# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

## Programa de Especialización de Tecnología en Alimentos

"Determinación del tiempo de vida útil de la leche de soya mediante un estudio de tiempo real"

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN**

Previo a la obtención del Título de:

**TECNOLOGO EN ALIMENTOS**

Presentado por:

María Lorena Chavarría Morbioni

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2010

# AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este trabajo de graduación.

En especial al equipo humano del Instituto Nacional de Pesca, por abrirme las puertas de su institución; a Ing. Ana María Costa por guiarme en la realización de este trabajo de graduación y a mi familia por su apoyo incondicional.

# DEDICATORIA

A DIOS

A MI FAMILIA

A MI NOVIO

LOS AMO

# TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

MEd. Ana María Costa V.

MSc. Carlos Poveda

# DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de este Trabajo de Graduación, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL"

--------------------------------
Ma. Lorena Chavarría M.

# RESUMEN

La leche de soya, es el alimento líquido blanquecino que se obtiene de la emulsión acuosa resultante de la hidratación de granos de soya entero (Glycine max).

La leche de soya es conocida a nivel mundial como uno de los alimentos que posee la mayor fuente de nutrientes como proteínas debido a que su composición de aminoácidos es completa comparada con otros cereales como los que contienen azufre (metionina y cistina), vitaminas y minerales como el calcio.

En el presente trabajo se propuso determinar el tiempo de vida útil de la leche de soya, para esto se realizó un estudio de tiempo real a muestras que fueron elaboradas bajo las mismas condiciones y almacenadas durante diez días a una temperatura de 5ºC manteniendo la cadena de frío; a las que se le realizó tanto análisis microbiológicos, físicos-químicos y sensoriales para determinar si dentro de este tiempo de estudio se presentaba o no modificaciones en la calidad de las muestras y por lo tanto determinar su tiempo de vida útil.

# INDICE GENERAL

# ABREVIATURAS

PET= Tereftalato de Polietileno

mm= Milímetros

mg= Miligramos

ml= Mililitro

gr= Gramos

Min.= Mínimo

NB= Norma boliviana

NTE= Norma técnica Boliviana

INEN= instituto ecuatoriano de normalización

NTG= Norma técnica guatemalteca

REP= Recuento en placa

UFC/ml= Unidades formadoras de colonias por mililitro.

AOAC= Sociedad Americana de Químicos Analistas

FDA= Food and Drugs Administration

cm3 = Centímetros cúbicos

Na(OH) = Hidróxido de sodio

E. coli= Escherichia coli.

EC= E.coli/coliformes

g/ml= Gramos sobre mililitros

KH2PO4= Fosfáto monopotásico

# SIMBOLOGIA

ºC= Grados Celsius

Nº= Número

N= Normalidad de una sustancia

%= Porcentaje

μ = Micras

pH= Potencial de Hidrógeno

’ = Minutos

< = Menor que

# INDICE DE FIGURAS

# INDICE DE TABLAS

Pág.

# INTRODUCCION

La soya, es una importante semilla perteneciente a la familia de las leguminosas.

El grano de la soya cuenta con un alto porcentaje de grasa (20%), además contiene también proteína (40%), hidratos de carbono (25%), agua (10%)y cenizas(5%). Desde el punto de vista alimenticio y comercial sus principales componentes son la proteína y la grasa.

Siendo la proteína de la soya poseedora de grandes propiedades como reducir las concentraciones de colesterol sanguíneo y es fuente de isoflavonas, jugando un papel importante en la prevención de enfermedades del corazón. La proteína de soya contiene todos los aminoácidos esenciales requeridos en la nutrición humana: isoleucina, leucina, lisina, metionina, triptófano, valina e histidina.

La soya es una leguminosa aprovechada ampliamente para elaborar productos como carne, queso, yogurt y en especial la leche de soya.

La leche de soya es el producto de mayor demanda en nuestro medio por su alto valor nutricional.

# CAPTULO 1

## 1. GENERALIDADES

### 1.1. Planteamiento del Problema

Es el Desconocimiento del tiempo de vida útil de la leche de soya fluida pasteurizada sabor vainilla, envasada en botella plástica de Tereftalato de Polietileno (PET) conservada a temperaturas de refrigeración.

### 1.2. Justificación de la Investigación

La soya es una leguminosa que aporta gran cantidad de nutrientes al ser humano y es un producto de bajo costo lo que representa una ventaja, ya que es fácilmente comerciable y puede ser consumida por personas de bajos recursos económicos; Además este grano es aprovechado en su totalidad para elaborar productos como la leche de soya.

El propósito de esta investigación es obtener datos reales del tiempo de vida útil de la leche de soya a través de la realización de un estudio de tiempo real.

La realización de esta investigación aportará de manera eficaz a futuros proyectos relacionados con productos elaborados a partir de soya.

## 1.3. Objetivos

### Objetivo General

- Determinar el tiempo de vida útil de la leche de soya fluida pasteurizada sabor vainilla conservada a temperaturas de refrigeración, mediante un estudio de tiempo real.

### Objetivos Específicos

- Identificar los factores que afectan la calidad y la vida útil de la leche de soya.
- Aplicar métodos científicos conocidos para determinar la vida útil de la leche de soya.
- Aportar la información obtenida de este estudio de vida útil, para los productores de leche de soya a grande o pequeña escala.
- Apoyar las investigaciones científicas relacionadas con productos derivados de la soya.

## 1.4. Hipótesis de Resultados Esperados

Por experiencias relacionadas a la elaboración de leche de soya, según la tecnología, el tipo de empaque y almacenamiento aplicado, se estima que el tiempo de vida útil de la leche de soya fluida pasteurizada y almacenada en refrigeración es de 8 a 10 días.

# CAPITULO 2

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Soya

La soya Glycine max (figura 1.2), es una importante semilla perteneciente a la familia de las leguminosas. En muchos países occidentales, esta semilla se utiliza para la extracción de aceite y el residuo o pasta, rico en proteína, se emplea para la alimentación animal, mientras que en oriente la soya es fundamental en la dieta de un gran sector de la población. [9]

FIGURA 2.1 GLYCINE MAX

Debido a sus propiedades nutritivas, principalmente por su proteína, en los últimos años ha habido un gran desarrollo científico y tecnológico, para su aprovechamiento integral. [9]

Existen tres especies principales: Glycine ussuriensis en estado natural, Glycine max cultivada y Glycine gracilis intermedia. Siendo Glycine max la más desarrollada en todo el mundo. [9]

La producción de soya se encuentra principalmente en cuatro países en donde se produce el 88% del total mundial. Los cuatro países son: Estados Unidos de Norteamérica, Brasil, China y Argentina. [10]

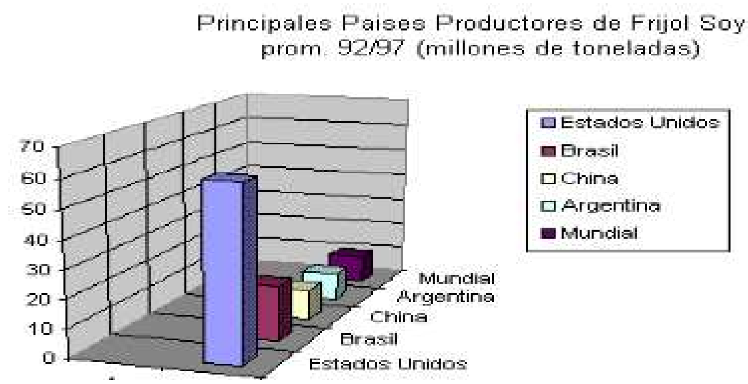


FIGURA 2.2 PAÍSES PRODUCTORES DE SOYA [10]

La soya es una semilla generalmente esférica de unos 8 a 10 mm de diámetro, del tamaño de un guisante y de color amarillo. Algunas variedades presentan una marca negra que corresponde al hilo de la semilla. [9]

En forma general, la soya está anatómicamente constituida por tres fracciones principales la cascarilla, que representa el 8% del peso total de la semilla, el hipocotilo 2% y el cotiledón 90% en este último se localiza el aceite en unos pequeños compartimientos, llamados esferosomas, de 0.2 a 0.3 µ, y que a su vez están dispersos entre los cuerpos proteínicos de mayor tamaño, integrados por aproximadamente 98% de proteínas y algo de lípidos y de acido fítico. La composición de la soya y de sus partes en % está representada en la tabla 1. [9]

TABLA 1.
COMPOSICIÓN DE LA SOYA Y DE SUS PARTES (%)

| | PROTEÍNA | GRASA | CARBOHIDRATOS | CENIZAS | CONSTITUYENTES DE LA SEMILLA |
|---|---|---|---|---|---|
| **SOYA TOTAL** | 40 | 21 | 34 | 4.9 | - |
| **COTILEDÓN** | 43 | 23 | 29 | 5.0 | 90 |
| **CASCARILLA** | 9 | 1 | 86 | 4.4 | 8 |
| **HIPOCOTILO** | 41 | 11 | 43 | 4.3 | 2 |

www1, 2010.

### 2.1.1 Composición Química.

La composición de la soya cambia dependiendo de la variedad del grano, de las condiciones de crecimiento, así como del estado en que se encuentra. [9]

El porcentaje de humedad, proteína, grasa, carbohidratos y cenizas, es menor en el grano fresco y cosechado antes de tiempo, debido a que no se desarrolló completamente, afectando su composición. [9]

La composición está reportada en el peso en base seca, ya que el frijol de soya contiene humedad. [9]

TABLA 2.
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE SOYA (GLYCINE MAX) [9]

| | COMPOSICIÓN (%) |
|---|---|
| Humedad | 8.6 |
| Energía | 413 |
| Proteína | 34.3 |
| Grasa | 18.7 |
| Carbohidratos | 31.6 |
| Fibra Cruda | 3.8 |
| Ceniza | 5.1 |
| Celulosa y Hemicelulosa | 17 |

www1, 2010.

TABLA 3.
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE SOYA (GLYCINE MAX) FRESCA [9]

| NUTRIMENTOS | COMPOSICIÓN (%) |
|---|---|
| Humedad | 6.8 |
| Proteína | 13 |
| Grasa | 6 |
| Carbohidratos | 11 |
| Ceniza | 2 |
| Celulosa y Hemicelulosa | 17 |

Nota: La composición está reportada en base seca

www1, 2010.

### Proteína de la Soya

**Contenido y Composición**

La soya es una excelente fuente de proteínas: una variación significativa en el contenido de proteína existe de un cultivo a otro, debido a la zona de cultivo, su crecimiento y cosecha. El contenido de proteína esta en un rango de 35 a 44%. [9]

La proteína de soya es particularmente valiosa, debido a que su composición de aminoácidos es completa comparada con otros cereales. [9]

TABLA 4.
CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES DE LA SOYA (GLYCINE MAX) Y DEL TRIGO. [11]

[redacted]

www3, 2010

Los aminoácidos principales que contienen azufre (metionina y cistina). Su porcentaje en la proteína de soya es cerca del 70% que de la proteína total del huevo. Por otra parte para ser una proteína vegetal, la de la soya es excepcionalmente rica en lisina y puede servir como suplemento valioso a los alimentos a base de cereales en los que la lisina es el factor limitante. [4]

**Glycina:** Proteína predominante del grano de soya, de esta se deriva el nombre del genero Glycine. Tiene un peso molecular 320000- 350000 y está constituida de 12 sub-unidades asociadas a través de enlaces hidrogeno y bisulfuro. [9]

**Enzimas:** La soya como todas las semillas contiene sistemas enzimáticos necesarios para la germinación. Tecnológicamente, la más importante enzima en la soya es la lipoxigenasa, también conocida como lipoxidasa. [9]

Esta enzima cataliza la oxidación de los ácidos grasos poli-insaturados (linoleico, linolénico y araquidónico) por el oxigeno molecular. Que lleva al desarrollo de la rancidez y el sabor afrijolado. [9]

### Carbohidratos de la Soya

Los carbohidratos constituyen una porción importante en el grano de soya, aproximadamente el 30% de su peso. Estos incluyen: almidón, azúcares (sacarosa, rafinosa estaquiosa) y otros carbohidratos menores como sustancias pépticas. La soya carece de almidón. [9]

### Vitaminas de la Soya

La semilla de la soya es una buena fuente de vitaminas solubles. El contenido de vitamina de la soya es presentado en la tabla 5, en donde se observa que el contenido de niacina es mucho mayor que el de tiamina. [9]

TABLA 5.
CONTENIDO DE VITAMINAS DE LA SOYA [9]

| VITAMINA | CONTENIDO |
|---|---|
| β-Caroteno (μg/g) | 0.2-2.4 |
| Tiamina (μg/g) | 11.0-17.0 |
| Riboflavina (μg/g) | 2.3 |
| Niacina (μg/g) | 20.0-26.0 |
| Ácido Pantoténico (μg/g) | 12.0 |
| Piridoxina (μg/g) | 6.4 |
| Biotina (μg/g) | 0.6 |
| Ácido Fólico (μg/g) | 2.3 |
| Colina (mg/g) | 3.4 |
| Inocitol(mg/g) | 1.9-2.6 |
| Ácido Ascórbico (mg/g) | 0.2 |

www1, 2010.

### Minerales de la Soya

El contenido total de minerales en el grano de soya es determinado por el total de cenizas. El contenido de calcio en la soya está en el rango de 160 a 470 mg/100g. La disponibilidad de calcio proveniente de la soya es muy baja, únicamente el 10% del calcio de la soya puede ser utilizado efectivamente por el hombre. La disponibilidad de otros minerales en la soya está influenciada por proteínas, ácido fítico y polifenoles. [9]

## 2.2. Leche de Soya

La leche de soya, es el alimento líquido blanquecino que se obtiene de la emulsión acuosa resultante de la hidratación de granos de soya entero (Glycine max), seleccionado y limpio, seguido de un procesamiento tecnológico adecuado. Su formula puede contener azúcar, colorantes, saborizantes y conservantes. [3]

FIGURA 2.3 LECHE DE SOYA

La leche de soya pasteurizada es la leche de soya fluida sometida a un proceso de pasteurización, que se aplica al producto a una temperatura no menor de 65ºC, por un tiempo definido seguido de un enfriamiento rápido y que elimina riesgos para la salud pública al destruir microorganismos patógenos y reducir la microbiota del producto con la mínima alteración de sus características organolépticas y nutricionales. [3]

La leche de soya natural, pasteurizada, o esterilizada, debe ser procesada a partir de fríjol de soya (Glycine max) apto para consumo humano, sano, limpio y en buen estado de conservación, exento de otras semillas y materias extrañas y que cumpla con las características indicadas en la Tabla Nº 6. [3]

FIGURA 2.4 GRANOS DE SOYA

TABLA 6.
CARACTERISTICAS DEL FRÍJOL DE SOYA PARA LA ELABORACIÓN DE LECHE DE SOYA [3]

[redacted]

COGUANOR, 2005.

### 2.2.1 Características generales

La leche de soya debe presentar aspecto normal, homogéneo, libre de sustancias extrañas. [3]

**Características organolépticas**

Cumplirá con las siguientes características organolépticas. [2]

**Apariencia:** Homogénea y estable, libre de aglomeraciones y grumos a su apariencia general.

**Olor:** A vegetal o leguminosa propio del grano de soya.

**Sabor:** ligeramente a frijol o poroto. Libre de sabores extraños.

**Color:** Blanquecino.

FIGURA 2.5 CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DE LA LECHE DE SOYA

### Características físicas y químicas

La leche de soya debe cumplir con las características físicas y químicas que se establecen en la tabla 7. [2]

TABLA 7.
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LA LECHE DE SOYA PASTEURIZADA (IBNORCA APNB 313021) [2]

| Características | Limites | Método de Ensayo |
|---|---|---|
| pH | 6.8 – 7.4 | - |
| Proteína | Min 3.0 % | NB 33020 |
| Grasa | Min 1.6 % | NB 228 |

IBNORCA, 2009.

TABLA 8.
CONTENIDO NUTRICIONAL DE LA LECHE DE SOYA [9]

| Nutrimento | Contenido (%) |
|---|---|
| Proteína | 3.6 |
| Lípidos | 2.0 |
| Carbohidratos | 2.9 |
| Calorías | 44 |

WWW1, 2010.

**Características microbiológicas**

La leche de soya pasteurizada no deberá contener microorganismos patógenos. El contenido de microorganismos no patógenos debe cumplir con lo establecido en la tabla 9 y 10.

TABLA 9.
REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE PASTEURIZADA (NTE INEN 10:2003) [1]

| Microorganismos | n | c | m | M | Método de ensayo |
|---|---|---|---|---|---|
| Recuento de total de aerobios mesófilos REP (UFC/ml) | 5 | 2 | $3,0X10^{4}$ | $1,0X10^{5}$ | NTE INEN 1529-5 |
| Coliformes totales REP (UFC/ml) | 5 | 1 | $5,0X10^{0}$ | $5,0X10^{1}$ | NTE INEN 1529-7 |
| E. coli (NMP/ml) Coliformes fecales | 5 | 0 | $< 3X10^{0}$ | - | NTE INEN 1529-8 |

INEN, 2003.

*< 3,0 x 100, significa que no existe ningún tubo positivo en la técnica del NMP con tres tubos.

n = Número de muestras que deben analizarse.

c = Número de muestras que se permite que tenga un recuento mayor que m, pero no mayor que M.

m = Recuento aceptable.

M = Recuento máximo permitido.

TABLA 10.
CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LECHE DE SOYA PASTEURIZADA [3]

| Microorganismos | n | c | m | M |
|---|---|---|---|---|
| Recuento total de bacterias no patógenas por mililitro máximo (UFC/ml) | 5 | 2 | 1000 | 5000 |
| Coliformes totales por mililitro máximo (UFC/ml) | 5 | 2 | < 10 | < 10 |
| Contenido de mohos y levaduras por mililitro máximo (UFC/ml) | 5 | 2 | 100 | 1000 |

COGUANOR, 2005.

### 2.2.2 Elaboración de Leche de Soya

La leche de soya se prepara, remojando los granos de soya, seguido de un molido húmedo, filtrado y ebullición. Sin embargo también se prepara haciendo dispersiones estables de aislados de proteína de soya en agua, junto con otros ingredientes. [9]

Como ya se ha mencionado anteriormente, granos de soya de baja calidad afectan en la composición química, propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la leche de soya. Actualmente los productores de ésta leche seleccionan cuidadosamente la variedad de soya amarilla (Glycine *max).* La recuperación de contenido proteínico es aproximadamente de 70 a 80%, sin embargo estos valores varían dependiendo de las etapas previas a la elaboración así como el procesamiento.

Algunas etapas utilizadas antes de iniciar la producción de leche de soya son: limpieza, descascarillado, remojo. [9]

**Diagrama de Flujo de elaboración de la leche de soya**

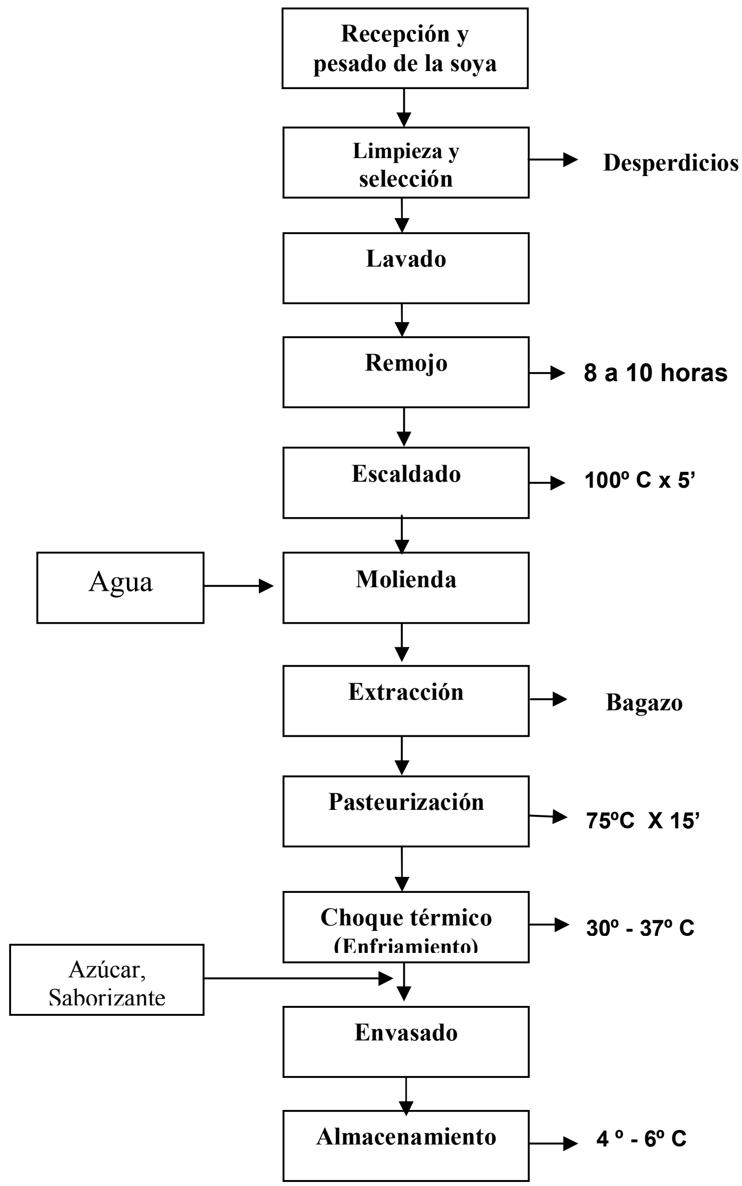


FIGURA 2.6 PROCESO DE ELABORACIÓN DE LECHE DE SOYA PASTEURIZADA

### 2.2.3 Descripción del Proceso

**Recepción y Pesado**. Se recepta y se pesa la cantidad de soya a utilizar de acuerdo a la formulación. [9]

FIGURA 2.7 RECEPCIÓN DE GRANOS DE SOYA

**Limpieza y selección**. La soya se debe limpiar con el objetivo de remover los materiales extraños, como piedras, paja, hierbas y metales. Y posteriormente enjuagar con agua potable libre de contaminantes. [9]

**Lavado.** Los granos de soya seleccionados y limpios se lavan con abundante agua para remover todas las impurezas aun presentes entre los granos. [9]

**Remojo**. La leche de soya es preparada con grano remojado en agua fría es preferible ya que hay menor perdida de sólidos. La cantidad de agua utilizada para el remojo es tres veces el peso del frijol, y el tiempo de remojo es de 8 a 10 horas. [9]

FIGURA 2.8 REMOJO DE GRANOS DE SOYA

**Escaldado**: Se la realiza a una temperatura entre los 95 a 100ºC por 5 minutos esto tiene como objetivo desactivar la enzima lipoxigenasa. [9]

FIGURA 2.9 ESCALDADO DE GRANOS DE SOYA

**Molienda**. El grano se muele con agua caliente en una licuadora semi-industrial en la misma proporción peso/volumen (1 kilo de soya/1 litro de agua). [9]

FIGURA 2.10 MOLIENDA DEL GRANO DE SOYA

**Extracción**. En esta etapa se extrae la leche, luego de moler los granos de soya. [9]

FIGURA 2.11 EXTRACCIÓN DE LA LECHE DE SOYA

**Pasteurización** este tratamiento térmico se lo realiza a una temperatura de 75ºC por 15 minutos. El objetivo perseguido de todo tratamiento térmico es la destrucción de los microorganismos patógenos que afectan la salud de quienes lo consumen y los microorganismos que originan su alteración. Además el tratamiento térmico a que se someta la leche de soya mejora la digestibilidad de la proteína al inactivar los inhibidores de tripsina. [9]

FIGURA 2.12 PASTEURIZACIÓN DE LA LECHE DE SOYA

**Enfriamiento y choque térmico** Se realiza un enfriamiento rápido hasta 30º C. Añadir los ingredientes y aditivos según formulación. [9]

**Envasado** Una vez que la leche alcanza temperaturas entre los 30-37ºC se procede a envasar el producto en envases plásticos asépticos. [9]

FIGURA 2.13 PRESENTACIÓN DE PRODUCTO TERMINADO

**Almacenamiento** Posterior al envasado almacenar en refrigeración en un rango de temperatura de 4-6ºC. [9]

### 2.2.4 Principales Alteraciones Microbiológicas

Las principales alteraciones microbiológicas que afectan la vida útil de la leche de soya son causadas por microorganismos como mohos/levaduras, E. coli (coliformes fecales), mesófilos aerobios; todos estos debido a la falta de higiene durante el proceso, tanto de los ambientes de elaboración como de las superficies de contacto. [3]

La Asociación Americana de soya recomienda que todos los productos de leche de soya deban ser sometidos a un tratamiento térmico adecuado antes de su venta. Algunas prácticas de manufactura incluyen: cocción completa de frijol de soya y suspensión acuosa; procesamiento de la soya con equipo sanitario, tratamiento térmico adecuado, rápido enfriamiento a una temperatura menor a 40º C. [3]

La Asociación Americana de soya emite la siguiente guía microbiológica para productos de leche de soya, los cuales deben de estar ausentes de:

Staphilococcus aureus, Salmonella, Escherichia coli enteropatógena, Vibrio parahemolyticus, Listeria monocytogenes, Campilobacter jejuni, Yersinia enterolítica. [3]

# CAPITULO 3

## 3. ANALISIS Y METODOS

En este capítulo se explicará la metodología de los análisis microbiológicos, sensoriales, organolépticos y físico- químicos realizados durante un periodo de 10 días para la determinación de la vida útil de la leche de soya.

### 3.1 Planeamiento del estudio de vida útil de la leche de soya

Para realizar el estudio de vida útil de la leche de soya se planificó el tipo de pruebas, los análisis y la frecuencia con que se van a realizar a las muestras.

TABLA 11.

PLANEAMIENTO DEL ESTUDIO DE VIDA UTIL

| Tipo de Prueba | Análisis a realizar | Frecuencia de análisis | Tiempo de estudio vida útil |
|---|---|---|---|
| Sensoriales | Color, olor, sabor, textura | Cada 2 días | 10 días |
| Físico-químicas | pH | Cada 2 días | |
| Microbiológicas | Mesófilos aerobios, Coliformes fecales, Mohos y levaduras. | Cada 2-3 días por tiempo de incubación y lectura de resultados | |

ELABORADO POR: LORENA CHAVARRÍA, 2009.

## 3.2 Análisis microbiológicos

Se ha tomado como parámetro de calidad el grado de inocuidad de la muestras de leche de soya, por lo cual se realizó pruebas microbiológicas para la determinación de mohos/levaduras, mesófilos aerobios y presencia o ausencia de microorganismos patógenos como E. coli/coliformes.

### 3.2.1 Determinación de Mohos y Levaduras

Los mohos y levaduras son microorganismos eucariotes, se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados. [5]

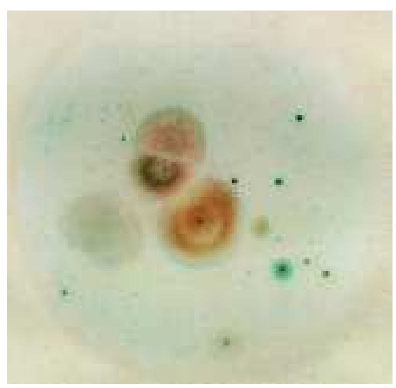

FIGURA 3.1 PLACA PETRIFILM PARA LA DETERMINACIÓN DE MOHOS COMO LEVADURAS

**Fundamento**

La placa Petrifilm para recuento de Mohos y Levaduras (Yeast y Molds, YM) es un sistema de medio de cultivo listo para usarse, que contiene nutrientes de Saboraud, dos antibióticos, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de fosfatos que promueve el contraste y facilita el recuento de las colonias. [5]

**Materiales y equipos**

- Pipetas de 1 y 5 ml
- placas Petrifilm
- Frascos boca ancha
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Incubadora
- Autoclave
- Contador de colonias
- Cámara de aire lamina

**Medios de Cultivo**

Agua de peptona o $KH_2PO_4$ (medio de dilución). [5]

**Preparación de la Muestra**

- Pesar o pipetear la muestra dentro de un contenedor estéril, como una bolsa homogenizadora o cualquier otro contenedor estéril apropiado.
- Adicionar la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: Kh2PO4 (Fosfáto monopotásico) con un pH 7.2, agua de peptona al 0.1%, solución salina 0.85-0.90%.
- Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales. [5]

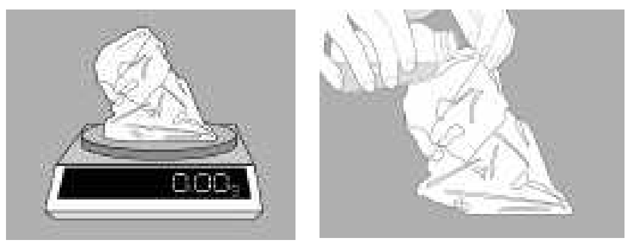

FIGURA 3.2 PROCEDIMIENTO PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS

**Inoculación**

- Coloque la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.
- Con la ayuda de una pipeta, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadriculada inferior.

- Libere la película superior dejando que caiga sobre la muestra.
- Sosteniendo la barra cruzada del dispersor para Mohos y Levaduras, colóquelo sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.
- Presione suavemente el dispersor para distribuir la muestra. No gire ni deslice el dispersor.
- Levante el dispersor. Espere por lo menos 1 minuto para permitir que se solidifique el gel y proceda a la incubación. [5]

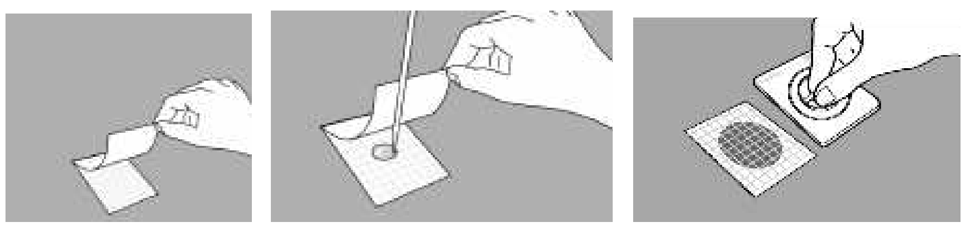

FIGURA 3.3 PROCEDIMIENTO PARA INOCULAR MUESTRAS

**Incubación**

Incube las placas cara abajo en grupos de hasta 20 unidades a 20-25º C por 3-5 días.

Algunos mohos pueden crecer rápidamente, por lo que puede ser útil leer y contar las placas a los 3 días, ya que las colonias más pequeñas se verán más obscuras que los Mohos ya crecidos a los 5 días. Si las placas presentan demasiado crecimiento al 5 día, registre el último resultado obtenido al día 3 como estimado.

Puede ser necesario humectar al ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la perdida de humedad. [5]

FIGURA 3.4 INCUBACIÓN DE PLACAS PETRIFILM

**Interpretación**

Las placas petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar o con  una fuente de luz amplificada. [5]

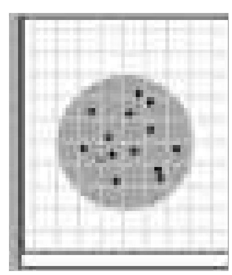

FIGURA 3.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### 3.2.2 Determinación de Aerobios Mesófilos REP

Microorganismos Aerobios mesófilos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre, a una temperatura comprendida entre 20 y 45º C con una zona óptima entre 30-40ºC.

El recuento de microorganismos Aerobios mesófilos REP Es la determinación del número de microorganismos aerobios mesófilos viables por gramo o cm3 de muestra de alimento. [6]

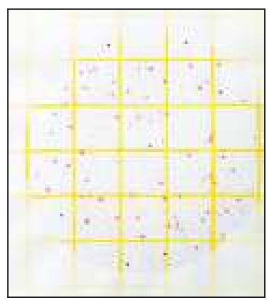

FIGURA 3.6 COLONIAS DE BACTERIAS AEROBIAS

**Fundamento**

Este método se basa en la presunción de que cada microorganismo presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio sólido se desarrollará, formando una colonia individual y visible. Esto se obtiene mezclando diluciones decimales del homogenizado de la muestra del alimento con el medio de cultivo.

Las placas petrifilm para recuento de Aerobios son un medio de cultivo listo para ser empleado, contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría, y un tinte indicador de color rojo que facilita el recuento de colonias. Las placas petrifilm AC se utilizan para el recuento de la población total existente de bacterias aerobias en productos, superficies. [6]

**Materiales y Medios de Cultivo**

- Pipetas 1ml y 5 ml
- placas Petrifilm
- Frascos boca ancha
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Incubadora
- Autoclave
- Contador de colonias
- Cámara de aire laminar

**Medios de Cultivo**

Agua de peptona o KH2PO4 (medio de dilución). [6]

**Procedimiento**

**Preparación de la Muestra**

- Pesar o pipetear la muestra dentro de un contenedor estéril, como una bolsa homogenizadora o cualquier otro contenedor estéril apropiado.
- Adicionar la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: Kh2po4 (Fosfáto monopotásico) con un pH 7.2, agua de peptona al 0.1%, solución salina 0.85-0.90%.
- Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales. [6]

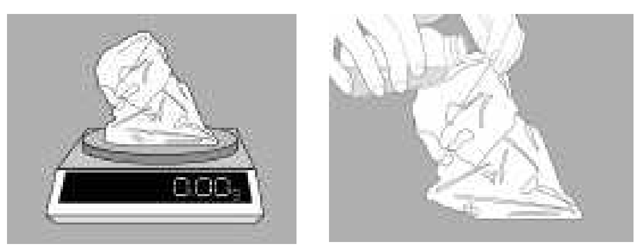


FIGURA 3.7 PREPARACIÓN DE MUESTRAS A INOCULAR

**Inoculación**

- Coloque la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.
- Con la ayuda de una pipeta, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadriculada inferior.
- Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No la deslice hacia abajo.
- Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispersor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.
- Presione suavemente el dispersor para distribuir la muestra. No gire ni deslice el dispersor. Recuerde distribuir la muestra antes de inocular una siguiente placa.
- Levante el dispersor. Espere por lo menos 1 minuto para permitir que se solidifique el gel y proceda a la incubación. [6]

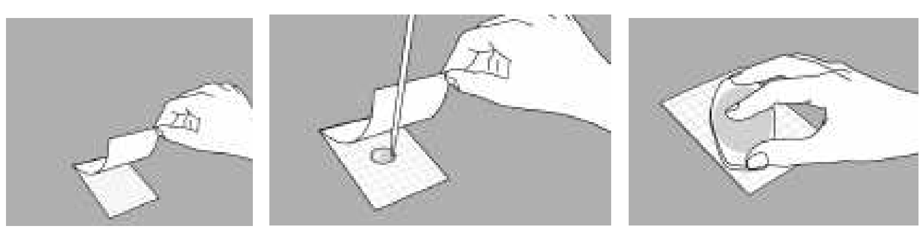

FIGURA 3.8 PROCEDIMIENTO DE INOCULACIÓN DE MUESTRA

**Incubación**

Incube las placas cara arriba a una temperatura de 35ºC por 48 horas en grupos de no más de 20 placas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la perdida de humedad. [6]

FIGURA 3.9 INCUBACIÓN DE PLACAS PETRIFILM PARA BACTERIAS AEROBIAS

**Interpretación**

Las placas petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la guía de interpretación para leer los resultados. [6]

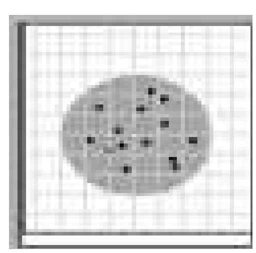

FIGURA 3.10 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### 3.2.3 Recuento de Coliformes fecales y E. coli

La AOAC Internacional y el manual de análisis bacteriológico de la FDA de los Estados Unidos definen los coliformes como colonias de bastoncillos gram-negativos que producen ácido y gas de la lactosa durante la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias coliformes que crecen en la placa petrifilm EC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia. [7]

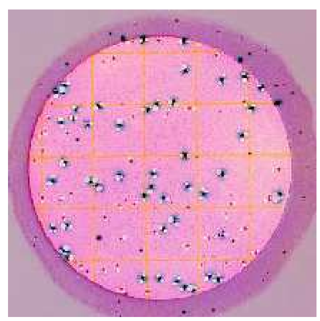

FIGURA 3.11 PLACA PETRFILM PARA DETERMINACIÓN E.COLI/COLIFORMES

**Fundamento**

Las placas petrifilm para el recuento de E. coli/coliformes contienen nutrientes de Bilis rojo violeta, un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad de la glucuronidasa y un indicador que facilita la enumeración de las colonias. La mayoría de las E. coli cerca del 97% produce betaglucuronidasa, la que a su vez produce una precipitación azul asociada con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por E.coli y coliformes fermentadores de lactosa. Cerca del 95% de las E. coli producen gas, representado por colonias entre azul y rojo-azules asociados con el gas atrapado en la placa petrifilm EC. [7]

**Materiales y Equipos**

- Pipetas 1ml y 5 ml
- placas Petrifilm
- Frascos boca ancha
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Incubadora
- Autoclave
- Contador de colonias
- Cámara de aire laminar

**Medios de Cultivo**

Agua de peptona o $KH_2PO_4$ (medio de dilución) [7]

**Preparación de la Muestra**

- Prepare una dilución de una muestra de alimente, pesar o pipetear la muestra dentro de un contenedor estéril, como una bolsa homogenizadora o cualquier otro contenedor estéril apropiado.
- Adicionar la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: KH2PO4 (Fosfáto monopotásico) con un pH 7.2, agua de peptona al 0.1%, solución salina 0.85-0.90%.
- Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales. [7]

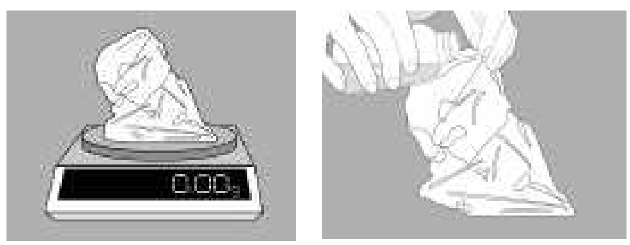

FIGURA 3.12 PREPARACIÓN DE MUESTRA A INOCULAR

**Inoculación**

- Coloque la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levante la película superior.
- Con la ayuda de una pipeta, coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadriculada inferior.

- Baje con cuidado la película superior para evitar que atrape burbujas de aire No la deje caer.
- Con el lado liso hacia abajo, coloque el dispersor en la película superior, sobre el inoculo.
- Presione suavemente el dispersor para distribuir el inoculo sobre el área circular No gire ni deslice el dispersor. Levante el dispersor. Espere por lo menos 1 minuto para permitir que se solidifique el gel y proceda a la incubación. [7]

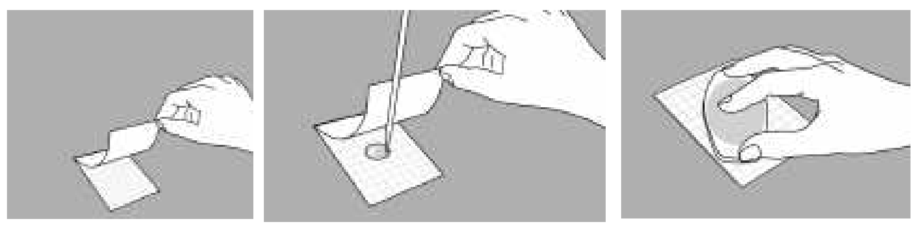

FIGURA 3.13 INOCULACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE E.COLI/COLIFORMES

**Incubación**

Incube las placas cara arriba a 35ºC por 24 horas, en grupos de no más de 20 piezas. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la perdida de humedad. [7]

FIGURA 3.14.INCUBACIÓN DE PLACAS PETRIFILM E.COLI/COLIFORMES

**Interpretación**

Las placas petrifilm pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz. Consulte la guía de interpretación para leer los resultados. [7]

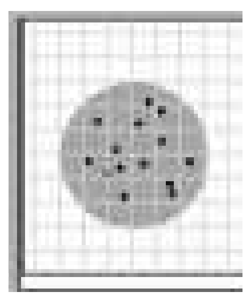

FIGURA 3.15 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

## 3.3 Análisis Sensoriales

La evaluación sensorial es el análisis de alimentos por medio de los sentidos. La palabra sensorial se deriva del latín sensus, que quiere decir sentido. La evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos, microbiológicos.

Se define al análisis sensorial, como el examen de los caracteres organolépticos de un producto mediante los sentidos, obtenido datos cuantificables y objetivables. [8]

**La degustación**

Degustar un alimento es probarlo con la intención de valorar su cualidad organoléptica global en función de un modelo psicológico y real establecido con antelación, con la posibilidad de que el modelo sea diferente según el lugar donde se ensaye. [8]

FIGURA 3.16 EVALUACIÓN SENSORIAL

El degustador es una persona seleccionada y entrenada para valorar sensorialmente un alimento según unos modelos preestablecidos. [8]

### 3.3.1 Evaluación sensorial discriminatoria por comparación de pares.

Se presentan un par de muestras codificadas para compararlas en base de alguna característica específica. Tiene aplicaciones similares a la prueba triangular. Menos muestras son requeridas y se prueban menos veces pero la probabilidad de adivinanza es del 50%. La prueba de comparaciones no nos indica el tamaño de la diferencia entre las dos muestras pero determina si existe una diferencia detectable o no (anexo 1). [8]

## 3.4 Análisis Físicos – Químicos

### 3.4.1 Determinación de pH

La determinación del pH es de vital importancia dentro del área biológica y química, ya que mediante ésta, es posible conocer la concentración de una solución.

Esto, debido a que al tener establecido un parámetro con las medidas de pH para cada sustancia, se puede saber, por medio de una medición, si la sustancia que se compara con la medida patrón ha sufrido alteración alguna y en medida del aumento o descenso del pH se puede establecer los motivos de tal anomalía. [12]

**Métodos para la determinación del pH**

Métodos potenciométricos. Se han podido diseñar electrodos que responden de manera específica a cierto análisis. El uso de estos electrodos para que midan las diferencias de potencial eléctrico originadas por la diferente concentración de una especie química, constituye el fundamento de las medidas potenciométricas. [12]

Existen varias maneras de medir el pH. La más simple consiste en emplear un indicador ácido-base, una sustancia que presenta coloraciones bien definidas dependiendo de la acidez de la solución. [12]

También se puede medir el utilizando indicadores como papel tornasol azul y rojo y dependiendo la coloración que se adquiera, se puede clasificar a una sustancia como ácido o base. [12]

# CAPITULO 4

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Resultados Microbiológicos

Para determinar el tiempo de vida útil de la leche de soya pasteurizada, conservada en refrigeración se analizaron 5 muestras de un mismo lote durante 10 días, a las cuales se les realizaron análisis microbiológicos para determinar su estabilidad.

TABLA 12. RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DE LECHE DE SOYA PASTEURIZADA

[redacted]

Durante este periodo el número de microorganismos aerobios decreció a causa del agotamiento de oxígeno en las muestras, mientras que el crecimiento de mohos/levaduras y E.coli/coliformes se mantuvo ausente.

Por lo tanto la leche de soya pasteurizada, conservada en refrigeración (5 ºC), no presentó alteraciones microbiológicas durante los diez días de estudio.

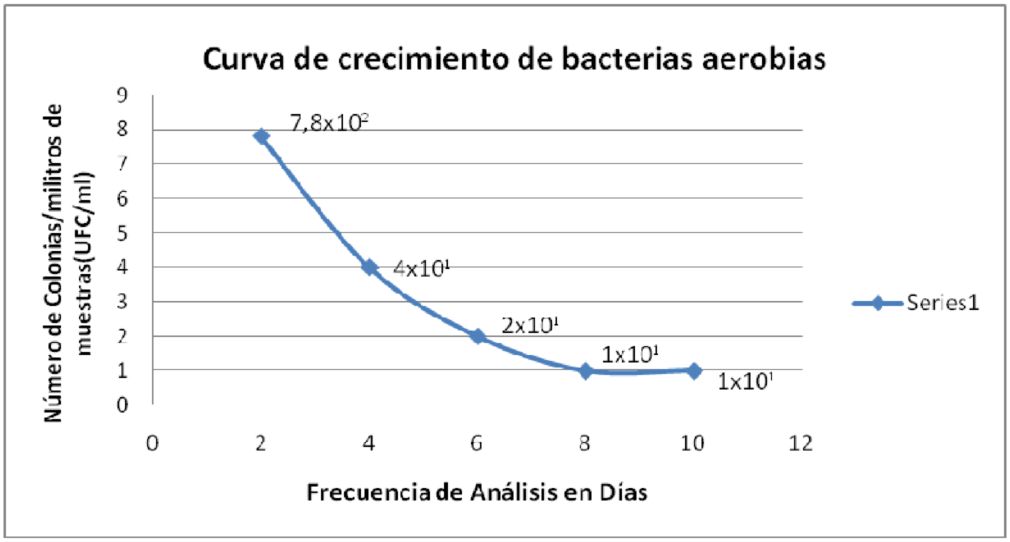


FIGURA 4.1 CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO DE LA LECHE SOYA PASTEURIZADA

### 4.2 Resultados del monitoreo de pH

También se monitoreó el pH de las cinco muestras durante los diez días con el propósito de detectar si había alteraciones en las muestras a causa de la degradación microbiana. En el transcurso de los diez días se registró un aumento en el pH más no el descenso, ya que se mantuvo ausente el crecimiento microbiano provocadores de la fermentación de azucares, como el caso de  mohos/levaduras que producen la acidez del medio.

TABLA 13. RESULTADOS DEL MONITOREO DE PH DE LECHE DE SOYA PASTEURIZADA

| Muestra | Tiempo de elaboración días | pH | Temperatura ºC |
|---|---|---|---|
| 1 | 0-2 | 6.59 | 25.0 |
| 2 | 2-4 | 6.60 | 25.0 |
| 3 | 4-6 | 6.65 | 25.0 |
| 4 | 6-8 | 6.66 | 25.0 |
| 5 | 8-10 | 6.67 | 25.0 |

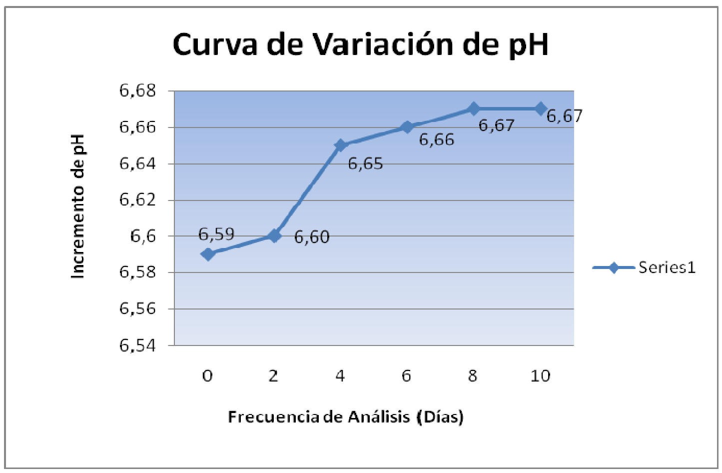


FIGURA 4.2 VARIACIÓN DE PH DE LA LECHE DE SOYA

**4.3 Resultados evaluación sensorial**

No solo se consideró como parámetros de calidad el crecimiento bacteriano y la variación de pH, también es importante cambios en los atributos organolépticos de la leche de soya ya que estos se pueden ver afectados por otros factores como; el cambios de olor y sabor a causa del enranciamiento de ácidos grasos insaturados durante el tiempo de almacenamiento, o por la permeabilidad del envase permitiendo el ingreso de oxigeno y otros gases, que alteran el olor y sabor del producto.

Por lo cual se realizó una prueba sensorial discriminatoria (comparación de pares) con 8 panelistas entrenados para determinar si hay diferencia detectable de frescura o sabor entre la muestra de leche de soya fresca y una muestra de leche de soya de doce días de elaboración obteniéndose los siguientes resultados ver figura 4.3.

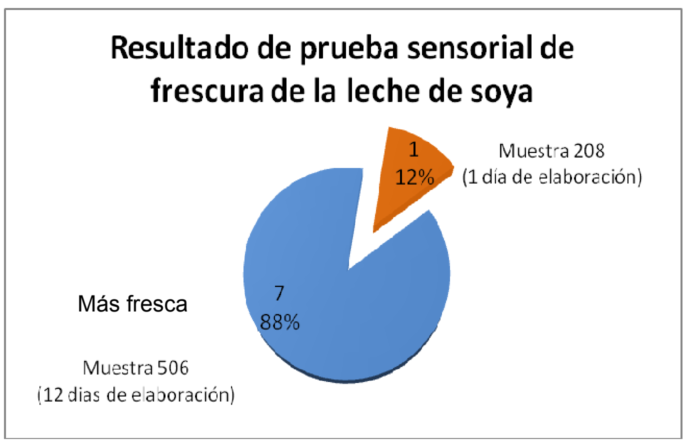


FIGURA 4.3 RESULTADOS DE EVALUACIÓN SENSORIAL

Utilizando la tabla para pruebas discriminatorias de 2 muestras se escogió el 1% para darle mayor margen de confianza a la evaluación de los panelistas y se obtuvo que no exista una diferencia detectable o significativa de frescura entre las dos muestras evaluadas.

# CAPITULO 5

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Mediante la realización de pruebas microbiológicas, físico-químicas y sensoriales se llego a la conclusión de que el tiempo de vida útil de la leche de soya es aproximadamente entre diez a doce días ya que durante ese tiempo de estudio, las muestras no presentaron alteraciones en sus características de calidad.

- Uno de los factores que contribuyo en gran parte la conservación de la leche de soya fue el empaque ya que los envases PET son una buena barrera del oxigeno evitando que el producto modifique sus propiedades químicas, su calidad sensoriales y microbiológica.

- La aplicación de un tratamiento térmico (pasteurización) destruye la flora bacteriana que causa deterior del alimento y su posterior almacenamiento a temperaturas de refrigeración manteniendo la cadena de frío es un factor importante que alarga la vida útil de la leche de soya.

- Se escogió para determinar la vida útil del producto un modelo de tiempo real, al ser la leche de soya un producto con una alta actividad de agua, que contiene gran proporción de nutrientes; por lo que es altamente perecedero.

- Comparando los resultados microbiológicos obtenidos de la leche de soya pasteurizada, frente a la norma INEN 10 “Requisitos Leche Pasteurizada” cumple ya que la carga bacteriana presente se encuentra por debajo del límite máximo establecido en la norma.

- Se recomienda realizar un segundo análisis para la determinación de mesófilos aerobios ya que pueden darse errores en la realización de las pruebas. Ya que los resultados obtenidos durante el estudio demuestra una disminución del número de colonias y no su incremento como es característico en el crecimiento microbiano.

- Es recomendable realizar un estudio de vida útil de leche de soya a diferentes temperaturas de almacenamiento para así determinar el tiempo de vida útil a dichas condiciones.

# ANEXOS

# ANEXO 1.

## Cuestionario para la evaluación sensorial entre dos muestras de leche de soya

Nombre:

Producto:

Fecha:

Evalúe frescura entre las dos muestras de leche de soya. Señale con una x la muestra que se siente más fresca. Pruebe la de la izquierda primero.

506 _____

128 _____

Comentarios: ----------------------------------------------------------

-----------------------------------------------------------------------------

**ANEXO 2**

[redacted]

## BIBLIOGRAFÍA

[1] INEN, Leche Pasteurizada. Requisitos. Norma Técnica Ecuatoriana, Tercera Revisión, Ecuador, 2003.

[2] IBNORCA, Leche de Soya Natural Fluida. Anteproyecto Norma Boliviana, Bolivia, 2009.

[3] COGUANOR, Leche de Soya Natural Fluida. Especificaciones. Norma Técnica Guatemalteca, Guatemala, 2005.

[4] PAMPLONA, J. El Poder Medicinal de los Alimentos. Primera Edición, Editorial Sanfeliz S.L. 2003.

[5] 3M, Recuento de Mohos y Levaduras. Guía de Interpretación. Placas Petrifilm. México, 2004.

[6] 3M, Recuento de Mesófilos Aerobios. Guía de Interpretación. Placas Petrifilm. México, 2006.

[7] 3M, Recuento de E. coli y Coliformes Fecales. Guía de Interpretación. Placas Petrifilm. México, 2006.

[8] REYES, M. Texto Guía Control de Calidad de Alimentos.2007.

[9] www1, 2010: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/gomez_a_ma/capitulo3.pdf

[10] www2, 2010: http://www.protoleg.com.mx/la_soya.html

[11] www3, 2010: http://www.scribd.com/doc/23519583/extraccion-de-proteina-de-soya

[12]www4,2010:http://www.cecyt15.ipn.mx/polilibros/instrumenta/contenido/unidades/unidad_iv.htm