



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Proyecto de la Unidad
Integración Curricular
previo a la obtención
del Título de Ingeniera
en Alimentos

Tema de la Unidad Integradora Curricular:

“ESTUDIO DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UNA BEBIDA LÁCTEA
SIMBIÓTICA, ELABORADA EMPLEANDO *Lactobacillus rhamnosus*,
Bifidobacterium s. p. Y PECTINA CÍTRICA”

Autor:

Luiggi Adrián Mendoza Intriago

Directora del Proyecto:

Ing. María Teresa Pacheco Tigselema, PhD.

MOCACHE – LOS RÍOS – ECUADOR

2022



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Luigi Adrián Mendoza Intriago**, declaro que la investigación aquí descrita es de mi autoría; que no ha sido previamente presentada para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

.....
Luigi Adrián Mendoza Intriago
C.C.: 0940801244



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

La suscrita, **Ing. María Teresa Pacheco Tigselema, PhD.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Directora del Trabajo de Titulación titulado **“ESTUDIO DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UNA BEBIDA LÁCTEA SIMBIÓTICA, ELABORADA EMPLEANDO *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium* s. p. Y PECTINA CÍTRICA”**, CERTIFICA que el estudiante Luiggi Adrián Mendoza Intriago, ejecutó dicha investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniería en Alimentos, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

.....
Ing. María Teresa Pacheco Tigselema, PhD.
C.C.: 0502635188
Docente Tutora



CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), a la normativa y directrices establecidas por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), la suscrita, **Ing. María Teresa Pacheco Tigselema, PhD.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en calidad de Directora del Trabajo de Titulación: “**ESTUDIO DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UNA BEBIDA LÁCTEA SIMBIÓTICA, ELABORADA EMPLEANDO *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium s. p.* Y PECTINA CÍTRICA**”, desarrollado por el Sr. estudiante **Luigi Adrián Mendoza Intriago**, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de **0%** cumpliendo de esta manera con el requerimiento establecido.



Document Information

Analyzed document	2022-02-03 Tesis Luigi CAMBIOS ACEPTADOS.docx (D126997676)
Submitted	2022-02-04T01:09:00.0000000
Submitted by	MARIA TERESA PACHECO TIGSELEMA
Submitter email	mpachecot@uteq.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	mpachecot.uteq@analysis.orkund.com

Sources included in the report

.....
Ing. María Teresa Pacheco Tigselema, PhD.
C.C.: 0502635188
Docente Tutora



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD CIENCIAS DE LA INDUSTRIA Y PRODUCCIÓN
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema:

**“ESTUDIO DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UNA BEBIDA LÁCTEA
SIMBIÓTICA, ELABORADA EMPLEANDO *Lactobacillus rhamnosus*,
Bifidobacterium s. p. Y PECTINA CÍTRICA”**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del Título
Ingeniero en Alimentos.

Aprobado por:

Ing. Christian Vallejo Torres, MSc.

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

Ing. Leonilo Durazno Delgado, MSc.

MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Wilma Llerena Silva, MSc.

MIEMBRO DE TRIBUNAL

MOCACHE – LOS RIOS – ECUADOR

2022

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento en primer lugar va para Dios, quien, a lo largo de mi vida y mi carrera, siempre me ha acompañado, y por otorgarme la sabiduría para tomar decisiones.

A mis padres: Dolores Intriago por su apoyo incondicional y preocupación cada vez que me encontraba en una situación difícil, y Galo Mendoza, que me ha motivado con sus consejos y que ahora se sentirá orgulloso de mi, por la meta cumplida.

A mi esposa Génesis Quishpe por su paciencia y tolerancia en cada momento difícil de mi carrera, y apoyarme incondicionalmente; sin ella esto no sería posible.

A mis suegros José Quishpe y Carmen Loor, por haberme ayudado y apoyado como un hijo. A mi cuñada Alejandra Quishpe, por sus palabras sus motivadoras y conocimientos.

Y como olvidar a mi tutora de tesis Dra. María Teresa Pacheco, por su amistad, paciencia y carisma para enseñar, a quien le debo este gran logro y por el cual le estaré eternamente agradecido; y a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, por hacer de este anhelo, una realidad.

Luigi Adrián Mendoza Intriago

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico principalmente al único rey y soberano que es Dios, a mis padres Dolores Intriago y Galo Mendoza que me hicieron una persona de bien, a mi esposa Génesis Quishpe, a mis suegros José Quishpe y Carmen Loor, y mi cuñada, quienes me brindan su apoyo día a día, y a mi tutora Dra. María Teresa Pacheco, que nos aceptó como sus tutorados, siempre con el afán de convertirnos en buenos profesionales.

Luigi Adrián Mendoza Intriago

RESUMEN

A fin de analizar el efecto del uso de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. y pectina cítrica en el tiempo de vida útil (TVU) de una bebida láctea fermentada, se emplearon dos diferentes dosis de cultivo, con y sin pectina cítrica. También se empleó *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, cultivo comúnmente empleado en la elaboración de yogur, como comparativo. Ambos cultivos fueron empleados a dosis de 0,006 % y 0,012 % e incubados a su temperatura óptima de actividad (44 y 37 °C, respectivamente), obteniendo un total de 8 tratamientos (T1 a T8). El análisis de bacterias patógenas (coliformes totales) y de probióticos viables, realizado a intervalos de 5 días durante el almacenamiento (8°C), permitió respectivamente, predecir el tiempo de vida útil de la bebida, y el tiempo de supervivencia de probióticos, empleando un modelo de cinética de orden uno. Al final del almacenamiento, todas las bebidas elaboradas mostraron cantidades de probióticos mayores a 10^7 Ufc/mL, ausencia de *E. coli*, coliformes totales entre 6 a 10 Ufc/mL, mohos y levaduras en el rango de 12 a 28 Ufc/mL, cumpliendo con los requisitos de la normativa. Las bebidas elaboradas con pectina cítrica exhibieron un mayor tiempo de vida útil, y también un mayor tiempo de supervivencia de probióticos, con un menor valor de la constante de cinética, que para las bebidas preparadas sin este prebiótico. El mayor tiempo de vida útil igual (37 días), se observó con el uso de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. a la dosis de 0,012 % p/v y pectina cítrica 0,34 % (T8), y el mayor tiempo de supervivencia de probióticos (161 días), se observó también en presencia de pectina a la dosis señalada, al emplear *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* al 0,006 % (T2) ($p < 0,05$). *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. en los tratamientos con pectina cítrica, también alcanzaron tiempos de supervivencia bastante altos, con valores de 105 y 152 días, al emplearse en dosis baja (0,006 %) y alta (0,012 %) (T6 y T8), respectivamente. Los resultados observados en cuanto al uso de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. y pectina cítrica, sobre la vida útil y supervivencia de probióticos viables, aún no se muestran reportados en otros estudios, pudiendo servir de gran aporte para lograr ventajas tecnológicas o funcionales en el desarrollo de nuevos alimentos simbióticos.

Palabras clave: Bebida láctea, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium*, pectina cítrica, vida útil.

ABSTRACT

To analyze the effect of of *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium* s. p. and citrus pectin in the shelf life time (SLT) of a fermented milk beverage, two different culture doses were used, with and without citrus pectin. *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, a culture commonly used in the production of yogurt, they were also used as a comparison. Both cultures were used at doses of 0.006 % and 0.012 % and incubated at their optimum activity temperature (44 and 37 °C, respectively), obtaining a total of 8 treatments (T1 to T8). The analysis of pathogenic bacteria (total coliforms) and of viable probiotics, carried out at intervals of 5 days during storage (8 °C), allowed, respectively, to predict the shelf life of the beverage, and the survival time of probiotics, using a kinetic model of order one. At the end of storage, all the beverages produced showed amounts of probiotics greater than 10^7 CFU/mL, absence of *E. coli*, total coliforms between 6 to 10 CFU/mL, molds and yeasts in the range of 12 to 28 CFU/mL, according to the requirements of the regulations. The beverages made with citrus pectin exhibited a longer shelf life, and also a longer probiotic survival time, with a lower value of the kinetic constant, than for the beverages prepared without this prebiotic. The longest equal shelf life (37 days) was observed with the use of *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium* s. p. at a dose of 0.012 % w/v and citrus pectin 0.34 % (T8), and the longest survival time of probiotics (161 days), was also observed in the presence of pectin at the indicated dose, when using *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* at 0.006 % (T2) ($p < 0.05$). *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium* s. p. in treatments with citrus pectin, they also reached quite high survival times, with values of 105 and 152 days, when used at low (0.006 %) and high (0.012 %) doses (T6 and T8), respectively. The results observed regarding the use of *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium* s. p. and citrus pectin, on the useful life and survival of viable probiotics, have not yet been reported in other studies, and may serve as a great contribution to achieve technological or functional advantages in the development of new symbiotic foods.

Keywords: Milk beverage, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium*, citrus pectin, shelf life.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1 Problema de la investigación	4
Planteamiento del problema	4
Diagnóstico.....	6
Pronóstico.....	6
Formulación del problema	6
Sistematización del problema.....	6
1.2 Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos específicos.....	7
1.3 Justificación	7
CAPITULO II.....	9
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	9
2.1 Marco conceptual.....	10
Yogur. Definición.....	10
Pasteurización.....	10
Inoculación.....	10
Incubación.....	11
Enfriamiento.....	12
Envasado	12
Aspectos microbiológicos y bioquímicos del yogur.	13
2.2 Marco Referencial.....	15
Microorganismos beneficiosos y mecanismo de acción	15
Prebióticos.....	18

Pectina. Estructura química.....	19
2.3 Marco legal	20
Requisitos fisicoquímicos y microbiológicos del yogur	20
CAPITULO III	21
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	21
3.1 Localización.....	22
3.2 Tipo de investigación.....	22
Exploratoria.....	22
Documental	22
3.3 Método de investigación	22
Método inductivo-deductivo	22
3.4 Fuentes de recopilación.....	22
3.5 Diseño de la investigación	22
Hipótesis	22
Hipótesis nula.....	23
Hipótesis alternativa.....	23
Diseño experimental – Modelo matemático.....	23
3.6 Mediciones o análisis.....	27
Análisis físico químicos	27
Análisis microbiológicos.....	27
3.7 Análisis estadístico.....	32
3.8 Recursos.....	32
Recursos humanos.....	32
Recursos materiales.....	33
CAPITULO IV	34
RESULTADOS Y DISCUSIONES	34
4.1 Control de indicadores de fermentación durante la elaboración de la bebida .	35

4.2	Tiempo de vida útil (TVU)	39
4.3	Tiempo de supervivencia de probióticos viables	42
4.4	Prueba de hipótesis (sobre los resultados de TVU)	48
4.5	Elección del mejor tratamiento. Comparación de medias: Prueba de Tukey. .	49
CAPITULO V.....		51
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		51
5.1	Conclusiones.....	52
5.2	Recomendaciones	52
BIBLIOGRAFÍA		53
CAPITULO VI.....		59
ANEXOS		59

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Diagrama de Ishikawa elaborado para el análisis de causa-efecto del problema.	5
Gráfico 2. Crecimiento simbiótico de las dos principales especies empleadas en la elaboración de yogur.	14
Gráfico 3. Factores que determinan el crecimiento simbiótico de <i>S. thermophilus</i> y <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	14
Gráfico 4. Comportamiento beneficioso de los microorganismos probióticos.	15
Gráfico 5. Estructura química de la pectina.	19
Gráfico 6. Proceso de elaboración de la bebida láctea.	26
Gráfico 7. Curva de crecimiento de bacterias probióticas	32
Gráfico 8. pH de la bebida durante la incubación.	35
Gráfico 9. °Brix de la bebida durante la incubación.	36
Gráfico 10. Acidez de la bebida durante la incubación.	36
Gráfico 11. Acidez de la bebida láctea durante el almacenamiento.	37
Gráfico 12. Curvas de crecimiento de coliformes totales durante el almacenamiento (8 °C).	39
Gráfico 13. Crecimiento de bacterias ácido lácticas durante 30 días de almacenamiento (8 °C) para todos los tratamientos.	42
Gráfico 14. Crecimiento de bacterias ácido lácticas durante 30 días de almacenamiento (8 °C), en las bebidas elaboradas sin pectina cítrica.	43
Gráfico 15. Crecimiento de bacterias ácido lácticas durante 30 días de almacenamiento (8 °C), en las bebidas elaboradas con pectina cítrica.	43
Gráfico 16. Ecuación de la recta, correspondiente a la etapa de muerte celular de <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> , y, <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p., en la bebida sin pectina, durante el almacenamiento (30 días/8 °C).	44
Gráfico 17. Ecuación de la recta, correspondiente a la etapa de muerte celular de <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> , y, <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p., en la bebida con pectina, durante el almacenamiento (30 días/8 °C).	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos del yogur.....	20
Tabla 2. Tratamientos a aplicar en el desarrollo de la bebida fermentada láctea.	25
Tabla 3. Tiempo de vida útil de las bebidas elaboradas.	41
Tabla 4. Tiempo total de supervivencia de <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> , o <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p., con y sin pectina cítrica.	47
Tabla 5. Análisis de varianza de un factor (tratamiento) para los resultados de tiempo de vida útil (días).....	48
Tabla 6. Resultados de TVU (días) para las bebidas elaboradas.....	49

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 395:2011. Leches Fermentadas. Requisitos.....	60
Anexo 2. ANOVA.....	67
Anexo 3. Fotografías tomadas durante el proceso de elaboración y análisis de la bebida.....	70

CÓDIGO DUBLÍN

Título	“ESTUDIO DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE UNA BEBIDA LÁCTEA SIMBIÓTICA, ELABORADA EMPLEANDO <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium s. p.</i> Y PECTINA CÍTRICA”
Autor	Luiggi Adrián Mendoza Intriago
Palabras clave	Bebida láctea, <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , pectina cítrica, vida útil.
Editorial	Equipo de Trabajo (docente-estudiante) - UTEQ, 2022.
Resumen	<p>A fin de analizar el efecto del uso de <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium s. p.</i> y pectina cítrica en el tiempo de vida útil (TVU) de una bebida láctea fermentada, se emplearon dos diferentes dosis de cultivo, con y sin pectina cítrica. También se empleó <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i>, cultivo comúnmente empleado en la elaboración de yogur, como comparativo. Ambos cultivos fueron empleados a dosis de 0,006 % y 0,012 % e incubados a su temperatura óptima de actividad (44 y 37 °C, respectivamente), obteniendo un total de 8 tratamientos (T1 a T8).</p> <p>El análisis de bacterias patógenas (coliformes totales) y de probióticos viables, realizado a intervalos de 5 días durante el almacenamiento (8°C), permitió respectivamente, predecir el tiempo de vida útil de la bebida, y el tiempo de supervivencia de probióticos, empleando un modelo de cinética de orden uno.</p> <p>Al final del almacenamiento, todas las bebidas elaboradas mostraron cantidades de probióticos mayores a 10⁷ Ufc/mL, ausencia de <i>E. coli</i>, coliformes totales entre 6 a 10 Ufc/mL, mohos y levaduras en el rango de 12 a 28 Ufc/mL, cumpliendo con los requisitos de la normativa.</p> <p>Las bebidas elaboradas con pectina cítrica exhibieron un mayor tiempo de vida útil, y también un mayor tiempo de supervivencia de probióticos, con un menor valor de la constante de cinética, que para las bebidas preparadas sin este prebiótico.</p> <p>El mayor tiempo de vida útil igual (37 días), se observó con el uso de <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium s. p.</i> a la dosis de 0,012 % p/v y pectina cítrica 0,34 % (T8), y el mayor tiempo de supervivencia de probióticos (161 días), se observó también en presencia de pectina a la dosis señalada, al emplear <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> al 0,006 % (T2) ($p < 0,05$).</p> <p><i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium s. p.</i> en los tratamientos con pectina cítrica, también alcanzaron tiempos de supervivencia bastante altos, con valores de 105 y 152 días, al emplearse en dosis baja (0,006 %) y alta (0,012 %) (T6 y T8), respectivamente.</p>

	Los resultados observados en cuanto al uso de <i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p. y pectina cítrica, sobre la vida útil y supervivencia de probióticos viables, aún no se muestran reportados en otros estudios, pudiendo servir de gran aporte para lograr ventajas tecnológicas o funcionales en el desarrollo de nuevos alimentos simbióticos.
Descripción	85 páginas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM.
URL	

Introducción

En los últimos años, la investigación en el ámbito alimentario ha pasado de concentrarse en los alimentos como fuente de energía y sustancias formadoras del cuerpo, a centrarse en la función y/o la aplicación de los componentes biológicamente activos de los alimentos en la salud humana, y en la elaboración de nuevos productos. Existe un incremento en el interés de los consumidores, por el papel activo de los alimentos, sobre el bienestar y la prolongación de la vida, así como en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles. Como resultado, se observa una mayor demanda en el consumo de bebidas simbióticas ([Alongi & Anese, 2021](#)), lo cual representa un desafío en el diseño de nuevos alimentos lácteos saludables.

Una bebida simbiótica es aquella obtenida mediante el uso combinado de microorganismos probióticos y compuestos prebióticos ([Virk et al., 2013](#)). Probióticos son aquellos microorganismos que cuando se ingieren a una cantidad adecuada, confieren algún beneficio a la salud del huésped ([Hill et al., 2014](#)), mientras que los prebióticos se definen como componentes que, metabolizados selectivamente por microorganismos, pueden proporcionar beneficios para la salud del anfitrión ([Gibson et al., 2010](#)).

Muchos de los cultivos conocidos como probióticos, son empleados para elaborar alimentos funcionales. Alimentos funcionales son productos integrales, fortificados, enriquecidos o mejorados que pueden proporcionar beneficios para la salud más allá de la provisión de nutrientes esenciales (e.g. vitaminas y minerales), cuando son consumido a niveles eficaces como parte de una dieta variada de forma regular ([Hasler et al., 2002](#)).

Entre los probióticos más conocidos podemos citar *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, los cuales han sido ampliamente estudiados y siguen siendo de gran aplicación, pese a que el entorno exige alimentos, cada vez más novedosos y saludables ([Granato et al., 2017](#)). En este sentido, existen cultivos probióticos, aún muy poco empleados en tecnología alimentaria, como son los *Lactobacillus rhamnosus* y las *Bifidobacterium s. p.* cuyo comportamiento podría presentar características fermentativas, condiciones de empleo y almacenamiento peculiares.

Cabe señalar que, según la normativa, es importante que exista suficiente cantidad de probióticos en una bebida, hasta el final de su tiempo de vida útil ([Hill et al., 2014](#), [INEN](#),

2011), para que la misma se pueda considerar un alimento funcional. Por otro lado, los prebióticos (e.g. la fibra soluble) pueden actuar como nutrientes para los microorganismos probióticos, contribuyendo a su crecimiento, o mejorando su funcionalidad (Gibson et al., 2004), por lo cual es necesario estudiar la interacción entre diferentes cepas y prebióticos vegetales. Adicionalmente, en estudios *in vivo* realizados con ratones, se ha observado que la pectina cítrica, posee cierto efecto sobre indicadores macroscópicos y bioquímicos, que señalan su potencial para mitigar la enfermedad inflamatoria intestinal (Pacheco et al., 2018a, 2018b, 2019).

Debido a lo mencionado, en este trabajo se ha determinado el tiempo de vida útil de una bebida láctea simbiótica empleando *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium* s. p. y pectina cítrica, en base a la construcción de curvas de crecimiento microbiano, según modelos de cinética de crecimiento microbiano, para verificar cumplimiento de estándares microbiológicos exigidos por la legislación.

Nota: El estudio del proceso fermentativo y de las características sensoriales de la bebida, ha sido abordado en otro trabajo de titulación paralelo a este.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Problema de la investigación

Planteamiento del problema

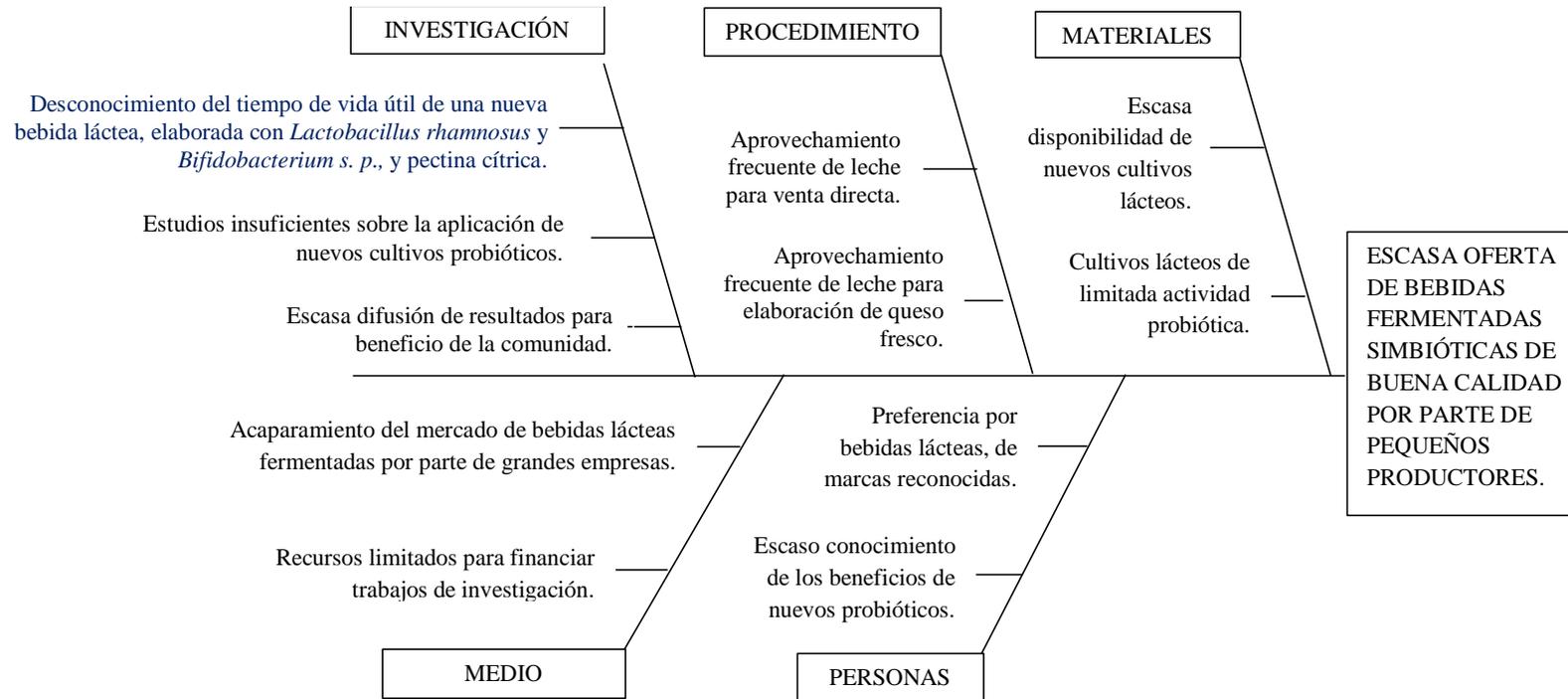
El principal problema, a nivel micro, que ha motivado esta investigación es la “escasa oferta de bebidas fermentadas probióticas de buena calidad por parte de pequeños productores”.

Luego de realizar un análisis de causa-efecto, siguiendo la metodología de Ishikawa (Ovalles Acosta et al, 2017), hemos podido observar que las causas del problema en mención se hallan en el ámbito investigativo, relacionadas con el procedimiento aplicado habitualmente por los pequeños productores de lácteos, la disponibilidad de materiales, la respuesta del medio ambiente, y la preferencia del consumidor (Gráfico 1).

Son muchas las causas que originan la escasa oferta de bebidas fermentadas probióticas de buena calidad por parte de pequeños productores en nuestro medio, no obstante, hemos determinado que varias de ellas, podrían reducirse o minimizarse, trabajando sobre una subcausa observada el ámbito de la investigación, identificada como: “desconocimiento del tiempo de vida útil de una nueva bebida láctea simbiótica, elaborada empleando como probiótico *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.*, y como prebiótico, pectina cítrica”.

Por lo tanto, esta investigación se ha enfocado en obtener curvas de crecimiento para estas bacterias ácido lácticas, en presencia de un prebiótico aún muy poco empleado en el desarrollo de alimentos funcionales, como es la pectina cítrica; para definir la vida útil de esta nueva bebida láctea; comparándolo a la vez, con el tiempo de anaquel observado al emplear un cultivo tradicional de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

Grafico 1. Diagrama de Ishikawa elaborado para el análisis de causa-efecto del problema.



Elaborado por: Luiggi Mendoza, Génesis Quispe y M. Teresa Pacheco, 2021.

Diagnóstico

El desarrollo de nuevos productos saludables y el emprendimiento en el sector alimentario, ha mostrado un interés en aumento, por lo que, este estudio está enfocado en elaborar una bebida láctea simbiótica, es decir empleando probióticos y prebióticos distintos a los habituales, y determinar su tiempo de vida útil, como una característica de calidad, que sustente, su posible potencial funcional.

Pronóstico

Al realizar esta investigación y difundir sus resultados, la industria alimentaria podrá disponer de mayor información sobre el efecto de la utilización de cepas microbianas diferentes a las comúnmente empleadas, con lo cual se promoverá el desarrollo de nuevos productos y el emprendimiento en el sector de los alimentos funcionales, aportando así, al crecimiento científico y económico del país.

Formulación del problema

¿Cómo influirá el uso de *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium s. p.*, y pectina cítrica sobre el tiempo de vida útil de una bebida láctea fermentada?

¿Qué diferencia existirá entre el tiempo de vida útil de una bebida láctea fermentada empleando el cultivo convencional (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termophilus*), y el tiempo de vida útil de la bebida elaborada con *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.*?

Sistematización del problema

¿Cómo se desarrollará el cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* en comparación con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termophilus* durante el almacenamiento de la bebida?

¿Cuál sería el resultado del efecto de la inclusión de pectina cítrica, sobre el desarrollo de bacterias ácido-lácticas?

1.2 Objetivos

Objetivo General

- Analizar el efecto del uso de *Lactobacillus rhamnosus* y *bifidobacterium s. p.* y pectina cítrica sobre el tiempo de vida útil de una bebida láctea fermentada.

Objetivos específicos

- Comparar el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* frente a *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termóphilus*, durante el almacenamiento de una bebida simbiótica.
- Determinar el efecto de la inclusión de pectina cítrica sobre la supervivencia y/o crecimiento de bacterias ácido-lácticas.
- Establecer la dosis de cultivo láctico, que permita el mayor tiempo de conservación de una bebida simbiótica.

1.3 Justificación

Los yogures simbióticos (SY) son alimentos naturales con efectos beneficiosos potenciales de salud, prevención y control de enfermedades crónicas a través de la acción sinérgica de bacterias probióticas y compuestos prebióticos (Fernández & Marette, 2017).

Estudios recientes, han evidenciado logros clínicos relacionados con el consumo de SY en poblaciones pediátricas y adultas sanas. También se ha abordado algunos desafíos futuros y soluciones interesantes para aumentar los efectos nutricionales saludables de estos productos lácteos. Se ha observado que el uso de un patrón de nutrición basado en SY en los niños, puede aumentar considerablemente la inmunidad de su cuerpo con una mejora en el funcionamiento social y escolar. El consumo de SY no solo reduce los problemas digestivos infantiles, sino que también disminuye notablemente la duración de la enfermedad y la gravedad de los síntomas. Se ha puntualizado que aumentar la cantidad de bifidobacterias y lactobacilos en el tracto gastrointestinal (GI) de adultos sanos que

consumen SY puede reducir significativamente las bacterias patógenas en las heces. La ingesta regular de SY con biodisponibilidad mejorada de compuestos bioactivos en un tiempo de tránsito intestinal corto reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular entre los adultos hipercolesterolémicos. Además, se ha evaluado una mejora significativa en el estado de salud de los pacientes adultos con síndrome del intestino irritable y enfermedad del hígado graso no alcohólico después de ingerir este suplemento biofuncional. La recuperación completa sin complicaciones adicionales durante el período de seguimiento en pacientes de edad avanzada también se puede obtener mediante la implementación de la guía dietética basada en SY (Mofid et al. 2020).

No obstante, podría suceder que los probióticos añadidos no alcancen un crecimiento tal, que les permita mantener un suficiente número, hasta el momento del consumo del producto elaborado, ya sea debido a características propias de la cepa en cuestión, a las condiciones de almacenamiento, o a las condiciones de empleo durante el proceso de obtención de la nueva bebida simbiótica; o que, los prebióticos utilizados en alimentos simbióticos, se degraden en cierto grado, a carbohidratos simples, antes de que el producto sea consumido, en cuyo caso no lograrían servir íntegramente como nutriente para los probióticos luego de la digestión.

Por otro lado, los pequeños productores de leche en nuestro medio, destinan esta importante materia prima a la venta directa, o en el mejor de los casos, a la elaboración de quesos o yogur, que no siempre posee la calidad funcional esperada, pues se emplean cepas cuya actividad debe conocerse en detalle, antes de aplicar un proceso habitual de elaboración, para garantizar el número de microorganismos supervivientes que señala la norma, al final de la vida útil del producto. Al mismo tiempo, el mercado consumidor de productos saludables exige variedad e innovación en la oferta, de modo que; se vuelve imperante desarrollar nuevos alimentos funcionales lácteos, siendo una alternativa para ello, ser la introducción de cepas no convencionales como *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* y prebióticos como la pectina, en la tecnología alimentaria.

Pero, para garantizar la cantidad de microorganismos viables al momento del consumo, es de vital importancia analizar las curvas de crecimiento de estos microorganismos, en interacción con el polisacárido funcional (prebiótico), para estimar la vida útil de la bebida simbiótica, y en base a ello, la dosificación de cultivo más recomendada.

CAPITULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Marco conceptual

Yogur. Definición

Se entiende por yogur el producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada pasteurizada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo, proteínas de leche y/u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche (Códex alimentarius, 2003).

Pasteurización

Consiste en eliminar los microorganismos patógenos de la leche. Puede aplicarse a temperaturas de 80-85°C durante 30 minutos en sistemas discontinuos y de 90-95°C durante alrededor de 5 minutos en sistemas de flujo continuo.

La pasteurización destruye la mayoría de la microflora innata de la leche, lo que permite un campo libre para los cultivos lácticos que se añaden posteriormente. Para que el yogur adquiera su típica consistencia no sólo es importante que tenga lugar la coagulación ácida, sino que también se ha de producir la desnaturalización de las proteínas del suero, en especial de la β -lactoglobulina. Como es sabido, esto se produce a temperaturas aproximadas a 75 °C, consiguiéndose los mejores resultados de consistencia (en las leches fermentadas) a una temperatura entre 85 y 95 °C. La interacción de la caseína *k* y la β -lactoglobulina provocada por el tratamiento térmico controlado (85°C/30 minutos o 90°C/15 minutos) y favorecida por el pH y la presencia de calcio, crea una nueva estructura que tiene una mejor capacidad de absorción de agua que dará como resultado un gel más firme y terso, de mayor viscosidad que no presenta sinéresis (exudación de suero).

Inoculación.

Para poder añadir el cultivo iniciador, la leche ha de enfriarse hasta una temperatura determinada. Esta temperatura es la misma que la de incubación y depende de las características del cultivo iniciador. Comúnmente esta temperatura está comprendida

entre 40 y 45°C, pero si se pretende el desarrollo de *Bifidobacterium spp.* o de otras bacterias probióticas, la temperatura óptima es de 37°C. Comúnmente, se inocula con *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus* liofilizados, congelados o en forma de una suspensión líquida.

En el yogur se pretende que la tasa inicial de microorganismos sea bastante elevada, del orden de 10^7 Ufc/mL. El tiempo de fermentación puede variar de 2 a 3 horas, o más, dependiendo del cultivo.

En lo que respecta al manejo del cultivo iniciador, en la actualidad, la industria suele adquirir los cultivos madre y propagarlos para conseguir el volumen de inóculo necesario para su producción. Lo habitual es que la propagación se realice en dos fases bien distintas. La primera, a nivel de laboratorio, trabajando con volúmenes no muy grandes y con un medio de propagación (leche) estéril, y la segunda a nivel de planta, con grandes volúmenes de leche, habitualmente pasteurizada. El iniciador se propaga en leche entera o, más frecuentemente, en leche desnatada. En ciertos casos, la industria prefiere no propagar los iniciadores y adquirirlos en cantidad suficiente para inocularlos directamente a un volumen definido de leche para obtener yogur o el producto lácteo de que se trate. Con este sistema tan cómodo se evitan innumerables problemas de iniciadores inactivos, desequilibrados, contaminaciones con fagos e incluso es posible cierto ahorro, ya que la industria no tiene que montar la instalación para la propagación del iniciador.

Incubación.

La temperatura y el tiempo de incubación, además de la cantidad de inóculo, no sólo influyen en la acidez final sino también en la relación entre bacterias. En el caso del cultivo del yogurt con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, una menor cantidad de inóculo y bajas temperaturas favorecen al *Streptococcus thermophilus* y en el caso inverso al *Lactobacillus bulgaricus*. En la elaboración de yogurt es preferible usar un corto tiempo de procesamiento, y para eso se regula la temperatura y la cantidad de inóculo. Con estos cultivos por lo general se usan temperaturas de incubación entre 42 y 45 °C, de 2 a 3% de cultivo y un tiempo de incubación de 2 a 3 horas.

La proporción inicial de ambas especies (1/1) se modifica rápidamente tras la siembra, dado que *St. thermophilus* entra enseguida en la fase de crecimiento exponencial, mientras

que *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* debe esperar a que se acumule ácido láctico para comenzar su crecimiento. No obstante, el estreptococo ve frenado su desarrollo por la acidez generada antes que el lactobacilo y el resultado global es que al alcanzarse un grado de acidez del 0,90 - 0.95% en términos de ácido láctico, se ha instaurado de nuevo el equilibrio entre ambas especies. En un principio el pH (comúnmente de 6,8) es favorable para el *Streptococcus termophilus* que se desarrolla más rápido produciendo ácido fórmico y dióxido de carbono, bajando así el pH hasta 5 aproximadamente. De este modo se estimula el crecimiento del *Lactobacillus bulgaricus*. Al mismo tiempo, el desarrollo del *Lactobacillus bulgaricus* favorece el crecimiento del *Streptococcus termophilus* por la producción de nutrientes como ácido láctico, péptidos y aminoácidos como la valina, triptófano, metionina, etc.

Determinada la cantidad de inóculo y la temperatura óptima de crecimiento, queda determinado el tiempo y la temperatura que se debe controlar, para no generar un exceso de ácido láctico.

Enfriamiento

Enfriar hasta la temperatura óptima de inoculación (42-45°C) permite la actividad y la supervivencia de las bacterias. Luego de la incubación, el enfriamiento ayuda a frenar la actividad del iniciador y sus enzimas, para evitar que la fermentación continúe. Se recomienda que la temperatura final del yogur no exceda los 5°C; de esta forma, la coexistencia de pH bajo y temperaturas de refrigeración actúan sinérgicamente para mantener el yogur en un estado apropiado para su consumo durante 15 o 20 días, al menos.

La refrigeración adecuada y la conservación de la cadena de frío aseguran la calidad sanitaria del producto desde su fabricación hasta el consumo.

Envasado

Los envases preferentemente opacos, para proteger las vitaminas de la luz, facilitar la impresión del envase y disimular la posible turbidez. El envasado puede realizarse antes de la incubación, pudiendo agregar, por ejemplo, frutas según corresponda (yogur de consistencia firme) o tras la fermentación (yogur batido y líquido). Se controla el cerrado

hermético del envase para mantener la inocuidad del producto. Se debe controlar que el envase y la atmósfera durante el envasado sean estériles (Ordoñez Pereda, 1998).

Aspectos microbiológicos y bioquímicos del yogur.

Cultivos iniciadores: Un cultivo iniciador puede estar formado por uno o más tipos de microorganismos y generalmente por varias cepas de la misma especie. Las bacterias se seleccionan por su capacidad de producir ácido láctico a partir de lactosa y por otras aptitudes metabólicas que juegan un papel importante en el sabor y aroma del producto terminado. En el yogur participan:

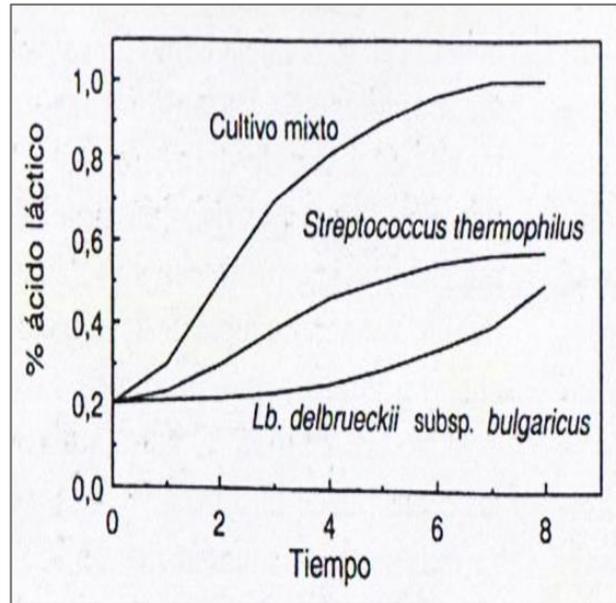
- *Streptococcus thermophilus*: producen L (+) lactato, acetaldehído y diacetilo a partir de la lactosa presente en la leche, y algunas cepas producen exopolisacáridos.
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: producen D (+) lactato y acetaldehído a partir de la lactosa presente en la leche, y algunas cepas producen también exopolisacáridos.

Estas dos bacterias crecen simbióticamente. El resultado del crecimiento conjunto es que se acelera el metabolismo y se logra la misma concentración de ácido láctico (Gráfico 2) y de otros metabolitos en un tiempo menor que si ambos crecieran por separado. De esta forma, el tiempo de incubación necesario para obtener yogur se reduce a unas 4 horas a 42 °C. En la actualidad, este desarrollo simbiótico está bien documentado. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* libera, a partir de las proteínas lácteas, diversos aminoácidos (entre ellos valina, ácido glutámico, triptófano y metionina) y algunos péptidos que estimulan el crecimiento de *S. thermophilus*. A su vez, esta bacteria produce formiato durante el metabolismo de la lactosa y anhídrido carbónico a partir de la urea presente en la leche. Ambos metabolitos estimulan el desarrollo del lactobacilo (Gráfico 3) (Jay, 2000).

La generación del aroma del yogur es igualmente más pronunciada en el cultivo mixto, siendo *L. delbrueckii* subsp. *bulgarricus* la especie fundamentalmente implicada en la liberación de acetaldehído. Los principales productos metabólicos de los microorganismos iniciadores son ácido láctico, compuestos del sabor y aroma (acetaldehído y diacetilo) y a veces exopolisacáridos. Cada cepa tiene una fisiología

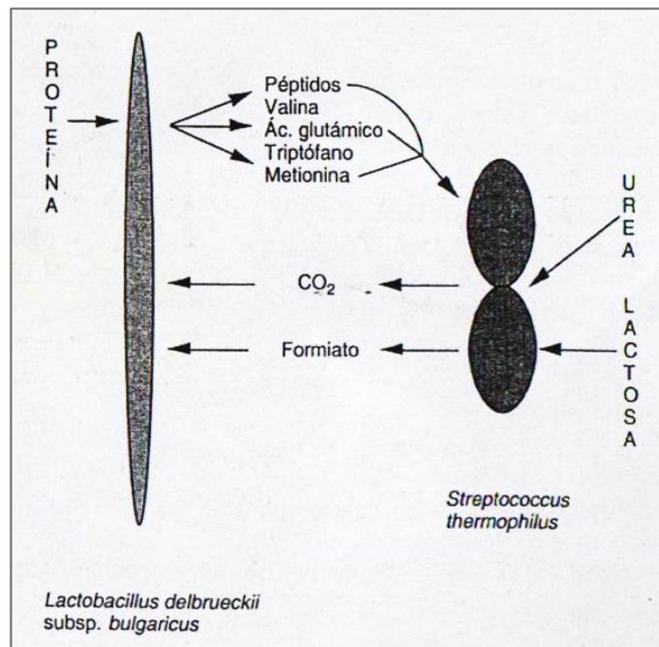
determinada que la hará más o menos aromática, más productora de exopolisacáridos, etc. (Badui, 2006).

Gráfico 2. Crecimiento simbiótico de las dos principales especies empleadas en la elaboración de yogur.



Tomado de: Jay, 2000.

Gráfico 3. Factores que determinan el crecimiento simbiótico de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.



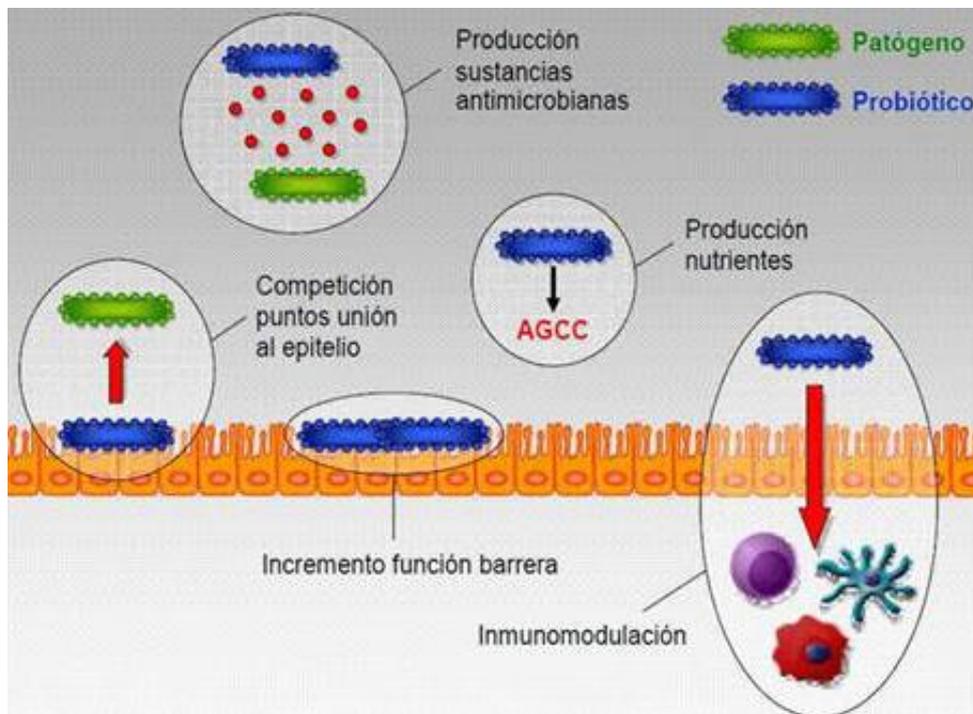
Tomado de: Jay, 2000.

2.2 Marco Referencial

Microorganismos beneficiosos y mecanismo de acción

Los microorganismos beneficiosos tienen una larga historia especialmente las bacterias conocidas como probióticas. Se conocen diversos efectos beneficiosos entre las que destacan la protección contra agentes patógenos y el efecto inmunomodulatorio, pero con el avance de los estudios en este campo cada día se conocen más y se ha llegado a describir cómo funcionan, por ejemplo, la supresión de microorganismos patógenos se debe a que las bacterias probióticas producen sustancias antimicrobianas entre las que se encuentra el peróxido de hidrógeno, el diacetilo, la reuterina, ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido acético, ácido butírico; algunas especies de bacterias también producen sustancias de naturaleza proteica conocidas como bacteriocinas (Gráfico 4).

Gráfico 4. Comportamiento beneficioso de los microorganismos probióticos.



Tomado de: Delgado F. R., 2013.

También tienen la capacidad de disminuir el colesterol sérico al inhibir su síntesis y reducir las lipoproteínas de baja densidad impidiendo su absorción en el intestino delgado; otro beneficio es que favorecen la absorción de nutrientes pues los probióticos promueven el “equilibrio” del microbiota (diversidad de especies microbianas en el

intestino), ayudando al procesamiento de azúcares no digeribles, metabolismo de proteínas complejas, síntesis de vitaminas y producción de energía. Cuando ciertos azúcares (oligosacáridos), que sirven de alimento para estas bacterias, son administrados en la dieta estimulan la absorción de minerales como el calcio, el fósforo y el magnesio, siendo mayor este efecto en fase de crecimiento rápido cuando la demanda de calcio es alta.

El efecto inmunomodulador del microbiota y los probióticos consiste en la modulación de la función de las células dendríticas tipo 1 (CD1) que inducen células efectoras Th1, células T reguladoras y la activación de células NK, todas ellas responsables de la respuesta inmunitaria en el intestino, es decir que son las células de defensa contra enfermedades.

Recientemente la investigación de los efectos de estas bacterias se ha ampliado y con base en estudios científicos se ha descubierto que estas bacterias son capaces de influir en la conducta del hospedero en distintos ámbitos como el aprendizaje, estados de ansiedad y conductas alimentarias (Delgado F. R. 2013).

Lactobacillus bulgaricus

Se caracterizan por su alta temperatura de crecimiento, con una temperatura óptima de 40 – 43 °C, mínima de 22 °C y máxima de 52.5 °C. Su resistencia frente a antibióticos es mayor que la de *Streptococcus thermophilus*. Se inhibe ante 0.3 - 0.6 U.I. de penicilina/mL de leche. Es una bacteria homo fermentativa, que produce hasta 1.7 % de D (-) ácido láctico en leche. Pequeñas cantidades de compuestos secundarios incluyen compuestos carbonílicos, etanol y ácidos volátiles.

Streptococcus thermophilus

Posee un amplio rango de crecimiento, con una temperatura óptima de 40 – 45 °C, mínima de 20 °C y máxima de 50 °C. Es muy sensible a sustancias inhibitoras. Es inhibido por 0.01 U.I. de penicilina o 5 mg de estreptomina/mL de leche. Bacteria láctica del grupo homo fermentativo, produce 0,7 - 1,0 % de L (+) ácido láctico.

Lactobacillus rhamnosus

Se ha demostrado que *Lactobacillus rhamnosus*, un miembro del microbiota comensal humana, es importante para la salud humana, ya que equilibra el sistema microecológico del intestino y proporciona inmunomodulación local y sistémica (Peng et al., 2014). *Lactobacillus rhamnosus* puede tolerar el ambiente dentro del tracto digestivo del animal, colonizar los intestinos de humanos y animales y puede mejorar la respuesta inmune sistémica en el huésped (Lebeer et al., 2012). Muchos estudios han demostrado que *Lactobacillus rhamnosus* y sus componentes de la pared celular pueden promover los niveles secretores de IL-6, IL-10 y TNF- α por las células mononucleares de sangre periférica humana y activar el sistema inmunológico del cuerpo (Di Caro et al., 2005; Ludwig et al., 2018). Se ha descubierto que la proteína p40 codificada por *Lactobacillus rhamnosus* puede proteger la inmunidad intestinal activando la vía de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR (Yan et al., 2011).

Bifidobacterium

Las especies de *Bifidobacterium* son bacterias grampositivas, anaerobias en forma de bastoncillo, catalasa-negativas que pertenecen a la rama de las actinobacterias. El pH ideal para el crecimiento de las especies de *Bifidobacterium* es 6-7, a un pH de aproximadamente 4.5-5 y por encima de 8-8.5, no se observa crecimiento. Se han encontrado especies de bacterias bífidó en seres humanos, animales de sangre caliente y abejas. La abundancia de especies de *Bifidobacterium* depende de la edad y la dieta. Se asientan en el tracto gastrointestinal poco después del nacimiento, forman la cepa dominante en el tracto gastrointestinal después del nacimiento, y su número disminuye con la edad (Langhendries, et al. 1995, Chopra, et al. 2015). La principal diferencia entre las especies de *Bifidobacterium* y otras especies de *Lactobacillus* está en la fuente de nitrógeno, de manera que *Bifidobacterium* puede crecer en ambientes que contienen amonio (nitrógeno mineral), en contraste, otras bacterias del ácido láctico necesitan una fuente de nitrógeno orgánico como péptidos para multiplicarse (Gomes et al., 1998, Guarner et al., 2003).

Narvishi et al. (2021) compararon los genomas y proteomas de 12 *Bifidobacterium* y 46 especies de *Lactobacillus*. Examinaron especies seleccionadas de *Lactobacillus* para determinar la resistencia a las sales biliares, la resistencia al ácido y al pH, la pepsina y

resistencia a la enzima tripsina y resistencia a los antibióticos. Los resultados mostraron que las especies de *Lactobacillus* tienen más diversidad y abundancia de bacteriocina en comparación con las especies de *Bifidobacterium*. En particular, *L. sakei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum* y *L. casei* tuvieron la mayor inhibición de patógenos; respectivamente; por lo que sugirieron una combinación de estos para controlar los patógenos gastrointestinales.

A pesar de la posible funcionalidad de los *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium*, su uso combinado, permanece aún muy poco explorado en el desarrollo de nuevos alimentos simbióticos.

Prebióticos

Un prebiótico se ha descrito como "un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon y, por tanto, mejora la salud del huésped" (Glen & Roberfroid, 1995), esta definición se mantuvo durante 15 años, y en 2008, la Sexta Reunión de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) se definió a los "prebióticos dietéticos" como "un ingrediente fermentado selectivamente que da como resultado cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, otorgando así un beneficio (s) sobre la salud del anfitrión" (Gibson et al., 2010).

Los siguientes criterios se utilizan para clasificar un compuesto como prebiótico: (i) debe ser resistente a pH ácido del estómago, no puede ser hidrolizado por enzimas de mamíferos y tampoco debe ser absorbido en el tracto gastrointestinal, (ii) puede ser fermentado por el microbiota intestinal, y (iii) el crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales puede ser estimulada selectivamente por este compuesto y este proceso mejora la salud del anfitrión (Gibson et al., 2010).

Aunque no todos los prebióticos son carbohidratos, se pueden aprovechar los dos criterios siguientes para distinguir la fibra de los prebióticos derivados de carbohidratos: (i) las fibras son carbohidratos con un grado de polimerización (DP) igual o superior a 3 y (ii) las enzimas endógenas en el intestino delgado no puede hidrolizarlos. Se debe tener en cuenta que la solubilidad o fermentabilidad de la fibra no es crucial (Howlet et al. 2010, Slavin et al., 2013).

Tipos de prebióticos

Hay muchos tipos de prebióticos. La mayoría de ellos son un subconjunto de grupos de carbohidratos y son en su mayoría carbohidratos oligosacáridos (OSC). Los artículos relevantes son principalmente sobre OSC, pero hay también algunas pruebas que demuestran que los prebióticos no son solo carbohidratos.

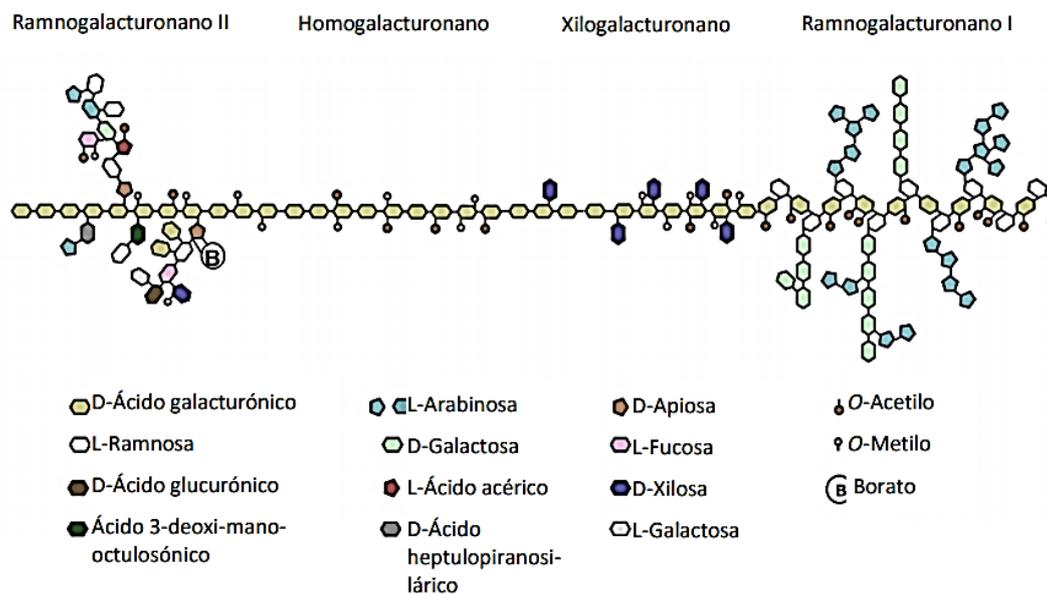
Entre los prebióticos, se puede citar los: fructanos, galacto-oligosacáridos, oligosacáridos derivados de almidón y glucosa, oligosacáridos de tipo no carbohidrato, y otros oligosacáridos (Davani-Davari, et al., 2019).

Dentro del grupo de “otros oligosacáridos” están los que se originan a partir de un polisacárido conocido como pectina.

Pectina. Estructura química

La pectina es un polisacárido presente en las membranas celulares de las células vegetales. De manera general, la pectina está conformada por monómeros de carbohidratos, unidos como se ilustra en la siguiente imagen (Gráfico 5).

Gráfico 5. Estructura química de la pectina.



Tomada de: Pacheco et al. 2019b,
Adaptada a partir de: Harholt et al., 2010.

Los oligosacáridos producidos a partir de pectina se llaman pepto-oligosacárido (POS). Los pepto-oligosacáridos, se basan en la extensión de ácido galacturónico (homogalacturonano) o ramnosa (ramnogalacturonano I). Los grupos carboxilo pueden sustituirse con esterificación con metilo, y la estructura puede acetilarse en el C2 o C3. Varios tipos de azúcares (por ejemplo, arabinosa, galactosa y xilosa) o ácido ferúlico están unidos a las cadenas laterales. Sus estructuras varían significativamente según la fuente vegetal y el proceso de extracción (Yoo et al., 2012).

2.3 Marco legal

Requisitos fisicoquímicos y microbiológicos del yogur

Según la norma NTE INEN 2 395:2011, las leches fermentadas deben cumplir las siguientes especificaciones (Tabla 1):

Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos del yogur

Requisitos	Tipo I		Tipo II		Tipo III	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Contenido de grasa	3.0	...	1.0	<3.0	...	<1.0
Acidez, %	0.6	1.5	0.6	1.5	0.6	1.5
Proteína, %	2.7	...	2.7	...	2.7	...
Ensayo de fosfatasa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: NTE INEN 2 395:2011

Según la norma señalada, el yogur sin tratamiento térmico posterior a la fermentación deberá contener mínimo 10^7 Ufc/g correspondiente a la suma de microorganismos del cultivo empleado y ausencia de *E. coli*, como los aspectos microbiológicos más relevantes.

CAPITULO III
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Localización

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y en el Laboratorio de Bromatología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, localizada en el Km 7 ½ de la vía Quevedo – El Empalme, Recinto San Felipe, entrada al Cantón Mocache, Provincia de Los Ríos – Ecuador.

3.2 Tipo de investigación

Exploratoria

Se armó un diseño experimental 2³ que permitió interrelacionar las diferentes variables de estudio (probióticos y prebiótico) para la elaboración de una bebida láctea fermentada aún no reportada en otros estudios y la determinación de su vida útil mediante el conteo de bacterias ácido lácticas.

Documental

La información de base para esta investigación, se obtuvo de libros, artículos científicos, folletos y normas relacionadas con el desarrollo de bebidas lácteas fermentadas.

3.3 Método de investigación

Método inductivo-deductivo

Se empleó este método al construir y analizar las curvas de crecimiento de microorganismos en la bebida y determinar el tiempo de vida útil, para en base a los resultados, proponer la formulación más recomendable para la elaboración de una nueva bebida simbiótica de buena calidad.

3.4 Fuentes de recopilación

Libros, artículos y revistas científicas, páginas web, folletos.

3.5 Diseño de la investigación

Hipótesis

Hipótesis nula

H₀: El tipo de probiótico, dosis del cultivo y prebiótico (pectina cítrica), no influyen sobre el tiempo de vida útil de la bebida láctea.

Hipótesis alternativa

H₁: El tipo de probiótico, dosis del cultivo y prebiótico (pectina cítrica), si influyen sobre el tiempo de vida útil de la bebida láctea.

Diseño experimental – Modelo matemático

Para interrelacionar las variables de interés, consideradas en las hipótesis planteadas, se armó un **diseño factorial 2ⁿ**, que, al considerar 3 variables independientes o factores, y dos niveles por cada uno ([sección 3.5.3](#)), es específicamente un **diseño 2³**. Las respuestas experimentales de este tipo de diseño, se representan con el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + R_l + E_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijk} = Respuestas del ensayo

u = Efecto global atribuible al material experimental

A_i = Efecto principal del factor A; niveles $i = 1,2$

B_j = Efecto principal del factor B; niveles $j = 1,2$

C_k = Efecto principal del factor C; niveles $k = 1,2$

$(AB)_{ij}$ = Efecto de interacción doble entre los factores A y B

$(AC)_{ik}$ = Efecto de interacción doble entre los factores A y C

$(BC)_{jk}$ = Efecto de interacción doble entre los factores B y C

$(ABC)_{ijk}$ = Efecto de interacción triple entre los factores A, B y C

R_l = Efecto de la réplica, ejemplo para un duplicado $l = 2$

E_{ijkl} = Efecto residual

Factores y niveles de estudio. Tratamientos.

El diseño experimental planteado (2³), estuvo conformado por los siguientes factores y niveles de estudio, obteniendo un total de 8 tratamientos (Tabla 2).

Factor A: Tipo de cultivo

a1: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (temperatura óptima de incubación a 44 °C)

a2: *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (temperatura óptima de incubación a 37 °C)

Factor B: Dosis del cultivo

b1: 0,006 %

b2: 0,012 %

Factor C: Cantidad de prebiótico (pectina cítrica)

c1: 0 %

c2: 0,34 %

El nivel más bajo del factor B, es decir la menor cantidad de cultivo a emplear, fue establecida tomando como punto de partida la dosis habitual recomendada por la casa comercial (Chr. Hansen) para el cultivo convencional: 0,006 % p/v.; y para establecer el nivel más alto del factor B, o mayor cantidad de cultivo, se consideró el doble de la dosis recomendada, es decir: 0,006 % = 0,012 % p/v.

Los niveles del factor C, se establecieron como 0 % p/v y 0,34 % p/v; la dosis más baja, se consideró a fin de disponer de resultados comparativos en ausencia, o presencia de pectina; y la dosis más alta se fijó en base a ensayos previos.

Tabla 2. Tratamientos a aplicar en el desarrollo de la bebida fermentada láctea.

N°	Código	Descripción
1	a1b1c1	<i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> al 0,006 %, sin pectina
2	a1b1c2	<i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> al 0,006 %, con pectina al 0,34 %
3	a1b2c1	<i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> al 0,012 %, sin pectina
4	a1b2c2	<i>L. bulgaricus</i> y <i>S. thermophilus</i> al 0,012 %, con pectina al 0,34 %
5	a2b1c1	<i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p. al 0,006 %, sin pectina
6	a2b1c2	<i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p. al 0,006 %, con pectina al 0,34%
7	a2b2c1	<i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p. al 0,012 %, sin pectina
8	a2b2c2	<i>L. rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium</i> s. p. al 0,012 %, con pectina al 0,34%

Elaborado por: Génesis Quishpe, Luiggi Mendoza y M. Teresa Pacheco, 2021.

- **Procedimiento aplicado para la elaboración de la bebida**

Para elaborar la bebida, al momento de la recepción de la leche se analizaron °Brix, pH y acidez para verificar que los valores de estas características físico químicas estuvieran dentro de sus límites señalados por la normativa de calidad para leche cruda de vaca ([NTE INEN 9:2012](#)).

Seguidamente se aplicó un filtrado para separar materias extrañas de la leche. Se añadió el prebiótico (pectina cítrica) al 0,34 % p/v en los tratamientos correspondientes y se pasteurizó a 63 °C /30 minutos.

La leche pasteurizada fue dejada en reposo para enfriar hasta la temperatura óptima de incubación para cada cultivo: 44 °C en el caso de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, y 37 °C en el caso de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p.

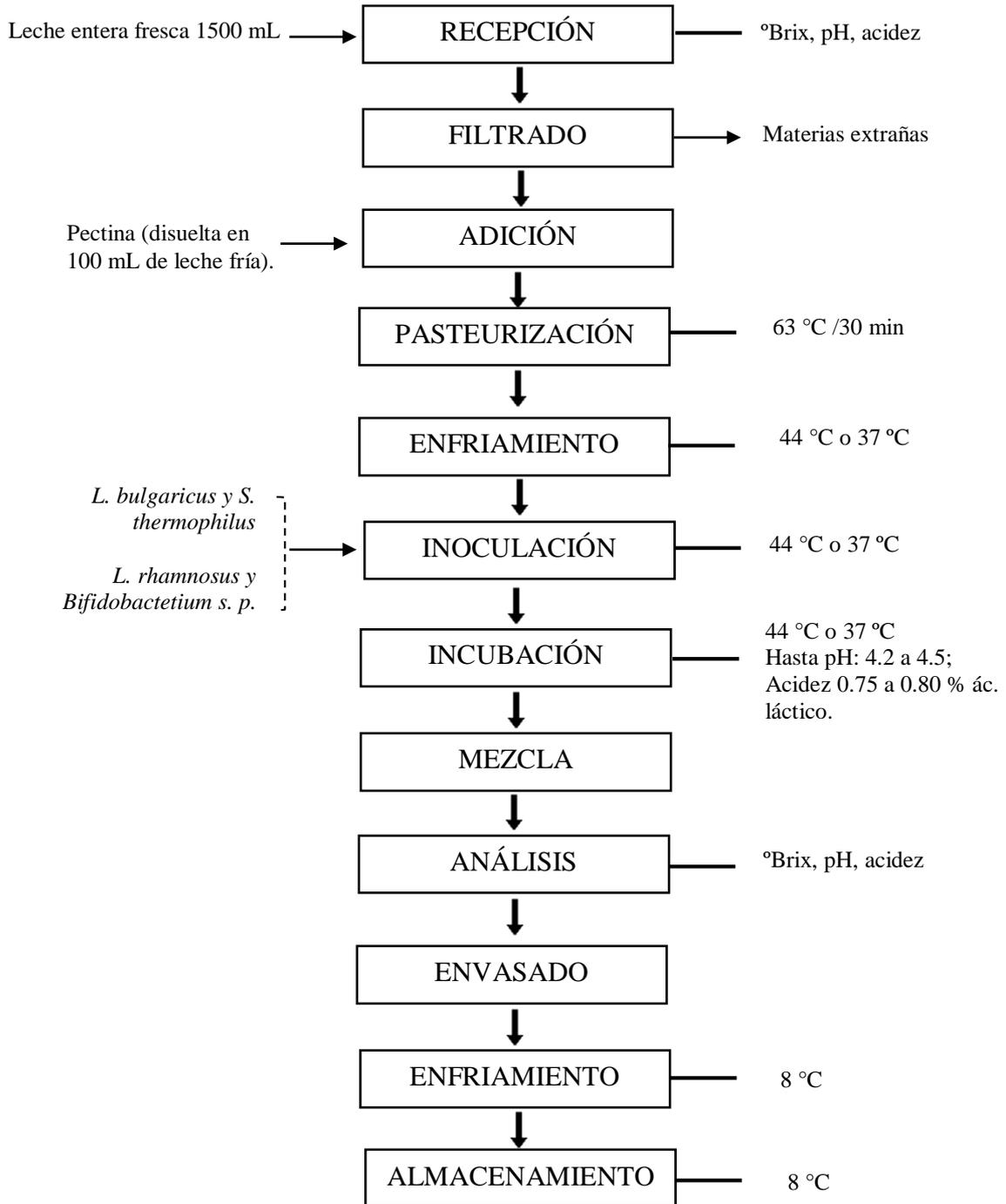
Una vez alcanzada la temperatura esperada, se procedió a inocular, es decir a agregar el cultivo lácteo de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* o *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. a la dosis respectiva (0,006 % o 0,012%) según el tratamiento ([Tabla 2](#)).

Agregado el cultivo, las bebidas fueron llevadas a incubación a la misma temperatura de actividad óptima para cada cultivo, por el tiempo necesario hasta observar un pH de 4.2 a 4.5, o una acidez de 0,75 % a 0,80 % de ácido láctico.

Alcanzado el pH señalado, se procedió a homogenizar la bebida y se continuó con el registro de °Brix, pH y acidez.

La bebida elaborada, se envasó en recipientes estériles de polietileno de alta densidad (PEAD) blancos, de 250 mL, debidamente rotulados, que rápidamente fueron llevados a refrigeración a temperatura de 8 °C (Gráfico 6).

Gráfico 6. Proceso de elaboración de la bebida láctea.



Elaborado por: Luiggi Mendoza, Génesis Quishpe y M. Teresa Pacheco, 2021.

3.6 Mediciones o análisis

Como referencia técnica de calidad para la bebida fermentada, se consideró la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 395:2011. Leches Fermentadas. Requisitos ([Anexo 1](#)). A continuación, se describen los análisis aplicados sobre la leche cruda fresca y sobre la bebida fermentada.

Los análisis aplicados sobre la bebida fermentada (análisis fisicoquímicos y microbiológicos) durante el almacenamiento (30 días a 8°C), se realizaron cada 5 días.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis físico químicos

- pH, °Brix y acidez titulable

El pH de la leche se determinó empleando un pH metro digital con aproximación a decimales, calibrado con buffers comerciales de pH 4 y 7.

Los °Brix iniciales de la leche y de la bebida fermentada, se midieron con ayuda de un refractómetro marca ATP. Para ello, se colocó una gota en el visor y se procedió a la lectura.

La acidez titulable de la leche y de la bebida fermentada se determinó según el método de titulación ácido – base reportado por [Reyes y Ludeña \(2015\)](#), para lo cual se tomó 10 mL de muestra a 20 °C, se adicionó tres gotas de solución indicadora de fenolftaleína y se tituló con una solución de hidróxido de sodio 1/9 N hasta cambio de coloración a rosa. ([Tamime & Robinson, 1991](#)) ([Yildiz, 2010](#)).

Análisis microbiológicos

- Recuento de microorganismos probióticos viables

El análisis de probióticos viables en la bebida, se realizó cada 5 días durante el almacenamiento (30 días) en refrigeración (8 °C), mediante siembras de 1 mL en medios de cultivo para bacterias ácido lácticas, siguiendo el protocolo recomendado en la guía de utilización de Petrifilm 3M ([Minnesota Mining and Manufacturing Company, 2015, 2017](#)) que se resume a continuación:

Bacterias ácido lácticas

- Almacenar los paquetes de las placas para recuento de bacterias ácido lácticas 3M Petrifilm sin abrir, a temperatura de congelación o refrigeración, igual a -20 a 8 °C (-4 a 46 °F).
- Usar antes de la fecha de caducidad indicada en el empaque. Es recomendable que las bolsas se atemperen a temperatura ambiente antes de usarlas.
- Para cerrar un paquete abierto, doblar el extremo superior y sellarlo con cinta adhesiva. Para evitar la exposición a la humedad, no refrigerar los paquetes abiertos. Almacenar los paquetes sellados en un ambiente fresco y seco (20–25 °C).
- Colocar la placa para recuento de bacterias ácido lácticas 3M Petrifilm en una superficie plana y nivelada.
- Levantar la película superior y colocar la pipeta perpendicularmente al área de inoculación, verter 1 mL de suspensión de la muestra en el centro de la película inferior. Asegurarse de no tocar la placa con la punta de la pipeta.
- Bajar con cuidado la película superior sobre la muestra para evitar que atrape burbujas de aire. No la deje caer.
- Colocar el difusor 3M Petrifilm (#6425 del catálogo) en el centro de la placa para recuento de bacterias ácido lácticas 3M Petrifilm sobre el inóculo.
- Presionar con suavidad en el centro del difusor 3M Petrifilm para distribuir la muestra uniformemente. No girar ni deslizar el difusor. Retirar el difusor 3M Petrifilm y esperar sin mover la placa como mínimo un minuto hasta que solidifique el gel.
- Incubar las placas con el lado transparente hacia arriba en pilas de no más de 20.
- Incubar la placa para recuento de bacterias ácido lácticas 3M Petrifilm por 48±3 horas a 28-37 °C.
- El recuento de las placas Petrifilm 3M puede realizarse con un contador de colonias estándar o con una lupa con luz.
- Contar todas las colonias rojas sin importar el tamaño o la intensidad del color. No contar las colonias que han crecido fuera del área de inoculación, o sobre la espuma de hule, por cuanto están fuera de la influencia selectiva del medio.
- Las bacterias ácido lácticas heterofermentativas se definen como colonias que son rojas e íntimamente asociadas a gas, dentro del diámetro de una colonia. Las colonias rojas sin gas están definidas como bacterias ácido lácticas homofermentativas.

- Análisis de patógenos

El análisis de *E. coli*, coliformes totales, mohos y levaduras, cada 5 días, en base a los métodos AOAC 998.08 y 991.14 tomados como base del protocolo señalado en las guías para el uso de placas Petrifilm 3M ([Minnesota Mining and Manufacturing Company, 2015, 2017](#)), como se describe:

E. coli y coliformes totales

- Preparar al menos una dilución de la muestra utilizando uno de los siguientes diluyentes estériles: agua destilada. El pH de la muestra debe estar al 6,5 - 7,5, si es necesario ajustarlo para muestras ácidas con NaOH 1N y alcalinas con HCl 1N.
- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levantar la lámina semitransparente superior. Con la pipeta perpendicular a la placa Petrifilm colocar 1 mL de la muestra (previamente preparada con su correspondiente dilución).
- Liberar la película superior. Con la cara lisa hacia abajo presionar el dispensor para repartir la muestra sobre el área circular.
- Levantar el dispensor, esperar un minuto a que se solidifique el gel y proceder a la incubación.
- Incubar las placas, cara arriba en grupos de hasta 20 unidades de altura.
- El tiempo de incubación y temperatura varían según el método. Para coliformes incubar 24 h (+/- 2 h) 35°C (+/- 1°C). Para *E. coli* incubar 48 h (+/- 2 h) 35 °C (+/- 1 °C).
- Retirar las placas una vez cumplido su tiempo de incubación y proceder al recuento de colonias.
- Para el conteo se puede utilizar el contador de colonias estándar u otro tipo de lupa con luz.
- Conservar las bolsas de placas, sin abrir a < 8 °C. Dejar que las bolsas lleguen a temperatura ambiente antes de abrirlas.
- No refrigerar las bolsas abiertas a fin de evitar exponerlas a la humedad. Conservar las bolsas una vez cerradas en un lugar fresco y seco.
- No utilizar las placas que presenten una coloración marrón.
- Las placas Petrifilm 3M para *E. coli* y coliformes (25 unidades) se presentan empacadas en bolsas de foil de aluminio que las protegen de la humedad y de la luz (tienen componentes fotosensibles).

- Las placas Petrifilm 3M para *E. coli* y coliformes cuentan con una vida útil de 18 meses a partir de su fecha de manufactura.
- Una vez abiertas las bolsas cuentan con una vida útil de 30 días a temperatura ambiente.
- Después de su utilización, al igual que cualquier otro sistema de control microbiológico, las placas Petrifilm para recuento *E. coli* y coliformes, pueden contener bacterias viables que pueden ser un riesgo biológico potencial. Seguir las normas industriales actuales para su destrucción.

Mohos y levaduras

- Colocar la placa 3M Petrifilm para el recuento rápido de mohos y levaduras en una superficie plana y nivelada. Levantar la película superior y agregar 1 mL de la muestra la pipeta perpendicular en el centro de la película inferior.
- Bajar la película superior sobre la muestra.
- Coloque difusor plano (No. de cat. 6425) u otro difusor plano en el centro de la placa 3M Petrifilm.
- Presionar firmemente el centro del dispersor para distribuir la muestra de manera uniforme. Difundir el inóculo por toda el área de crecimiento de la placa 3M Petrifilm antes de que se forme el gel. No deslizar el dispersor a través de la película.
- Retirar el dispersor y dejar sin mover la placa por lo menos durante un minuto, para permitir que se forme el gel.
- Incubar la placa 3M Petrifilm para el recuento rápido de mohos y levaduras a 25-28 °C durante 48 ± 2 horas en posición horizontal, con la película transparente hacia arriba, en pilas de no más de 40 placas.
- Leer los resultados para las levaduras y los mohos a las 48 horas. Ciertos mohos y levaduras de crecimiento más lento pueden aparecer apenas visibles a las 48 horas. Para mejorar la interpretación de estos mohos, incubarlos por 12 horas más.
- Sellar la bolsa plegando el extremo y pegándolo con cinta adhesiva. Para evitar la exposición a la humedad, no refrigere las bolsas abiertas. Almacene las bolsas reselladas en un ambiente fresco (20 a 25 °C) y seco.

Nota: El estudio de la variación de las características fisicoquímicas y sensoriales de la bebida luego de la incubación y al final del almacenamiento, se llevó a cabo por parte de otro estudiante, de forma paralela a esta investigación.

- **Cálculo del tiempo de vida útil (TVU)**

El tiempo de vida útil (TVU) de la bebida, se calculó considerando como estándar de calidad la máxima cantidad de microorganismos patógenos aceptables en leches lácteas fermentadas según la normativa [NTE INEN 2 395:2011](#), en base a la construcción de curvas de crecimiento elaboradas con los datos del análisis microbiológico. Una vez obtenida la ecuación de la recta, se calculó el tiempo de vida aplicando el modelo de cinética de Arrhenius, ecuación de orden 1 o primer orden ([Ecuación 1](#)), el cual permite expresar con gran precisión procesos de crecimiento o muerte microbiana ([Labuza, 1982; Alvarado, 2013](#)).

$$\log \{A\} = - (k t/2,303) + \log \{A_0\} \quad \text{Ec. 1}$$

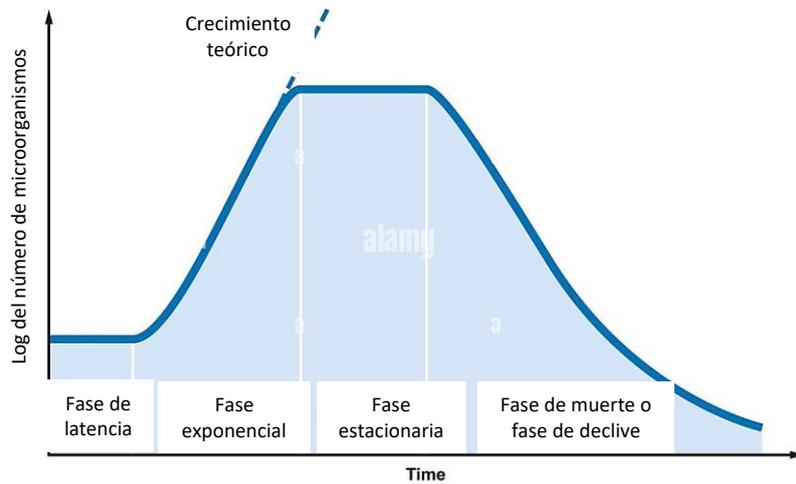
donde $\{A_0\}$ es la cantidad o concentración al tiempo 0 y $\{A\}$ es la concentración al tiempo t , y k es la constante de velocidad dependiente de la temperatura, considerando para su aplicación una temperatura constante.

- **Cálculo del tiempo de supervivencia de probióticos viables**

En vista de que, para hablar de tiempo de vida útil de una bebida láctea fermentada, también se exige que esta llegue con una cantidad mínima de 10^7 Ufc/mL de probióticos viables hasta el final del almacenamiento ([NTE INEN 2 395:2011](#)), el tiempo de supervivencia de probióticos viables se ha estimado de acuerdo a la metodología recomendada por [Vinderola, et al. \(2000\)](#) para estudios en yogur durante el almacenamiento en refrigeración.

Según el método recomendado, se construyó la curva de Log del número de microorganismos vs. tiempo, en base a los datos observados durante los 30 días de almacenamiento ([modelo de curva de crecimiento bacteriano: Gráfico 7](#)).

Gráfico 7. Curva de crecimiento de bacterias probióticas



Steward, 2022; Lungu, et al. 2009.

Con los datos de la parte lineal final de dicha curva (etapa de muerte) se calculó la ecuación de regresión; en base a dicha ecuación, por comparación, y despeje de la ecuación del modelo de cinética de orden 1 (Ec. 1), considerando un valor de $A = 10^7$ Ufc/mL, se calculó el tiempo de muerte o fase de declive.

Finalmente, al tiempo de muerte calculado, se sumó el tiempo correspondiente a la etapa de adaptación, crecimiento exponencial y estabilidad, con lo cual se obtuvo el tiempo total de supervivencia de probióticos viables.

3.7 Análisis estadístico

Para probar la hipótesis alternativa, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) (95 %) en el programa de Excel. Y para la comparación de medias de TVU se aplicó una prueba de Tukey (95 %) ($p < 0.05$) en el programa SPSS v. 21.

3.8 Recursos

Recursos humanos

- Graduando: Búsqueda bibliográfica, redacción, trabajo experimental, descripción y análisis de resultados.

- Docente Tutora: Asesoría general, búsqueda bibliográfica, redacción, análisis de resultados, revisión y corrección.

Recursos materiales

Reactivos e insumos

- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N
- Fenolftaleína (2 %)
- Agua destilada
- Leche entera cruda fresca
- Cultivos lácteos
 - L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (Chr. Hansen)
 - L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. (Bagó v.)
- Pectina cítrica (Sigma A.)
- Petrifilm 3M para bacterias ácido lácticas, *E. coli*, coliformes totales, mohos y levaduras.

Instrumentos y equipos

- Balanza
- Termómetro escala 0 a 100 °C
- Peachímetro digital
- Refractómetro (ATP)
- Pipeta de 2 mL
- Pera de succión
- Vasos de precipitación
- Soporte universal
- Bureta
- Recipientes de acero inoxidable
- Incubadora
- Envases de polietileno de alta densidad blancos de 250 mL

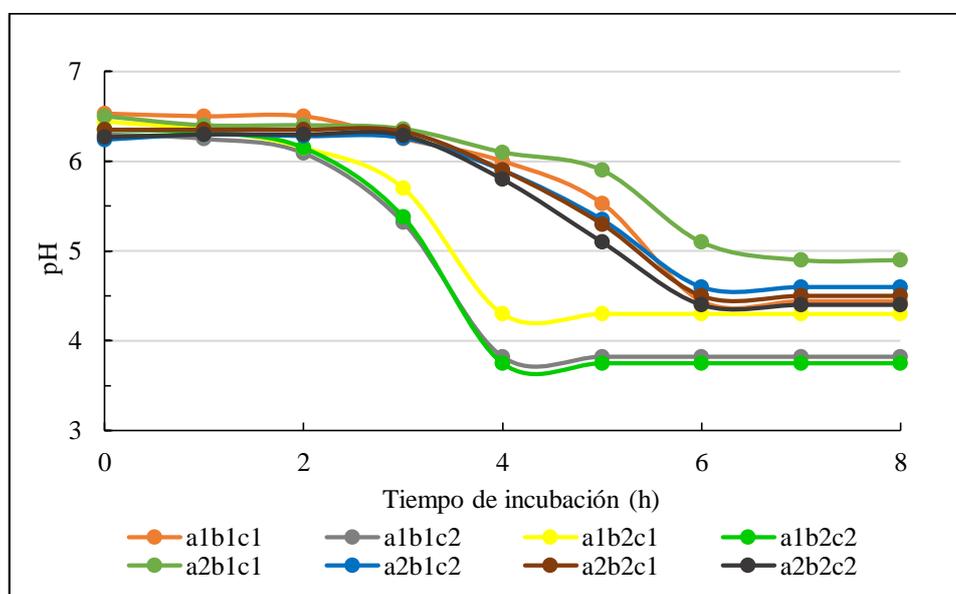
CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Control de indicadores de fermentación durante la elaboración de la bebida

La leche empleada para la elaboración de la bebida presentó un pH de 6,65, 10 °Brix y una acidez 0,17 % de ácido láctico. Siendo adecuada para su utilización según lo señalado en la [NTE INEN 2 395:2011](#), se procedió a aplicar el procedimiento señalado en el capítulo anterior ([Gráfico 6](#)), conforme a los 8 tratamientos planteados ([Tabla 2](#)).

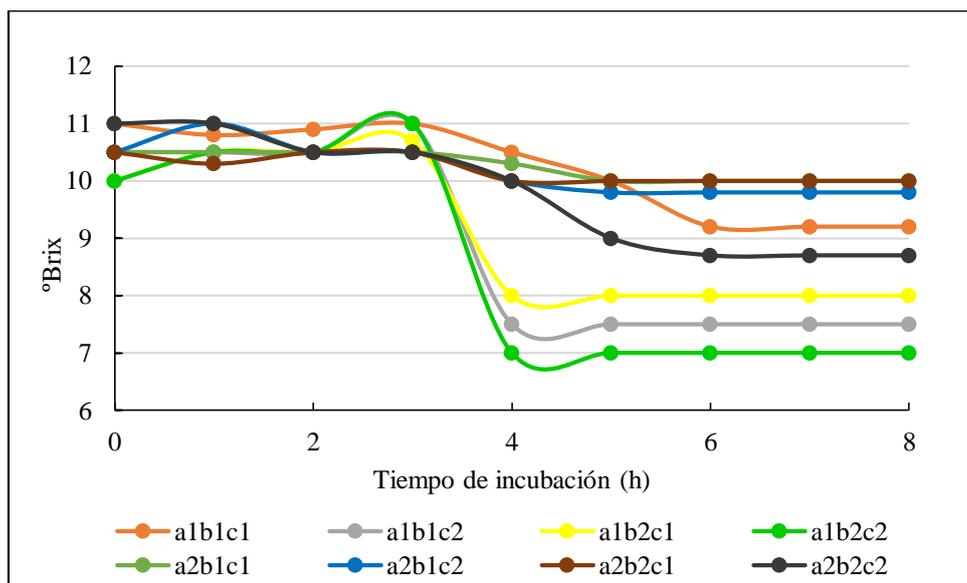
El pH, los °Brix, y la acidez, fueron monitoreados cada hora durante la incubación ([Gráficos 8 al 10](#)); y cada 5 días durante el almacenamiento. Durante la incubación la variación de estos indicadores fue marcada, mientras que durante el almacenamiento la variación fue menor, como puede observarse en la gráfica de acidez registrada durante los 30 días ([Gráfico 11](#)).

Gráfico 8. pH de la bebida durante la incubación.



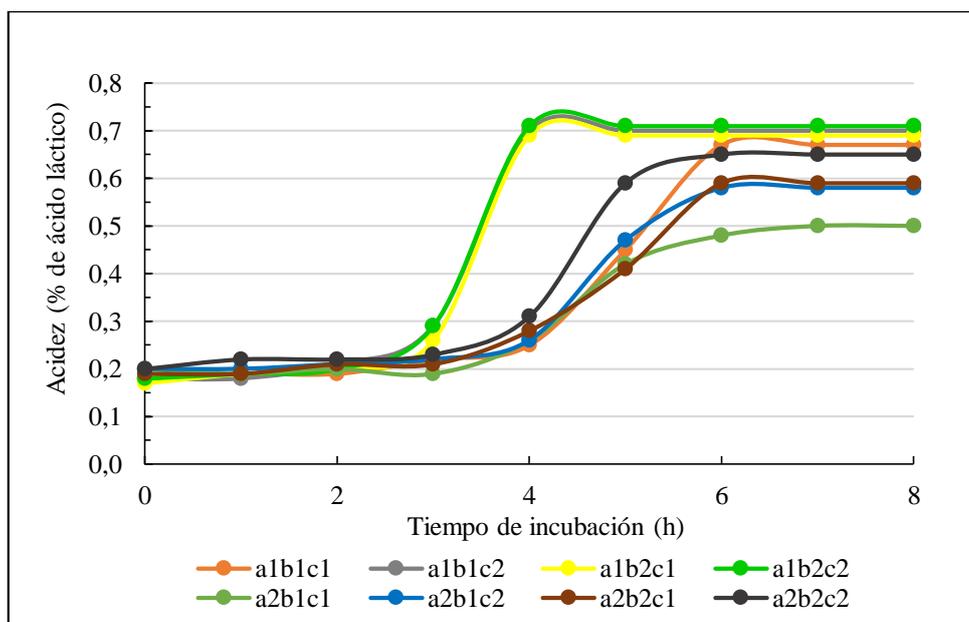
- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

Gráfico 9. °Brix de la bebida durante la incubación.



- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
 T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
 T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

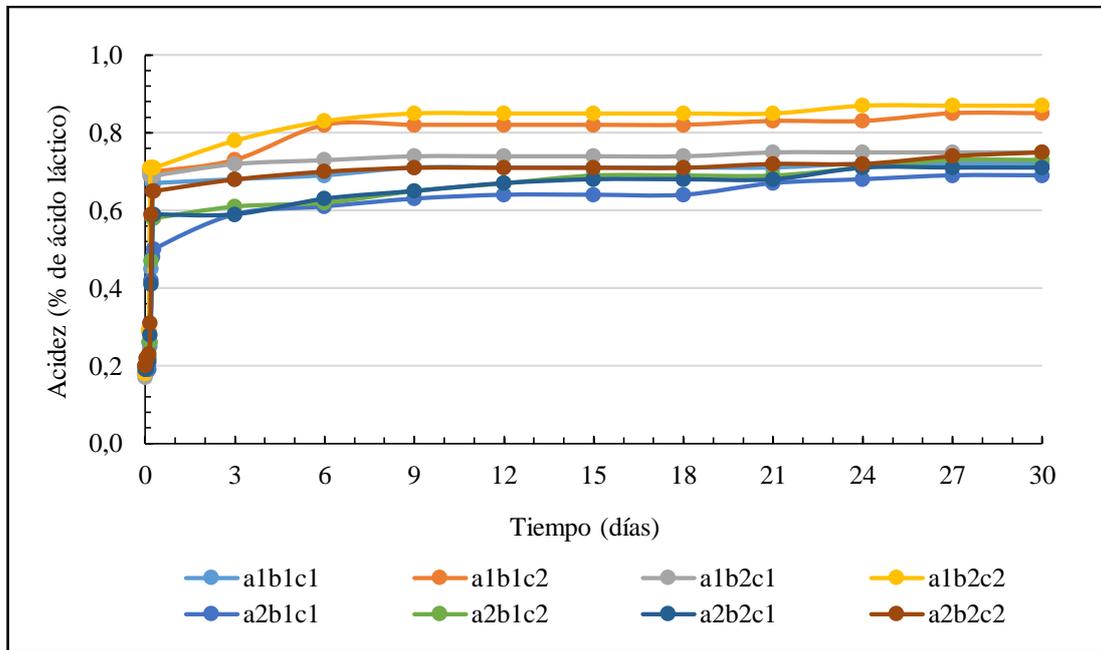
Gráfico 10. Acidez de la bebida durante la incubación.



- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
 T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina

- T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
 T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

Gráfico 11. Acidez de la bebida láctea durante el almacenamiento.



- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
 T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
 T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

La gran variación del pH, °Brix y acidez de las bebidas, observada durante la incubación (Gráficos 8 al 10), se encuentra acorde a lo reportado por Jay (2000) en procesos de fermentación de bebidas lácteas, pues, en cuanto las bacterias ácido lácticas se encuentran a su temperatura óptima y disponen de los nutrientes necesarios, inician aceleradamente su metabolismo, para luego mantenerse casi constante y detenerlo al final del almacenamiento; pudiendo incluso llegar a morir debido a la falta de nutrientes, o a un exceso de ácido láctico en el medio.

En las bebidas elaboradas, al final del tiempo de incubación, se observó un mayor pH al emplear *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* (T5 y T8), y un menor pH en las bebidas elaboradas con *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (T1 a T4) (Gráfico 8).

En concordancia; los valores de acidez fueron menores al emplear *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* (T5 y T8) y mayores al utilizar *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (T1 a T4) (Gráfico 10).

Conforme disminuyeron los °Brix (Gráfico 9), la acidez se vio incrementada, lo cual es un indicativo de que los probióticos empleados, cumplen muy bien su papel fermentativo en presencia o ausencia de pectina.

La acidez más alta fue lograda con el uso de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* al 0,012 %, y pectina cítrica 0,34 % (T4) (Gráfico 10); quizá debido a un mayor poder fermentativo de estos macroorganismos y/o a un mantenimiento de su supervivencia gracias a la presencia del prebiótico.

La bebida elaborada con *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* al 0,012 %, y pectina cítrica 0,34 % (T8), mostró un menor valor de acidez, señalando un menor poder fermentativo en comparación a *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* tomado como estándar en este estudio.

Cabe resaltar que el menor valor de acidez fue observado al emplear *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* 0,006 %, y sin pectina cítrica (T5); por lo que, para utilizar el cultivo no convencional de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* y lograr tiempos cortos en la etapa de incubación, se recomendaría el uso de este cultivo en dosis del 0,012 % y pectina cítrica al 0,34 % (T8) (Gráfico 10).

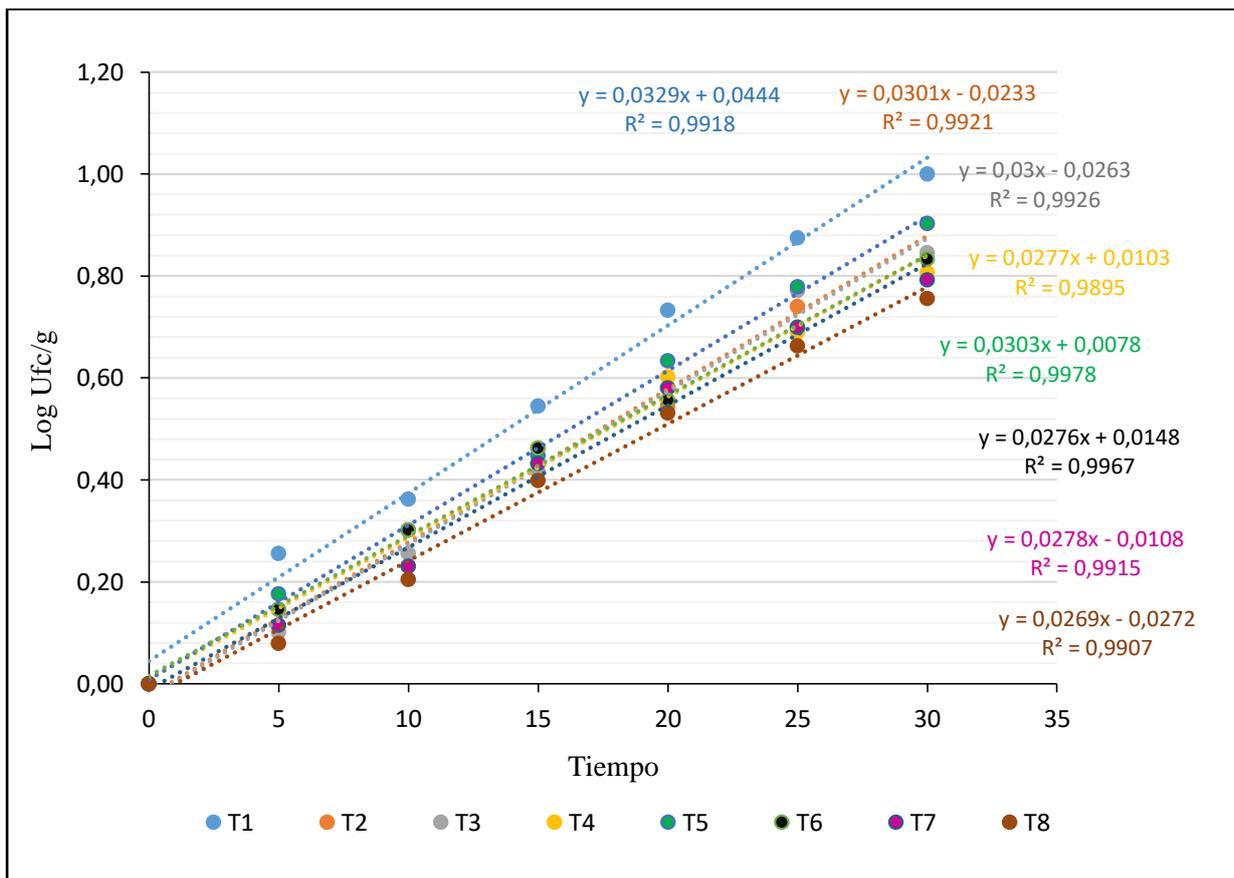
Por otro lado, considerando que valores de acidez muy altos, pueden causar sinéresis al final del almacenamiento (Rani et al., 2012); si el objetivo es observar bajos valores de acidez al final de este tiempo, lo recomendable sería emplear *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* sin pectina (T5 y T7) (0,7 % ác. láctico) (Gráfico 11).

4.2 Tiempo de vida útil (TVU)

Al hablar de tiempo de vida útil (TVU) de un alimento se puede determinar: el tiempo o fecha de consumo preferencial y el tiempo o fecha de caducidad. El consumo preferencial, viene dado por la característica de calidad (física, química o sensorial) del alimento, que primero llegue a su límite de calidad o señal de deterioro. El TVU o tiempo de caducidad, en cambio, está relacionado con aspectos de seguridad alimentaria para el consumidor y por lo tanto está basado en aspectos químicos o microbiológicos (Canadian Institute of Food Safety, 2020).

En este sentido, se ha determinado el TVU de las bebidas elaboradas, atendiendo al índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad (m), establecido por la NTE INEN 2 395:2011 (Anexo 1: Tabla 2) para coliformes totales (10 Ufc/g). Las curvas de crecimiento y ecuaciones respectivas se pueden observar en la siguiente gráfica (Gráfico 12).

Gráfico 12. Curvas de crecimiento de coliformes totales durante el almacenamiento (8 °C).



- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
 T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
 T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

Una vez obtenidas las ecuaciones de regresión, se procedió a calcular el TVU mediante el modelo de cinética de orden 1, ya que, como se ha indicado en el capítulo anterior, permite expresar con gran precisión la muerte (declive) y el crecimiento microbiano (Labuza, 1982; Alvarado, 2013).

A continuación, se presenta un ejemplo del cálculo aplicado para el tratamiento 1 (T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* al 0,006 %, sin pectina).

Partiendo de la ecuación de la recta, para la bebida elaborada según el tratamiento 1:

$$y = 0,0329 x + 0,0444$$

$$y = m x + b$$

se comparó con el modelo de cinética de primer orden:

$$\log \{A\} = -k t / 2,303 + \log \{A_0\} \quad \text{Ec. 1}$$

donde $-k/2.303$ es igual a la pendiente, resultando una constante de velocidad igual a:

$$\frac{-k}{2,303} = 0,0329$$

$$k = -0,076 \text{ (Ufc/mL) / día}$$

y reemplazando los valores de A, k y A₀, en la ecuación 1, se despejó el tiempo de vida útil:

$$\log \{A\} = - (k t / 2,303) + \log \{A_0\}$$

$$\log \{10\} = - (-0,076 t / 2,303) + \log \{0\}$$

$$1 \text{ Ufc/mL} = (0,033 \text{ Ufc/mL/día}) t$$

$$t = \frac{1 \frac{\text{Ufc}}{\text{mL}} (\text{día})}{0,033 \frac{\text{Ufc}}{\text{mL}}}$$

$$t = 30,40 \text{ días}$$

Los resultados de tiempo de vida útil para las bebidas elaboradas según los 8 tratamientos, se observan a continuación:

Tabla 3. Tiempo de vida útil de las bebidas elaboradas.

Tratamiento		Ecuación	R ²	m (Ufc/mL)/día	k (Ufc/mL)/día	TVU (días)
Nº	Código					
T1	a1b1c1	y = 0,0329x + 0,0444	0,9918	0,0329	-0,076	30,40
T2	a1b1c2	y = 0,0301x - 0,0233	0,9921	0,0301	-0,069	33,22
T3	a1b2c1	y = 0,03x - 0,0263	0,9926	0,0300	-0,069	33,33
T4	a1b2c2	y = 0,0277x + 0,0103	0,9895	0,0277	-0,064	36,10
T5	a2b1c1	y = 0,0303x + 0,0078	0,9978	0,0303	-0,070	33,00
T6	a2b1c2	y = 0,0276x + 0,0148	0,9967	0,0276	-0,064	36,23
T7	a2b2c1	y = 0,0278x - 0,0108	0,9915	0,0278	-0,064	35,97
T8	a2b2c2	y = 0,0269x - 0,0272	0,9907	0,0269	-0,062	37,17

- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

La cantidad de mohos y levaduras, se observó en el rango de 12 a 28 Ufc/g entre los tratamientos 1 a 8, al final de los 30 días de almacenamiento, estando dentro del límite máximo establecido por la norma. La menor cantidad de estos microorganismos, se presentó para los tratamientos con la mayor dosis de probiótico y pectina cítrica (T4 y T8). En todos los casos se observó ausencia de *E. coli*.

Estos resultados podrían deberse entre otros factores, al potencial prebiótico de la pectina (Davani-Davari, et al., 2019), y, por ende, a un mayor efecto antagónico de las bacterias beneficiosas frente a las contaminantes.

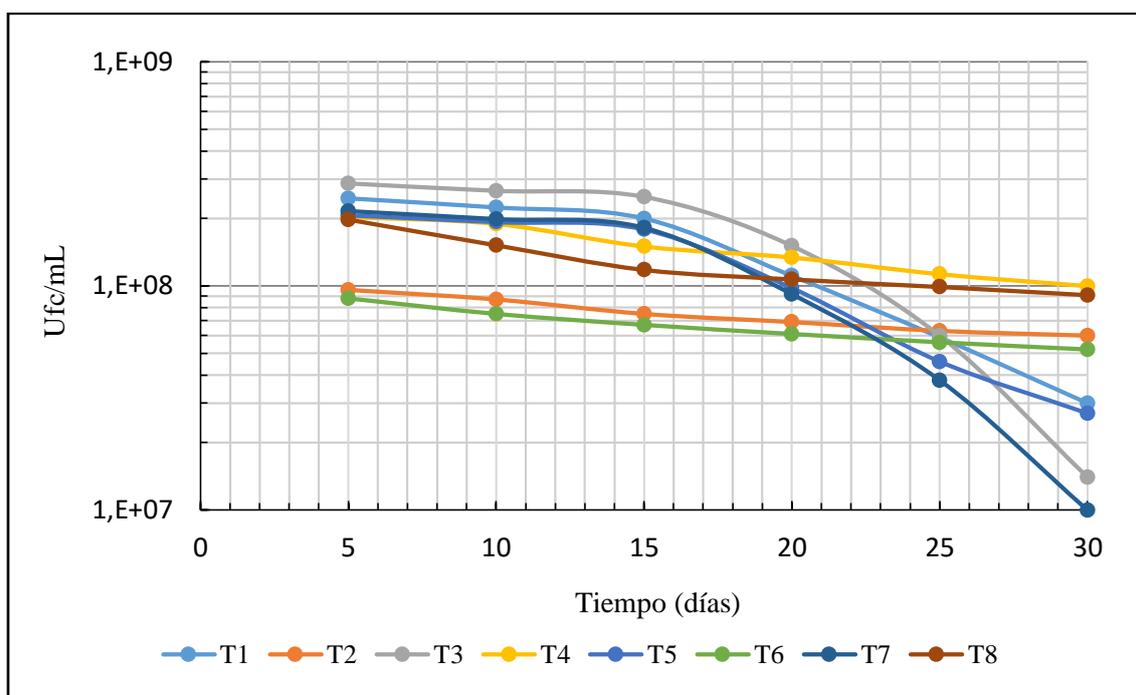
4.3 Tiempo de supervivencia de probióticos viables

En base a la metodología recomendada por Vinderola, et al. (2000) se construyeron las curvas de crecimiento de bacterias ácido lácticas analizadas en las bebidas (Gráficos 11 a 13).

El Gráfico 11 muestra todas las curvas de crecimiento bacteriano, es decir para los 8 tratamientos.

Los Gráficos 12 y 13 muestran las curvas de crecimiento bacteriano, para los tratamientos sin pectina (T1, T3, T5, T7) y con pectina (T2, T4, T6, T8), respectivamente; ya que, dependiendo de la ausencia o presencia de prebiótico, se observaron tendencias de crecimiento claramente diferentes.

Gráfico 13. Crecimiento de bacterias ácido lácticas durante 30 días de almacenamiento (8 °C) para todos los tratamientos.

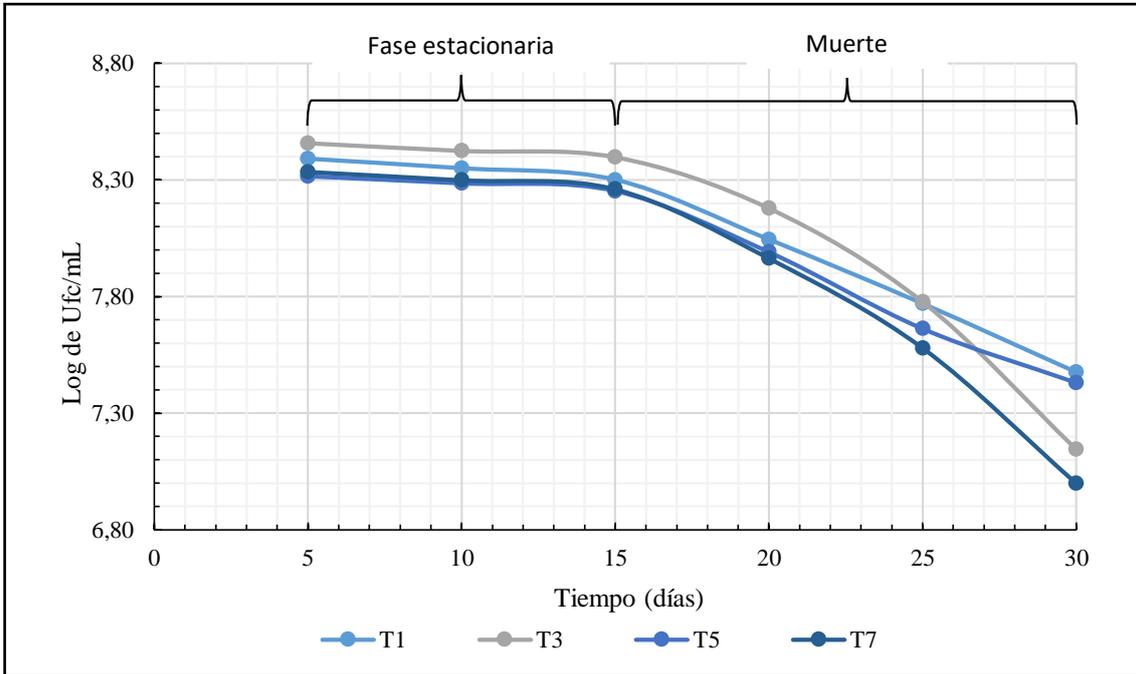


*Contaje al tiempo cero (etapa de adaptación y crecimiento exponencial): no representado en la gráfica.

- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
- T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
- T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
- T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
- T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina

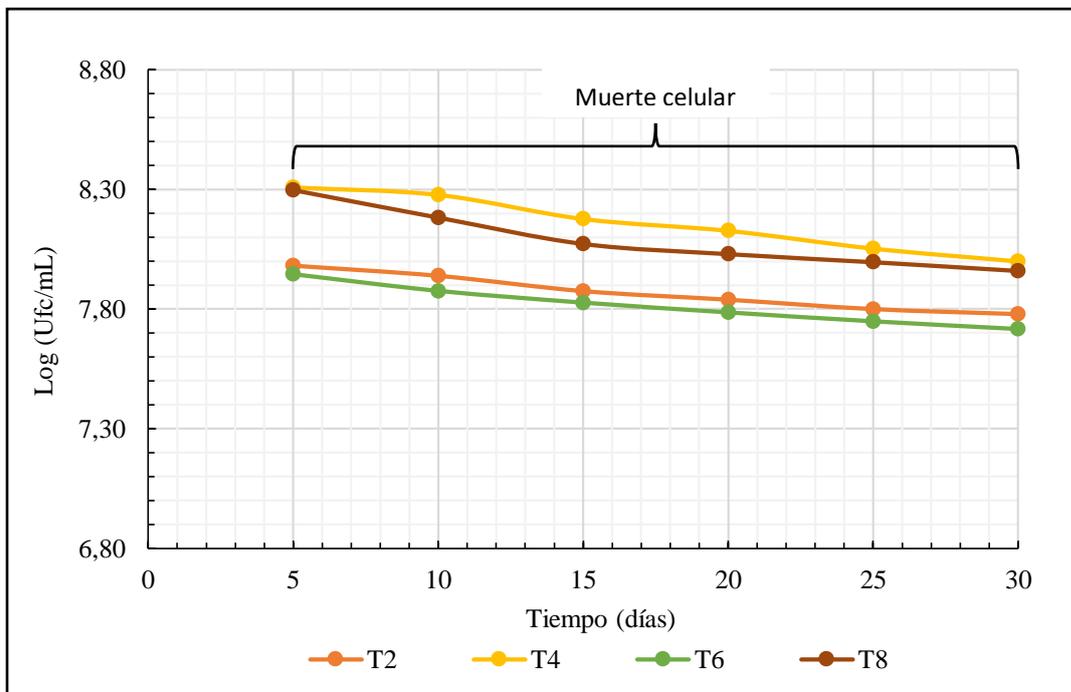
- T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

Gráfico 14. Crecimiento de bacterias ácido lácticas durante 30 días de almacenamiento (8 °C), en las bebidas elaboradas sin pectina cítrica.



- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
 T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina

Gráfico 15. Crecimiento de bacterias ácido lácticas durante 30 días de almacenamiento (8 °C), en las bebidas elaboradas con pectina cítrica.

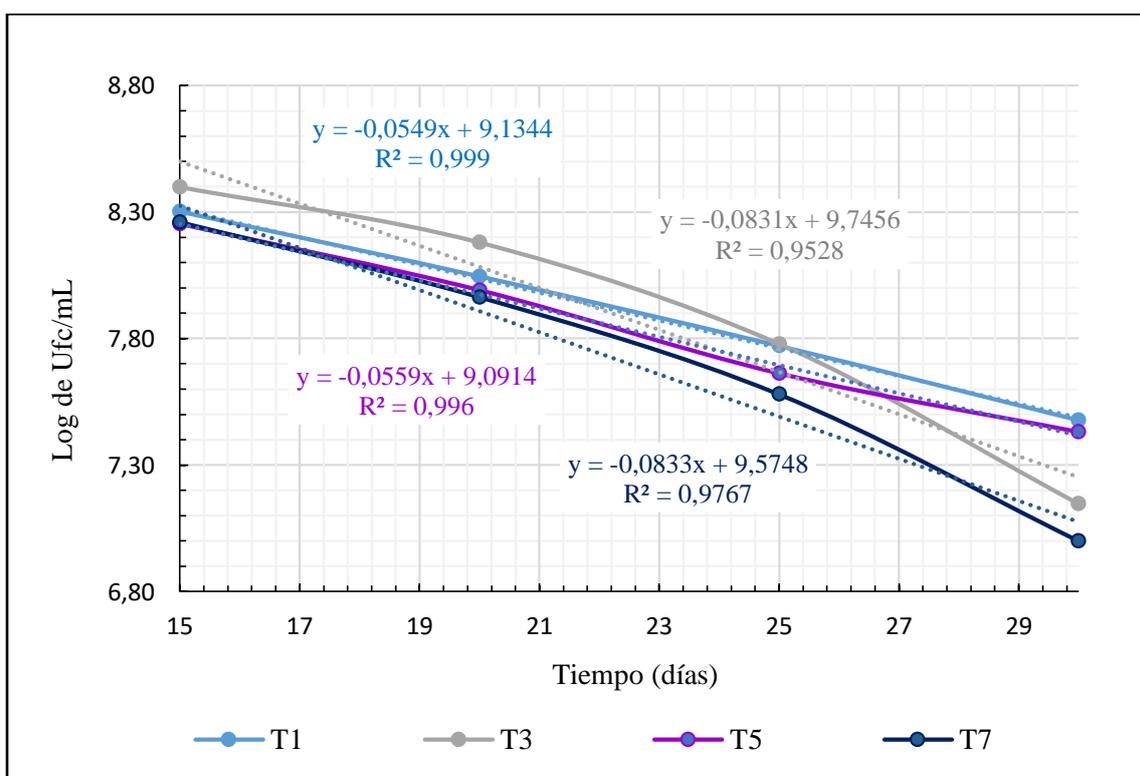


- T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
- T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
- T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
- T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

En las bebidas elaboradas sin pectina (T1, T3, T5, T7) (Gráfico 12) del día 5 al día 15, se observó una fase estacionaria y una fase de muerte celular; mientras que, en las bebidas elaboradas con pectina (T2, T2, T6, T8), a partir del día 5 en adelante, se observó la fase de muerte celular.

Una vez identificada la fase de muerte celular de probióticos, se procedió a obtener la ecuación de la recta (Gráficos 14 y 15).

Gráfico 16. Ecuación de la recta, correspondiente a la etapa de muerte celular de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, y, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.*, en la bebida sin pectina, durante el almacenamiento (30 días/8 °C).

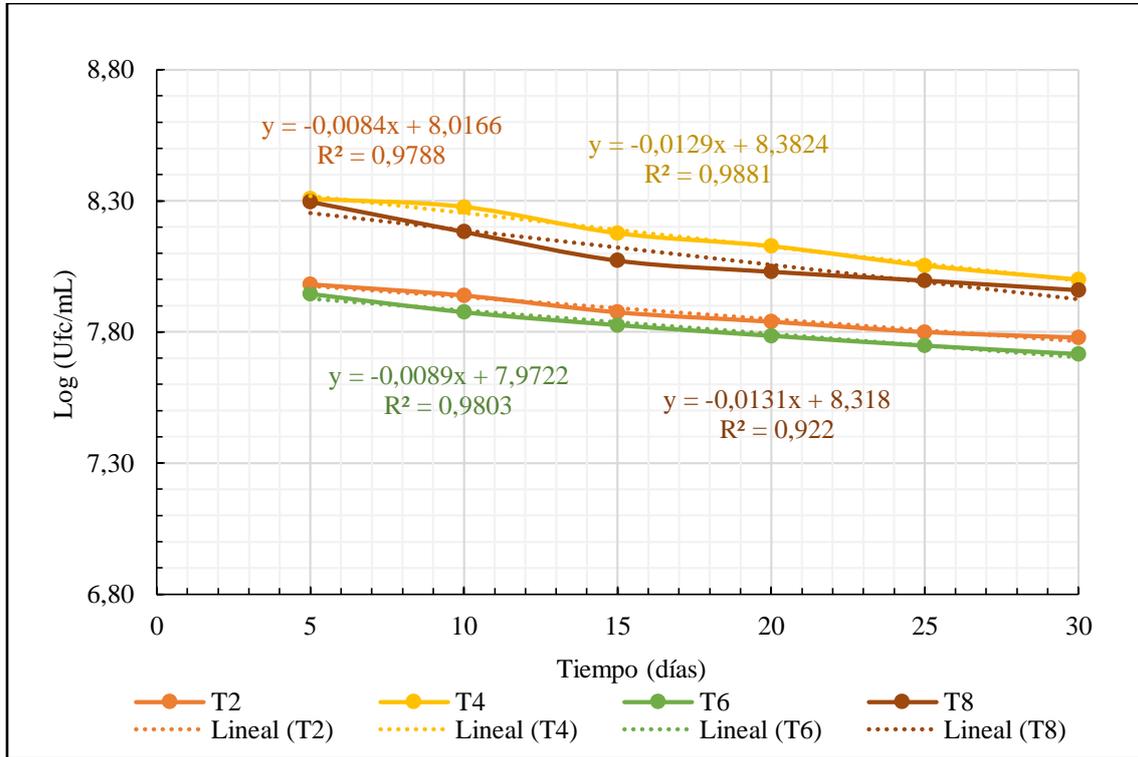


*Tiempo de almacenamiento anterior a la fase de muerte o declive = 15 días.

- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
- T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina

T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
 T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina

Gráfico 17. Ecuación de la recta, correspondiente a la etapa de muerte celular de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, y, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.*, en la bebida con pectina, durante el almacenamiento (30 días/8 °C).



*Tiempo de almacenamiento anterior a la fase de muerte o declive = 5 días.

T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
 T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
 T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
 T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

En base a la ecuación de la recta, comparándola con el modelo de cinética de orden 1 (Ecuación 1), se identificó la pendiente ($m = -k/2.303$) y se calculó la velocidad de reacción (k).

Seguidamente, se despejó el tiempo de la fase de declive, considerando un valor final mínimo de probióticos igual a 10^7 Ufc/mL (límite de calidad).

A continuación, se muestra un ejemplo del cálculo aplicado para hallar el tiempo de supervivencia de probióticos de la bebida elaborada siguiendo el tratamiento 1 (T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* al 0,006 %, sin pectina).

$$\log \{A\} = - (k t/2,303) + \log \{A_0\} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

A: número de microorganismos final (10^7 Ufc/mL)

k: constante de velocidad de muerte de microorganismos

t: tiempo de muerte o declive

A_0 : número de microorganismos observado al inicio de la fase de muerte o declive

Ecuación de la recta presentada en la gráfica:

$$y = -0,0549 x + 9,1344$$

$$y = m x + b$$

Siendo $m = -0,0549$; por despeje, k es igual a:

$$\log \{A\} = - (k t/2,303) + \log \{A_0\} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\frac{-k}{2,303} = -0,0549$$

$$k = 0,1264 \text{ (Ufc/mL) / día}$$

Luego, reemplazando datos en la ecuación 1 y despejando t:

$$\log \{A\} = - (k t/2,303) + \log \{A_0\}$$

$$\log \{10^7\} = - (0,1264 t/2,303) + \log \{200.000.000,\}$$

$$- t = \frac{(\log 10^7 - 8,3) \frac{\text{Ufc}}{\text{mL}} * 2,303}{0,1264 \frac{\text{Ufc}}{\text{mL}} / \text{día}}$$

$$- t = \frac{(7 - 8,3) \text{ día} * 2,303}{0,1264}$$

$$-t = \frac{-2.994 \text{ días}}{0,1264}$$

$$t = 23.67 \text{ días}$$

Valor que, sumado al tiempo de almacenamiento anterior a la fase de muerte o declive, que para este caso, es igual a 15 días (Gráfico 14), equivale a un tiempo de supervivencia total de probióticos igual a:

$$\text{Tiempo total de supervivencia} = (23.67 + 15) \text{ días}$$

$$\text{Tiempo total de supervivencia} = \mathbf{38.67 \text{ días}}$$

El tiempo total de supervivencia de los probióticos, en las bebidas elaboradas, según los 8 tratamientos del estudio, se presenta en la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 4. Tiempo total de supervivencia de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, o *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.*, con y sin pectina cítrica.

Tratamiento		Ecuación	R ²	<i>m</i>	<i>k</i>	<i>log Ao</i>	<i>t1</i>	<i>t2</i>	<i>t total</i>
Nº	Código			(Ufc/mL)/día	(Ufc/mL)/día	Ufc/mL	(días)	(días)	(días)
T1	a1b1c1	y = -0,0549x + 9,1344	0,999	-0,0549	0,1264	8,30	23,9	15	38,9
T2	a1b1c2	y = -0,0084x + 8,0166	0,979	-0,0084	0,0193	7,98	156,0	5	161,0
T3	a1b2c1	y = -0,0831x + 9,7456	0,953	-0,0831	0,1914	8,40	15,8	15	30,8
T4	a1b2c2	y = -0,0129x + 8,3824	0,988	-0,0129	0,0297	8,31	101,6	5	106,6
T5	a2b1c1	y = -0,0559x + 9,0914	0,996	-0,0559	0,1287	8,25	23,4	15	38,4
T6	a2b1c2	y = -0,0089x + 7,9722	0,980	-0,0089	0,0205	7,94	147,2	5	152,2
T7	a2b2c1	y = -0,0833x + 9,5748	0,977	-0,0833	0,1918	8,26	15,7	15	30,7
T8	a2b2c2	y = -0,0131x + 8,318	0,922	-0,0131	0,0302	8,30	100,0	5	105,0

- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

Los mayores tiempos de supervivencia, se observan en presencia de pectina, para el cultivo convencional.

No se ha reportado información sobre la supervivencia de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* en presencia de pectina; no obstante, se conoce que dicha supervivencia en medios ácidos puede depender también, de la resistencia de la cepa. Fan et al. (2017) observaron supervivencia de *L. casei* hasta por 63 días a 4 °C sin una pérdida significativa de viabilidad de 10⁸ UFC/mL en alimentos encurtidos acidificados.

4.4 Prueba de hipótesis (sobre los resultados de TVU)

Al aplicar el análisis de varianza de un factor (ANOVA) ($p < 0,05$) para los resultados de vida útil de la bebida (T1 a T8), se pudo observar un valor p menor al valor F de Fisher, con lo cual, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa; es decir: **“El tratamiento aplicado (probiótico, dosis del cultivo y prebiótico), influyó sobre el tiempo de vida útil de la bebida láctea elaborada”** (Tabla 4).

Tabla 5. Análisis de varianza de un factor (tratamiento) para los resultados de tiempo de vida útil (días).

RESUMEN					
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza	
Fila 1	2	60,80	30,40	0,0800	
Fila 2	2	66,44	33,22	0,0288	
Fila 3	2	66,65	33,33	0,2112	
Fila 4	2	72,19	36,10	0,0012	
Fila 5	2	65,99	33,00	0,0181	
Fila 6	2	72,46	36,23	0,1058	
Fila 7	2	71,93	35,97	0,0004	
Fila 8	2	74,34	37,17	0,0002	

ANÁLISIS DE VARIANZA					
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	73,722	7	10,532	188,995	3,03E-08
Dentro de los grupos	0,446	8	0,056		
Total	74,168	15			

- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
- T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
- T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
- T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
- T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
- T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
- T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
- T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

4.5 Elección del mejor tratamiento. Comparación de medias: Prueba de Tukey.

La tabla de ANOVA para el diseño 2³ (Anexo 2) permitió observar que existe influencia de cada uno de los factores de estudio (A: tipo de cultivo, B: dosis de cultivo, C: cantidad de prebiótico) y de todas las interacciones, sobre la variable dependiente (tiempo de vida útil).

Por lo tanto, habiendo confirmado la hipótesis alternativa, se procedió a aplicar la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para la comparación de medias, obteniendo los resultados que se muestran en la [Tabla 6](#).

Tabla 6. Resultados de TVU (días) para las bebidas elaboradas.

Tratamiento		TVU	CV
Nº	Código	(días)	(%)
T1	a1b1c1	30,40 ± 0,28 ^d	0,93
T2	a1b1c2	33,22 ± 0,17 ^c	0,51
T3	a1b2c1	33,33 ± 0,46 ^c	1,38
T4	a1b2c2	36,10 ± 0,04 ^{ab}	0,10
T5	a2b1c1	33,00 ± 0,13 ^c	0,41
T6	a2b1c2	36,23 ± 0,33 ^{ab}	0,90
T7	a2b2c1	35,97 ± 0,02 ^b	0,06
T8	a2b2c2	37,17 ± 0,01 ^a	0,04

Promedios ± desviación estándar, para n= 2.

Los superíndices a-d señalan valores de mayor a menor ($p < 0.05$).

- T1: a1b1c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, sin pectina
T2: a1b1c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34 %)
T3: a1b2c1: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, sin pectina
T4: a1b2c2: *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* (44 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34 %)
T5: a2b1c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, sin pectina
T6: a2b1c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,006 %, con pectina (0,34%)
T7: a2b2c1: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, sin pectina
T8: a2b2c2: *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* (37 °C) al 0,012 %, con pectina (0,34%)

Los resultados de esta prueba señalan que el TVU estimado para la bebida elaborada con los tratamientos 8, 6 y 4 (36 a 37 días), son estadísticamente mayores en comparación al TVU de la bebida elaborada de acuerdo a los demás tratamientos (30 a 33 días) ($p < 0,05$). Los tratamientos 8, 6 y 4 tienen como característica común, la presencia de pectina, por lo que parece confirmarse el hecho de que este polisacárido contribuye a la estabilidad de los probióticos y por ende a un mayor antagonismo en contra de patógenos, extendiendo así el tiempo de vida útil en esta bebida.

El menor TVU se observó al emplear el cultivo convencional, a la dosis más baja y sin pectina (T1) ($p < 0,05$), resultado similar al reportado por [Torrieri \(2016\)](#), quien señala que para yogures convencionales (sin prebióticos) almacenados en refrigeración (4 a 8 °C) el TVU generalmente es de 30,5 días.

El mayor TVU tiempo logrado en este estudio (36 a 37 días), señala el efecto positivo de la pectina sobre el TVU de bebidas lácteas fermentadas, ya sea empleando el cultivo convencional o *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.*, pudiendo lograr ventajas tecnológicas y funcionales en base a su utilización. Hasta el momento, no se han reportado estudios similares sobre vida útil, empleando pectina cítrica y *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium s. p.* en diferentes dosis en bebidas lácteas fermentadas.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El uso de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. 0,012 % y pectina cítrica al 0,034 %, permitió estimar tiempos de vida útil, de hasta 37; efecto positivo, si se considera que por lo general el yogur suele presentar un tiempo de vida útil máximo de 30 días (resultado similar al observado en este estudio, al emplear *L. bulgaricus* y *S. termophilus* sin pectina).
- Las curvas de crecimiento de *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium* s. p. y de *L. bulgaricus* y *S. termophilus*, durante el almacenamiento de la bebida láctea a 8 °C, se mostraron diferentes dependiendo del uso de pectina. Para ambos microorganismos, la presencia de pectina ocasionó que la fase de muerte celular apareciera en menor tiempo, pero con una menor cinética de velocidad al final, contribuyendo a un mayor mantenimiento de probióticos supervivientes.
- En las bebidas elaboradas con pectina cítrica se pudo observar tiempos de supervivencia de probióticos, de 105 a 161 días. La supervivencia más alta se observó en el caso del cultivo convencional.

Los resultados de este estudio, no han sido observados hasta el momento en otras fuentes, pudiendo ser de gran utilidad para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales.

5.2 Recomendaciones

- Analizar a futuro, la cantidad de pectina que ha permanecido en la bebida al final del almacenamiento.
- Evaluar el efecto del consumo de la bebida en sistemas de digestión simulada (*in vitro*) y/o mediante ensayos *in vivo*.
- Realizar estudios sobre la adición de pectina cítrica en otros tipos de alimentos con probióticos, para corroborar su efecto sobre la extensión del tiempo de vida del alimento, y mejorar su potencial funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Alongi, M. & Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*. 81, 104466.
- Alvarado, J. de D. (2013). Principios de ingeniería aplicados a los alimentos. 2da Ed., Ambato – Ecuador.
- Badui, S. (2006). Química de los alimentos. 4ta edición: Leche. Editorial Pearson Educación, México.
- Canadian Institute of Food Safety. (2020). The difference between best before and expiry dates. Accedido en enero de 2022: <https://www.foodsafety.ca/blog/difference-between-best-and-expiry-dates>
- Codex Alimentarius. Normas del Codex para leches fermentadas. CODEX STAN 243-2003. 2003.
- Chopra, L., Singh, G., Jena, K.K., & Sahoo, D.K. (2015). Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific reports*. 5,13412.
- Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S.J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. Review. *Foods*. 8(3) 8030092.
- Delgado F.R. (2013). Esquematización de los mecanismos de acción de los probióticos en el tracto intestinal. Probióticos y salud Humana. Accedido en 13 de julio de 2021: <https://www.slideshare.net/CRISTINAALVAREZALVAR4/probiticos-lm>

- Di Caro, S., Tab, H., Grillo, A., Elia, C., Gasbarrini, G., Sepulveda, A. R., & Gasbarrini, A. (2005). Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Digestive and Liver Disease*, 37(5), 320–329.
- Fan, S., Breidt, F., Price, R. & Pérez-Díaz, I. (2017). Survival and growth of probiotic lactic acid bacteria in refrigerated pickle products. *Journal of Food Science*, 82(1):167-173.
- Fernández, M.A., & Marette, A. (2017). Potential health benefits of combining yogurt and fruits based on their probiotic and prebiotic properties. *Advances in Nutrition*, 8,155-64.
- Glenn, G. & Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125, 1401–1412.
- Gibson, G.R., Probert, H.M., van Loo, J., Rastall, R.A., & Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of the prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17, 259–275.
- Gibson, G.R.; Scott, K.P.; Rastall, R.A.; Tuohy, K.M.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferrandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E.F.; Saulnier, D.; Loh, G.; Macfarlane, S., Delzenne, N., Ringel, Y., Kozianowski, G., Dickmann, R., Lenoir-Wijnkoop, I., Walker, C., & Buddington, R. (2010). Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science and Technology. Bulletin: Functional Foods*. 7, 1–19.
- Gomes, A.M., Malcata, F.X., & Klaver, F.A. (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. *Journal of Dairy Science*. 81(11), 2817–2825.
- Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 13–22.
- Guarner, F., & Malagelada, J.-R. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*. 361(9356), 512–519.

- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantarum*, *129*, 283–295.
- Hasler C. M. (2002). Functional foods: benefits, concerns and challenges - A position paper from the American Council on Science and Health. *Journal of Nutrition*. *132*: 3772–3781.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., & Sanders M.E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. *11*, 506–514.
- Howlett, J.F., Betteridge, V.A., Champ, M., Craig, S.A., Meheust, A., & Jones, J.M. (2010). The definition of dietary fiber-discussions at the ninth vahouny fiber symposium: Building scientific agreement. *Food & Nutrition Research*. *54*, 5750.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). (2011). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2 395 (2011). Leche fermentada. Requisitos.
- Jay, J.M. (2000). Modern food microbiology. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Labuza, T. P. (1982). Shelf-Life Dating of Foods. Westport, Connecticut. *Food and Nutrition Press*.
- Langhendries, J.P., Van Hees, J.D.J., Lamboray, J.M., Darimont, J., Mozin, M.J., Secretin, M.C., & Senterre, J. (1995). Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. *21*(2), 177–181.

- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., von Ossowski, I., Reunanen, J., Palva, A., de Vos, W.M., De Keersmaecker, S.C.J., & Vanderleyden, J. (2012). Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG Pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 185–193.
- Ludwig, I.S., Broere, F., Manurung, S., Lambers, T.T., van der Zee, R., & Van Eden, W. (2018). *Lactobacillus rhamnosus* GG-Derived Soluble Mediators Modulate Adaptive Immune Cells. *Frontiers in Immunology*, 9(1), 1546–1552.
- Lungu, B., Ricke, S.C., Johnson, M.G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*. 15(1-2), 7-17.
- Minnesota Mining and Manufacturing Company. (2015). 3M Ciencia aplicada a la vida. Guía de interpretación de placas Petrifilm™ para recuento de *E. coli* y coliformes. St. Paul. USA.
- Minnesota Mining and Manufacturing Company. (2017). 3M Ciencia aplicada a la vida. Guía de interpretación de placas Petrifilm™ para recuento de bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras. México D.F.
- Moats, W.A., (1970). Kinetics of thermal death of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 105(1), 165-171.
- Mofid, V., Izadi, A., Mojtahedi, S.Y., & Khedmat, L. (2020). Therapeutic and nutritional effects of synbiotic yogurts in children and adults: A clinical review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 12, 851–859 (2020).
- Narvishi, D., Fard, N.A., & Sadrnia, M. (2021). Genomic and proteomic comparisons of bacteriocins in probiotic species *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and inhibitory ability of *Escherichia coli* MG 1655. *Biotechnology Reports*. 31, e00654.

- Ordoñez, J.A. (1998). Tecnología de los alimentos, volumen II: Alimentos de origen animal. Editorial Síntesis S.A, Madrid (España).
- Ovalles Acosta, J.C., Gisbert Soler, V. y Pérez Molina, A.I. (2017). Herramientas para el análisis de causa raíz (ACR). *3C Empresa: investigación y pensamiento crítico*, Edición Especial, 1-9.
- Pacheco, M.T., Moreno, F.J., & Villamiel, M. (2018a). Chemical and physicochemical characterization of orange by-products derived from industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(August 2017), 868–876.
- Pacheco, M.T., Vezza, T., Diez-Echave, P., Utrilla, P., Villamiel, M., & Moreno, F.J. (2018b). Anti-inflammatory bowel effect of industrial orange by-products in DSS-treated mice. *Food & Function*, 4888–4896.
- Pacheco, M.T., Villamiel, M., Moreno, R., & Moreno, F.J. (2019). Structural and rheological properties of pectins extracted from industrial sugar beet by-products. *Molecules*, 24(3), 392.
- Pacheco, M.T., Villamiel, M., & Moreno, F. J. (2019b). Obtención y caracterización de compuestos bioactivos procedentes de tubérculos andinos y de subproductos de la industria agroalimentaria. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid-España. 1, 1-309.
- Peng, S., Yang, Y., Li, S., Wu, Q., Shah, N. P., Wei, H., & Xu, F. (2014). Immunomodulatory activities of *Lactobacillus rhamnosus* ZDY114 and donkey milk in BALB/c mice. *International Dairy Journal*, 34(2), 263–266.
- Rani, R., Unnikrishnan, V., Dharaiya, C. N., Singh, B. (2012). Factors affecting syneresis in yoghurt: A review. *Indian Journal Dairy and Bioscience*, 23 (2012).
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*. 5, 1417–1435.

- Steward, K. (2022). An introduction to culturing bacteria. *Technology Networks – Immunology & Microbiology*. Accedido en marzo del 2022. Disponible en: <https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/an-introduction-to-culturing-bacteria-355566>
- Torrieri, E. (2016). Storage stability: Shelf life testing. *Encyclopedia of food and health. Reference Module in Food Science*, 188-192.
- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A. (2012). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage, *Food Research International*, 33(2), 97-102.
- Virk, A., Mandrekar, J., Berbari, E.F., Boyce, T.G., Fischer P.R., Kasten, M.J., Orenstein, R., Rosenblatt, J.E., Sampathkumar, P., Sia, I., Springer, D., & Witzig, T. E., (2013). A Randomized, double blind, placebo-controlled trial of an oral synbiotic (AKSB) for prevention of travelers' diarrhea. *Journal of Travel Medicine*. 20, p.88-94.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T. L., Washington, M. K., Shi, Y., Liu, L., Chaturvedi, R., Peek Jr., R.M., Wilson, K.T., & Polk, D. B. (2011). Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2242–2253.
- Yoo, H.-D., Kim, D.-J., Paek, S.-H., & Oh, S.-E. Plant cell wall polysaccharides as potential resources for the development of novel prebiotics. *Biomolecules & Therapeutics*. 20, 371–379.

CAPITULO VI

ANEXOS



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2395:2011
Segunda revisión

LECHES FERMENTADAS. REQUISITOS.

Primera Edición

FERMENTE MILKS. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos procesados, leches fermentadas, requisitos.
AL: 03.01-442
CDU: 637.146
CIR: 3112
ICS: 67.100.01

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</p>	<p>LECHES FERMENTADAS. REQUISITOS</p>	<p>NTE INEN 2395:2011 Segunda revisión 2011-07</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir las leches fermentadas, destinadas al consumo directo.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma se aplica a las leches fermentadas naturales: yogur, kéfir, kumis, leche cultivada o acidificada; leches fermentadas con ingredientes y leches fermentadas tratadas térmicamente.</p> <p>2.2 No se aplican a las bebidas de leches fermentadas</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para efectos de esta norma se adoptan las siguientes definiciones:</p> <p>3.1.1 <i>Leche Fermentada natural.</i> Es el producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, elaborado a partir de la leche por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de vencimiento. Si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación, no se aplica el requisito de microorganismos viables. Comprende todos los productos naturales, incluida la leche fermentada líquida, la leche acidificada y la leche cultivada y al yogur natural, sin aromas ni colorantes.</p> <p>3.1.2 <i>Producto natural.</i> Es el producto que no está aromatizado, no contiene frutas, hortalizas u otros ingredientes que no sean lácteos, ni está mezclado con otros ingredientes que no sean lácteos.</p> <p>3.1.3 <i>Yogur.</i> Es el producto coagulado obtenido por fermentación láctica de la leche o mezcla de esta con derivados lácteos, mediante la acción de bacterias lácticas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>, pudiendo estar acompañadas de otras bacterias benéficas que por su actividad le confieren las características al producto terminado; estas bacterias deben ser viables y activas desde su inicio y durante toda la vida útil del producto. Puede ser adicionado o no de los ingredientes y aditivos indicados en esta norma.</p> <p>3.1.4 <i>Kéfir.</i> Es una leche fermentada con cultivos ácido lácticos elaborados con granos de kéfir, <i>Lactobacillus kéfir</i>, especies de géneros <i>Leuconostoc</i>, <i>Lactococcus</i> y <i>Acetobacter</i> con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kéfir están constituidos por levaduras fermentadoras de lactosa (<i>Kluyveromyces marxianus</i>) y levaduras no fermentadoras de lactosa (<i>Saccharomyces omnisporus</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces exiguus</i>), <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Bifidobacterium</i> sp y <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>, por cuales deben ser viables y activos durante la vida útil del producto.</p> <p>3.1.5 <i>Kumis.</i> Es una leche fermentada con <i>Lactococcus Lactis</i> subsp <i>cremoris</i> y <i>Lactococcus Lactis</i> subsp <i>lactis</i>, los cuales deben ser viables y activos en el producto hasta el final de su vida útil, con producción de alcohol y ácido láctico.</p> <p>3.1.6 <i>Leche cultivada, o acidificada.</i> Es una leche fermentada por la acción de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (leche acidificada) o <i>Bifidobacterium</i> sp., u otros cultivos lácteos inocuos apropiados, los cuales deben ser viables y activos durante la vida útil del producto.</p> <p>3.1.7 <i>Leche fermentada tratada térmicamente.</i> Es el producto definido en el numeral 3.1.1 y 3.1.3, que ha sido sometido a tratamiento térmico, después de la fermentación. Los cultivos de microorganismos no serán viables ni activos en el producto final.</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos procesados, leches fermentadas, requisitos</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17 01 3000 - Baquero Moreno (E8-29) y Almageo - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

3.1.8 Leche fermentada con ingredientes. Son productos lácteos compuestos, que contienen un máximo del 30 % (m/m) de ingredientes no lácteos (tales como edulcorantes, frutas y verduras así como jugos, purés, pastas, preparados y conservantes derivados de los mismos, cereales, miel, chocolate, frutos secos, café, especias y otros alimentos aromatizantes naturales e inocuos) y/o sabores. Los ingredientes no lácteos pueden ser añadidos antes o luego de la fermentación.

3.1.9 Leche fermentada concentrada. Es una leche fermentada cuya proteína ha sido aumentada antes o luego de la fermentación a un mínimo del 5,6%. Las leches fermentadas concentradas incluyen productos tradicionales tales como Stragisto (yogur colado), Labneh, Ymer e Yvette.

3.1.10 Leche fermentada adicionada con microorganismos probióticos. Es el producto definido en el numeral 3.1.1 al cual se le han adicionado bacteria vivas benéficas, que al ser ingeridas favorecen la microflora intestinal.

3.1.11 Microorganismo probiótico. Microorganismo vivo, que suministrado en la dieta e ingerido en cantidad suficiente ejerce un efecto benéfico sobre la salud, más allá de los efectos nutricionales.

4. CLASIFICACIÓN

4.1 De acuerdo a sus características las leches fermentadas, se clasifican de la siguiente manera:

4.1.1 Según el contenido de grasa en:

- a) Entera.
- b) Semidescremada (parcialmente descremada).
- c) Descremada.

4.1.2 De acuerdo a los ingredientes en:

- a) Natural,
- b) Con ingredientes,

4.1.3 De acuerdo al proceso de elaboración en:

- a) Batido,
- b) Coagulado o afianado,
- c) Tratado térmicamente
- d) Concentrado,
- e) Deslactosado.

4.1.4 De acuerdo al contenido de etanol, el Kéfir se clasifica en:

- a) suave
- b) fuerte

5. DISPOSICIONES ESPECÍFICAS

5.1 La leche que se utilice para la elaboración de leches fermentadas debe cumplir con la NTE INEN 09, y posteriormente ser pasteurizada (ver NTE INEN 10) o esterilizada (ver NTE INEN 701) y debe manipularse en condiciones sanitarias según el Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura del Ministerio de Salud Pública.

(Continúa)

5.2 Se permite el uso de otras leches diferentes a las de vaca, siempre que en la etiqueta se declare de que mamífero proceda.

5.3 Las leches fermentadas, deben presentar aspecto homogéneo, el sabor y olor deben ser característicos del producto fresco, sin materias extrañas, de color blanco cremoso u otro propio, resultante del color de la fruta o colorante natural añadido, de consistencia pastosa; textura lisa y uniforme.

5.4 A las leches fermentadas pueden agregarse, durante el proceso de fabricación, crema previamente pasteurizada, leche en polvo, leche evaporada, grasa láctea anhidra y proteínas lácteas.

5.5 Los residuos de medicamentos veterinarios y sus metabolitos no deben superar los límites establecidos por el Codex Alimentario CAC/LMR 2 en su última edición.

5.6 Los residuos de plaguicidas, pesticidas y sus metabolitos, no deben superar los límites establecidos por el Codex Alimentario CAC/LMR 1 en su última edición.

5.7 Se permite el uso de vitaminas, minerales y otros nutrientes específicos, de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 1334-2.

6. REQUISITOS

6.1 Requisitos específicos

6.1.1 A las leches fermentadas podrán añadirse: azúcares o edulcorantes permitidos, frutas frescas enteras o en trozos, pulpa de frutas, frutas secas y otros preparados a base de frutas. El contenido de fruta adicionada no debe ser inferior al 5 % (m/m) en el producto final.

6.1.2 Se permite la adición de otros ingredientes como: hortalizas, miel, chocolate, cacao, coco, café, cereales, especias y otros ingredientes naturales. Cuando se utiliza café el contenido máximo de cafeína será de 200 mg/kg, en el producto final. El peso total de las sustancias no lácteas agregadas a las leches fermentadas no será superior al 30% del peso total del producto.

6.1.3 La leche fermentada con frutas u hortalizas, al realizar el análisis histológico deben presentar las características propias de la fruta u hortaliza adicionada.

6.1.4 Las leches fermentadas, ensayadas de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con lo establecido en la tabla 1.

TABLA 1. Especificaciones de las leches fermentadas

REQUISITOS	ENTERA		SEMIDESCREMADA		DESCREMADA		MÉTODO DE ENSAYO
	Min %	Max %	Min %	Max %	Min %	Max %	
Contenido de grasa	2,5	---	1,0	<2,5	---	<1,0	NTE INEN 12
Proteína, % cum En yogur, kéfir, kumis, leche cultivada	2,7	--	2,7	--	2,7	--	NTE INEN 16
Alcohol etílico, % m/v En kéfir suave En kéfir fuerte Kumis	0,5 -- 0,5	1,5 3,0 ---	0,5 -- 0,5	1,5 3,0 ---	0,5 -- 0,5	1,5 3,0 ---	NTE INEN 379
Presencia de adulterantes ¹⁾	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1500
Grasa Vegetal	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 1500
Suero de Leche	Negativo		Negativo		Negativo		NTE INEN 2401

1) Adulterantes: Hema y almidones (excepto los almidones modificados); soluciones salinas, suero de leche, grasas vegetales.

(Continúa)

6.1.5 Las leches fermentadas deben cumplir con los requisitos del contenido mínimo del cultivo del microorganismo específico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*; *Lactobacillus acidophilus*, según sea el caso), y de bacterias probióticas, hasta la fecha de vencimiento, de acuerdo con lo indicado en la tabla 2.

TABLA 2. Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

PRODUCTO	Yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada Mínimo	Kéfir y kumis Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	10^7 UFC/g	
Bacterias probióticas	10^6 UFC/g	
Levaduras		10^4 UFC/g

6.1.6 Requisitos microbiológicos

6.1.6.1 Al análisis microbiológico correspondiente las leches fermentadas deben dar ausencia de microorganismos patógenos, de sus metabolitos y toxinas.

6.1.6.2 Las leches fermentadas, ensayadas de acuerdo con las normas ecuatorianas correspondientes deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la tabla 3.

TABLA 3. Requisitos microbiológicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Coliformes totales, UFC/g	5	10	100	2	NTE INEN 1529-7
Recuento de <i>E. coli</i> , UFC/g	5	<1	-	0	NTE INEN 1529-8
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	200	500	2	NTE INEN 1529-10

En donde:

n = Número de muestras a examinar.

m = Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = Índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

6.1.6.3 Cuando se analicen muestras individuales se tomarán como valores máximos los expresados en la columna m.

6.1.6.4 Las leches fermentadas tratadas térmicamente y envasadas asépticamente deben demostrar esterilidad comercial de acuerdo a NTE INEN 2335

6.1.7 Aditivos. Se permite el uso de los aditivos establecidos en la NTE INEN 2074 para estos productos

6.1.8 Contaminantes. El límite máximo de contaminantes no deben superar los límites establecidos por el Codex Stan 193-1995

6.2 Requisitos complementarios

6.2.1 Las leches fermentadas, siempre que no se hayan sometido al proceso de esterilización, deben mantenerse en refrigeración durante toda su vida útil.

(Continúa)

6.2.2 Las unidades de comercialización de este producto debe cumplir con lo dispuesto en la Ley 2007-76 del Sistema Ecuatoriano de la Calidad.

7. INSPECCIÓN

7.1 Muestreo. El muestreo debe realizarse de acuerdo con lo establecido en la NTE INEN 04.

7.2 Aceptación o rechazo. Se acepta el lote si cumple con los requisitos establecidos en esta norma; caso contrario se rechaza.

8. ENVASADO Y EMBALADO

8.1 Las leches fermentadas deben expendirse en envases asépticos, y herméticamente cerrados, que aseguren la adecuada conservación y calidad del producto.

8.2 Las leches fermentadas deben acondicionarse en envases cuyo material, en contacto con el producto, sea resistente a su acción y no altere las características organolépticas del mismo.

8.3 El embalaje debe hacerse en condiciones que mantenga las características del producto y aseguren su inocuidad durante el almacenamiento, transporte y expendio.

9. ROTULADO

9.1 El Rotulado debe cumplir con los requisitos establecidos en el RTE INEN 022

(Continúa)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

<p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 4 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 10 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 12 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 16 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 19 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 379</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 701 Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1334-2</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1500</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-7</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-10</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2074</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2335</p> <p>Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2401</p> <p>Reglamento Técnico Ecuatoriano RTE INEN 022</p> <p>Ley 2007-75</p> <p>Decreto Ejecutivo 3253</p> <p>Codex Alimentarius CAC/MRL 1</p> <p>Codex Alimentarius CAC/MRL 2</p> <p>Codex Stan 193-1995 Norma General del Codex para los contaminantes y toxinas presentes en los alimentos.</p>	<p>Leche y productos lácteos. Muestreo Leche cruda. Requisitos. Leche pasteurizada. Requisitos. Leche. Determinación del contenido de grasa. Leche. Determinación de la acidez titulable. Leche. Determinación de la proteína Leche. Ensayo de fosfatasa. Conservas vegetales. Determinación de alcohol etílico. Leche larga vida. Requisitos Rotulado de productos alimenticios para consumo humano. Parte 2. Rotulado nutricional. Requisitos. Leche. Métodos de ensayo cualitativos para la determinación de la calidad. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del recuento de colonias. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y escherichia coli. Control microbiológico de los alimentos. Determinación del número de mohos y levaduras viables. Aditivos alimentarios permitidos para consumo humano. Listas positivas. Requisitos. Leche larga vida. Método para control de la esterilidad comercial Leche determinación de suero de quesería en leche fluida y en polvo. Método de cromatografía líquida de alta eficacia. Rotulado de productos alimenticios procesados, envasados y empaquetados del Sistema Ecuatoriano de la Calidad. Publicado en el Registro Oficial No. 26 de 2007-02-22. Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Procesados, Registro Oficial 696 de 4 de Noviembre del 2002 Lista de límites máximos para residuos de plaguicidas en los alimentos. Lista de límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios.</p>
---	--

Z.2 BASES DE ESTUDIO

<p>Norma Andina. NA.078:2009 Leches fermentadas. Requisitos. Comunidad Andina, Lima 2009</p> <p>Norma Técnica Colombiana NCT 805 Productos Lácteos. Leches Fermentadas. Bogotá 2000.</p> <p>Programa Conjunto FAO – OMS Norma del Codex para leches fermentadas. Codex Stan 243-2003. Adoptado 2003. Revisión 2008, 2010</p>
--

(Continúa)

Anexo 2. ANOVA

Tabla de ANOVA para el diseño 2³

Códigos asignados a los niveles:

<p>Factor A: Tipo de cultivo a1: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> (temperatura óptima de incubación a 44 °C) a2: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium s. p.</i> (temperatura óptima de incubación a 37 °C)</p> <p>Factor B: Dosis del cultivo b1: 0,006 % b2: 0,012 %</p> <p>Factor C: Cantidad de prebiótico (pectina cítrica) c1: 0 % c2: 0,34 %</p> <p><i>Réplicas (L o l): 2</i></p>

Códigos asignados a los niveles según la notación estándar del diseño 2³:

<p>Factor A: Tipo de cultivo a0: <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> (temperatura óptima de incubación a 44 °C) a1: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Bifidobacterium s. p.</i> (temperatura óptima de incubación a 37 °C)</p> <p>Factor B: Dosis del cultivo b0: 0,006 % b1: 0,012 %</p> <p>Factor C: Cantidad de prebiótico (pectina cítrica) c0: 0 % c1: 0,34 %</p> <p><i>Réplicas (L o l): 2</i></p>

Tratamientos y tiempos de vida útil (TVU), ordenados según la notación inicial y la notación estándar para el diseño factorial completo 2³ (Saltos, 2013):

Según la notación inicial		Según la notación estándar				
Nivel más bajo: 1 Nivel más alto: 2		Nivel más bajo: 0 Nivel más alto: 1		R1	R2	TVU promedio
T1	a1b1c1	T1	a0b0c0	30,30	30,50	30,40
T2	a1b1c2	T5	a1b0c0	32,80	33,20	33,00
T3	a1b2c1	T3	a0b1c0	33,30	33,36	33,33
T4	a1b2c2	T7	a1b1c0	35,96	35,98	35,97
T5	a2b1c1	T2	a0b0c1	33,20	33,23	33,22
T6	a2b1c2	T6	a1b0c1	36,22	36,24	36,23
T7	a2b2c1	T4	a0b1c1	36,08	36,11	36,10
T8	a2b2c2	T8	a1b1c1	37,15	37,19	37,17

Cálculos para construir la tabla de ANOVA 2³:

Tiempo de vida útil:					
Tratamientos		R1	R2	Total	Y... ^{^2}
a0b0c0	1	30,30	30,50	60,80	3696,64
a1b0c0	a	32,80	33,20	66,00	4356,00
a0b1c0	b	33,30	33,36	66,66	4443,56
a1b1c0	ab	35,96	35,98	71,94	5175,36
a0b0c1	c	33,20	33,23	66,43	4412,94
a1b0c1	ac	36,22	36,24	72,46	5250,45
a0b1c1	bc	36,08	36,11	72,19	5211,40
a1b1c1	abc	37,15	37,19	74,34	5526,44
		275,01	275,81	550,82	Y...
	Y...k ^{^2}	75630,50	76071,16		38072,79
	Σ (Y...k ^{^2})	151701,66			Σ (Y... ^{^2})

Valores de los efectos totales aplicando el método de Yates:

Tiempo de vida útil:					
Tratamientos		Total	1er efecto	2do efecto	Efectos totales
a0b0c0	1	60,80	126,80	265,40	550,82
a1b0c0	a	66,00	138,60	285,42	18,66
a0b1c0	b	66,66	138,89	10,48	19,44
a1b1c0	ab	71,94	146,53	8,18	-3,80
a0b0c1	c	66,43	5,20	11,80	20,02
a1b0c1	ac	72,46	5,28	7,64	-2,30
a0b1c1	bc	72,19	6,03	0,08	-4,16
a1b1c1	abc	74,34	2,15	-3,88	-3,96
		550,82			

Cálculos para hallar las suma de cuadrados:

Tiempos de vida útil elevados al cuadrado:				
Tratamientos		R1	R2	Total
a0b0c0	1	918,09	930,25	1848,34
a1b0c0	a	1075,84	1102,24	2178,08
a0b1c0	b	1108,89	1112,89	2221,78
a1b1c0	ab	1293,12	1294,56	2587,68
a0b0c1	c	1102,24	1104,23	2206,47
a1b0c1	ac	1311,89	1313,34	2625,23
a0b1c1	bc	1301,77	1303,93	2605,70
a1b1c1	abc	1380,12	1383,10	2763,22
		9491,96	9544,54	19036,50
				Σ (Y _{ijkl} ^{^2})

La suma de cuadrados para cada efecto principal y de las interacciones, la obtenemos de manera general, aplicando la siguiente fórmula:

$$SC = (\text{Efectos totales}^2) / ((2^3) * 2)$$

Réplicas =	2
Tratamientos =	8
a =	2
b =	2
c =	2

$$SCTotal = \sum (Y_{ijkl}^2) - ((y_{...})^2) / (a * b * c * l)$$

$$SCTotal = 73,831$$

$$SCRéplicas = ((1/abc)(\sum \sum Y \dots)^2) - ((y_{...})^2) / (a * b * c * l)$$

$$SCRéplicas = 0,040$$

Cuadrado medio de cada fuente de variación para el cuadrado medio del error.

Análisis de varianza del tiempo de vida útil. Diseño 2³ con dos réplicas.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Razón de varianza (RV)	Efectos medios	FT	
Réplicas	0,040	1	0,040	4,382	34,426	5,591	con 1 grados de libertad en el numerador y 7 en el denominador, se observa este valor de F en la tabla F de Fisher para alfa 0,05.
A	21,762	1	21,762	2383,968	1,166	5,591	
B	23,620	1	23,620	2587,437	1,215	5,591	
AB	0,902	1	0,902	98,865	-0,238	5,591	
C	25,050	1	25,050	2744,134	1,251	5,591	
AC	0,331	1	0,331	36,219	-0,144	5,591	
BC	1,082	1	1,082	118,485	-0,260	5,591	
ABC	0,980	1	0,980	107,366	-0,248	5,591	
Residuo	0,064	7	0,009				
	73,831						

$$SCResiduo = SCT - SCRéplicas - SCTr$$

Construida la tabla de ANOVA, se compara la razón de varianza (RV) con el valor F de tablas. Si RV es mayor que el F de tablas, existe influencia de esa fuente de variación sobre la variable dependiente (Saltos, 1993).

Resultado:

La tabla ANOVA para el diseño 2³, muestra valores de la razón de varianza (RV), mayores que el estadístico F de Fisher observado en la tabla (α 0,05), para el factor A, el factor B, el factor C, y para las interacciones; por lo tanto en este estudio "existe influencia estadísticamente significativa del factor A (tipo de cultivo), factor B (dosis del cultivo), factor C (cantidad de prebiótico) y de las interacciones de estos factores, sobre el tiempo de vida útil (TVU) de la bebida elaborada".

Para seleccionar el mejor tratamiento, se debe realizar una comparación de medias aplicando la prueba de Tukey (95 %) (p < 0,05).

Luego de dicha comparación, entre las medias de los 8 tratamientos (Tabla 3), se seleccionó el mejor tratamiento en función del TVU más alto, puesto que interesa el mayor tiempo de conservación de la bebida.

Anexo 3. Fotografías tomadas durante el proceso de elaboración y análisis de la bebida.



Incubación de los tratamientos del 1 al 4 con temperatura de 44°C



Incubación de los tratamientos del 5 al 8 con temperatura de 37°C



Almacenamiento de los tratamientos con temperatura de 8°C



Análisis de Acidez Titulable



Análisis de °BRIX



Análisis de pH



Cajas Petrifilm



Desinfectando la Biofase



Sembrando en las placas
Petrifilm



Haciendo las diluciones



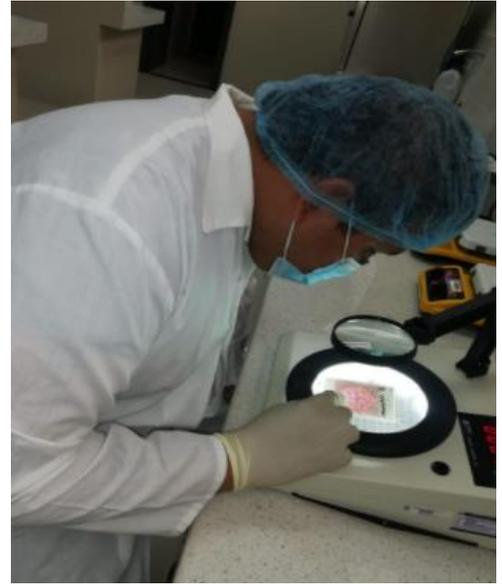
Sembrando en las placas
Petrifilm



Incubación de las placas
Petrifilm



Incubación de las placas
Petrifilm



Conteo de los
microorganismos en las
placas Petrifilm