparan con los cambios detectados en *Candida lipolítica*. De ello obtienen que *L. casei* y *L. delbrueckii* tuvieron una apreciable actividad lipolítica mientras que *S. thermophilus* fue

comparativamente menor, a partir de la inoculación al 1% en leche de soya preparada por el método descrito por Angeles y col (1971).

Aunque en esta investigación no se menciona el uso de los gránulos de kéfir para la elaboración de productos fermentados de leche de soya, cabe mencionar que se utiliza *S. thermophilus* y *L. delbrueckii*, dichos microorganismos se tienen en la mezcla del cultivo iniciador (MY-800) aquí utilizado, por lo que a diferencia del anterior estudio no podemos suponer cuál de ellos tiene menos actividad lipolítica, pero en base a la investigación anterior en la que utilizan estos mismos microorganismos, podemos decir que el *S. thermophilus* tuvo poca actividad lipolítica y que el *L. delbrueckii* resultó ser el que utiliza en mayor proporción los triglicéridos, aunque el resultado de esta mezcla obtuvo menos actividad lipolítica que en la que se utilizaron los gránulos de kéfir.

## **B. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL (PROTEÍNA, GRASA, FIBRA CRUDA, CENIZAS, CARBOHIDRATOS Y SÓLIDOS TOTALES).**

Dado que los estudios hechos por Karleskind (1991) en yogurt de soya, este elaboró un yogurt con proteína aislada de soya agregando lactosa, sacarosa, aceite de maíz, estabilizador y emulsificador monoglicérido, con el que obtuvo un valor de proteína de 4.6% superior a 2.0% para yogurt de leche de soya adicionando leche descremada en polvo, aunque este último ingrediente no tuvo cierta relevancia, pues no influyó en el valor de proteína de esta preparación.

Al mencionar las tres formulaciones hechas por Lee (1990), con respecto a la proteína, el obtiene un valor de 8.12% en la preparación de yogurt con leche de soya y proteína concentrada del suero, en la segunda incluye tratamiento con carbón activado en la leche de soya más proteína concentrada del suero, obteniendo un valor de 8.30% y en la tercera formulación se agrega leche de soya con tratamiento de carbón activado más leche en polvo descremada, dando como resultado 7.28% de proteína.

En este estudio los ingredientes que se utilizan tienen efecto en el valor proteico de los yogurt de soya, dado que el valor aquí reportado es de 3.31% para el S. C y de 3.03 % para el S. B, es decir valores por debajo de los anteriores, también es necesario mencionar que en este trabajo no se agregó ningún ingrediente para incrementar el contenido de proteína de los productos. Aún así al comparar nuestro resultado con el que reporta un yogurt comercial de 3.5 % de proteína en 100g de alimento, nuestro valor reportado es cercano a este (INNSZ, 1992). Además que aportan un 4 % del requerimiento total de proteína en una dieta de 2000 kcal (cuadro 17), semejante a un yogurt de leche entera.

En cuanto al contenido de grasa del S. C de 2.18 % y de 2.14 % para el S. B, estos son semejantes entre sí. Al comparar con los resultados que se reportan para un yogurt natural de leche entera de 3.3 % (INNSZ, 1992) este último es mayor al aquí obtenido, además que el contenido de ácidos grasos son insaturados de origen vegetal, a diferencia de los de un Y. A. Es de importancia mencionar que si se compara con un yogurt elaborado con leche semidescremada con un porcentaje mínimo de grasa de 1.5 % (NOM, 1986), el

rango de diferencia es menor (0.68) para el yogurt C y del yogurt B de 0.64, por lo que es muy poca la cantidad de grasa que tiene un yogurt en base a lo aquí señalado, así este tipo de productos puede ser una opción más de la alimentación para aquellas personas que presenten problemas de triglicéridos y colesterol elevado, pues ambos yogurt B y C aportan un porcentaje a la Ingesta diaria recomendada (% IDR) del 6 %, mientras que el yogurt A lo hace al 9.3 %.

En un estudio realizado por Karleskind, y col (1991), en el que obtiene valores de 1.83 % para un yogurt con proteína aislada de soya agregando 10 g aceite de maíz, aunque este no influyó en su contenido total de grasa. Al igual que en otra de sus formulaciones de yogurt a base de leche de soya agregando 5 g de aceite de maíz en el que obtuvo un valor de grasa de 1.9 %, aún así estos dos valores son cercanos a los aquí obtenidos, aunque en este caso no hubo la adición de aceite de maíz.

Al referirnos al porcentaje de hidratos de carbono que contienen los yogurt B y C, es de un 0 % a la IDR (cuadro 17), a comparación del yogurt A de 1.6 %, esto es sin la adición de azúcares en el yogurt, por lo que si se consume de esta manera puede ser recomendado para pacientes diabéticos, además que no contiene lactosa por lo que puede ser consumido en aquellos pacientes que presenten intolerancia a este azúcar. En el contenido de fibra de 4.28 % para el S. B y de 3.19 % para el S. C, tenemos que estos valores son significativos, esto se debe a que en un Y. A no contienen fibra (INNSZ, 1992), y en los productos aquí elaborados si la hay, aportando a la IDR 14.3 % el yogurt B y 10.6 % el yogurt C, el tipo de fibra que contienen es del tipo insoluble, por lo ayuda en el aumento de la masa fecal y en la disminución del tiempo de tránsito intestinal. Como consecuencia, esta clase de fibra es de gran ayuda en el estreñimiento (Mahan, 1995).

Los resultados de sólidos totales en el S. C de 9.9% y de 9.94% para el S. B, datos muy parecidos dado que ambas formulaciones fueron preparadas con leche de soya al 10% y que al parecer al dar lugar a la fermentación este contenido de sólidos disminuyó en poca proporción comparado con la concentración inicial de la leche de soya. Resultados similares son reportados por Lee (1990), del yogurt con leche de soya más proteína del suero concentrada con un total de sólidos de 11.49%, así como leche de soya tratada con carbón activado dando un total de sólidos de 10.89% y por último la que incluye lo mismo que la anterior, más leche en polvo descremada con un total de sólidos de 10.62%.

En este estudio los ingredientes que se utilizan son utilizados para mejorar el sabor del los yogurt tal es el caso de la proteína del suero concentrada y la leche en polvo descremada, y en del tratamiento con carbón activado utilizado para remover los compuestos fenólicos y el sabor a frijol, lo que no contribuyó adecuadamente a este fin. Aún así Mark y col, 1990. reporta un contenido menor al reportado en este trabajo de 7.3% de sólidos en el yogurt con leche de soya, en el que además sugiere que esté sea fortificado con leche en polvo descremada para obtener una mayor concentración de sólidos del 14%.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Altschul A.M., *New Protein Foods, Vol. 1A Technology*, Ed. Academic Press, New York and London 1974.
- Angeles A.G, Marth E.H, *Growth and Activity of Lactic-acid Bacteria in Soymilk. I. Growth and acid production*, 1970, 30-36.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 15 th. 1990.
- Badui D. S., *Química de los Alimentos, edición 3ª*. Editorial Alambra mexicana, 617 - 635.
- Esain., *Elementos de Microbiología Lactologica*, 1971: 60, 61.
- Hsu, H.W., Vavak, L.D. Satterlee y G.A. Miller (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *L. Food Sci.*, 42(5):1269-1273.
- Karleskind D, Laye I, Halpin E, Morr C.V, *Improving Acid in Soy-Based Yogurt by Adding Cheese Whey Proteins and Mineral Salts*. *Journal of Food Science* 1991, 56(4):999-1001.
- Khaleque A., y col. *Studies on the Proccesing and Properties of Soymilk. I. Effect of processing conditions on the flavour and compositions of soymilks*. *Journal of Science Food Agriculture* 1970, 21, November: 579-583.
- Khaleque A., y col. *Studies on the Proccesing and Properties of Soymilk. II. Effect of processing condition on the trypsin inhibitor activity and the in-vitro of proteins in varios soymilk preparations*. *Journal of Science Food Agriculture* 1971, 22, October: 526-530.
- Kwok K.C. y col, *Heat Inactivation of Inhibitors in Soymilk at Ultra-High Temperatures*. *Journal of Food Science* 1993, 58(4): 859-862.
- Lee S-Y, Morr C.V y Seo A. *Comparison of milk-based and soymilk-based yogurt*. *Journal of Food Science* 1990, 55(2):532-536.
- Norma Oficial Mexicana (NOM), Acuerdo Secofi-SSA, *Alimentos-yogurt*, 1986.
- Nsofor L. M, Chukwu E. U. *Sensory Evaluation of Soy Milk-Based Yoghurt*. *Journal Food Science and Technology* 1992, 29(5): 301-303.
- Mahan I. K, Arlin M. T., *Nutrición y Dietoterapia*. Mc Graw Hill, 8a. ed. 1995: 28.
- Mital B.K, Steinkraus K.H. *Growth of Lactic and Bacteria in Soymilks*. *Journal of Food Science* 1974, 39: 1018-1022.
- Mital B.K. y col, *Utilization of Oligosaccharides by Lactic Acid Bacteria During Fermentation of Soy Milk*. *Journal of Food Science* 1975, 40: 114-116.

Navarrete, V.A. (1990). Manual de procedimientos de análisis de leche y sus derivados y elaboración de productos lácteos. Tesis. UAQ.

Nelson, A. I. y col. Illinois Processes for Preparation of Soymilk. *Journal of Food Science* 1976, 41:57-61.

Nsofor L.M. y col, Soya-Yoghurt Starter Culture Development from Fermented Tropical Vegetables. *Journal Science of Food Agriculture* 1992, 60: 515-518.

Pedrero F. L., Evaluación Sensorial de los Alimentos, Alhambra Mexicana, 1989.

Pinthong R, Macrae R, Rothwell J. The Development of a Soya-based Yogurt. I. Acid production by lactic acid bacteria. II. Sensory evaluation and analysis of volatiles. III. Analysis oligosaccharides. *Journnal Food Technology* 1980, 15: 647-667.

Rabell, R.G. (1991). Estudio comparativo de 24 variedades de soya (*Glycine max*). Tesis. UAQ, Facultad de Química (alimentos), Junio.

Reddy P.V. y col, Physical and Chamilical Characteristics of Soy Milk. *Journal of Food and Technology* 1992, 29, May/June: 193-194.

Schmidt R.H, Sistrunk C.P, Richter R.L, Cornell J.A. Heat Treatment and Storage Effects on Texture Characteristics of Milk and Yogurt Systems Fortified with Oilseed Proteins. *Journal of Food Science* 1980, 45: 471-475.

Shirai K., et. al., Production of a Yogurt-like Product from Plant Foodstuffs and Whey. Substrate Preparation and Fermentation. *J Sci Food Agric* 1992, 59:199-204.

Shirai K, Pedraza G, Gutierrez-Durán M, Marshall V M E, Revah-Moiseev s, García-Garibay M, Production of a Yogurt-like Product from Plant Foodstuffs and Whey. *Sensory Evaluation and Physical Attributes* 1992, 59:205-210.

Skoog / West., Química Analítica, 4a.ed. Mc Graw Hill 1990: 54.

Tamine A. Y, Deeth H.C, Yogurt: Technology and Biochemistry. *Jornal of Food Protection* 1980, 45(12):939-977.

Tejada de Hernández., Manual de Laboratorio para análisis de ingredientes utilizados en la alimentación animal, 1985: 22-27, 88-91.

Veisseyre R., Técnicas de Lactología, 6ª. Edición. 1972: 233.

Wang H.L, Kraidej L, Hesseltine C. W. Lactic Acid Fermentation of Soybean Milk. *Journal Milk Food Technology* 1974, 37(2): 71-73.

Wilcke H. L. Y col, Soy Protein & Human Nutrition. Academic Press 1979: 187-203.

Zanella V. G., Microbiología y Preservación de Semillas de Kéfir, Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC), U. A. Q. 1998.

**Anexo H. Receta para la utilización del gabazo que sobra al preparar la leche de soya.**

### **TOFO (QUESO DE SOYA).**

**Ingredientes:**

**¼ de frijol de soya  
¼ de chile cascabel.  
Cebolla  
Vinagre o jugo de limón.**

**Procedimiento:**

- 1. Se pone a remojar el frijol toda la noche de 6 de la tarde 8 de la mañana siguiente, se poner a hervir en una olla de peltre y se mueve con una cuchara de palo. Cuando ya se tiene el frijol se muele en la licuadora moliendo la mitad de frijol con agua caliente y la otra mitad con agua fría.**
- 2. Se pone en una olla de agua hirviendo se mueve hasta que se acabe la espuma, se retira del fuego y se le pone un chorrito de vinagre o limón y con eso se corta, se cuele en una manta de cielo y ya frío se exprime bien.**
- 3. Antes de eso se ponen a asar un cuarto de chiles cascabel y se remojan en agua caliente. Se pica una cebolla muy finita, y se muele el chile con ajo y cominos dejándolo un poco espeso.**
- 4. Luego se fríe la cebolla primero, ya frita se pone el chile cascabel, se deja hervir para luego agregar el OKARA (gabazo del frijol) y se revuelve bien.**