



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán

Desarrollo De Un Producto Fermentado Funcional Formulado Con
Leche Vegetal.

T E S I S

Que Para Obtener El Título De:

Ingeniera En Alimentos

Presenta:

Yesenia Ramos Barrera

Asesora:

Dra. Clara Ínes Álvarez Manrique

Co-asesoras:

Dra. Alma Virginia Lara Sagahón

I.B.Q. Leticia Figueroa Villareal

Cuautitlán Izcalli, Estado De México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo de un producto fermentado funcional formulado con leche vegetal.

Que presenta la pasante: Yesenia Ramos Barrera

Con número de cuenta: 410049956 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Mayo de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
VOCAL	I.A. Sandra Margarita Rueda Enríquez	
SECRETARIO	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
1er. SUPLENTE	M. I. Miguel de Nazareth Pineda Becerril	
2do. SUPLENTE	M. en C. Enrique Fuentes Prado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

AGRADECIMIENTOS

Durante este periodo de tiempo he podido creer profesionalmente, pero también personalmente, y esto último solo ha sido posible, gracias a las personas que forman parte de mi vida. Es a ellas a quienes quiero demostrar mis agradecimientos en esta pequeña parte de mi tesis.

GRACIAS

A dios, por todas las cosas maravillosas que me ha dado, por ser parte de mi vida y acompañarme en cada momento hasta este instante.

A mis Padres por enseñarme a esforzarme y a trabajar por lo que deseo, por su apoyo incondicional, por todo el cariño y momentos felices que me han dado durante toda mi vida. Los amo con todo mi corazón y estoy segura de que todo lo que soy se los debo en gran parte a ustedes, gracias.

A mis hermanas, a las cuales adoro con toda mi alma y a las cuales agradezco infinitamente todo el amor, la paciencia y los momentos inolvidables, así como el apoyo que me han brindado siempre estando a mi lado.

A mí abuelita, gracias por siempre estar a mi lado, por acompañarme en este camino, por cuidarme y siempre creer en mí. Te quiero muchísimo <3.

A mi familia, (tíos y primos) gracias por aguantar mis charlas sobre la tesis e interesarse por este mundo loco de la investigación y sobre todo gracias por apoyarme siempre y por creer en mí, en especial a mí Majo que me inspira a dar lo mejor de mí cada día .

A mí querida asesora Dra. Clarita, porque además de ser una excelente profesora, ha sido una gran amiga, gracias por todas las lecciones no solo

profesionales si no también personales, gracias por sus consejos, su paciencia, su cariño.

A mi co-asesora Dra. Vicky, por sus grandes contribuciones a este trabajo y su inestimable ayuda y sobre todo, por su paciencia y alegría. Gracias por siempre estar ahí.

A mi co-asesora I.B.Q. Lety, por abrirme las puertas del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, gracias por sus enseñanzas y motivaciones.

A mis amigos; Choche, Dul, Yuri, Santi y Crhis, gracias por siempre estar a mi lado a pesar de la distancia, por creer en mí y apoyarme en cada momento haciéndome saber que siempre contaría con ustedes. Los quiero muchísimo.

A mis compañeros de laboratorio, Adi, Absa, Bere, Liz, Laurita, Vicky, Chucho y Fani, con los cuales compartí muchos momentos, gracias por todas las risas y las palabras de aliento.

A mis amigos Ere, Jared, Rosita, Toño, Angie, Eve (MG) y sobre todo a Eve, gracias por siempre estar a mi lado, por acompañarme durante todo este camino, haciendo más llevadero los días de estrés, por todos esos buenos (y malos) momentos que hemos compartido dentro y fuera de la escuela.

A mi Marquitos, gracias por cada segundo de alegría que has traído a mi vida, gracias por la paciencia infinita que me has tenido, por cada momento compartido y sobre todo gracias por todo el amor. Te amo.

ÍNDICE GENERAL.

CONTENIDO	PÁGINA:
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	i
INTRODUCCIÓN	iii
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES.	1
1.1 Generalidades de la Avena.	1
1.1.2 Estructura del grano de avena.....	1
1.1.3 Cultivo del cereal en México.....	9
1.1.4 Productos derivados de la semilla.	10
1.2 Alimentos funcionales.	11
1.2.1 Alimentos probióticos.....	12
1.3 Yogurt.	18
1.3.1 Definición.	18
1.3.2 Tipos.....	21
1.3.3 Proceso de elaboración del yogurt batido o para beber.....	21
1.3.4 Descripción y funcionalidad de las materias primas en la elaboración de yogurt.....	25
1.4 Microencapsulación.....	30
1.4.2 Materiales empleados en la microencapsulación.	32
1.5 Evaluación sensorial.	36
1.5.1 Tipos de pruebas.....	37

1.5 Mercadotecnia.....	39
1.5.1 Estudio de mercado	39
1.6 Vida útil.....	44
1.6.1 Factores que afectan la calidad y vida útil.....	45
1.6.2 Métodos para determinar la vida útil.....	47
1.6.3 Diseño de estudio de vida útil	49
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	50
2.1 Objetivos.....	50
2.2 Cuadro metodológico:	51
2.3 Descripción de la metodología experimental.....	52
2.3.1 Actividades preliminares:	52
2.3.2 Objetivo particular 1. Desarrollo del estudio de mercado e identificación del mercado meta.....	57
2.3.3 Objetivo particular 2. Encapsulación del microorganismo probiótico y de la pulpa de zarzamora.	59
2.3.4 Objetivo particular 3. Desarrollo y selección de los prototipos del producto fermentado de avena.	62
2.3.5 Objetivo particular 4. Determinación y comparación de las propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas, del prototipo seleccionado.	65
2.3.6 Objetivo particular 5. Selección del envase, desarrollo de la etiqueta y determinación del precio del producto fermentado de avena.....	67
2.3.7 Objetivo particular 6. Determinación de la vida útil del producto fermentado de avena.....	67
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	69
3.1. Actividades preliminares.	69

3.1.1 Selección de la leche vegetal.	69
3.1.2 Actividad preliminar 2. Análisis químico proximal y fisicoquímico de las materias primas.	71
3.1.3 Actividad preliminar 3: Selección, activación, aislamiento e identificación de la cepa liofilizada y el microorganismo probiótico.....	74
3.2 Objetivo particular 1. Desarrollo del estudio de mercado e identificación del mercado meta.....	79
3.2.1. Estudio de mercado.	79
3.3 Objetivo particular 2. Encapsulación del microorganismo probiótico y de la pulpa de zarzamora.	84
3.3.1 Obtención de la masa celular del L. casei para la encapsulación.....	84
3.3.2 Encapsulamiento del microorganismo probiótico (L. casei), determinación del diámetro medio.	85
3.3.3 Determinación de la concentración de microorganismo probiótico encapsulado.	85
3.3.4 Análisis de perfil de textura de las cápsulas de probiótico.	86
3.3.4 Determinación de la eficiencia de la encapsulación y de la sobrevivencia del L. casei.	87
3.4 Objetivo particular 3. Desarrollo y selección de los prototipos del producto fermentado de avena.	88
3.4.1 Determinación experimental de las condiciones de fermentación de la bebida de avena.....	88
3.4.2 Descripción del diagrama de proceso para la elaboración del producto fermentado tipo yogurt a base de leche de avena.	92
3.4.3 Evaluación sensorial de los prototipos.	95
3.5 Objetivo particular 4. Determinación y comparación de las propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas, del prototipo seleccionado.	103

3.5.1 Evaluación química y fisicoquímica del prototipo seleccionado:	103
3.5.2 Evaluación microbiológica del prototipo seleccionado:	106
3.6 Objetivo particular 5. Selección del envase, desarrollo de la etiqueta y determinación del precio del producto fermentado de avena.	106
3.6.1 Selección del envase.	106
3.6.2 Diseño de la etiqueta.	107
3.6.3 Determinación del costo unitario del producto.	109
3.7 Objetivo particular 6. Determinación de la vida útil del producto fermentado de avena	111
3.7.1 Determinación de vida útil fisicoquímica del producto fermentado de avena.....	111
3.7.2 Determinación de la vida útil microbiológica del producto fermentado de avena. ..	113
3.7.3 Determinación de la vida útil sensorial del producto fermentado de avena.....	116
CONCLUSIONES.....	119
RECOMENDACIONES.	121
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS.....	I

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA:	PÁGINA:
Figura 1: Estructura de la planta de avena (Parson, 1983).	2
Figura 2: Estructura del grano de avena (Mazza, 2000).	4
Figura 3: Principales Estados Productores de Avena Grano (2007-2009), (SIAP-SAGARPA, 2010).	9
Figura 4: Tabla de clasificación de las leches fermentadas.	15
Figura 5: Esquematización del proceso de formación del coágulo del yogurt (Castro, 2005). ..	23
Figura 6: Formula general de los glicósidos de stevia rebaudiana.	29
Figura 7: Estructura de una microcápsula, donde la pared está conformada por el agente encapsulante y el núcleo por la sustancia activa.	31
Figura 8: Método de extrusión para la encapsulación de microorganismos.	32
Figura 9: Métodos empleados en la microencapsulación (Madene <i>et al.</i> , 2006).	33
Figura 10: Estructura química del alginato.	36
Figura 11: Componentes principales de una etiqueta.	43
Figura 12: Diagrama de elaboración de la leche de avena.	53
Figura 13: Activación y aislamiento del cultivo láctico liofilizado.	55
Figura 14: Método de diluciones para conteo microbiológico.	56
Figura 15: Encuesta para el estudio de mercado.	58
Figura 16: Representación gráfica de la obtención de masa celular del <i>L. casei</i>	59
Figura 17: Encapsulación con alginato de sodio y cloruro de calcio del microorganismo.	60
Figura 18: Metodología para el conteo del número de microorganismos presentes en las cápsulas.	61
Figura 19: Primera parte de la encuesta de evaluación sensorial para selección de prototipo.	64
Figura 20: Segunda parte de la encuesta de evaluación sensorial para el prototipo.	65
Figura 21: Colonias encontradas en el cultivo iniciador dilución 10^{-4}	74

Figura 22: Identificación morfológica de las variaciones de colonias presentes en el cultivo iniciador, de izquierda a derecha se puede observar en la primera imagen un lactobacilo largo y delgado, seguido por un lactobacilo corto y finalmente un coco.	75
Figura 23: Morfología del <i>L. bulgaricus</i>	75
Figura 24: Pruebas bioquímicas realizadas al <i>L. bulgaricus</i>	77
Figura 25: Pruebas bioquímicas realizadas al microorganismo probiótico.....	79
Figura 26: Frecuencia de consumo de los derivados lácteos.	80
Figura 27: Tiempo empleado por los encuestados en desayunar (gráfico de la izquierda) y porcentaje de consumo de productos o derivados lácteos (gráfico de la derecha).....	80
Figura 28: Conocimiento y/o consumo de leches vegetales.....	81
Figura 29: Porcentaje de la población que tiene conocimientos acerca de la funcionalidad de las bebidas vegetales.....	81
Figura 30: Porcentaje de población que tiene conocimientos acerca de los alimentos funcionales.....	81
Figura 31: Interés en el consumo de un producto formulado con leche vegetal.	82
Figura 32: Presentación preferida para el producto fermentado funcional.	82
Figura 34: Sabor de preferencia para el producto.	83
Figura 33: Porcentaje de preferencia de consumo del producto.	83
Figura 35: Posible precio a pagar por el producto fermentado funcional tipo yogurt.	84
Figura 36: Cápsula de <i>L. casei</i> , elaborada con alginato con diámetro promedio de 2 mm.	85
Figura 37: Cápsulas de microorganismos probióticos elaboradas con alginato.	86
Figura 38: Curva de descenso de pH.	91
Figura 39: Curva de acidificación.....	92
Figura 40: Diagrama de proceso para la elaboración del producto fermentado funcional (* parámetros establecidos por medio de la evaluación sensorial).....	94
Figura 41: Gráfico radial de las medianas de los atributos evaluados para cada prototipo.....	95
Figura 42: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de apariencia.	97

Figura 43: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de dulzor.....	98
Figura 44: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de acidez.....	99
Figura 45: Gráfica de efecto de interacción de la pulpa sobre el atributo de sensación de esferas.....	100
Figura 46: Gráfica de efecto de la pulpa sobre el atributo de olor.	101
Figura 47: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de sabor.	102
Figura 48: Envase de HDPL pigmentado blanco, para el producto fermentado de avena.	107
Figura 49: Representación gráfica de los elementos de la etiqueta conforme a la NOM-051-SCFI/SSA1-2010.	108
Figura 50: Etiqueta con dimensiones del producto fermentado de avena.....	110
Figura 51: Efecto de acidificación y descenso de pH del producto fermentado de avena respecto al tiempo de almacenamiento.	111
Figura 52: Incremento del porcentaje de sinéresis del producto fermentado de avena con respecto al tiempo de almacenamiento.	112
Figura 53: Descenso del número de microorganismo probióticos totales en el producto fermentado de avena durante su tiempo de almacenamiento.....	114
Figura 54: Comportamiento del microorganismo encapsulado y eficiencia de encapsulación con respecto al tiempo de almacenamiento.....	115
Figura 55: Dureza (Kgf.) exhibida por las cápsulas de probiótico encapsulado con respecto al tiempo de almacenamiento.	116

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA:	PÁGINA:
Tabla 1: Composición química aproximada de los granos de cereales.....	3
Tabla 2: Composición por solubilidad de las proteínas de los granos enteros de cereales.....	5
Tabla 3: Características principales de las proteínas componentes de la avena.	6
Tabla 4: Comercio de la semilla de avena en México (INEGI, 2010).	10
Tabla 5: Factores extrínsecos que afectan la viabilidad de los probióticos.	13
Tabla 6: Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo al tipo de su flora dominante. ..	14
Tabla 7: Diferenciación de las bacterias lácticas según su manera de fermentar la glucosa. ..	17
Tabla 8: Especificaciones fisicoquímicas.	19
Tabla 9: Especificaciones microbiológicas.....	20
Tabla 10. Composición nutrimental en 100 g de zarzamora (Rubus fruticosus).	30
Tabla 11: Principales materiales empleados en la encapsulación.	34
Tabla 12: Clasificación de los métodos de evaluación sensorial.....	38
Tabla 13. Condiciones experimentales para determinar el efecto de la pulpa y el edulcorante en propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto fermentado.	63
Tabla 14: Métodos empleados para la determinación de la composición química y fisicoquímica.	66
Tabla 15: Cuadro comparativo sobre las características organolépticas y de fermentación de las bebidas vegetales.....	69
Tabla 16: Efecto de la concentración de goma y de avena en algunas características de la leche de avena elaborada.....	70
Tabla 17: Parámetros físicos, fisicoquímicos y químicos de la leche de avena comparados con la leche de soya (* Cada prueba se realizó por triplicado, reportándose el promedio y el coeficiente de variación).	71
Tabla 18: Parámetros físicos, fisicoquímicos y químicos de la pulpa de zarzamora (* Cada prueba se realizó por triplicado, reportándose el promedio).....	73

Tabla 19: Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas al <i>L. bulgaricus</i> del cultivo liofilizado, parámetros empleados de COWAN and STEEL'S.	76
Tabla 20: Resultados obtenidos de la prueba bioquímica para el microorganismo probiótico, parámetros empleados de COWAN and STEEL'S.	78
Tabla 21: Datos obtenidos del análisis de textura de las cápsulas de <i>L. casei</i> elaboradas con alginato al 1.5 % (* pruebas realizadas por triplicado, reportando los promedios).	86
Tabla 22: Resultados de consistencia obtenidos para los prototipos (* valor determinado a un yogurt comercial).	89
Tabla 23: Determinación de concentración de glucosa e inóculo, para estandarizar el proceso.	89
Tabla 24: Representación gráfica de los prototipos obtenidos con el diseño factorial para obtener las condiciones óptimas de fermentación.	90
Tabla 25: Resultados del análisis de varianza.	96
Tabla 26: Componentes del producto fermentado funcional tipo yogurt.	103
Tabla 27: Composición química de la bebida fermentada de avena, comparada con un yogurt bebible comercial.	104
Tabla 28: Estimación de la vida útil sensorial del producto fermentado de avena, de acuerdo al modelo logarítmico normal.	117
Tabla 29: Estimación de vida útil sensorial para los atributos de sabor, olor, apariencia y acidez, con un porcentaje de rechazo del 25 %.	117

RESUMEN

El interés del consumidor por su salud ha incrementado en años recientes, comportamiento que ha contribuido al aumento en el mercado nacional de productos con distintas ventajas nutricionales, como los alimentos probióticos, los cuales son definidos por Schrezenmeir y Vrese (2001), como un preparado o un producto (lácteo o no lácteo) que contiene microorganismos viables en cantidades suficientes, que modifican la microflora (por implantación o colonización) del huésped y por este medio ejercen efectos beneficiosos sobre su salud.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue desarrollar un producto fermentado funcional tipo yogurt elaborado con leche de avena y pulpa de zarzamora, para emplearlo como suplemento alimenticio por la población en general. Para ello se determinó la viabilidad del producto mediante una investigación de mercado, cuyos resultados arrojaron que el 92.5 % de los encuestados se encontrarían dispuestos a consumir este producto. Se decidió por un producto con el microorganismo probiótico encapsulado para prolongar su viabilidad, la encapsulación fue mediante la técnica de extrusión empleando alginato de sodio y cloruro de calcio, obteniendo capsulas de 2 mm de diámetro, que presentaban concentraciones de 7.5×10^9 UFC/g *L. casei*, y una eficiencia de encapsulación de 94.52 %. Consecutivamente se desarrollaron 4 prototipos en los cuales se varió la proporción de edulcorante y pulpa disuelta (4 % edulcorante: 15 % pulpa, 5 % edulcorante: 15 % pulpa, 4 % edulcorante: 0 % pulpa, 5 % edulcorante: 0 % pulpa), estos se sometieron a una prueba sensorial de intervalos, eligiendo mediante un análisis de varianza al prototipo que presento mejores características organolépticas eligiéndose así al de menor concentración de edulcorante y de pulpa disuelta (4 % y 15 % respectivamente), en el cual se evaluaron propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas, según lo establece la normatividad mexicana, determinando así que este contaba con los requerimientos necesarios para ser considerado una bebida fermentada de características probióticas (7.5×10^7 UFC/g), reducida en calorías y baja en grasa (NOM-086-SSA1, 1994), la cual de acuerdo al análisis de supervivencia y las pruebas

realizadas cuenta con un periodo de 17 días de vida útil almacenada a 5 °C, en un envase de HDPE pigmentado blanco con capacidad de 80 ml.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el concepto de nutrición ha evolucionado notablemente, el actual interés radica en la relación entre la alimentación y las enfermedades crónicas no transmisibles (Cortés *et al.*, 2005). Siguiendo esta tendencia, los consumidores, buscan en el mercado alimentos que contribuyan a su salud y bienestar, en especial aquellos que ejercen una acción beneficiosa sobre algunos procesos fisiológicos y/o reducen el riesgo de padecer una enfermedad, estos alimentos se han denominado funcionales y su importancia radica en que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional, contribuyendo de esta manera en la conservación de la salud, disminuyendo el riesgo de enfermedad (Olagnero *et al.*, 2007).

Dentro del grupo de los alimentos funcionales podemos encontrar a las bebidas fermentadas con probióticos (Mazza, 2000), las cuales ejercen efectos beneficiosos sobre la salud, ya que contiene microorganismos viables en cantidad suficiente, que modifican la microflora (por implantación o colonización) del huésped (Schresenmeir & Vrese, 2001).

Existe una amplia variedad de bebidas fermentadas, las cuales se pueden clasificar en función al tipo de microorganismo utilizado en su elaboración. Dentro de estas, es de interés en el presente estudio la leche fermentada (yogurt), que según el CODEX, es un producto obtenido por medio de la fermentación de la leche, con o sin modificaciones en la composición por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la disminución del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima (CODEX Alimentarius, 2003).

Debido a los problemas de salud actuales en México (Centro de Nutrición, Obesidad y Alteraciones Metabólicas., 2012), en este proyecto se planteó el desarrollo de un producto fermentado funcional tipo yogurt a base de una bebida de avena (leche de avena), ya que este cereal además de presentar todas las características normales de un alimento (carácter nutritivo básico, sabor y textura agradables), proporciona también un efecto beneficioso para la salud, declaración que se basa en numerosos estudios clínicos que llegaron a la conclusión

de que los productos de avena pueden reducir los niveles de colesterol en suero, por su alto contenido de β -glucano (Whelch, 1995). Además para incrementar la aceptación del mismo y su valor nutricional, se adicionó un edulcorante natural bajo en calorías (stevia) capaz de inhibir el desarrollo de microorganismos en la zona bucal (Giannuzzi & Molina, 1995) y un saborizante de zarzamora (*Rubus fruticosus*), el cual le proporciona al producto un aporte extra de fibra y una gran cantidad de carotenoides y antocianinas que presentan una actividad antioxidante (Andrade *et al.*, s.f.).

Para conservar la viabilidad de los microorganismo durante el almacenamiento del producto se adicionó un probiótico (*L. casei*) encapsulado, el cual además de brindar mayor funcionalidad permite reducir la intolerancia a la lactosa y aumentar la respuesta inmunológica (Magariños *et al.*, 2008).

El conjunto de estos componentes (leche de avena, los probióticos, la stevia y la pulpa de zarzamora), permite la obtención de un producto funcional con buenas características nutricionales, organolépticas y de bajo aporte calórico.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES.

1.1 Generalidades de la Avena.

La avena (*Avena sativa*) es una planta herbácea anual, perteneciente a la familia de las gramíneas (SAGARPA, 2010). Posee raíces más abundantes y profundas que las de los demás cereales; los tallos son gruesos, rectos y cilíndricos, pueden variar de medio metro y hasta metro y medio, están formados por varios entrenudos que terminan en gruesos nudos; las hojas son planas y alargadas de longitud aproximada a los 25 cm y ancho de 1 hasta 1.6 cm; su lígula de longitud media, la espiga se encuentra formada por 20 o hasta 100 espiguillas por panícula, tiene un grano parecido al del trigo pero más largo y puntiagudo en ambos extremos, no cuenta con aurículas, en la etapa de la plántula, las hojas se despliegan en sentido contrario a las manecillas del reloj, produce de 3 a 5 macollas y su inflorescencia es un conjunto de espigas o racimos que nacen de un mismo tallo las cuales se denominan panoja o panícula, como se puede observar en la **Figura 1** (Parson, 1983).

Es considerada una planta de estación fría, muy sensible a las altas temperaturas sobre todo durante la floración y la formación del grano. Es muy exigente en agua por tener un coeficiente de transpiración elevado, aunque le puede perjudicar el exceso de humedad. Se adapta a terrenos muy diversos, preferentemente profundos y arcillo-arenosos. La cosecha se realiza con trilladora de cereales cuando el grano está maduro y seco (Salmerón, 2003).

El grano de avena es básicamente de consumo humano, se utiliza en forma de hojuelas y se cocina en sopas, atoles y guisos; como forraje se emplea principalmente en la alimentación de ganado (Scade, 1981).

1.1.2 Estructura del grano de avena.

Los granos enteros de todos los cereales tienen una composición química y un valor nutritivo parecido. Aportan energía a partir de carbohidratos y de grasas, junto con una porción variable de proteína vegetal (FAO, 1990).

El grano del cereal es, botánicamente, un fruto en cariósipide que contiene solo una semilla (grano). La cubierta exterior de esta semilla está constituida, fundamentalmente por el pericarpio y el tegmen o testa (**Figura 2**).

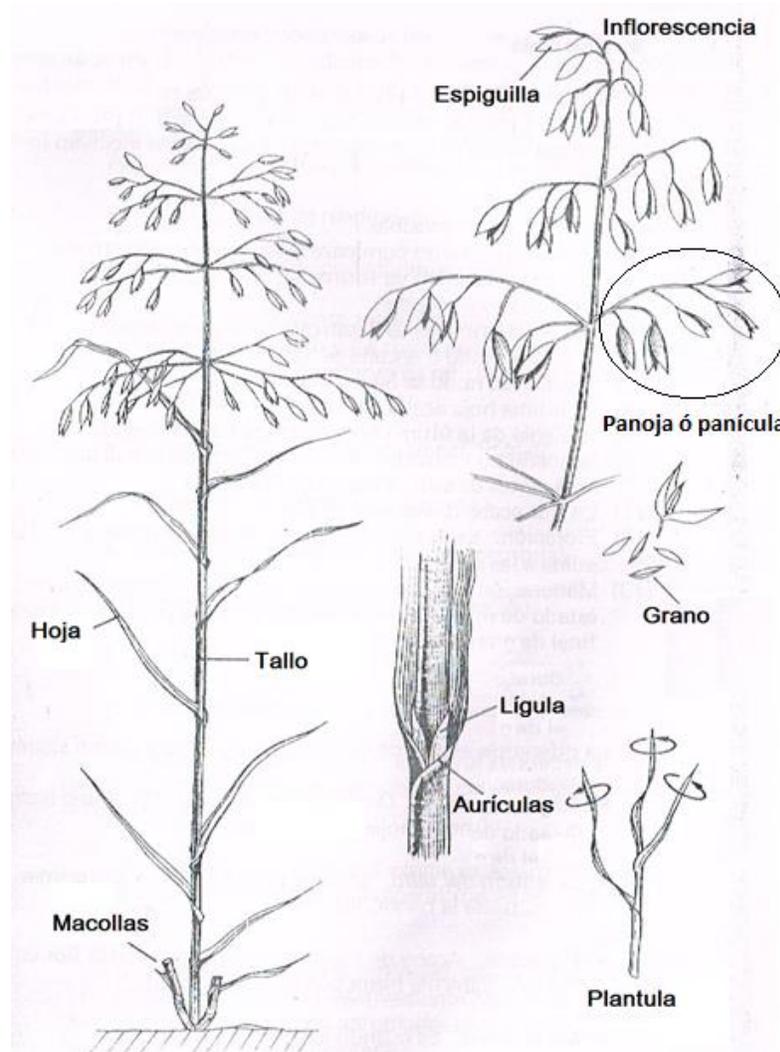


Figura 1: Estructura de la planta de avena (Parson, 1983).

El pericarpio comprende, a su vez, diversos tejidos (epicarpio, mesocarpio, capa e células transversales, entre otros), más o menos diferenciados, según el cereal, formados en el grano maduro, por células vacías. En el tegmen o testa del grano maduro sólo se diferencia fácilmente una capa celular. El pericarpio es rico en celulosa y el tegmen está constituido, básicamente por una capa continua de sustancia grasa, en la cual se encuentran los pigmentos que dan al grano su color característico (Primo, 1987).

Subyacente al tegmen se encuentra la capa aleurona, que consta de uno o varios estratos de células de parénquima, de forma cuadrangular o rectangular y con paredes delgadas. Estas células contienen abundantes glóbulos de grasa y proteína.

El endospermo propiamente dicho está constituido por células de parénquima, de paredes delgadas, dispuestas en sentido radial, repletas de gránulos de almidón. Las capas más externas del endospermo son ricas en glóbulos o gránulos proteicos.

El embrión o germen está localizado en un extremo del grano, adosado a la cara ventral, siendo una estructura compleja, formada por el escutelo (tejido de reserva), el coleoptilo, la coleorriza, el epiblasto, la raíz, la plúmula, y el hipocotilo. Los tejidos del germen son ricos en proteínas y lípidos no conteniendo apenas almidón. El germen está envuelto por las cubiertas exteriores del grano (pericarpio, tegmen y la aleurona).

Los granos de avena además presentan una cubierta lignocelulósica más externa, denominada cascarilla, muy rica en sílice (Primo, 1987).

1.1.2.1 Composición química de los granos de la avena.

La constitución química de los granos de avena, en lo que respecta a los constituyentes principales, se da en la **Tabla 1**. Teniendo presente que la composición química varía entre límites muy amplios, dependientes no sólo de la variedad, sino también de las condiciones de cultivo.

Tabla 1: Composición química aproximada de los granos de cereales.

Cereales	Hidratos de Carbono					Factor de conversión N en proteínas.
	Proteínas	Grasa	Totales	Fibra	Cenizas	
Arroz	10.1	2.1	86.4	1.0	1.4	5.95
Avena	22.4	9.8	64.0	3.9	3.8	6.25
Cebada	10.1	1.1	87.6	0.8	1.2	5.83
Maíz	10.3	4.5	83.8	2.3	1.4	6.25
Trigo	13.4	2.4	82.3	2.4	1.9	5.83

(Primo, 1987)

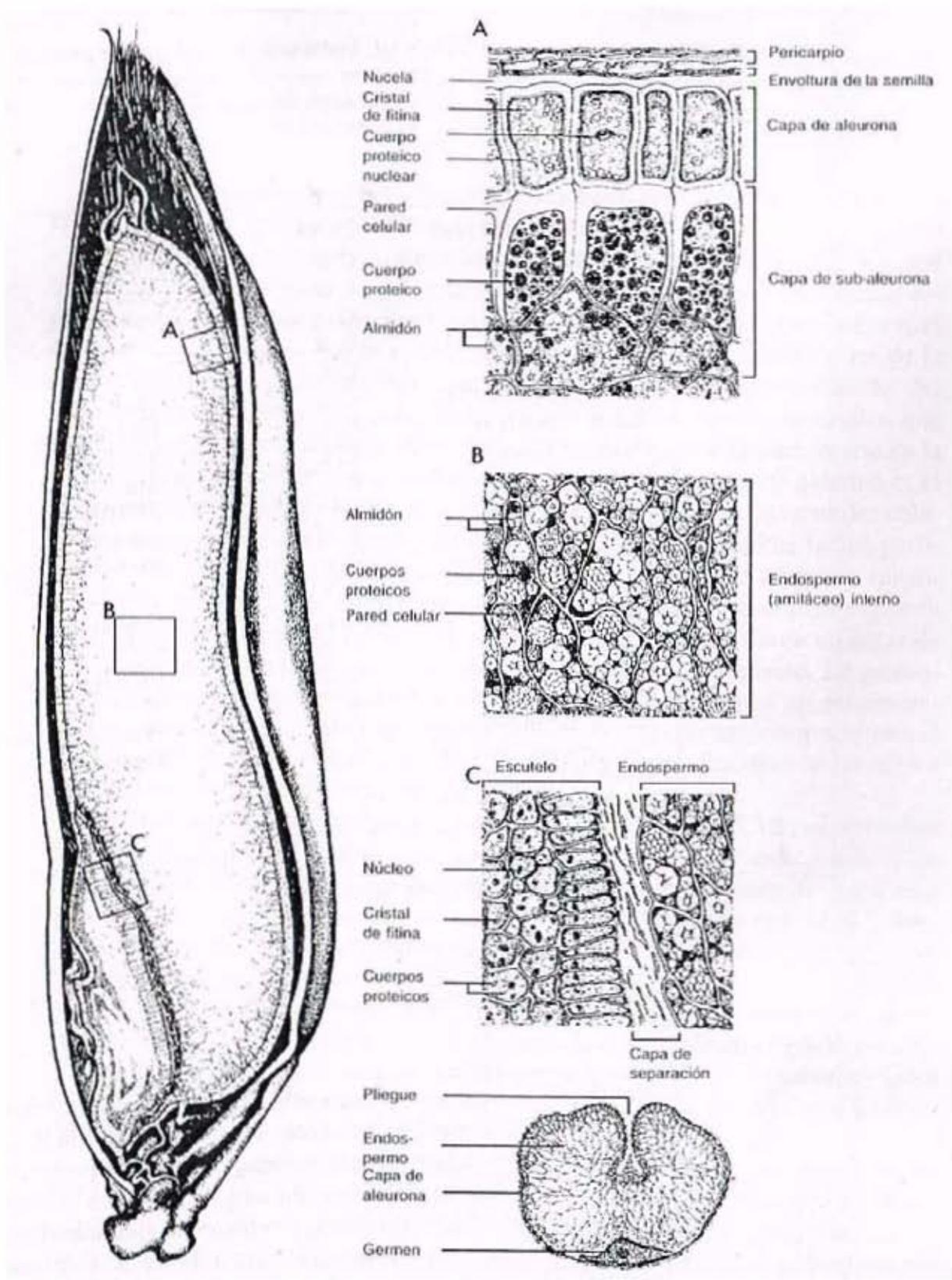


Figura 2: Estructura del grano de avena (Mazza, 2000).

- Hidratos de carbono.

Los hidratos de carbono representan en la avena alrededor del 65 %. En el grano, los carbohidratos se localizan, fundamentalmente en el endospermo, algunos componentes importantes en esta fracción son las hemicelulosas, la celulosa (fibra) y los azúcares libres, para el caso de la avena su azúcar más abundante es la sacarosa.

- Proteínas.

La distribución de las proteínas entre los diversos tejidos que constituyen el grano, y aún en el interior de los mismos, varían de un cereal a otro. Las concentraciones mayores se encuentran en las capas más externas del endospermo (capas subaleurónicas), en la propia aleurona y en el germen. Las proteínas presentes en los granos se clasifican según Osborne como: albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, de las cuales las últimas dos se localizan, principalmente, en el endospermo; las albúminas y globulinas se presentan también en las cubiertas exteriores y en el germen.

Las semillas tales como la cebada, maíz, centeno, sorgo y trigo tienden a ser ricas en un tipo especial de proteínas de reserva llamadas prolaminas y relativamente pobres en albúminas y globulinas, a excepción del arroz y la avena en los cuales predominan las globulinas (Moya *et al.*, 2002).

Tabla 2: Composición por solubilidad de las proteínas de los granos enteros de cereales.

Cereales	Fracción proteica				Contenido de proteínas
	Albúminas	Globulinas	Prolaminas	Glutelinas	
Arroz	5.0	10.0	5.0	80.0	8-10
Avena	1.0	78.0	16.0	5.0	8-14
Cebada	13.0	12.0	52.0	23.0	10-16
Maíz	4.0	2.0	55.0	39.0	7-13
Trigo	3-5	10.0	69.0	16.0	12-18

(Primo, 1987)

Como ya se mencionó en la avena el contenido de proteínas principalmente se basa en las globulinas las cuales forman el 78 % de la composición total como se muestra en la **Tabla 2**.

Las características principales de las proteínas contenidas en la avena, se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Características principales de las proteínas componentes de la avena.

Proteína (%)	Características
Globulinas (78-80)	Proteínas multiméricas solubles en solución salina y alcanzan entre el 75 al 80 % de las proteínas de almacenamiento (Moya <i>et al.</i> , 2002). Coagulan por el calor. Solubles en soluciones de ácidos fuertes (Garrido <i>et al.</i> , 2006).
Prolaminas (10-16)	También conocidas como aveninas, son proteínas de reserva de los granos, representan entre el 4 al 14 % del total del contenido proteínico de las semillas de avena. Son solubles en solución alcohólica (Moya <i>et al.</i> , 2002). No son coagulables en calor. Son ricas en prolina, de ahí su nombre (Garrido <i>et al.</i> , 2006).
Glutelinas (5 %)	Solubles en soluciones de ácidos y bases diluidas. Insolubles en disolventes neutros. Coagulan por el calor (Garrido <i>et al.</i> , 2006).

Estos 3 tipos de proteínas forman parte del grupo de las proteínas simples u holoproteínas, ya que al hidrolizarse totalmente forman sólo α -aminoácidos, o sus derivados.

- Lípidos.

Los lípidos representan, normalmente el 1-4 % del peso del grano (**Tabla 1**), observándose de esta manera que el cereal más abundante en este compuesto es la avena con un porcentaje de 9 a 10 %.

Los lípidos se encuentran localizados en todos los tejidos del grano, principalmente como componentes de las membranas celulares y concentradas en el tegmen o testa.

El valor nutricional del grano de avena es superior al de otros cereales, al ser la avena más rica en aminoácidos esenciales, especialmente en lisina. El contenido en proteínas digestibles del grano de avena es mayor que en maíz (**Tabla 1**) y también tiene una mayor riqueza en materia de grasa que la cebada y el trigo (Nestlé, 2008).

1.1.2.2 Características y propiedades funcionales.

Como se mencionó anteriormente, la avena es quizás uno de los cereales más ricos en nutrientes que existe. Además de que la FDA (Food and Drug Administration), ha admitido que los productos de sémola de avena, salvado de avena o harina de avena proveen un efecto beneficioso para la salud (health claim).

La declaración se basa en numerosos estudios clínicos que llegaron a la conclusión de que los productos de avena pueden reducir los niveles de colesterol en suero, un factor que aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares, la FDA ha determinado que el principal ingrediente activo que presenta estas propiedades es la fibra soluble (1→3) (1→4)-β-D-glucano, o simplemente β-glucano, este componente y la viscosidad parecen tener una importante función en la modificación de los lípidos sanguíneos y en la atenuación de la respuesta de la glucosa y la insulina en sangre.

En la avena existen numerosos componentes que pueden potencialmente modificar los lípidos sanguíneos o producir efectos fisiológicos beneficiosos. Las capas externas de la avena son, como las de otros cereales, una buena fuente de fibra alimentaria soluble, y tiene, por consiguiente, la capacidad de mejorar la función del colon. Estas capas concentran otros

componentes con funciones determinadas como ceras, lignina, fitato, vitaminas, minerales y compuestos fenólicos. Algunos de estos compuestos son poderosos antioxidantes y pueden presentar potentes propiedades farmacológicas. Pero además, la avena es un cereal integral que es nutritivo en el sentido más general, es decir, proporciona energía, proteína, vitaminas, minerales y una distribución de aminoácidos equilibrada (Mazza, 2000).

A continuación se presentan algunos de las principales características de la avena las cuales le brindan su funcionalidad:

- Como ya se mencionó anteriormente, el salvado de avena contiene una sustancia derivada de la celulosa llamada β -glucano, la cual disminuye el nivel de colesterol gracias a que absorbe y arrastra los ácidos biliares del intestino (Halfrish *et al.*, 1995).
- La avena contiene ácidos grasos insaturados entre los que destacan el linoleico (80%), el predominio de estos conlleva a un efecto regulador del colesterol.
- Este cereal además contiene una sustancia llamada avenasterol, la cual es una sustancia vegetal parecida al colesterol que evita que este último se absorba en el intestino.
- Un estudio llevado a cabo por el departamento de agricultura de los Estados Unidos advirtió que la glucosa proveniente de la avena es muy bien tolerada por los diabéticos (Marlett *et al.*, 1994).
- Un experimento demostró que varios tipos de fibras, entre ellas la de la avena, reduce los niveles de estrógeno en la sangre logrando disminuir el riesgo de cáncer de mama notablemente (Schultz & Howie, s.f.).
- La avena aporta los nutrientes más importantes para el buen funcionamiento de las neuronas: glucosa, ácidos grasos, fósforo, lecitina y vitamina B1. Todo ello ejerce un efecto tonificante y tonificador en el sistema nervioso, ayudando a superar el estrés y la depresión (Marlett *et al.*, 1994).
- El alto contenido en zinc de la avena facilita a nuestro organismo la asimilación y el almacenamiento de la insulina, contribuye a la madurez sexual y ayuda en el proceso de crecimiento, además de ser beneficioso para el sistema inmunitario y la

cicatrización de heridas. También ayuda a metabolizar las proteínas, a combatir la fatiga e interviene en el transporte de la vitamina A a la retina.

- La abundancia de las vitaminas B6 y K, en este cereal hace que su consumo sea muy recomendable en casos de diabetes, depresión y asma. Además, de ayudar a prevenir enfermedades cardíacas, combatir el cáncer y generar una correcta coagulación de la sangre (Schultz & Howie, s.f.).

1.1.3 Cultivo del cereal en México.

En México, es el cuarto cereal más producido con una participación del 0.5% de la producción total de cereales. En los primeros lugares encontramos al maíz (81.7 %), trigo (16.7 %) y arroz (1.1 %). El precio por tonelada de la avena en el país es muy bajo, esto debido a la falta de demanda que tiene el cereal (SAGARPA, 2010).

Chihuahua es el principal estado productor de avena en grano en México, con el 69.3 % del volumen la producción entre los años de 2007 a 2009 (**Figura 3**). El Estado de México, Durango, Zacatecas e Hidalgo le siguen en importancia y cuentan con el 11.5 %, 9.4 %, 4.6 % y 3.5 % de la producción respectivamente (SAGARPA, 2010).

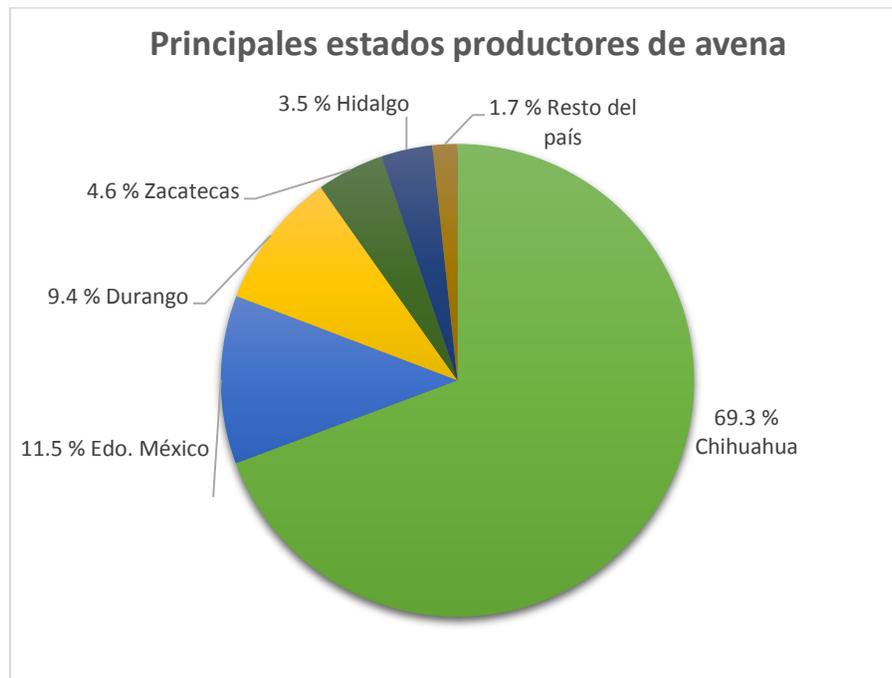


Figura 3: Principales Estados Productores de Avena Grano (2007-2009), (SIAP-SAGARPA, 2010).

En cuanto a comercio exterior, México es un importador neto de avena. En relación a la semilla de avena, nuestro país ha importado un promedio anual de 194 toneladas de semilla entre 2005 y 2009 (**Tabla 4**). Desde el año 2000 a 2009 las importaciones han disminuido en 80.0 %, hasta llegar el último año mencionado a las 104 toneladas importadas. La totalidad de las importaciones y exportaciones mexicanas de avena semilla tienen como origen y destino los Estados Unidos (INEGI, 2010).

Tabla 4: Comercio de la semilla de avena en México (INEGI, 2010).

Año	Cantidad (Toneladas)		Valor (Miles US\$)		Precio ^{/1} (US\$/Ton)	
	Export.	Import.	Export.	Import.	Export.	Import.
2000		522.2	0.0	220.7		422.6
2001		558.5	0.0	231.3		414.2
2002		346.2	0.0	152.4		440.3
2003	35.4	274.9	15.9	112.1	450.2	407.7
2004	73.3	276.4	29.2	118.0	398.1	426.9
2005	20.4	93.9	7.4	43.0	363.8	457.4
2006	40.0	267.3	23.7	142.9	592.0	534.5
2007		256.0	0.0	151.2		590.8
2008	21.3	248.1	3.5	177.1	164.0	713.8
2009		104.2	0.0	79.1		759.1

(INEGI, 2010)

1.1.4 Productos derivados de la semilla.

El grano de avena se emplea principalmente en la alimentación del ganado, aunque también es utilizada como planta forrajera, en pastoreo, heno o ensilado, sola o con leguminosas forrajeras. En menor escala la avena se emplea como alimento para consumo humano, en productos dietéticos, triturada o molida y para preparar diversos platos. También se mezcla con harina de otros cereales en la fabricación de pan, así como en la fabricación de alcohol y bebidas (Infoagro, 2010).

Se le considera como cultivo alternativo en los Valles Altos y en la región semiárida del Norte-Centro de México, particularmente cuando el inicio del período de lluvias se retrasa o se presentan bajas temperaturas que ponen en riesgo la siembra de los cultivos tradicionales de maíz y frijol. Si bien el uso de la avena como forraje se ha extendido en nuestro país,

incrementándose la producción en la última década, un gran problema que afecta a la comercialización de la avena grano para consumo humano es la poca demanda de este cereal en nuestro país. Ya que la dieta del mexicano no incluye el consumo regular de la avena, entre otros factores, por falta de información de su contenido alimenticio. Esto ha ocasionado que no se le haya dado mayor importancia al cultivo y desarrollo de este cereal (Salmerón, 2003).

1.2 Alimentos funcionales.

Siempre se ha considerado como alimento, a cualquier producto, natural o transformado, que suministra al organismo que lo ingiere, la energía y las sustancias químicas necesarias para mantenerse en buen estado de salud; y como nutrientes, a las sustancias químicas contenidas en los alimentos que el organismo utiliza, transforma e incorpora a sus propios tejidos para cumplir tres fines básicos: a) aportar la energía necesaria para su funcionamiento; b) proporcionar los materiales para la formación de sus estructuras y, c) suministrar sustancias necesarias para regular el metabolismo. Estos nutrientes incluyen a las proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas y el agua (Cortés *et al.*, 2005).

Además de los nutrientes y componentes de aroma, sabor, color y textura, algunos alimentos contienen ciertas sustancias químicas capaces de tener efectos positivos para promover y/o restaurar la salud, lo que permite atribuirles una función saludable. A dichos alimentos se les conoce como funcionales (Betoret *et al.*, 2003).

La Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos ha definido estos alimentos como “cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado o no, que pueda proporcionar un beneficio a la salud superior al de los nutrientes tradicionales que contiene” (Thomas & Eart, 1994). El término “funcional” implica que el alimento tiene algún valor identificado que conduce a beneficios para la salud, incluyendo la reducción del riesgo de enfermedad, para la persona que lo consume (Mazza, 2000).

Entre los alimentos funcionales más consumidos tenemos a los alimentos probióticos (Betoret *et al.*, 2003).

1.2.1 Alimentos probióticos.

El término probiótico significa “a favor de la vida” y existen diferentes definiciones del mismo. En el 2002 la FAO estableció que los probióticos son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas. Definiciones más recientes los indican como “ingrediente alimentario microbiano vivo, que al ser ingerido en cantidades suficientes, ejerce efectos benéficos sobre la salud de quien lo consume (Ashwell, 2005).

El agregado de bacterias probióticas para la elaboración de alimentos funcionales depende, por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores) que permite obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales, y por el otro lado, de los factores extrínsecos (**Tabla 5**) que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales. Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su efecto benéfico en el huésped (Saarela *et al.*, 2000).

Los probióticos estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo. Son también conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos y se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Penna, 1998). Para que un microorganismo pueda realizar esta función de protección tiene que cumplir los postulados de Huchetson: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda llegar vivo al intestino (Pardio *et al.*, 1994).

El efecto protector de estos microorganismos se realiza mediante dos mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos así como la producción de sus toxinas que imposibilitan su acción patogénica (Penna, 1998).

Dentro del grupo de microorganismos probióticos encontramos en sí, a las bacterias ácido-lácticas quienes equilibran la flora intestinal y potencian el sistema inmunológico (Penna, 1998).

Tabla 5: Factores extrínsecos que afectan la viabilidad de los probióticos.

Factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad de las células probióticas:	pH (derivado del proceso de fermentación), oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), composición química del medio de cultivo, concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica), temperatura y duración de la fermentación.
	Prácticas de inoculación (momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), interacciones antagónicas entre especies.
	Condiciones de almacenamiento del producto.

Vinderola *et al.*, 2000

1.2.1.1 Leches fermentadas.

Las leches fermentadas son productos preparados a partir de la leche entera, parcial o totalmente descremada, concentrada o bien sustituida, total o parcialmente con leche descremada en polvo, pasteurizada o esterilizada y fermentada por medio de microorganismos específicos, siendo los principales las bacterias ácido lácticas. Cuando son realizadas esas fermentaciones se producen metabolitos como el ácido láctico, etanol, bacteriocinas y muchos otros compuestos que conservan la leche y le imparten características organolépticas distintas (CODEX Alimentarius, 2003). Existe una variedad muy amplia de leches fermentadas, las cuales se elaboran de diferentes formas y con distintos tipos de materias primas y en las que intervienen un gran número de especies de BAL y algunas levaduras (Bamforth, 2005). Siendo de esta manera su principal clasificación en función al tipo de microorganismo empleado en su elaboración, como se muestra en la **Tabla 6**.

Muchas de las bacterias lácticas utilizadas en la fabricación de leches fermentadas están consideradas como probióticos, es por esto que la ingesta regular de este producto puede resultar beneficiosa para prevenir enfermedades infecciosas comunes por ingestión de patógenos.

Tabla 6: Clasificación de las leches fermentadas de acuerdo al tipo de su flora dominante.

Grupo:	Tipo de flora:	Características:	Productos:
I	<i>Lactococcus</i> y en algunos casos <i>Leuconostoc</i> (bacterias mesofilicas).	Acidez baja o moderada	Jocoque Buttermilk Leches escandinavas
II	<i>Lactobacillus</i>	Acidez moderada o alta	Leche "búlgara" Leche acidófila Yakult
III	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> (bacterias termófilas).		Yogurt Dahi Labneh Bioghurt Prostokvasha Brano Gioddu
IV	Bacterias lácticas y levaduras.	Acidez y alcohol	Kefir Koumiss "Búlgaros"

García *et. al.*, 2005.

Tipos de leches fermentadas.

En la **Figura 4** se muestra la clasificación que asigna el CODEX para las leches fermentadas.

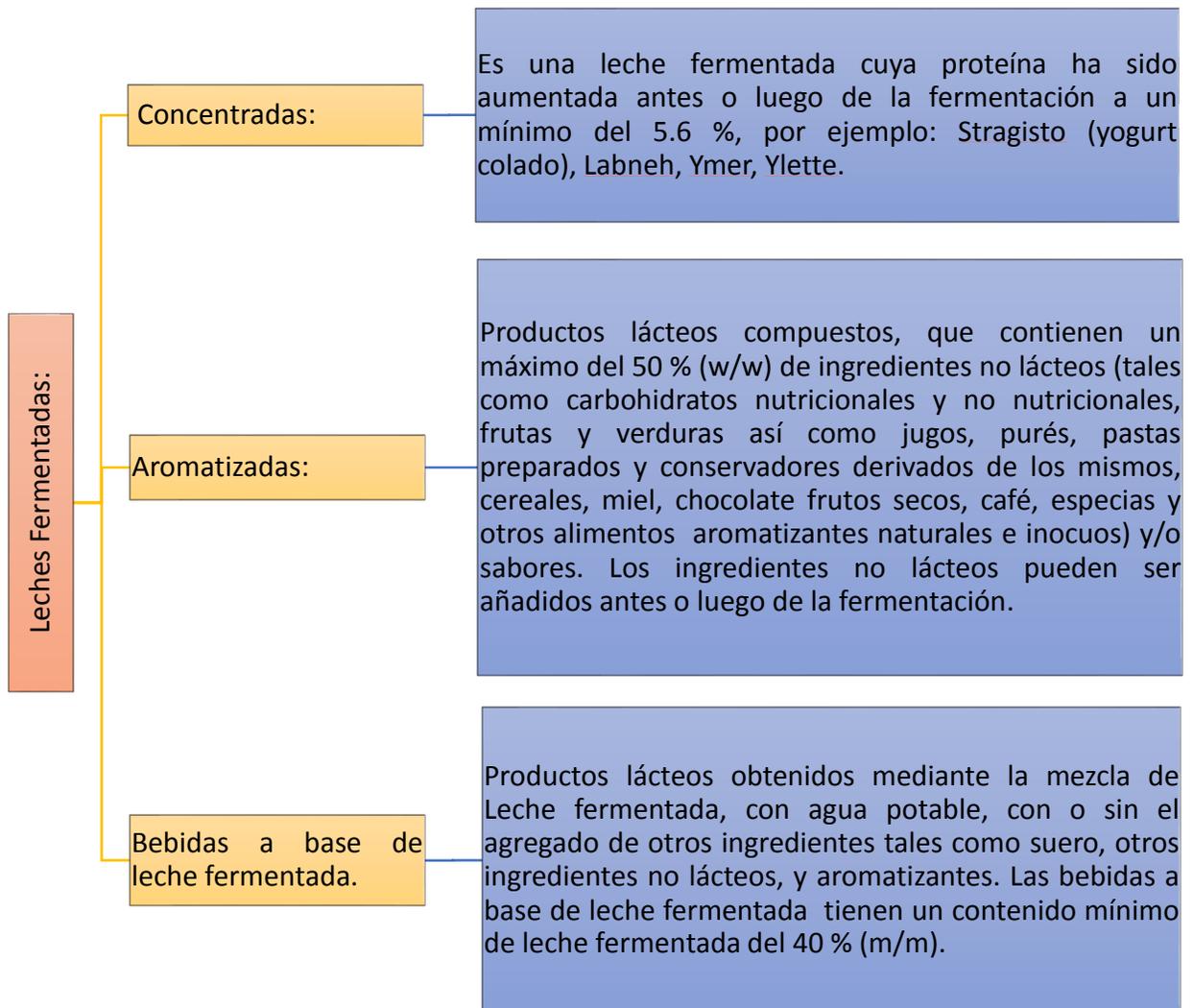


Figura 4: Tabla de clasificación de las leches fermentadas.

Bacterias lácticas.

El grupo de bacterias lácticas o bacterias ácido lácticas ha sido definido por ORLAN-JENSE (1919) y reúne varios géneros caracterizados por su capacidad de fermentar los glúcidos produciendo ácido láctico. La fermentación se denomina homoláctica si el ácido láctico es prácticamente el único producto formado, y heteroláctica si se forman también otros compuestos: ácido acético, etanol, CO₂, etc.

Según el tipo de fermentación se habla de bacterias homofermentativas o heterofermentativas. Ciertas bacterias homofermentativas son también capaces de

fermentación heteroláctica en condiciones de crecimiento no óptimas o según la naturaleza del azúcar utilizado.

Las bacterias lácticas presentan otras características comunes que explican su reagrupamiento:

Son bacterias Gram positivas, generalmente inmóviles, nunca esporuladas, catalasa-negativas, oxidasa-negativas, generalmente nitrato reductasa negativas, su capacidad de biosíntesis es débil, lo que explica su poliauxotropía para diversos aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y ácidos grasos, pero también su metabolismo fermentativo: incapaces de sintetizar el núcleo hemo de las porfirinas, están normalmente desprovistas de citocromo. Son bacterias anaerobias facultativas: microaerófilas, capaces de fermentar tanto en aerobiosis como anaerobiosis, son ácido tolerantes pudiendo crecer en pH tan bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, y la mayoría crecen a pH entre 4 y 4.5 (Carr *et al.*, 2002).

La clasificación de las bacterias ácido lácticas en géneros diferentes es basada en principio en la morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas (**Tabla 7**)), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia ácida o alcalina.

Los géneros más representativos de este tipo de bacterias son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Leveau & Bouix, 2000).

Función de las bacterias lácticas.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, siendo unas de las principales la fermentación de alimentos, la producción de ácido, la inhibición de microorganismos indeseables, la reducción de riesgos higiénicos, la coagulación de la leche, sinéresis del lactosuero, la reducción del contenido de azúcares, formación de aromas como los producidos por el diacetilo y acetaldehído en la mantequilla, la producción de gas requerida para la formación de hoyos en cierto tipo de quesos y la proteólisis necesaria

durante la maduración de los mismos. Además, las bacterias ácido lácticas disminuyen la lipólisis, lo cual evita la rancidez en los productos lácteos (Ramírez *et al.*, 2011), contribuyendo de esta manera en la biopreservación de los alimentos, además de mejorar las características sensoriales como el sabor, olor, textura, aumentando su calidad nutritiva.

Tabla 7: Diferenciación de las bacterias lácticas según su manera de fermentar la glucosa.

Homofermentadoras:	Heterofermentadoras:
<p><i>Lactococcus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Pedococcus</i> y algunos <i>Lactobacillus</i> poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa, utilizando la vía de la glucólisis (Ramírez <i>et al.</i>, 2011)</p>	<p>Por su parte el género <i>Leuconostoc</i>, <i>Lactosphaera</i> y algunos <i>Lactobacillus</i> se consideran heterofermentadores, ya que convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr <i>et al.</i>, 2002).</p>

Especies de bacterias ácido lácticas.

- *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus*.

Es un bacilo homofermentativo Gram positivo, largo, no móvil el cual produce ácido D-(-)-láctico. Es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa. Pero no así maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45 °C, pero su óptimo está en el intervalo de 40 a 43 °C, y no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15 °C. Posee la habilidad de crecer en pH ácidos y presenta metabolismos fermentativos aún en presencia de oxígeno (Holt *et al.*, 1994).

- *Lactococcus salivarius sbsp. thermophilus*.

Presenta forma esférica u ovoide, se asocia en pares o cadenas largas de célula. Es Gram positivo, no móvil, termófilo por lo que crece entre 40 a 45 °C y no crece a temperaturas

menores de 20 °C. Produce ácido L (+)-láctico por homofermentación. Como fuente de carbono utiliza glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa (Holt *et al.*, 1994).

- *Lactobacillus casei*.

El *Lactobacillus casei* es una bacteria láctica, Gram positiva, no esporulada que pertenece al Phylum Firmicutes, Clase Bacilli, Orden Lactobacillales.

El metabolismo de *L. casei* es heterofermentativo gracias a que posee una enzima llamada fosfocetolasa, que le permite poder seguir la vía de las pentosas convirtiendo hexosas (principalmente glucosa) en pentosas y teniendo como productos finales una variedad de compuestos reducidos además de lactato, como ácido acético, etanol, bióxido de carbono y además a partir de piruvato produce peróxido de hidrógeno (Boone & Castenholz, 2001).

Es una bacteria anaerobia facultativa es decir crece de manera óptima en condiciones anóxicas, pero puede presentar crecimiento si la concentración de oxígeno es baja, debido a que posee enzimas como NADH oxidasa, NADH peroxidasa que minimizan la toxicidad de compuestos activados por el oxígeno (González *et al.*, 2004).

El *L. casei* se considera una bacteria GRAS (generalmente reconocida como segura) y un microorganismo probiótico, se le han comprobado beneficios como: inhibir microorganismos patógenos (*Salmonella*, *Shigella* y *Helicobacter*), reducir la intolerancia a la lactosa y aumentar la respuesta inmunológica, mantiene el balance de la microflora intestinal y disminuye la actividad enzimática fecal (Magariños *et al.*, 2008).

1.3 Yogurt.

1.3.1 Definición.

El yogurt es un producto lácteo fermentado que resulta del crecimiento de las bacterias lácticas *Lactobacillus delbrueckii sbsp. bulgaricus* y *Lactococcus salivarius sbsp. thermophilus* en leche. De esta fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y

delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con sabor característico (Bamforth, 2005).

Norma:

Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-181-SCFI-2010), el yogurt es el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Lactococcus sbsp. thermophilus* y *Lactobacillus sbsp. bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH.

El yogurt podrá clasificarse por sus componentes en simple o natural y en saborizado o con fruta, independientemente de su presentación. Podrá clasificarse como: yogurt, yogurt simple o yogurt natural, cuando cumpla con las especificaciones establecidas en el apartado 6 de esta NOM.

El yogurt saborizado o con fruta podrá contener hasta 50 % (m/m) de ingredientes no lácteos, a saber: edulcorantes, frutas y verduras, así como jugos, purés, pastas, preparados y conservadores 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.

Especificaciones:

- **Especificaciones fisicoquímicas del yogurt, así como de las leches fermentadas, según lo establece el CODEX y la NOM-181-SCFI-2010:**

El yogurt y las leches fermentadas deberán cumplir con las especificaciones fisicoquímicas descritas en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Especificaciones fisicoquímicas.

	CODEX STAN 243-2003		NOM-181-SCFI-2010
	Leche Fermentada	Yogurt, yogurt en base a cultivos alternativos	Yogurt según Norma Oficial Mexicana
Proteína láctea ^(a) (% m/m):	Mínimo 2.7 %	Mínimo 2.7 %	Mínimo 2.9 a 1.2 %

	CODEX STAN 243-2003		NOM-181-SCFI-2010
Grasa láctea (% m/m):	Menos del 10 %	Menos del 15 %	Máximo 15.0 %
Acidez valorable, expresada como porcentaje de ácido láctico (% m/m):	Mínimo 0.3 %	Mínimo 0.6 %	Mínimo 0.5 %
Sólidos Lácteos no grasos:			Mínimo 8.25 %
(a) El contenido de proteína es 6.38 multiplicado por el nitrógeno Kjendahl total determinado.			

- Especificaciones microbiológicas:

Número de microorganismos viables que deben contener las leches fermentadas según el CODEX y la NMX-703-COFOCALEC-2004 (Tabla 9):

Tabla 9: Especificaciones microbiológicas.

	CODEX STAN 243-2003		NMX-703-COFOCALEC-2004
	Leche Fermentada	Yogurt, yogurt en base a cultivos alternativos	Yogurt según Norma Mexicana:
Suma de microorganismos que comprende el cultivo (UFC/g, en total):	Mínimo 10 ⁷	Mínimo 10 ⁷	Mínimo 10 ⁷
Microorganismo etiquetados ^(b) (UFC/g Total):	Mínimo 10 ⁶	Mínimo 10 ⁶	Mínimo 10 ⁶
^(b) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza la declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico, que ha sido agregado como complemento del cultivo.			

En las leches fermentadas aromatizadas y bebidas a base de leche fermentada los criterios anteriores se aplican a la parte de leche fermentada. Los criterios microbiológicos (basados en la porción de producto de leche fermentada) son válidos hasta la fecha de duración mínima.

Los microorganismos deben permanecer viables, activos y abundantes hasta la fecha de caducidad del producto.

1.3.2 Tipos.

Existe una gran variedad de yogures que difieren entre sí por varios factores, entre ellos: el proceso de elaboración (firme, batido y líquido), la adición de saborizantes (natural, afrutado y saborizado) y la forma de presentación.

El yogurt firme y el batido son dos tipos de yogurt que difieren en el proceso de elaboración. En el yogurt firme, la leche inoculada con los microorganismos se debe envasar en los recipientes definitivos antes de que se inicie la fermentación, la cual se llevará a cabo en el mismo recipiente en el que será distribuido el producto. Si se desea agregarle frutas, se adicionan en el fondo del envase antes de la leche (Hernández *et al.*, 2003).

Los yogurts batidos son más líquidos que los firmes, y la fermentación se lleva a cabo fuera del envase final, en un recipiente de fermentación, lo que permite adicionarle preparados de fruta (jugos, pulpa o trozos de fruta) o cereales, etc. (Madrid, 1990).

El yogurt líquido o para beber se puede describir como un yogurt batido de menor viscosidad. (Hernández *et al.*, 2003). El proceso de fabricación de este yogurt es el mismo que el del yogurt batido, pero el contenido de sólidos es menor, el coágulo se bate antes del llenado de los envases y suele añadirse zumos de frutas en lugar de concentrados (Early, 1998).

1.3.3 Proceso de elaboración del yogurt batido o para beber.

La elaboración de un yogurt comienza por la selección y mezcla de todos los ingredientes que constituyen la preparación inicial o mezcla base, como se muestra en la **Figura 40** (página 94).

Estandarización: La fortificación de la leche consiste en aumentar su contenido de sólidos no grasos (Early, 1998). La finalidad de la estandarización es lograr un contenido de sólidos mínimo del 15 %, para de esta manera mejorar la consistencia final del yogurt, disminuir la tendencia a la sinéresis y reducir ligeramente la producción de ácido durante la fermentación (Varman, 1995).

Homogenización: La finalidad de homogeneizar es reducir el tamaño de la fase discontinua, es decir, los glóbulos de grasa, para conseguir una emulsión estable (Early, 1998). Esta operación mejora la textura, disminuye la tendencia a la sinéresis y la formación de nódulos (Varman, 1995).

Pasteurización: Esta operación tiene como finalidad eliminar la flora asociada a la leche, dejando así un medio adecuado para el cultivo de las bacterias del yogurt. El tratamiento térmico reduce el potencial redox de la leche debido a la desordenación del oxígeno disuelto y a la producción de grupos sulfhidrilos libres por la desnaturalización de las proteínas, liberando de esta manera algunos péptidos que estimulan el crecimiento de los cultivos. Modifica además la estructura de las proteínas de la leche favoreciendo su agregación, provoca asociación de la kappa-caseína con la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, y expone los dominios hidrofóbicos de las proteínas por desnaturalización, lo cual mejora la viscosidad del yogurt y su capacidad de retención de agua (García *et al.*, 2004).

Enfriamiento: Una vez que la leche ha recibido el tratamiento térmico, es necesario refrigerarla hasta una temperatura adecuada para la siembra del cultivo (40 a 45 °C) (Early, 1998).

Inoculación: Se inocula con 2 % a 5 % de un cultivo compuesto de *Lactobacillus*, o alternativamente se puede utilizar cultivos congelados o liofilizados de uso directo. La leche se incuba a 42 °C de 3 a 6 horas, el producto alcanza una acidez de entre 0.8 y 1.4 % de ácido láctico y un pH entre 3.7 a 4.6.

La incubación se efectúa en el envase de distribución en el caso del yogurt firme o semisólido, y en tanques para el yogurt batido y líquido.

Fermentación: Para yogures batidos y para beber la fermentación se realiza en tanques que tienen este propósito, para los yogures firmes la fermentación se realiza en el propio envase de venta. Para la incubación de la leche inoculada con los cultivos tradicionales de *Lc. thermophilus* y *L. bulgaricus*, se requiere de una temperatura de 42 °C por un periodo de tiempo de 4 a 6 horas.

La formación del coágulo durante la elaboración del yogurt, obedece al hecho de que a un pH cercano a 4.6 las micelas de caseína de la leche coalescen en forma de cadenas o conglomerados para formar una estructura tridimensional en la cual queda atrapado el suero, como se observa en la **Figura 5**. A pH alto (> 5.4) las micelas de caseína mantienen su estado nativo (100-250 nm), pero cuando el pH alcanza valores de 5.1, las partículas sufren disociaciones parciales formando subpartículas de 30-40 nm, cuando se alcanza pH del orden de 4.8 – 4.3 la caseína forma grandes conglomerados que atrapan la grasa y el suero, y que son responsables de las altas viscosidades del producto.

A mayor contenido de sólidos de leche, las micelas formadas por la caseína tienden a ser de menor tamaño, formando aglomerados y cadenas que componen una matriz más eficiente para la formación de un gel (Castro, 2005).

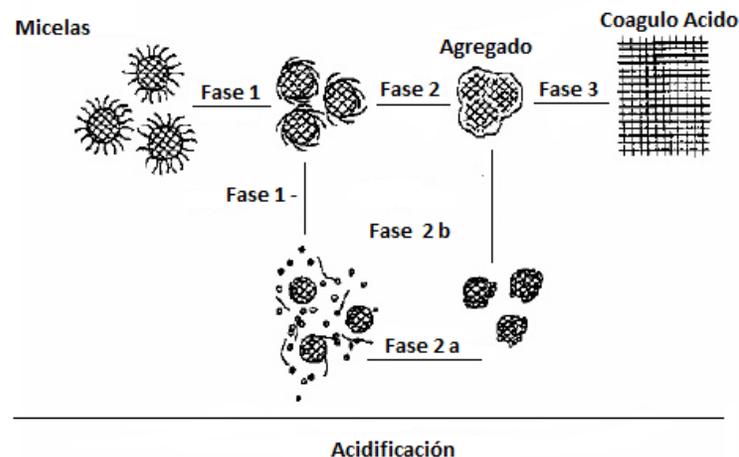


Figura 5: Esquemización del proceso de formación del coágulo del yogurt (Castro, 2005).

El proceso de fermentación suele interrumpirse cuando el pH de la leche es aproximadamente de 4.2 – 4.4 y, en ocasiones, más bajo (3.8 - 4.0) (Tamime, 1991).

Batido: Consiste en la rotura del coágulo/gel caliente y la reincorporación del lactosuero y es una operación que sólo se realiza en la fabricación de yogures batidos y para beber. Generalmente, para obtener un gel homogéneo es suficiente una agitación muy suave (2-4 rpm) durante unos 5-10 minutos. La agitación tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del cultivo, reduce la producción de ácido láctico.

Enfriamiento: El enfriamiento se hace, en el caso del yogurt firme, dentro del envase mediante baños de agua o con corrientes de aire frío (García *et al.*, 2005). Este enfriamiento se debe realizar de manera rápida para lograr frenar la acidificación, a partir de allí se evita que se produzca el desuerado, lo más recomendable es continuar la refrigeración lentamente; asimismo, de esta forma se afectara menos la consistencia del producto. Para alcanzar los efectos del enfriamiento y así reducir la actividad metabólica de los microorganismos y mantener las propiedades reológicas del producto, el yogurt debe ser llevado lo más rápido posible desde la temperatura de incubación hasta aproximadamente 18-20 °C.

Adición de frutas y mezclado: El puré se debe encontrar en proporción de 15 a 25 % en el producto final. Este mezclado permite conseguir una distribución uniforme de color, aroma y de las frutas dentro del yogurt.

Envasado: El yogurt es comercializado en envases de vidrio, polietileno, polipropileno, poliestireno, cloruro de polivinilo, bolsas de plástico y envases de cartón.

Almacenamiento refrigerado: El yogurt tradicional deben mantenerse en condiciones de refrigeración hasta el momento de su consumo. La mayoría de los yogures tienen una caducidad de entre 15 y 21 días. Las variaciones de temperatura durante el período de conservación producen modificaciones en la textura y la viscosidad, originan la separación de suero y favorecen el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos. Además la exposición a temperaturas más altas que las recomendadas, aceleran las reacciones bioquímicas como la oxidación de la grasa, aumentan la hidratación de las proteínas

contenidas en el yogurt, produce la deshidratación de la superficie del producto y modifica el color de la fruta.

La temperatura durante todo el período de conservación debe mantenerse entre 2 y 5 °C, nunca sobrepasar los 10 °C (Early, 1998).

1.3.4 Descripción y funcionalidad de las materias primas en la elaboración de yogurt.

Leche.

Es un producto integro, no alterado ni adulterado y sin calostro, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras domésticas, mamíferas, sanas bien alimentadas, después de las 48 horas de la emisión de calostro.

La leche como tal es un alimento compuesto principalmente de agua (entre 85 y 89 %) y sólidos como la grasa, proteína, lactosa y minerales (calcio, fósforo, zinc y magnesio, entre otros). Contiene también vitaminas A, D y del grupo B, especialmente B2, B1, B6 y B12 (PROFECO, 2004).

Leches vegetales.

No hay una definición formal ni legal para este producto, sin embargo es un término general que se imparte a una bebida no láctea elaborada a base de agua y de ingredientes vegetales, así como de algunos frutos secos, cereales o legumbres, que presenta características sensoriales de color (blanquecino) y consistencia (cremosa) semejantes a las de la leche de vaca por lo cual se emplea este término para describirla.

Hay diversas razones para consumir bebidas vegetales o leches vegetales, incluyendo la sustitución de leche de vaca en pacientes con intolerancia a la lactosa (que carecen de la enzima lactasa), las creencias religiosas, preferencia por su sabor o el veganismo.

Entre sus principales ventajas encontramos que estas no contienen lactosa, ni colesterol, son ricas en ácidos grasos insaturados, aportan proteínas vegetales de alta calidad, tiene un bajo contenido en sodio y son de fácil digestión (Román, 2009).

Existe una amplia variedad de bebidas vegetales la más común es la leche de soya, sin embargo también podemos encontrar leche de avena, almendra, quínoa, arroz, amaranto, nuez, avellana, etc.

- Leche de avena: La nutrióloga Elizabeth Catalán (2012) define a esta bebida como un producto obtenido a partir de la avena integral.

Con un alto contenido en fibra, que ayuda a regular el tránsito intestinal, posee un alto aporte de vitamina B y estimula el buen funcionamiento del sistema nervioso, entrega proteínas que tienen una buena cantidad de aminoácidos esenciales, es ideal para personas con niveles de colesterol alto y es muy recomendable para personas con problemas de insomnio y/o estrés, ya que posee avenina, sustancia que actúa como sedante en nuestro organismo.

Cultivo iniciador (fermento):

La función de cualquier cultivo iniciador es la de producir suficiente cantidad de ácido láctico en el menor tiempo posible, haciendo descender el pH de la leche desde 6.4 - 6.7 (dependiendo de la riqueza en extracto seco) hasta un pH de 3.8 – 4.2 y además desarrollar en el producto final unas características de textura, viscosidad y sabor que correspondan a las exigencias de los consumidores.

Los cultivos comerciales más utilizados para la producción de yogurt están compuestos *por L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. salivarius subsp. thermophilus* en proporción 1:1, estableciendo entre estas bacterias lácticas un fenómeno de asociación o simbiosis cooperativa que es beneficiosa para ambos microorganismos, pero no necesaria. Este tipo de cooperación se conoce como protocooperación, ya que el crecimiento del coco se ve estimulado por la presencia en el medio de aminoácidos y péptidos liberados en la acción proteolítica del bacilo sobre la proteína de la leche. A su vez, el desarrollo del bacilo está favorecido por la formación de ácido fórmico y el CO₂ producidos por las células del coco en fase de crecimiento logarítmica (Early, 1998).

Estabilizantes:

Para la elaboración de diversos productos lácteos, se emplean estabilizantes, la finalidad de la adición de estos a la mezcla base es mejorar y mantener las características deseables del yogurt, es decir, textura, viscosidad/consistencia, aspecto y cuerpo.

Los estabilizantes en el yogurt tienen básicamente dos funciones, generar una mejor retención de agua, así como favorecer el aumento de la viscosidad. Las moléculas de los estabilizantes son capaces de formar una red mediante enlaces entre las mismas y los distintos componentes de la leche, debido a la presencia de grupos cargados negativamente.

Existen una gran variedad de compuestos que pueden ser adicionados a la leche, con objeto de lograr una adecuada viscosidad del yogurt. Estos estabilizantes se pueden añadir en forma individual o conformando mezclas (Tamime & Robinson, 1991).

- **Goma Guar:**

La goma guar es un carbohidrato polimerizado comestible, útil como agente espesante con agua y como reactivo de adsorción. Se encuentra en el endospermo de las semillas de la planta leguminosa *Cyamopsis tetragonalobus* y *psolaroides* (Alimentarios y técnicas, S.A. de C.V., s.f.), es un galactomano que consiste en una cadena de manosa ramificada con unidades de galactosa en una proporción 2:1. Estas ramificaciones permiten la separación de las cadenas principales y, por consiguiente, su hidratación como consecuencia de su elevada afinidad con el agua, la goma guar proporciona una alta viscosidad en sistemas acuosos o lácticos (Cubero *et al.*, 2002).

Entre sus aplicaciones industriales destaca el empleo como aditivo químico y alimentario. Esta goma es empleada principalmente como agente espesante con viscosidad en función a la temperatura. Puede emplearse en una amplia gama de productos, ya que permanece estable en un rango de pH de 3 a 11, presenta la ventaja de ser soluble en frío. Es poco sensible a los efectos mecánicos y tiene buena resistencia a los ciclos congelación-descongelación (Cubero *et al.*, 2002).

Azúcares y/o Edulcorantes:

Normalmente en la elaboración de yogurt con frutas, yogurt con sabor a frutas y, en algunos casos, de yogurt natural azucarado o edulcorado, se suelen adicionar agentes edulcorantes, cuya función principal es atenuar la acidez del producto.

La cantidad de edulcorante añadido depende del tipo de agente utilizado, las preferencias de los consumidores, la fruta empleada, así como los posibles efectos inhibidores sobre los microorganismos estarter del yogurt y las limitaciones legales.

El yogurt de frutas y el yogurt aromatizado contienen por término medio hasta un 20 % de carbohidratos.

Los preparados de frutas utilizados en la industria del yogurt pueden englobarse en dos categorías: la primera incluye las conservas de frutas a las que no se ha añadido edulcorante alguno y la segunda las frutas a las que se han adicionado azúcares y agentes edulcorantes (Tamime & Robinson, 1991).

- **Stevia (Esteviósido):**

Los edulcorantes de bajas calorías, son sustancias dulces que no aportan carbohidratos al metabolismo (Giannuzzi & Molina, 1995).

El interés por conseguir edulcorantes que no aporten calorías y que no sean artificiales ha conducido al descubrimiento de algunas sustancias, que hoy se usan con cierta frecuencia en alimentos para regímenes especiales. En su mayoría proceden de plantas, una de estas sustancias es el esteviósido, perteneciente a la Stevia rebaudiana, Caá-ché o yerba dulce, que crece en forma silvestre en algunas zonas de Paraguay, Brasil y provincias del noroeste argentino. Sus hojas tienen un intenso sabor dulce, propiedad que se debe al contenido de este glicósidos (Soto & del Val, 2002).

La hoja en su forma natural es de 10 a 15 veces más dulce que el azúcar común. Los esteveósidos tienen un poder edulcorante de 200 a 300 veces mayor que el azúcar, constituyendo un sustituto no calórico y seguro para los diabéticos. Muchos estudios de

toxicidad llevados a cabo con extractos de *S. rebaudiana* indican que es segura para el consumo humano y que este producto puede inhibir el desarrollo de microorganismos en la zona bucal, además de ser digestible totalmente por el organismo (Giannuzzi & Molina, 1995).

El esteviósido es un glicósido diterpeno de $M = 804,80$ y fórmula $C_{38}H_{60}O_{18}$, su estructura se muestra en la **Figura 6**.

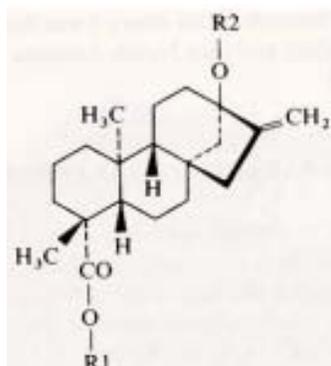


Figura 6: Formula general de los glicósidos de stevia rebaudiana.

Zarzamora: Características, propiedades y producción en México

La zarzamora (*Rubus fruticosus*) de la familia Rosaceae es un fruto de pequeño tamaño, redondo o ligeramente alargado, compuesto por pequeños glóbulos los cuales se agrupan en un receptáculo en forma de racimo que contienen en su interior una semilla diminuta y tienden a ser de color negro brillante intenso.

Poseen propiedades diuréticas, astringentes, antiulcerosas, antidiabéticas, hemostáticas, fortifica las encías, y además aporta mucha fibra y pocas calorías, al ser pobre en proteínas y grasas (Wada & Ou, 2002).

Estos frutos contienen un elevado porcentaje de agua, alrededor del 80 % y en el porcentaje restante posee azúcares, vitaminas, sales de calcio y ácidos orgánicos (**Tabla 10**). Tienen un alto contenido en fibras, lo que mejora el tránsito intestinal, además poseen gran cantidad de carotenoides y antocianinas que presentan una actividad antioxidante (Wada & Ou, 2002).

Tabla 10. Composición nutrimental en 100 g de zarzamora (*Rubus fruticosus*).

Hidratos de Carbono						
	Proteínas	Grasa	Totales	Fibra	Cenizas	Agua
Zarzamora	0.70	0.60	12.6	2.7	0.50	85.6

(Wada & Ou, 2002).

1.4 Microencapsulación.

Se define a la microencapsulación como la tecnología empleada para el embalaje/envoltura de materiales, sólidos, líquidos o gaseosos en pequeñas cápsulas que pueden liberar su contenido a una velocidad controlada bajo determinadas condiciones (Parra, 2011).

Una microcápsula está constituida como se muestra en la **Figura 7**, por una membrana fuerte, delgada esférica semipermeable que envuelve a un núcleo sólido o líquido, con un diámetro que puede variar desde unas pocas micras a varios milímetros (Kailasapathy, 2006). La microencapsulación, por tanto, ayuda a separar el núcleo central, en nuestro caso los microorganismos probióticos, de su entorno hasta su liberación, protegiéndolo de diversos factores adversos como acidez, concentración de oxígeno y condiciones gástricas, mejorando con ello su estabilidad y vida media y proporcionando una liberación controlada dependiendo del material empleado como matriz. Esta liberación de puede producir mediante diversos mecanismos, como ruptura mecánica de la pared de la cápsula, disolución de la misma, fusión de la pared o difusión del contenido a través de la pared (Kailasapathy, 2006). Finalmente debe destacarse que, al tratarse la pared de las microcápsulas de una membrana semipermeable, permite el intercambio de nutrientes y metabolitos con el exterior, hecho importante para el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos encapsulados.

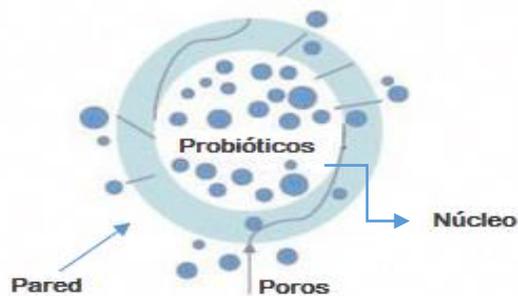


Figura 7: Estructura de una microcápsula, donde la pared está conformada por el agente encapsulante y el núcleo por la sustancia activa.

1.4.1 Métodos de microencapsulación.

Existe una gran variedad de métodos de encapsulación aplicables en diversos campos, la selección de este se encuentra en función del: tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, de la sustancia a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado propuesto, del mecanismo de liberación deseado y del costo (Villena *et al.*, 2009).

Las técnicas de encapsulación pueden ser divididas en dos grupos: químicos y mecánicos (Madene *et al.*, 2006). En la **Figura 9** se observan los principales métodos que se utilizan para encapsular sustancias.

1.4.1.1 Metodologías de extrusión o goteo.

La extrusión consiste en producir pequeñas gotas de material encapsulado forzando el paso de una solución a través de una aguja de jeringa o de una boquilla en los dispositivos generadores de goteo (de Vos *et al.*, 2010). Para ello, los microorganismos son adicionados a una solución hidrocoloide y esta suspensión se hace gotear sobre una solución de endurecimiento (**Figura 8**). El tamaño de las cápsulas obtenidas se encuentra entre los 2 a 4 mm, y este va a depender del diámetro de salida de la solución, ya que cuanto menor sea el diámetro de la abertura correspondiente (aguja/boquilla), menor será el tamaño de las cápsulas.

Se trata de una técnica apropiada para la encapsulación de microorganismos ya que es poco agresiva, no emplea disolventes perjudiciales para las bacterias, se puede llevar a cabo tanto en condiciones anaerobias como aerobias y además, empleando los dispositivos adecuados se puede producir a gran escala. Es por ello que es una técnica ampliamente aplicada en la encapsulación de probióticos (Jiménez, 2011).

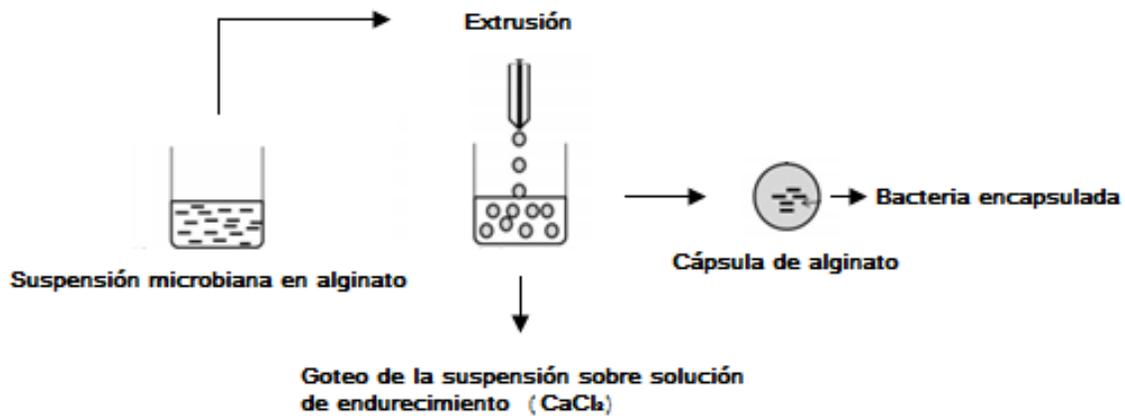


Figura 8: Método de extrusión para la encapsulación de microorganismos.

1.4.2 Materiales empleados en la microencapsulación.

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la encapsulación será la elección de una matriz adecuada (Pedroza, 2002), existe una amplia variedad de agentes encapsulantes los cuales se clasifican de acuerdo a su naturaleza y composición química, en la **Tabla 11**, se presentan los principales.

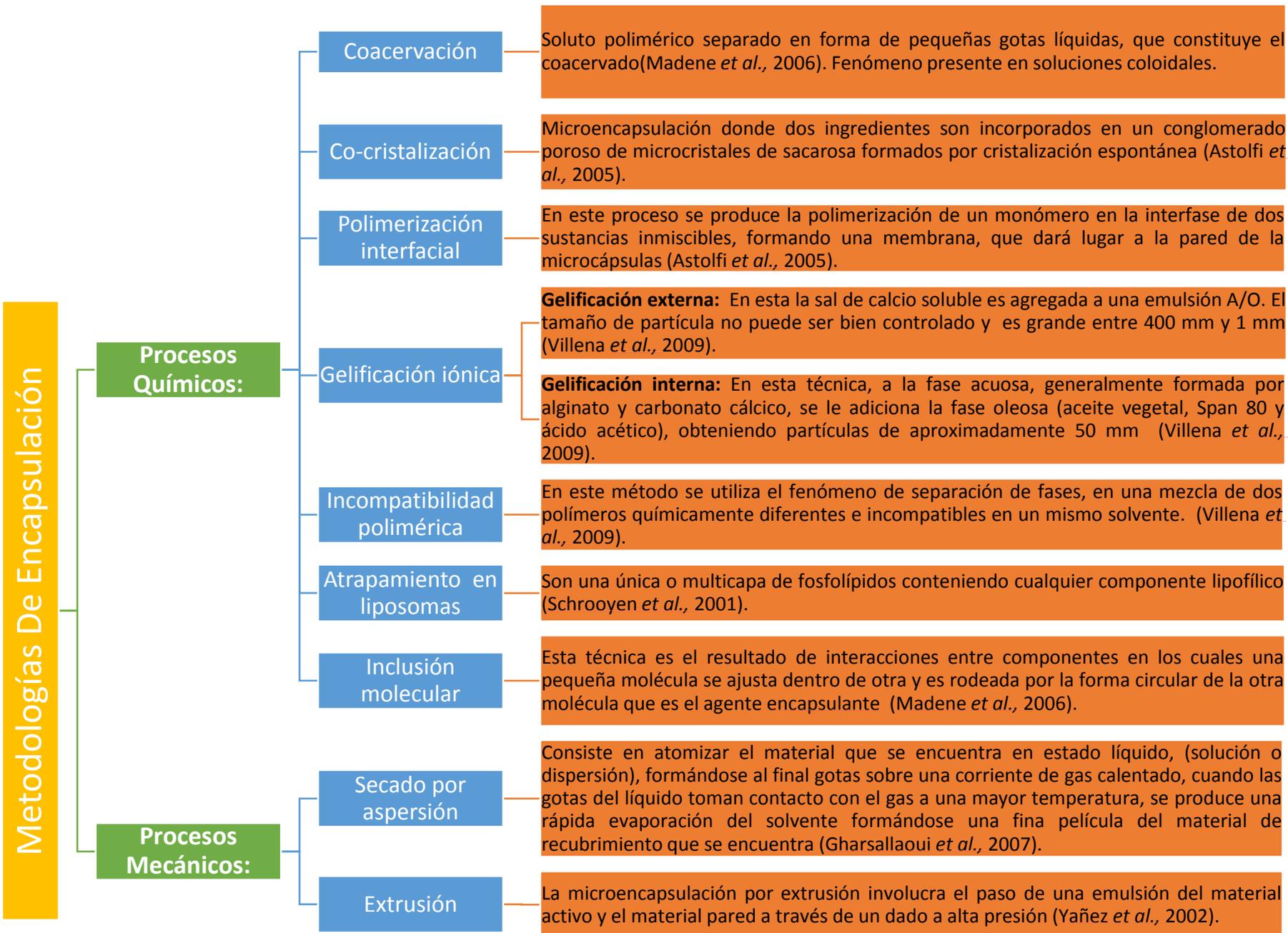


Figura 9: Métodos empleados en la microencapsulación (Madene *et al.*, 2006).

Tabla 11: Principales materiales empleados en la encapsulación.

Agente Encapsulante:	Cobertura Específica:
Lípidos:	<p>Dentro de los principales agentes encapsulantes de carácter lipídico se encuentran; las grasa láctea, lecitinas, ceras, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, parafinas, aceites hidrogenados como el aceite de palma, algodón y soya, todos estos agentes presentan la característica de ser excelentes formadores de películas capaces de cubrir las partículas individuales, proporcionando una encapsulación uniforme (Yañez <i>et al.</i>, 2002).</p>
Carbohidratos:	<ul style="list-style-type: none"> • Almidón: Es un polisacárido compuesto principalmente de amilosa y amilopectina. El almidón resistente es el que no es digerido por las enzimas pancreáticas (amilasas) en el intestino delgado y puede llegar al colon donde se fermenta; esta especificidad proporciona una buena característica de protección al utilizarse como material encapsulante y una mejor liberación de los probióticos o componentes activos en el intestino grueso (Anal & Singh, 2007). • Maltodextrinas: Se elaboran por el método de la hidrólisis ácida o enzimática de los almidones. Entre sus principales ventajas como pared para encapsular se encuentra su bajo costo y su efectividad, son inodoras, incoloras y de baja viscosidad a altas concentraciones, además permiten la formación de polvos de libre flujo sin enmascarar el sabor original (García <i>et al.</i>, 2004). • Gomas: Entre sus principales características se

	<p>encuentra que generalmente son insípidas, aunque pueden tener un efecto pronunciado en el gusto y sabor de alimentos, son solubles, de baja viscosidad, poseen características de emulsificación y son muy versátiles para la mayoría de los métodos de encapsulación (Madene <i>et al.</i>, 2006).</p> <p>Como ejemplos de agentes encapsulantes se tienen a la goma de algarrobo, guar, árabiga, gelana y xantana (Morkhade & Joshi, 2007), una de las principales aplicaciones ha sido en inmovilización y protección de células bacterianas, para lo cual se han utilizado alginatos y carragenina (McMaster <i>et al.</i>, 2005).</p>
<p>Proteína:</p>	<p>Dentro de los principales encapsulante de este tipo encontramos a las proteínas alimenticias como caseinato de sodio, proteína de lactosuero, aislados de proteína de soya, gluten, caseína, soya, trigo y grenetina, este último utilizado por sus buenas propiedades de emulsificación, formación de películas, solubilidad de agua y biodegradabilidad (Favaro <i>et al.</i>, 2010).</p>

1.4.2.1 Materiales empleados en la microencapsulación de probióticos.

Como materiales de encapsulación de microorganismos probióticos normalmente se emplean polisacáridos de diferente origen: algas marinas (k-carragenano, alginato), plantas (almidón y sus derivados, goma arábica), animales (quitosan) o bacterias (gelano, xantano); y proteínas animales (gelatina, leche). Mayoritariamente se emplean polisacáridos en la encapsulación de probióticos ya que constituyen una matriz cuya degradación se ve favorecida por microorganismo de la microbiota intestinal, lo que unido

a la protección que ofrecen a nivel del tracto gastrointestinal superior, permite obtener una liberación de los microorganismos en el órgano diana (de Vos *et al.*, 2010).

Alginato.

Se trata de un polisacárido aniónico obtenido de algas marinas pardas, tiene como características su no toxicidad, es biocompatible, y facilidad de solubilización (por Ca^{++} secuestrante) (Nazzaro *et al.*, 2009). En cuanto a su composición química es un polímero lineal formado por residuos de los ácidos (1 \rightarrow 4)- β -D-manurónico y α -L-gulurónico los cuales se encuentran en formas de bloques, tanto de cada uno de los ácidos como con una distribución aleatoria de los mismos (**Figura 10**). El alginato es, probablemente, el polisacárido más utilizado en microencapsulación a nivel laboratorio, debido a que permiten que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente, no requieren de solventes orgánicos tóxicos, tiene un elevado grado de porosidad, además de disolverse y degradarse bajo condiciones fisiológicas normales, permite una alta velocidad de difusión para macromoléculas, y la posibilidad de controlar dicha difusión.

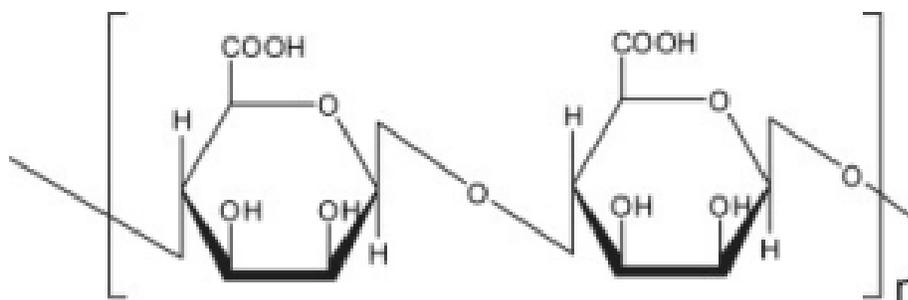


Figura 10: Estructura química del alginato.

1.5 Evaluación sensorial.

Según el Instituto de Alimentos de EEUU (IFT) se ha definido a la Evaluación Sensorial como la disciplina científica que permite evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a características de los alimentos y materiales, de acuerdo a como se perciben por medio de los sentidos del gusto, olfato, vista, tacto y oído (Schutz, 1971).

Otro concepto que se le da es el de la caracterización y análisis de aceptación o rechazo de un alimento por parte del catador o consumidor, de acuerdo a las sensaciones experimentadas desde el mismo momento que lo observa y después que lo consume.

La evaluación sensorial tiene un papel muy importante (Schutz, 1971), su contribución es evidente, especialmente en la investigación y en el desarrollo de nuevos productos (Anholt, 1987), mercadotecnia, producción y aseguramiento de la calidad.

1.5.1 Tipos de pruebas.

La clasificación de los tipos de pruebas empleados en la evaluación sensorial se presenta en la **Tabla 12**:

Tabla 12: Clasificación de los métodos de evaluación sensorial.

Tipo de prueba:		Clases de pruebas:	Pruebas:	Características:
Afectiva:	Este tipo de pruebas se emplean para definir el grado de aceptación y preferencia de un producto determinado por parte del consumidor. Para estas pruebas se requiere de un grupo bastante numeroso de panelistas los cuales no necesariamente tienen que ser entrenados (Hernández, 2005).	Pruebas de preferencia	Prueba de preferencia pareada y por ordenación.	Presenta mayor variabilidad. Las apreciaciones cambian con: el tiempo, práctica, instrucciones, etc. El mínimo número de jueces que se puede utilizar de 50 a 100 jueces es adecuado.
		Pruebas de satisfacción	Escala hedónica verbal, facial y de acción en alimentos.	
		Prueba de Aceptación		
Discriminativa:	Consisten en comparar dos o más muestras de un producto alimenticio, en donde el panelista indica si se percibe la diferencia o no, además se utilizan estas pruebas para describir la diferencia y para estimar su tamaño (Stone <i>et al.</i> , 1994).	Pruebas de Diferenciación: Mide simplemente si las muestras son diferentes.	Prueba de pares, Dúo-trío y Triangular.	Agudeza sensorial normal. El número de jueces depende de la viabilidad del producto y la reproducibilidad de juicios.
		Pruebas de Sensibilidad: Mide la capacidad del juez para detectar características.	Prueba de ordenamiento, escalar de control, umbral de detección, de reconocimiento y dilución.	
Descriptiva:	Estas pruebas permiten conocer las características del producto alimenticio y las exigencias del consumidor. A través de ellas se realizan los cambios necesarios en las formulaciones hasta que el producto contenga los atributos para que el producto tenga mayor aceptación del consumidor (Hernández, 2005).	Escala de Atributos.	Escala de categorías, de relaciones y de estimación de la magnitud, análisis descriptivo.	Frecuentemente 10 jueces, generalmente el mínimo son 5, puesto que menos podría representar demasiada dependencia de la respuesta individual.
		Análisis Descriptivo.	Análisis de perfil de sabor y de perfil de textura.	
		Análisis Cuantitativo.	Análisis descriptivo cuantitativo	

(Stone *et al.*, 1974)

1.5 Mercadotecnia

La mercadotecnia es la actividad humana que pretende satisfacer las necesidades y los deseos por medio de procesos de intercambio. Dichos procesos son sociales y administrativos mediante los cuales las necesidades, carencias y demandas de los clientes son saciadas con aquello que necesitan y quieren, creando productos y valores para satisfacerlas e intercambiándolos con terceros por medio de sus relaciones y transacciones (Kotler, 1996).

El que la gente consuma, el que compre una marca y no otra, el que sea fiel a esa marca y a la empresa, son cuestiones que le importan mucho a la mercadotecnia, esa es su razón y su propósito: cautivar la actitud de consumo de los clientes (Kotler & Armstrong, 2008).

Hacer mercadotecnia, por lo tanto, significa enfocar los esfuerzos en la labor más redituable de toda empresa que es la venta y la facturación, establecer las bases estructurales para competir de manera exitosa en el futuro y lograr ventajas estratégicas con base en el conocimiento profundo de los clientes y sus necesidades (Kotler, 1996).

1.5.1 Estudio de mercado

Para efectuar de manera sistemática la aplicación de la mercadotecnia, se realiza un estudio de mercado, el cual se define como la recopilación y análisis de información respecto al mundo de la empresa y del mercado a tratar, para poder tomar decisiones dentro del campo del marketing estratégico y operativo. Se trata de una herramienta que debe permitir a la empresa obtener la información necesaria para establecer las diferentes políticas, objetivos, planes y estrategias más adecuadas a sus intereses (Pride, 1997). Dicho estudio consta de 3 objetivos principales:

- Satisfacer las necesidades del cliente, ya sea mediante un bien o servicio requerido, es decir, que el producto o servicio cumpla con los requerimientos y deseos exigidos cuando sea utilizado.
- Determinar el grado económico de éxito o fracaso que pueda tener una empresa al momento de entrar a un nuevo mercado o al introducir un nuevo producto o servicio y, así, saber con mayor certeza las acciones que se deben tomar.

- Ayudar al desarrollo del negocio, mediante la adecuada planeación, organización, control de los recursos y áreas que lo conforman, para que cubra las necesidades del mercado, en el tiempo oportuno (Rapp & Collins, 1991).

Este estudio consta de varias etapas:

1. **Segmentación de mercados:** Consiste en dividir el mercado total de un bien o servicio en varios grupos más pequeños e internamente homogéneos, con el fin de conocer realmente a los consumidores y mejorar la precisión del marketing de una empresa, agrupando en un segmento de mercado a personas con necesidades semejantes.
2. **Elección de mercados:** Consiste en escoger las necesidades del cliente que se han de satisfacer y las que no, clasificando a los clientes de acuerdo a: la categoría del producto, a la capacidad para comprarlo, a su poder adquisitivo, etc.
3. **Posicionamiento:** Es el lugar mental que ocupa la concepción del producto y su imagen cuando se compara con el resto de los productos o marcas competidores, además indica lo que los consumidores piensan sobre las marcas y productos que existen en el mercado.
4. **Mix marketing:** Consiste en la suma de acciones de Marketing, en la que centramos nuestros conocimientos y aplicamos nuestra experiencia y creatividad para que los consumidores se conviertan en nuestros clientes (Rapp & Collins, 1991).

1.5.1.1 Aplicación de las cuatro P's (Mix Marketing)

Kotler y Armstrong (2008), definen mix marketing como "el conjunto de herramientas tácticas controlables de mercadotecnia que la empresa combina para producir una respuesta deseada en el mercado meta. El mix marketing incluye todo lo que la empresa puede hacer para influir en la demanda de su producto". Es un conjunto de variables o herramientas controlables que se combinan para lograr un determinado resultado en el mercado meta, como influir positivamente en la demanda, generar ventas, entre otros (Pride, 1997). Estas herramientas están enfocadas al producto y son: Producto, Plaza, Precio y Promoción.

Producto

Un producto es cualquier cosa que provee satisfacción; puede tratarse de un bien, artículo o servicio, y se obtiene a través de un intercambio (Danel, 1990).

Marca

La marca no es sólo un nombre que identifica al producto, sino que ella también aporta ciertas características y valores al producto. Para el caso de muchos productos nuevos, así como para aquellos en que una empresa tiene un control demasiado grande, los consumidores tienden a llamar al producto genérico con el nombre de la marca más conocida. En otros casos, la razón central de la compra del producto es la marca, por el prestigio que ella aporta al consumidor (Arellano, 2000).

Envase

El envase se refiere a los materiales utilizados para encerrar el producto mientras se encuentra en almacén o en tránsito. En el mercadeo, el envase también tiene que ver con la promoción. De hecho, al envase se le ha llamado el vendedor silencioso; este influye en la percepción del producto por parte del consumidor, a través de la identificación de la marca, el color, la textura y otros signos materiales del producto (Pelton *et al.*, 2005).

Debido a la complejidad de las cadenas de abastecimiento y las largas distancias (exportaciones) se obliga a desarrollar empaques que garanticen una prolongada vida útil del producto. Este tiempo, es determinado por el material del envase (Labuza, 1999).

En función a la NOM-130-SSA1-1995 un envase es todo recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo, conservando su integridad física, química y sanitaria. El uso de envases y empaques apropiados es una medida que puede tener efectos realmente importantes, pues reduce las pérdidas de material y asegura que los productos lleguen a los consumidores en las mejores condiciones posibles. En general un envase debe proveer las siguientes propiedades:

- El producto debe protegerse en su recorrido desde el fabricante hasta el consumidor.
- El envasado asegura identificación, limpieza y además, si es adecuado al producto, evita pérdidas por evaporación, derramamiento o deterioro.

- Es el único que asegura que el producto llegue con la calidad de origen.
- Tiene la capacidad de preservar y/o conservar, pues otorga una barrera entre el producto y los agentes externos a él, logrando su permanencia por largo tiempo sin sufrir alteraciones en su composición química o estructura física.
- Cuida al consumidor y al medio ambiente del propio producto y, al mismo tiempo, aísla al producto de riesgos físicos y mecánicos durante el transporte.
- Sirve como dosificador y otorga distintas presentaciones de comercialización que implican colocar un mismo producto en diferentes cantidades.
- El envase puede convertirse en el único elemento diferenciador dentro de un conjunto de productos similares, ya que entra en contacto con el consumidor (antes que el propio producto).
- Brinda información sobre el contenido del envase antes de acceder al producto (tipo, cantidad, calidad, información nutricional, del establecimiento donde fue elaborado, entre otros).
- Presentar los productos a su eventual consumidor bajo un aspecto lo más atractivo posible y en un volumen que sea conveniente para la unidad de consumo.

En los últimos años ha existido un elevado crecimiento en la variedad y aplicación de diferentes tipos de envases elaborados con materiales plásticos, los cuales han aumentado la variedad de envases disponibles para almacenar productos alimentarios debido a las propiedades que posee, ya que es un material reciclable, económico, liviano e irrompible, y con una gran resistencia mecánica y flexibilidad, además de su versatilidad de formas y su capacidad para adquirir un nivel de dureza muy variable (desde frascos y botellas hasta multicapas o films). Asimismo, son capaces de generar una buena barrera contra factores extrínsecos, como la humedad y gases externos y, a su vez, soportan altas temperaturas, lo cual permite obtener sellos herméticos (INTI, 2012).

Existen diversos tipos de plásticos empleados para la elaboración de envases utilizados en el empaque de alimentos, de entre los cuales destacan: el Polietilentereftalato (PET o PETE), el Polietileno de alta densidad (HDPE / PEAD), el Policloruro de vinilo o cloruro de polivinilo

(PVC o V), el Polietileno de baja densidad (LDPE / PEBD), el Polipropileno (PP), el Poliestireno (PS), entre otros, cuyo uso depende de las características del alimentos a envasar aunque el más empleado para el envasado de yogurt bebible es el HDPE (INTI, 2012).

Etiqueta

Las etiquetas acompañan a los diferentes niveles de envase y embalaje que a su manera, protegen el producto dando instrucciones de mantención, de transporte y de uso (Mercado, 1998), en la **Figura 11** se muestran las partes principales que conforman una etiqueta.



Figura 11: Componentes principales de una etiqueta.

Precio

Podemos definir como precio a la estimación cuantitativa que se efectúa sobre un producto y que, traducido a unidades monetarias, expresa la aceptación o no del producto hacia el conjunto de atributos de dicho producto, atendiendo a la capacidad para satisfacer necesidades (Danel, 1990).

Plaza

También conocida como posición o distribución, incluye todas aquellas actividades de la empresa que ponen el producto a disposición del mercado meta. Es un grupo de intermediarios relacionados entre sí que hacen llegar los productos y/o servicios de los fabricantes a los consumidores y usuarios finales (Pride & Ferrel, 1997).

Promoción

Abarca una serie de actividades cuyo objetivo es: informar, persuadir y recordar las características, ventajas y beneficios del producto. Es todo aquello que se utiliza como parte

de las actividades de mercadotecnia para estimular o fomentar la compra o venta de un producto o servicio mediante incentivos de corto plazo. De esa manera, se complementa las acciones de publicidad y se facilita la venta personal (Danel, 1990).

1.6 Vida útil

La calidad es una cualidad de los alimentos, que puede definirse como la combinación de un número de propiedades que influyen el grado de aceptabilidad de los alimentos por parte del consumidor o usuario (Kramer & Twigg, 1968).

Debido a la naturaleza de los alimentos como sistemas fisicoquímica y biológicamente activos, la calidad del alimento es un estado dinámico que continuamente está en movimiento para reducir sus niveles. Por lo tanto, para cada alimento en particular existe un tiempo finito después de la producción, durante el cual éste retiene un nivel requerido de cualidades organolépticas y de seguridad bajo condiciones de almacenamiento estables. Este periodo de tiempo puede ser generalmente definido como vida de anaquel del producto alimenticio (Kennet *et al.*, 1997).

La vida útil de un alimento también puede definirse como el tiempo, después de la producción o empaque, durante el cual el producto conserva ciertas características de calidad establecidas por el proveedor, características que pueden ser de ámbito fisicoquímico, microbiológico o sensorial (Kramer & Twigg, 1968).

Desde el punto de vista de la creación de un nuevo producto, el conocimiento de la vida útil es un aspecto muy importante, ya que esta vida debe exceder al menos el tiempo mínimo requerido de distribución del productor al consumidor. La determinación oportuna y objetiva de la "vida útil" de los productos nos permitirá evitar pérdidas por devolución, ampliar el mercado meta y aumentar la confianza del consumidor.

El productor debe tener un conocimiento de los factores que afectan al producto así como las maneras críticas de falla del alimento. Con esta información se puede elegir los mejores sistemas para maximizar la vida de almacén y así, poner sobre el producto una fecha abierta que indique la vida de alta calidad de este (Labuza, 1999).

1.6.1 Factores que afectan la calidad y vida útil

Los factores que afectan la percepción de calidad por parte del consumidor son tanto intrínsecos del producto, como extrínsecos. Los factores intrínsecos están relacionados con las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas. Estas variables, por su propia naturaleza, controlan las características sensoriales del producto, que a su vez son las variables que determinan la aceptabilidad y la percepción de calidad que tiene el consumidor. Aunque los factores intrínsecos son determinantes de la calidad, muchos otros factores extrínsecos contribuyen a la misma. Estos factores cubren aspectos asociados a las expectativas, influencias culturales y sociales. Sobre éstos contribuyen el precio, la conveniencia y la marca (Cardello, 1998).

Entre los factores intrínsecos más importantes podemos mencionar:

- ✓ **pH:** Es determinante para el crecimiento de los microorganismos cuya tolerancia oscila entre un máximo y un mínimo, entre los cuales está el valor óptimo de crecimiento se aproximan al valor de pH neutro (7). Por lo tanto en los alimentos es importante mantener valores de pH ácidos para evitar su degradación.
- ✓ **Agua:** Es un elemento básico para la vida, de manera que todos los seres vivos, incluso los microorganismos la necesitan para vivir. Es básico tener en cuenta que en los alimentos lo que se conoce como actividad de agua (a_w), es la relación del vapor de agua del alimento y la presión de vapor del agua pura, que es 1, por lo tanto, los valores de a_w oscilan entre 0 y 1. Cuantos más solutos tenga el alimento, menor será su a_w . Los valores de a_w que requieren los microorganismos para poder desarrollarse y multiplicarse se encuentran entre el rango 0.6 a 1.
- ✓ **Potencial Óxido – Reducción:** Se define como la facilidad con la que un sustrato gana o pierde electrones, dándose un diferencial de potencial. Si este diferencial es positivo se oxida la sustancia y si es negativo se reduce. Atendiendo a este potencial distinguimos los siguientes tipos de microorganismos: aerobias, microaerófilos, aeróbicos facultativos, anaerobios estrictos. En base al alimento crecerán unos u otros organismos, pero también es importante la presencia de oxígeno en la

atmósfera y su capacidad de penetración en ésta. Puede darse una típica secuenciación, de manera que en el alimento crezcan en primer lugar microorganismos aerobios, pero a medida que se agote el oxígeno y los componentes del alimento aparecerán otros organismos en un caso típico de sinergismo.

- ✓ **Contenido de nutrientes de alimentos:** Los organismos ven el alimento como un sustrato para su crecimiento, pero para que el alimento pueda sustentar el crecimiento microbiano, deberá tener una serie de nutrientes y componentes, que hagan factible el crecimiento de determinado microorganismo.
- ✓ **Relaciones entre microorganismos:** Una relación que exista entre 2 organismos puede ser de dos tipos. Se puede dar antagonismo, en el que un organismo actúe inhibiendo el crecimiento de otro o se puede dar sinergismo, si un organismo favorece el crecimiento del otro. Esto nos va a interesar para evitar el crecimiento de organismos alterantes o patógenos, ya que hay ciertos patógenos que pueden ser antagonicos del crecimiento de otros organismos y viceversa (Cardello, 1998).

Entre los factores extrínsecos más importantes podemos mencionar:

- ✓ **Temperatura:** Siempre será un factor a tener en cuenta para la conservación de los alimentos. El margen de crecimiento de los microorganismos es muy amplio, va de – 18 °C a 90 °C, dependiendo del microorganismo que se encuentre presente y de los nutrientes que el alimento contenga para poder desarrollarse.
- ✓ **Humedad relativa:** Es de sumo interés, ya que como ya hemos dicho, la actividad del agua es la base. La HR se equilibrará con el agua del alimento, o como mínimo tiende a ello. Será útil entonces usar humidificadores o desecadores para regular el contenido de agua de la atmósfera. Además para evitar que se equilibre, otra opción es usar empaques alrededor del alimento, haciendo que éste tenga una atmósfera aislada. La pérdida o ganancia de humedad de un alimento puede ocasionar su marchitamiento, reblandecimiento o apelmazamiento.
- ✓ **Atmósfera:** La atmósfera a la que se encuentra un alimento es básica para su conservación, sobre todo a nivel de la presión parcial de oxígeno y su capacidad de

difusión. Dependiendo del alimento a almacenar, es posible emplear atmosferas con diversos gases (dióxido de carbono o hielo seco) para inhibir el crecimiento de microorganismos sobre estos.

- ✓ **Procesos industriales:** Los procesos industriales que se lleven a cabo pueden afectar a los microorganismos que crezcan en el alimento, ya sean procesos de embotellado, calentamiento, etc. (Cardello, 1998).

Aparte de la degradación microbiológica, existe una gran cantidad de reacciones que se pueden dar debido a estos factores, pero la mayoría pueden clasificarse dentro de las siguientes áreas:

- ✓ **Oscurecimiento no enzimático:** Una serie de reacciones complejas que inician con compuestos reductores y grupos amino que producen sabores amargos, pigmentos oscuros, pérdida de solubilidad de las proteínas y pérdida de características de sabor.
- ✓ **Pérdida de vitaminas:** Esto conlleva a la pérdida del valor nutricional del alimento. La destrucción de las vitaminas puede ocurrir a través de varios mecanismos como es la hidrólisis debido a la luz, calor o ácidos, a la oxidación directa en presencia de oxígeno y la participación de éstas en reacciones redox.
- ✓ **Cambio de color:** El color natural de los alimentos se pierde como consecuencia de varios tipos de reacciones como la oxidación directa de pigmentos o co-oxidación de lípidos.
- ✓ **Actividad enzimática:** Si los alimentos no se someten a tratamientos térmicos para inactivar las enzimas, éstas pueden catalizar ciertas reacciones que producen sabores, colores o texturas indeseables (Labuza, 1985).

1.6.2 Métodos para determinar la vida útil

Para determinar la vida útil de un alimento o producto, primero deben identificarse las reacciones químicas o biológicas que influyen en la calidad y seguridad del mismo, considerando la composición del alimento y del proceso al que es sometido y se procede a establecer las reacciones más críticas en la calidad (Rodon *et al.*, 2004).

El tiempo de vida útil se puede estimar mediante varios métodos: pueden tomarse valores reportados en la literatura especializada de alimentos similares y bajo condiciones similares al producto de nuestro interés; se pueden monitorear las quejas de los consumidores para orientar los posibles valores de vida útil; se pueden evaluar atributos de calidad del alimento que varían durante la vida útil en anaquel o mediante pruebas aceleradas (Rodon *et al.*, 2004).

- **Ensayos en anaquel.** Estos ensayos ofrecen excelentes datos, pero presentan, en algunos casos, el inconveniente del tiempo prolongado para su adquisición. Entre las consecuencias están que el dato obtenido es puntual y se obtiene en un lapso que puede no ser práctico para la empresa, con es el caso del lanzamiento de nuevos productos.
- **Pruebas de vida útil acelerada.** Estos métodos se basan en la aplicación de los principios de la cinética química sobre el efecto que las condiciones ambientales como temperatura, presión, humedad, gases de la atmósfera y luz, tienen sobre la velocidad de la reacción (Robertson, 1993). Los métodos acelerados para la determinación de la durabilidad son útiles para reducir el tiempo dedicado a los ensayos de estimación cuando se está determinando la vida de anaquel de productos no perecederos. Se basa en someter el producto a condiciones de almacenamiento que aceleren las reacciones de deterioro, las cuales se denominan condiciones de abuso, que pueden ser temperaturas, presiones parciales de oxígeno o contenidos de humedad altos (Giraldo, 1999).

Las pruebas de laboratorio simulan las condiciones reales, pero existen variables como las condiciones de transporte, cambios de presión, fluctuaciones de temperatura, entre otras, que son difíciles de duplicar. Por lo tanto, los resultados obtenidos son estimaciones de la vida útil del alimento (Rodríguez, 2004).

1.6.3 Diseño de estudio de vida útil

Un estudio de vida útil consiste en realizar una serie de controles preestablecidos en el tiempo, de acuerdo con una frecuencia establecida, hasta alcanzar el deterioro elegido como limitante o hasta alcanzar los límites prefijados.

Los puntos clave al diseñar un estudio de vida útil son el tiempo durante el cual se va a realizar el estudio siguiendo una determinada frecuencia de muestreo y los controles que se van a llevar a cabo sobre el producto hasta que presente un deterioro importante. Generalmente se cuenta con poca información previa, por lo que se deben programar controles simultáneos de calidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial (Hough & Fiszman, 2005).

Los pasos para realizar el diseño del estudio de vida útil de manera adecuada y ordenada son:

1. **Realizar la obtención de información preliminar:** Sobre algún determinado producto alimenticio que presenta características y propiedades similares al producto a desarrollar, para realizar una estimación.
2. **Selección de las condiciones del ensayo:** Para diseñar un estudio de vida útil hay que seleccionar la temperatura, humedad e iluminación que se van a emplear en el mismo, determinando si se van a usar condiciones normales o aceleradas.
3. **Determinación del tiempo máximo de almacenamiento:** Periodo de tiempo en el cual la muestra sufre un deterioro importante.
4. **Selección de los tiempos de muestreo:** Se debe seleccionar un mínimo de seis tiempos de muestreo; si se ensayan menos tiempos, la confianza en la determinación de la vida útil disminuye (Hough & Fiszman., 2005).
5. **Determinación de los descriptores críticos:** Un descriptor crítico es aquella característica que limita la vida útil del producto, ya sea por disminución durante la vida comercial (contenido en vitaminas, funcionalidad de un aditivo, carácter crujiente, olor típico, etc.) o por aumento del mismo (pardeamiento, carga microbiana, olor o sabor extraño, sabor rancio, etc.).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Objetivos

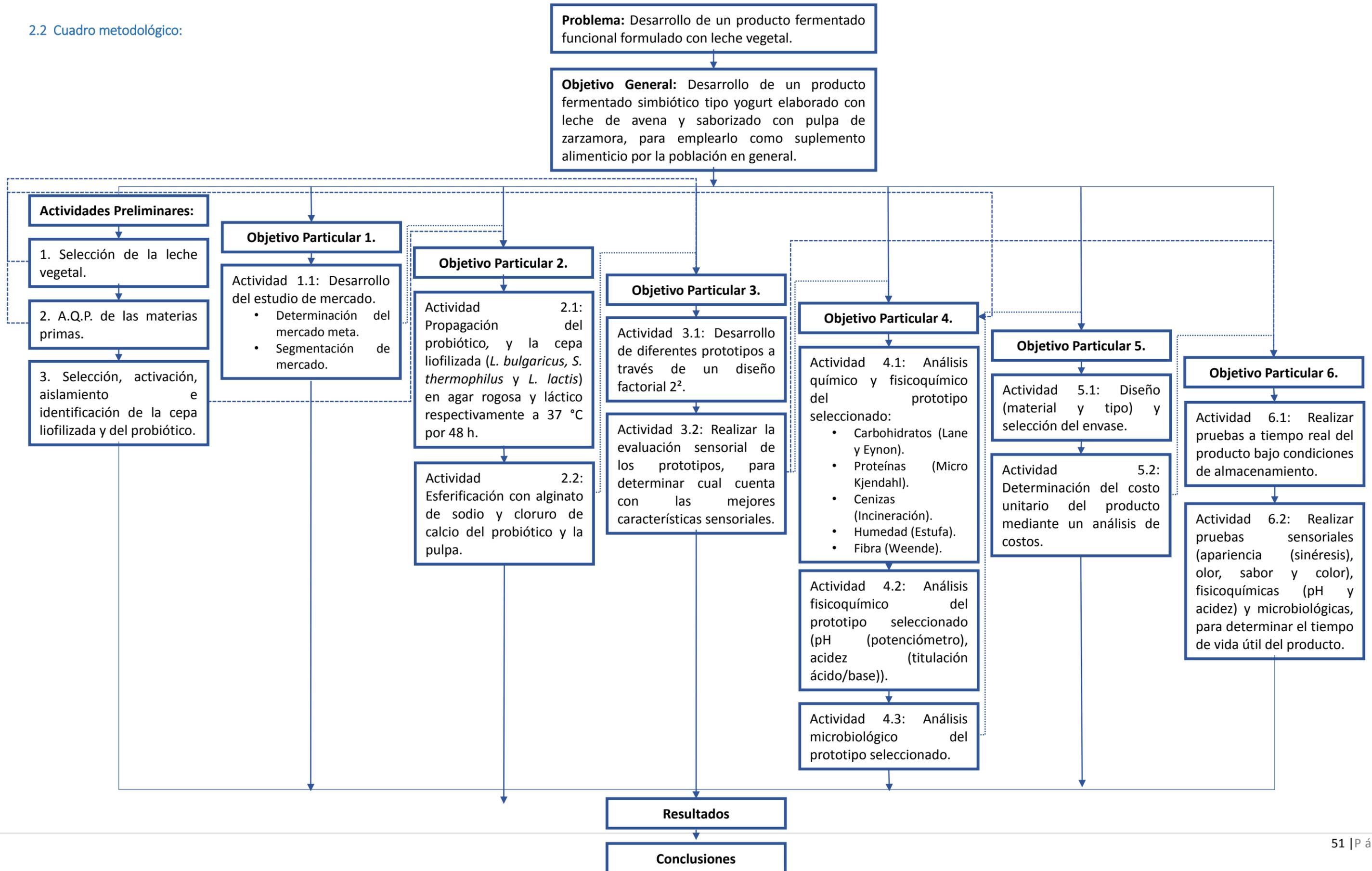
2.1.1 Objetivo General:

Desarrollar un producto fermentado funcional tipo yogurt elaborado con leche de avena y pulpa de zarzamora, para emplearlo como suplemento alimenticio por la población en general.

2.1.2 Objetivos Particulares:

1. Determinar la viabilidad de un producto fermentado funcional tipo yogurt formulado con leche de avena mediante una investigación de mercado, para identificar a los posibles consumidores.
2. Encapsular la bacteria láctica y la pulpa de zarzamora, mediante esferificación con alginato y cloruro de calcio, para asegurar la viabilidad de la bacteria.
3. Desarrollar diferentes formulaciones del producto previamente fermentado variando la concentración de edulcorante (4 % y 5 %) con respecto al saborizantes (10 % y 25 %), manteniendo constante la concentración de la bacteria láctica, para determinar mediante pruebas sensoriales de intervalos el prototipo de preferencia.
4. Analizar los parámetros químicos (carbohidratos, fibra, humedad, proteínas y cenizas) y fisicoquímicos (pH y acidez), así como microbiológicos del prototipo seleccionado para determinar la composición química y la calidad higiénica del producto respectivamente.
5. Seleccionar el material y diseño del envase, así como el costo unitario del prototipo, mediante la NOM-130-SSA1-1995 y un estudio de mercado para su posterior comercialización.
6. Estimar la vida útil del prototipo seleccionado bajo condiciones reales de almacenamiento, para determinar el tiempo máximo de consumo del producto fermentado tipo yogurt.

2.2 Cuadro metodológico:



2.3 Descripción de la metodología experimental.

2.3.1 Actividades preliminares:

2.3.1.1 Selección y formulación de la leche vegetal.

El objetivo de esta actividad fue la selección de la leche vegetal que se emplearía como base del producto fermentado.

Para probar la susceptibilidad a la fermentación y por su disponibilidad en el mercado se seleccionaron las leches de avena, alpiste y la de amaranto, las cuales poseen una concentración intermedia de proteínas que cuentan con un mejor balance de aminoácidos esenciales, que el que presentan otras variedades de cereales (Soriano, 2012), además de que al ser de origen vegetal, no contiene grasas saturadas ni colesterol (Rius, 2012), lo que es indicado para el consumo de personas con intolerancia a la lactosa y con problemas de salud cardiovascular (Soriano, 2012).

Se adquirieron los polvos para elaborar las leches de avena, alpiste y de amaranto en la tienda SUPER NATURISIMA S.A. de C. V., localizada en el municipio de Nicolás Romero. Las bebidas se prepararon disolviendo 20 g de polvo en 250 ml de agua y estas se sometieron a una prueba preliminar de fermentación por un periodo de 6 h a 42 °C con *Lactobacillus casei*.

La leche de avena se seleccionó porque una vez fermentada presentó los mejores atributos de sabor, olor, color y apariencia.

Por otro lado para evitar la separación de fases que presentaba la leche de avena, se decidió agregar un estabilizante, para esto se realizó un experimento en el que se probaron 3 concentraciones de avena (4, 6 y 8 %) y 3 de estabilizante (0.3, 0.5 y 1 %). La selección de la bebida se realizó mediante la evaluación de las características organolépticas de sabor, olor, color y estabilidad, así como de su pH y acidez.

El diagrama de proceso planteado para la elaboración de la leche de avena se muestra en la **Figura 1 2.**

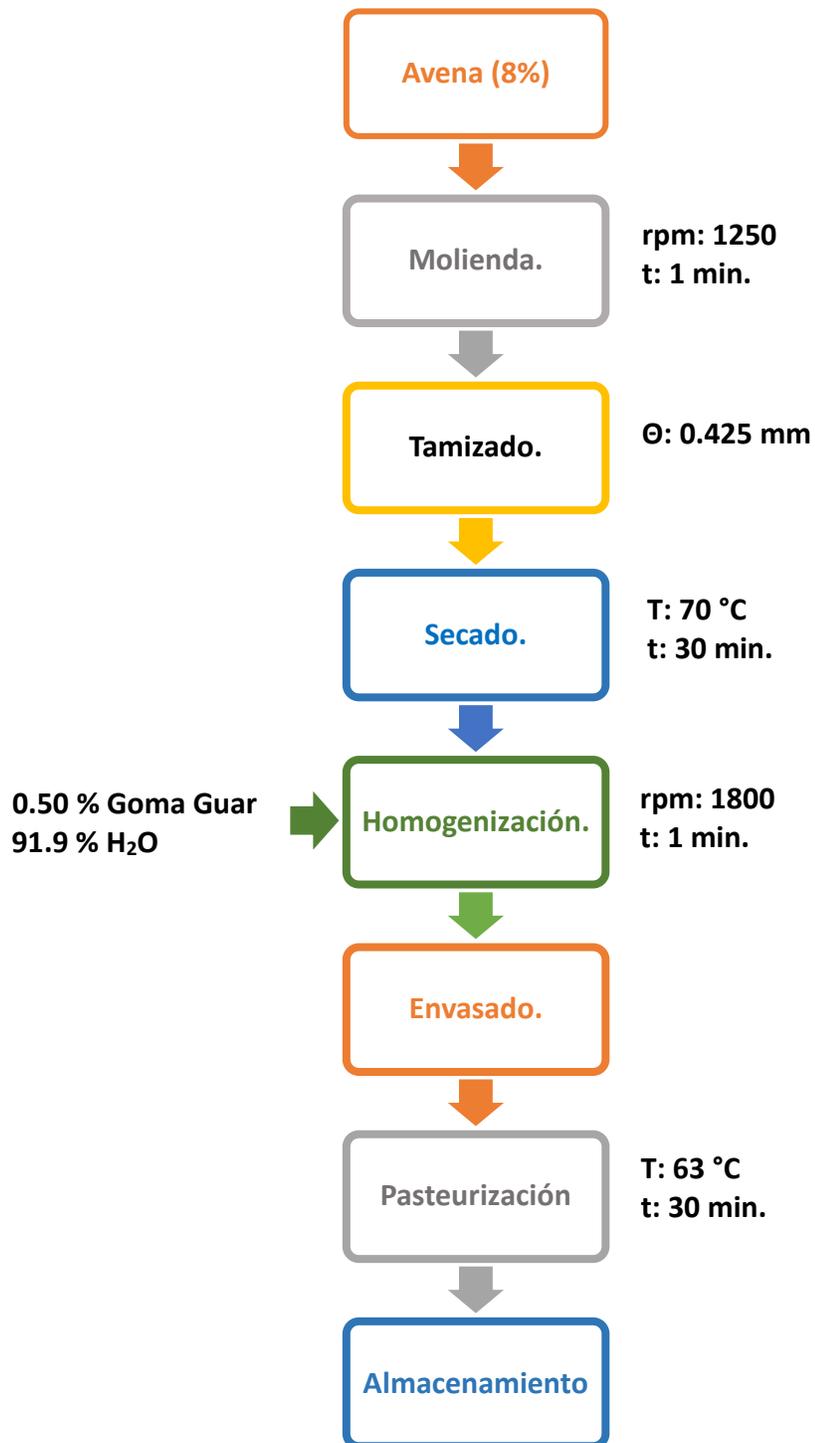


Figura 12: Diagrama de elaboración de la leche de avena.

Descripción del diagrama de elaboración de la leche de avena:

Molienda y Tamizado: Estas operaciones unitarias se emplean para reducir el tamaño de partícula del cereal, con la finalidad de mejorar la solubilidad de este en el disolvente al generar una mayor área de contacto (Bedolla *et al.*, 2012), este proceso se realizó a 1250 rpm durante un periodo de 1 min., en un molino de café de la marca Hamilton Beach, modelo 80374, posteriormente la harina procesada se seleccionó a través de un sistema de tamices hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo de 0.425 mm.

- **Secado:** La principal función de esta operación es la de reducir la humedad de la harina de avena, impidiendo el desarrollo de microorganismo que alteren su composición y calidad higiénica (Álvarez & Bagué, 2012).
- **Homogenización:** Este proceso permite obtener la bebida vegetal al mezclar el 8 % de la harina de cereal, el 0.5 % de estabilizante (goma guar) y el 91.5 % de disolvente (agua), el proceso se realizó a 1800 rpm por un periodo de 1 min., en una batidora de inmersión de la marca Oster, modelo 2609-13, obteniendo así una solución homogénea con buena estabilidad.
- **Pasteurización LTLT (baja temperatura, largo tiempo):** Esta operación se llevó a cabo a 63 °C durante un periodo de 30 min., su principal función fue la disminución de la carga microbiológica presente en la bebida, asegurando de esta manera la calidad higiénica del producto (Jay, 2000).
- **Envasado y almacenamiento:** La leche de avena se colocó en recipientes de vidrio previamente esterilizados **T: 4 °C** y el almacenamiento se realizó a una temperatura de 4 °C.

2.3.1.2 Análisis químico proximal y fisicoquímico de las materias primas.

Se realizó un análisis químico proximal de la pulpa de zarzamora la cual se adquirió en la empresa Ricco Aroma de México S.A. de C.V. y de la leche de avena previamente elaborada, las metodologías empleadas se presentan en la **Tabla 14** que se presenta en la página 66.

2.3.1.3 Selección, activación, aislamiento e identificación de la cepa liofilizada y el microorganismo probiótico.

- Activación del cultivo láctico liofilizado (cultivo iniciador):

En 500 ml de leche descremada Santa Clara previamente pasteurizada a 10 lb/pulg² durante 10 minutos, se inocularon 0.018 g de la cepa liofilizada MY 800 LYO 5 DCU conformada por una mezcla de: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus thermophilus* y *Lactobacillus lactis*, adquirida en la empresa ALCATRAZ, S.A. de C.V., la leche previamente inoculada se incubó durante 6 horas a 42 °C, se enfrió a 15 °C y se conservó a una temperatura de 5 °C (**Figura 13**).

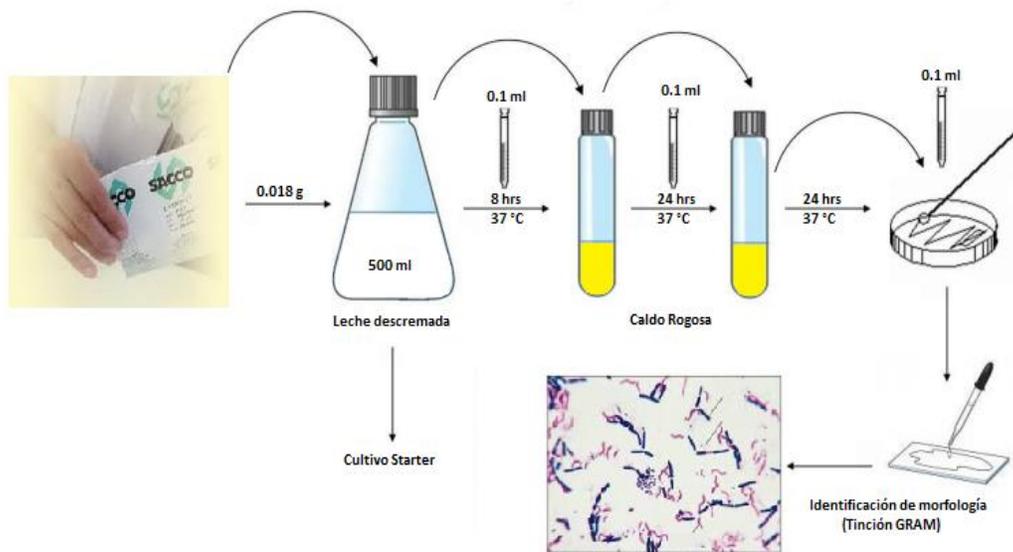


Figura 13: Activación y aislamiento del cultivo láctico liofilizado.

Se determinó el número de células viables presentes en el cultivo iniciador, mediante un conteo en placa, realizando diluciones decimales del fermento (hasta la 10⁻⁸), y sembrando 0.1 ml de cada dilución (**Figura 14**) en agar láctico (**Anexo 2**).

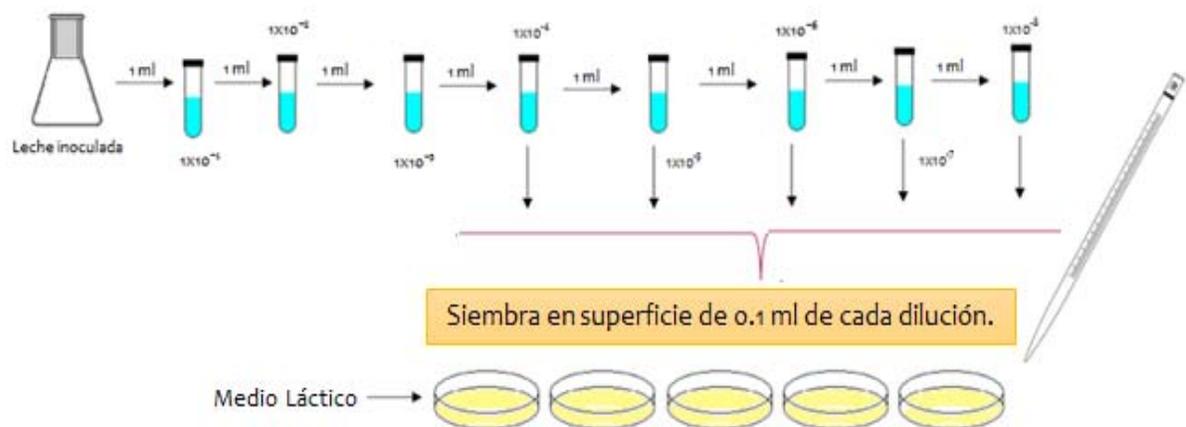


Figura 14: Método de diluciones para conteo microbiológico.

- Aislamiento de los microorganismos presentes en el cultivo iniciador:

Se identificaron las especies presentes en la mezcla iniciadora aislando por estría en agar láctico e incubando a 37 °C durante 24 h., la identificación de las especies se realizó mediante las pruebas bioquímicas y morfológicas que se mencionan a continuación.

- Activación del microorganismo probiótico:

Se realizó la activación del *Lactobacillus casei* proporcionado por el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en caldo rogosa durante 48 h a 37 °C.

El aislamiento de la cepa, se efectuó sembrando por estría cruzada en agar de medio rogosa (MRS) (**Anexo 2**), el cual se incubó durante 48 h a 37 °C.

- Identificación bioquímica y morfológica:

Para identificar las cepas aisladas las pruebas realizadas fueron: tinción de Gram, Oxidación/Fermentación (OF) y la habilidad de fermentar los siguientes carbohidratos: arabinosa, celobiosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melecitosa, melibiosa, salicín, sorbitol, sucrosa, xilosa, esculina y trehalosa (McFaddin, 2003).

2.3.2 Objetivo particular 1. Desarrollo del estudio de mercado e identificación del mercado meta.

2.3.2.1. Estudio de mercado.

Para determinar la factibilidad de la elaboración del producto fermentado funcional a base de una bebida de avena, definir su mercado meta y su sabor, así como un posible límite del precio al que estarán disponibles a pagar los consumidores, se realizó una encuesta de 12 preguntas (**Figura 15**) a 40 personas de ambos sexos, el tamaño de muestra fue seleccionado a partir de una fórmula estadística para estimar proporciones (Alvarado, 2008) con un nivel de confianza del 95 % (**Anexo 3**).

Debido a las propiedades funcionales que presentan la avena y las bacterias lácticas, se asumió que el producto fermentado sería fácilmente consumido por personas que tienen un estilo de vida acelerado y sufren de enfermedades gastrointestinales, así que la encuesta se aplicó aleatoriamente a personas activas de entre 15 y 50 años de edad, estudiantes y trabajadores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y de la Escuela Preparatoria Oficial No. 272 Tepojaco».

ENCUESTA DE MERCADO

Edad: _____ Sexo: F M Ocupación: _____

1. ¿Cuánto tiempo inviertes en el desayuno?
a. Nada b. 1 hora c. Media hora d. 15 minutos e. Otro
2. ¿Consumes algún producto o derivado lácteo?
SI NO ¿Por qué? _____.
3. Enumera con qué frecuencia consumes los siguientes derivados lácteos (Del 1 al 4, siendo 1 el más consumido y 4 el menos consumido).
a. Yogurt b. Flan c. Natilla d. Mousse
4. En caso de que si consuma alguno, ¿Con qué frecuencia lo hace?
a. Diariamente b. Cada tercer día c. 1 vez por semana d. Otro. _____.
5. ¿Conoce y/o consume leches vegetales?
a) **SI conozco, pero no las consumo.**
b) **No conozco y no las consumo.**
c) **SI conozco y las consumo.**
d) **No conozco, pero me interesaría consumirlas.**
¿Por qué? _____.
6. ¿Sabes qué es un alimento funcional? **SI NO**
7. ¿Conoce las propiedades funcionales de las leches vegetales? **SI NO**
8. Te interesaría consumir un producto fermentado funcional elaborado con leche vegetal, sabiendo que el consumo de este alimento te proporciona un mejor funcionamiento digestivo, un aporte nutricional elevado por su alto contenido proteico y, además, te ayuda a eliminar grasas como el colesterol.
SI NO ¿Por qué? _____.
9. En caso de que si te interese, ¿Cuál de los siguientes productos preferirías?
a. Yogur b. Flan c. Natilla d. Mousse
10. ¿De qué sabor te gustaría que fuera la base de ese producto?
a. Natural b. Arándano c. Zarzamora d. Kiwi e. Otro _____.
11. ¿Comprarías este nuevo producto tomando en cuenta que beneficia su salud?
SI NO ¿Por qué? _____.
12. ¿Cuánto estaría dispuesto a pagar por este producto en una presentación de 200 g?
a. De 3- 6 pesos b. De 6 – 10 pesos c. De 10 – 15 pesos d. Otro _____.

Figura 15: Encuesta para el estudio de mercado.

2.3.3 Objetivo particular 2. Encapsulación del microorganismo probiótico y de la pulpa de zarzamora.

2.3.3.1. Obtención de la masa celular del *L. casei* para la encapsulación.

La producción de masa celular de *Lactobacillus*, se realizó mediante siembras del *L. casei* cultivadas en proporción del 10 %, iniciando con 2.5 ml e incubando cada inóculo a 37 ° C por 24 horas hasta obtener 1 L de caldo Rogosa (**Figura, 16**).

El cultivo se vació en botes estériles y se centrifugó a 7000 rpm durante 20 minutos, en una centrifuga RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se lavó dos veces con solución salina fisiológica (SSF), centrifugando después de cada lavado a las condiciones ya mencionadas, finalmente se suspendió en 25 ml de SSF y se refrigeró hasta su uso.

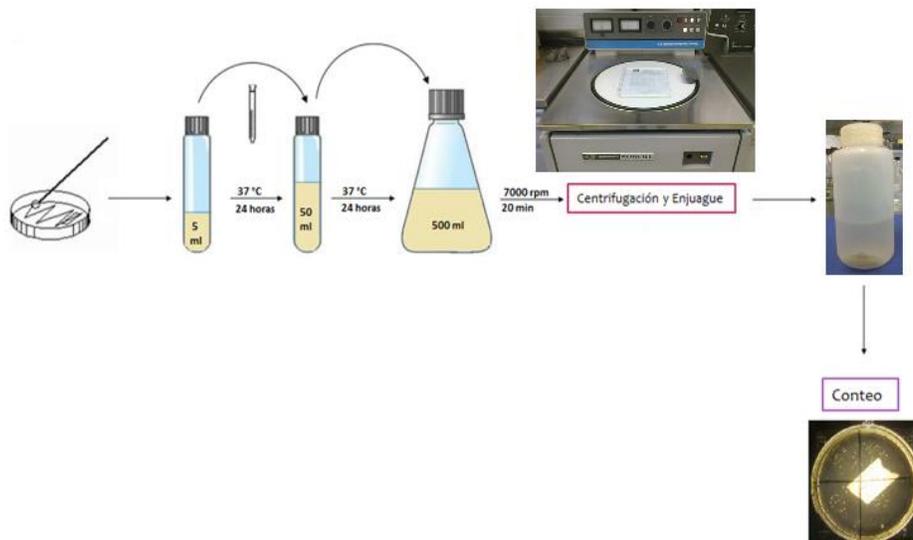


Figura 16: Representación gráfica de la obtención de masa celular del *L. casei*.

Para tener un estimado de la cantidad de microorganismo viables presentes en la suspensión se empleó el método de Miles y Misra y la siguiente ecuación, el equipo utilizado se muestra en el **Anexo 1**.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \left(\frac{\text{No.colonias}}{\text{No.cuadrantes}} \right) \left(\frac{1}{\text{Dilución}} \right) (20 \mu\text{L de dilución})(50 \text{ Factor para 1 ml})$$

2.3.3.2 Encapsulamiento del microorganismo probiótico (*L. casei*) y de la pulpa de zarzamora.

La encapsulación del microorganismo se realizó por medio de una técnica de extrusión, el material encapsulante fué una solución de alginato de sodio al 1.5 %, al cual se le añadieron 25 ml de cultivo en suspensión de 8.75×10^9 UFC por ml de *Lactobacillus*. Con ayuda de una jeringa de 3 ml se tomó una porción de la dispersión y se realizó un goteo en una solución de cloruro de calcio al 2 %, se dejó reposar durante 10 min. y se retiró el exceso de sal enjuagando las cápsulas con agua potable, como se muestra en la **Figura 17**.

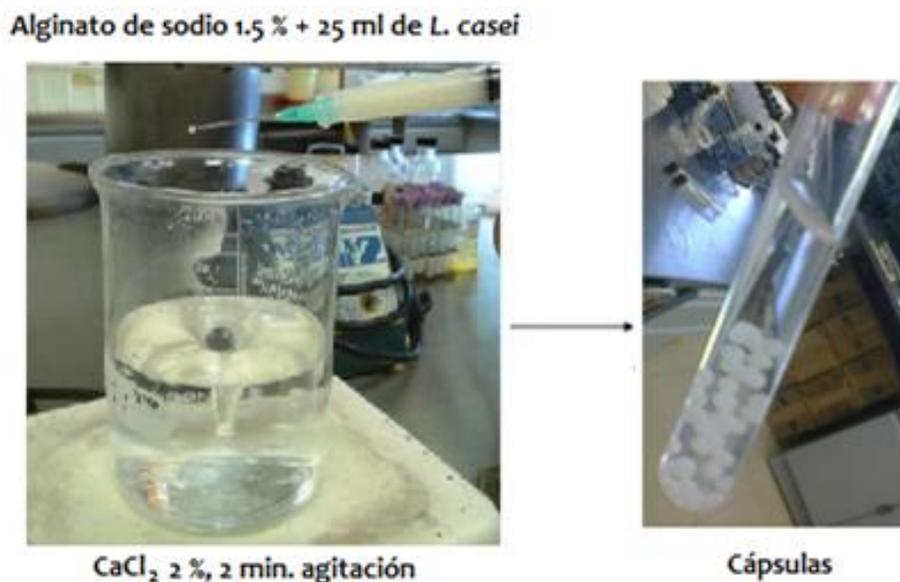


Figura 17: Encapsulación con alginato de sodio y cloruro de calcio del microorganismo.

Para realizar la encapsulación de la pulpa, se empleó la técnica de encapsulación inversa, teniendo el material encapsulante disuelto en una solución de 1.5 % de alginato de sodio al cual se goteó la pulpa mezclada con 0.5 % de cloruro de calcio.

2.3.3.3 Determinación de la concentración de microorganismo probiótico encapsulado.

Para determinar la concentración de microorganismos presentes en las cápsulas, se realizó un conteo por gota (**Figura 18**).

La primera dilución se efectuó macerando en un mortero estéril 1 g de cápsulas para lograr la liberación del microorganismo. Posteriormente se realizaron 4 diluciones decimales.

La segunda dilución se llevó a cabo tomando 0.5 ml de cápsulas maceradas, las cuales se colocaron en 4.5 ml de solución salina, el tubo se sometió a agitación durante 30 segundos en un agitador Vortex, esta operación se repitió hasta obtener la dilución 10^{-4} , con ayuda de una micropipeta se tomaron 20 μ L de las diluciones, los cuales se sembraron por cuadruplicado en Agar Rogosa, las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Finalmente se realizó el conteo de las colonias para determinar la concentración de microorganismo por cápsula, empleando la ecuación del método de Miles y Misra, para de esta manera definir la concentración de cápsulas que se adicionaron al producto fermentado tipo yogurt.

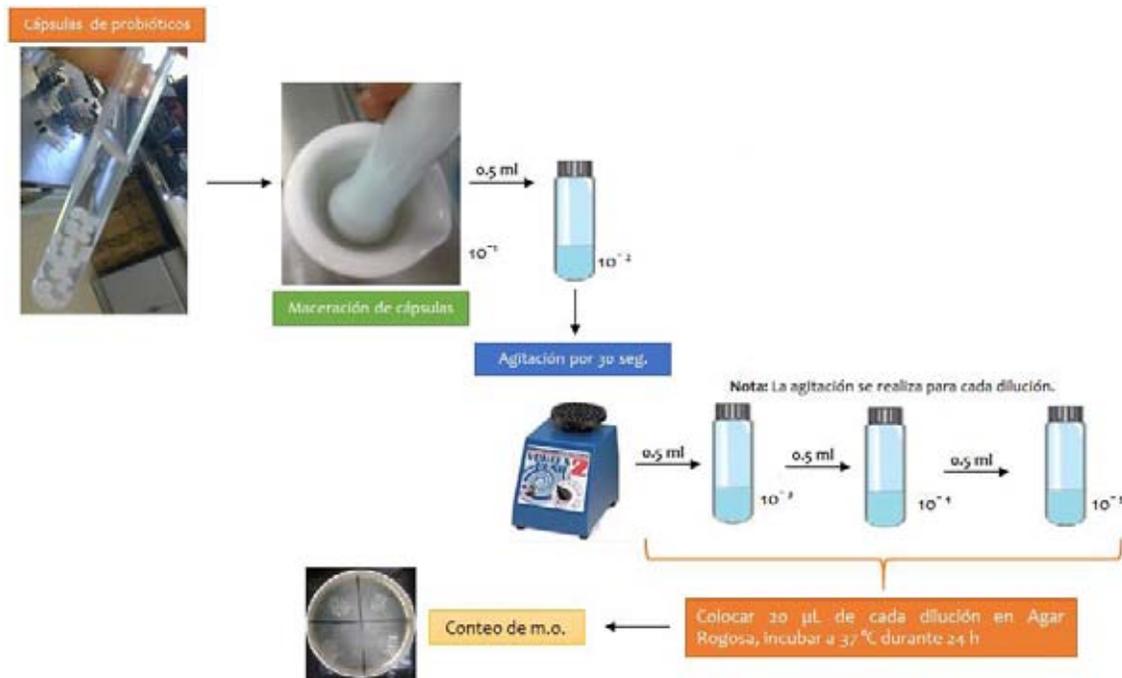


Figura 18: Metodología para el conteo del número de microorganismos presentes en las cápsulas.

2.3.3.4 Análisis de perfil de textura de las cápsulas de probiótico y determinación de diámetro medio.

Las cápsulas se sometieron a un análisis de perfil de textura en un texturómetro: Lloyd, TA-500, equipado con una geometría cilíndrica de acrílico de ¼ de pulgada de diámetro, las

mediciones se realizaron a una cápsula aplicando dos ciclos de compresión, a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) por triplicado, en las siguientes condiciones:

- Muestra: 0.5 cm de diámetro.
- Precarga: 1 g
- Distancia de penetración: 20 mm
- Velocidad de penetración: 1.3 mm/s

A partir de las curvas de fuerza-tiempo se determinaron las características texturales de: dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad, adhesividad y masticabilidad.

El diámetro medio de las cápsulas se obtuvo mediante la medición del diámetro de las capsulas con un vernier.

2.3.3.5 Determinación de la eficiencia de la encapsulación y de la sobrevivencia del *L. casei*.

Para llevar a cabo esta determinación se realizó nuevamente el conteo del número de microorganismos presentes en las cápsulas después del día 3 y posteriormente cada tercer día por un periodo de 21 días, siguiendo la metodología establecida anteriormente (**Figura 18**). El cálculo de la eficiencia de encapsulación se realizó con la siguiente ecuación (Rodríguez *et al.*, 2012):

$$\% \text{ L. casei encapsulado} = \left(\frac{\text{Log} ([\text{UFC}] \text{ finales})}{\text{Log} ([\text{UFC}] \text{ iniciales})} \right) (100)$$

2.3.4 Objetivo particular 3. Desarrollo y selección de los prototipos del producto fermentado de avena.

2.3.4.1 Selección del porcentaje de sólidos para la adecuación de la leche de avena.

Se realizó un ajuste de sólidos a la bebida de avena, mediante la adición de leche en polvo en concentraciones de 4, 6 y 8 %, la selección de la concentración óptima se efectuó determinando y comparando con la consistencia de un producto comercial empleando un Viscosímetro de Brookfield modelo 562.

2.3.4.2 Selección de concentraciones de inóculo y porcentaje de glucosa.

Para establecer las condiciones de fermentación se realizó un experimento en el cual se variaron las concentraciones de inóculo (3 y 5 %) y glucosa (0.5 y 2 %), las muestras se fermentaron a 42 °C por 6 horas con el cultivo láctico liofilizado, llevando un control de pH y acidez cada 30 min., hasta un descenso de pH de 4.3. Se evaluaron los atributos de acidez, sabor, textura y formación de coágulo.

2.3.4.3 Elaboración de prototipos.

Posteriormente se plantearon los prototipos de acuerdo al diseño factorial 2² que se presenta en la **Tabla 13**, en el cual se evaluó el efecto de los factores concentración del edulcorante y proporción de pulpa de fruta en algunas propiedades fisicoquímicas (pH y acidez) y sensoriales del producto fermentado.

Tabla 13. Condiciones experimentales para determinar el efecto de la pulpa y el edulcorante en propiedades fisicoquímicas y sensoriales del producto fermentado.

Prototipo:	% Pulpa disuelta:	% Edulcorante:	Propiedades	
			Fisicoquímicas	Sensoriales
186	15	5	Acidez y pH	Apariencia, olor, sabor, dulzor y acidez.
265	0	4		
613	0	5		
822	15	4		

2.3.4.4 Evaluación sensorial de prototipos.

Se efectuó una prueba descriptiva con escala estructurada a 30 jueces semi-entrenados en la cual cada juez evaluó 6 atributos (apariciencia, olor, sabor, acidez, dulzor y sensación de esferas) de los 4 prototipos, con base en una escala que se les proporcionó para que ubicarán la intensidad con la que percibían cada sensación.

Los jueces a quienes se les aplicó dicha evaluación fueron alumnos de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán con conocimientos previos de evaluación sensorial. El formato de dicha encuesta se muestra en las **Figuras 19 y 20**.

A los resultados obtenidos de la evaluación sensorial se les realizó un análisis de varianza para un diseño factorial en bloques, donde los bloques fueron los jueces. Se utilizó el paquete estadístico R versión 3.0.2. (R coreteam *et al.*, 2014).

PRODUCTO FERMENTADO FUNCIONAL DE AVENA

Nombre: _____ Fecha: _____ Serie: _____

INSTRUCCIONES: Pruebe las muestras de izquierda a derecha e indique para cada atributo su intensidad de acuerdo a las siguientes escalas:

Apariencia

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Nada agradable			Agradable				Muy agradable				
Muestras:		186			265			822			613	
Intensidad:		_____			_____			_____			_____	

Olor

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Nada agradable			Agradable				Muy agradable				
Muestras:		186			265			822			613	
Intensidad:		_____			_____			_____			_____	

Sabor

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
	Nada agradable			Agradable				Muy agradable				
Muestras:		186			265			822			613	
Intensidad:		_____			_____			_____			_____	

Figura 19: Primera parte de la encuesta de evaluación sensorial para selección de prototipo.

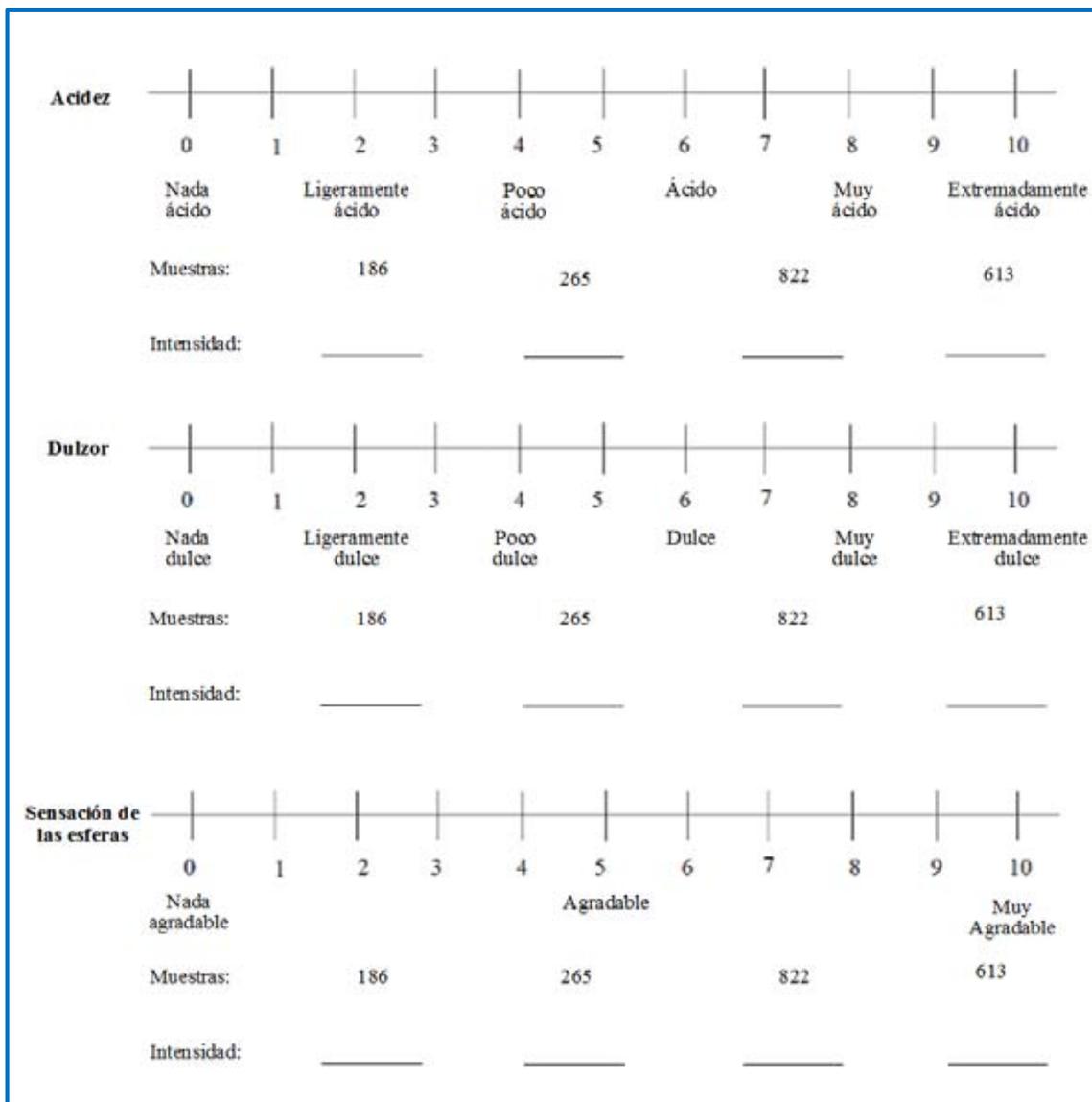


Figura 20: Segunda parte de la encuesta de evaluación sensorial para el prototipo.

2.3.5 Objetivo particular 4. Determinación y comparación de las propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas, del prototipo seleccionado.

2.3.5.1 Evaluación física, química y microbiológica del prototipo seleccionado.

El prototipo seleccionado se sometió a las pruebas químicas, fisicoquímicas y microbiológicas según lo establece la normatividad nacional e internacional, con base en la norma NOM-185-SSA1-2002 de productos lácteos fermentados y acidificados, así como en el numeral del CODEX STAN 243-2003, para leches fermentadas.

Cabe mencionar que las pruebas químicas y fisicoquímicas se realizaron por triplicado, a los resultados.

2.3.5.2 Evaluación química y fisicoquímica del prototipo seleccionado.

Se midieron pH, acidez, humedad, grasa, proteína, carbohidratos, fibra y cenizas, las metodologías empleadas y las normas correspondientes se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14: Métodos empleados para la determinación de la composición química y fisicoquímica.

Método:	Determinación:	Referencia:
Cajas de arena.	Humedad	NOM-116-SSA1-1994
Termobalanza.		Nollet 1996
Kennedy.	Fibra cruda	Lees 1982
Lane-Eynon.	Azúcares (ART y ARD)	NMX-F-312-1978
Micro-Kjeldahl.	Proteína	NMX-F-068-S-1980
Röse-Gottlieb.	Grasa	NMX-F-311-1977
Klemm.	Cenizas	NMX-F-066-S-1978

Refractómetro	°Brix	NMX-F-103-1982
pH metro	pH	NMX-F-317-S-1978
Volumétrico	Acidez	NMX-F-102-S-1978

2.3.5.3 Evaluación microbiológica del prototipo seleccionado.

Se realizó el análisis microbiológico para coliformes totales (NOM-113-SSA1-1994), *Staphylococcus aureus* (NOM-115-SSA1-1994) y *Salmonella spp* (NOM-114-SSA1-1994).

La concentración de microorganismos probióticos viables en el producto, se obtuvo mediante un conteo microbiológico por el método de diluciones y vaciado en placa, como se describió previamente (**Figura 18**).

2.3.6 Objetivo particular 5. Selección del envase, desarrollo de la etiqueta y determinación del precio del producto fermentado de avena.

2.3.6.1 Selección del envase y desarrollo de la etiqueta.

La selección del envase se realizó tomando en cuenta las especificaciones establecidas por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (2012) y la NOM-130-SSA1-1995, además de las características fisicoquímicas, químicas y sensoriales del producto, considerando de la misma manera el precio y la disponibilidad del recipiente.

El desarrollo de la etiqueta se llevó a cabo teniendo en cuenta los lineamientos establecidos en la NOM-051-SCFI-1994, NOM-086-SSA1-1994 y el apartado del CODEX para leches fermentadas (CODEX STAN 243-2003). En esta etiqueta se incluirán los datos principales del producto, su principal finalidad será la de brindarle al consumidor información acerca del mismo.

2.3.6.2 Determinación del costo unitario del producto.

Para determinar el precio del producto se consideraron los costos de la materia prima empleada para su elaboración, el precio del envase, así como la etiqueta y el margen de precios de la competencia, además del estudio de mercado **Figura 15** en el cual se planteó la pregunta del precio el cual se encontraría dispuesto a pagar el consumidor.

2.3.7 Objetivo particular 6. Determinación de la vida útil del producto fermentado de avena.

2.3.7.1 Diseño del estudio de vida útil.

Se realizó un diseño escalonado, elaborando un lote cada tercer día por un periodo de 21 días, para obtener finalmente 8 lotes, los cuales fueron almacenados en refrigeración a una temperatura de 4 ± 1 °C, el equipo empleado en esta actividad se muestra en el **Anexo 1**, la evaluación de las muestras se efectuó al finalizar el tiempo máximo de almacenamiento (21 días).

2.3.7.2 Determinación fisicoquímica, microbiológica y sensorial del tiempo de vida útil.

De acuerdo con Suárez (2013), Bamforth (2005) y la normatividad nacional e internacional (NOM-185-SSA1-2002 y CODEX STAN 243-2003), los descriptores críticos de deterioro del producto fermentado son: variación de pH (potenciómetro) y acidez (titulación ácido/base), porcentaje de sinéresis, calidad microbiológica y concentración final de microorganismos probióticos (conteo microbiológico por dilución).

Además de los análisis fisicoquímicos (pH y acidez) y microbiológicos (determinación de la concentración final de probióticos, eficiencia de encapsulación), correspondientes a las muestras de cada tiempo, se realizó una evaluación sensorial con una prueba de aceptación a 41 jueces semi-entrenados, los cuales se encargaron de calificar los atributos de apariencia, olor, sabor y acidez. Las propiedades elegidas son aquellas que por la naturaleza del producto, son las más susceptibles a sufrir un cambio significativo.

Los resultados obtenidos de cada uno de los descriptores fisicoquímicos, microbiológicos y físicos se graficaron con respecto al tiempo y se realizó un análisis de regresión, determinándose la vida útil del producto cuando este ya no cumplía con las especificaciones establecidas por las normas antes mencionadas.

Posteriormente para estimar la vida útil sensorial, se realizó un análisis de supervivencia empleando el paquete estadístico R y la función R `sslife` de Guillermo Hough (2010).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

3.1. Actividades preliminares.

3.1.1 Selección de la leche vegetal.

Tras efectuar las pruebas piloto de fermentación, estabilidad y apariencia física, con la leche de avena, amaranto y alpiste, se seleccionó la leche de avena, ya que resultó con las mejores características organolépticas de sabor, olor y apariencia, como se puede observar en el cuadro comparativo de la **Tabla 15**.

Tabla 15: Cuadro comparativo sobre las características organolépticas y de fermentación de las bebidas vegetales.

	Estabilidad, color, olor y sabor:	Prueba de fermentación y características:
Amaranto:	Buena estabilidad, dilución homogénea, color blanco, olor característico del amaranto, sabor ligero al cereal.	Buena capacidad de fermentación, se genera una separación de fases, el olor y aspecto desagradable.
Alpiste:	Nula estabilidad, ya que generaba precipitación del soluto, color blanco grisáceo, inodoro, sabor nulo.	Fermentación baja, ya que no se formaba coágulo, ni viscosidad, el producto tenía un olor desagradable.
Avena:	Baja estabilidad, ya que se forman dos fases en la dilución, color blanco con un ligero sobrenadante amarillo/café claro, olor y sabor ligero a avena.	A pesar de la separación de fases, se llevó a cabo la fermentación obteniendo un producto con características de sabor y olor aceptables.

Como se puede observar en la **Tabla 15**, a pesar de que la bebida de avena pierde estabilidad fácilmente, es ésta la que presenta mejores características organolépticas después del proceso de fermentación. Para disminuir la separación de fases ocasionada por la sedimentación del soluto (polvo), se tomó la decisión de elaborar la leche de avena, para lo cual se realizó un experimento variando las concentraciones de avena (4, 6 y 8 %) y estabilizante (0.3 y 0.5 %), en la **Tabla 16** se presenta el cuadro comparativo de los resultados obtenidos.

Tabla 16: Efecto de la concentración de goma y de avena en algunas características de la leche de avena elaborada.

% Concentración		°Brix:	% Acidez y pH:	Sabor y Color:	Consistencia/estabilidad:
Goma:	Avena:				
0.1	4.0	4.8	6.70 ± 0.2 de pH, 0.03 ± 0.01 de acidez.	Ligeramente a "avena", color blanco.	Ligera (casi agua), no existe separación de fases.
	6.0	6.7		Moderadamente a avena, color beige.	Moderada, existe ligera precipitación y una clara separación de fases.
	8.0	8.5		Sabor a avena, color blanco/café claro.	Sobrenadante color café oscuro y se forman 2 fase bien definidas.
0.3	4.0	4.9	6.76 ± 0.2 de pH, 0.02 ± 0.01 de acidez.	Sabor ligero a avena, color blanco/ amarillento.	Consistencia ligera, existe separación de fases al encontrarse en reposo.
	6.0	7.1		Sabor a avena, color crema.	Consistencia moderada (semi/espesa), sedimentación del soluto.
	8.0	8.7		Sabor a cereal, color blanco/crema.	Consistencia parecida a la leche, presenta sobrenadante café claro.
0.5	4.0	5.2	6.79 ± 0.2 de pH, 0.04 ± 0.01 de acidez.	Sabor ligero a avena, color blanco/ ligeramente café claro.	Consistencia ligera, precipitación baja, ligera coloración color café claro en la superficie.
	6.0	7.4		Sabor avena, color blanco/beige/café claro	Consistencia moderada, precipitación al fondo.
	8.0	9.1		Sabor avena, color blanco/beige.	Consistencia semi/espesa, parecida a la de la leche, nula precipitación y separación de fases.

De acuerdo con los resultados mostrados en la **Tabla 16** se concluyó usar las concentraciones de estabilizante de 0.5 % y de avena de 8 %.

3.1.2 Actividad preliminar 2. Análisis químico proximal y fisicoquímico de las materias primas.

Análisis de la leche de avena.

La **Tabla 17** se presentan los resultados obtenidos, además de la comparación con los datos publicados en ASA (2000).

Tabla 17: Parámetros físicos, fisicoquímicos y químicos de la leche de avena comparados con la leche de soya (* Cada prueba se realizó por triplicado, reportándose el promedio y el coeficiente de variación).

Parámetro:	Leche de soya:	Experimental*:	Coeficiente de variación:
ρ	1.022 g/ml	1.013 g/ml	3.2×10^{-4}

Parámetro:	Bibliografico¹:	Experimental*:	Coeficiente de variación:
Acidez	0.03	0.04	0.07
pH	6.97	6.79	0.12

Parámetro:	Bibliografico¹:	Experimental*:	Coeficiente de variación:
Humedad	92.1	92.5	8.4×10^{-4}
Carbohidratos	1.80	4.22	0.0
Grasa	1.90	0.44	0.0
Proteína	3.80	1.08	0.0
Fibra	0.01	0.64	0.0
Cenizas	0.39	0.92	0.467

Debido a que en el mercado no existe ningún producto comercial similar a esta bebida, se optó por realizar la comparación de los parámetros con la leche de soya, ya que esta es ampliamente consumida y cuenta con una gran aceptación en el mercado, teniendo en cuenta el origen de cada una de estas bebidas, la comparación realizada solo servirá para determinar si la leche de avena elaborada cuenta con la concentración mínima de sólidos y pH necesario para su fermentación.

La comparación de las propiedades físicas de estas leches nos permite tener un estimado de la concentración de sólidos presentes, los cuales sirven de referencia para llevar a cabo la estandarización del producto (Moreno, 1996), con los resultados obtenidos, podemos establecer que la variación de densidad es principalmente generada por la naturaleza de cada componente, ya que esta es una propiedad específica de cada especie (Alais, 2003), sin embargo, este parámetro es semejante para cada una de las bebidas, estableciendo de acuerdo con el estudio realizado por Castillo y González en 2006, que la bebida elaborada cuentan con un porcentaje de sólidos similar al de la leche de vaca, además de presentar características fisicoquímicas adecuadas para el desarrollo de las bacterias lácticas encargadas del proceso de fermentación.

Como ya se mencionó, debido a la naturaleza que presenta cada uno de los componentes principales de las bebidas vegetales, se puede observar que existe una variación significativa entre los parámetros químicos, principalmente entre la proteína y la grasa, cuyos valores son superiores para la leche de soya tratándose de una oleaginosa caracterizada por el alto contenido de aceites y materia grasa así como de proteína en su composición, a diferencia de la avena en la cual los principales componente son los carbohidratos en especial el almidón (Ospina, 2001), la sacarosa y la fibra.

A su vez los parámetros químicos nos permiten determinar el tipo de sólidos presentes en la bebida, de acuerdo con esta información podemos observar que la leche cuenta con un mayor porcentaje de carbohidratos, que son uno de los componentes más importantes para la fermentación siendo el sustrato para los microorganismos, sin embargo debido a que en su mayoría son almidones y estos no forman parte de los requerimientos energéticos de los microorganismos (Bamforth, 2005), para la elaboración del producto se requirió la adición de un azúcar simple que sirviera de sustrato para las bacterias lácticas. De igual manera la importancia de este componente es la de proveer características organolépticas agradables de sabor al producto atenuando la acidez (Tamime & Robinson, 1991), además de proporcionar una mejor consistencia.

Debido a que la concentración de proteína es baja, el cuerpo del producto podría verse afectado, sin embargo las proteínas que predominan en la composición de la avena son las globulinas, las cuales cuentan con la capacidad de desdoblarse y coagular al ser sometidas a un calentamiento, sin regresar a su estado natural al enfriarse (Moya *et al.*, 2002), característica por la cual proporcionan cuerpo al producto, disminuyen la sinéresis del mismo al aumentar la viscosidad.

La baja concentración de grasa brindan poca firmeza al producto tipo yogurt (Castillo & González, 2006), sin embargo proporciona una mayor funcionalidad, obteniendo de esta manera un producto bajo en grasa (Early, 1998).

Además de que la concentración de fibra que presenta le confiere características simbióticas ya que estudios recientes han demostrado que la fibra de avena permite el desarrollo de microorganismo probióticos (Angelov *et al.*, 2005).

Análisis de la pulpa de zarzamora.

Se efectuó el análisis físico, fisicoquímico y químico de la pulpa de zarzamora, para tener un estimado de los componentes que se adicionarían al producto final, al suministrarle la pulpa, los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 18**:

Tabla 18: Parámetros físicos, fisicoquímicos y químicos de la pulpa de zarzamora (* Cada prueba se realizó por triplicado, reportándose el promedio)

Parámetro:	Experimental*:	Coefficiente de variación:
° Brix	54.2	0.104

Parámetro:	Experimental*:	Coefficiente de variación:
Acidez	0.28	0.00

Parámetro:	Experimental*:	Coefficiente de variación:
Humedad	39.1	0.003
Carbohidratos	58.3	0.005

Fibra	1.16	0.012
Pectina	0.01	0.067
Cenizas	1.39	0.004

En las tablas presentadas se puede observar que los carbohidratos son el principal componente de la pulpa de zarzamora, condición que favorece las características organolépticas del producto ya que disminuye la acidez del mismo y mejora su sabor, incrementando su aceptación (Bamforth, 2005). Sin embargo, se debe tener en cuenta que las concentraciones de azúcar mayores a 7 % (p/v), modifican la presión osmótica y reducen la a_w pudiendo ejercer un efecto inhibitorio sobre los microorganismos probióticos presentes (Early, 1998), además de incrementar la concentración final de carbohidratos, restando funcionalidad al producto.

3.1.3 Actividad preliminar 3: Selección, activación, aislamiento e identificación de la cepa liofilizada y el microorganismo probiótico.

- *Activación del cultivo láctico liofilizado (cultivo iniciador):*

Se obtuvo un recuento de 1.4×10^7 UFC/ml del cultivo láctico liofilizado, identificándose además tres cepas con características morfológicas diferentes, como se muestra en la **Figura 21**.

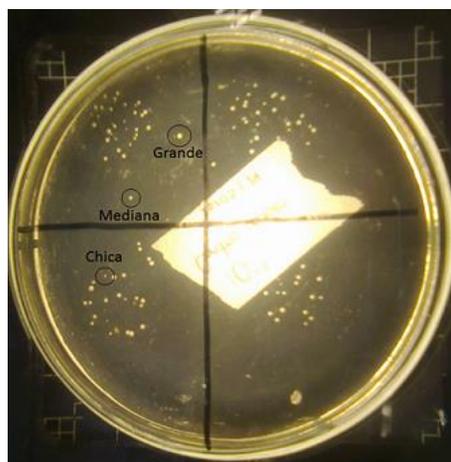


Figura 21: Colonias encontradas en el cultivo iniciador dilución 10^{-4}

Las colonias que contaban con diferentes tamaños (chica, mediana y grande), se sometieron a una identificación morfológica a través de una tinción Gram, identificándose dos colonias conformadas por dos diferentes bacilos y un coco, con características Gram positivas, en la **Figura 22** se pueden apreciar las diferentes morfologías.



Figura 22: Identificación morfológica de las variaciones de colonias presentes en el cultivo iniciador, de izquierda a derecha se puede observar en la primera imagen un lactobacilo largo y delgado, seguido por un lactobacilo corto y finalmente un coco.

La purificación de las cepas se realizó mediante una siembra consecutivamente por estría cruzada en agar láctico hasta que se observó el crecimiento de colonias de tamaño y características homogéneas.

- **Identificación bioquímica y morfológica *L. bulgaricus*:**

De las tres cepas presentes en el cultivo láctico liofilizado se identificó la presencia del *L. bulgaricus* el cual como ya se mencionó es un bacilo largo delgado (**Figura 23**), Gram positivo, catalasa negativo.



Figura 23: Morfología del *L. bulgaricus*.

Los resultados de las pruebas bioquímicas para este microorganismo se presentan en la **Tabla 19**, en la cual se puede observar que existe una coincidencia al 100 % entre los resultados obtenidos experimentalmente y los presentados por Cowan y Steel's, corroborando que la bacteria aislada correspondía al *L. bulgaricus*, e igualmente confirmando la presencia de *Lc. thermophilus*, teniendo en cuenta su previa identificación morfológica y el proceso de simbiosis cooperativa que se presenta entre ambos microorganismos.

Tabla 19: Resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas realizadas al *L. bulgaricus* del cultivo liofilizado, parámetros empleados de COWAN and STEEL'S.

Azúcar:	Identificación bioquímica del <i>Lactobacillus</i> , por COWAN:	Experimental:
	<i>L. bulgaricus</i> :	
Arabinosa	-	-
Celobiosa	-	-
Galactosa	+	+
Glucosa	+	+
Lactosa	+	+
Maltosa	-	-
Manitol	-	-
Mannosa	-	-
Melecitosa	-	-
Melobiosa	-	-
Salicin	-	-
Sorbitol	-	-
Sucrosa	-	-
Xilosa	-	-
Esculina	-	-
Trehalosa	+	+

Los símbolos usados son: + =positivo a la reacción por 90 % o más para algunas cepas; d = algunas cepas +, otras - (cerca del 89-11 % positivo); - = reacción negativa para la mayoría de las cepas (90 % o más); ()= reacción retrasada; w= reacción débil; #= reacción débil, lenta o negativa.



Figura 24: Pruebas bioquímicas realizadas al *L. bulgaricus*.

- Activación del microorganismo probiótico:

El conteo del número de microorganismos viables presentes en el cultivo puro de *L. casei* fue: 8.75×10^9 UFC/ml.

- Identificación bioquímica y morfológica del *L. casei*:

Las colonias aisladas en medio MRS (rogosa) para esta cepa, fueron redondas, blancas, cremosas y pequeñas, crecimiento característico para el *L. casei* en ese medio de acuerdo a Yuki *et al.*, (1999).

En el microscopio se observaron bacilos en cadena Gram positivos, los cuales resultaron negativos para la prueba catalasa es decir que no poseen la enzima que hidroliza el peróxido de hidrogeno (Madigan, 1999).

A continuación en la **Tabla 20** se presentan los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas realizadas al microorganismo probiótico en las cuales se puede observar que existe un 93 % de coincidencia entre la referencia bibliográfica y los resultados experimentales, concluyendo de esta manera en la confirmación de que la bacteria aislada corresponde a la especie de *Lactobacillus casei*, de acuerdo con el sistema miniaturizado API en el cual se establece que el porcentaje de coincidencia se debe ser mayor o igual al 80 %.

Tabla 20: Resultados obtenidos de la prueba bioquímica para el microorganismo probiótico, parámetros empleados de COWAN and STEEL'S.

Azúcar:	Identificación bioquímica del <i>L. casei</i> , por COWAN:	Experimental:
Arabinosa	-	+
Celobiosa	+	+
Galactosa	+	+
Glucosa	+	+
Lactosa	*	+
Maltosa	d	+
Manitol	+	+
Mannosa	+	+
Melecitosa	+	+
Melobiosa	-	-
Salicin	+	+
Sorbitol	+	+
Sucrosa	d	+
Xilosa	-	+
Esculina	+	+
Trehalosa	+	+

Los símbolos usados son: + =positivo a la reacción por 90 % o más para algunas cepas; d = algunas cepas +, otras – (cerca del 89-11 % positivo); – = reacción negativa para la mayoría de las cepas (90 % o más); ()= reacción retrasada; w= reacción débil; #= reacción débil, lenta o negativa.



Figura 25: Pruebas bioquímicas realizadas al microorganismo probiótico.

3.2 Objetivo particular 1. Desarrollo del estudio de mercado e identificación del mercado meta.

3.2.1. Estudio de mercado.

El estudio de mercado se realizó a 40 personas de ambos sexos, de entre 15 y 50 años de edad, estudiantes y trabajadores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y de la Escuela Preparatoria Oficial No. 272 «Tepojaco».

Ya que el producto fermentado a desarrollar va enfocado a servir tanto como alimento funcional y suplemento alimenticio para aquellas personas que presentan deficiencias nutricionales por falta de tiempo o malos hábitos, se les preguntó a los encuestados cuánto tiempo invierten en el desayuno, obteniéndose que el 22 % de los encuestados no tienen tiempo de desayunar y el 45 % solo toman 15 minutos de su tiempo para ingerir algo como desayuno (**Figura 26, izquierda**).

Basándonos en la naturaleza del producto a desarrollar el cual destaca por tener características similares a las de un derivado lácteo, se les preguntó a los encuestados si consumían algún producto con estas características y cuál era el de su preferencia, verificándose que la gran mayoría de la población consume productos lácteos (**Figura 26, derecha**) y el de mayor preferencia es el yogurt.

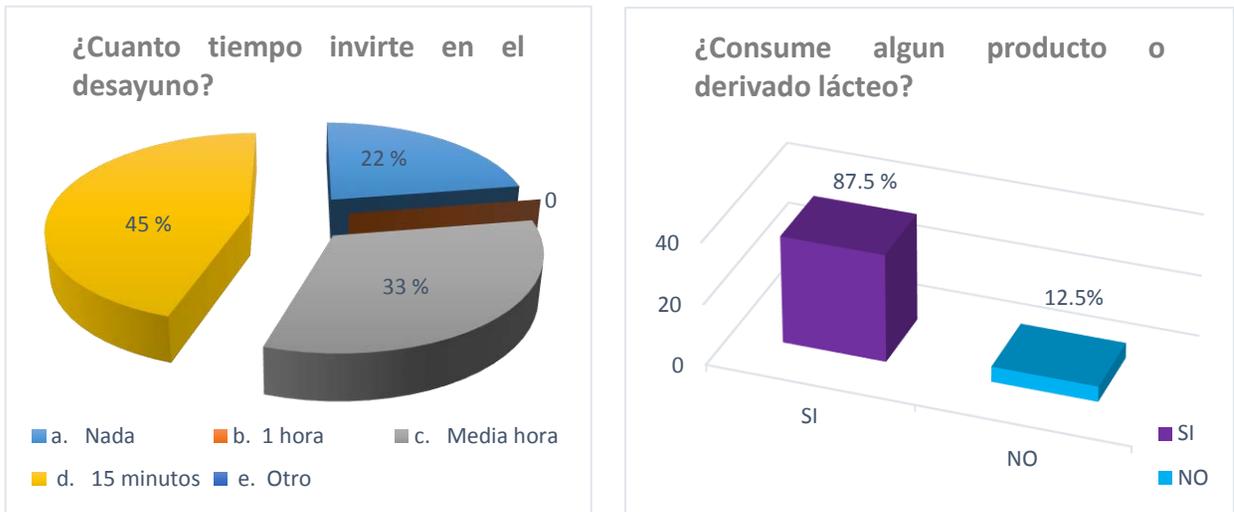


Figura 27: Tiempo empleado por los encuestados en desayunar (gráfico de la izquierda) y porcentaje de consumo de productos o derivados lácteos (gráfico de la derecha).

Con respecto a la frecuencia de consumo de los productos lácteos, resultó que el 40 % de los entrevistados que consumen algún derivado lácteo lo hacen al menos una vez por semana (Figura 27).

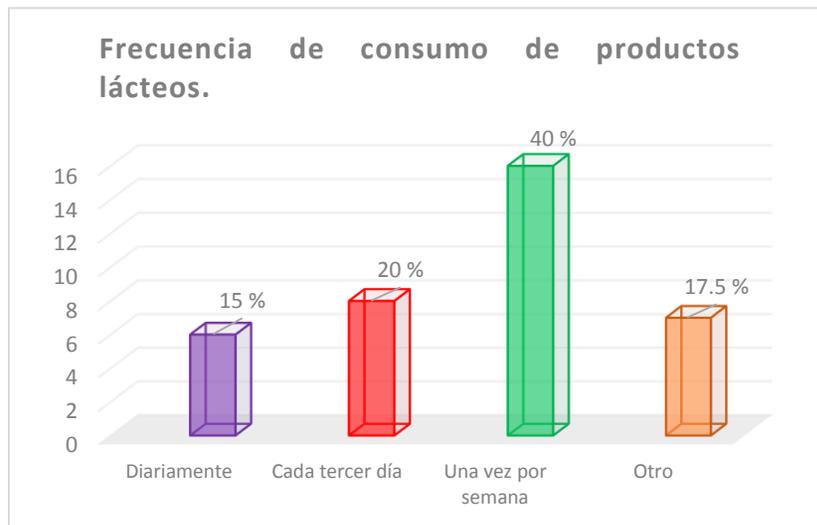


Figura 26: Frecuencia de consumo de los derivados lácteos.

Para establecer la frecuencia de consumo de las bebidas vegetales, se les cuestionó a los entrevistados si conocían y/o consumían las leches vegetales, identificándose de esta manera que el 50 % de la población entrevistada tiene conocimientos acerca de las bebidas vegetales pero no las consume (Figura, 28), esto se debe principalmente a la poca oferta de estos productos en el mercado y de igual manera a los precios que se manejan.

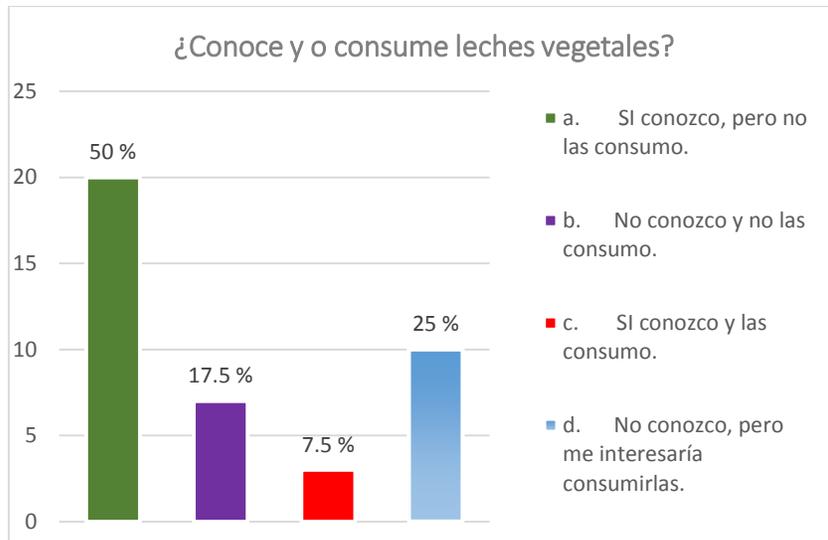


Figura 28: Conocimiento y/o consumo de leches vegetales.

Con el fin de evaluar que tan conocidos son los alimentos funcionales por la población y, a su vez, detectar si el consumo del producto dependería de ésta propiedad, se les cuestionó a los entrevistados si conocían que es un alimento funcional obteniéndose que el 65 % de la población desconocen las cualidades de un alimento funcional (Figura 29), y por lo tanto, la mayoría de la población no es consciente de las propiedades funcionales que ofrecen las leches vegetales (Figura 30).

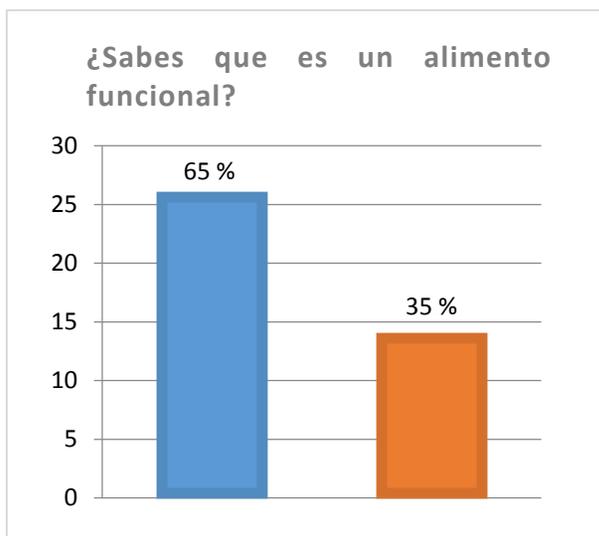


Figura 30: Porcentaje de población que tiene conocimientos acerca de los alimentos funcionales.

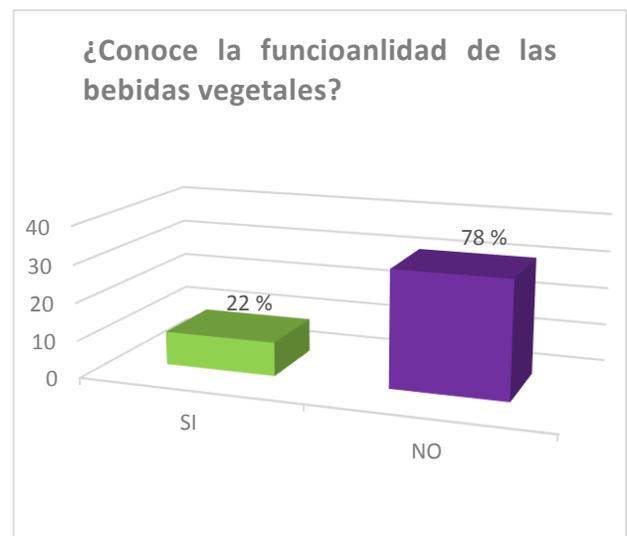


Figura 29: Porcentaje de la población que tiene conocimientos acerca de la funcionalidad de las bebidas vegetales.

Debido a que el 77.5 % de la población muestral desconocen las propiedades funcionales de las leches vegetales, se les describieron las propiedades de estas bebidas y se les preguntó que si en base a su nuevo conocimiento les interesaría consumir un producto fermentado funcional elaborado con leche vegetal y, en dado caso de que si les interesara, cuál de los derivadoslácteos mencionados (yogurt, flan, natilla o mouse) preferirían, obteniéndose que el 92.5 % de los encuestados si consumirían un producto de este estilo (**Figura 31**) y la presentación que preferirían en un 74 % sería en forma de yogurt (**Figura 32**).

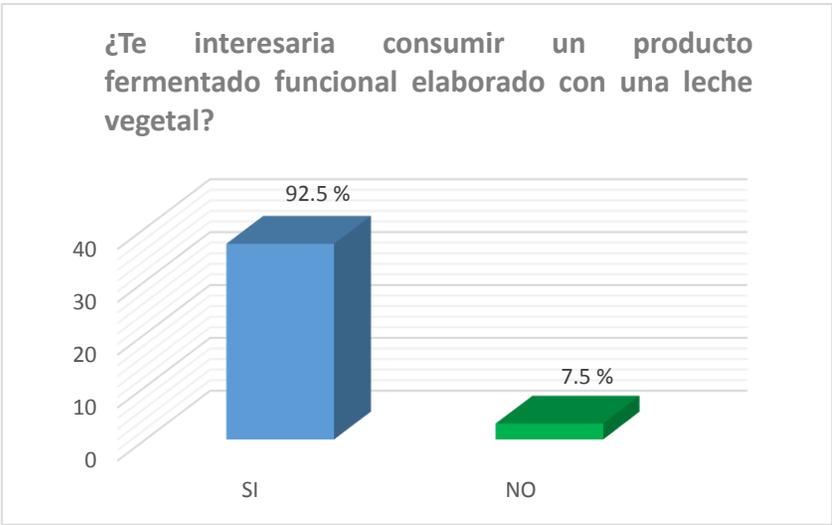


Figura 31: Interés en el consumo de un producto formulado con leche vegetal.

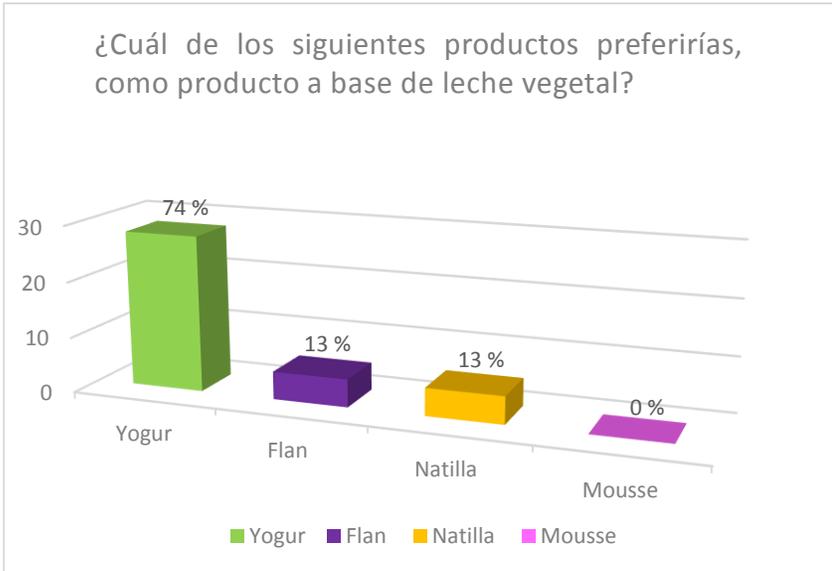


Figura 32: Presentación preferida para el producto fermentado funcional.

Para determinar el sabor del producto a desarrollar e identificar si sería adquirido por los consumidores, se realizaron las siguientes preguntas, en las cuales se obtuvo que el 95 % de los encuestados se encontrarían dispuestos a comprar el producto (**Figura 33**) y que el sabor de preferencia para el mismo según el 51 % debería ser zarzamora (**Figura 34**).

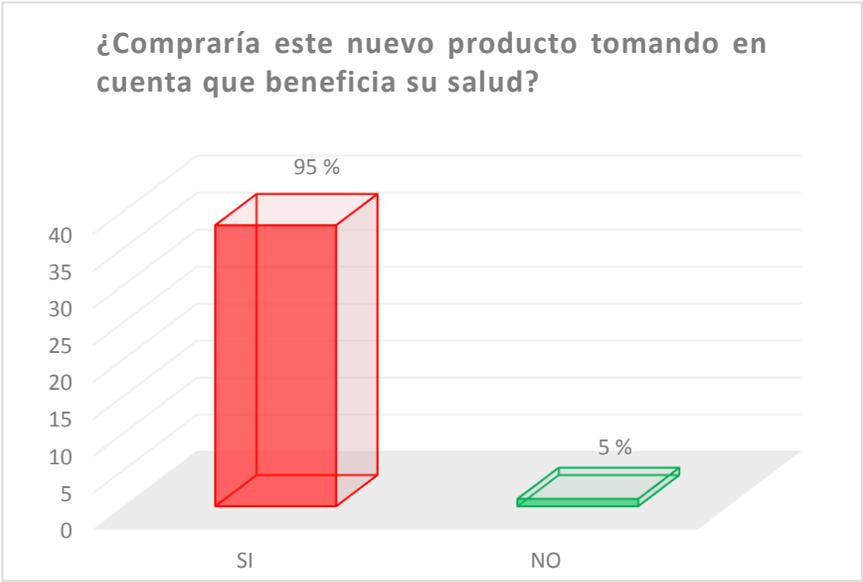


Figura 343: Porcentaje de preferencia de consumo del producto.

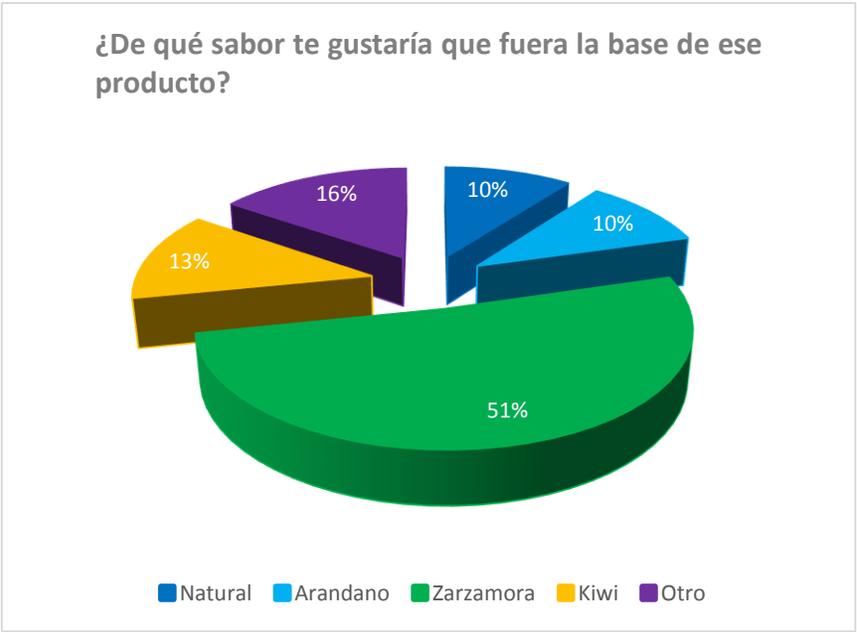


Figura 334: Sabor de preferencia para el producto.

Finalmente, se les preguntó a los encuestados que, en base a las propiedades que observan que tendría el producto a desarrollar, cuánto sería el precio que estarían dispuestos a pagar por una presentación de 200 g, esto con el fin de poder establecer un rango en el costo de las materias primas a emplear en la elaboración de este producto, a lo cual, el 60 % de los encuestados respondió que el precio que ellos pagarían ésta en el rango de entre 6 a 10 pesos (**Figura 35**).

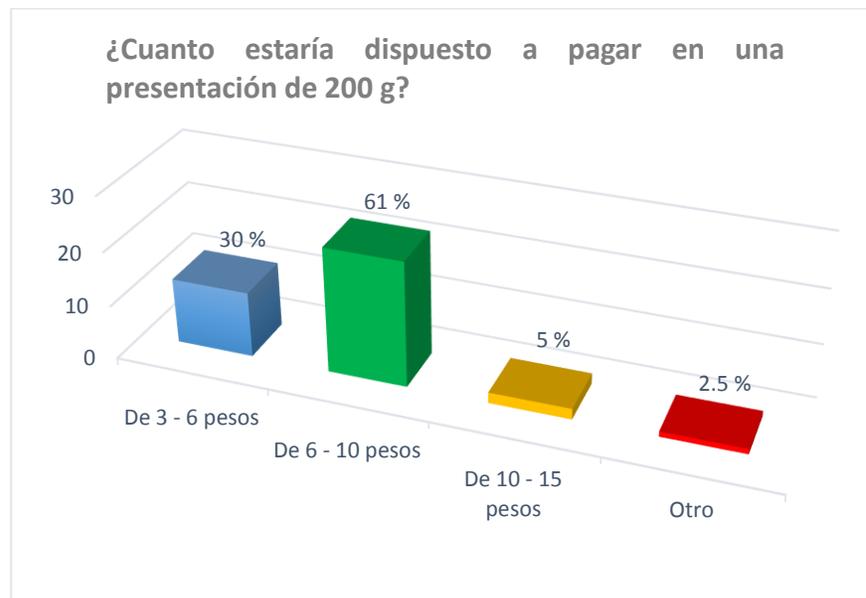


Figura 35: Posible precio a pagar por el producto fermentado funcional tipo yogurt.

3.3 Objetivo particular 2. Encapsulación del microorganismo probiótico y de la pulpa de zarzamora.

3.3.1 Obtención de la masa celular del *L. casei* para la encapsulación.

La concentración final de probiótico fue de: 8.75×10^9 UFC/ml, parámetro que permitió establecer una estimación de la concentración inicial de células inoculadas en el alginato.

3.3.2 Encapsulamiento del microorganismo probiótico (*L. casei*), determinación del diámetro medio.

Con la técnica de encapsulación por extrusión se obtuvieron cápsulas con características de un gel de forma esférica, con diámetro promedio de 2 mm (**Figura 36**), coincidiendo con el estudio realizado por Muthukumarasamy y col. en 2006, quienes instituyeron que el tamaño de las cápsulas elaboradas con alginato debe encontrarse en un intervalo de 2 a 3 mm de diámetro.

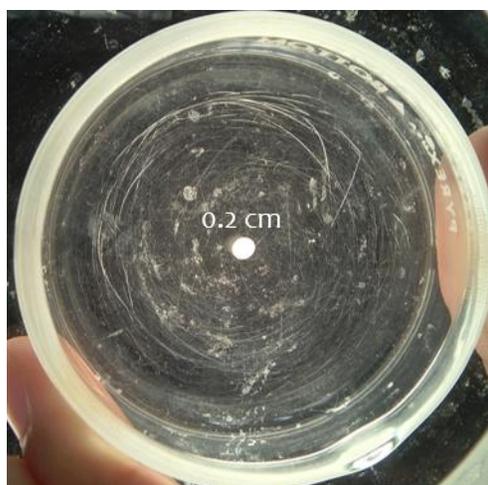


Figura 36: Cápsula de *L. casei*, elaborada con alginato con diámetro promedio de 2 mm.

A nivel de viabilidad las cápsulas estudiadas por Muthukumarasamy, son capaces de proteger al *Lactobacillus reuter*, asumiendo de esta manera que las cápsulas elaboradas exhiben este mismo comportamiento al presentar una diámetro mayor a 40 μm , parámetro señalado como óptimo para la sobrevivencia de microorganismos encapsulados con alginato (Krasaekoopt *et al.*, 2004). Por otro lado, el tamaño de partícula al ser mayor que el límite establecido (150 μm), puede generar un efecto negativo en las propiedades sensoriales del producto.

3.3.3 Determinación de la concentración de microorganismo probiótico encapsulado.

La concentración de células viables por cápsula se determinó nuevamente empleando el método de Miles Misra, recurriendo a la liberación del material activo mediante la fractura generada por la aplicación de presión y fricción (Pérez *et al.*, 2013), obteniendo como

resultado 7.5×10^9 UFC/g, concentración que se encuentra 2 ciclos logarítmicos por arriba del resultado obtenido en las investigaciones de Paniagua (9.8×10^7 UFC/g) y López (1.3×10^7 UFC/g), esta variación puede atribuirse a la concentración inicial de microorganismo empleada para la elaboración de las cápsulas e igualmente verse influenciada por la técnica de liberación aplicada.

La evaluación de la concentración de microorganismos encapsulados permitió determinar que para considerar al producto funcional se deberían adicionar 60 cápsulas, las cuales corresponden a 1 gramo.



Figura 37: Cápsulas de microorganismos probióticos elaboradas con alginato.

3.3.4 Análisis de perfil de textura de las cápsulas de probiótico.

Las propiedades texturales para las microcápsulas de *L. casei*, se evaluaron mediante un análisis de perfil de textura, a continuación se presentan en los resultados obtenidos:

Tabla 21: Datos obtenidos del análisis de textura de las cápsulas de *L. casei* elaboradas con alginato al 1.5 % (* pruebas realizadas por triplicado, reportando los promedios).

*ATP de cápsulas de <i>L. casei</i>.					
	Dureza (kgf):	Cohesividad:	Elasticidad (mm):	Masticabilidad (kgf.mm):	Adhesividad (kgf.mm):
Elaboradas	0.8600	0.5928	4.3420	0.0108	0.0085
Referencia	0.1127	1.144	-----	0.0147	-----

Referencia: Paniagua & Romero., (2013).

Con estos parámetros (**Tabla 21**) se determinó que las cápsulas, presentaban una dureza inferior a la reportada por Paniagua y colaboradores (2013) a pesar de exhibir las mismas condiciones de elaboración en cuanto a concentración de alginato (1.5 %) y cloruro de calcio (0.5 M), esta variación se ve influenciada por el tiempo de inmersión de las cápsulas en la solución de cloruro de calcio, ya que durante una exposición más prolongada, existe una consolidación más fuerte de los enlaces intermoleculares, relación que depende de la difusión de los iones a través de la membrana (Martín, 2009).

Igualmente se estipuló que la variación existente entre la dureza de las cápsulas era proporcional a la concentración de microorganismo, observando un aumento o disminución de este valor al igual que de la elasticidad, fenómeno generado por la interferencia de los probióticos, los cuales actúan como barrera al impedir la inmediata interacción entre los enlaces.

Con respecto a la cohesividad se estableció que las cápsulas al poseer poca dureza tendían a ser menos cohesiva y por lo tanto más elásticas, requiriendo de una menor fuerza para reducir su consistencia al momento de ser ingeridas, valor que se vio expuesto en el parámetro de masticabilidad el cual fue inferior para las cápsulas en estudio.

De igual manera se observó que la adhesividad que presentaban las cápsulas de alginato y probiótico era nula, característica impartida por su estructura de gel que contaba con una forma esférica la cual se encontraba definida por paredes lisas libres de adherencia.

3.3.4 Determinación de la eficiencia de la encapsulación y de la sobrevivencia del *L. casei*.

La eficiencia obtenida para las cápsulas de *L. casei* fue de 94.52 %, coincidiendo con los estudios elaborados por diversos autores, los cuales han demostrado que los probióticos microencapsulados con alginato, ven incrementada su supervivencia hasta en un 80 y 95 %, frente a los no encapsulados (Martín, 2009).

Demostrando de esta manera que las microcápsulas elaboradas cuentan con las características estructurales adecuadas para lograr la protección del microorganismo probiótico, favoreciendo su supervivencia al resguardarlo de factores externos que afectan

su viabilidad; mejorando el sabor, aroma, estabilidad, apariencia y funcionalidad del producto, al favorecer la conservación de la concentración mínima necesaria del probiótico para alcanzar sus ventajas terapéuticas. Beneficiando la aceptación de los consumidores hacia el mismo, además de incrementar su valor nutricional.

3.4 Objetivo particular 3. Desarrollo y selección de los prototipos del producto fermentado de avena.

3.4.1 Determinación experimental de las condiciones de fermentación de la bebida de avena.

Aunque la bebida de avena exhibía características adecuadas para su fermentación, en las normas se establecen los requerimientos mínimos del contenido de sólidos no grasos, materia grasa y sólidos totales (Early, 1998), instituyendo proporciones variables de cada componente que dependen del tipo de yogurt a desarrollar.

Para cumplir con los estándares establecidos por la normatividad y favorecer la textura del producto, se llevó a cabo la fortificación de la bebida de avena, adicionando leche en polvo desnatada (Svelty), con la finalidad de aumentar su contenido de sólidos no grasos (Tamime & Robinson, 1991), los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 22**, con respecto a estos, se definió que la concentración a emplear para realizar la estandarización de la bebida correspondía al 8 %, alcanzando así un porcentaje mayor al 8.5 % de sólidos no grasos, límite señalado para la elaboración de un yogurt según la norma expedida por el CODEX para bebidas fermentadas (CODEX Alimentarius, 2003).

El resultado de la consistencia que corresponde al valor señalado de sólidos (880.3 cp.), se encuentra por encima del establecido para un yogurt bebible comercial* (450 a 500 cp.), la diferencia de este atributo se atribuye a la interacción de las globulinas presentes en la composición de la avena, las cuales se desnaturalizan con el calor y brindan una mayor viscosidad al producto, característica que para muchos consumidores resulta no atractiva, en este caso presenta una ventaja tecnológica, ya que permite el aumento de la viscosidad y de esta manera mejora la consistencia final del producto sin la necesidad de emplear estabilizantes.

Tabla 22: Resultados de consistencia obtenidos para los prototipos (* valor determinado a un yogurt comercial).

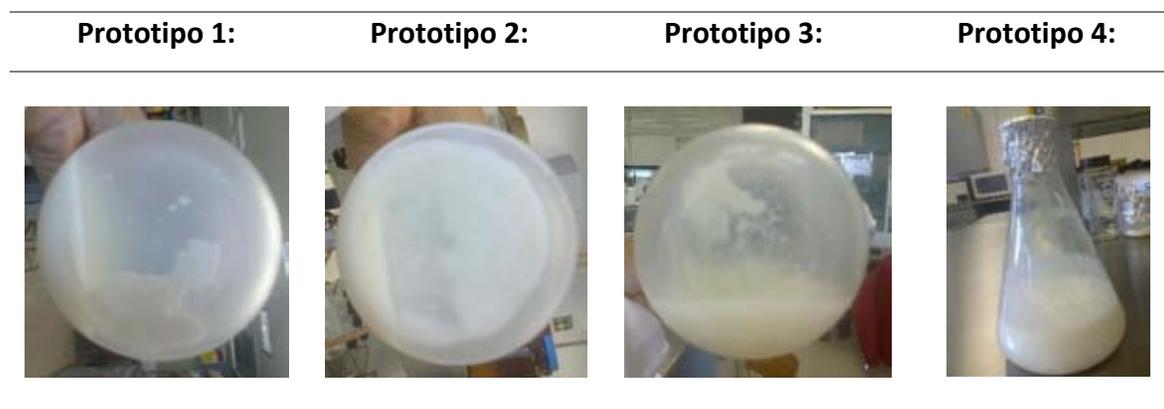
% de leche en polvo desnatada:	Temperatura (°C):	Consistencia (cp):
4 %	10	164.5
6 %	10	328.4
8 %	10	880.3
12 %*	10	500 ± 50

Una vez establecida la concentración de sólidos para la estandarización de la bebida, se realizó un experimento, para determinar las mejores condiciones de fermentación, los factores de variación y resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 23**.

Tabla 23: Determinación de concentración de glucosa e inóculo, para estandarizar el proceso.

No. de prototipo:	% de glucosa:	% de inóculo:	Sabor y acidez:	Formación de coágulo:
1	0.5 %	3.0 %	Sabor ácido.	Mínima, formación de coágulo, con formación de grumos pequeños, consistencia semilíquida.
2	2.0 %	3.0 %	Sabor ácido.	Ligera formación de coágulo, con grumo uniforme en fondo, presenta consistencia semisólida.
3	0.5 %	5.0 %	Ligero sabor ácido.	Sin coágulo, ligera formación de grumos, leche de consistencia viscosa.
4	2.0 %	5.0 %	Sabor ácido, con presencia de aroma a fermentado.	Coágulo estable, con ligera formación de grumos, consistencia semisólida.

Tabla 24: Representación gráfica de los prototipos obtenidos con el diseño factorial para obtener las condiciones óptimas de fermentación.



Las variables más relevantes en el proceso de fermentación son: el tipo y cantidad de cultivo iniciador, las características fisicoquímicas de la leche y la temperatura (Rodríguez *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta esto y considerando la naturaleza de la bebida de avena, se realizó la adición de un azúcar simple que favoreciera la fermentación, observándose con los resultados obtenidos (**Tabla 23**), que a mayor concentración de glucosa (2 %), se lograba reducir el tiempo del proceso, obteniéndose a la par un producto que cumplía con las características fisicoquímicas especificadas por las normas.

Definiendo igualmente que a pesar de que la concentración de microorganismo es un factor clave en el desarrollo de la transformación biotecnológica, este se ve afectado directamente por los nutrientes, los cuales son los elementos que favorecen su desarrollo (Suarez *et al.*, 2013), como se observa en la **Tabla 23**, en la cual se aprecia que a pesar de que el prototipo 2 cuenta con una concentración más baja de inóculo con respecto al 4, los dos exhiben rasgos similares, a diferencia del prototipo 3, el cual carece de las características requeridas para la elaboración del producto, aunque presenta una alta concentración de inóculo (5 %), este comportamiento puede atribuirse a la baja disponibilidad de nutrientes en el medio.

De esta manera se especificó, que el porcentaje de glucosa e inculo a emplear para optimizar el proceso de fermentación de la bebida de avena era de: 2 % y 5 %, respectivamente.

En las gráficas de las **Figuras, 38 y 39**, se presenta el comportamiento de acidificación y descenso de pH durante el proceso de fermentación.

Estas gráficas, permitieron establecer el porcentaje de acidez y pH experimental de la bebida a las condiciones antes citadas, en el periodo de tiempo establecido (6 h), mostrando que el producto alcanza una acidez de 0.8 % de ácido láctico y pH de 3.8, valores que se encuentran dentro de los establecidos por la NOM-185-SSA1-2002. Otros autores como Bamforth (2005) reportaron que en yogures mexicanos se habían encontrado valores de acidez de entre 1.12 y 2.06 % de ácido láctico y de pH entre 3.95 y 4.7, datos que corresponden a los señalados por el CODEX (2003), en el cual se establece que la variación de acidez para un yogurt debe ser de 0.8 a 1.4 % y el pH de 3.7 a 4.6.

Es imperativo mencionar que los valores de pH y acidez obtenidos durante este proceso se verán contrarrestados por la adición de la pulpa y el edulcorante (Early, 1998).

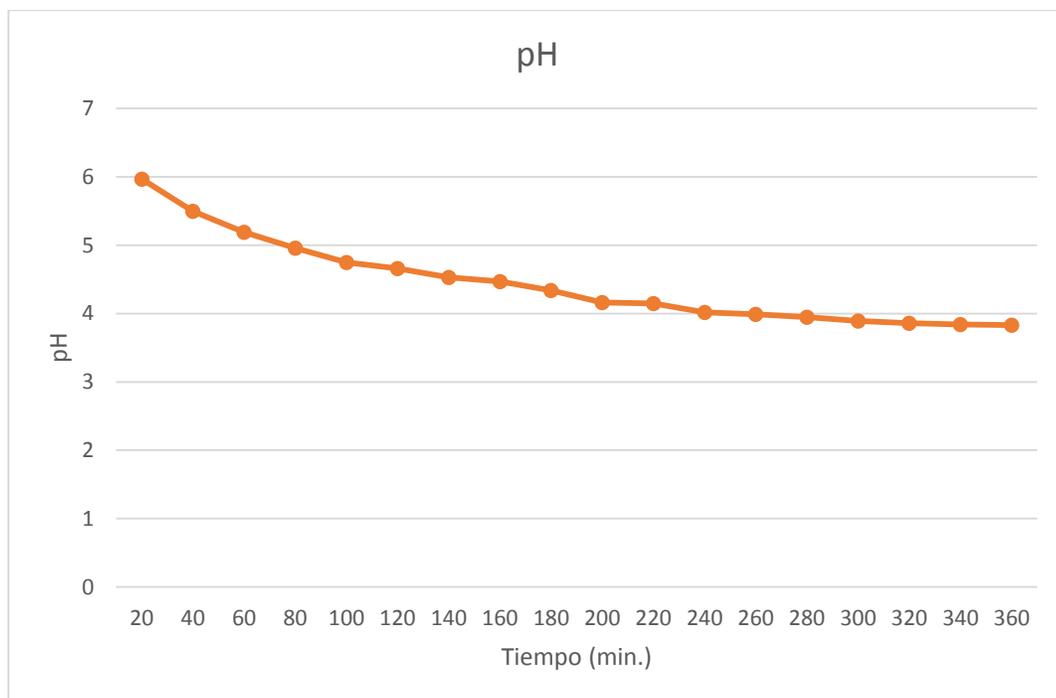


Figura 38: Curva de descenso de pH.

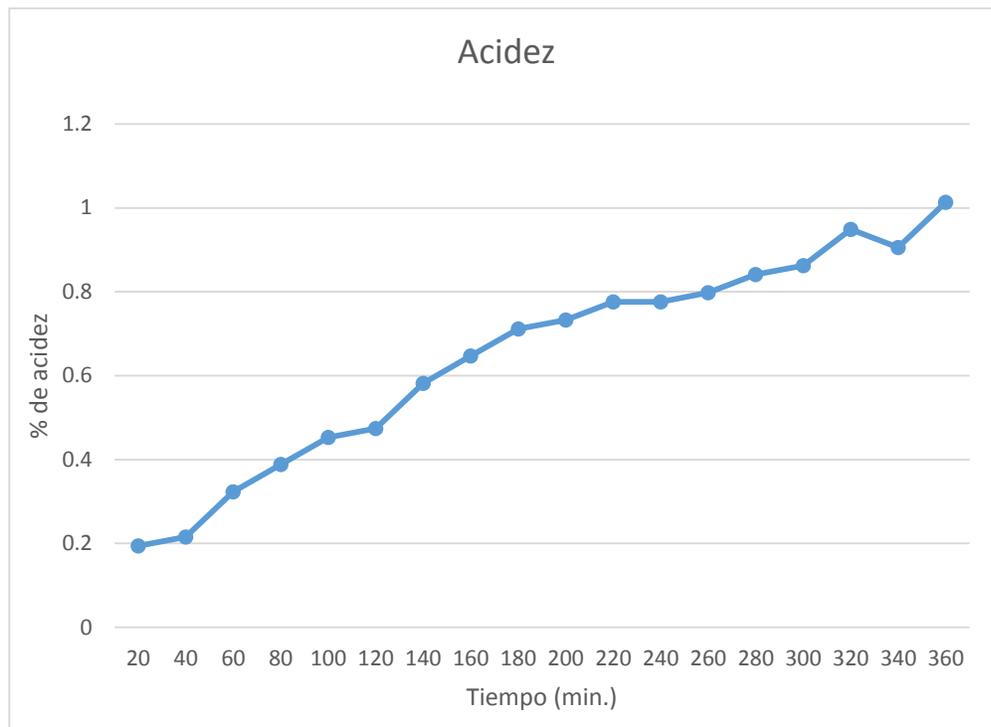


Figura 39: Curva de acidificación.

Posteriormente al acondicionamiento experimental de la bebida de avena y la determinación de las condiciones óptimas de fermentación, se planteó el diagrama de proceso el cual se presenta en la **Figura 40**.

3.4.2 Descripción del diagrama de proceso para la elaboración del producto fermentado tipo yogurt a base de leche de avena.

Estandarización: La fortificación de la bebida de avena, consistió en aumentar su contenido de sólidos no grasos (Early, 1998), adicionando 8 % de leche en polvo, con el fin de mejorar la consistencia del yogurt y disminuir la tendencia a la sinéresis (Varman, 1995). Además en esta etapa también se agregó la glucosa (2 %), cuya función en el producto es la de servir como sustrato para las bacterias lácticas durante el proceso de fermentación.

Homogenización: La finalidad de homogeneizar es incorporar todos los componentes, previamente adicionados, además de reducir el tamaño de los glóbulos grasos, mejorando la textura, disminuyendo la tendencia a la sinéresis y la formación de nódulos (Varman, 1995),

esta operación se realiza por un periodo de tiempo de 2 minutos a una velocidad de 700 rpm, posteriormente se deja reposar el preparado durante 1 hora, para permitir el asentamiento de la mezcla y la eliminación de aire adicionado mediante la agitación.

Fermentación: Se inocula la mezcla con una concentración de 5 % de un cultivo láctico constituido por *L. bulgaricus*, *Lc. thermophilus* y *L. lactis*, consecutivamente la leche se incuba a 42 °C por un periodo de 6 horas, hasta la obtención de una acidez de 1 % y un pH de 3.8.

Enfriamiento: Al finalizar el periodo de fermentación, la bebida se somete a una disminución de la temperatura, hasta los 15 °C, el propósito de este choque térmico es el de disminuir la actividad de las bacterias lácticas y mantener las propiedades reológicas del producto (Early, 1998).

Batido: Esta operación consiste en la rotura del coágulo, su principal propósito es la obtención de un gel homogéneo, además de permitir la incorporación de la stevia (4 %) y la pulpa de zarzamora (15 %), la agitación generada durante esta acción también muestra un efecto inhibitorio sobre la actividad del cultivo, al reduciendo la producción de ácido láctico.

Envasado: En esta etapa el producto fermentado es vertido junto con la concentración de cápsulas de probiótico y pulpa de zarzamora en recipientes de polietileno de alta densidad (HDPL).

Almacenamiento refrigerado: El producto fermentado se conserva en refrigeración a una temperatura de 4 °C, con el fin de conservar sus propiedades organolépticas y nutricionales, hasta su consumo.

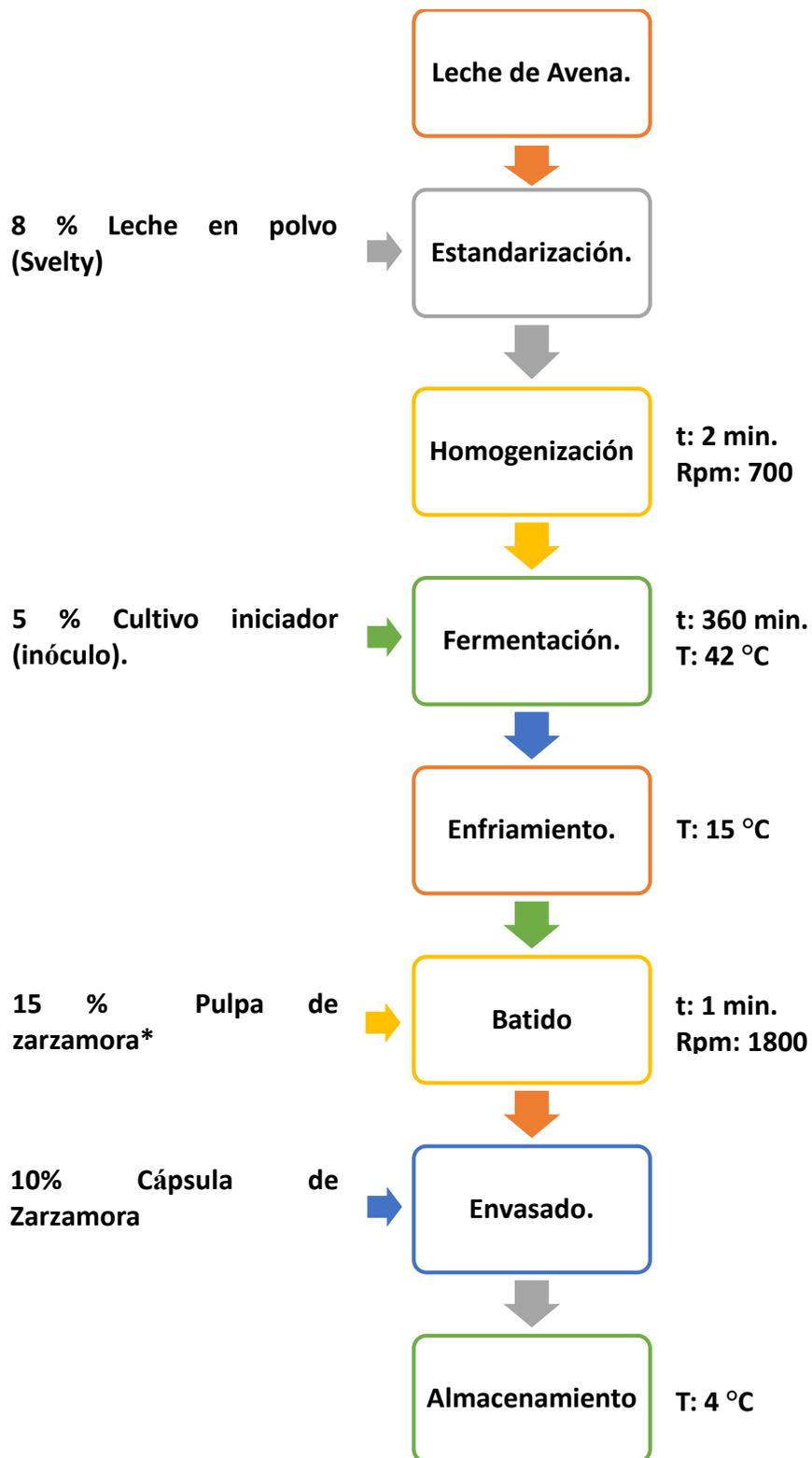


Figura 40: Diagrama de proceso para la elaboración del producto fermentado funcional (* parámetros establecidos por medio de la evaluación sensorial).

3.4.3 Evaluación sensorial de los prototipos.

Los resultados de la evaluación sensorial se presentan en la gráfica radial de las medianas obtenidas de cada atributo y de cada prototipo (**Figura 41**).

En ésta gráfica se puede observar que los atributos que presentan mayor diferencia entre prototipo son la apariencia, sabor, acidez y dulzor.

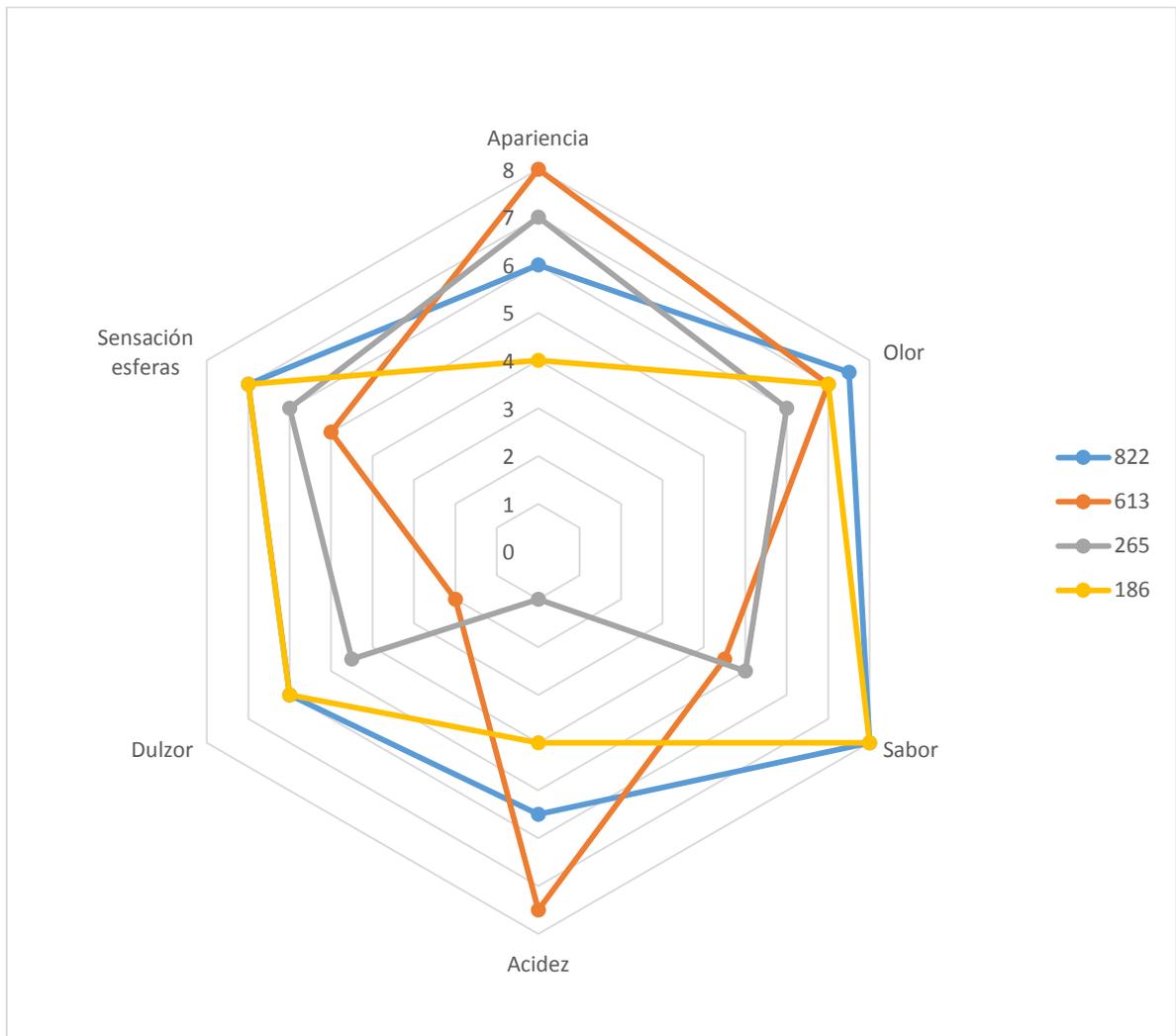


Figura 41: Gráfico radial de las medianas de los atributos evaluados para cada prototipo.

En la **Tabla 25** y en el **Anexo 4**, se muestran los resultados del análisis de varianza en la que observamos los efectos significativos que describimos a continuación.

Tabla 25: Resultados del análisis de varianza.

Efecto:	Valor p:					
	Apariencia	Olor	Sabor	Acidez	Dulzor	Sensación de esferas:
Proporción/edulcorante:	0.24	0.59	0.49	3.1×10^{-6}	0.01	0.73
Proporción/pulpa:	5.06×10^{-6}	0.02	4.4×10^{-10}	0.81	2.2×10^{-10}	5×10^{-3}
Interacción pulpa/edulcorante:	0.008	0.20	0.38	2.2×10^{-16}	7.9×10^{-5}	0.19

La mejor apariencia se obtuvo en los prototipos que no contenía pulpa disuelta (($p < 0.05$), **Figura 42**).

El resultado obtenido para este atributo, se encuentra influenciado por la degradación de color que presenta la pulpa al encontrarse en un medio ácido, comportamiento que es atribuido a la concentración de los iones H^+ presentes, los cuales disminuyen la estabilidad de los pigmentos generando una reducción gradual de la coloración (Valencia & Guevará, 2013).

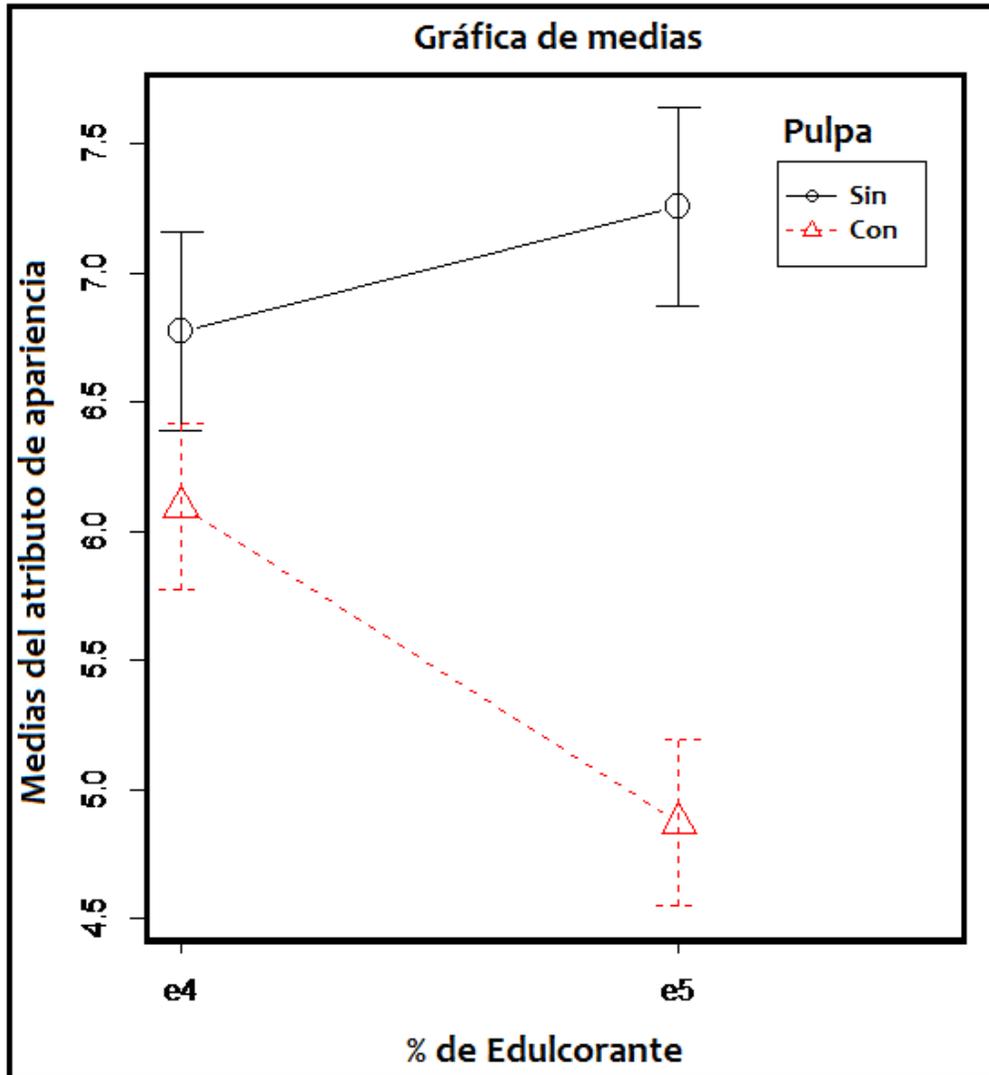


Figura 42: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de apariencia.

Con relación al atributo de dulzor se encontró que los prototipos que contenían pulpa presentaban mayor aceptación respecto a los que no (($p < 0.05$) (Figura 43)), este comportamiento se encontró favorecido por la adición del edulcorante ya que el conjunto de los dos componentes “edulcorante-pulpa”, tiene como función principal según lo establece la bibliografía contrarrestar la acidez producida durante la fermentación (Early, 1998).

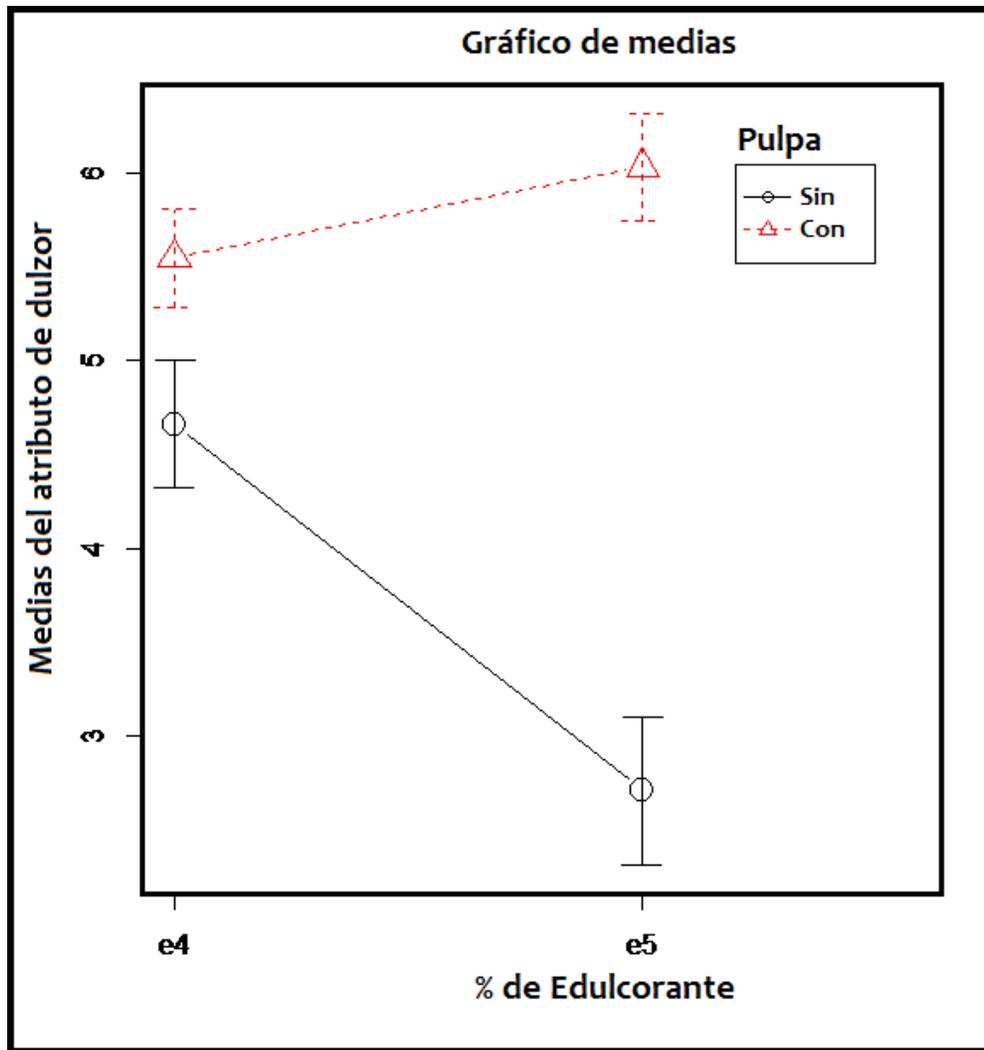


Figura 43: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de dulzor.

Sin embargo a pesar de esto en la gráfica también se puede observar que para los prototipos que no contenían pulpa disuelta, el efecto “dulzor-edulcorante”, se presentaba de manera inversa, estableciéndose que para la concentración de edulcorante de 5 %, existía una disminución significativa ($p < 0.05$) del atributo en estudio (Figura 44), comportamiento inusual, que puede ser atribuido a la concentración de sacarosa presente en el medio, la cual posiblemente debido a la exposición prolongada de temperatura y a la acidez sufrió una disociación en sus dos monosacáridos la fructosa y glucosa, esta última al encontrarse libre en el medio fue empleada como sustrato por los microorganismos encargados de la fermentación, generando una acidificación residual contribuyendo en la diferencia

significativa ($p < 0.05$) presentada por el atributo de acidez, el cual influyo en la disminución de dulzor, como se muestra en las **Figuras 43 y 44**, estableciendo así que la relación entre los parámetros de acidez y dulzor es inversa, ya que el incremento en uno de los dos atributos repercute en la disminución del otro.

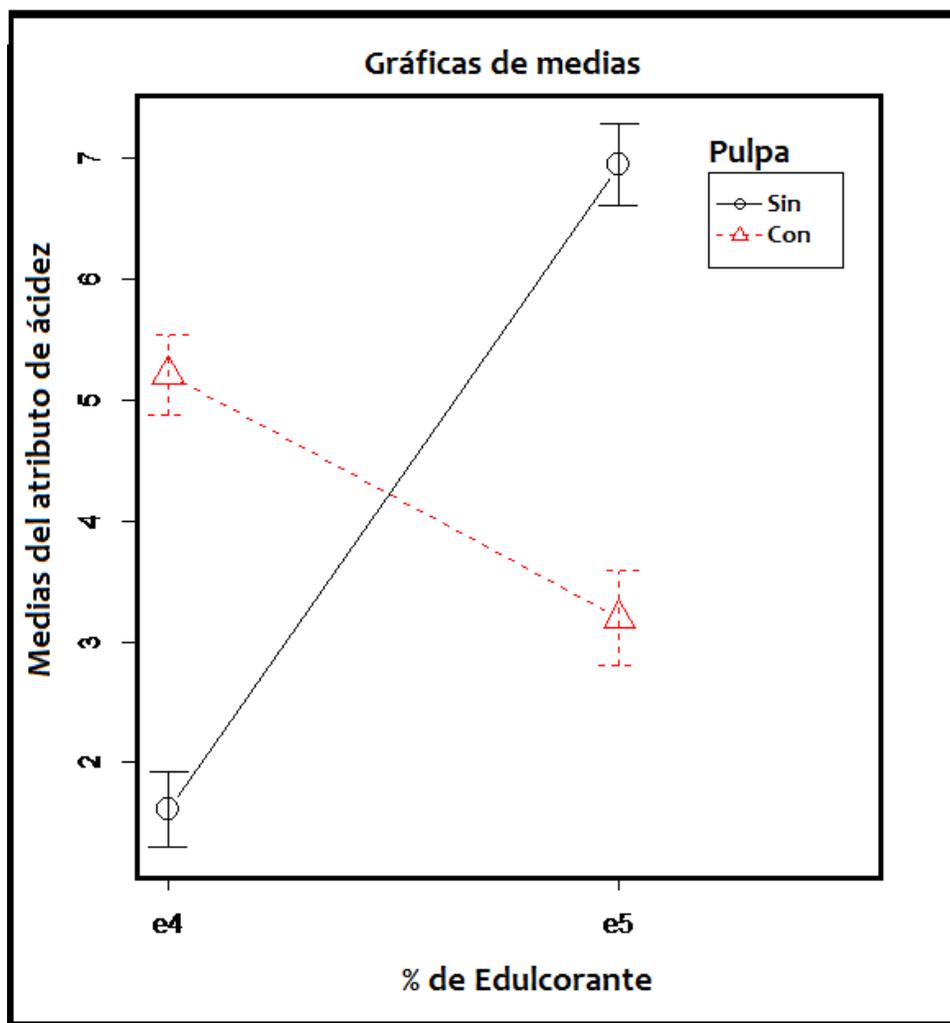


Figura 44: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de acidez.

En cuanto a la sensación producida por las esferas de pulpa y el olor, en la **Tabla 25** se puede observar que no existe efecto significativo para la interacción (pulpa/edulcorante) y el edulcorante ($p > 0.05$).

De acuerdo igualmente con la esta tabla (**Tabla 25**), se observa que el efecto significativo para ambos atributos es generado por la concentración de la pulpa ($p < 0.05$).

Ahora bien en cuanto a la sensación de esferas cuyo comportamiento se presenta en el gráfico de la **Figura 45**, se puede observar que existe una menor aceptación con respecto a este atributo en el prototipo que no presenta pulpa disuelta, este efecto posiblemente pueda ser atribuido a que a concentraciones mayores de acidez las cápsulas son más susceptibles a sufrir daños estructurales, como lo menciona Jiménez (2010), además este comportamiento puede encontrarse influenciado por la porosidad que presenta en su estructura la membrana (Hernández, 1990), ya que este factor facilita la transferencia del material del interior de la cápsula al medio, ocasionando el vaciado y por consiguiente su reducción de tamaño.

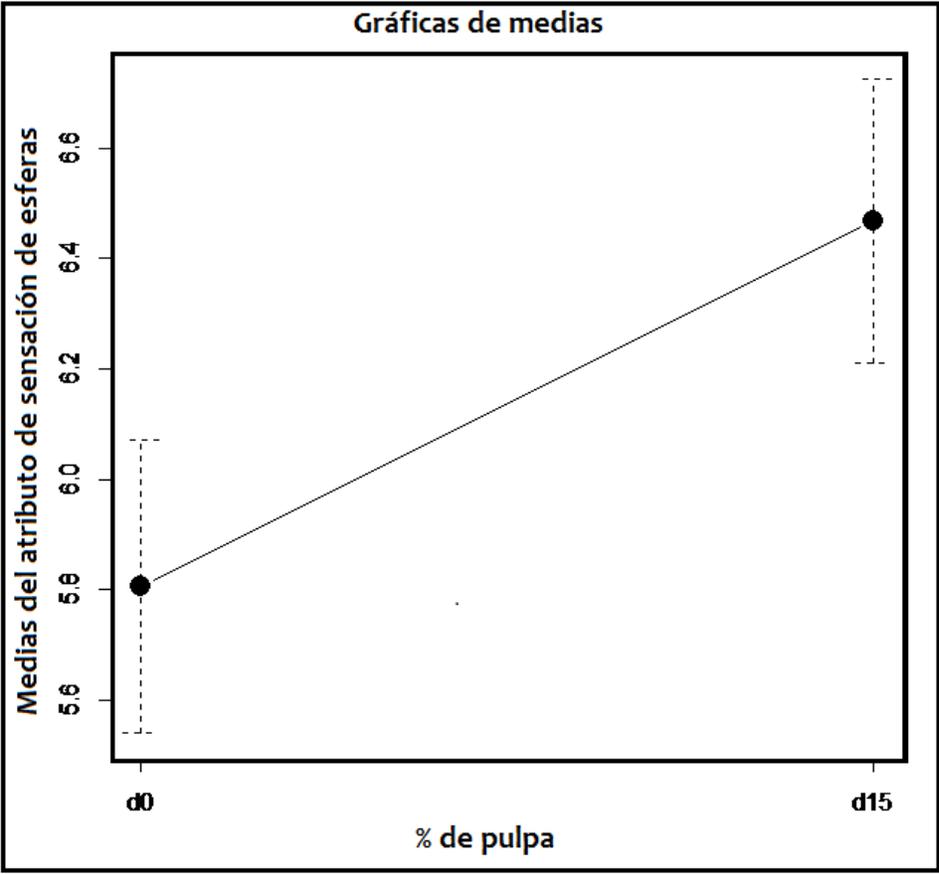


Figura 45: Gráfica de efecto de interacción de la pulpa sobre el atributo de sensación de esferas.

En relación al efecto presentado en el olor (**Figura, 46**), este comportamiento según lo establecido por Early y Tamime en 1998 y 1991 respectivamente, es el deseado ya que la adición de concentrado de fruta, en el producto según lo establecen estos autores tiene la

finalidad de proporcionar características de sabor, aroma y color, a manera de incrementar su aceptación, efecto que en este caso se puede observar en la **Figura 46**, en la cual se aprecia que a mayor concentración de pulpa existe más aceptación en cuanto al atributo de olor.

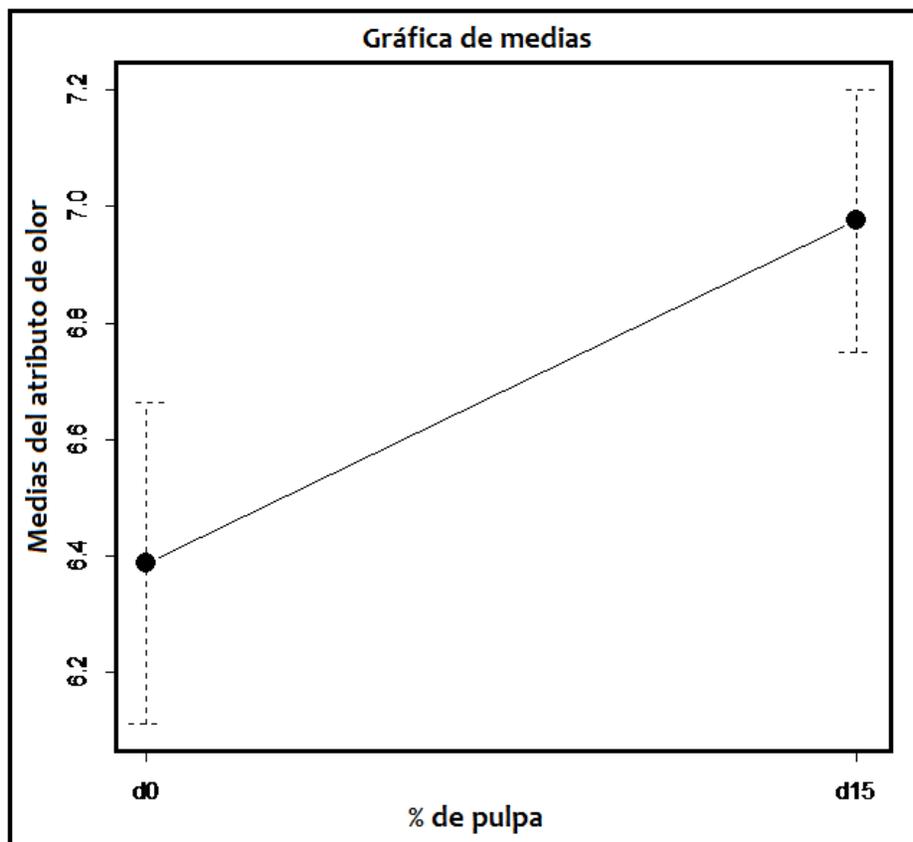


Figura 46: Gráfica de efecto de la pulpa sobre el atributo de olor.

En función del sabor, se encontró que los prototipos que presentaban mejor calificación respecto a este atributo eran los que contenían pulpa disuelta ($p < 0.05$), **Figura 47**), comportamiento esperado, ya que como lo menciona Bamforth (2005), el alto nivel de acidez del yogurt natural no es del agrado de muchos consumidores.

En este gráfico (**Figura 47**) se observa de igual forma que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) al variar la concentración de edulcorante, implicando de esta manera que el efecto de rechazo o aceptación en cuanto a este atributo solo es proporcionado por la concentración de pulpa.

Con base a las calificaciones otorgadas, se eligió al prototipo que contenía pulpa disuelta y el 4 % de edulcorante, ya que como se muestra en el gráfico radial (**Figura 41**), aparte de ser el prototipo que presenta un nivel más homogéneo en las calificaciones otorgadas por los jueces, este cumple con la especificación establecida por la NOM-185-SSA1-2002 en cuanto al nivel de acidez y pH, con respecto al sabor este prototipo es uno de los que presentaron la mejor calificación para este atributo, como se puede observar en la **Figura 41**, sin embargo al no existir diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los prototipo con pulpa disuelta **Figura 47**, la elección de este con respecto a este atributo se realizó seleccionando la concentración más baja de edulcorante ya que esto mejora las características funcionales del producto al reducir la cantidad de carbohidratos a adicionar.

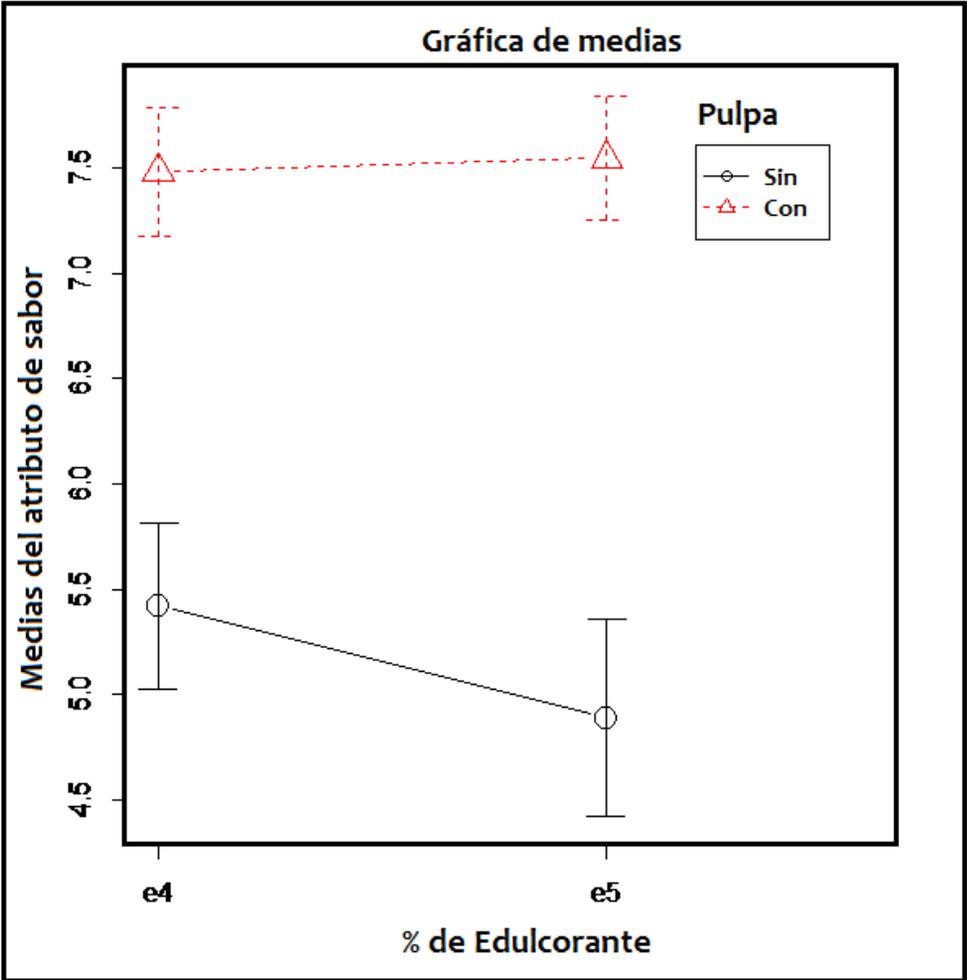


Figura 47: Gráfica de efecto de interacción entre la pulpa y el edulcorante sobre el atributo de sabor.

3.5 Objetivo particular 4. Determinación y comparación de las propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas, del prototipo seleccionado.

Se realizó la evaluación de las propiedades químicas, fisicoquímicas y microbiológicas conforme lo establece la normatividad para el prototipo seleccionado (15 % de pulpa disuelta, 10 % de pulpa encapsulada y 4 % de edulcorante), cuya composición se presenta en la **Tabla 26**.

Tabla 26: Componentes del producto fermentado funcional tipo yogurt.

Componente	Porcentaje
Bebida de avena (Leche):	65.2 %
Pulpa de zarzamora disuelta:	11.1 %
Pulpa de zarzamora encapsulada:	7.90 %
Sólidos de leche descremada (Svelty):	6.40 %
Inoculo (Cultivo iniciador):	4.00 %
Stevia/Fruktosa/Sacarosa:	3.20 %
Glucosa anhidrida en polvo:	1.60 %
Encapsulado de <i>L. casei</i> :	0.80 %

3.5.1 Evaluación química y fisicoquímica del prototipo seleccionado:

Debido a que en México no se comercializa ningún producto fermentado a base de una leche vegetal, se realizó la comparación de la composición química del prototipo con respecto a un yogurt comercial bebible* (Activia®).

Como se puede observar en la **Tabla 27**, existe una clara diferencia entre la composición química del producto fermentado de avena y los productos comerciales, esta variación se atribuye principalmente a las materias primas empleadas, a los ingredientes añadidos y al proceso de fabricación, ya que como lo menciona Early (1998), de estos depende el contenido en vitaminas, proteínas, grasa y minerales.

Tabla 27: Composición química de la bebida fermentada de avena, comparada con un yogurt bebible comercial.

Composición química:	Porcentaje (%):		Coeficiente de variación (%):
	Experimental (Avena):	*Comercial (Bebible):	
Humedad:	81.65	73.61	2.30
Azúcares Reductores Directos (ARD):	10.73	16.20	2.71
Azúcares Reductores Totales (ART):	11.92	17.98	
Proteínas:	2.76	6.00	3.45
Grasa:	1.76	3.68	3.21
Fibra cruda:	1.15	0.40	4.41
Cenizas:	0.76	0.11	4.33

Con respecto a la concentración de proteína y grasa, se observa que el producto fermentado de avena presenta una menor concentración que el producto comercial (bebible), esto se debe principalmente a lo que se mencionó en el párrafo anterior ya que el producto comercial se encuentra elaborado con leche, la cual en su composición presenta una concentración aproximada de 2.4 a 4.0 % de proteína y de 2.5 a 5.0 % de grasa (Gil & Ruíz, 2010), porcentajes que se encuentran por encima de los valores obtenidos para la leche de avena la cual presenta 1.08 % de proteína y 0.44 % de grasa. Además de la composición química de las materias primas, otro factor al cual se puede atribuir la variación de proteína es al proceso de fortificación el cual se lleva a cabo con el fin de incrementar la concentración de sólidos no grasos, los cuales a su vez influyen en el aumento del contenido proteico (Vélez & Rivas, 2001), sin embargo a pesar de esto el producto fermentado de avena contiene la concentración media requerida de proteína según lo establecido por la PROFECO (2006).

Respecto a la concentración de grasa, al presentar el producto fermentado de avena (**Tabla 27**), una concentración menor de 25 % de grasa del contenido total del producto comercial, se puede considerar a este como un producto “reducido en grasa”, según lo establece la NOM-086-SSA1-1994 y la “Food Standards Committee Reporto on Yogurt”.

La concentración de fibra del producto fermentado de avena (1.15 %) es superior al dato reportado en la etiqueta del producto comercial (**Tabla 27**), esto se debe principalmente a la composición de la avena la cual presenta un alto contenido en carbohidratos complejos como beta-glucanos, la fuente de fibra soluble más importante que contiene este cereal, a la cual se le atribuyen diversos efectos a la salud como, la disminución de los niveles de colesterol en sangre, la reducción de desórdenes cardiovasculares, así como la optimización del metabolismo lipídico y de la glucosa (Suárez *et al.*, 2013), además de ejercer acción prebiótica en el organismo debido a que estimula el crecimiento de bifidobacterias y bacterias ácido lácticas (Angelov *et al.*, 2005).

En cuanto su composición química se puede establecer que el producto fermentado de avena, cuenta con las características necesarias requeridas para el consumo por personas intolerantes a la lactosa, ya que al estar elaborado con componentes vegetales, no contiene colesterol, ni lactosa. Además de que ciertos estudios han comprobado que los microorganismo presentes en las bebidas fermentadas (bacterias ácido lácticas) continúan metabolizando la lactosa después de la ingestión del producto y la cantidad de lactosa residual que llega al intestino delgado, es tan pequeña que no produce ninguna reacción adversa (Early, 1998), por lo cual la adición de leche en polvo desnatada para la elaboración de la bebida fermentada de avena no proporciona ningún cambio en las propiedades funcionales del producto.

De igual forma con respecto a la NOM-086-SSA1-1994, este producto puede catalogarse como un producto reducido en calorías al contener 60 Kcal, con respecto a 133 Kcal que presenta el producto comercial bebible.

De acuerdo al análisis fisicoquímico, el producto fermentado de avena presentó un pH de 3.8, con una acidez de 0.8 % de ácido láctico, valores que se encuentran dentro del rango señalado por el CODEX y la normatividad mexicana (NOM-185-SSA1-2002 y NOM-181-SCFI-2010) para productos fermentados como el yogurt, en los cuales se establece que el valor mínimo de acidez es de 0.6 % de ácido láctico, y el pH de 4.4.

3.5.2 Evaluación microbiológica del prototipo seleccionado:

Los resultados del análisis microbiológico demostraron que el producto fermentado de avena, presenta ausencia de coliformes totales, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, cumpliendo de esta manera con las especificaciones microbiológicas establecidas por la NOM-185-SSA1-2002, en el apartado de bebidas fermentadas.

La concentración final de probióticos fue de 5×10^9 UFC/ml, parámetro que se encuentra dentro del rango determinado por la "Fermented Milks and Lactic Acid *Bacteria* Beverages Association" de Japón, en la cual se establece que el número total de microorganismo presentes en una bebida para considerarse como un alimento probiótico debe ser mínimo de 10^7 UFC/ml, para asegurar que se producirá un efecto benéfico para la salud (Ramos Clamont *et al.*, 2012).

3.6 Objetivo particular 5. Selección del envase, desarrollo de la etiqueta y determinación del precio del producto fermentado de avena.

3.6.1 Selección del envase.

La selección del envase se realizó teniendo en cuenta las especificaciones señaladas por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI, 2012), estableciéndose de esta manera que se emplearía polietileno (PE) de monocapa o coextruido, pigmentado blanco, como material de envasado (**Figura, 48**), el cual se sella térmicamente, empleando una tapa troquelada de laminado conformada por aluminio/polietileno (Alu-Poly) de fácil apertura, el envase cuenta con una capacidad de 80 ml y es de la marca: bio empak.

Polietileno (PE).

El polietileno es un monómero insaboro, no tóxico, más ligero que el agua y un poco blancuzco, aunque laminado en películas es totalmente transparente (Losada, 2000). Es químicamente muy inerte. No se disuelve en ningún solvente a temperatura ambiente (Billmeyer, 2004). Es muy resistente al agua, al vapor de agua, a los químicos, a bajas temperaturas y es un buen aislante eléctrico. Tiene una resistencia igualable sólo por el vidrio a ácidos y álcalis (Losada, 2000).

Se clasifica en VLDPE, LDPE, MDPE, HDPE, correspondiendo estas siglas en inglés a su densidad, que puede ser muy baja, baja, media y alta, respectivamente (INTI, 2012).

- **Polietileno de alta densidad (HDPE):** Conocido igualmente como polietileno lineal y producido principalmente por la polimerización radical del etileno, es altamente cristalino (90 %) y contiene menos de una cadena lateral por cada 200 átomos de carbono de la cadena principal. Su punto de fusión está por encima de los 127 °C y su densidad cae en el intervalo de 0.95-0.97 g/cm³. Posee una rigidez mayor que los polietilenos ramificados, además de un punto de fusión cristalino más alto y mayor resistencia a la tracción y dureza. Cuentan con una buena resistencia química y física (cortes y rasgaduras) y poca permeabilidad a los gases y vapores (Billmeyer, 2004). Este material es ampliamente utilizado en la fabricación de envases, principalmente de tarros, botellas y bidones, es empleado para el envasado de productos alimenticios, productos para higiene y limpieza, medicamentos, aceites y productos para la industria automotriz, etc. (Coles & Hall, 2004).



Figura 48: Envase de HDPL pigmentado blanco, para el producto fermentado de avena.

3.6.2 Diseño de la etiqueta.

En la **Figura 50**, se presenta el diseño de la etiqueta propuesta para la presentación comercial del producto, se trata de una etiqueta “sleeve termoretractil”, de cuerpo completo hasta la

tapa (overall labeling), impresa en hoja de PET termoencogible, con perforación horizontal y vertical en el borde superior, que servirá como abre fácil (easy open) y que funcionara como sello de seguridad (Cliftonpackaging, 2014).

Las especificaciones generales de la etiqueta se establecieron en base a la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y la información comercial general se especificó conforme a la NOM-030-SCFI-2006 (Figura 49).

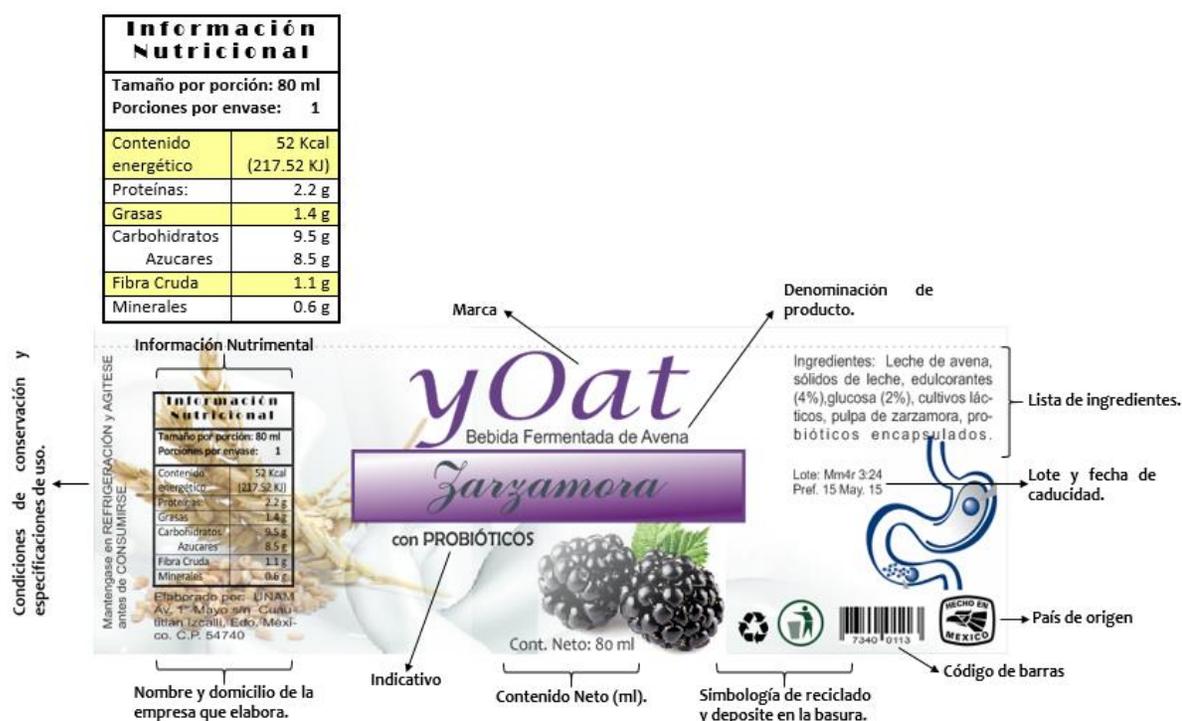


Figura 49: Representación gráfica de los elementos de la etiqueta conforme a la NOM-051-SCFI/SSA1-2010.

Para la selección de colores empleados en el diseño de la etiqueta se revisó el tratado de la teoría del color elaborado por la compañía de diseño industrial "Netdisseny" en el cual se habla del color como una apreciación subjetiva nuestra, definiéndolo así como, la sensación que se produce en respuesta a la estimulación del ojo y de sus mecanismos nerviosos, por la energía luminosa de ciertas longitudes de onda, el color se puede emplear para crear experiencias y puede llegar a ser la traducción visual de nuestros sentidos, o despertar estos mediante la gama de colores utilizados, teniendo en cuenta esto en la **Anexo 5** se presenta el significado de los colores empleados en este diseño.

Estos colores en conjunto con los elementos gráficos y la tipografía elegida, dan forma a la etiqueta presentada en la **Figura 50**.

3.6.3 Determinación del costo unitario del producto.

El costo del producto se estableció mediante el análisis que se presenta en el **Anexo 6**, determinándose de esta manera que una porción de 80 ml de bebida fermentada de avena, tendría un valor aproximado de \$ 5.00 M.N., importe que se encuentra dentro del rango de precios establecidos para productos con características semejante y que además según la encuesta de mercado está por debajo del rango de precios que los consumidores potenciales se encontrarían dispuestos a pagar (**Figura 15**).

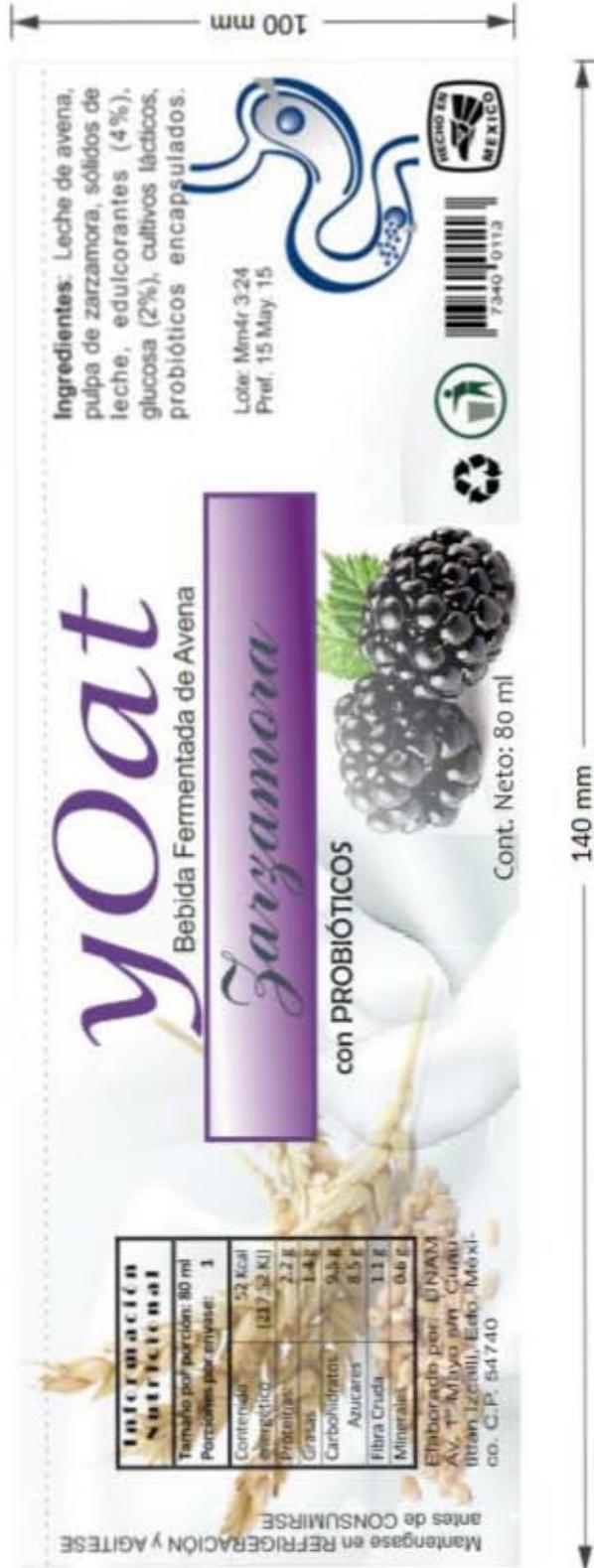


Figura 50: Etiqueta con dimensiones del producto fermentado de avena.

3.7 Objetivo particular 6. Determinación de la vida útil del producto fermentado de avena.

3.7.1 Determinación de vida útil fisicoquímica del producto fermentado de avena.

En la **Figura 51**, se observa que el producto exhibió un incremento en la acidez durante el tiempo de almacenamiento, comportamiento que se debe principalmente al fenómeno de post acidificación que se presenta debido a la actividad residual de las bacterias ácido lácticas (Lubbers *et al.*, 2004; Briceño *et al.*, 2001), las cuales a su vez al seguir fermentando los azúcares presentes en el medio generan una liberación de iones H^+ los cuales influyen en el descenso de pH (**Figura 51**).

De igual manera en este gráfico (**Figura 51**) se puede observar que la relación que guarda la acidez respecto al tiempo es proporcional y directa ($R^2=0.92$, $p < 0.001$), contraria a la relación pH-tiempo, la cual presenta un comportamiento inverso pero igualmente proporcional ($R^2=0.94$, $p < 0.001$).

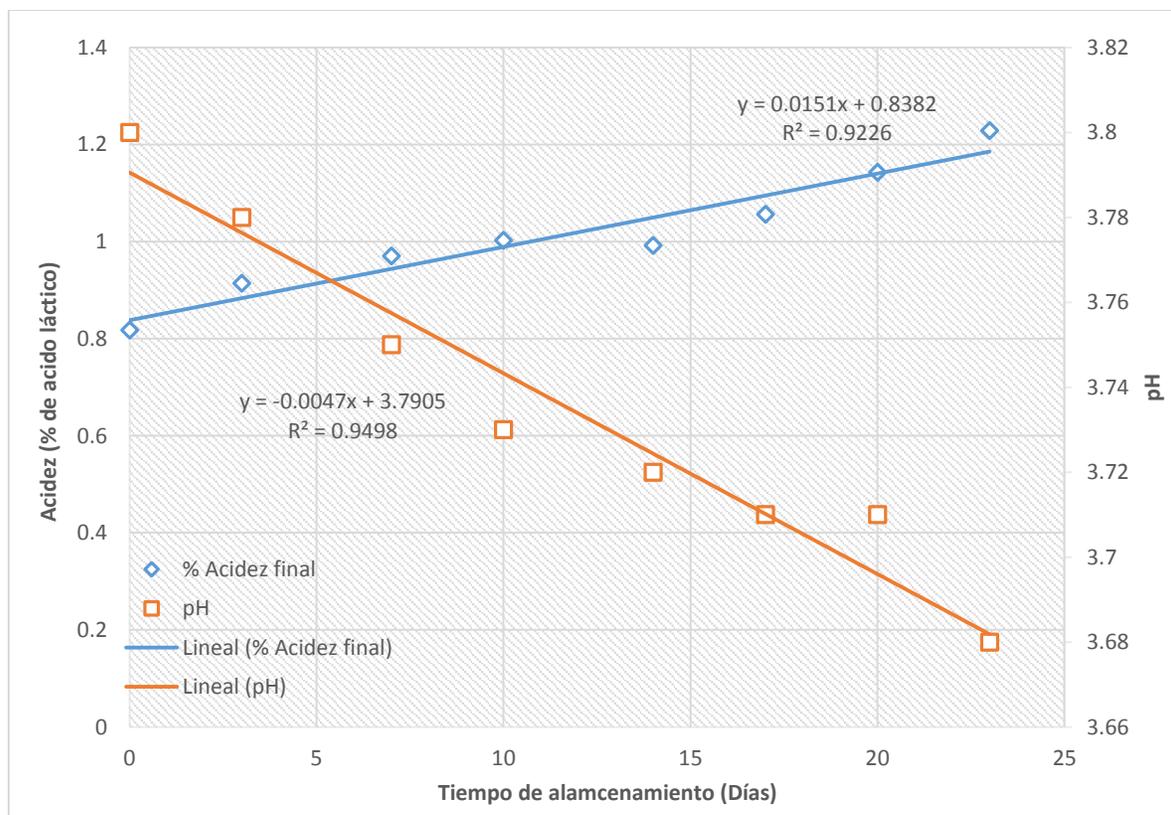


Figura 51: Efecto de acidificación y descenso de pH del producto fermentado de avena respecto al tiempo de almacenamiento.

El comportamiento observado en la **Figura 51**, nos permiten tener un estimado del tiempo de vida útil del producto fermentado de avena, el cual teniendo en cuenta los rangos establecido por el CODEX (2003) para estos parámetros sería de 21 días, momento en el que este contaría con un pH de 3.7 y una acidez de 1.14 %.

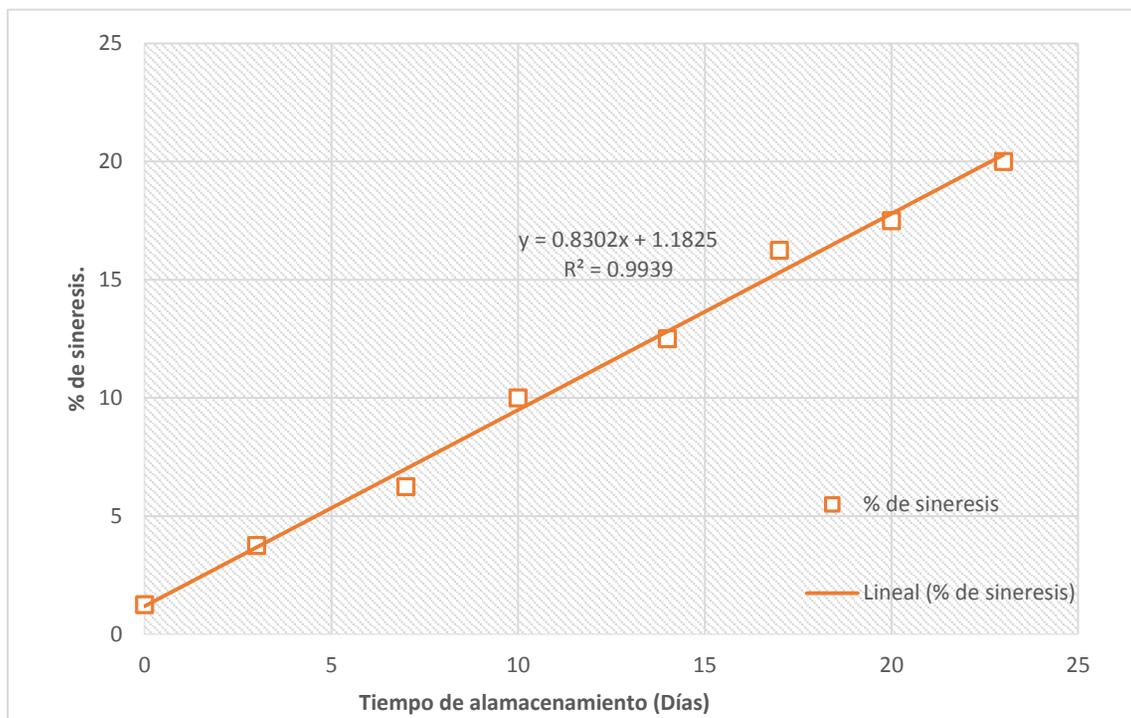


Figura 52: Incremento del porcentaje de sinéresis del producto fermentado de avena con respecto al tiempo de almacenamiento.

Otro parámetro importante en la determinación de la vida útil de los productos lácteos, es la sinéresis, ya que ésta afecta la calidad y aceptación de los mismos. Físicoquímicamente, la sinéresis es un fenómeno generado por la expulsión o separación del lactosuero debido a la contracción del gel y a los arreglos de la red molecular de caseína después de la formación del mismo (Acevedo *et al.*, 2010). Los principales factores de proceso asociados con este fenómeno son: rápida acidificación, alta temperatura de incubación, el tratamiento térmico excesivo y el bajo contenido de sólidos (Lucey *et al.*, 1998).

Debido a que bibliográficamente no se encuentra establecido el porcentaje de sinéresis máximo permitido, en este proyecto nos apoyamos en los resultados obtenidos por Parra y

col. en 2012, para establecer un punto de comparación de este parámetro y así poder estimar la vida útil del producto fermentado de avena.

Como se puede observar en la **Figura 52**, el porcentaje máximo de sinéresis obtenido a los 21 días fue de 20 %, valor que se encuentra por debajo de los datos experimentales obtenidos por Parra y col., los cuales obtuvieron un porcentaje de sinéresis del 40 % a los 13 días, teniendo en cuenta esta comparación, se estableció que el efecto de disminución del porcentaje de sinéresis es generado como lo indica Ruíz y Ramírez (2009), por la presencia de la fibra de avena (β -glucano) la cual brinda mayor viscosidad al producto por tener una alta retención de agua, actuando así como un espesante, este efecto también se puede encontrar influenciado por la presencia de los carbohidratos (almidones) y proteínas (globulinas) que se encuentran de forma natural en la avena, y que presentan un efecto similar al del β -glucano al encontrarse expuestos a temperaturas de calentamiento (Moya *et al.*, 2002).

Otro factor que igualmente puede influir en la disminución del porcentaje de sinéresis es la presencia de las cápsulas de microorganismo ya que posiblemente existe una ligera retención de agua por la presencia del polímero encapsulante, como lo mencionaron en su investigación Parra y col. (2012), los cuales encontraron que el efecto de sinéresis disminuyó en muestras con encapsulado de microorganismos.

De acuerdo con los datos obtenidos y teniendo en cuenta la referencia antes citada, se puede establecer que con respecto a la característica de sinéresis el producto fermentado de avena cuenta con una vida útil mayor a 21 días.

3.7.2 Determinación de la vida útil microbiológica del producto fermentado de avena.

Para determinar la vida útil del producto fermentado de avena se realizó un análisis microbiológico y un recuento de la concentración de bacterias ácido lácticas (Cabeza, 2013), estableciendo de esta manera que la vida útil del producto terminaría en cuanto este no cumpliera con las especificaciones de calidad higiénica presentes en NOM-185-SSA1-2002, o en su caso al obtener concentraciones menores de 10^7 UFC/g de microorganismos viables (CODEX Alimentarius, 2003).

La evaluación microbiológica arrojó resultados negativos para coliformes totales, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella ssp*, indicando la ausencia de estos microorganismos para cada uno de los 8 lotes (0,3,6,9,12,15,18,21 días), después de los 21 días de almacenamiento en refrigeración, cumpliendo de esta manera con las especificaciones sanitarias establecidas por la normatividad mexicana, confirmando que los cultivos iniciadores (*L. bulgaricus*, *Lc. thermophilus* y *L. lactis*) del yogurt posiblemente presentaron un efecto inhibitorio sobre otros microorganismos, siendo algunos de los factores que cooperan en esto, la producción de ácido láctico que conlleva a una disminución del pH y la posible liberación de bacteriocinas, de igual forma se puede establecer que las prácticas de manufactura durante el proceso de elaboración y las condiciones de almacenamiento se realizaron de forma correcta (Ruíz & Ramírez, 2009).

La concentración de microorganismo probiótico libre, presentó un decremento ($p < 0.001$) proporcional ($R^2=0.78$) al tiempo de almacenamiento, como se puede observar en la **Figura 53**.

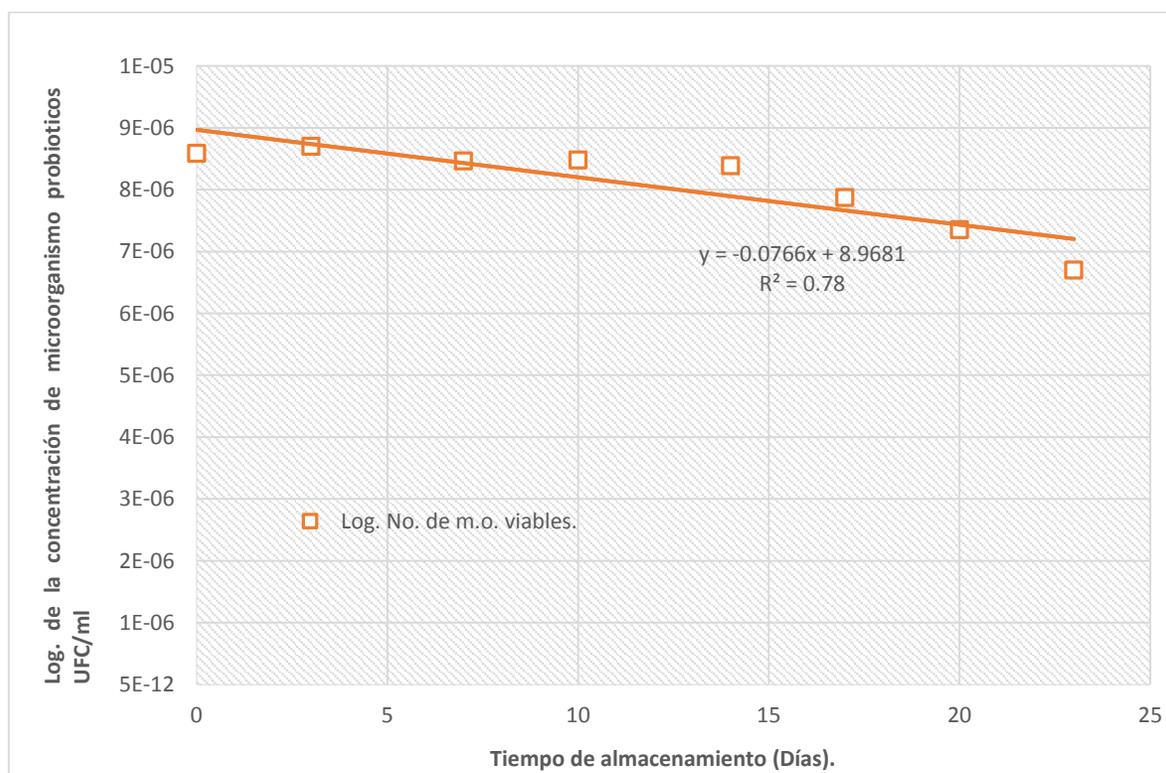


Figura 53: Descenso del número de microorganismo probióticos totales en el producto fermentado de avena durante su tiempo de almacenamiento.

Lo anterior se debe a que, tanto durante el proceso de elaboración del producto, como en el almacenamiento, los probióticos se ven sujetos a estreses osmóticos, mecánicos oxidativos o por frío (Burgain *et al.*, 2011).

Para atenuar la disminución de la viabilidad en el producto fermentado de avena, se adicionó el microorganismo probiótico encapsulado, el comportamiento lineal de la viabilidad ($R^2=0.61$) y de la variación de eficiencia de encapsulación ($R^2=0.69$) se muestran en el gráfico de la **Figura 54**, en el cual se observa que la concentración de la bacteria encapsulada, se redujo significativamente a lo largo del estudio, efecto que podría deberse a la difusión de las células de las cápsulas al medio, trayendo como consecuencia la pérdida de dureza de las cápsulas, comportamiento que se observa en la **Figura 55**. Esto contribuye a la post acidificación del medio generando un efecto inhibitorio sobre los cultivos iniciadores (probióticos libres), ya que la acidez es uno de los factores que más influye en la sobrevivencia de los mismos. Debido a la inactivación de enzimas importantes en su metabolismo (Cruz, 2009).

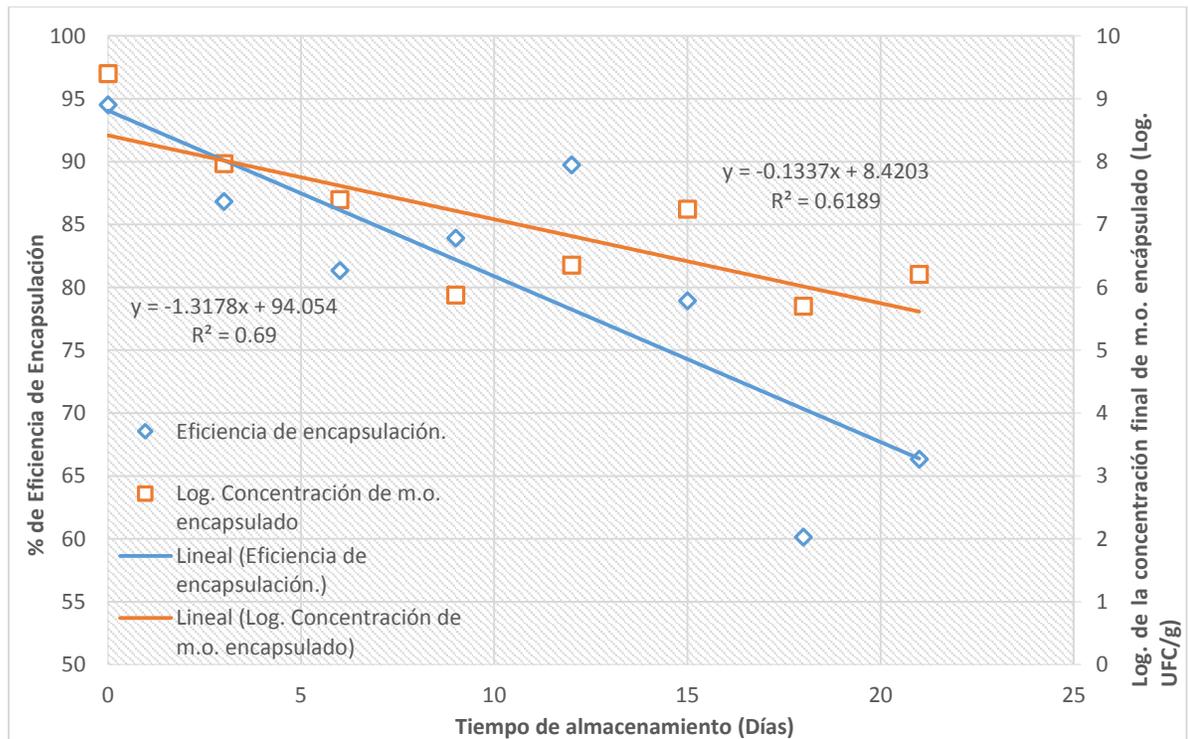


Figura 54: Comportamiento del microorganismo encapsulado y eficiencia de encapsulación con respecto al tiempo de almacenamiento.

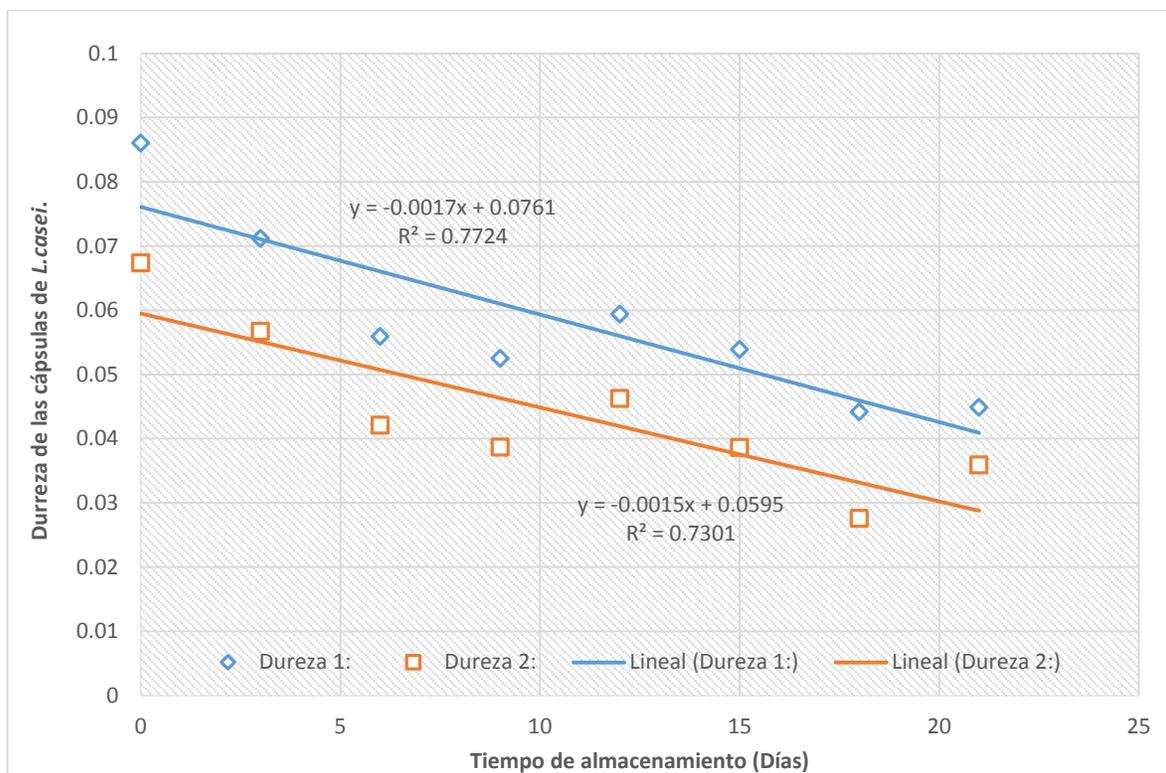


Figura 55: Dureza (Kgf.) exhibida por las cápsulas de probiótico encapsulado con respecto al tiempo de almacenamiento.

De acuerdo a lo antes mencionado y teniendo en cuenta los análisis de varianza presentados en el **Anexo 7** además de los requerimientos mínimos necesarios establecido por el CODEX y la normatividad mexicana para denominar a un alimento como probiótico, se estableció que el tiempo de vida útil microbiológico para el producto fue de 18 días, periodo de tiempo en el cual se obtiene una concentración de microorganismo probiótico libre de 7.75×10^7 UFC/g y una concentración de probiótico encapsulado de 1.75×10^7 UFC/g con un 79 % de eficiencia de encapsulación.

3.7.3 Determinación de la vida útil sensorial del producto fermentado de avena.

De acuerdo al análisis de supervivencia realizado (**Tabla 28**) se estableció que la vida sensorial del producto a condiciones de almacenamiento de refrigeración (4 °C), fue de 17 días con un intervalo de 95 % de confianza de ± 4 días, según el modelo “logarítmico normal” (lognormal), con un porcentaje de rechazo del 25 %.

Tabla 28: Estimación de la vida útil sensorial del producto fermentado de avena, de acuerdo al modelo logarítmico normal.

% de Rechazo	Tiempo estimado de vida útil (Días)	Modelo	Intervalo de 95 % de confianza		Error (Días)
			Inferior	Superior	
10	13 ± 5	Log. Normal	8.54	20.43	2.93
25	17 ± 4		13.53	22.17	2.18
50	23 ± 7		17.89	30.64	3.21

Así mismo se determinó que los atributos que influyeron de manera directa en el rechazo del producto fueron el sabor y la apariencia los cuales sensorialmente presentan un tiempo de vida útil de 18 y 17 días respectivamente (**Tabla, 29**), periodo de tiempo que se encuentra dentro del rango establecido para el producto fermentado de avena (**Tabla, 28**).

Tabla 29: Estimación de vida útil sensorial para los atributos de sabor, olor, apariencia y acidez, con un porcentaje de rechazo del 25 %.

Parámetro	Tiempo estimado de vida útil (Días)	Modelo	Intervalo de 95 % de confianza		Error (Días)
			Inferior	Superior	
Apariencia	17	Log. normal	13.53	22.17	2.18
Acidez	26		5.689	121.6	20.0
Sabor	18		14.82	22.54	1.95
Olor	20		18.20	23.59	1.30

De acuerdo a los resultados obtenidos se estableció que el tiempo de vida útil sensorial era de 17 días el cual respecto al tiempo de vida útil microbiológico y fisicoquímico (18 días) fue inferior, sin embargo debido a que esta diferencia era mínima y a que el éxito de un producto depende de la aceptación de este por los consumidores, se determinó que el tiempo de vida útil del producto sería de 17 días momento en el cual este presentaría una concentración de

7.5×10^7 UFC/g de concentración de probiótico, un porcentaje de sinéresis del 16 %, con una acidez de 1.05 % de ácido láctico y un pH de 3.71.

El tiempo de vida útil que presenta el producto fermentado de avena (17 días), se encuentra por debajo del tiempo establecido para un producto comercial análogo el cual es superior a los 21 días, sin embargo a pesar de esto el producto fermentado presenta como ventaja el no contar en su formulación con aditivos, colorantes ni conservadores artificiales, favoreciendo de esta manera a la salud del consumidor y expandiendo su mercado de venta a personas que prefieren una alimentación más natural.

CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos durante la experimentación podemos establecer que el desarrollo del producto fermentado de avena es factible, de acuerdo al dato obtenido en el estudio de mercado en el cual se muestra que el 95 % de la poblacional encuestada se encontraría dispuesto a consumirlo.

La tecnología de microencapsulación resulta ser una opción viable y atractiva para preservar la funcionalidad del producto fermentado al conservar la concentración de microorganismos probióticos hasta el término de la vida útil, proporcionando características fisicoquímicas interesantes como la disminución de la sinéresis (Parra *et al.*, 2012). La concentración de 1.5 % de alginato de sodio en conjunto con la del cloruro de calcio (2 %), permiten la obtención de microcápsulas con un porcentaje de eficiencia del 94 %, cuyo valor se encuentra por encima del reportado por otros autores (Paniagua & Romero, 2013). Las cápsulas obtenidas presentaron una dureza de 0.86 kgf y un tamaño de partícula de 2 mm.

Conforme a los resultados obtenidos de las pruebas microbiológicas podemos asegurar que el producto es apto para su consumo y que no representa ningún riesgo a la salud, en cuanto al elaborarlo se lleve a cabo un buen control de calidad y la aplicación de buenas prácticas de manufactura.

Este producto fermentado al encontrarse elaborado con leche de avena, no contiene lactosa, por lo que es indicado para el consumo de personas con intolerancia a la lactosa.

Además biotecnológicamente a pesar de no contar con una alta concentración de proteína, ni grasa, los componentes principales de la avena como la fibra soluble (β -glucano), proteínas (globulinas) y carbohidratos (almidón), generan un efecto positivo en las propiedades fisicoquímicas y texturales del producto fermentado.

En cuanto al proceso de fermentación podemos establecer de acuerdo a los resultados obtenidos que éste fomentó la mejora de las características sensoriales de la avena y de igual forma potencializó sus beneficios sobre la salud y sus características nutricionales debido a la combinación de prebióticos con probióticos.

Ahora bien de acuerdo a la NOM-086-SSA1-1994 y a la comparación realizada entre el producto comercial y el de avena se estableció que éste es un producto bajo en calorías y reducido en grasa, respecto al producto comercial.

El costo unitario del producto fue de \$ 5.00 M.N., valor que se encontrarían dispuestos a pagar los consumidores ya que se encuentra dentro del rango de precios establecidos para productos análogos.

A condiciones de refrigeración de 5 °C, el producto fermentado de avena presenta una vida útil de 17 días.

Finalmente podemos mencionar que el uso de avena como sustrato para elaborar productos probióticos supone interesantes características funcionales y nutricionales, además de ser una opción viable de explotación comercial de este cereal en México.

RECOMENDACIONES.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio y los pocos avances que se presentan en esta línea de investigación en México, es necesario no perder de vista que el producto elaborado puede ser sometido a una reformulación para mejorar sus características tanto organolépticas como nutricionales, teniendo en cuenta esto, los puntos que se plantea a continuación nos permiten establecer una base de partida para lograr este objetivo.

Se recomienda estudiar el efecto de la adición de diferentes concentración de solidos de avena en el proceso de fermentación, además de experimentar de igual forma con el incremento de fibra de avena o en su caso la adición de una fibra natural como la inulina para favorecer el desarrollo de microorganismo probióticos y evaluar la interacción entre este factor y la estabilidad del producto.

Se propone de igual forma el estudio del efecto de la pasteurización sobre las propiedades de la leche de avena.

Igualmente se requiere establecer la correlación que guarda la acidez con respecto a la estabilidad de las cápsulas y del producto.

Con respecto a las características organolépticas se plantea la determinación experimental del efecto de la adición de pulpa natural y un colorante sobre los atributos de color y sabor.

Y finalmente para establecer el comportamiento de las microcápsulas de probiótico resulta factible realizar la evaluación de diversos materiales encapsulante para determinar cuál es el que brinda mayor protección a los microorganismos y probar esto a través de un estudio “*in-vitro*”.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.S.A. (2000). *Soy milk yogurt*. Chicago : Soyinfo Center.
- Acevedo, D., Rodríguez, A., & Fernández, A. (2010). Efecto de las variables de procesos sobre la cinética de acidificación, la viabilidad y la sinéresis del suero costeño Colombiano. *Información Tecnológica*, 2(21).
- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche principio de la técnica lechera*. (4 ed.). Madrid: REVERTÉ.
- Alimentarios y técnicas, S.A. de C.V. (s.f.). *La goma guar y su uso en alimentos*. Recuperado el 23 de Marzo de 2014, de <http://es.scribd.com/doc/71242194/GomaGuar-1839>
- Alvarado, V. (2008). *Fundamentos de inferencia estadística*. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana.
- Álvarez, C., & Bagué, S. (2012). *Tecnología farmacéutica*. Ecuador: CLUB UNIVERSITARIO.
- Anal, E., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Food Science & Technology*, 18, 240-251.
- Andrade, E., Morales, G., Ortiz, C., Rodríguez, G., Ronquillo, V., Sánchez, S., . . . Hernández, L. (s.f.). Análisis de las propiedades fisicoquímicas de la zarzamora en las variedades Brazoz, Cherokee y Tupy de la zona alta de Michoacan. *Instituto Tecnológico de Celaya*.
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., & Hristozova, T. (2005). Development of a new oat based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 75-80.
- Anholt, H. (1987). Primary events in olfactory reception. *TIBS*, 12, 49-53.
- Arellano, R. (2000). *Marketing enfoque en América latina*. México D.F.: Mc Graw Hill.
- Ashwell, M. (2005). Concepto sobre alimentos funcionales. *ILSI*.
- Bamforth, C. (2005). *Alimentos, fermentaciones y microorganismos*. Zaragoza: Acribia S.A.

- Bedolla, B., Dueñas, G., Esquivel, I., Favela, T., Guerrero, H., Mendoza, M., . . . Trujillo, C. (2012). *Introducción a la tecnología de los alimentos/ Academia del área de plantas piloto de alimentos..* (2 ed.). México D.F.: Limusa.
- Betoret, N., Puente, L., Díaz, M., Gras, M., Martínez-Monzo, J., & Fito, P. (2003). Development of probiotic enriched dried fruits by vacuum impregnation. *Journal of Food Engineering, 56*, 273-277.
- Bilmeyer, F. (2004). *Ciencia de los polímeros.* (4 ed.). (D. Areal., Trad.) Madrid: REVERTÉ.
- Boone, R., & Castenholz, R. (2001). Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, 1*, 148-163.
- Briceño, A., Martínez, R., & García, K. (2001). Viabilidad y actividad de la flora láctica (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. *Acta Científica Venezuela, 52*(1), 46-54.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engeneering, 104*(4), 467-468.
- Cabeza, H. (s.f.). Aplicación de la microbiología predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos. México, D.F., México. Recuperado el 11 de Abril de 2015, de http://www.academia.edu/992792/Aplicaci%C3%B3n_de_la_Microbiolog%C3%ADa_Predictiva_en_la_determinaci%C3%B3n_de_la_vida_%C3%BAtil_de_los_alimentos
- Cardello, V. (1998). *Perception of food quality in food storage stability.* Florida: CRC. Press.
- Carr, F., Chill, D., & Malda, N. (2002). The lactic acid bacteria a literature survey. *Critical reviews in microbiology, 28*(4), 281-370.
- Castillo, J., & González, G. (2006). Optimización del proceso tradicional de leche de soya para la elaboración de un producto tipo yogurt. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de licenciatura. UNAM: México.

- Castro, M. (2005). Modelización de la consistencia del yogurt aplanado (Cinética de acidificación estabilización del coágulo, reometría, evaluación sensorial de la consistencia) y su pérdida de calidad. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de Felipe Villarreal.: Lima.
- Catalán, E. (12 de Marzo de 2012). Leches vegetales. *Express, Casino*. Santiago, Chile.
- Centro de Nutrición, Obesidad y Alteraciones Metabólicas. (12 de Marzo de 2012). *La obesidad en México*. Recuperado el 3 de Marzo de 2014, de <http://www.abchospital.com/articulos/item/2012/03/12>.
- Clifton Packaging. (2014). *Etiquetas termoencogibles/Mangas termoencogibles*. Recuperado el 11 de Abril de 2015, de <http://www.cliftonpackaging.com.mx>
- CODEX Alimentarius. (2003). *STAN 243 "Norma del CODEX para leches fermentadas"*. Chile: FAO.
- Coles, B., & Hall, C. (2004). *Proceedings SPE*. Atlanta: SPE ANTEC.
- Condony, R., Mariné, A., & Rafecas, M. (1998). *Yogurt: elaboración y valor nutritivo*. España: Fundación Española de la Nutrición.
- Cortés, R., Chiralt, B., & Puente, D. (2005). Alimentos funcionales una historia con mucho presente y futuro. *VITAE*, 5-14.
- Cowan, & Steel's. (1993). *Manual para la identificación de bacterias de importancia médica*. (13 ed.). E.U.: Cambridge University Press.
- Cruz, A. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, 42(9), 1233-1239.
- Cubero, N., Monferrer, A., & Villalta, J. (2002). *Aditivos alimentarios*. España: Mundi-Prensa.
- Danel, P. (1990). *Fundamentos de mercadotecnia*. México D.F.: Trillas.

- de Vos, P., Faas, M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Early, R. (1998). *Tecnología de los productos lácteos*. Madrid: Acribia S.A.
- FAO. (1990). *Utilización de alimentos tropicales: Cereales*. Roma.
- FAO/OMS. (2003). *Diet, nutrition and prevention of chronic diseases*. Geneva: WHO technical Report Series 916.
- Favaro, C., Santana, A., Monterrey-Quintero, E., Trindade, M., & Netto, F. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 336-340.
- Favela, T., Navarrete, L., & Ortiz, G. (2012). Cultivos lácticos y su aplicación en la elaboración de yogurt. En B. Bedolla, G. Dueñas, I. Esquivel, T. Favela, H. Guerrero, M. Mendoza, . . . C. Trujillo, *Introducción a la tecnología de alimentos*. (2 ed., págs. 13-33). México D.F.: Limusa.
- Fuller, C. (1989). Probiotics in man and animal. *Journal Applied Bacter*, 68, 365-378.
- García, G., Quintero, R., & López, M. (2005). *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa.
- García, M., González, M., Ochoa, H., & Medrano. (2004). Microencapsulación del jugo de cebada verde mediante secado por aspersion. *Revista de Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(4), 262-266.
- Garrido, P., Tejón, R., Blanco, G., Villaverde, G., Mendoza, O., & Ramírez, J. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid: Tébar, S. L.
- Giannuzzi, L., & Molina, O. (1995). Edulcorantes naturales y sintéticos: Aplicaciones y aspectos toxicológicos. *Acta Franz. Botlaeretise*, 14(2), 113-119.

- Gil, H., & Ruíz, L. (2010). *Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos*. (2 ed., Vol. II). Madrid: Panamericana.
- Giraldo, G. (1999). *Métodos de estudio de vida de anaquel de los alimentos*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia.
- González, R., Blancas, A., R., S., Azaola, A., & Wachter, C. (1995). Growth and final product formation by *Bifidobacterium infantis* in aerated fermentations. *Microbiology and Biotechnology*, *65*, 606-610.
- Hallfrisch, J., Scholfield, D., & Behall, K. (1995). Diets containing oat extracts improve glucose and insulin responses of moderately hypercholesterolemic men and women. *Clin. Nutr.*, *61*, 379-384.
- Hernández, A. (1990). *Microfiltración ultrafiltración y ósmosis inversa*. España: Universidad de Murcia.
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). *Microbiología industrial*. San Carlos: EUNED.
- Hernández, E. (2005). *Evaluación sensorial*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería: Bogotá.
- Holt, J., Krieg, N., & Sneath, P. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9 ed.). USA: Williams and Wilkins.
- Hough, G. (2010). *Sensory shelf life estimation of food products*. E.U.: CRC Press.
- Hough, G., & Fiszman, S. (2005). *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos*. España: Cytel.
- INEGI. (2010). *Anuario estadístico del estado de Chihuahua*. Gobierno del estado de Chihuahua, México.
- Infoagro. (2010). *El cultivo de la avena*. Recuperado el 15 de Marzo de 2014, de <http://www.infoagro.com/herbaceos/cereales/avena.html>

- Instituto Nacional de Tecnología Industrial. (2012). *Envases y embalajes*. Caracas: INTI.
- Jay, J. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. (2 ed.). España: Acribia.
- Jiménez, P. (2011). *Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral*. Tesis doctoral. Universidad de Granada: España.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 39, 1221-1227.
- Kennet, V., Rotsteine, E., & Sing, R. (1997). *Handbook of food engineering practice*. New York: CRC Press.
- Kotler, P. (1996). *Dirección de mercadotecnia*. (8 ed.). USA: Prentice Hall.
- Kotler, P., & Armstrong, G. (2008). *Principles of marketing*. USA: Prentice Hall.
- Kramer, A., & Twigg, B. (1968). *Measure of frozen food quality and quality change in the freezing preservation of foods*. Westport : AVI Publishing.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). Evaluation of encapsulation techniques for probiotic for yogurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
- Labuza, T. (1999). *Literature review on water activity and glass transition*. Minnesota: Department of food science and nutrition.
- Labuza, T., & Schmidt, M. (1985). Accelerated shelf-life dating of foods. *Food Technology*, 39(9), 57-134.
- Leveau, J., & Bouix, M. (2000). *Microbiología industrial*. Zaragoza: Acribia S.A.
- López, P. (2012). *Desarrollo de una bebida funcional adicionada con Lactobacillus casei y un antioxidante natural (jugo de granada)*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de Licenciatura. UNAM: México.

- Losada, A. (2000). *Envases y embalaje: Historia, tecnología y ecología*. . México D.F.: Librería S.A. de C.V.
- Lozano, P. (2011). *Estudio de la viabilidad de Lactobacillus casei Shirota en una gelatina de pitaya (Stenocereus griseus)*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Tesis de Maestría. IPN: México D.F.
- Lubbers, S., Decourcelle, N., Vallet, N., & Guichard, E. (2004). Flavor release and rheology behaviour of strawberry fatfree stirred yogurt during storage. *J. Agr. Food. Chem.*, 52(10).
- Lucey, J., & Tamehana, M. (1998). Comparación de la formación, propiedades reológicas y microestructurales de geles de leche elaborados por la acidificación de bacterias lácticas. *Food Research International*, 31, 147-155.
- Madene, A., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 4(1), 1-121.
- Madigan, M. (1999). *BROCK: Biología de los microorganismos*. (8 ed.). España: Prentice Hall.
- Madrid, V. (1990). *Manual de industrias lácteas* (2 ed.). Madrid: Mundi Prensa.
- Mancera, J. (2010). *Diseño de una pulpa funcional de frutas y hortalizas con propiedades antioxidantes y prebióticas*. Tesis de Maestría. Univeridad Nacional de Bogotá: Colombia.
- Margariños, H., Cartes, P., Fraser, B., Selaive, S., Costa, M., Figuerola, F., & Pizarro, O. (2008). Viability of probiotic microorganisms (Lactobacillus casei 79 shirota and Bifidobacterium animalis subsp. lactis) in a milk-based dessert with cranberry sauce. *Society of Dairy Tech.*, 61, 96-101.
- Marlett, A., Hosig, B., Vollendorf, W., Shinnick, F., Haack, S., & Story, A. (1994). Mechanism of serum reduction by oat bran. *Hepatology*, 20, 1450-1457.

- Martín, V., Morales, H., Gallardo, L., & Ruíz, M. (2009). *Técnicas de microencapsulación: Una propuesta para microencapsular*. Madrid : Acribia S.A.
- Mazza, G. (2000). *Alimentos funcionales: Aspectos bioquímicos y de procesado*. Zaragoza: Acribia S.A.
- McFaddin. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Medica PAnamericana S.A.
- McMaster, L., Kokott, S., & Mazutti, P. (2005). Micro-encapsulation of Bifidobacterium lactis for incorporation into soft foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 723-728.
- Mercado, S. (1998). *Mercadotecnia programada: Principios y aplicaciones para orientar la empresa hacia el mercado*. (2 ed.). México D.F.: Limusa.
- Moreno, G. (1996). Factores que influyen la supervivencia y la multiplicación de los microorganismos en los alimentos. *Industria alimentaria*, 7(8), 263-268.
- Morkhade, D., & Joshi, S. (2007). Evaluation of gum damar as a novel microencapsulating material for ibuprofen and diltiazem hydrochloride. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(8), 19-25.
- Moya, E., Galussi, A., Reinoso, P., & Soldán, G. (2002). Caracterización varietal de avena sativa y avena bizantina por electroforesis de aveninas y proteínas totales en semillas. *Revista Científica Agropecuaria.*, 6, 41-47.
- Muthukumarasamy, P., Wojitas, P., & Holley, R. (2006). Stability of L. reuteri in different types of microcapsules. *Journal of Food Science*, 71(1), 20-24.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319-323.

Nestlé. (Junio de 2008). *Cereales Integrales*. Obtenido de Food and nutrition communication nestlé: <http://www.nutriguia.com.uy/boletines/junio08/nestle/cerealesintegrales.pdf>

NMX-F-066-S. (1978). *Determinación de cenizas en alimentos*.

NMX-F-068-S. (1980). *Alimentos. Determinación de proteínas*.

NMX-F-102-S. (1978). *Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas*.

NMX-F-103. (1982). *Alimentos, frutas y derivados. Determinación de grados BRIX*.

NMX-F-311. (1997). *Determinación de extracto etéreo en leche en polvo y productos lácteos*.

NMX-F-312. (1978). *Determinación de reductores directos y totales en alimentos*.

NOM-030-SCFI. (2006). *Información comercial. Declaración de la cantidad de etiqueta. Especificaciones*.

Nom-051-SCFI/SSA1. (2010). *Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados. Información comercial y sanitaria*.

NOM-086-SSA1. (1994). *Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales*.

NOM-113-SSA1. (1994). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa*.

NOM-114-SSA1. (1994). *Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos*.

NOM-115-SSA1. (1994). *Bienes y servicios. Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos*.

NOM-116-SSA1. (s.f.). *Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa*.

- NOM-130-SSA1. (1995). *Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.*
- NOM-181-SCFI. (2010). *Yogurt denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.*
- NOM-185-SSA1. (2002). *Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.*
- NOM-F-317-S. (1978). *Determinación de pH de los alimentos.*
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Funcional foods: fiber, prebiotics, probiotics and simbiotics. *DIETA*, 21(121).
- Ospina, M. (2001). *Características físico mecánicas y análisis de calidad de granos.* Colombia: Editorial Universidad Nacional de Colombia.
- Paniagua, B., & Romero, C. (2013). *Desarrollo de una espuma tipo mousse funcional de requesón con Lactobacillus casei.* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Tesis de Licenciatura. UNAM: México.
- Pardio, T., Kryszatof, N., Waliszewski, N., & Robledo, G. (1994). Los probióticos y su futuro. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*, 468(1), 6-10.
- Parra, A. (2011). Microencapsulación de alimentos. *Revista Nacional de Agronomía Medellín*. Recuperado el 17 de Noviembre de 2014, de <http://www.revista.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/25055/37055>
- Parra, H., & Medina, V. (2012). Sobrevivencia y encapsulación de bacterias y su efecto en las propiedades sensoriales, fisicoquímicas y microbiológicas del yogurt. *Redalyc VITAE*, 19(1), 90-92.
- Parson, D. (1983). *Trigo, Cebada, Avena.* México: Trillas.

- Pedroza, R. (2002). Alimentos microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *IV Simposio Internacional de Nutrición Acuícola*.
- Pelton, D., Strutton, J., & J., L. (2005). *Canales de marketing y distribución comercial. Un enfoque de administración de relaciones*. (2 ed.). México D.F.: McGraw Hill.
- Penna, J. (1998). Diarrea y probióticos. *Revista de Enfermedades Infecciosas Pediátricas*, 11(6), 182.
- Pérez, L., Bueno, G., Brizuela, H., Tortoló, C., & Gastón, P. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *ICIDCA*, 47(1), 14-25.
- Pride, W., & Ferrel, O. (1997). *Marketing: Conceptos y estrategias*. México D.F.: McGraw Hill.
- Primo, E. (1987). *Química Agrícola III*. Madrid: Alhambra S.A.
- PROFECO. (2004). *No todo lo que parece leche lo es. Leche, fórmulas lácteas y productos lácteos combinados*. México D.F.
- PROFECO. (2006). *Yogurt y otros lácteos fermentados*. México D.F.
- Ramírez, R., Petra, R., Velázquez, G., Ulloa, A., & Arce, R. (2011). *Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Tepic: Universidad de Nayarit .
- Ramos-Clamont, M., Hernández, G., Fernández, M., Froto, M., & Vázquez, M. (2012). Estrategias para mejorar la sobrevivencia de probióticos en helados. *Revista de ciencias Biológicas y de la Salud.*, 15(2), 31-38.
- Rapp, S., & Collins, T. (1991). *El gran giro de la mercadotecnia*. USA: McGraw Hill.
- Rius, M. (Octubre de 2012). *LIQUATS VEGETALS*. Obtenido de YOSOY avena: <http://www.yosoyavena/bebidadeavena.com>
- Robertsob, G. (1993). *Food packing*. New York: Marcel Dekker.

- Rodon, E., Pacheco, E., & Ortega, F. (2004). Estimación de la vida útil de un análogo comercial de mayonesa utilizando el factor de aceleración Q10. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 4(21), 68-83.
- Rodríguez, B., Montes, M., & Ramírez, J. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. *VITAE*, 19(1).
- Rodríguez, B., Serna, J., Uribe, B., Klotz, M., & Quintanilla, C. (2014). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la concentración de azúcar y de cultivos iniciadores comerciales sobre la cinética de fermentación del yogurt. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 213-225.
- Rodríguez, B., Serna, J., Uribe, B., Klotz, M., & Quintanilla, C. (2014). Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la concentración de azúcar y de cultivos iniciadores comerciales sobre la cinética de fermentación del yogurt. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 13(1), 213-225.
- Rodríguez, V. (2004). *Estimación de la vida útil de la harina de Pejibaye, obtenida por la deshidratación*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica.: San Jose.
- Román, D. (2009). *Alternativas vegetales a la leche*. Madrid: Union vegetariana española.
- Ruíz, R., & Ramírez, M. (2009). Elaboración de yogurt con probióticos (*Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus acidophilus*) e inulina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 26, 223-242.
- Saarela, M., Morgensen, G., Fondé, R., Matto, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technology properties. *Journal Biotechnology*, 84, 197-215.
- SAGARPA. (2010). *Monografía de la avena y semilla de avena para siembra*. Mexico D.F.
- Salmerón, Z. (2003). Agenda técnica para el cultivo de cereales de temporal en el area de influencia del campo experimental "Sierra de Chihuahua". *INIFAP-CIRNC*.
- Sangri, A. (2003). *Introducción a la mercadotecnia*. México D.F.: Grupo Editorial Patria.

- Scade, J. (1981). *Cereales*. Zaragoza: Acribia S.A.
- Schiffin, E., Brassart, D., Servin, A., Rochat, F., & Donnet Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Journal Dairy Science*, 66(2), 15-20.
- Schresenmeir, J., & Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and symbiotics approaching a definition. *Journal Clinical Nutrition*.
- Schultz, T., & Howie, B. (s.f.). In vitro binding of steroid hormones by natural and purified fibers. *Nutr. Cancer*, 8(2), 141-147.
- Schutz, G. (1971). Source of invalidity in the sensory evaluation of food. *Food Technology*, 25(249), 53-57.
- Soriano, G. (2012). *Amaranto. Nutraceutico excepcional*. Mexico D.F.: UNAM.
- Soto, E., & del Val, S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la Stevia rebaudiana. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 20, 5-9.
- Stewart, R. (1971). Sensory evaluation and quality assurance. *Food Technology*, 25, 101-106.
- Stone, J., Sidel, H., Oliver, S., Woisey, A., & Singleton, R. (1974). Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. *Food Technology*, 28(11), 24-34.
- Suárez, G., Bernat, N., Cháfer, M., Chiralt, A., & González, M. (2013). *Estudio preliminar de la fermentación de licuado de avena (Avena sativa) con microorganismos probióticos como alternativa a las leches de origen animal*. Valencia: Universidad Politécnica.
- Sydow, E. (1971). Flavor a chemical or psychophysical concept. *Food Technology*, 25, 40-45.
- Tamime, A., & Robinson, R. (1991). *yogurt ciencia y tecnología*. Zaragoza: Acribia S.A.
- Thomas, R., & Eart, R. (1994). Enhancing the food supply. *Food Science*, 98-142.
- Torres, R. (1999). *Flora intestinal, probióticos y salud*. Guadalajara: Gráfica nueva Yakult .

- Ubéda, G. (2012). *Análisis de perfil de azúcares en la autenticación de zumos de fruta*. . Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Tesis de Maestría. UPC: Colombia.
- Universidad de Madrid. (2008). *Microbiología: Manual de prácticas*. . Madrid: Editorial de la Universidad de Madrid.
- Valencia, S., & Guevará, P. (2013). Variación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos durante el procesamiento del néctar de zarzamora (*Rubus fruticosus*). *Revista de la Sociedad de Química*, 79(2).
- Varnam, H. (1995). *Leche y productos lácteos: Tecnología, química y microbiología*. Madrid: Acribia S.A.
- Vélez, J., & Rivas, A. (2001). Propiedades y características del yogurt. *CTI*, 12(6).
- Villena, M., Morales, H., Lara, G., & Martínez, R. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars. Pharmaceutica*, 50(1), 43-50.
- Vinderola, G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresh cheese. *Journal Dairy Science*, 83, 191-195.
- Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant activity and phenolic content of Oregon cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5, 3495-3500.
- Whelch, W. (1995). Oats in human nutrition and health. *Chapman and Hall*, 1, 433-479.
- Yañez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jiménez, M., Márquez, M., & Ramos, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21(1), 313-319.
- Yuki, N., Watanabe, K., Mike, A., Tagami, Y., Tanaka, R., Ohwaki, M., & Morotomi, M. (1999). Survival of a probiotic *Lactobacillus casei* Shirota, in the gastrointestinal tract: selective isolation from feces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal Food Microbiology*, 47, 51-57.

ANEXOS.

ANEXO 1: Equipo.

El equipo mencionado en este apartado se empleó durante la etapa experimental de este proyecto:

Equipo:	Marca:	Modelo:
Balanza Analítica con sensibilidad de 0.1 mg.	WIGGEN HAUSER	J1204
	AUGUST SAUTER GMBH	D-7470
Balanza de determinación de humedad equipada con una lámpara infrarroja de 250 W.	OHAUS	Mb25
Baño de agitación recíproca Thermo Precision de 26.5 L.	THERMO SCIENTIFIC	25
Cuenta colonias.	REICHERT TECNOLOGI	DARKFIELD QUEBEC
Horno o estufa eléctrica con control de temperatura.	MAPSA	HDP-334
Incubadora anaeróbica.	BLUE M LINDBERG	GI 100 A
		200^a
Micro destilador Kjendahl.	LABCONCO	
Micro digestor de seis plazas Kjendahl.		230 V
Mufla	BLUE M	M25A-2^a
Potenciómetro PH/MV resolución de pH \pm 0.01 y temperatura 0.0 a 100 °C.	CORNING	220
	HANNA	8521
Refractómetro Abbé con valores límites 0 a 85 ° Brix.	BAUSCH & LOMB	33-46-10
Refrigerador sin congelador con variación de temperatura de \pm 0.1 °C.	LG	GR-282SF
Texturómetro con capacidad de carga de 1 KN a 225 lb/in ² , rango de velocidad de 0.5 a 1270 mm/min.	LLOYD	TA-500

ANEXO 2: Composición química de los medios de cultivo.

- **Medio Láctico:**

Reactivos:	Cantidad (g):
Acetato De Sodio Trihidratado:	1.50
Ácido Ascórbico:	0.50
Bactogelatina (gelatina):	2.50
Extracto De Levadura:	5.00
Glucosa:	5.00
Lactosa:	5.00
NaCl	4.00
Triptona:	20.0
H ₂ O Destilada:	1 L

Nota: Para llevar a cabo la elaboración de agar láctico, se adiciona 14 g de agar.

- **Medio Rogosa (MRS):**

Reactivos:	Cantidad (g):
Extracto De Carne:	5.0
Extracto De Levadura:	2.5
Ácido Ascórbico:	0.5
Peptona De Soya:	5.0
Peptona De Caseína:	5.0
Acetato De Sodio Trihidratado:	3.0
Dextrosa:	5.0
H ₂ O Destilada:	1 L

Nota: Para llevar a cabo la elaboración de agar rogosa, se adiciona 14 g de agar.

ANEXO 3. Determinación del tamaño de muestra para la aplicación del estudio de mercado y establecimiento de los intervalos de confianza.

- Selección del tamaño de muestra para la aplicación del estudio de mercado.

Con el fin de obtener datos confiables de las encuestas aplicadas, se seleccionó un tamaño muestral a partir de una ecuación estadística de proporciones (debido a que los datos obtenidos serían datos categóricos), como se muestra a continuación:

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 P(1 - P)}{d^2}$$

Dónde:

n: Tamaño muestral

Z_{α/2}: Valor de “Z” de tablas, para un nivel de confianza del 95% es de 1.96

P: Proporción

d: Error máximo de estimación

Se seleccionó el tamaño muestral en función a nuestra pregunta más significativa (si lo consumirían o no), con una proporción de 0.4, un nivel de confianza del 95% y un error máximo de estimación de 0.15, obteniéndose un total de 40 encuestas a realizar.

- Determinación de los intervalos de confianza para el estudio de mercado.

Se determinaron a partir de la siguiente ecuación para proporciones y se calcularon para cada una de las respuestas.

$$\frac{X}{n} - Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{P(1 - P)}{n}} < p < \frac{X}{n} + Z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{P(1 - P)}{n}}$$

Dónde:

X: Número de respuesta para ese dato categórico

n: Tamaño muestral

$Z_{\alpha/2}$: Valor de "Z" de tablas, para un nivel de confianza del 95% es de 1.96

P: Proporción, relación de X/n

Intervalos de confianza obtenidos para las respuestas obtenidas del estudio de mercado.

Pregunta	Opciones	Respuesta	Intervalo de confianza		
1	a. Nada	9	0.09559	<P<	0.35441
	b. 1 hora	0	0.00000		0.00000
	c. Media hora	13	0.17985		0.47015
	d. 15 minutos	18	0.29583		0.60417
	e. Otro	0	0.00000		0.00000
2	SI	35	0.77251	<P<	0.97749
	NO	5	0.02251		0.22749
3	a. Yogur	30	0.61581	<P<	0.88419
	b. Flan	24	0.44818		0.75182
	c. Natilla	21	0.37024		0.67976
	d. Mousse	31	0.64559		0.90441
4	a. Diariamente	6	0.03934	<P<	0.26066
	b. Cada tercer día	8	0.07604		0.32396
	c. Una vez por semana	16	0.24818		0.55182
	d. Otro	7	0.05725		0.29275
5	a. Si conozco, pero no las consumo.	20	0.34505	<P<	0.65495
	b. No conozco y no las consumo.	7	0.05725		0.29275
	c. Si conozco y las consumo.	3	0.01574		0.15663

	d. No conozco, pero me interesaría consumirlas.	10	0.11581		0.38419
6	SI	26	0.50219	<P<	0.79781
	NO	14	0.20219		0.49781
7	SI	9	0.09559	<P<	0.35441
	NO	31	0.64559		0.90441
8	SI	37	0.84337	<P<	0.98426
	NO	3	0.01574		0.15663
9	a. Yogur	28	0.55798	<P<	0.84202
	b. Flan	5	0.02251		0.22749
	c. Natilla	5	0.02251		0.22749
	d. Mousse	0	0.00000		0.00000
10	a. Natural	4	0.00703	<P<	0.19297
	b. Arándano	4	0.00703		0.19297
	c. Zarzamora	20	0.34505		0.65495
	d. Kiwi	5	0.02251		0.22749
	e. Otro	6	0.03934		0.26066
11	SI	38	0.88246	<P<	0.99389
	NO	1	0.00063		0.07338
12	a. De 3 - 6 pesos	12	0.15798	<P<	0.44202
	b. De 6 - 10 pesos	23	0.42180		0.72820
	c. De 10 - 15 pesos	2	0.00611		0.11754
	d. Otro	1	0.00063		0.07338

ANEXO 4. Resultados del análisis de varianza para la elección de los prototipos.

		Grados de libertad:	Suma de cuadrados:	Valor F:	Valor p:
ACIDEZ	Edulcorante	1	85.56	24.7578	3.102x10 ⁻⁶
	Pulpa	1	0.20	0.0583	0.8097
	F (Juez)	30	130.24	1.2563	0.2045
	Interacción	1	419.23	121.3131	2.2x10 ⁻¹⁶
	Residuo	90	311.02		
DULZOR	Edulcorante	1	16.696	6.2109	0.01453
	Pulpa	1	137.341	51.0916	2.237x10 ⁻¹⁰
	F (Juez)	30	147.794	1.8327	0.01518
	Interacción	1	45.970	17.1010	7.946x10 ⁻⁵
	Residuo	90	241.931		
SENSACIÓN DE ESFERAS	Edulcorante	1	0.20	0.1213	0.728435
	Pulpa	1	13.56	8.1567	0.005327
	F (Juez)	30	364.42	7.3088	9.246x10 ⁻¹⁴
	Interacción	1	2.91	1.7517	0.189019
	Residuo	90	149.58		
APARIENCIA	Edulcorante	1	4.266	1.3809	0.243051
	Pulpa	1	72.782	23.558	5.066x10 ⁻⁶
	F (Juez)	30	187.50	2.0230	0.005769
	Interacción	1	22.653	7.3325	0.008104
	Residuo	90	278.04		
SABOR	Edulcorante	1	1.70	0.4797	0.49036
	Pulpa	1	173.08	48.9627	4.4x10 ⁻¹⁰
	F (Juez)	30	197.67	1.8640	0.01297
	Interacción	1	2.76	0.7808	0.37925
	Residuo	90	318.15		
OLOR	Edulcorante	1	0.583	0.2801	0.59794
	Pulpa	1	10.744	5.1648	0.02543
	F (Juez)	30	289.73	4.6426	8.14x10 ⁻⁹
	Interacción	1	3.389	1.6292	0.20510
	Residuo	90			

ANEXO 5. Psicología del color empleada en el diseño de la etiqueta del producto.

Color:	Significado psicológico:
 Blanco	Se halla en los extremos de la gama de los grises. Tiene un valor límite, frecuentemente extremos de brillo y de saturación, y también un valor neutro (ausencia de color). También es un valor latente capaz de potenciar los otros colores vecinos. Puede expresar paz, soleado, feliz, activo, puro e inocente; crea una impresión de luminosidad de vacío positivo y de infinito. El blanco es el fondo universal de la comunicación gráfica.
 Negro	Es el símbolo del silencio, del misterio y, en ocasiones puede significar impuro o maligno. Confiere nobleza y elegancia, sobre todo cuando es brillante.
 Gris	Es el centro de todo, pero es un centro neutro y pasivo, que simboliza la indecisión y la ausencia de energía, expresa duda y melancolía. Simbólicamente el blanco y negro con sus degradaciones en gris, son el color de la lógica y de lo esencial.
 Azul	Símbolo de la profundidad. Inmaterial y frío, suscita una predisposición favorable. Es un color reservado y entra dentro de los colores fríos, expresa armonía, amistad, fidelidad, serenidad, sosiego, posee la virtud de crear la ilusión óptica de retroceder. Este color se asocia al cielo, el mar y el aire, en sus tonos claro sugiere optimismo. Cuando más se clarifica más pierde atracción y se vuelve indiferente y vacío. Cuando más se oscurece más atrae al infinito.
 Violeta	Es el color de la templanza, de la lucidez y de la reflexión. Es místico, melancólico y podría representar también la introversión. Cuando del violeta se deriva el lila o morado, se aplana y pierde su potencial de concentración positiva. Cuando tiende al púrpura proyecta una sensación de majestad.

ANEXO 6: Determinación del costo unitario del producto.

Para llevar a cabo este análisis de costos se tuvieron en cuenta los precios ofertados en el 2014 de cada una de las materias primas y del envase.

Cantidad:		Concepto:	Costo (\$):	Cantidad empleada para elaborar 1 L de producto fermentado de avena:		Total (\$):
4	L	Agua para beber (Gerber).	21.00	0.918	L	4.80
10	Kg	Avena <i>sativa</i> de costal selecta.	140.00	80	g	1.20
1	Kg	Glucosa Anhídrida grado alimenticio.	82.50	30	g	2.50
360	g	Leche en polvo (Nestle Svelty).	40.00	80	g	9.00
900	g	Savien (Stevia/ Sacarosa/ Fructosa).	32.00	30	g	1.10
500	g	Goma Guar (P.I.Q.)	162.00	2	g	0.70
1.80	g	Cultivos lácticos liofilizados (Sacco).	126.00	0.018	g	2.50
50	g	Alginato de sodio.	48.80	0.15	g	0.15
1	Kg	CaCl ₂	17.50	6	g	0.11
50	ml	<i>Lactobacillus casei</i>	1.00	50	ml	1.00
0.750 L de producto fermentado de avena sin sabor:				0.750	L	16.50

4	L	Pulpa de zarzamora (Ricco aroma).	134.00	0.250	L	8.50
10	g	L. <i>casei</i> encapsulado.	1.26	1	L	1.26
1 kg de producto fermentado de avena sabor zarzamora:				1	L	26.30
De 1 kg de producto fermentado de avena sabor zarzamora se obtienen 12 porciones:				80	ml	2.20
1000	Pzas.	Envases de HDPE de 80 ml y tapas troqueladas, marca bio empak.	1600.00	1	Pza.	1.60
Costo unitario por porción de 80 ml de producto fermentado de avena:				1	Pza.	3.80
Costo unitario por porción de 80 ml de producto + el 30% del precio para considerar rentable el proceso:				1	Pza.	4.95
Costo unitario redondeado:				1	Pza.	5.00

ANEXO 7. Resultados de análisis de regresión para vida útil.

		Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
pH	Regresión	1	0.01044	0.01044727	113.4079	4.0416x10 ⁻⁵
	Residuos	6	0.00055	9.2121x10 ⁻⁵		
	Total	7	0.011			
ACIDEZ	Regresión	1	0.10652	0.1065	71.5535	0.00015
	Residuos	6	0.00893	0.0015		
	Total	7	0.11546			
CONCENTRACIÓN DE m.o. libre	Regresión	1	5.0544x10 ¹⁷	5.0544x10 ¹⁷	36.9807	0.00089
	Residuos	6	8.2006x10 ¹⁶	1.3667x10 ¹⁶		
	Total	7	5.8744x10 ¹⁷			
SINÉRESIS	Regresión	1	206.2251	206.22513	970.5729	7.2642x10 ⁻⁸
	Residuos	6	1.2748	0.21247		
	Total	7	207.5			
ENCAPSULACIÓN	Regresión	1	665.6034	665.6034	13.9732	0.0096
	Residuos	6	285.8047	47.6341		
	Total	7	951.4081			
m.o. ENCAPSULADO	Regresión	1	6.5225	6.52255	8.9199	0.0244
	Residuos	6	4.3873	0.7312		
	Total	7	10.9099			