

## EVOLUCION DE LA MICROFLORA ESENCIAL DEL YOGUR COMERCIAL PARA SU CONSERVACION.

(EVOLUTION OF THE ESSENTIAL MICROFLORA OF COMMERCIAL YOGOURT DURING ITS CONSERVATION).

por

Jordano Salinas, Rafael

Departamento de higiene, inspección y microbiología de los alimentos, y Sección de bromatología del C.S.I.C. Córdoba (España).

Palabras clave: Microbiología industrial. Industrias lácteas. Streptococcus thermophilus. Lactobacillus bulgaricus.

Keywords: Microbiology. Milk industry. Streptococcus thermophilus. Lactobacillus bulgaricus.

### Summary

The evolution of the essential microflora in yoghurt kept at 7° C for 40 days, has been investigated in 300 samples belonging to two varieties, natural and strawberry flavour, from 3 well-known Spanish commercial makes. The pH and the acidity have been measured. It has been noticed that S. thermophilus and L. bulgaricus suffer a decrease in quantity, which is statistically significant ( $p \leq 0.001$ ). In thirty days time this microflora was reduced to its 50 p.100; there being no relevant statistical differences between S. thermophilus and L. bulgaricus throughout this period of time. It has also been checked that the evolution of the essential microflora is related to variations of acidity of the yoghurt. We propose that natural and flavoured yoghurts should contain a minimum of  $100 \times 10^6$  bacteria per gramme both of S. thermophilus and of L. bulgaricus, and that the time of commercial life of yoghurt kept at 7° C should be of 3 weeks since the end of its elaboration.

Recibido para publicación el 25-2-1983.

### Resumen

Se ha investigado la evolución de la microflora esencial del yogur conservado durante cuarenta días a 7<sup>o</sup> C, en 300 muestras de dos variedades elaboradas en España (natural y sabor a fresa) pertenecientes a tres marcas de gran difusión comercial. Se ha medido también el pH y la acidez titulable. Se ha comprobado que el S. thermophilus y el L. bulgaricus experimentan un descenso numérico que es estadísticamente significativo ( $p \leq 0,001$ ). A los treinta días de conservación esta microflora se había reducido en un porcentaje próximo al cincuenta por ciento y no existían diferencias significativas entre el S. thermophilus y el L. bulgaricus. Igualmente, se ha constatado que la evolución de la microflora esencial está relacionada con las variaciones de la acidez titulable. Como consecuencia de la investigación se propone para el yogur, natural y aromatizado, que dichos productos contengan un mínimo de  $100 \times 10^6$  bacterias esenciales por gramo, tanto de S. thermophilus como de L. bulgaricus, y se estima que la vida comercial del yogur conservado a 7<sup>o</sup> C es de tres semanas, contabilizadas a partir del término de su elaboración.

### Introducción y revisión bibliográfica

El examen microbiológico del yogur está orientado a dos finalidades: asegurar la ausencia de microorganismos patógenos y comprobar que las bacterias viables presentes en el mismo son Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus (Robinson y Tamine 29). Según Rašić y Kurmann 27) los diferentes microorganismos detectados en el yogur pueden clasificarse en tres grupos de microflora: esencial, no esencial y contaminante. La microflora esencial está constituida por el S. thermophilus y el L. bulgaricus.

Robinson y Tamine 28) plantean si es o no conveniente especificar la presencia de S. thermophilus y de L. bulgaricus en el yogur. El hecho de que algunos países como Francia (Dehove 9), Holanda 22), Italia 15), Nueva Zelanda 23), Bulgaria 6), Africa del Sur 14) y Dinamarca 13), se hayan definido en sentido afirmativo ha dado gran relevancia a los métodos de determinación. La técnica de recuento microscópico directo (prueba muy utilizada en los Estados Unidos, pero abandonada en el Reino Uni-

do) no es válida como instrumento de evaluación de bacterias ácido-lácticas en el yogur (Davis<sup>7)</sup>, Battistotti y Bottazzi<sup>4)</sup> y Speckman y Johannsen<sup>30)</sup>). En opinión de Robinson y Tamine<sup>29)</sup> el método alternativo para el examen de microflora esencial del yogur estaría representado por el recuento en placa.

Sobre las variaciones que experimenta la microflora esencial del yogur durante su conservación merecen destacarse los trabajos de Amato y col.<sup>2)</sup>, Ottogalli y col.<sup>24)</sup>, Puhan y col.<sup>25 y 26)</sup>, Luisiani y col.<sup>20)</sup>, Glättli y col.<sup>12)</sup>, Emaldi y col.<sup>11)</sup>, Luisiani y Bianchi-Salvadori<sup>19)</sup> y Kondratenko y col.<sup>17)</sup>

### Material y métodos

Las muestras pertenecían a tres marcas de gran difusión comercial: A, B y C. De cada marca se han realizado cien análisis, de los que cincuenta corresponden a la variedad natural y otros cincuenta a la de sabor a fresa. La totalidad de los yogures se comercializaban en envases de material plástico con un contenido aproximado a 125 gramos. Las muestras investigadas estaban agrupadas en seis lotes homogéneos, representado cada uno por una variedad natural o aromatizada de cada marca, conseguidos directamente de la factoría productora el mismo día de su elaboración. En ningún caso transcurrieron más de veinticuatro horas desde el término de la elaboración hasta el control de laboratorio o el almacenamiento a 7º C (temperatura habitual de comercialización). De cada lote se tomaban al azar diez muestras, para la realización del control inicial del mismo. Las cuarenta restantes eran conservadas a 7º C y sometidas a control al cabo de diez, veinte, treinta y cuarenta días de almacenamiento, en las condiciones citadas. En cada control se analizaban diez yogures.

El recuento de S. thermophilus lo hemos realizado sobre agar MRS (De Man y col.<sup>10)</sup>); y el de L. bulgaricus, en agar M17 (Terzaghi y Sandine<sup>31)</sup>) según el "Método oficial francés" para la enumeración de la microflora específica del yogur<sup>21)</sup>. A continuación procedíamos a la medida del pH, mediante un PH-metro, y a la valoración de la acidez titulable, siguiendo los "Métodos para el examen de productos lácteos" (APHA<sup>3)</sup>).

## Resultados y discusión

Los resultados de la evolución de los recuentos específicos de S. thermophilus y de L. bulgaricus, del pH y de la acidez titulable se expresan gráficamente en las figuras 1 a 6.

En todos los casos (marcas A, B y C, natural y aromatizado) los valores de la "H" de Kruskal-Wallis (contraste no paramétrico aplicado a los resultados obtenidos) fueron significativos ( $p < 0,001$ ); de lo que se deduce que la microflora esencial del yogur, almacenado a 7º C durante cuarenta días, evoluciona significativamente. En los diferentes controles realizados se ha detectado un constante descenso, respecto a los valores iniciales, en los recuentos de S. thermophilus y de L. bulgaricus, que estuvo situado, al cabo de treinta días, en la mayoría de los casos, en torno al 50 p.100 (tablas I y II). Tras cuarenta días la reducción en el número de colonias de S. thermophilus llegó hasta el 88,14 p.100, de su valor inicial, y el de L. bulgaricus descendió en un 91,41 p.100, en yogur natural de la marca B (tabla I). En esta evolución no existen, según se ha estudiado, diferencias significativas entre el S. thermophilus y el L. bulgaricus.

Davis y col.<sup>8)</sup> comprueban que el recuento de las bacterias esenciales del yogur no experimenta modificaciones apreciables tras catorce días a 15º C y después de veintiocho a 5º C. Ottogalli y col.<sup>24)</sup> constatan, en yogur conservado a 4º C, que la microflora esencial sufre un descenso constante. De un recuento inicial de  $10^8$  a  $10^9$  bacterias por milímetro, éste, al cabo de diez días, descendió en un 50 p.100, mientras que después de cuarenta la reducción era del 90 p.100; y tras sesenta días, del 100 p.100. Puhan y col.<sup>25)</sup> observan que los gérmenes esenciales decrecían tras seis a ocho días, y al cabo de dieciseis a veinte su número representaba el 64 p.100 del que era a los dos días. También Puhan y col.<sup>26)</sup> señalan variaciones de la microflora esencial del yogur. Glättli y col.<sup>12)</sup> observan que a 5º C los recuentos de S. thermophilus y de L. bulgaricus descendían lentamente, en tanto que a 10 y a 20º C lo hacían rápidamente, tras cuarenta y veintiún días, respectivamente. Emaldi y col.<sup>11)</sup> detectan también, en yogur conservado a 4º C, disminuciones en las bacterias esenciales.

Nosotros hemos apreciado que el S. thermophilus y el L. bulgaricus experimentan un descenso numérico, en el yogur conservado a 7º C durante cuarenta días, que es estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ). Transcurridos treinta días la microflora esencial se redujo en un porcentaje

próximo al 50 p.100 y no se detectaron diferencias significativas entre S. thermophilus y L. bulgaricus. Ottogalli y col. <sup>24)</sup>; Puhán y col. <sup>25,26)</sup> Glättli y col. <sup>12)</sup> y Emaldi y col. <sup>11)</sup> constatan un descenso en los recuentos de la microflora esencial del yogur (S. thermophilus y L. bulgaricus), en su conjunto, durante su conservación. Sin embargo, los porcentajes de reducción que observaron los autores antes citados no son comparables a los apreciados en la presente investigación, ya que dichos porcentajes están influenciados, entre otros factores, por la fecha de fabricación del yogur, la temperatura de conservación y los niveles de acidez presentes.

Por otra parte, mediante el coeficiente de correlación por rangos ordenados, de Spearman, hemos comprobado que la evolución de la microflora esencial está relacionada con las variaciones de la acidez titulable. Existe una correlación negativa con unos niveles de significación comprendidos entre  $p \leq 0,001$  y  $p \leq 0,05$ , entre los recuentos específicos, de S. thermophilus y L. bulgaricus, y las variaciones del ácido láctico.

Tenemos escasas referencias de normas o patrones que regulen la presencia de S. thermophilus y L. bulgaricus en el yogur (tabla III). La práctica totalidad de los yogures analizados en los controles iniciales cumplían los requisitos vigentes en Suiza (Lebensmittel Verordnung<sup>18)</sup>, el grado satisfactorio de Davis y col.<sup>8)</sup> y el umbral recomendado por Accolas y col.<sup>1)</sup> (tabla IV). En España no existe ninguna normativa en vigor, que se refiera a la microflora esencial del yogur. Nosotros, como consecuencia de los resultados obtenidos y de todo lo expuesto, proponemos, para el yogur (natural y aromatizado), que dichos productos contengan un mínimo de  $100 \times 10^6$  bacterias por gramo, tanto en el caso del recuento de S. thermophilus como en el de L. bulgaricus.

En relación con la vida comercial del yogur, la norma española(5) establece un límite de veinte días, como máximo, contabilizados a partir de la fecha en que el producto fue envasado para su venta definitiva. Davis y col.<sup>8)</sup> consideran que si el yogur se conserva a 5º C es apto para el consumo durante diez días. Según Luisiani y col.<sup>20)</sup> un yogur conservado a 5º C contiene, al cabo de un mes, un número de microorganismos esenciales próximo a  $100 \times 10^6$  por milímetro, con independencia del tipo de yogur. Para este autor se puede establecer, siempre que se mantenga la cadena de frío, un tiempo de conservación de aproximadamente un mes. Nosotros, teniendo en cuenta la evolución que siguen los recuentos de S. thermophilus y L. bulgaricus (tablas I y II, figuras 1 a 6) y los niveles de esta microflora viable, generalmente aceptados (tabla III),

así como la recomendación relativa a la presencia de bacterias esenciales anteriormente dicha, consideramos que la vida comercial del yogur conservado a 7º C es de tres semanas, contabilizadas a partir del término de su elaboración.

Tabla I. Recuentos iniciales y porcentajes de reducción de la microflora esencial del yogur natural conservado a 7º C. Valores medios.

Control (a)	Marca A		Marca B		Marca C	
	<u>S.thermoph.</u>	<u>L.bulg.</u>	<u>S.thermoph.</u>	<u>L.bulg.</u>	<u>S.thermoph.</u>	<u>L.bulg.</u>
(millones de colonias por gramo)						
Inicial	120	241	135	268	144	249
Reducción p.100 respecto del recuento inicial.						
A los 10 días	6,66	0,83	5,92	3,73	13,90	5,62
A los 20 días	33,34	9,54	22,22	22,76	29,86	24,09
A los 30 días	58,33	52,69	61,48	69,77	49,30	54,21
A los 40 días	76,67	82,16	88,14	91,41	66,66	75,50

(a) En cada control se han investigado diez muestras de cada marca.

Tabla II. Recuentos iniciales y porcentajes de reducción de la microflora esencial del yogur natural conservado a 7º C. Valores medios.

Control (a)	Marca A		Marca B		Marca C	
	<u>S.thermoph.</u>	<u>L.bulg.</u>	<u>S.thermoph.</u>	<u>L.bulg.</u>	<u>S.thermoph.</u>	<u>L.bulg.</u>
(millones de colonias por gramo)						
Inicial	125	262	185	164	174	175
Reducción p.100 respecto del recuento inicial.						
A los 10 días	8,00	4,20	4,32	1,22	16,09	13,00
A los 20 días	16,80	9,92	5,40	4,26	31,61	27,42
A los 30 días	52,80	51,53	41,62	44,51	48,27	40,57
A los 40 días	74,40	82,44	77,83	89,02	71,26	82,86

(a) En cada control se han investigado diez muestras de cada marca.

Tabla III. Normas o patrones y límites microbiológicos propuestos para microflora esencial del yogur.

País o autor	<u>S. thermophilus</u>	<u>L. bulgaricus</u>
	x 10 <sup>6</sup> col./g ó ml.	x 10 <sup>6</sup> col./g ó ml.
Suiza (Lebensmittel Verordnung <sup>18</sup> )	(	1 )
Davis y col. <sup>8</sup> )		
grados:		
satisfactorio	> 100	> 100
dudoso	10 - 100	10 - 100
insatisfactorio	< 10	< 10
Accolas y col. <sup>1</sup> )	(	100 )

( ) = S. thermophilus + L. bulgaricus

Tabla IV. Porcentajes de muestras, investigadas en el control inicial, que cumplen las normas o patrones y límites propuestos para la microflora esencial del yogur.

<u>S. thermophilus</u> + <u>L. bulgaricus</u> x 10 <sup>6</sup> col. /g ó ml.		Marca A		Marca B		Marca C	
		nat.	arom.	nat.	arom.	nat.	arom.
	1 (a)	100	100	100	100	100	100
	100 (b)	100	100	100	100	100	100
<u>S. thermophilus</u> x 10 <sup>6</sup> col./g ó ml.	> 100	80	100	100	100	100	100
	10-100	20	0	0	0	0	0
	< 10 (c)	0	0	0	0	0	0
<u>L. bulgaricus</u> x 10 <sup>6</sup> col./g. ó ml.	> 100	100	100	100	100	100	100
	10-100	0	0	0	0	0	0
	< 10 (c)	0	0	0	0	0	0

(a) Suiza (Lebensmittel Verordnung<sup>18</sup>); (b) Accolas y col.<sup>1</sup>); (c) Davis y col.<sup>8</sup>)

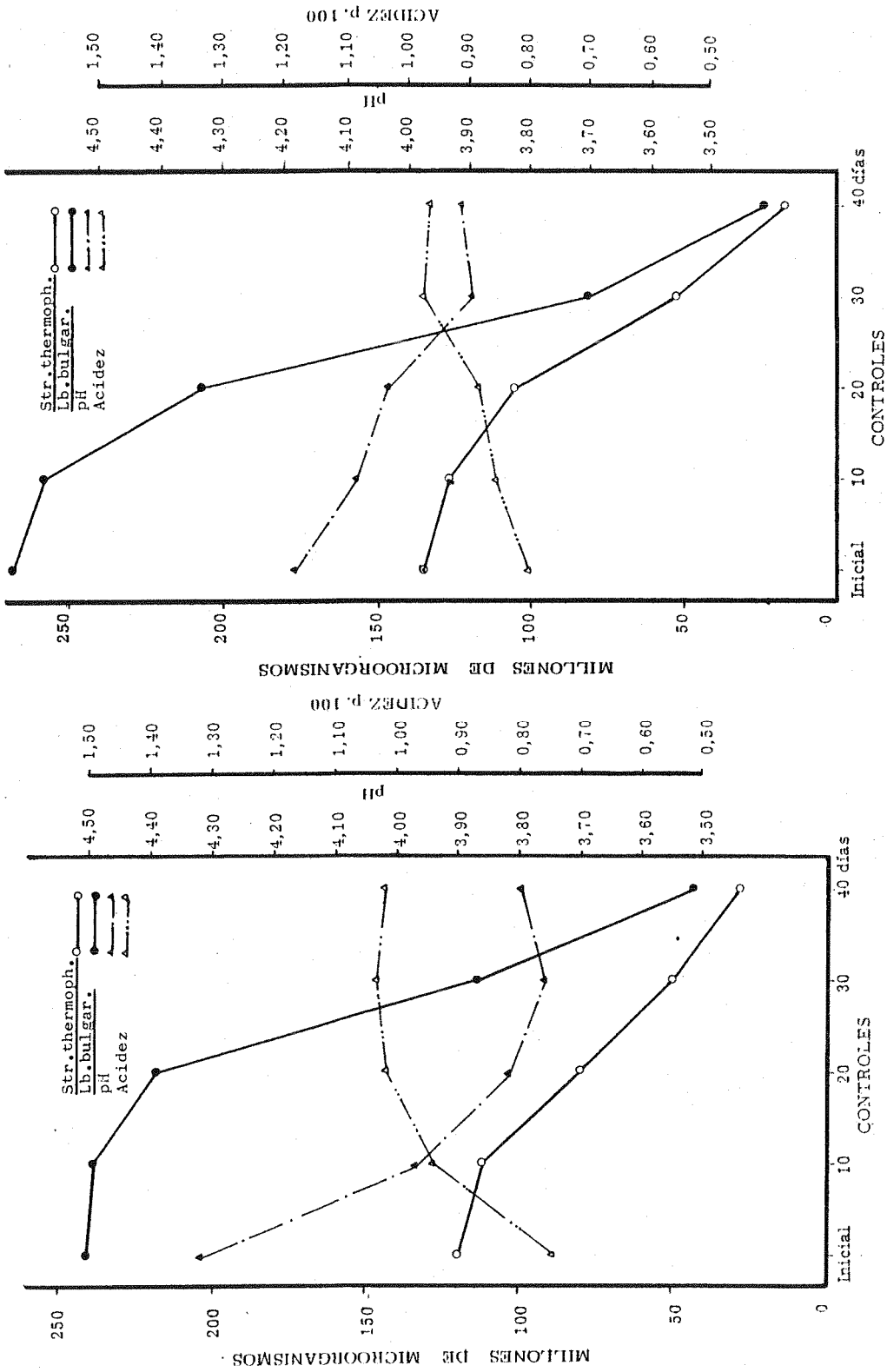


Figura 1. Evolución de la microflora esencial (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), el pH y la acidez titulable, expresada en ácido láctico, en yogur conservado a 7º C. Marca A, yogur natural.

Figura 2. Evolución de la microflora esencial (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), el pH y la acidez titulable, expresada en ácido láctico, en yogur conservado a 7º C. Marca B, yogur natural.



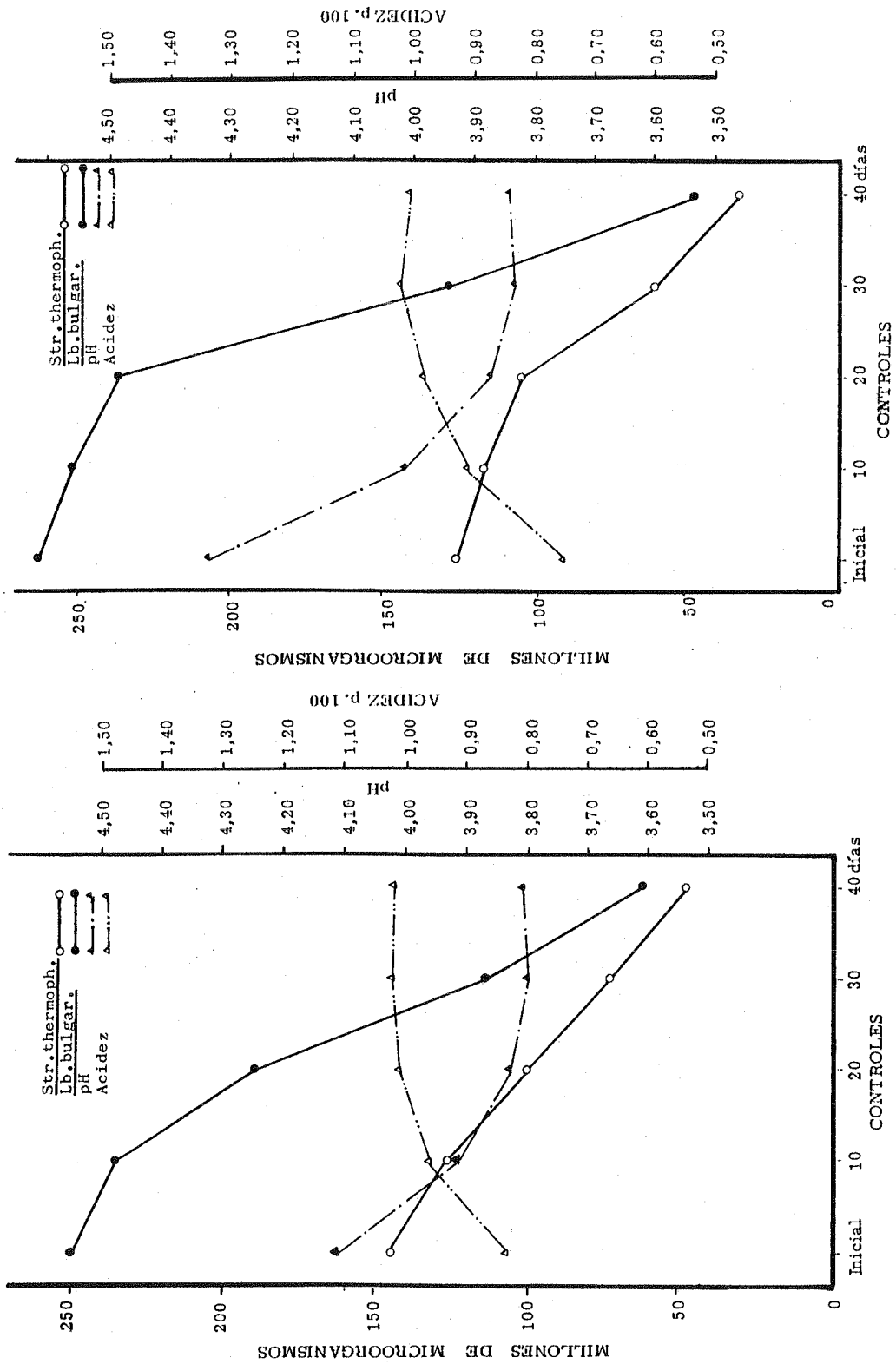


Figura 3. Evolución de la microflora esencial (S. thermophilus y L. bulgaricus), el pH y la acidez titulable, expresada en ácido láctico, en yogur conservado a 7º C. Marca C, yogur natural.

Figura 4. Evolución de la microflora esencial (S. thermophilus y L. bulgaricus), el pH y la acidez titulable, expresada en ácido láctico, en yogur conservado a 7º C. Marca A, yogur aromatizado.

JORDANO, R.: EVOLUCION DE LA MICROFLORA ESENCIAL DEL YOGUR.

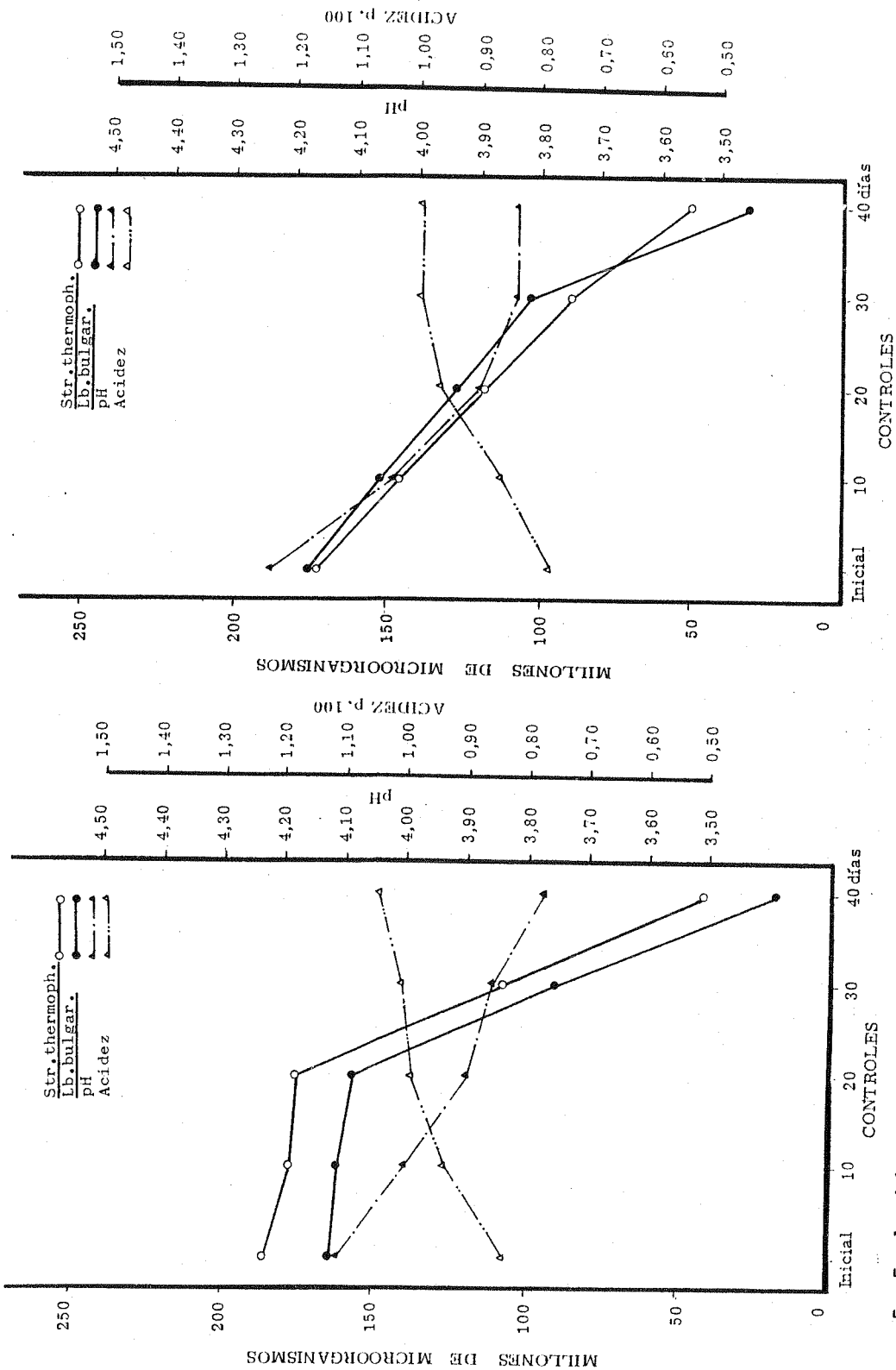


Figura 5. Evolución de la microflora esencial (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), el pH y la acidez titulable, expresada en ácido láctico, en yogur conservado a 7º C. Marca B, yogur aromatizado.

Figura 6. Evolución de la microflora esencial (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), el pH y la acidez titulable, expresada en ácido láctico, en yogur conservado a 7º C. Marca C, yogur aromatizado.

### Bibliografía

1. Accolas, J.P., M. Venaux, C. Delmas, O. Sansoulet, R. Grappin y D. Petransxiène. 20ème Congrès International de Laiterie. París (1978).
2. Amato, F., L. Becheroni y A. Dracos. Nuovi. Ann. Ig. Microbiol. Ital. 21, 341-361 (1970).
3. APHA. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. American Public Health Association. Washington (USA) (1978).
4. Battistotti, B. y V. Bottazzi. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia. 25, 120-129 (1974).
5. Boletín Oficial del Estado. Norma española para el yogur. Decreto 705/1975 del 5 de marzo. B.O.E. nº 88 (1975).
6. Bulgarian Standrads. Dairy Sci. Abstracts. 36, 578 (1974).
7. Davis, J.G. Dairy Inds. 35, 139 (1970).
8. Davis, J.G., T.R. Asthon y M. McCaskill. Dairy Inds. 36, 569-573 (1971).
9. Dehove, R.A. La Regulation des Produits Alimentaires et la Repression des Fraudes. 4th ed. 2 rue des Petits-Pères. París (France) (1961).
10. De Man, J.C., M. Rogosa y M.A. Sharpe. J. Appl. Bact. 23, 130-135 (1960).
11. Emaldi, G.C., C. Pompei, E. Carbone y C. Peri. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia. 25, 32-42 (1974).
12. Glättli, H., E. Flückiger, G. Schenker y F. Walser. Schweizerische Milchzeitung. 100, 67-68 (1974).
13. IDF/Denmark. Danish Government Research Institute for Dairy Industry. DK-3400. Hillerød (1975).
14. IDF/South Africa. South Africa National Dairy Committee. POBox265 0001. Pretoria (1975).
15. Italian Standards. Circular nº 2. Ministry of Public Health. Rome (1972).

16. Jordano, R. Tesis doctoral. Serv. Reprografía. Facultad de Veterinaria. Córdoba (1982).
17. Kondratenko, M., L. Goranova, R. Simeonova y B. G'osheva. Khranitel-na Promishlenost. 28, 29-35 (1979).
18. Lebensmittel Verordnung. Schweizerische Verordnung über den Verkehr mit Lebensmitteln und Gebrauchsgegenständen. Bern (Schweiz) (1971).
19. Luisiani, G. y B. Bianchi-Salvadori. XX International Dairy Congress E. 351 (1978).
20. Luisiani, G., P. Salvadori y B. Bianchi-Salvadori. Le Lait. 1, 53-59 (1974).
21. Ministère de L'Agriculture. Méthode Officielle d'analyses pour le dénombrement de la flore spécifique du yaourt. Journal Officiel de la République Française (1978).
22. Netherlands Standards. Health Laws & Regulation. WHO. 18, 755 (1967).
23. New Zealand Food & Drugs Act. Government Building. Wellington (1973).
24. Ottogalli, G., P. Resmini, G. Rondinini y S. Saracchi. Ann. Micr. 22, 71-79 (1972).
25. Puhan, Z., O. Flüeler y M. Banhegyi. Schweiz. Milchw. Forsch. 2, 37-52 (1973).
26. Puhan, Z., M. Banhegyi y O. Flüeler. Schweiz. Milchw. Forsch. 2, 53-68 (1973).
27. Rašić, J.Lj. y J.A. Kurmann. Yoghurt. Technical Dairy Publishing House. Copenhagen (Denmark) (1978).
28. Robinson, R.K. y A.Y. Tamine. J. Soc. Dairy Technol. 28, 149 (1975).
29. Robinson, R.K. y A.Y. Tamine. J. Soc. Dairy Technol. 29, 147-155 (1976).
30. Speckman, C A. y G.B. Johannsen. L'industria del Latte. 11, 15-29 (1975).
31. Terzaghi, B.E. y W.E. Sandine. Appl. Microbiol. 29, 807-813 (1975).