

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

“ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA BAJA EN CALORÍAS A PARTIR DEL SUERO DULCE OBTENIDO COMO SUBPRODUCTO EN LA ELABORACIÓN DE QUESO FRESCO CON BIFIDUM BACTERIUM SABORIZADA CON DURAZNO”

Trabajo de titulación previo la obtención
del título de Ingeniero Químico

AUTOR:

HENRY MARCELO CAJAMARCA HUAYLLAZACA

CI: 0104394408

DIRECTORA:

ING. PATRICIA LILIANA RAMÍREZ JIMBO

CI: 0103542981

CUENCA-ECUADOR

2017



Resumen

El trabajo de titulación está enfocado en realizar una bebida tipo funcional a partir del suero de leche que se obtiene como subproducto en la elaboración de queso fresco para tener una bebida de gran valor nutricional, contiene lactosa en grandes proporciones como carbohidrato estructural, lo que permite el crecimiento y multiplicación de las bacterias, mediante esta ventaja, este trabajo de investigación se basó en aprovechar el suero dulce de leche en la elaboración de bebidas fermentadas mediante la utilización del fermento Bifidum bacterium dándonos unas mezclas de bacterias probióticas y vitaminas y a estas se les añadió otros aditivos como estabilizadores, pulpas de frutas, para mejorar las características organolépticas y nutricionales del producto final, prolongar la durabilidad de la misma. La bebida proporcionará beneficios para la salud del ser humano, puede estimular la respuesta inmune, modular la motilidad gastrointestinal, prevenir la aparición de diarreas, y proteger contra la infección al ser humano.

Se realizó los análisis físico-químicos, bromatológicos y microbiológicos del suero y de la bebida terminada para determinar si cumplen las normas establecidas, se realizó análisis estadístico con los datos obtenidos de los análisis de acuerdo con los objetivos planteados, se realizó una prueba de la aceptación del producto mediante una encuesta que tiene por objeto evaluar la aceptación de un nuevo producto que consiste en bebida de tipo funcional, se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental.

Palabras Clave: Leche, suero dulce, probiótico, alimento funcional, fermento, bebida funciona, microorganismos.



Abstract

This titration work is focused on making a functional type drink from the sweet whey that is obtained as a by-product in the elaboration of fresh cheese to have a drink of great nutritional value, it contains lactose in great proportions as structural carbohydrate, Which allows the growth and multiplication of bacteria, to this advantage, this research work was based on the use of sweet whey in the production of fermented beverages by using the ferment Bifidum bacterium giving us a mix of probiotic bacteria and vitamins and to these we added other additives as stabilizers, fruit pulps, to improve the organoleptic and nutritional characteristics of the final product, to prolong the durability of the same.

This beverage will provide benefits to human health, it can stimulate the immune response, modulate gastrointestinal motility, prevent the onset of diarrhea, and protect against human infection.

The investigation the physical-chemical, bromatological and microbiological analyzes of the serum and the finished beverage were carried out to determine if they met the established standards, a statistical analysis was performed with the data obtained from the analyzes according to the objectives set, a Proof of acceptance of the product through the application of a survey to evaluate the acceptance of a new product consisting of a functional beverage, this refers to those processed foods which contain ingredients that play a specific role in the physiological functions of the human organism, beyond Of its nutritional content.

Keywords: Milk, sweet whey, probiotic, functional food, yeast, beverage, microorganisms.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVO GENERAL:	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	17
1. CAPITULO 1: Contenido Teórico	18
1.1 Leche.....	18
1.2 Leche cruda de vaca.	18
1.3 Productos lácteos.	18
1.3.1 Tipos de productos lácteos:.....	18
1.4 El Suero de leche liquido.....	19
1.4.1 Tipos de suero de leche	19
1.5 Requisitos del suero.....	20
1.5.1 Los requisitos físicos químicos y microbiológicos del suero de leche	20
1.6 Propiedades nutricionales del suero de leche.....	21
1.7 Aprovechamiento del suero de leche.....	23
1.7.1 Usos del suero de leche.....	23
1.7.1.1 Obtención de las proteínas.....	24
1.7.1.2 Obtención de la lactosa.....	24
1.8 Alimentos funcionales.....	25
1.8.1 Probióticos	26
1.8.2 Prebióticos	27
1.8.3 Simbióticos.....	28
1.9 Bebidas.....	28
1.9.1 Bebidas Fermentadas.....	28
1.9.2 Bebidas funcionales	29
1.10 Alimentos fermentados.....	29
1.11 Fermentación	29
1.11.1 Medios de fermentación	31
1.11.2 Tipos de fermentación	31
1.11.2.1 Alcohólica	31
1.11.2.2 Láctica.....	32
1.12 Probiótico Bifidobacterium.....	34
1.12.1 Características culturales y morfológicas.....	34



2. CAPITULO II: Diseño de estudio	36
2.1 Localización del trabajo de titulación	36
2.2 Descripción del proceso.	36
2.3 Materiales y reactivos	37
2.4 Descripción de materia prima empleada para la bebida.	38
2.4.1 Leche.	38
2.4.2 Suero dulce de leche.	38
2.4.3 Fermento probiótico (Bifidobacterium BB-12).	38
2.4.4 Pulpa de fruta	39
2.4.5 Benzoato de Sodio	39
3. CAPITULO III: Descripción de los productos y análisis	40
3.1 Desarrollo de queso fresco.	40
3.1.1 Procedimiento.	40
3.1.2 Diagrama del proceso de queso fresco	41
3.2 Proceso de fermentación.	42
3.2.1 Procedimiento	42
3.2.2 Diagrama del proceso de fermentación.	43
3.3 Desarrollo de la bebida fermentada.	44
3.3.1 Procedimiento.	44
3.3.2 Diagrama del proceso de la bebida fermentada.	47
3.4 Análisis de calidad de la leche para la elaboración de queso.	48
3.5 Análisis físico-químico del suero dulce de leche.	48
3.5.1 Acidez titulable.	48
3.5.1 Fundamento.	48
3.5.2 Materiales y reactivos	49
3.5.3 Procedimiento	49
3.5.4 Diagrama del proceso de la medición de la acidez titulable. .. 50	
3.5.2 pH del suero dulce.	51
3.5.2.1 Fundamento.	51
3.5.2.2 Equipos y reactivos	51
3.5.2.3 Procedimiento.	51
3.5.2.4 Diagrama del proceso de la medición del pH.	52
3.5.3 Análisis de la proteína, grasa, % de agua y densidad	52



3.5.3.1	Fundamento.....	52
3.5.3.2	Procedimiento.....	53
3.5.3.3	Diagrama del proceso de la medición de los diferentes parámetros en el quipo MILKOTESTER.	53
3.6	Análisis microbiológico del suero dulce de leche.	54
3.6.1	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos.	54
3.6.1.1.	Fundamento.....	54
3.6.1.2.	Diagrama del proceso del recuento de aerobios mesófilos.	55
3.6.2	Recuento estándar en placa de Escherichia coli	55
3.6.2.1	Fundamento.....	56
3.6.2.2	Diagrama del proceso del recuento de Echerichia coli.....	57
3.6.3	Detección de Salmonella.....	58
3.6.3.1	Fundamento.	58
3.6.3.2	Diagrama del proceso de detección de salmonella.....	59
3.7	Análisis físico-químico de la bebida fermentada.....	59
3.7.1	pH del de la bebida fermentada.....	59
3.7.1.1	Fundamento.....	60
3.7.1.2	Equipos y reactivos.....	60
3.7.1.3	Procedimiento:	60
3.7.1.4	Diagrama del proceso de la medición del pH.	61
3.7.2	Análisis para la determinación del % de grasa	61
3.7.2.1	Fundamento.....	61
3.7.2.2	Materiales y reactivos	62
3.7.2.3	Procedimiento.....	62
3.7.2.4	Diagrama del proceso de determinación del % de grasa en la bebida fermentada.	64
3.7.3	Análisis para la determinación del % de glúcidos totales.	65
3.7.3.1	Fundamento.	65
3.7.3.2	Diagrama del proceso de determinación del % de glúcidos en la bebida fermentada.	66
3.7.4	Análisis para la determinación del % de proteína.....	67
3.7.4.1	Fundamento.	67
3.7.4.2	Equipos y reactivos.....	67
3.7.4.3	Procedimiento.....	68



3.7.4.4	Diagrama del proceso de determinación del % de proteína en la bebida fermentada.....	71
3.7.5	Acidez de la bebida fermentada.....	72
3.7.5.1	Fundamento.....	72
3.7.5.3	Procedimiento.....	72
3.7.5.4	Diagrama del proceso de la medición de la acidez.....	74
3.8	Análisis microbiológico de la bebida fermentada.....	75
3.8.1	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos.....	75
3.8.1.1	Fundamento.....	75
3.8.1.2	Diagrama del proceso del recuento de aerobios mesófilos.....	76
3.8.2	Recuento estándar en placa de Escherichia coli.....	77
3.8.2.1	Fundamento.....	77
3.8.2.2	Diagrama del proceso del recuento de Echerichia coli.....	78
3.8.3	Detección de Salmonella.....	79
3.8.3.1	Fundamento.....	79
3.8.3.2	Diagrama del proceso de detección de salmonella.....	80
3.9	Valoración de la viabilidad del cultivo probiótico.....	80
3.9.1	Fundamento.....	81
3.9.2	Materiales y medios de cultivo.....	81
3.9.3	Procedimiento.....	82
3.9.4	Diagrama del proceso del recuento de aerobios mesófilos....	84
4.	CAPITULO IV: Resultados y Discusiones.....	86
4.1	Resultado del análisis de calidad de la leche para la elaboración de queso.....	86
4.2	Resultados en la elaboración de queso:.....	86
4.3	Resultados de los análisis físico-químico del suero dulce de leche. 87	
4.3.1	Acidez del suero de leche.....	87
4.3.2	pH del suero de leche.....	87
4.3.3	Resultado de los análisis de: %proteína, %grasa, % de agua y densidad del suero a ser utilizado.....	88
4.4	Análisis microbiológicos del suero dulce de leche.....	88
4.5	Resultado del proceso de fermentación.....	89
4.5.1	Proceso de fermentación del suero.....	89



4.5.2	Resultado de la medición de pH en el proceso de fermentación	90
4.6	Resultados de la elaboración de la Bebida Fermentada.....	93
4.6.1	Cálculos para la elaboración de la bebida.....	93
4.6.2	Resultados de la medición del pH del proceso de la bebida fermentada.	94
4.7	Formulación de la bebida	95
4.7.1	Cálculos para la formulación de la bebida	95
4.7.2	Resultados de la formulación de la bebida	96
4.8	Resultado de los análisis físico-químicos de la bebida fermentada.	96
4.8.1	pH.....	96
4.8.2	Resultado de análisis del %proteína, %grasa, %glúcidos y %acidez de la bebida fermentada	96
4.9	Análisis microbiológico de la bebida fermentada.	97
4.10	Valoración de la viabilidad del cultivo probiótico.....	98
4.11	Cuantificación de los microorganismos aerobios	98
4.12	Cuantificación de probióticos	99
4.13	Resultado de la medida del pH de la bebida	101
4.14	Resultado del análisis de la aceptación sensorial de la bebida fermentada.....	102
5.	Conclusiones.....	106
6.	Recomendaciones.....	107
7.	Bibliografía.....	108
8.	ANEXOS	111
7.1	Anexo 1: Ficha Técnica.....	112
7.2	Anexo 2: Pruebas de IMViC.....	116
7.3	Anexo 3: Prueba del indol	117
7.4	Anexo 4: Tabla Contenido de componentes y concentraciones permitidas en los alimentos y semáforo alimenticio de la bebida fermentada.....	118
7.5	Anexo 5: Encuesta.....	119
7.6	Anexo 6: Resultado de análisis.....	120
7.7	Anexo 7: Fotografías.....	125



Índice de tablas

Tabla 1: Requisitos físico-químicos de la leche cruda. Elaborado por: Autor. Fuente: (INEN 0009, 2012)	18
Tabla 2: Requisitos físico-químicos del suero de leche. Elaborado por: Autor. Fuente: (INEN 2594, 2011)	21
Tabla 3: Requisitos microbiológicos para el suero de leche. Elaborado por: Autor. Fuente: (INEN 2594, 2011)	21
Tabla 4: Funciones biológicas de las proteínas de la leche. Elaborado por: Autor. Fuente: (Hernandez , 2014)	23
Tabla 5: Aplicaciones del suero de leche y sus beneficios. Elaborado por: Autor. Fuente: (Poveda E., 2013)	25
Tabla 6: Influencia de las bacterias probióticas en la salud: Elaborado por: Autor. Fuente: (Taranto, Médici , & Font de Valdez, 2005)	26
Tabla 7: Tipos de Fermentación y sus productos industriales. Elaborado por: Autor. Fuente: (Puerta Quintero, 2010)	33
Tabla 8: Materiales, equipos y reactivos e insumos .Fuente: Autor.	37
Tabla 9: Materiales y reactivos para la medición de la acidez titulable. Fuente: Autor.	49
Tabla 10: Equipos y reactivos para la medición del pH del suero. Fuente: Autor	51
Tabla 11: Equipos y reactivos para la medición del pH del suero. Fuente: Autor	60
Tabla 12: Materiales y reactivos para el proceso de la determinación del % de grasa. Fuente: Autor	62
Tabla 13: Materiales y reactivos para el proceso de la determinación del % de proteína. Fuente: Autor	68
Tabla 14: Materiales y reactivos para la medición de la acidez titulable. Fuente: Autor.	72
Tabla 15: Materiales y medios de cultivo para el recuento de aerobios mesófilos. Fuente: Autor	82
Tabla 16: Escala de calificación de la bebida fermentada. Fuente: Autor.	85
Tabla 17: Análisis de calidad de la leche. Fuente: Autor	86
Tabla 18: Datos para la determinación de la acidez del suero de leche. Fuente Autor.	87
Tabla 19: Determinación de la acidez del suero. Fuente: Autor	87
Tabla 20: Análisis de proteína, grasa, agua y densidad. Fuente: Autor	88
Tabla 21: Análisis microbiológico del suero dulce de leche. Fuente: Laboratorio de Análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.....	89
Tabla 22: Resultados para el proceso de fermentación. Fuente: Autor.	89
Tabla 23: Medición de pH en los diferentes tratamientos. Fuente: Autor.....	90
Tabla 24: Determinación de crecimiento de microorganismos. Fuente: Autor. 91	
Tabla 25: Resultados de los diferentes tratamientos. Fuente Autor.....	93
Tabla 26: Cálculos para porcentaje de fermento en la bebida final. Fuente: Autor.	93
Tabla 27: Medición del pH vs tiempo en la fermentación en el proceso de la bebida fermentada. Fuente: Autor.....	94



Tabla 28: Resultado de la formulación de la bebida. Fuente: Autor.....	96
Tabla 29: Análisis de proteína, grasa, glúcidos y acidez de la bebida fermentada. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.....	96
Tabla 30: Análisis microbiológico de la bebida fermentada. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.	97
Tabla 31: Recuento de microorganismos de la bebida fermentada. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.	98
Tabla 32: Recuento de aerobios. Fuente: Autor.	98
Tabla 33: Cuantificación de microorganismos probióticos. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.	99
Tabla 34: Datos para la gráfica de recuento de probióticos. Fuente: Autor. ...	100
Tabla 35: Medida del pH vs tiempo en la bebida fermentada. Fuente: Autor..	101
Tabla 36: Tabulación de las variables de la bebida 1. Fuente: Autor.....	104
Tabla 37: Clasificación de coliformes por las pruebas "IMViC". Fuente: INEN 1529-8.....	116
Tabla 38: Contenido de componentes y concentraciones permitidas en los alimentos. Fuente: INEN 0022	118

Índice de imágenes

Imagen 1: Morfología del género Bifidobacterium. Fuente: (Collado, 2004) ...	35
Imagen 2: Fermento Probiótico (Bifidumbacterium BB-12). Fuente Autor.	38
Imagen 3: Diagrama de proceso de elaboración de quesos. Fuente: Autor. ..	41
Imagen 4: Diagrama de proceso de Fermentación. Fuente: Autor.	43
Imagen 5: Proceso de Centrifugación. Fuente: Autor.....	44
Imagen 6: Inoculación. Fuente: Autor.....	45
Imagen 7: Proceso de fermentación. Fuente: Autor	46
Imagen 8: Diagrama del proceso de elaboración de la bebida fermentada. Fuente: Autor.	47
Imagen 9: Diagrama de medición de la acidez titulable. Fuente: Autor.	50
Imagen 10: Diagrama de medición del pH del suero. Fuente: Autor.....	52
Imagen 11: Diagrama del proceso de medición en el quipo MILKOTESTER. Fuente: Autor.	53
Imagen 12: Diagrama del proceso de recuento de aerobios mesófilos. Fuente: Autor.	55
Imagen 13: Diagrama del proceso de recuento de Escherichia coli. Fuente: Autor.	57
Imagen 14: Diagrama del proceso de detección de salmonella. Fuente: Autor.	59
Imagen 15: Diagrama del proceso de medición del pH. Fuente: Autor.....	61
Imagen 16: Diagrama del proceso de determinación del % de grasa. Fuente: Autor.	64
Imagen 17: Diagrama del proceso para la determinación del % de glúcidos. Fuente: Autor.	66
Imagen 18: Diagrama del proceso para la determinación del % de proteína. Fuente: Autor.	71



Imagen 19: Diagrama del proceso de medición de la acidez. Fuente: Autor. .	74
Imagen 20: Diagrama del proceso de recuento de aerobios mesófilos. Fuente: Autor.	76
Imagen 21: Diagrama del proceso de recuento de Escherichia coli. Fuente: Autor.	78
Imagen 22: Diagrama del proceso de detección de salmonella. Fuente: Autor.	80
Imagen 23: Diagrama del proceso de recuento de aerobios mesófilos. Fuente: Autor.	84
Imagen 24: Semáforo alimenticio de la bebida fermentada. Fuente: Autor: ...	118

Índice de graficas

Gráfica 1: Variación del pH vs el tiempo en la fermentación en los diferentes tratamientos. Fuente: Autor	91
Gráfica 2: Proceso de fermentación experimento 1: Fuente Autor.	92
Gráfica 3: Proceso de fermentación experimento 2: Fuente Autor.	92
Gráfica 4: Variación del pH vs el tiempo en la fermentación de la bebida fermentada.....	94
Gráfica 5: Recuento de aerobios vs tiempo. Fuente: Autor.	99
Gráfica 6: Recuento del probiótico vs tiempo. Fuente: Autor.....	100
Gráfica 7: Medición del pH vs tiempo en la bebida fermentada. Fuente: Autor.	101
Gráfica 8: Tabulación de pregunta 1.- ¿Conoce de algún tipo de bebida funcional que se venda en la localidad? Fuente: Autor.	103
Gráfica 9: Resultado de encuesta de aceptación del producto. Fuente: Autor.	104
Gráfica 10: Tabulación de la pregunta 3.- ¿Compraría este tipo de bebida? Fuente Autor.	105



Universidad de Cuenca
Clausula de derechos de autor

Henry Marcelo Cajamarca Huayllazaca, autor del trabajo de titulación “Elaboración de una bebida fermentada baja en calorías a partir del suero dulce obtenido como subproducto en la elaboración de queso fresco con bifidum bacterium saborizada con durazno”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Ingeniero Químico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 05 de diciembre del 2016

Henry Marcelo Cajamarca Huayllazaca

C.I: 0104394408



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

Henry Marcelo Cajamarca Huayllazaca, autor de la tesis "Elaboración de una bebida fermentada baja en calorías a partir del suero dulce obtenido como subproducto en la elaboración de queso fresco con bifidum bacterium saborizada con durazno", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 05 de diciembre del 2016

Henry Marcelo Cajamarca Huayllazaca

C.I: 0104394408



AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios por darme salud y vida, guiar mi camino y poder culminar esta etapa tan importante en mi vida. A mi madre que me ha demostrado su confianza, su apoyo, amor siempre corrigiendo mis errores, como también celebrando mis triunfos. A mi padre por ser mi guía, por su apoyo económico y sé que esta tan feliz como yo por mi logro. A mis hermanos que hemos compartido tantos momentos inolvidables, son las personas más importantes en mi vida. A mi enamorada que está a mi lado incluso en mis momentos y situaciones más difíciles. A mi maestros a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanza y finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa universidad la cual abre sus puertas a muchos jóvenes como yo, preparándonos para un futuro y formándonos como personas de bien.



DEDICATORIA

Este trabajo de titulación va dedicado a mi madre María Huayllazaca de una manera muy especial quien a lo largo de mi vida ha velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Sabiendo formarme con buenos sentimientos y valores lo cual me ayudado a salir en adelante en mis momentos difíciles por ser el pilar más importante en mi vida, demostrándome su amor, confianza. A mi padre Ángel Cajamarca que a pesar de la distancia ha estado conmigo dándome sus consejos, brindándome su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar de mi capacidad. A mi hermano Edwin que ha sido un ejemplo para mí, apoyándome aconsejándome muchas veces siendo el papel de padre, ha sabido guiarme para culminar mi carrera profesional. De la misma manera dedico a mis hermanos William, María y Ángel a quienes adoro. A mi enamorada que ha permanecido a mi lado y forma parte de mis logros. También a mis maestros que estuvieron brindándome su apoyo y conocimientos en las buenas y malas para así poder culminar mi carrera profesional.



INTRODUCCIÓN

El concepto de alimentos funcionales presenta una nueva tendencia en la industria de alimentos y bebidas, no sólo por sus características alimenticias sino con la función específica de mejorar la salud y prevenir enfermedades. Las bebidas funcionales son productos que poseen componentes fisiológicos que complementan su aporte nutricional y que representan un beneficio extra para la salud de las personas, como por ejemplo en el metabolismo del colesterol, la mineralización ósea y la reducción de riesgos de enfermedad.

La fabricación de queso dentro de empresas lácteas en nuestra ciudad consume gran cantidad de leche, dando inevitablemente lugar a la producción de una cantidad excesiva de lacto suero. En la producción de quesos el 85% de la transformación de leche en queso termina como suero dulce de leche. Como consecuencia el suero dulce de leche es un subproducto de la elaboración del queso y este suero se caracteriza por el color amarillo-verdoso, posee un alto valor nutritivo debido a la presencia de proteínas (entre la que se destacan la α -lacto-albúmina y la β -lacto- globulina), las vitaminas del complejo B, y minerales como el calcio y el fósforo. El problema tendríamos en que el suero se desperdicia al no darle un uso apropiado gracias a su alto valor nutritivo, teniendo en cuenta que en el mercado de alimentos y bebidas saludables ha experimentado un crecimiento constante en la última década, impulsada por una serie de factores, como el aumento de la presión a los productores para reducir el contenido de ingredientes nocivos a la salud, cambios de estilo de vida de los consumidores, la parte del suero es vertido como efluente a los ríos convirtiéndose en el contaminante principal de la industria láctea. Esta situación genera que las fuentes de agua cercanas a las industrias queseras estén altamente contaminadas por la gran cantidad de sustancia orgánica que el suero aporta perjudicando a las poblaciones aledañas y causando graves daños al medio ambiente. Esto ha llevado al desarrollo e investigación de una variedad de productos alimenticios y bebidas funcionales, actualmente la población requiere alimentos novedosos que cubran sus necesidades nutricionales, de fácil acceso y que le proporcione un beneficio a la salud, la respuesta se encuentra en la propuesta de elaborar una bebida funcional con elevada calidad nutricional y que además proporcione satisfacción al paladar de los consumidores



aprovechando el suero dulce de leche para la elaboración de bebidas fermentadas mediante la utilización del fermento Bifidum bacterium dándonos unas mezclas de bacterias probióticas y vitaminas. La calidad nutricional del suero es muy importante pues contiene el 25 % de las proteínas de la leche de las cuales presentan una importante actividad biológica además de que se absorbe más rápido que cualquier otra proteína y los músculos reciben esos aminoácidos después de poco tiempo de ser ingerida. Considerando la información anterior que en el suero se considera como un subproducto de la elaboración de quesos y de alto contenido nutricional, lo que origina que el costo sea muy bajo, permite elaborar un producto de excelente calidad nutricional y sensorial, evitando que este recurso con tantas cualidades se desaproveche y se convierta en contaminación como efluente.

OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar una bebida tipo funcional mediante la fermentación del suero de leche hasta 21 días de vida útil.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del suero dulce.
- Desarrollar una fórmula láctea a partir del suero dulce de leche.
- Evaluar parámetros fisicoquímicos y microbiológicos a la bebida formulada.
- Determinar la funcionalidad del producto hasta el día final de su vida útil.
- Determinar la aceptación sensorial de la bebida.



1. CAPITULO 1: Contenido Teórico

1.1 Leche

Definición según la (INEN 0009, 2012) “Producto de la secreción mamaria normal de animales bovinos lecheros sanos, obtenida mediante uno o más ordeños diarios, higiénicos, completos e ininterrumpidos, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada a un tratamiento posterior previo a su consumo”

1.2 Leche cruda de vaca. Leche que no ha sido sometida a ningún tipo de calentamiento, es decir su temperatura no ha superado la de la leche inmediatamente después de ser extraída de la ubre (no más de 40°C). (INEN 0009, 2012)

Requisitos físico-químicos de la leche se indican en la tabla 1.

Requisito	Unidad	MIN	MAX	Método de ensayo
Densidad relativa	-	1,029	1,033	NTE INEN 11
Punto de congelación	°C	-0,512	-0,512	NTE INEN 15
Acidez titulable como ácido láctico	%	0,13	0,17	NTE INEN 13
Materia grasa	%	3	-	NTE INEN 12
Solidos no grasos	%	8,2	-	-
Cenizas	%	0,65	-	NTE INEN 14
Proteínas	%	2,9	-	NTE INEN 16

Tabla 1: Requisitos físico-químicos de la leche cruda. Elaborado por: Autor.

Fuente: (INEN 0009, 2012)

1.3 Productos lácteos.

Producto lácteo se entiende como “un producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche”, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración. (FAO).

1.3.1 Tipos de productos lácteos:

Leche pasteurizada, Leche larga vida, Leche fluida con ingredientes, Leches fermentadas, Cuajada natural, Leche condensada. Leche evaporada, Leche en polvo y crema en polvo, Crema de leche, Suero de mantequilla



(Buttermilk), Mantequilla, Manjar o dulce de leche, Quesos madurados, Quesos frescos, Quesos en salmuera, Otros quesos, Bebida de leche fermentada, Bebida láctea, Bebida de suero, Leche pasteurizada de cabra, Queso fresco de cabra, Queso madurado y semimadurado de cabra. (INEN 0076, 2013)

1.4 El Suero de leche líquido

Es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada, el 85% de la transformación de leche en la industria quesera termina como suero lácteo. (INEN 2594, 2011) (Miranda & Fonseca, 2014).

1.4.1 Tipos de suero de leche

El suero de leche se clasifica dependiendo de su acidez y del contenido de lactosa, el suero de leche líquido, se clasifica en:

- Suero de leche ácido.
- Suero de leche dulce.

“Suero de leche ácido: Es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada. La coagulación se produce, principalmente, por acidificación química y/o bacteriana.” Según la norma (INEN 2594, 2011).

“Suero de leche dulce: Es el producto definido anterior, en el cual el contenido de lactosa es superior y la acidez es menor a la que presenta el suero de leche ácido.” Según la norma (INEN 2594, 2011).

La composición del suero de la leche va a variar dependiendo con la leche que se utiliza para la elaboración de los diferentes quesos a fabricar, además la composición del suero depende del sistema de coagulación. Se obtiene el suero dulce por la coagulación del cuajo y su pH es de 6 a 6,6. Y el suero ácido se obtiene por la acidificación con un pH más bajo que el anterior de 4,3 a 4,7. (Zavala Pope, 2005)



1.5 Requisitos del suero

El suero de leche es destinado para posteriores procesamientos y este debe cumplir con los requisitos establecidos en el Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura, y provenir de productos que hayan utilizado leche pasteurizada para su elaboración. Además no debe contener sustancias extrañas a la naturaleza del producto y que no sean propias del procesamiento del queso. Los límites máximos de plaguicidas no deben superar los establecidos en el Codex Alimentarius CAC/ MRL 1 en su última edición.

Los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios no deben superar los establecidos en el Codex Alimentario CAC/MRL 2 en su última edición. (INEN 2594, 2011)

1.5.1 Los requisitos físicos químicos y microbiológicos del suero de leche

Los requisitos físico-químicos de los dos tipos de suero de leche deben cumplir con lo establecido en la tabla 2 según el método de ensayo de las normas correspondientes.

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min	Max	Min	Max	
Lactosa, %(m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, %(m/m) ⁽¹⁾	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea, (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0,7	--	0,7	NTE INEN14
Acides tituable, %(calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41



(1) El contenido de proteína láctica es igual a 6,38 por el % nitrógeno total determinado

Tabla 2: Requisitos físico-químicos del suero de leche. Elaborado por: Autor.

Fuente: (INEN 2594, 2011)

Los requisitos microbiológicos del suero de leche deben cumplir con lo establecido en la tabla 3 según el método de ensayo de las normas correspondientes.

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de los microorganismos aerobios mesófilos ufc/g.	5	30000	100000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de Escherichia coli ufc/g.	5	<100	-	0	NTE INEN 1529-8
Staphylococcus aureus ufc/g.	5	<100	100	1	NTE INEN 1529-14
Salmonella /25g.	5	Ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de Listeria monocytogenes /25g	5	Ausencia	-	0	ISO 11290-1

Tabla 3: Requisitos microbiológicos para el suero de leche. Elaborado por:

Autor. Fuente: (INEN 2594, 2011)

Donde:

n = Número de muestras a examinar.

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

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

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

1.6 Propiedades nutricionales del suero de leche

Las proteínas del suero se han utilizado como suplemento alimenticio de gran valor nutritivo debido a la capacidad del suero para proporcionar aminoácidos esenciales. Todas las proteínas de la leche tienen diferentes



funciones biológicas entre las cuales podemos destacar la prevención del cáncer, actividades antimicrobianas y antivirales, efectos inmunomoduladores y actividad prebiótica. (Hernandez , 2014)

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales el suero de leche se ha convertido en la materia prima para obtener diferentes productos a nivel tecnológico, al establecer que es factible emplear propiedades funcionales identificadas en el suero de leche a nuevos productos alimenticios. Sin embargo, a pesar del valor nutricional potencial del suero y al aumento en su aprovechamiento para la producción de otros alimentos, aún gran parte es descartado, causando problemas de contaminación en ríos y suelos. La eliminación del suero se debe entre otros aspectos, al desconocimiento de algunos productores sobre las bondades nutricionales de este subproducto y a la dificultad para acceder a las tecnologías apropiadas para su manejo y procesamiento. (Hernandez , 2014) (Poveda E., 2013)

En la tabla 4 se presenta algunas funciones biológicas del suero de la leche que ayudan al organismo y ayudan a la prevención de diferentes enfermedades.

Proteína	Función biológica
B-Lactoglobulina	Transportador (retino, palmitol, ácidos grasos, vitamina D y Colesterol) Aumento de la actividad esterasa pregástrica. Tránsito de inmunidad pasiva Regulación de la glándula mamaria en el metabolismo del fósforo.
α-Lactoalbúmina	Prevención del cáncer Síntesis de lactosa Tratamiento de la enfermedad inducida por el estrés crónico.
Albumina del suero	Función antimutagénica Prevención del cáncer Inmunomodulación



inmunoglobulinas	Prevención y tratamiento de diferentes infecciones microbianas (infecciones de las vías respiratorias superiores, gastritis, caries dental, diarrea, etc.)
Lactoferrina	Actividad antibacterianas, antivirales, antifúngicas. Evita varias infecciones microbianas y varios tipos de cáncer Actividad prebiótica
Lactoperoxidasa	Biosidas y actividades biostáticas Prevención de cáncer de colon y cáncer de piel.
Glicomacropéptidos	Interacción con toxinas, virus, y bacterias. Control de la formación del ácido en la placa dental Actividad inmunomoduladora
Osteopontina	Mineralización ósea, se utiliza para el tratamiento del cáncer
Proteasas peptonas	Efectos inmunoestimulantes Prevención del cáncer

*Tabla 4: Funciones biológicas de las proteínas de la leche. Elaborado por:
Autor: Fuente: (Hernandez , 2014)*

1.7 Aprovechamiento del suero de leche.

Dentro de los usos está en primer lugar la práctica de separar la grasa y los finos de caseína que aún puede contener el suero y de esta forma se recuperan dos productos valiosos y a la vez, el suero queda en mejores condiciones para su posterior aprovechamiento.

1.7.1 Usos del suero de leche

El suero queso puede utilizarse como base acuosa o en combinación con otros ingredientes ya sean lácteos (leche, proteínas) o no lácteos (grasas y proteínas vegetales). El suero se puede aprovechar en la alimentación de ganado en forma natural o concentrada. El suero líquido concentrado se utiliza para elaborar productos como galletas, queso procesado, alimentos concentrados y productos farmacéuticos. También se aprovechan las proteínas y la lactosa separadas del líquido. (Salinas, Olmos , D Berlijn, & Figueroa, 2014)



1.7.1.1 Obtención de las proteínas.

El suero contiene 0,8% de proteínas como albumina, globulina y residuos de caseína. Se precipita las proteínas por calentamiento siguiendo los siguientes pasos según (Salinas, Olmos , D Berlijn, & Figueroa, 2014):

- Se ajusta le pH del suero a 4,6.
- Se calienta hasta 95°C por 45 min.
- Se escurre y se filtra el líquido,
- La cuajada se introduce en sacos de tela y se presan.

Por cada 1000kg de suero se obtiene entre 20 y 25 kg de proteína que contiene 80% de agua.

1.7.1.2 Obtención de la lactosa

La lactosa es un azúcar cuyas propiedades específicas se aprovechan en la fabricación de antibióticos y productos farmacéuticos dietéticos y alimenticios. La lactosa se obtiene siguiendo los siguientes pasos según (Salinas, Olmos , D Berlijn, & Figueroa, 2014):

- Eliminación de proteínas.
- Concentración del suero hasta un contenido de 60% de solidos solubles.
- Cristalización de la lactosa.
- Centrifugación.
- Desección
- Envasado.

En la tabla 5 se observan algunas aplicaciones industriales del suero de leche.

Aplicaciones	Algunos beneficios
Productos de panadería.	Incrementar el valor nutricional, como emulsificante, reemplazar la adición de huevo, para dar cuerpo a la masa.



Productos lácteos.	Valor nutricional, emulsificante, gelificante mejora las propiedades organolépticas, mejora consistencia, cohesividad.
Bebidas	Valor nutricional, solubilidad, viscosidad, estabilidad coloidal.
Postres	Propiedades emulsificantes, dar cuerpo y textura a los productos.
Confitería	Como emulsificante y facilita el batido
Productos cárnicos	Pre-emulsificante, gelificante, mejor solubilidad.

Tabla 5: Aplicaciones del suero de leche y sus beneficios. Elaborado por: Autor.

Fuente: (Poveda E., 2013)

1.8 Alimentos funcionales

El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU). Esto se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional. Algunas de las principales funciones son las relacionadas con un óptimo crecimiento y desarrollo, la función del sistema cardiovascular, los antioxidantes, el sistema gastrointestinal, entre otros. (Alvírez Morales, Gonzales Martínez , & Jimenez Salas, 2002)

Para definir en forma precisa lo que significan los alimentos funcionales, se considera que se trata de un concepto aún en desarrollo y que bien podría definirse como productos intermedios entre los tradicionales y la medicina. Pero podrían definirse como cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. The International Life Science Institute (ILSI) establece que se puede considerar que un alimento es funcional si se logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, que mejora el estado de salud y de bienestar, o bien que reduce el riesgo de una enfermedad. (Chasquibol S., 2003)



1.8.1 Probióticos

Son el conjunto de alimentos fermentados por bifidobacterias y lactobacilos. Se define a los probióticos como alimentos funcionales que se caracterizan por contener microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrado en cantidades adecuadas. (Taranto, Médici , & Font de Valdez, 2005) Como por ejemplo el yogur (obtenido de la fermentación de la leche por *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*) y otros derivados lácteos fermentados son los principales representantes de este grupo de alimentos funcionales, al que también pertenecen algunos vegetales y productos cárnicos fermentados. Los mecanismos por los cuales los probióticos ejercen sus acciones beneficiosas no son bien conocidos, aunque se postulan como los más relevantes la producción de lactasa, la modificación del pH intestinal, la producción de sustancias antimicrobianas, la competición con microorganismos patógenos por sus receptores, lugares de unión y nutrientes precisos para su desarrollo, el estímulo del sistema inmune y la generación de citoquinas. (Silveira Rodríguez & Megías, 2003)

Los efectos de los probióticos atribuidos a las bacterias lácticas algunos están documentados sus mecanismo de acción como la disminución de la intolerancia a la lactosa, y que otros requieren de mayor estudio y modelos de experimentación de su modo de acción, como son las propiedades antitumorales o el efecto hipocolesterolémico. (Taranto, Médici , & Font de Valdez, 2005) En la tabla 6 se presenta las influencias de las bacterias probióticas en la salud.

Probiótico	Influencia	Reducción de los síntomas a la intolerancia a la lactosa
		Disminuyen los niveles de colesterol sanguíneo
		Producen en vitaminas del grupo B
		Actúan como inmunomoduladores
		Inhiben el crecimiento de patógenos potenciales
		Restablecen la flora intestinal durante una terapia con antibióticos

Tabla 6: Influencia de las bacterias probióticas en la salud: Elaborado por:

Autor. Fuente: (Taranto, Médici , & Font de Valdez, 2005)



Conocer y difundir los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas ejercen su efecto benéfico permitirá una óptima recomendación por parte de los profesionales de la salud y una mayor confianza en el consumo de alimentos funcionales por parte de la comunidad.

1.8.1.1 Mecanismo de acción

Actúan acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales de forma que mantienen la flora intestinal y evitan la acción de gérmenes patógenos. Tienen propiedades inmunomoduladoras: modifican la respuesta a antígenos, aumentan la secreción de inmunoglobulina-A específica frente a rotavirus. Producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal a través de la producción de sustancias inhibidoras de dichas enzimas, es posible que disminuyan el desarrollo de determinados tumores. Los probióticos aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico. (Lorente & Serra, 2001)

1.8.2 Prebióticos

Se define a los prebióticos como ingredientes alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónicas. Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso donde son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por las Bifidobacterias y Lactobacilos, generando de esta forma una biomasa bacteriana saludable y un pH óptimo. (Olafnero, Abad, & Bendersky, 2007)

Para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios:

No debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo. Debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo bifidobacterias y lactobacilos.



Debe ser capaz de alterar la microflora colónica tornándola saludable, por ejemplo reduciendo el número de organismos putrefactivos e incrementado las especies sacarolíticas. (Olafnero, Abad, & Bendersky, 2007)

Los prebióticos tienen acciones favorables con respecto al problema del estreñimiento, las diarreas por infección, la osteoporosis (al incrementar la biodisponibilidad del calcio), aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (al corregir la dislipemia y la resistencia insulínica), obesidad, diabetes mellitus tipo 2 e incluso contra el cáncer. (Silveira Rodríguez & Megías, 2003)

1.8.3 Simbióticos

Se define a los alimentos simbióticos a la asociación de un probiótico con un prebiótico. Un ejemplo son los preparados lácteos ricos en fibra fermentados por bifidobacterias. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios relevantes con simbióticos, por lo que los aparentes beneficios son por el momento especulativos. (Silveira Rodríguez & Megías, 2003)

1.9 Bebidas

Las bebidas se definen como todos aquellos líquidos que ingieren los seres humanos, incluida el agua. Sin embargo, se excluye a los productos líquidos para el reemplazo de comidas usados en el control de peso y las sopas. Se prescindió de estas últimas porque se comportan más como los alimentos sólidos que como líquidos, en términos de saciedad y compensación dietética. (Rivera, Muñoz Hernandez, & Rosas Peralta, 2008)

Para evaluar las categorías de bebidas se debe considerar los siguientes factores: Densidad energética y de nutrientes. La densidad energética se definió como kcal/240ml. La densidad de nutrientes se definió como el contenido nutricional (en las unidades específicas de cada nutriente) por 240ml. Contribución al consumo total de energía y peso corporal. Contribución a la ingestión diaria de nutrientes esenciales. Evidencia de efectos benéficos en la salud. Evidencia de efectos adversos a la salud. (Rivera, Muñoz Hernandez, & Rosas Peralta, 2008)

1.9.1 Bebidas Fermentadas

La fermentación es un proceso natural mediante el cual la materia prima se transforma en bebida alcohólica o analcohólicas. Este proceso requiere determinadas condiciones físico-químicas y la presencia de bacterias-levaduras



que transforman el azúcar de la materia prima en una serie de sustancias. Estas transformaciones se realizan mediante la fermentación que es un proceso totalmente anaeróbico (sin presencia de oxígeno), dando como producto final un compuesto de tipo orgánico, el cual caracteriza por lo general, a los distintos tipos de fermentaciones existentes, pudiendo así realizar una clasificación y una diferenciación. (Páez Escobar, 2010)

1.9.2 Bebidas funcionales

Las bebidas funcionales son productos que poseen uno o varios componentes fisiológicos que complementan su aporte nutricional y que representan un beneficio extra para la salud de las personas, como por ejemplo en el metabolismo del colesterol, la mineralización ósea y la reducción de riesgos de enfermedad.

Dentro de los ingredientes que pueden ayudar en este beneficio, tenemos al lactato de calcio, compuestos prebióticos, probióticos y algún otro producto que aporte beneficios al organismo. Prácticamente todo tipo de bebidas, como el agua mineral, leche de soya, bebidas energéticas, néctares o jugos, ya tienen valor agregado al producto porque ejercen un beneficio al organismo (MAKYMAT).

1.10 Alimentos fermentados.

Son definidos como aquellos alimentos que han sido modificados, mediante la acción de microorganismos o enzimas. Estos son productos apetitosos que se preparan a partir de la materia prima o tratada térmicamente, y que mediante un proceso (inoculación) se incluyen microorganismos específicos dependiendo de la bebida que se desea obtener, estos microorganismos adquieren propiedades sensoriales como sabor, aroma, apariencia visual, textura y consistencia, además estos microorganismos dan una vida de anaquel y seguridad higiénica al consumidor. (Ramírez, Ulloa, & Velázquez, 2011)

1.11 Fermentación

Fermentación es un proceso anaeróbico o parcialmente anaeróbico donde carbohidratos o compuestos relacionados son oxidados para producir energía.



En el sentido biológico la fermentación es un proceso de obtención de energía en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno) que puede generar como producto final ácido láctico (fermentación láctica, por bacterias ácido lácticas) o etanol (fermentación alcohólica por levaduras). (Páez Escobar, 2010)

La reacción de la fermentación láctica es:



La reacción de la fermentación alcohólica es:



En el sentido industrial la fermentación es un proceso microbiano a gran escala, tanto si se desea realizar en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Gracias a los productos fermentados, las biotecnologías nos procuran generar una alimentación más rica en vitaminas, fácil de digerir y sabrosa. El uso de enzimas seleccionadas permite evitar todo tipo de contaminación. Los productos metabólicos de la fermentación como el ácido láctico, el ácido acético y el alcohol contienen naturalmente inhibidores de la descomposición de la materia orgánica. La fermentación ofrece una inestimable fuente de producción de alimentos y descomposición. (Páez Escobar, 2010)

Los organismos que se utilizan para procesos de fermentación industrialmente deben tener las siguientes características: Debe ser capaz de crecer rápidamente en el sustrato y ambiente adecuado, y de cultivarse fácilmente en grandes cantidades. Capaz de mantener constancia fisiológica bajo las condiciones de cultivo y producir abundantemente las enzimas esenciales para que ocurran los cambios deseados. Condiciones requerida para crecimiento máximo y producción de alimento deben ser simples. La mayoría de los alimentos preparados utilizando microorganismos son alimentos fermentados. Los microorganismos que predominan en la fermentación para la producción de un alimento son levaduras y bacterias ácido lácticas, principalmente miembros del género *Saccharomyces*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus* respectivamente. (Vega, 2008)



1.11.1 Medios de fermentación

La fermentación con células libres dentro de los fermentos y constituyen todavía el método más utilizado ya que su manipulación es relativamente fácil y no requiere un medio de cultivo estéril. Estas células se reproducen con la misma rapidez con la que son eliminadas del reactor, existe una síntesis constante. De esta forma se suministra los fermentos al reactor en condiciones apropiadas para el crecimiento, la fermentación puede transcurrir en estado estacionario en el cual la eficiencia catalítica no cambia. A partir de la degradación catabólica de los nutrientes, la célula que crece activamente es capaz de suministrar la energía necesaria para la síntesis. Pero el mayor número de reacciones requeridas para el metabolismo significa el aumento de la formación de productos secundarios y a la vez no deseados. Esto lleva a la producción de un exceso de biomasa y limita el rendimiento del medio del cultivo. (Páez Escobar, 2010)

Los objetivos para fermentar los alimentos son:

1. Desarrollar una diversidad de sabores, aromas y texturas en los substratos de los alimentos.
2. Preservar los alimentos a través de diferentes ácidos como por ejemplo: el ácido láctico y el ácido acético.
3. Enriquecer los substratos de los alimentos con proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales y vitaminas.

1.11.2 Tipos de fermentación

1.11.2.1 Alcohólica

Es la que se realiza principalmente por levaduras que producen etanol y CO_2 . Cuando hay oxígeno las levaduras realizan la respiración, crecen, oxidan completamente la glucosa, en condiciones anaeróbicas estos microorganismos fermentan los azúcares, como la glucosa y algunas la lactosa. Siguiendo la secuencia de las reacciones de glucólisis la glucosa se transforma en el ácido pirúvico, luego el ácido pirúvico se transforma en acetaldehído mediante la enzima piruvato-descarboxilasa, seguidamente el acetaldehído se convierte en etanol por medio de la enzima alcohol-deshidrogenasa. (Puerta Quintero, 2010)



1.11.2.2 Láctica

Es la que se realiza mediante las bacterias Lactobacilacea y Enterobacteriaceae, algunos protozoos, esta consiste en la obtención de ácido láctico a partir de azúcares. En esta fermentación el piruvato producido en la glicólisis se transforma en ácido láctico mediante la enzima lactato-deshidrogenasa. (Puerta Quintero, 2010)

En la tabla 7 se muestra los diferentes tipos de fermentación existentes según en microorganismo, el sustrato y las condiciones.

Tipo de fermentación	Microorganismos fermentadores	Sustratos	Productos
Alcohólica o etanólica	Saccharomyces cerevisiae, S. ellipsoideus, S. anamensisi, S. carsbengnesis, Candida seudotropicalis, Torulopsis spp, Mucor spp., Kluyverimyces fragilis, Sarcina ventriculi.	Malta de cebada, cereales, arroz, maíz, trigo, jugo de la vid, caña de azúcar, melaza, sorgo, jugos de fruta, remolacha, suero de leche.	Etanol, vinos, cerveza, licores, bebidas destiladas, pan, salsas
Láctica homofermentiva	Streptococcus thermophilus s. lactis, S. faecalis, Pediococcus cerevisiae y por la mayoría de los Lactobacillus como L. lactis, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. casei.	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	Yogur, suero de leche, quesos, mantequilla, kumis, encurtidos
Láctica heterofermentiva	Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis y L. fermenti, Bifidobacterium bifidus.	Leche, suero de leche, vegetales, sacarosa	



Propiónica o propanoica	Propionibacterium freundenreichii, P. shermanii, P. pentosaceum, Micrococcus lacticus, Clostridium propionicum, entre otras	Productos lácteos, glucosa, sacarosa, lactosa, pentosa, ácido láctico, ácido málico, glicerina	Ácido propiónico, ácido acético y otros ácido
Butírica o butanoica	Clostridium butyricum y Clostridium spp.	Polisacáridos (almidón, pectina), glucosa, proteínas, aminoácidos, purinas, etanol, ácido úrico, xantina	Ácidos butíricos, acético, fórmico, láctico, succínico, butanol y otros alcoholes y cetonas
Fórmica o ácidomixta	Enterobacter spp., Escherichia coli, Aerobacter aerogens, Erwinia spp., Serratia marcescens, Proteus vulgaris, Salmonella thyphi, Shigella spp., y las bacterias luminosas	Glucosa o lactosa	Ácidos, acético, láctico, málico, fórmico, vinagre, glicerina y disolventes
Metánica	Methanobacterium omelianskii, M. formicium y M. ruminantium, Methanosarcina methanica, M. barkeri, Methanococcus mazei y M. vannieli	Alcoholes, ácidos, CO ₂	Gas metano
Maloláctica	Leuconostoc oenos	Ácido málico	Vinos blancos y rojos, cidra

Tabla 7: Tipos de Fermentación y sus productos industriales. Elaborado por:

Autor. Fuente: (Puerta Quintero, 2010)



1.12 Probiótico *Bifidobacterium*

Los probióticos son microorganismos vivos que se encuentran en algunos productos alimentarios o suplementos, y cuyo consumo en cantidades suficientes puede ser beneficioso para la salud. Los probióticos contribuyen al mantenimiento de un equilibrio saludable de bacterias dentro del tracto gastrointestinal.

Los tipos más comunes de bacterias probióticas son las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas cantidades, apareciendo a los pocos días después del nacimiento. Constituyen una de las especies predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, *Eubacterias*, *Clostridia* y *Bacteroides*, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde 10^8 a 10^{11} bacterias por gramo de material del colon. La flora intestinal beneficiosa, representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, contribuye de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones: metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta. Protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos. Tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular. (Collado, 2004)

1.12.1 Características culturales y morfológicas.

Son bacilos de variada morfología, generalmente de forma bacilar, pueden ser cortos, regulares, con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no son esporulados y se tiñen irregularmente con azul de metileno. Son anaerobios estrictos, sin embargo el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo.

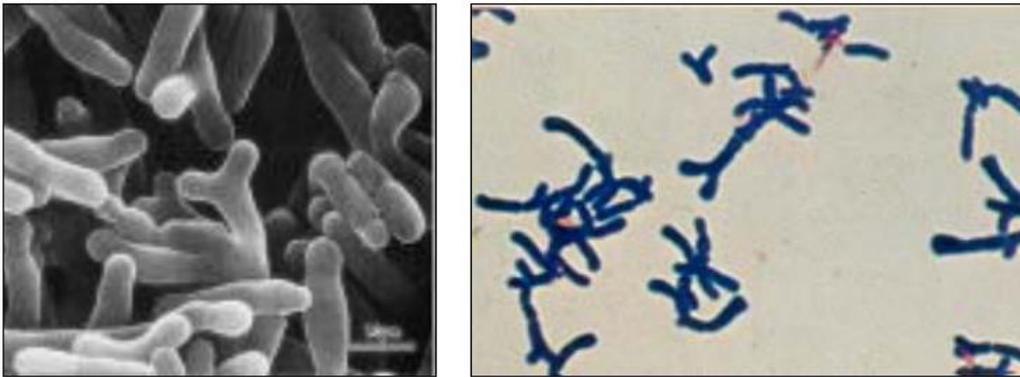


Imagen 1: Morfología del género Bifidobacterium. Fuente: (Collado, 2004)

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este género no resisten bien temperaturas mayores de 46°C. El pH requerido para su crecimiento oscila entre 6.5-7 y a pHs menores o iguales el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello, es importante controlar el descenso del pH en los productos lácteos que contienen este microorganismo. (Collado, 2004)

1.12.2 Características bioquímicas

Las bifidobacterias se diferencian del resto de bacterias acidolácticas ya que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. No producen CO₂ ni los ácidos butíricos y propiónico. Producen la rápida y completa coagulación de la leche sin formación de gas. La fermentación de la glucosa, lactosa, levulosa, fructosa y galactosa está marcada por la acidificación de la leche. No producen ácidos. (Collado, 2004)



2. CAPITULO II: Diseño de estudio

2.1 Localización del trabajo de titulación

El trabajo de titulación se desarrolló en la Planta Procesadora de Lácteos de la Universidad de Cuenca, los análisis correspondientes se realizaron en los laboratorios de Bromatología y de Lácteos ubicados en los laboratorios del tecnológico de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca.

2.2 Descripción del proceso.

El trabajo de titulación comprendió un estudio para la obtención de una bebida fermentada baja en calorías a partir del suero dulce de leche, lo cual empezó con elaboración del queso fresco del cual se obtiene el suero como subproducto en su elaboración con el cual se trabajó.

El suero empleado fue descremado y fermentado con una cepa probiótica de BIFIDUM BACTERIUM BB-12 siguiendo los parámetros de la ficha técnica del fermento y con este suero fermentado se obtuvo la formulación óptima para la elaboración de la bebida fermentada.

En la elaboración de esta investigación se realizó los siguientes análisis y evaluaciones según lo establecido en los objetivos.

Los parámetros físico-químicos fueron evaluados en el laboratorio de la planta de lácteos de la Universidad de Cuenca usando los equipos y procedimientos establecidos en el laboratorio y en las normas correspondientes.

Los parámetros microbiológicos fueron evaluados en el laboratorio de Bromatología de la Universidad de Cuenca usando los equipos y procedimientos establecidos en el laboratorio y en las normas correspondientes.

Para el proceso de la fermentación se realizó 4 tratamientos por duplicado, un tratamiento testigo y 3 tratamientos con diferentes dosificaciones del fermento, para determinar el mejor proceso de la fermentación según los diferentes tratamientos ya que en la ficha técnica no estipula las cantidades de uso en el suero dulce de leche, y así proceder con la elaboración de la bebida fermentada con el mejor de los diferentes tratamientos.



Las dosificaciones se basaron en los porcentajes de otros fermentos probióticos como Lactobacillos, streptococcus y (Parra Huertas, 2010) recomienda un volumen de cultivo de 0 a 3% .

Se realizó una evaluación sensorial para determinar la aceptación del producto terminado, la evaluación de las características sensoriales de la bebida fermentada se realizó mediante las variables (acidez/sabor/apariencia/textura/aroma) tomando en cuenta la variable apariencia se tomó como el color ya que se presentó a los evaluados la bebida en un envase de vidrio de 220ml.

2.3 Materiales y reactivos

Materiales y Equipos		Reactivos e insumos
	Jarras	
Marmita	Lienzos	Leche cruda
Cocina	Papel filtro	Cuajo
Milkotester	Moldes	Cloruro de calcio
Frigorífico	Prensa	Fermento probiótico
Vasos de precipitación	Recipientes 20	(Bifidobacterium)
Varillas	litros	Ácido cítrico
Bureta	Descremadora	Benzoato de sodio
Pipetas	pH-metro	Sacarosa
Embudos	Balanza	Saborizante (durazno y
Termómetros	Recipientes de	frutilla)
Brixometro	galón	Pulpa de fruta (durazno y
Palas	Ollas	frutilla)
Lira	Botellas de vidrios	Gelatina sin sabor
Coladores	250ml	Carbón activado
	Tapas metálica	

Tabla 8: Materiales, equipos y reactivos e insumos .Fuente: Autor.

2.4 Descripción de materia prima empleada para la bebida.

2.4.1 Leche.

La leche utilizada fue procedente de la empresa LÁCTEOS VÁSQUEZ esta empresa se dedica a la comercialización de leche. La leche cruda adquirida cumplió con los requisitos físico-químicos de la leche cruda según la norma (INEN 0009, 2012).

2.4.2 Suero dulce de leche.

El suero utilizado se obtuvo como subproducto en la elaboración del queso fresco (ver proceso en la página 38). El suero obtenido cumplió con los requisitos establecidos en la norma (INEN 2594, 2011).

2.4.3 Fermento probiótico (Bifidobacterium BB-12).

El fermento que se utilizó fue el BB-12 este es un cultivo termófilo ácido láctico. El cultivo es una cepa individual definida con una larga historia de uso seguro, así como certificados de identificación y certificados de sanidad y origen. BB-12 es una marca registrada de Chr. Hansen. Este fermento fue adquirido de la empresa Distribuidora Descalzi S.A.

La ficha técnica del producto BB-12 fue dado por la empresa de la cepa utilizada para la fermentación se encuentra en el **(Anexo 1)**.

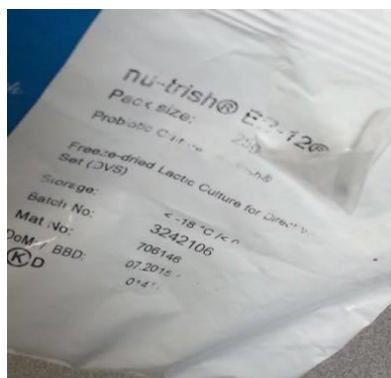


Imagen 2: Fermento Probiótico (Bifidobacterium BB-12). Fuente Autor.



2.4.4 Pulpa de fruta

La pulpa de la fruta se elaboró a partir de fruta fresca y clasificada de acuerdo a su color y textura.

2.4.5 Benzoato de Sodio

Es utilizado como conservante en la industria alimentaria. Y es un agente conservador de acción inhibitoria del desarrollo de bacterias, hongos y levaduras. Su dosis es 0,1g por cada 1000g de producto terminado o según el producto a elaborar y su formulación.



3. CAPITULO III: Descripción de los productos y análisis

3.1 Desarrollo de queso fresco.

Los quesos son una forma de conservación de los componentes insolubles de la leche (la caseína y la materia grasa), se obtienen por la coagulación de la leche seguida del desuerado, en el curso del cual el lacto suero se separa de la cuajada. El lacto suero contiene la mayor parte del agua y de los componentes solubles de la leche siendo este suero la materia prima para la elaboración de la bebida fermentada.

3.1.1 Procedimiento.

1. Recibir la leche y almacenar a 4°C.
2. Pasteurizar la leche en la cual llevamos a la leche a 67°C por 5 minutos en este paso se debe homogenizar muy bien la leche para que adquiera esta temperatura en todo el pasteurizador esto mediante una paleta de madera.
3. Enfriar la leche en este mismo recipiente hasta una temperatura comprendida entre 38°C a 40°C.
4. Colocar el cuajo según la relación de 10ml de cuajo por cada 100litros de leche.
5. Homogenizar la mezcla y se deja reposar por 30 minutos.
6. Realizar el corte de la cuajada, esta se realiza mediante una lira realizando cortes horizontales como verticales obteniendo cubos, posterior se mueve con la paleta de madera y si existe cuajos de gran tamaño debe cortar con la ayuda del cuchillo.
7. Desuerado en este paso se debe separar el suero para ellos colocamos una reja en la salida del equipo y abrimos la llave, el suero se recogerá en recipientes.
8. Colocar el cuajo en un lienzo dentro del molde.
9. Colocar en la máquina de prensado, este equipo ayuda a la eliminación del suero que aun contiene el cuajo se le deja en este equipo por 30 minutos.

10. Retirar los quesos del equipo de prensado y se dejar en reposo en una solución de sal muera al 20 % durante un día.
11. Empaquetar al vacío los quesos obtenidos, este proceso se realiza con el fin de evitar deterioro del producto.

3.1.2 Diagrama del proceso de queso fresco

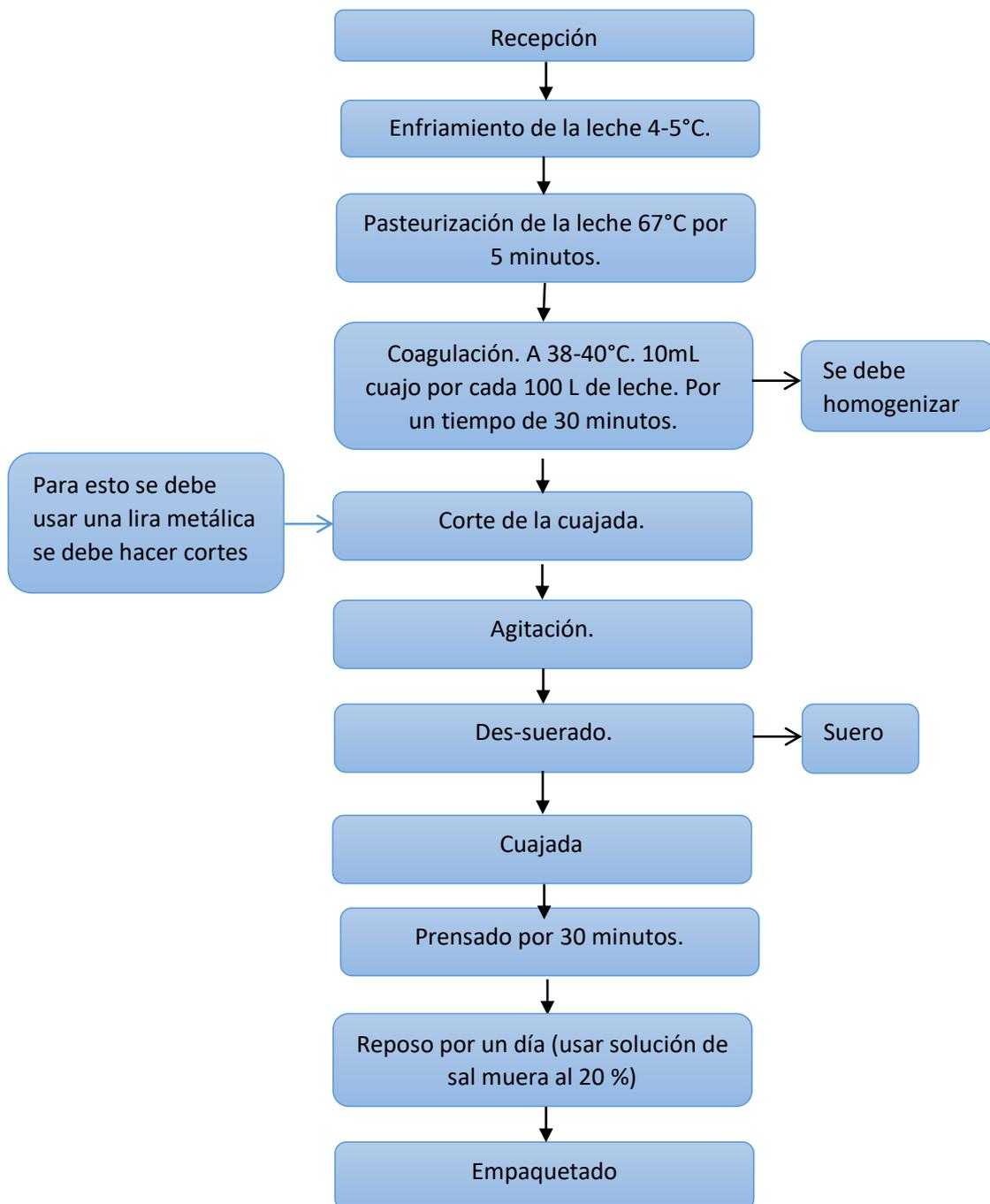


Imagen 3: Diagrama de proceso de elaboración de quesos. Fuente: Autor.



3.2 Proceso de fermentación.

El estudio se realizó con cuatro dosificaciones de (0%, 0.1%, 0.3%, 0.5%) del fermento haciendo los cálculos para trabajar con 100 litros de materia prima, mediante la inoculación del fermento se determinó la viabilidad de la fermentación del probiótico BB-12. Dado que en la ficha técnica del fermento no especifica la cantidad a utilizar según la cantidad de materia prima a trabajar.

3.2.1 Procedimiento

1. **Recepción:** se recibió el suero a 38-40°C posterior de la etapa de coagulación en la elaboración del queso fresco.
2. **Centrifugación.** Se realizó una doble centrifugación en la descremadora de leche con el fin de eliminar la grasa.
3. **Pasteurización:** se lo realizó al elevar la temperatura del suero a 85°C por 5 minutos en una cocina industrial.
4. **Adición del conservante (Benzoato de Sodio):** según la norma (INEN 2074 , 2012)
5. **Disminución de la temperatura:** se llevó a la temperatura de 40°C del suero pasteurizado con agua fría para los siguientes procesos.
6. **Igualación del pH a 4,5:** mediante la utilización de ácido cítrico se bajó el pH del suero de 6,3 a 4,5.
7. **Inoculación:** se inocula las 4 muestras de suero de 3 litros cada una, con la concentración del fermento mediante cuatro dosificaciones (0%, 0.1%, 0.3%, 0.5%), y según las especificaciones establecidas en la ficha técnica del producto (**Anexo 1**),
8. **Fermentación:** Se deja fermentar el producto en bidones por 24 horas, tiempo en que se fermenta todos los carbohidratos presentes en el suero, se realizó la medición del pH y acides para determinar los cambios ocurridos en la fermentación.
9. Medir pH en el tiempo.

3.2.2 Diagrama del proceso de fermentación.

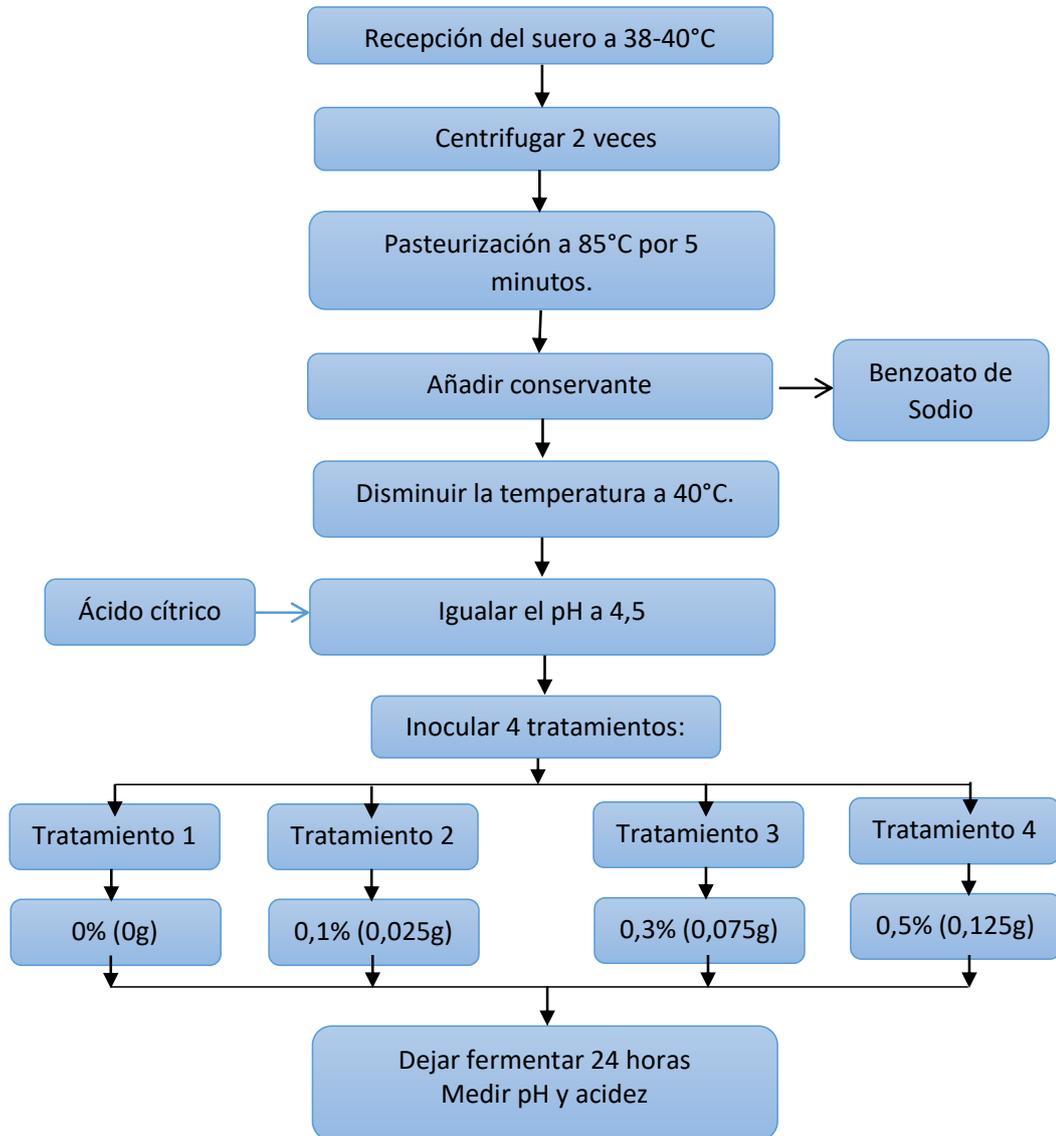


Imagen 4: Diagrama de proceso de Fermentación. Fuente: Autor.

3.3 Desarrollo de la bebida fermentada.

La bebida se desarrolló a partir del suero dulce de leche que se obtuvo como subproducto en la elaboración del queso fresco. Se obtuvo aproximadamente un 85% de suero del total de la leche.

Materia prima a utilizar:

Pulpa: Se empleó durazno, se procedió a pelar y pasteurizar

Edulcorante: Se utilizó azúcar común para dar dulzor a la bebida.

Saborizante: Se utilizó saborizante artificial de durazno de la marca TANG

3.3.1 Procedimiento.

1. **Recepción:** se recibió el suero a 38-40°C posterior de la etapa de coagulación en la elaboración del queso fresco.
2. **Centrifugación.** Se realizó una doble centrifugación en la descremadora de leche con el fin de eliminar la grasa.



Imagen 5: Proceso de Centrifugación. Fuente: Autor.

3. **Pasteurización:** se trabajó a 85°C por 5 minutos en una cocina industrial.
4. **Adición del conservante (Benzoato de Sodio):** según la norma (INEN 2074 , 2012).
5. **Disminución de la temperatura:** se llevó a la temperatura de 40°C del suero pasteurizado con agua fría para los siguientes procesos.

6. **Igualación del pH a 4,5:** se utilizó ácido cítrico y se añadió directamente hasta bajar el pH del suero de 6,3 a 4,5.
7. **Inoculación:** se inocula con la concentración del fermento al 0,5% y según las especificaciones establecidas en la ficha técnica del producto **(Anexo 1)**



Imagen 6: Inoculación. Fuente: Autor.

8. **Clarificante:** añadir una funda de gelatina sin sabor de 7,5g como clarificante.
9. **Fermentación:** se dejar que fermente el producto por 24 horas tiempo en que se fermenta todos carbohidratos presentes en el suero, se realizó la medición del pH y acidez para determinar los cambios ocurridos en la fermentación.
10. **Decantación:** Después de la fermentación se extrajo la parte líquida del proceso de fermentación, con la cual se mide y se trabaja para elaborar la bebida.



Imagen 7: Proceso de fermentación. Fuente: Autor

11. **Mezclado:** a la parte líquida de la fermentación se le debe añadir 20% de agua, la pulpa, saborizante y el edulcorante.
12. **Homogenización:** se debe homogenizar bien la mezcla para los demás procesos.
13. **Embotellado:** para el proceso del embotellado se debe lavar las botellas y esterilizadas y se procedió al llenado de con la bebida ya formulada.
14. **Evacuado y tapado:** se realizó el evacuado mediante el baño María para la eliminación del oxígeno presente y así evitar la propagación de microorganismos patógenos, se realiza el tapado hermético mediante el sellado después de la evacuación.
15. **Almacenado:** se lo realiza a 4°C un frigorífico, se realizaran los análisis a partir del primer día de almacenamiento de la bebida elaborada.

3.3.2 Diagrama del proceso de la bebida fermentada.

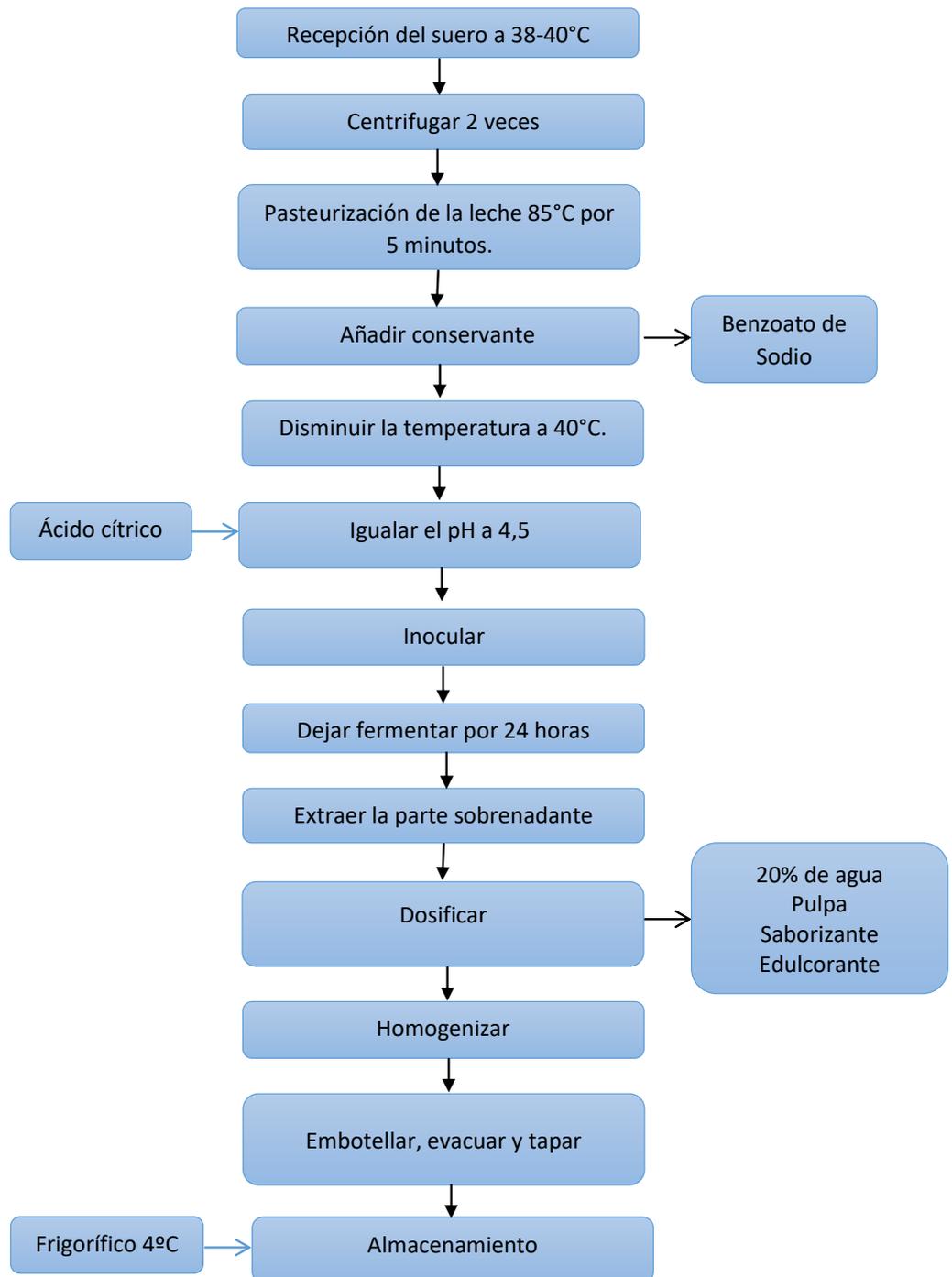


Imagen 8: Diagrama del proceso de elaboración de la bebida fermentada.

Fuente: Autor.



3.4 Análisis de calidad de la leche para la elaboración de queso.

Las pruebas para determinar la calidad de la leche para la elaboración del queso fueron realizadas en el laboratorio de lácteos de la Universidad de Cuenca, el análisis se realizó en el equipo MILKOTESTER programado para medir los parámetros con respecto a la leche y las variables analizadas fueron la grasa, sólidos no grasos, densidad, punto de congelación, proteína, lactosa, sales y agua.

Para la medición de los parámetros se siguió los siguientes pasos:

- Tomar una muestra de leche a trabajar.
- Programar el equipo según la materia prima a analizar.
- Colocar el blanco (agua destilada) y la leche en los recipientes del equipo para proceder a la medición.
- Realizar la medición al iniciar la marcha del blanco y la leche.
- Se realizara por duplicado la medición de la leche.

3.5 Análisis físico-químico del suero dulce de leche.

3.5.1 Acidez titulable.

La medición de la acidez titulable está basado en la norma NTE INEN 0013, en la cual se establece como el método para determinar la acidez titulable de la leche pero se aplicó para la determinación de la acidez del suero dulce.

Según la norma (NTE INEN 0013) establece que la Acidez titulable de la leche. Es la acidez de la leche, expresada convencionalmente como contenido de ácido láctico, y determinada mediante procedimientos normalizados.

3.5.1 Fundamento.

Se titula la acidez con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador. Se añade la solución de hidróxido hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base ha sido añadida a la solución, el punto final se da con el viraje o cambio de color.



3.5.2 Materiales y reactivos

Materiales	Reactivos
Matraz Erlenmeyer de 100ml	Suero dulce de leche
Matraz de 500ml	Solución 0,1 N de hidróxido de sodio
Bureta de 25ml	Solución indicadora de fenolftaleína
Estufa	Agua destilada, exenta de CO ₂ y fría

Tabla 9: Materiales y reactivos para la medición de la acidez titulable. Fuente: Autor.

3.5.3 Procedimiento

- La determinación realizar por duplicado sobre la misma muestra preparada.
- Lavar cuidadosamente y secar el matraz Erlenmeyer.
- Colocar en el Erlenmeyer la muestra.
- Diluir el contenido del matraz con un volumen dos veces mayor de agua destilada, y agregar 2 cm³ de solución indicadora de fenolftaleína.
- Agregar, lentamente y con agitación, la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, justamente hasta conseguir un color rosado
- Continuar agregando la solución hasta que el color rosado persista durante 30 s.
- Leer en la bureta el volumen de solución empleada, con aproximación a 0,05ml.
- La acidez titulable de la leche se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\% \frac{P}{V} \text{Ácido Láctico} = A = \frac{(VNK)_{NaOH} * m_{eq} * 100}{Vm}$$

Siendo:

A= acidez titulable de la leche, en porcentaje en masa de ácido láctico.

V_m = volumen de la muestra.

V = volumen del hidróxido de sodio.

N = normalidad del hidróxido de sodio.

K = constante del hidróxido de sodio.

m_{eq} = miliequivalentes del ácido láctico

3.5.4 Diagrama del proceso de la medición de la acidez titulable.

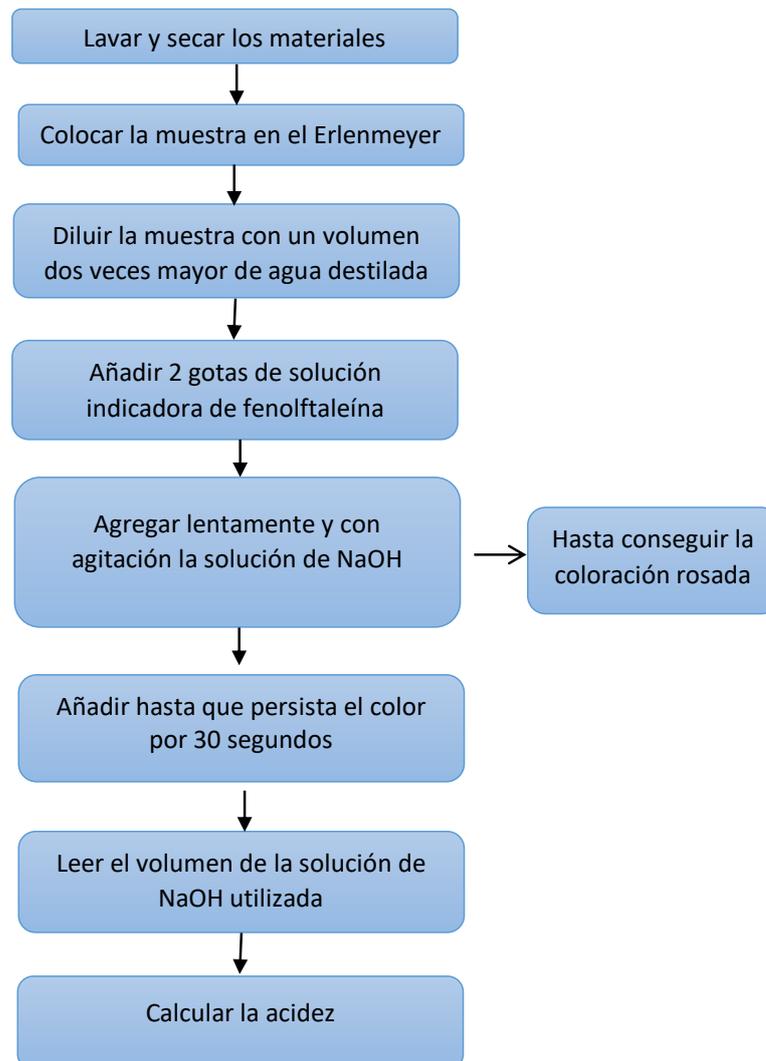


Imagen 9: Diagrama de medición de la acidez titulable. Fuente: Autor.



3.5.2 pH del suero dulce.

El pH representa la acidez actual (concentración de H⁺ libres) en la solución, para la determinación del pH del suero dulce de leche se basó en la norma NTE INEN 0973, en la cual se establece como el método potenciométrico para determinar el pH en agua potable, pero se aplicó para la determinación del pH del suero dulce siguiendo los procedimientos de la norma. (NTE INEN 0973)

3.5.2.1 Fundamento.

Determinación electrométrica del pH en una muestra, utilizando un electrodo que mide el cambio eléctrico producido por el cambio de pH.

3.5.2.2 Equipos y reactivos

Equipos	Reactivos
Potenciómetro	Suero dulce de leche
Piceta	Agua destilada
Vaso de precipitación	Soluciones tampón pH4, pH7, pH9

Tabla 10: Equipos y reactivos para la medición del pH del suero. Fuente: Autor

3.5.2.3 Procedimiento.

- Efectuar la determinación por duplicado sobre la muestra.
- Lavar los electrodos con agua destilada y calibrar el aparato a la temperatura de la muestra.
- Colocar la muestra en el vaso de precipitación, introducir los electrodos y efectuar la determinación del pH.

3.5.2.4 Diagrama del proceso de la medición del pH.

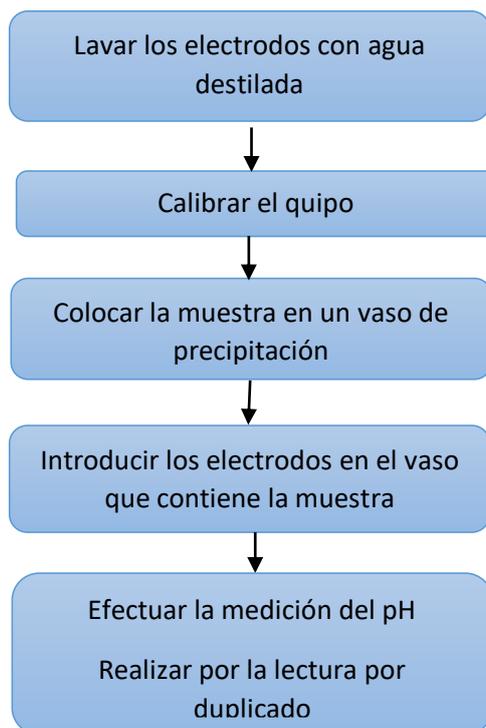


Imagen 10: Diagrama de medición del pH del suero. Fuente: Autor.

3.5.3 Análisis de la proteína, grasa, % de agua y densidad

Las pruebas se realizaron en el equipo MILKOTESTER programado para medir los parámetros con respecto al suero de leche.

3.5.3.1 Fundamento

El MILKOTESTER está diseñado para los análisis de porcentaje de grasa, sólidos no grasos, proteína, lactosa, contenido de agua, temperatura (C°), punto de congelación, sales densidades y PH. Estos parámetros son medidos al mismo tiempo.

El dispositivo tiene un diseño compacto, una estructura robusta y una interfaz fácil de usar. Lo más importante, la operación es de un solo botón es muy simple, se pulsa una sola vez para empezar a medir y una sola vez para la limpieza. Las muestras se dosifican con precisión y se requieren pequeñas cantidades, el volumen de la muestra es de 23cm³, no es necesario un tratamiento térmico o mecánico de las muestras antes del análisis.

3.5.3.2 Procedimiento

Para la medición de los parámetros se siguió los siguientes pasos:

- Tomar una muestra de suero a trabajar.
- Programar el equipo según la materia prima a analizar.
- Colocar el blanco (agua destilada) y el suero en los recipientes del equipo para proceder a la medición.
- Colocar el capilar del quipo dentro de los recipientes.
- Realizar la medición al iniciar la marcha del blanco y la leche.
- Se realizará por duplicado la medición de la leche.

3.5.3.3 Diagrama del proceso de la medición de los diferentes parámetros en el quipo MILKOTESTER.

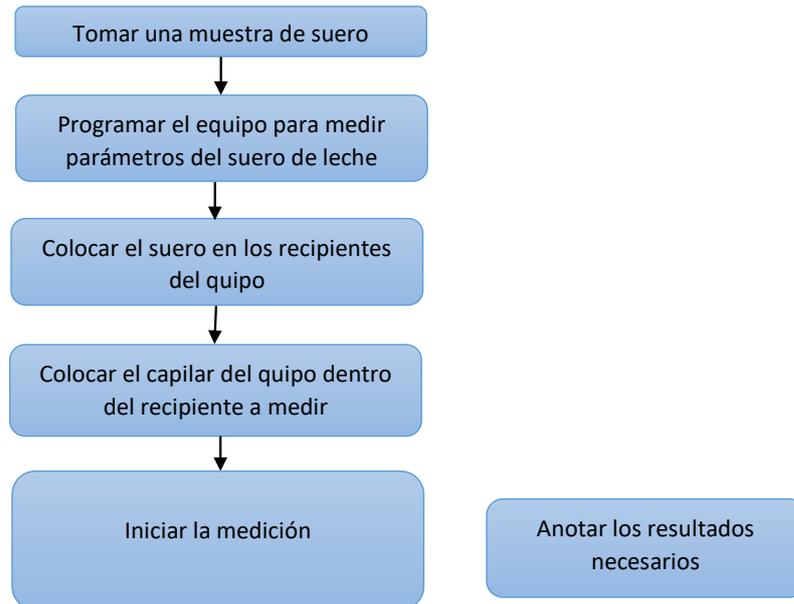


Imagen 11: Diagrama del proceso de medición en el quipo MILKOTESTER.

Fuente: Autor.



3.6 Análisis microbiológico del suero dulce de leche.

3.6.1 Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos.

El recuento de los microorganismos aerobios de la muestra de suero dulce de leche se está basado en la norma NTE INEN 1529-5, en la cual se establece como el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.

Según la norma (INEN 1529-5, 2006) establece el control microbiológico de los alimentos y determinada mediante procedimientos normalizados.

3.6.1.1. Fundamento

Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital esté presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento (INEN 1529-5, 2006).

El desarrollo del proceso se describe en la imagen 12.

3.6.1.2. Diagrama del proceso del recuento de aerobios mesófilos.

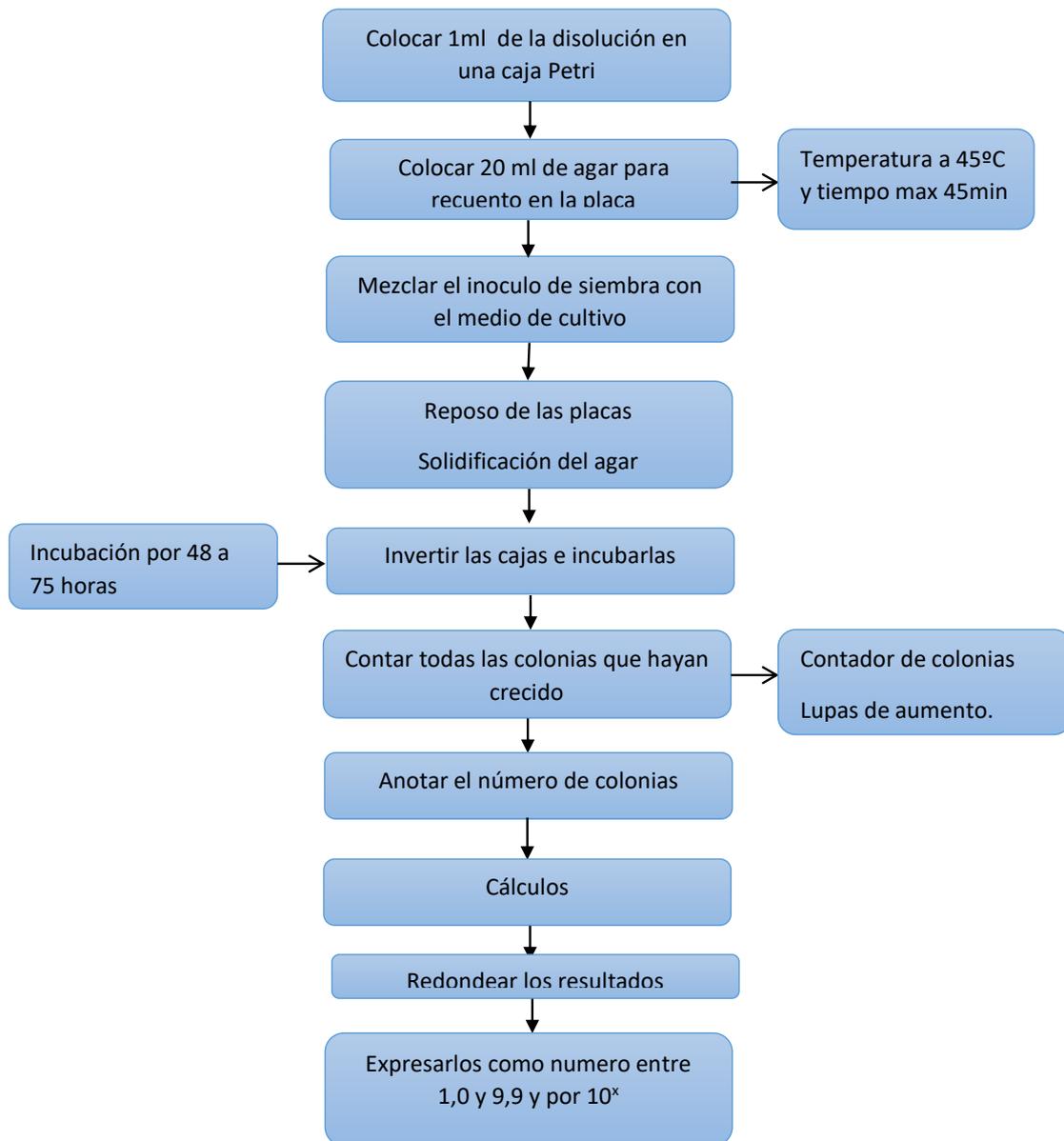


Imagen 12: Diagrama del proceso de recuento de aerobios mesófilos. Fuente:

Autor.

3.6.2 Recuento estándar en placa de Escherichia coli

El recuento de los microorganismos Escherichia coli de la muestra se suero dulce de leche se está basado en la norma NTE INEN 1529-8, en la cual se establece como el método que establece la técnica del número más probable para la determinación de coliformes fecales y las pruebas confirmatorias de Escherichia coli e identificación de las especies del grupo coliforme fecal.



Según la norma (INEN 1529-8, 1990) establece el recuento de *Escherichia coli*, control microbiológico de los alimentos y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.6.2.1 Fundamento

Este método se basa en la prueba de Eijkman modificada para detectar la fermentación de la lactosa con producción de gas a $44 - 45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y complementada con la prueba de indol a esta temperatura, estos ensayos se realizan en caldo brillante-bilis lactosa y en caldo triptona partiendo de un inóculo tomado de cada tubo gas positivo del cultivo para coliformes totales, (INEN 1529-6) e incubados a $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. La confirmación de *E. coli* y la diferenciación de las especies y variedades del grupo coliforme fecal, se realizan mediante los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico.

El desarrollo de los procesos se describe en el diagrama de la imagen 13.



3.6.2.2 Diagrama del proceso del recuento de Echerichia coli.

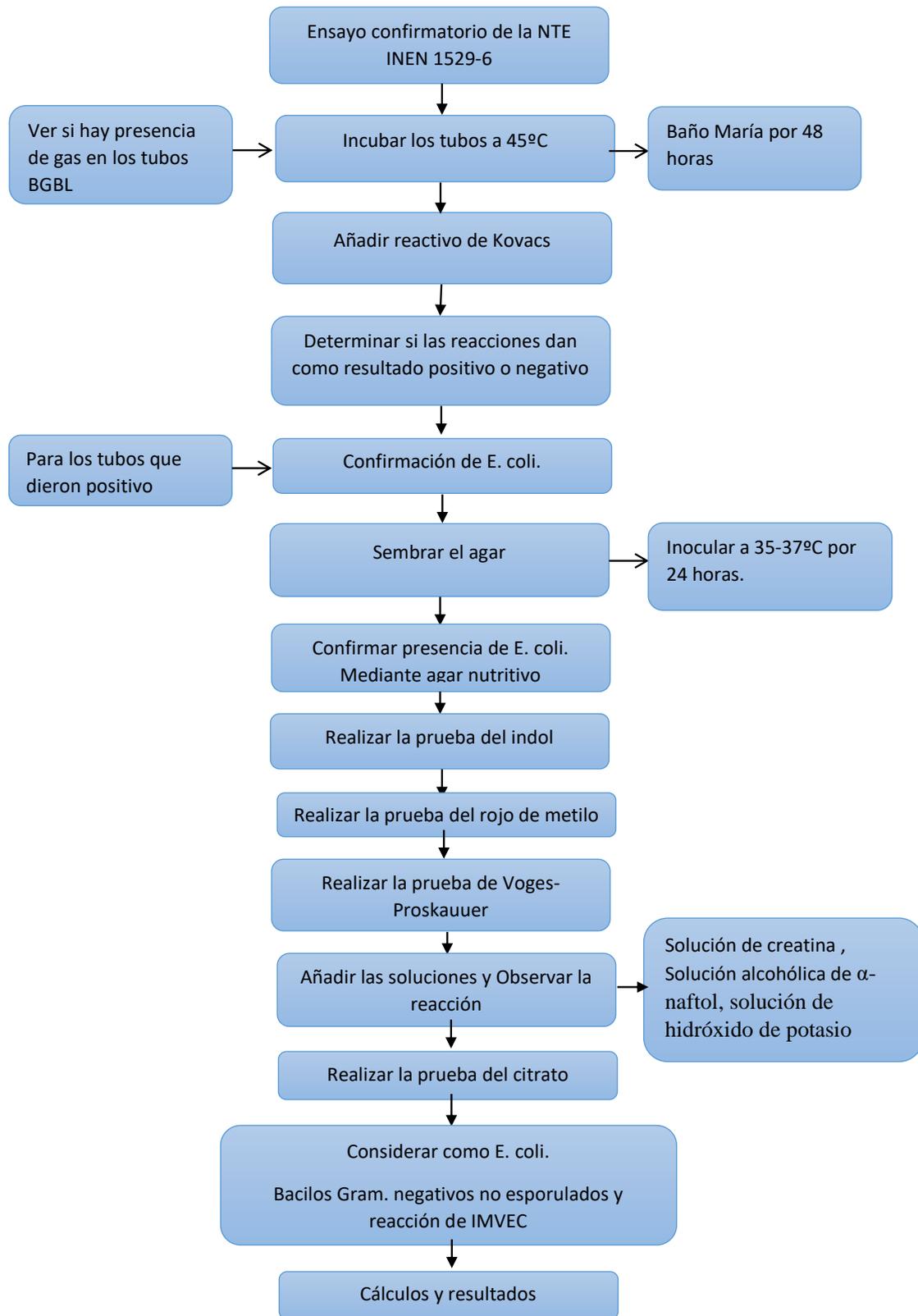


Imagen 13: Diagrama del proceso de recuento de Escherichia coli. Fuente:

Autor.



3.6.3 Detección de Salmonella

La detección de los microorganismos de Salmonella de la muestra se suero dulce de leche se está basado en la norma NTE INEN 1529-15, en la cual se establece el método de ensayo para detectar Salmonella en alimentos. .

Según la norma (INEN 1529-15, 2009) establece control microbiológico de los alimentos, el método de detección de la salmonella y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.6.3.1 Fundamento.

Las salmonellas, cuando presentes en los alimentos, generalmente lo están en pequeños números, algunas veces debilitadas y frecuentemente acompañadas de un gran número de otros miembros de Enterobacteriaceae, por tanto, en este método se considera las siguientes etapas:

Pre-enriquecimiento. Cultivo de la muestra a 37° C en medios mínimos sencillos, exentos de agentes químicos selectivos a fin de lograr la revitalización de las salmonelas lesionadas.

Enriquecimiento selectivo. Subcultivo a 37° C y entre 42 a 43° C, en medios líquidos selectivos del cultivo pre-enriquecido, para inhibir o restringir el crecimiento de la flora competitiva y favorecer la multiplicación de las salmonelas.

Siembra en placa de medios selectivos sólidos. Inoculación de los cultivos de enriquecimiento selectivo en la superficie de agares selectivos y diferenciales, para visualizar las colonias que por su aspecto característico se las considera como de Salmonella presuntiva.

Identificación. Subcultivo de las colonias de Salmonella presuntiva y determinación de sus características bioquímicas y serológicas para identificarlas como miembros del género Salmonella.

El desarrollo del proceso se describe en la imagen 14.

3.6.3.2 Diagrama del proceso de detección de salmonella.

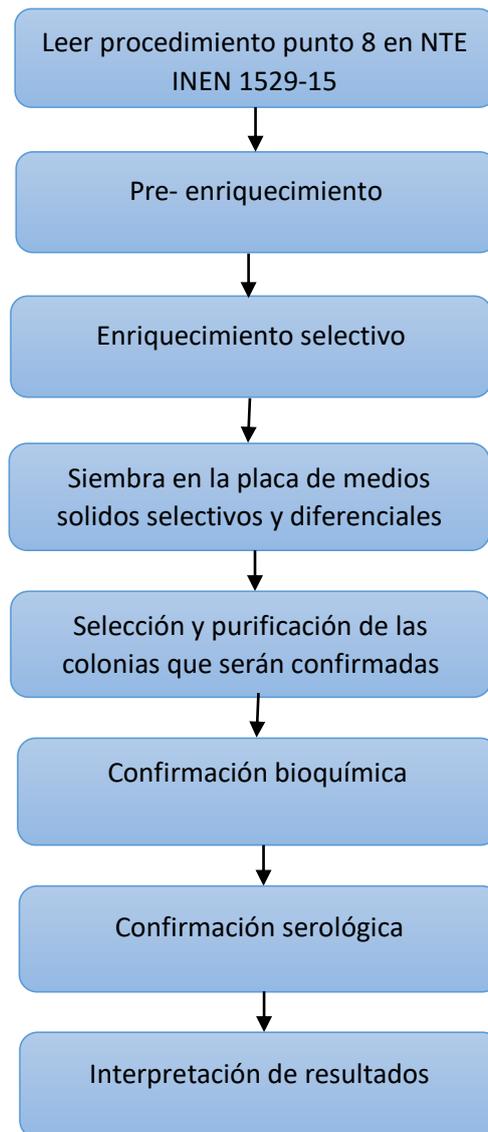


Imagen 14: Diagrama del proceso de detección de salmonella. Fuente: Autor.

3.7 Análisis físico-químico de la bebida fermentada.

3.7.1 pH del de la bebida fermentada.

El pH representa la acidez actual (concentración de H⁺ libres) en la solución, para le determinación del pH del suero dulce de leche se baso en la norma NTE INEN 0973, en la cual se establece como el método potenciométrico para determinar el pH en agua potable, pero se aplicó para la determinación del pH de la bebida fermentada siguiendo los procedimientos establecidos en la norma (NTE INEN 0973).



3.7.1.1 Fundamento

Determinación electrométrica del pH en una muestra, utilizando un electrodo de vidrio que mide el cambio eléctrico producido por el cambio de pH.

3.7.1.2 Equipos y reactivos

Equipos	Reactivos
Potenciómetro	Bebida fermentada
Piseta	Agua destilada
Vaso de precipitación	Soluciones tampón pH4, pH7, pH9

Tabla 11: Equipos y reactivos para la medición del pH del suero. Fuente: Autor

3.7.1.3 Procedimiento:

- Efectuar la determinación por duplicado sobre la muestra.
- Lavar los electrodos con agua destilada y calibrar el aparato a la temperatura de la muestra, utilizando una solución de referencia cuyo pH sea similar al esperado para la muestra.
- Colocar la muestra en el vaso de precipitación, introducir los electrodos y efectuar la determinación del pH.

3.7.1.4 Diagrama del proceso de la medición del pH.

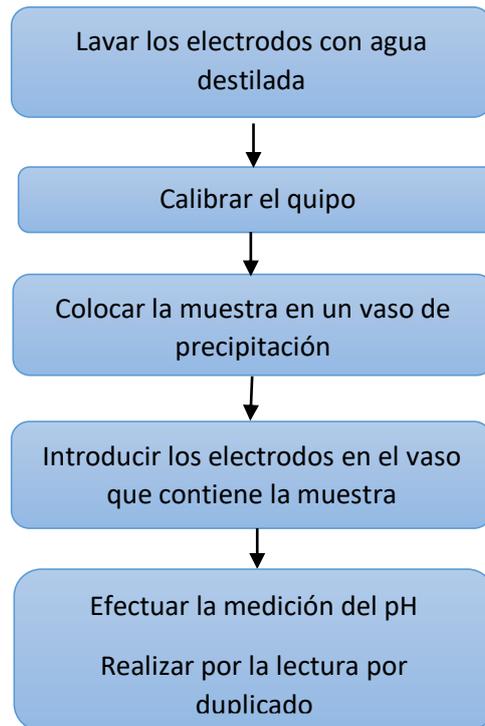


Imagen 15: Diagrama del proceso de medición del pH. Fuente: Autor.

3.7.2 Análisis para la determinación del % de grasa

La medición del contenido de grasa en la bebida fermentada basada en la norma NTE INEN 0012, en la cual se describe el método de Gerber.

Según la norma (INEN 0013) el método de GERBER determina el contenido de grasa de un producto y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.7.2.1 Fundamento

Separar, mediante acidificación y centrifugación, la materia grasa contenida en el producto analizado, y determinar el contenido de grasa mediante lectura directa en un butirómetro estandarizado.



3.7.2.2 Materiales y reactivos

Materiales	Reactivo
Pipeta aforada de 10 ml, de seguridad, para ácido sulfúrico	Ácido sulfúrico, concentrado para análisis, con densidad $1,815 \pm 0,003$ g/cm ³ a 20°C.
Pipeta aforada de 1ml, para alcohol amílico.	
Pipeta aforada de 10,94ml, para medir la muestra	Alcohol amílico, compuesto principalmente de 3-metil-butanol y 2-metil-butanol y prácticamente exento de alcoholes amílicos secundarios o terciarios y furfural; deberá tener una densidad de $0,811 \pm 0,002$ g/cm ³ a 20°C. Agua destilada.
Butirómetros Gerber	
Centrífuga, con velocidad de 1100 ± 100 r/min.	
Baño de agua, con regulador de temperatura, ajustado a $65^\circ \pm 2^\circ$ C	
Baño María.	

Tabla 12: Materiales y reactivos para el proceso de la determinación del % de grasa. Fuente: Autor

3.7.2.3 Procedimiento

- Llevar la muestra a una temperatura de aproximadamente 20°C, y mezclarla mediante agitación suave hasta que esté homogénea, cuidando que no haya separación de grasa por efecto de la agitación.
- Para la determinación del contenido de grasa debe usarse el butirómetro Gerber.
- Verter 10ml, exactamente medidos, de ácido sulfúrico en el butirómetro respectivo, cuidando de no humedecer con ácido el cuello del butirómetro.
- Invertir lentamente, tres o cuatro veces, la botella que contiene la muestra preparada, y pipetear 10,94ml de muestra, de tal manera que el borde inferior del menisco coincida con la línea de calibración de la pipeta después de limpiar con papel absorbente la parte exterior de su punta de descarga.



- Luego, sosteniendo la pipeta con su punta pegada al borde inferior del cuello del butirómetro, descargar cuidadosamente la muestra en el mismo hasta que el menisco se detenga, dejar transcurrir 3 segundos y frotar la punta de la pipeta contra la base del cuello del butirómetro.
- Verter 1ml, exactamente medido, de alcohol amílico en el butirómetro, cuidando de no humedecer con el alcohol el cuello del butirómetro, El alcohol amílico debe añadirse siempre después de la muestra.
- Tapar herméticamente el cuello del butirómetro y agitar en una vitrina de protección, invirtiendo lentamente al butirómetro dos o tres veces durante la operación.
- Inmediatamente después de la agitación, centrifugar el butirómetro con su tapa colocada hacia afuera. Si no hay un número suficiente de butirómetros para llenar completamente la centrífuga, colocarlos simétricamente, equilibrándolos con uno que contenga igual volumen de agua en caso de ser necesario. Una vez que la centrífuga alcanza la velocidad necesaria, continuar la centrifugación durante un tiempo no menor de 4 min ni mayor de 5 min, a tal velocidad.
- Retirar el butirómetro de la centrífuga y colocarlo, con la tapa hacia abajo, en el baño de agua a $65^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo no menor de 4 min ni mayor de 10 min, manteniendo la columna de grasa completamente sumergida en el agua.
- Antes de proceder a la lectura, colocar el nivel de separación entre el ácido y la columna de grasa sobre la marca de una graduación principal de la escala; esto se consigue presionando o aflojando adecuadamente la tapa del butirómetro. Leer las medidas correspondientes a la parte inferior del menisco de grasa y al nivel de separación entre el ácido y la columna de grasa; la diferencia entre las dos lecturas da el contenido de grasa de la leche. Al realizar las lecturas, debe mantenerse la escala en posición vertical y el punto de lectura al mismo nivel de los ojos.

3.7.2.4 Diagrama del proceso de determinación del % de grasa en la bebida fermentada.

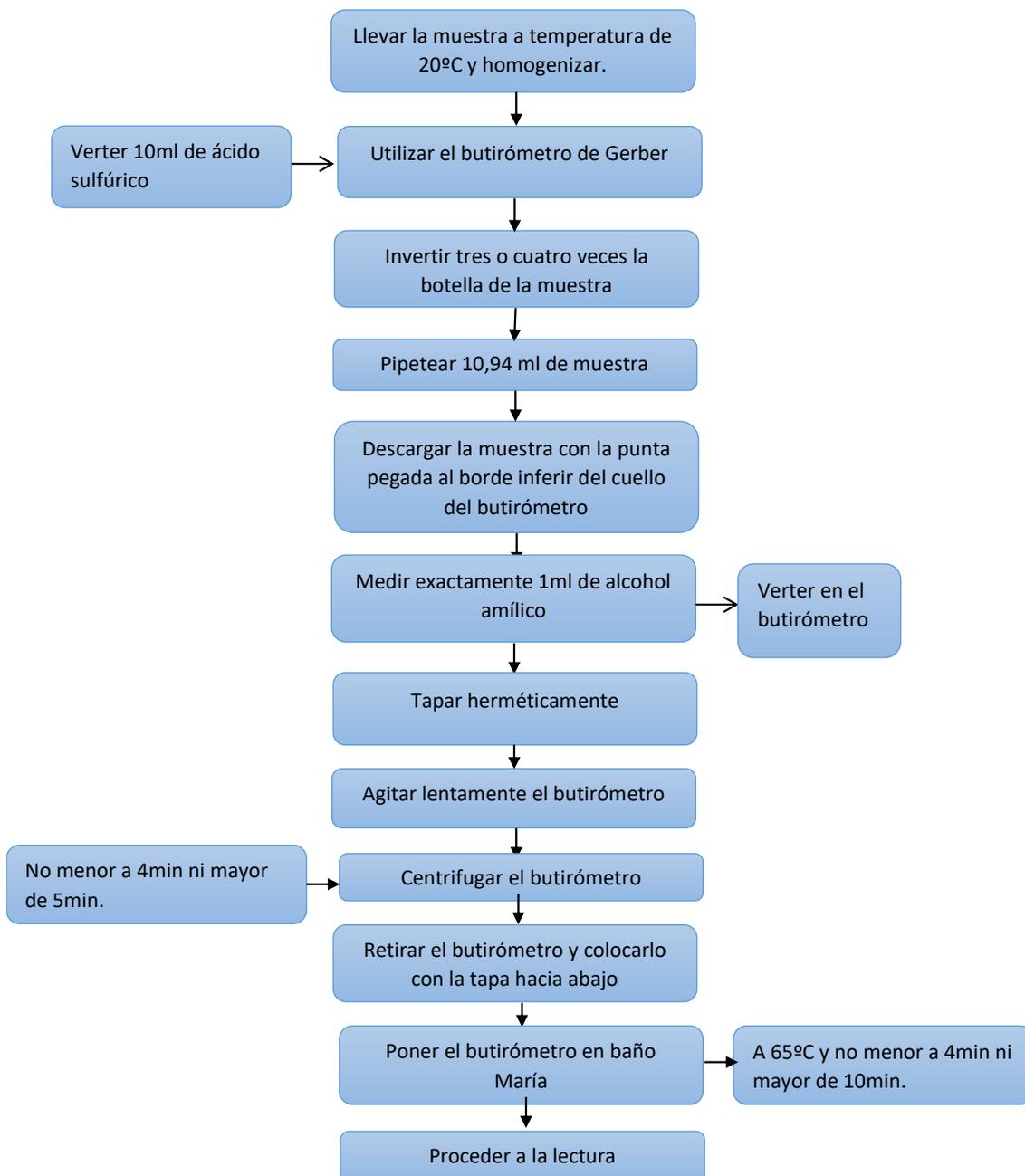


Imagen 16: Diagrama del proceso de determinación del % de grasa. Fuente: Autor.



3.7.3 Análisis para la determinación del % de glúcidos totales.

La medición del porcentaje de glúcidos está basada en la reacción de FEHLING

3.7.3.1 Fundamento.

Se trata de una reacción redox en la que el grupo aldehído (reductor) de los azúcares es oxidado a grupo ácido por el Cu^{2+} que se reduce a Cu^+ . Los carbohidratos monosacáridos como los disacáridos reductores reaccionan con el Cu^{2+} dando un precipitado rojo de óxido cuproso.

Esta reacción se debe tratar en un medio básico por lo que es necesario introducir en la reacción tartrato sódico-potásico para evitar la precipitación del hidróxido cúprico.

El desarrollo del proceso se describe en el diagrama de la imagen 17.

3.7.3.2 Diagrama del proceso de determinación del % de glúcidos en la bebida fermentada.

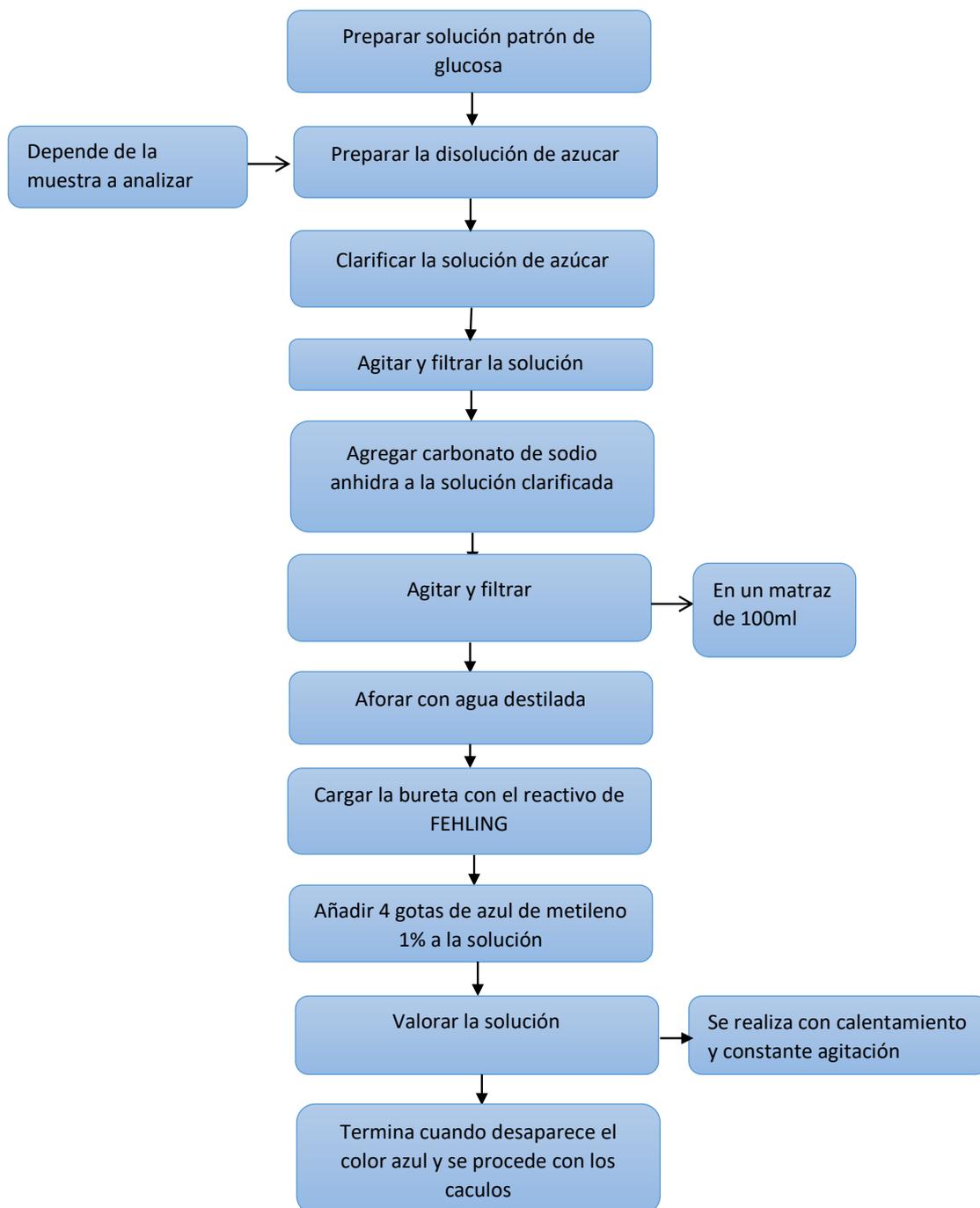


Imagen 17: Diagrama del proceso para la determinación del % de glúcidos.

Fuente: Autor.



3.7.4 Análisis para la determinación del % de proteína

La medición del contenido de proteína en la bebida fermentada está basada en la norma NTE INEN 0016, en la cual se utiliza el de KJELDAHL.

Según la norma (INEN 0016) el método de KJELDAHL determina el contenido de proteína de una muestra y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.7.4.1 Fundamento.

El método se basa en la destrucción de la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado, formándose sulfato de amonio que en exceso de hidróxido de sodio libera amoníaco, el que se destila recibiendo en:

- a) Ácido sulfúrico donde se forma sulfato de amonio y el exceso de ácido es valorado con hidróxido de sodio en presencia de rojo de metilo, o
- b) Ácido bórico formándose borato de amonio el que se valora con ácido clorhídrico.

3.7.4.2 Equipos y reactivos

Equipos	Reactivos
Aparato de Kjeldahl, para digestión y destilación.	Ácido sulfúrico concentrado, con densidad 1,84 g/ml a 20°C, exento de nitrógeno.
Matraz Kjeldahl de 50ml.	Solución 0,1N de ácido sulfúrico, debidamente estandarizada.
Matraz Erlenmeyer de 500ml.	Solución concentrada de hidróxido de sodio. Disolver 450 g de hidróxido de sodio sólido en agua destilada y diluir la solución hasta 1000ml. La densidad relativa de la solución final debe ser mayor de 1,36.
Bureta de 50ml.	Solución 0,1N de hidróxido de sodio, debidamente esterilizada.
Balanza analítica. Sensible al 0,1 mg.	Solución de sulfuro alcalino o solución de tiosulfato de sodio. Disolver 40 g de sulfuro de potasio o de sulfuro de sodio en



1000ml de agua destilada; o disolver 80 g de tiosulfato de sodio pentahidratado en 100 cm³ de agua destilada.

Sulfato de potasio o sulfato de sodio anhidro, exento de nitrógeno, reactivo para análisis.

Oxido mercúrico, o mercurio metálico, reactivo para análisis.

Solución alcohólica de rojo de metilo.
Disolver 1 g de rojo de metilo en 200ml de alcohol etílico al 95% (V/V).

Tabla 13: Materiales y reactivos para el proceso de la determinación del % de proteína. Fuente: Autor

3.7.4.3 Procedimiento

La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra preparada

- Pesar, con aproximación al 0,1 mg, aproximadamente 5 g de muestra.
- Transferir la muestra al matraz Kjeldahl y agregar el catalizador, formado por 0,7 g de óxido mercúrico (ó 0,65 g de mercurio metálico) y 15 g de sulfato de potasio en polvo (ó 15 g de sulfato de sodio anhidro)
- Agregar 25ml de ácido sulfúrico concentrado, y un trozo pequeño de parafina para reducir la formación de espuma durante la digestión.
- Agitar el matraz y colocarlo en forma inclinada en la hornilla del aparato de kjeldahl. Calentar suavemente hasta que no se observe formación de espuma, y aumentar el calentamiento hasta que el contenido del matraz hierva uniformemente y presente un aspecto límpido; continuar el calentamiento durante 30 minutos y dejar enfriar.



- Agregar aproximadamente 200ml de agua destilada, enfriar la mezcla hasta una temperatura inferior a 25°C, agregar 25ml de la solución de sulfuro alcalino (o tiosulfato de sodio) y agitar la mezcla para precipitar el mercurio.
- Agregar unas pocas granallas de zinc para evitar proyecciones durante la ebullición. Inclinar el matraz y verter por sus paredes, cuidadosamente, para que se formen dos capas, 50ml de la solución concentrada de hidróxido de sodio (o mayor cantidad, si fuera necesario, para alcanzar un alto grado de alcalinidad).
- Inmediatamente, conectar el matraz Kjeldahl al condensador mediante la ampolla de destilación. El extremo de salida del condensador debe estar sumergido en 50ml de la solución 0,1 N de ácido sulfúrico contenida en el matraz Erlenmeyer de 500ml a la cual se han agregado unas gotas de la solución alcohólica de rojo de metilo.
- Agitar el matraz Kjeldahl hasta mezclar completamente su contenido y luego calentarlo.
- Destilar hasta que todo el amoníaco haya pasado a la solución acida contenida en el matraz Erlenmeyer, (lo cual se logra después de destilar por lo menos 150ml).
- Usando la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, titular el exceso de ácido contenido en el matraz Erlenmeyer.
- Realizar un solo ensayo en blanco con todos los reactivos, sin la muestra y siguiendo el mismo procedimiento descrito para cada determinación o serie de determinaciones.
- Calculo el contenido de proteínas en la leche se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$P = (1,40)(6,38) \frac{(V_1 N_1 - V_2 N_2) - (V_3 N_1 - V_4 N_2)}{m}$$

Siendo:

P = contenido de proteínas en la leche, en porcentaje de masa.

V1 = volumen de la solución de ácido sulfúrico empleado para recoger el destilado de la muestra, en ml.

N1 = normalidad de la solución de ácido sulfúrico.



V_2 = volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación, en ml.

N_2 = normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

V_3 = volumen de la solución de ácido sulfúrico empleado para recoger el destilado del ensayo en blanco, en ml.

V_4 = volumen de la solución de hidróxido de sodio empleado en la titulación del ensayo en blanco, en ml.

m = masa de la muestra, en g.

3.7.4.4 Diagrama del proceso de determinación del % de proteína en la bebida fermentada.

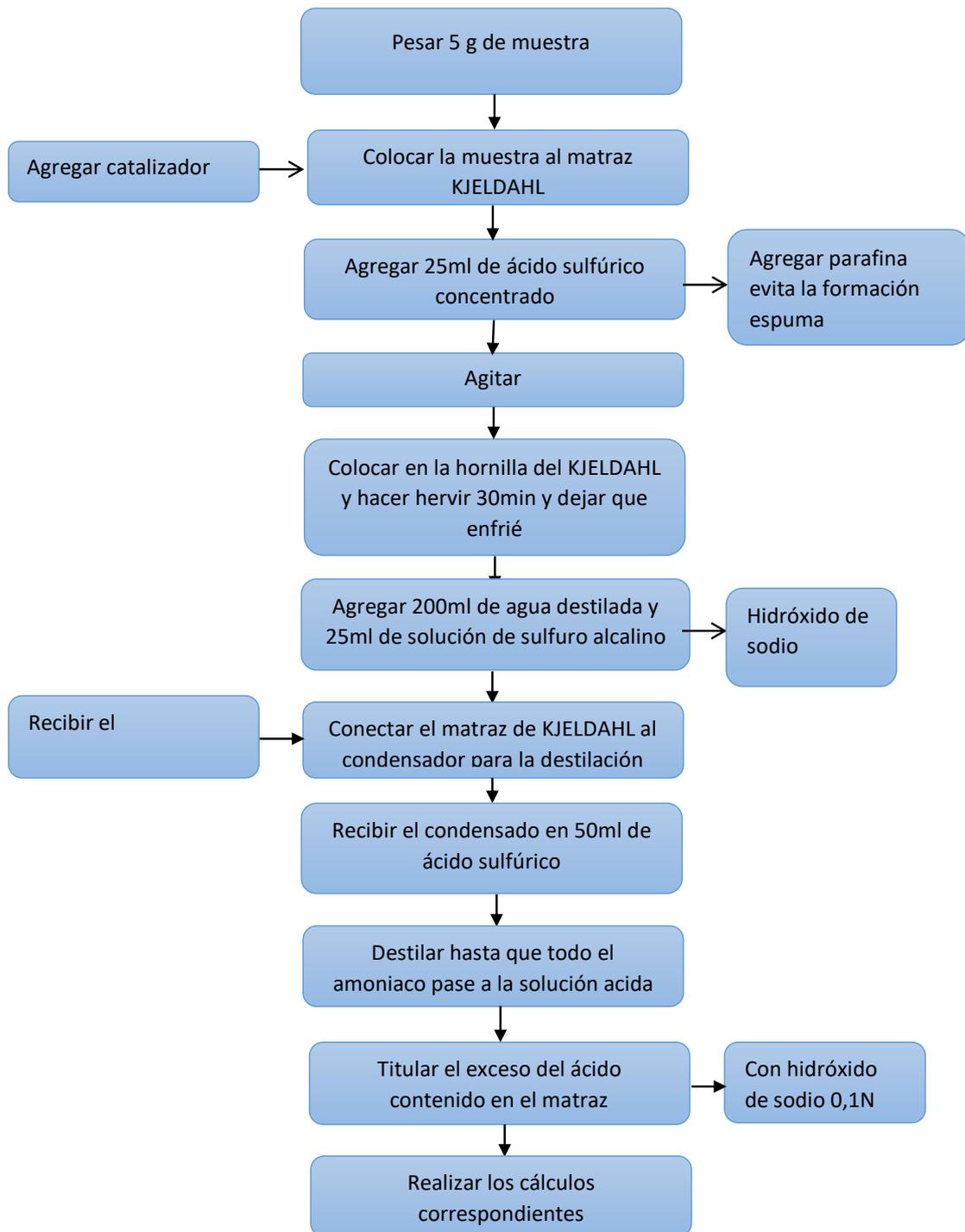


Imagen 18: Diagrama del proceso para la determinación del % de proteína.

Fuente: Autor.



3.7.5 Acidez de la bebida fermentada.

La medición de la acidez está basado en la norma (INEN 0013), en la cual se establece como el método para determinar la acidez titulable de la leche pero se aplicó para la determinación de la acidez de la bebida fermentada.

Según la norma (NTE INEN 0013)

3.7.5.1 Fundamento.

Se titula la acidez con una solución estandarizada de hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador. Se añade la solución de hidróxido hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base ha sido añadida a la solución, el punto final se da con el viraje o cambio de color.

3.7.5.2 Materiales y reactivos

Materiales	Reactivos
Matraz Erlenmeyer de 100ml	Bebida fermentada
Matraz de 500ml	Solución 0,1 N de hidróxido de sodio
Bureta de 25ml	Solución indicadora de fenolftaleína
Estufa	Agua destilada, exenta de CO ₂ y fría

Tabla 14: Materiales y reactivos para la medición de la acidez titulable. Fuente: Autor.

3.7.5.3 Procedimiento

La determinación realizar por duplicado sobre la misma muestra preparada.

- Lavar cuidadosamente y secar el matraz Erlenmeyer.
- Colocar en el Erlenmeyer la muestra.
- Diluir el contenido del matraz con un volumen dos veces mayor de agua destilada, y agregar 2 cm³ de solución indicadora de fenolftaleína.
- Agregar, lentamente y con agitación, la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, justamente hasta conseguir un color rosado



- Continuar agregando la solución hasta que el color rosado persista durante 30s.
- Leer en la bureta el volumen de solución empleada, con aproximación a 0,05ml.
- La acidez titulable de la leche se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$\% \frac{P}{V} \text{Ácido Láctico} = A = \frac{(VNK)_{NaOH} * m_{eq} * 100}{V_m}$$

Siendo:

A= acidez titulable de la leche, en porcentaje en masa de ácido láctico.

V_m = volumen de la muestra.

V = volumen del hidróxido de sodio.

N= normalidad del hidróxido de sodio.

K= constante del hidróxido de sodio.

m_{eq}= miliequivalentes del ácido láctico

3.7.5.4 Diagrama del proceso de la medición de la acidez.

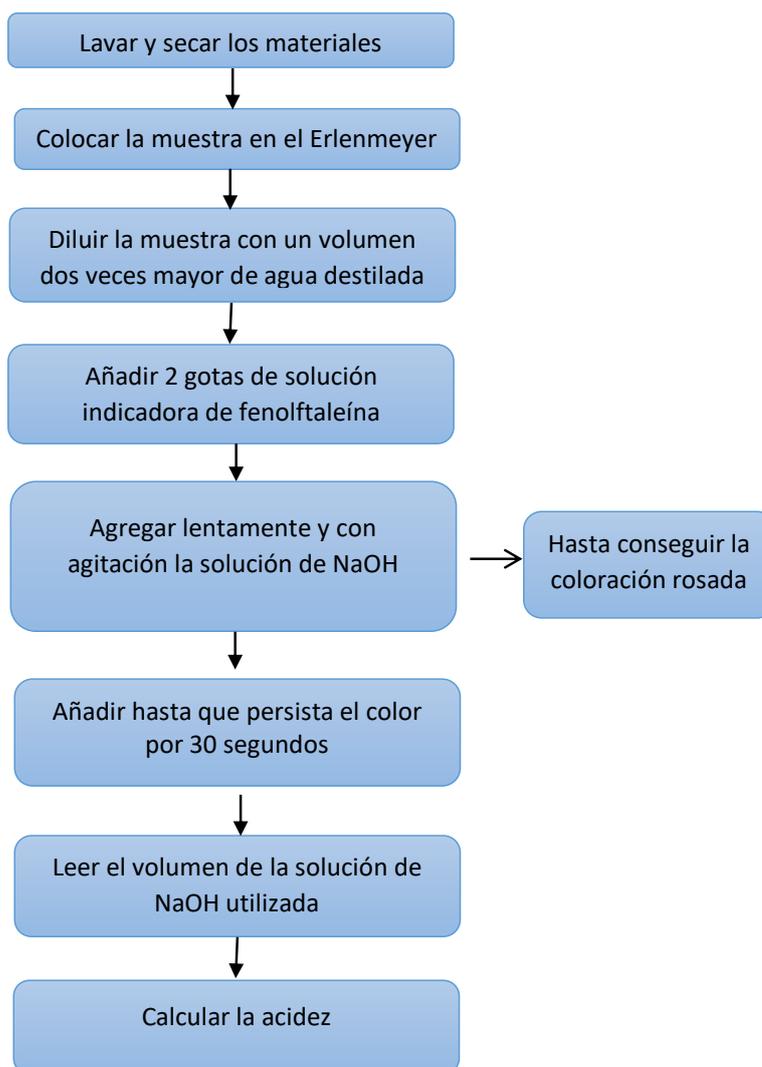


Imagen 19: Diagrama del proceso de medición de la acidez. Fuente: Autor.



3.8 Análisis microbiológico de la bebida fermentada.

3.8.1 Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos.

El recuento de los microorganismos aerobios de la bebida fermentada está basado en la norma NTE INEN 1529-5, en la cual se establece como el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.

Según la norma (INEN 1529-5, 2006) establece el control microbiológico de los alimentos y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.8.1.1 Fundamento

Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital esté presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento (INEN 1529-5, 2006).

El desarrollo del proceso se describe en el diagrama de la imagen 20.

3.8.1.2 Diagrama del proceso del recuento de aerobios mesófilos.

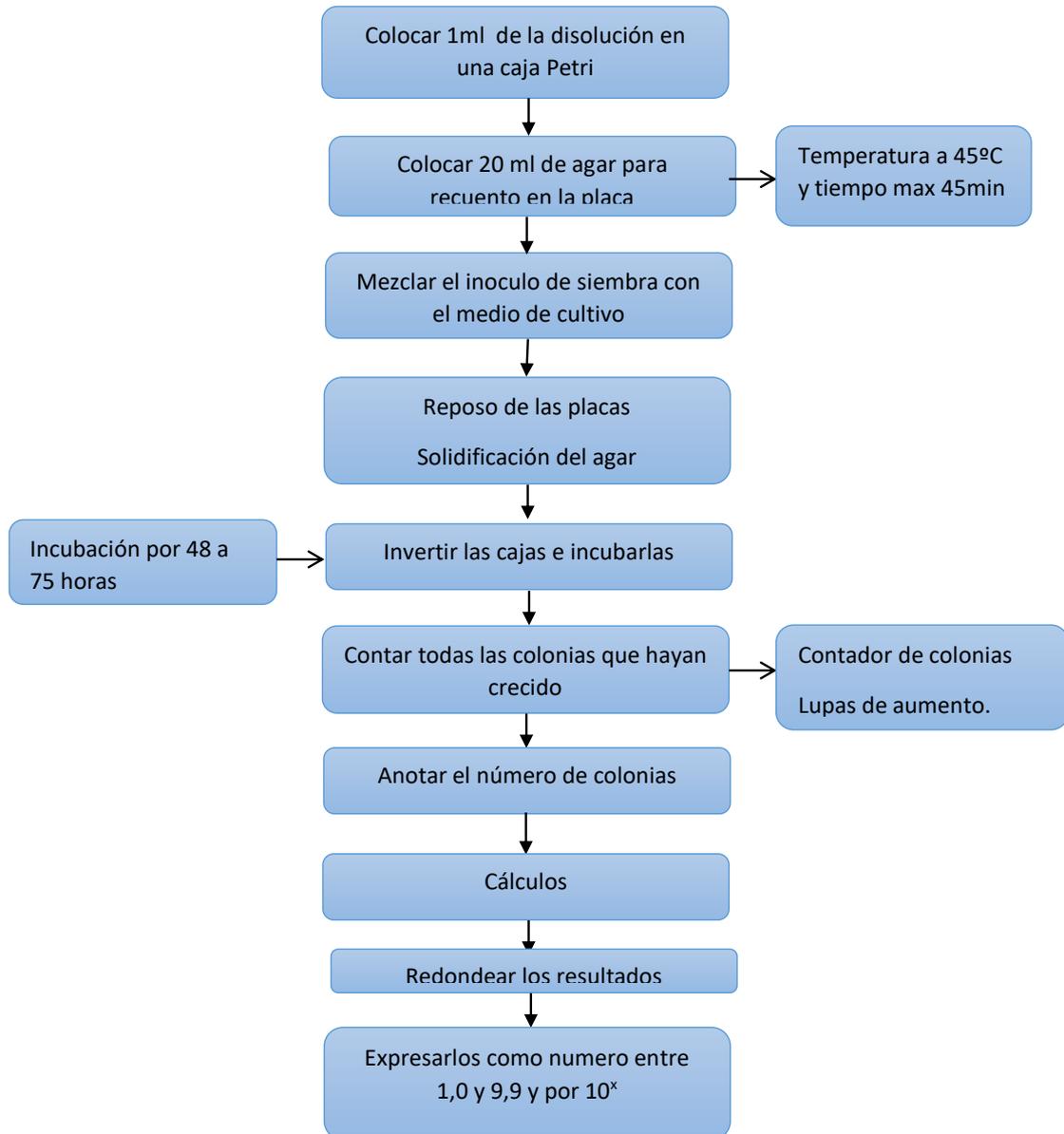


Imagen 20: Diagrama del proceso de recuento de aerobios mesófilos. Fuente: Autor.



3.8.2 Recuento estándar en placa de Escherichia coli

El recuento de los microorganismos Escherichia coli de la muestra de la bebida fermentada está basado en la norma NTE INEN 1529-8, en la cual se establece como el método que establece la técnica del número más probable para la determinación de coliformes fecales y las pruebas confirmatorias de Escherichia coli e identificación de las especies del grupo coliforme fecal.

Según la norma (INEN 1529-8, 1990) establece el recuento de Escherichia coli, control microbiológico de los alimentos y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.8.2.1 Fundamento.

Este método se basa en la prueba de Eijkman modificada para detectar la fermentación de la lactosa con producción de gas a $44 - 45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y complementada con la prueba de indol (**Anexo 3**) a esta temperatura, estos ensayos se realizan en caldo brillante-bilis lactosa y en caldo triptona partiendo de un inóculo tomado de cada tubo gas positivo del cultivo para coliformes totales, (INEN 1529-6) e incubados a $45,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. La confirmación de E. coli y la diferenciación de las especies y variedades del grupo coliforme fecal, se realizan mediante los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato sódico.

El desarrollo del proceso se describe en el diagrama de la imagen 21.



3.8.2.2 Diagrama del proceso del recuento de Echerichia coli.

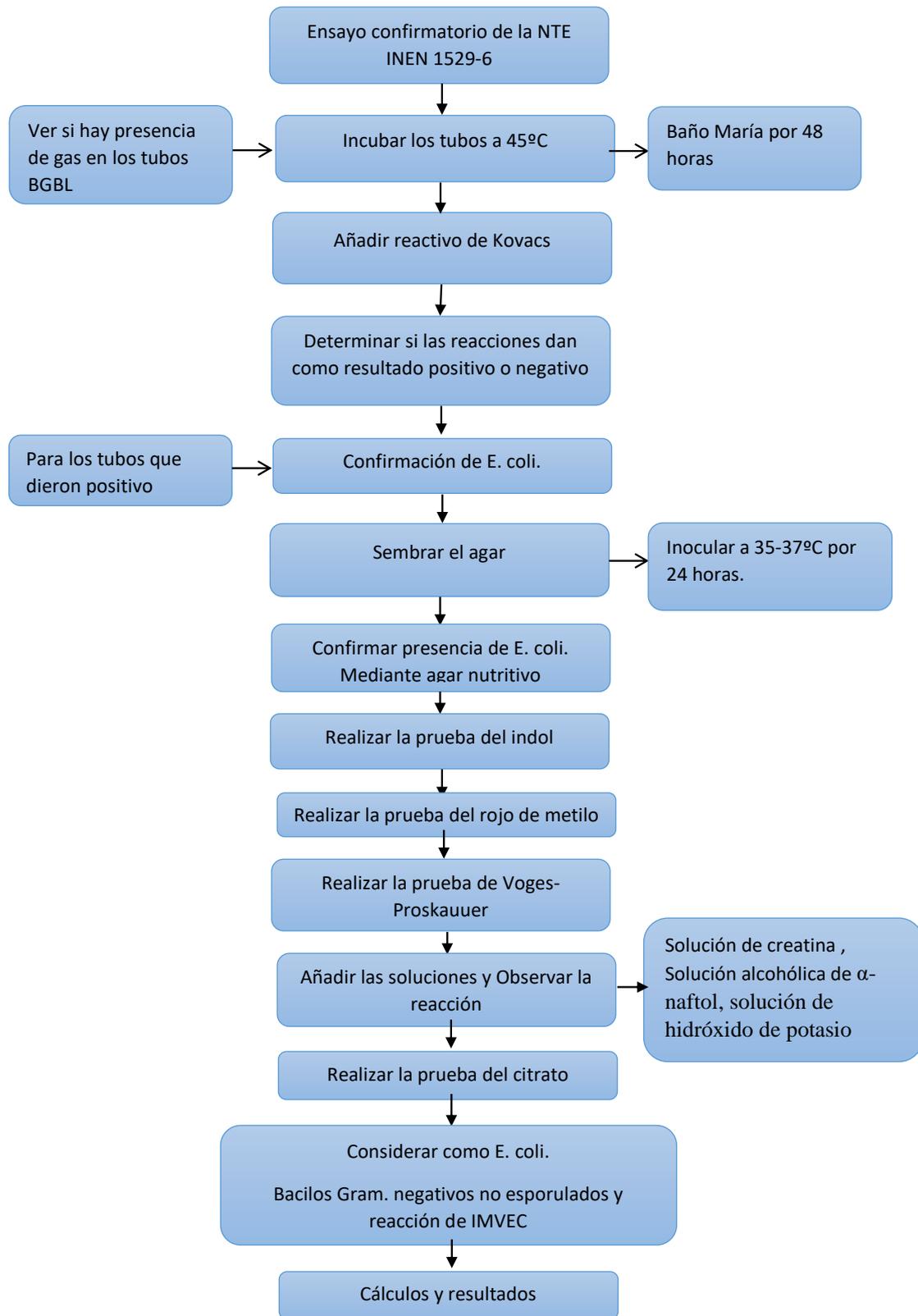


Imagen 21: Diagrama del proceso de recuento de Escherichia coli. Fuente:

Autor.



3.8.3 Detección de Salmonella

La detección de los microorganismos de Salmonella de la bebida fermentada está basado en la norma NTE INEN 1529-15, en la cual se establece el método de ensayo para detectar Salmonella en alimentos.

Según la norma (INEN 1529-15, 2009) establece control microbiológico de los alimentos, el método de detección de la salmonella y está determinada mediante procedimientos normalizados.

3.8.3.1 Fundamento.

Las salmonellas, cuando están presentes en los alimentos, generalmente lo están en pequeñas cantidades, algunas veces debilitadas y frecuentemente acompañadas de un gran número de otros miembros de Enterobacteriaceae, por tanto, en este método se considera las siguientes etapas:

Pre-enriquecimiento. Cultivo de la muestra a 37° C en medios mínimos sencillos, exentos de agentes químicos selectivos a fin de lograr la revitalización de las salmonelas lesionadas.

Enriquecimiento selectivo. Subcultivo a 37° C y entre 42 a 43° C, en medios líquidos selectivos del cultivo pre-enriquecido, para inhibir o restringir el crecimiento de la flora competitiva y favorecer la multiplicación de las salmonelas.

Siembra en placa de medios selectivos sólidos. Inoculación de los cultivos de enriquecimiento selectivo en la superficie de agares selectivos y diferenciales, para visualizar las colonias que por su aspecto característico se las considera como de Salmonella presuntiva.

Identificación. Subcultivo de las colonias de Salmonella presuntiva y determinación de sus características bioquímicas y serológicas para identificarlas como miembros del género Salmonella.

El desarrollo del proceso se describe en el diagrama de la imagen 22.

3.8.3.2 Diagrama del proceso de detección de salmonella.

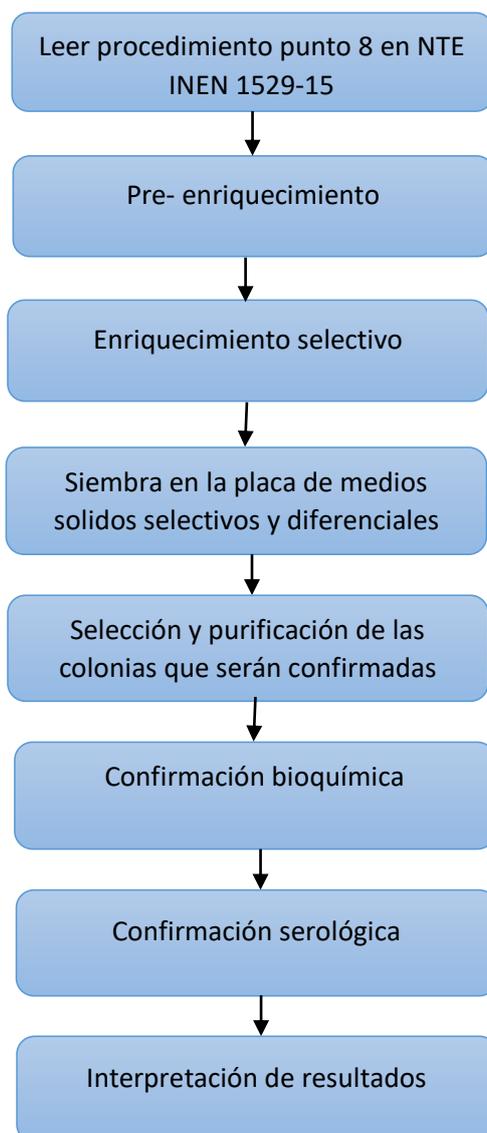


Imagen 22: Diagrama del proceso de detección de salmonella. Fuente: Autor.

3.9 Valoración de la viabilidad del cultivo probiótico.

Se midió la viabilidad del probiótico mediante la técnica de siembra de medios de cultivos. Para el recuento de *Bifidobacterium* BB-12, mediante el recuento de los microorganismos aerobios que está basado en la norma (INEN 1529-5, 2006), en la cual se establece como el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal.

Según la norma (INEN 1529-5, 2006) establece el control microbiológico de los alimentos y determinada mediante procedimientos normalizados.



3.9.1 Fundamento.

Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital esté presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento (INEN 1529-5, 2006).

3.9.2 Materiales y medios de cultivo

Materiales	Medios de cultivo
Pipetas serológicas de punta ancha de 1,5ml y 10ml graduadas en 1/10 de unidad.	Agar para recuento en placa (Plate Count Agar).
Cajas Petri de 90mm x 15mm.	Agua petonada al 0,1 %
Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100ml, 250ml, 500ml y 1000ml con tapa de rosca autoclavable.	(diluyente).
Tubos de 150mm x 16mm.	
Gradillas.	
Contador de colonias.	
Balanza de capacidad no superior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad.	
Baño de agua regulado a 45°C ± 1°C.	
Incubadora regulable (25°C - 60°C).	
Autoclave.	
Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo	
Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15°C a -20°C	



Tabla 15: Materiales y medios de cultivo para el recuento de aerobios mesófilos. Fuente: Autor

3.9.3 Procedimiento.

- Para cada dilución el ensayo se hará por duplicado. En cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositará 1ml de cada dilución. Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.
- Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 ml de agar para recuento en placa-PCA, fundido y templado a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La adición del medio no debe pasar de más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución.
- Cuidadosamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.
- Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.
- Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar.
- Invertir las cajas e incubarlas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas.
- No apilar más de 6 placas. Las pilas de placas deben estar separadas entre sí, de las paredes y del techo de la incubadora.
- Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias y utilizando un contador de colonias, contar todas las colonias que hayan crecido en el medio, incluso las pequeñas, pero, se debe tener cuidado para no confundirlas con partículas de alimentos o precipitados, para esto, utilizar lupas de mayor aumento.
- Las colonias de crecimiento difuso deben considerarse como una sola colonia si el crecimiento de este tipo de colonias cubre menos de un cuarto de la placa; si cubre más la caja no será tomada en cuenta en el ensayo.
- Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.
- Realizar los respectivos cálculos.



- Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias).
- Calcular el número N de microorganismo por gramo o ml de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

En donde: Σc = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas:

V = Volumen inoculado en cada caja Petri

n1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada

n2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada

d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

- Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10^x , donde x es la correspondiente potencia de 10.

3.9.4 Diagrama del proceso del recuento de aerobios mesófilos.

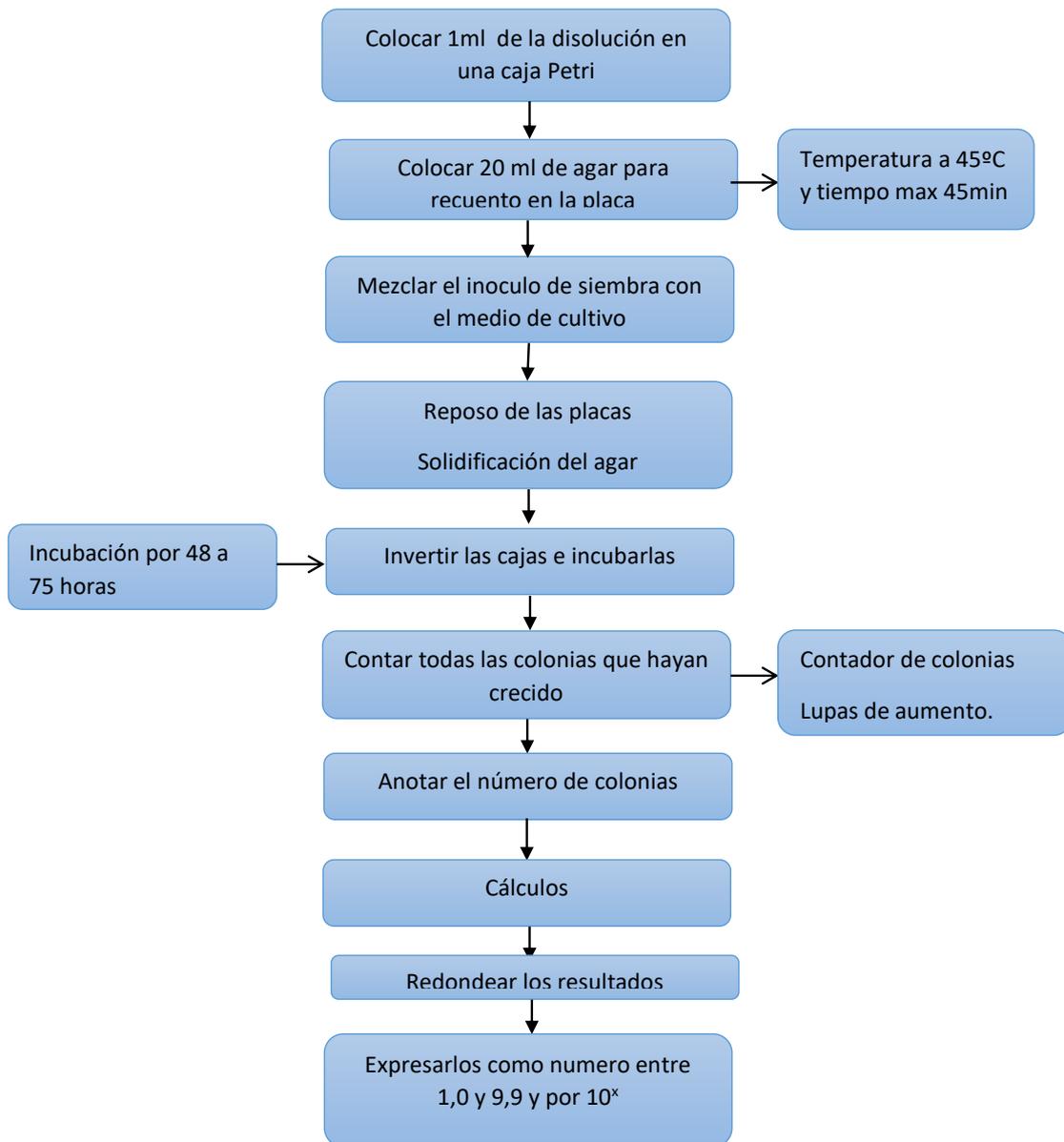


Imagen 23: Diagrama del proceso de recuento de aerobios mesófilos. Fuente:

Autor.

3.5.4 Determinar la aceptación sensorial de la bebida.

Las pruebas de evaluación sensoriales se realizaron en el laboratorio de Lácteos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca los catadores fueron los estudiantes de la facultad de ciclos superiores. Con la cual se realizó una encuesta (**ANEXO 5**) en donde se tiene por objeto evaluar la aceptación de un nuevo producto que consiste en bebida de tipo funcional, para



la evaluación se determinó si hay diferencias significativas del proceso, tienen las siguientes variables a analizar: Acidez, Textura, Apariencia, Sabor, Aroma, Aceptación General,

Se realizó una evaluación sensorial de aceptación según la escala de la siguiente tabla 16.

Escala	Significado
1	Me disgusta mucho
2	No me disgusta
3	Ni me gusta ni me disgusta
4	Me gusta
5	Me gusta mucho

Tabla 16: Escala de calificación de la bebida fermentada. Fuente: Autor.



4. CAPITULO IV: Resultados y Discusiones

4.1 Resultado del análisis de calidad de la leche para la elaboración de queso.

Materia prima: Leche

Este análisis se efectuó en el quipo MILKOTESTER del laboratorio de Lácteos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, en la tabla 17 se indican los valores obtenidos, los mismos que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la norma (INEN 0009, 2012).

Parámetro	Medida	Requisito INEN 09	
		MIN	MAX
Grasa	3,3%	3%	-
Solidos no grasos	8,5%	8,2%	-
Densidad	1,03 kg/m ³	1,028 kg/m ³	1,033 kg/m ³
Punto de congelación	-0,51°C	-0,536°C	-0,512
Proteína	3%	2,9%	-
Lactosa	4,4%		
Sales	0,6%		
Agua	0%		

Tabla 17: Análisis de calidad de la leche. Fuente: Autor

4.2 Resultados en la elaboración de queso:

Se elaboró queso fresco con la finalidad de obtener el suero dulce de leche para la bebida fermentada.

Cantidad de leche: 100 litros de leche.

	Obtención:
100 litros de Leche	82 litros de suero
	22 quesos de 600g aprox.



4.3 Resultados de los análisis físico-químico del suero dulce de leche.

4.3.1 Acidez del suero de leche

Datos	
Volumen de muestra	20 ml
Volumen de NaOH	2,5 ml
Normalidad de NaOH	0,1
mili-equivalentes de NaOH	0,09

Tabla 18: Datos para la determinación de la acidez del suero de leche. Fuente Autor.

Determinación de la acidez del suero de leche

$$\% \frac{P}{V} \text{Ácido Láctico} = A = \frac{(VNK)_{NaOH} * m_{eq} * 100}{Vm}$$

Calculo

$$\% \frac{P}{V} \text{Ácido Láctico} = A = \frac{(2,5 * 0,1 * 1)_{NaOH} * 0,09 * 100}{20}$$

Resultado

$$\% \frac{P}{V} \text{Ácido Láctico} = A = 0,1125$$

Tabla 19: Determinación de la acidez del suero. Fuente: Autor

4.3.2 pH del suero de leche

$$pH \text{ inicial} = 6,3$$



4.3.3 Resultado de los análisis de: %proteína, %grasa, % de agua y densidad del suero a ser utilizado.

Las pruebas se realizaron en el equipo MILKOTESTER del laboratorio de Lácteos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, programado para medir los parámetros con respecto al suero de leche y se expresan en la tabla 20.

Parámetro	Medida en %	Requisitos INEN 2594	
		MIN	MAX
Proteína	2%	0,8	-
Grasa	0%	-	0,3
Densidad	1,01kg/m ³		
Agua	34,9%		

Tabla 20: Análisis de proteína, grasa, agua y densidad. Fuente: Autor

Los parámetros medidos cumplen con los requisitos establecidos en la norma (INEN 2594, 2011)

4.4 Análisis microbiológicos del suero dulce de leche.

Los análisis fueron realizados por los técnicos del laboratorio de agua y alimentos y los resultados están expresados en la tabla 21.



Muestra	Parámetro	Método	Unidad	Resultado	Requisitos limite max
Suero de queso pasteurizado	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	UFC/ml	2,1x10 ⁵ UFC/ml	100000 UFC/ml
	Recuento estándar en placa de Escherichia coli	NTE INEN 1529-8	UFC/ml	<1,0x10 ¹ UFC/ml	<10 UFC/ml
	Detección de Salmonella/25ml	NTE INEN 1529-15		Ausencia	Ausencia

Tabla 21: Análisis microbiológico del suero dulce de leche. Fuente: Laboratorio de Análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca..

4.5 Resultado del proceso de fermentación.

4.5.1 Proceso de fermentación del suero

Se trabajó con 4 tratamientos de 3 litros, se bajó el pH del suero pasteurizado mediante la adición de ácido cítrico y la medición en el pH-metro.

Tratamiento	Benzoato de sodio (0,1g por litro)	Ácido cítrico	% de fermento para la inoculación	Cantidad de fermento a utilizar
1			0%	0g en 3 litros
2	1,2g en 12	4,5g en	0,1%	0,025g en 3 litros
3	litros	12 litros	0,3%	0,075g en 3litros
4			0,5%	0,125g en 3litros

Tabla 22: Resultados para el proceso de fermentación. Fuente: Autor.



En la tabla anterior se estableció las cantidades de fermento BB-12 a utilizar, mediante pruebas en los porcentajes utilizados en otros fermentos probióticos, para poder determinar en los diferentes tratamientos de BB-12 cuál es el porcentaje del fermento a utilizar en el proceso final de la elaboración de la bebida.

Medidas de fermentación:

Se realizaron 3 medidas:

- *La primera inicial*
- *La segunda después de 24 horas de fermentación*
- *La tercera a las 29 horas de fermentación.*

4.5.2 Resultado de la medición de pH en el proceso de fermentación

Tratamientos				
	T1 (0%)	T2 (0,1%)	T3 (0,3%)	T4 (0,5%)
Tiempo	pH			
0 horas	4,5	4,5	4,5	4,5
24 horas	4,71	4,72	4,73	4,71
29 horas	4,78	4,76	4,76	4,75

Tabla 23: Medición de pH en los diferentes tratamientos. Fuente: Autor



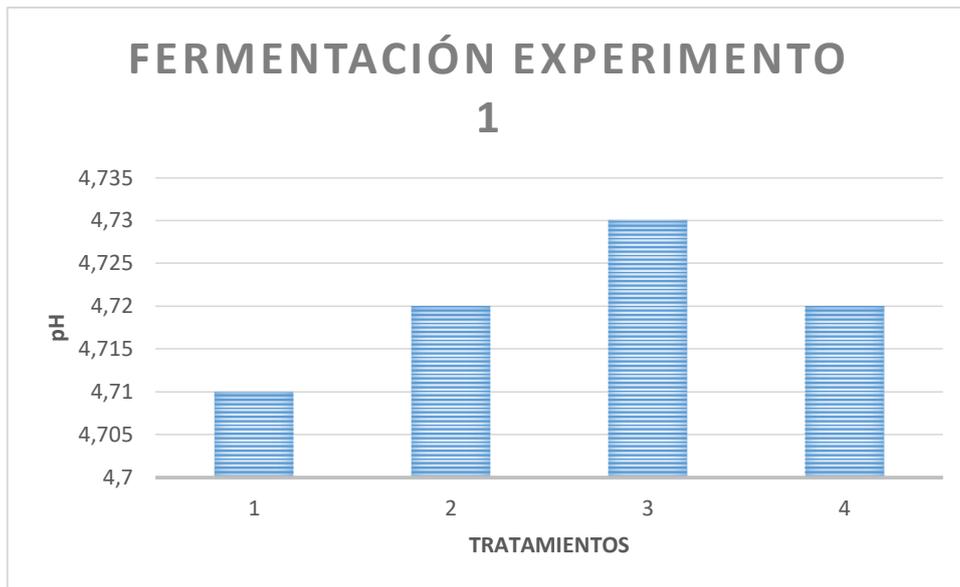
Gráfica 1: Variación del pH vs el tiempo en la fermentación en los diferentes tratamientos. Fuente: Autor

La gráfica 1 muestra el proceso de fermentación y el crecimiento de los microorganismos probiótico en los diferentes tratamientos, muestran un crecimiento lineal con aumento de la pendiente en todos los tratamientos según el cambio de pH a las 24 horas de fermentación ya que se encuentra en la fase exponencial del crecimiento bacteriano, después tienen variación en la pendiente esta comienza a disminuir ya entran en la fase estacionaria los tratamientos 1, 2, 3 y el tratamiento 4 continúa con la misma pendiente lo que significa que sigue en la fase de crecimiento como se observa en la gráfica 1.

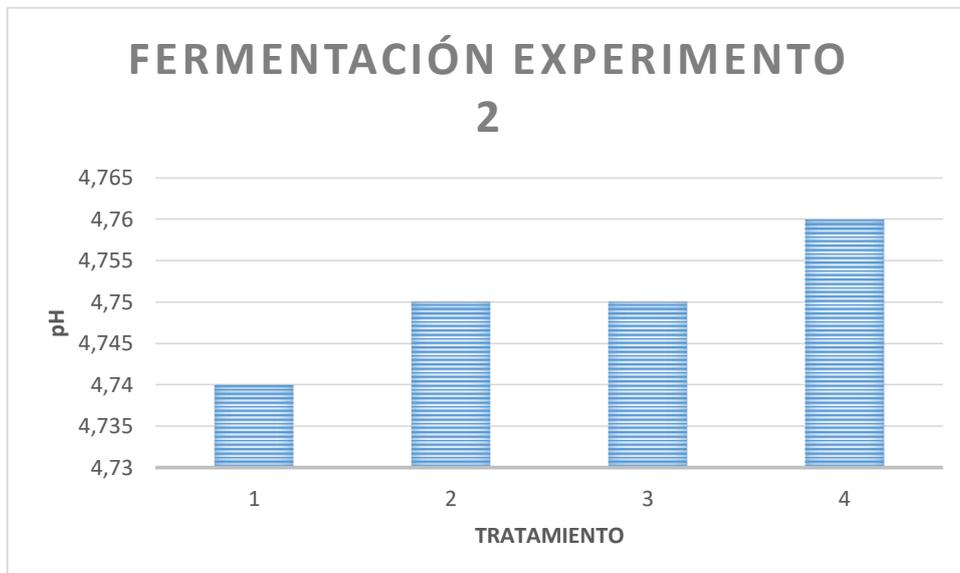
En el proceso de fermentación se realizó la experimentación de la fermentación por duplicado, las medidas de pH de los tratamientos muestran el crecimiento de los microorganismos probióticos según el tiempo.

Tratamientos	Experimento 1	Experimento 2
1	4,71	4,74
2	4,72	4,75
3	4,73	4,75
4	4,72	4,76

Tabla 24: Determinación de crecimiento de microorganismos. Fuente: Autor.



Gráfica 2: Proceso de fermentación experimento 1: Fuente Autor.



Gráfica 3: Proceso de fermentación experimento 2: Fuente Autor.

En la gráficas 2 y 3 se muestran los tratamientos de fermentación y se determinó que los tratamientos 3 y 4 son factibles para realizar la fermentación en el suero dulce de leche ya que presentan un crecimiento mayor de los microorganismos probióticos según la variación del pH en los diferentes tratamientos. Se trabajó con los cálculos del % de fermento del Tratamiento 4 ya que contiene una mayor cantidad de fermento y esto nos ayudó a que haya una fermentación completa de todo el suero dulce de leche.



Cuadro comparativo de los tipos de fermento.

	Tratamiento			
	1	2	3	4
Cantidad de inocular	0g	0,025g	0,075g	0,125g
Crecimiento de microbiano probiótico	0 UFC/ml	185000 UFC/ml	185900 UFC/ml	292400 UFC/ml
pH	6,3	4,75	4,75	4,76
Acidez	0,1125 % Ácido Láctico	0,2160 % Ácido Láctico	0,3060 % Ácido Láctico	0,5240 % Ácido Láctico

Tabla 25: Resultados de los diferentes tratamientos. Fuente Autor.

De acuerdo con la tabla 25 se estableció que el tratamiento 4 nos da los mejores resultados y se utilizó los cálculos de este tratamiento para el proceso de la fermentación en la elaboración de la bebida fermentada final.

4.6 Resultados de la elaboración de la Bebida Fermentada.

Para la elaboración de la bebida fermentada final se trabajó con 12 litros de suero pasteurizado y se realizó los cálculos del porcentaje de fermento del tratamiento 4 de las pruebas de fermentación, para determinar la cantidad de fermento a utilizar.

4.6.1 Cálculos para la elaboración de la bebida

Clarificante (Gelatina sin sabor)	Benzoato de sodio (0,1g por litro)	Ácido cítrico	% de fermento para la inoculación	Cantidad de fermento a utilizar
7,5g en 12 litros	1,2g en 12 litros	4,5g en 12 litros	0,5%	0,5g en 12 litros

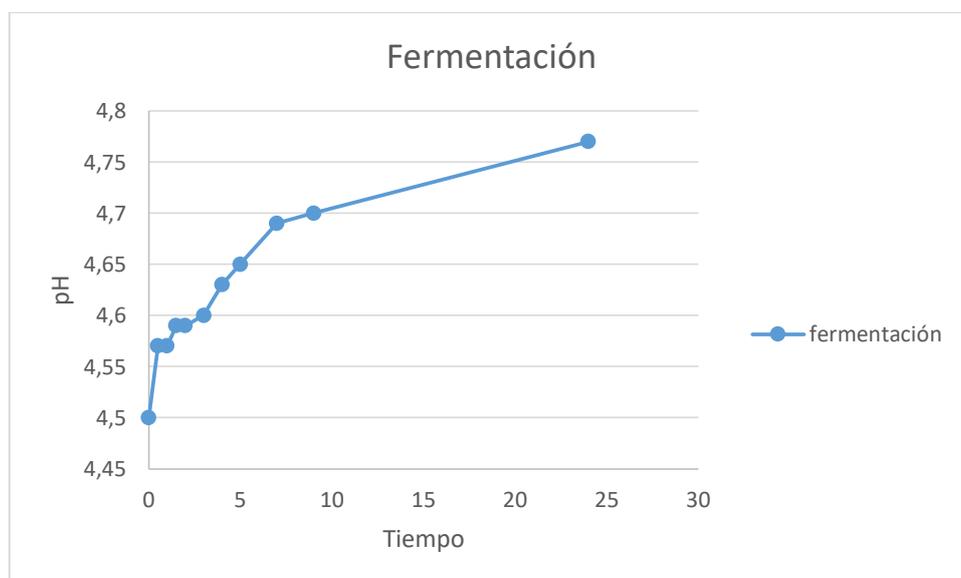
Tabla 26: Cálculos para porcentaje de fermento en la bebida final. Fuente: Autor.

4.6.2 Resultados de la medición del pH del proceso de la bebida fermentada.

Para la medición del pH se tomó muestras en recipientes separados ya que el fermento probiótico es sensible a la presencia de oxígeno.

Tiempo	Fermentación media pH
0 h	4,5
0,5 h	4,57
1 h	4,57
1,5 h	4,59
2 h	4,59
3 h	4,6
4 h	4,63
5 h	4,65
7 h	4,69
9 h	4,7
24 h	4,77

Tabla 27: Medición del pH vs tiempo en la fermentación en el proceso de la bebida fermentada. Fuente: Autor.



Gráfica 4: Variación del pH vs el tiempo en la fermentación de la bebida fermentada.



La gráfica muestra el proceso de crecimiento de los microorganismos probiótico, se observa el crecimiento exponencial de fermentación, después existe variación en la pendiente y comienza a disminuir se habla de la fase estacionaria, continua con la misma pendiente lo que significa que sigue en la fase de crecimiento y entra en la fase estacionaria del proceso de fermentación como se observa en la gráfica 4.

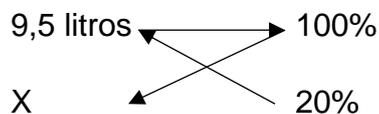
4.7 Formulación de la bebida

Se midió la cantidad de bebida después de la fermentación con la cual se trabajará para la elaboración final de la bebida fermentada:

Cantidad de bebida líquida = 9,5 litros

4.7.1 Cálculos para la formulación de la bebida

Cantidad de agua:



X= 1,9 litros de agua.

Esta agua se añadirá a los 9,5 litros de suero fermentado.

Cantidad de bebida: suero + agua

Total de bebida = 11,4 litros.

Pulpa:

Se añadió a los 11,4 litros un total de 1000ml de pulpa de durazno.

Cantidad de bebida= 11,4 litros + 1 litro

Cantidad de bebida = 12,4 litros.

Azúcar:

50 g de azúcar por litro.

50g 1 litro

X 12,4 litros

X=620 g de azúcar en 12,4 litros de bebida.



4.7.2 Resultados de la formulación de la bebida

Los análisis fueron determinados mediante pruebas para la pulpa y el % agua, para la cantidad de azúcar se tomó los datos de (Rivera, Muñoz-Hernandez, & Rosas-Peralta, 2008) para endulzar la bebida.

Ingredientes	Cantidad
Suero fermentado	9,5 litros
Agua	1,9 litros
Azúcar	620 gramos
Pulpa	1 litro

Tabla 28: Resultado de la formulación de la bebida. Fuente: Autor.

4.8 Resultado de los análisis físico-químicos de la bebida fermentada.

4.8.1 pH

pH inicial de la bebida= 4.40

4.8.2 Resultado de análisis del %proteína, %grasa, %glúcidos y %acidez de la bebida fermentada

Los análisis fueron realizados en el laboratorio de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca y los resultados están expresados en la tabla 29

Parámetro	Medida en %
Proteína	4,9% N
Grasa	1% P/P
Glúcidos	9,31% P/P
Acidez	34,9% (Ácido láctico)

Tabla 29: Análisis de proteína, grasa, glúcidos y acidez de la bebida fermentada. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.



4.9 Análisis microbiológico de la bebida fermentada.

Muestra	Parámetro	Método	Unidad	Resultado	Requisitos limite max
Suero de bebida pasteurizada	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	UFC/ml	40 UFC/ml	No hay referencia en la norma.
	Recuento estándar en placa de Escherichia coli	NTE INEN 1529-8	UFC/ml	<1,0x10 ¹ UFC/ml	<10 UFC/ml
	Detección de Salmonella/25ml	NTE INEN 1529-15		Ausencia	Ausencia

Tabla 30: Análisis microbiológico de la bebida fermentada. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.

Los parámetros están dentro de los requisitos que establece la norma (INEN 2594, 2011) y otro parámetro no tienen referencia en una norma ya que es un parámetro a analizar.



4.10 Valoración de la viabilidad del cultivo probiótico

Los análisis de recuento de los microorganismos fueron realizados por los técnicos del laboratorio de agua y alimentos y los resultados están expresados en la tabla 31.

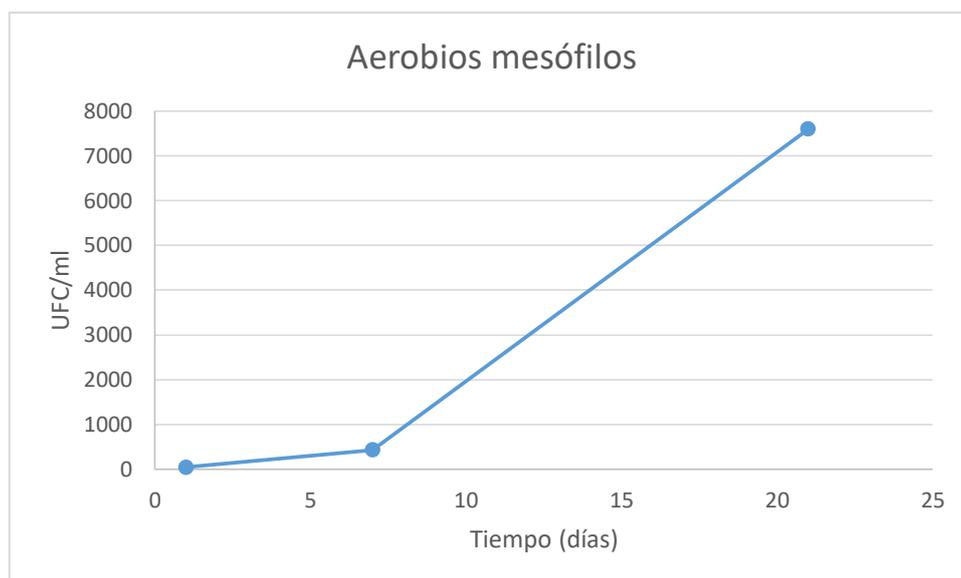
Muestra	Parámetro	Tiempo	Método	Unidad	Resultado	Requisitos limite max
Bebida fermentada saborizada	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	1 día	NTE INEN 1529-5	UFC/ml	40 UFC/ml	Sin referencia
		7 días	NTE INEN 1529-5	UFC/ml	4,4x10 ² UFC/ml	Sin referencia
		21 días	NTE INEN 1529-5	UFC/ml	7,6x10 ³ UFC/ml	Sin referencia

Tabla 31: Recuento de microorganismos de la bebida fermentada. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.

4.11 Cuantificación de los microorganismos aerobios

Tiempo	Medida aerobios
1 día	40
7 días	430
21 días	7600

Tabla 32: Recuento de aerobios. Fuente: Autor.



Gráfica 5: Recuento de aerobios vs tiempo. Fuente: Autor.

En la gráfica 5 se puede observar el aumento exponencial de los microorganismos aerobios según el tiempo de almacenamiento.

4.12 Cuantificación de probióticos

La cuantificación de microorganismos anaerobios se los realizó para determinar los microorganismos probióticos añadidos

La cantidad de microorganismos probióticos daría de la resta de microorganismos presentes en el suero sin pasteurizar y de los microorganismos presentes en la bebida fermentada.

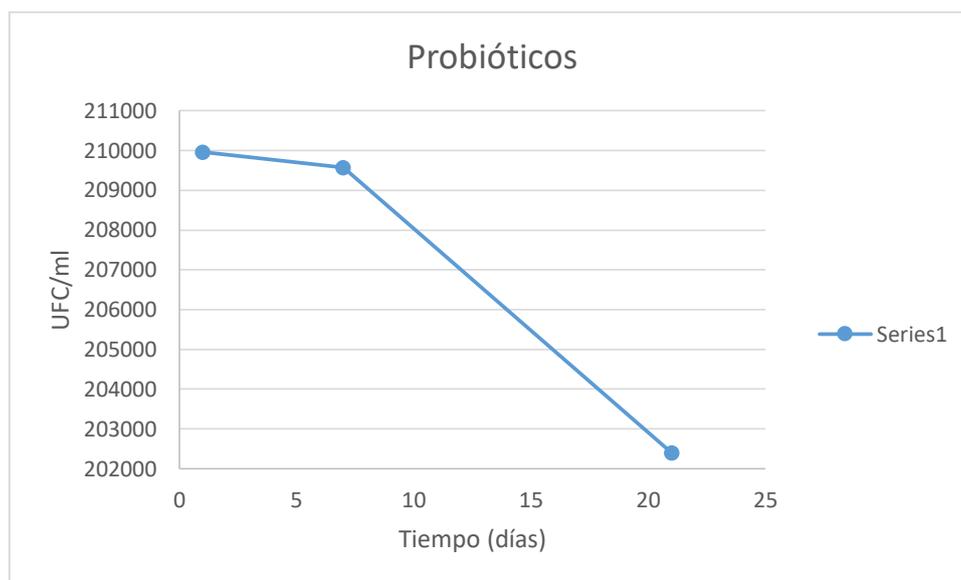
Días	Aerobios de la bebida	aerobios totales	Resta A totales – aerobios de la bebida	Probiótico
1	40UFC/ml	210000 UFC/ml	210000 – 40	209960 UFC/ml
7	430 UFC/ml	210000 UFC/ml	210000 – 430	209570 UFC/ml
21	7600 UFC/ml	210000 UFC/ml	210000 - 7600	202400 UFC/ml

Tabla 33: Cuantificación de microorganismos probióticos. Fuente: Laboratorio de análisis de agua y alimentos de la Universidad de Cuenca.

Gráfica de los probióticos durante el tiempo

Días	Cantidad de probióticos
1	209960 UFC/ml
7	209570 UFC/ml
21	202400 UFC/ml

Tabla 34: Datos para la gráfica de recuento de probióticos. Fuente: Autor.



Gráfica 6: Recuento del probiótico vs tiempo. Fuente: Autor.

En el día 1 el tratamiento que registra los mayores recuentos de *Bifidobacterium* BB-12 dando un recuento de 209960 UFC/ml.

En el día 7 el *Bifidobacterium* BB12 presenta una disminución de los microorganismos del recuento que el día 1, lo que quiere decir que hay reducción de su población.

En el día 21 el *Bifidobacterium* BB12 presenta una disminución drástica de los microorganismos del recuento que el día 1, lo que quiere decir que hay reducción considerable de su población.

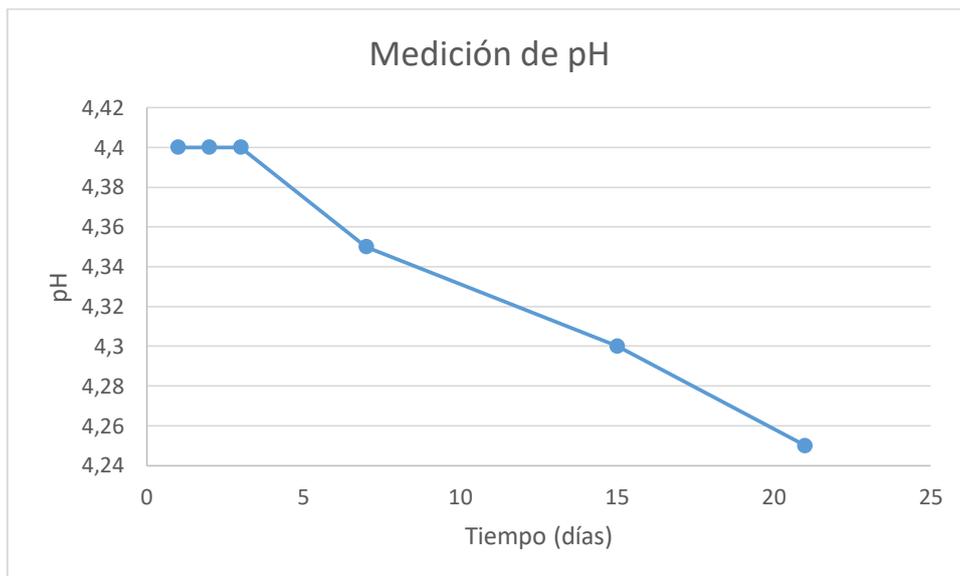
La disponibilidad de oxígeno es quizás el factor que más afecta las bifidobacterias, que son anaerobias estrictas.

La tendencia en el recuento de células viables en el transcurso del almacenamiento fue decreciente en el tratamiento. Este dato destaca la importancia de lograr un alto recuento de microorganismos probióticos el día 1 de elaboración de la bebida fermentada, puesto que no se observa desarrollo de organismos en este período y, por el contrario, la población decrece.

4.13 Resultado de la medida del pH de la bebida

Días	Medida pH
1	4,4
2	4,4
3	4,4
7	4,35
15	4,3
21	4,25

Tabla 35: Medida del pH vs tiempo en la bebida fermentada. Fuente: Autor.



Gráfica 7: Medición del pH vs tiempo en la bebida fermentada. Fuente: Autor.

Se observa en la gráfica 7 la disminución del pH encontrada en las diferentes mediciones durante los días estipulados en el objetivo general como los días de vida útil del probiótico.



Los descensos de pH de la medición para el BB-12 se pueden considerar que el número de microorganismos viables va disminuyendo y dando una baja de pH. Lo que indica que el tratamiento disminuye su vida útil funcional del producto con el aumento del tiempo de almacenamiento.

4.14 Resultado del análisis de la aceptación sensorial de la bebida fermentada.

Para calcular el tamaño de la muestra se empleó la siguiente fórmula y los evaluados fueron alumnos de la carrera de Ingeniería Química de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca:

$$n = \frac{N\sigma^2 Z^2}{(N-1)e^2 + \sigma^2 Z^2}$$

Donde:

n = el tamaño de la muestra.

N = tamaño de la población.

σ = Desviación estándar de la población que, generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor constante de 0,5.

Z = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Es un valor constante que, si no se tiene su valor, se lo toma en relación al 95% de confianza equivale a 1,645 (como más usual) o en relación al 99% de confianza equivale 2,58, valor que queda a criterio del investigador.

e = Límite aceptable de error muestra que, generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor que varía entre el 1% (0,01) y 9% (0,09), valor que queda a criterio del encuestador.

Datos:

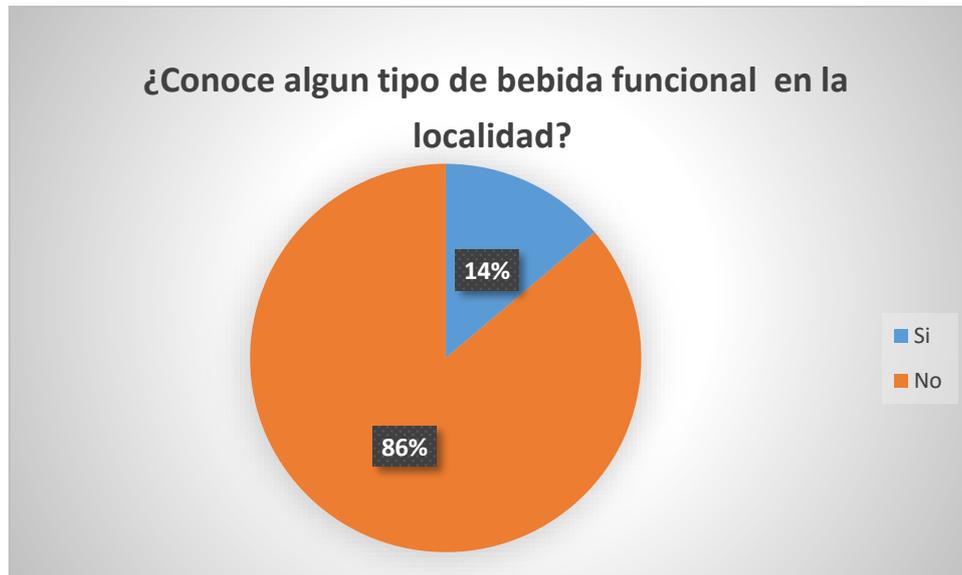
e	0,09
N	150
δ	0,5
confianza	0,95
Z	1,645

$$n = \frac{150 * 0,5^2 * 1,645^2}{(150 - 1)0,09^2 + 0,5^2 * 1,645^2}$$

$n = 50$ *estudiantes.*

Tabulación de la encuesta de aceptación sensorial.

1.- ¿Conoce de algún tipo de bebida funcional que se venda en la localidad? Si la respuesta es afirmativa, indique el nombre del producto.



Gráfica 8: Tabulación de pregunta 1.- ¿Conoce de algún tipo de bebida funcional que se venda en la localidad? Fuente: Autor.

Bebidas nombradas por los encuestados

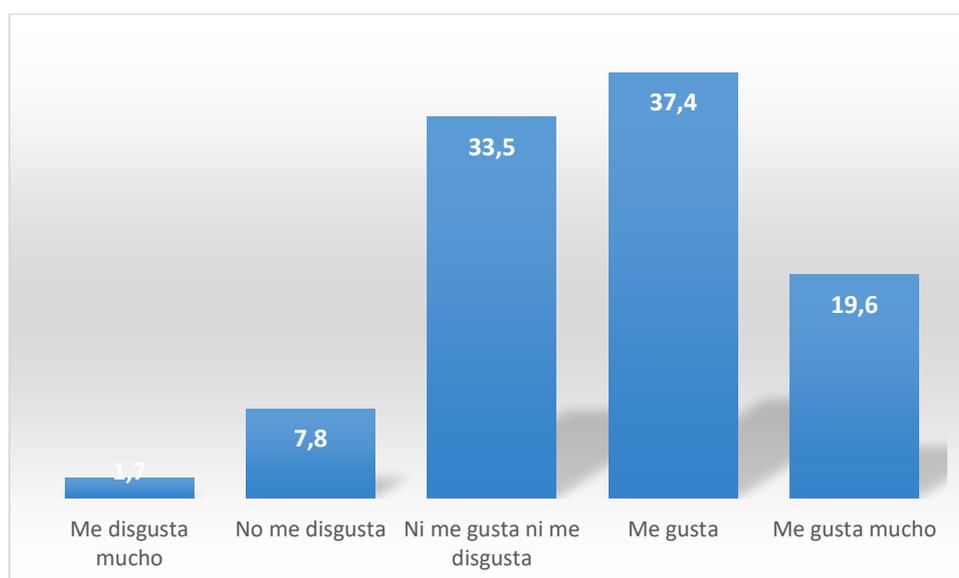
D`hoy, Bebida de chia, Bebida leche de soya.

2.-Calificar la bebida según la escala que se encuentra en la tabla 16

1	Me disgusta mucho
2	No me disgusta
3	Ni me gusta ni me disgusta
4	Me gusta
5	Me gusta mucho

Bebida Fermentada					
Escala tabla 16					
Variable	1	2	3	4	5
	%	%	%	%	%
Acidez	6,7	10,0	36,7	36,7	10,0
Textura	3,3	3,3	30,0	43,3	20,0
Apariencia	0,0	0,0	30,0	46,7	23,3
Sabor	0,0	23,3	16,7	36,7	23,3
Aroma	0,0	3,3	40,0	30,0	23,3
Aceptación del producto.	0,0	6,7	46,7	30,0	16,7
Total	1,7	7,8	33,5	37,4	19,6

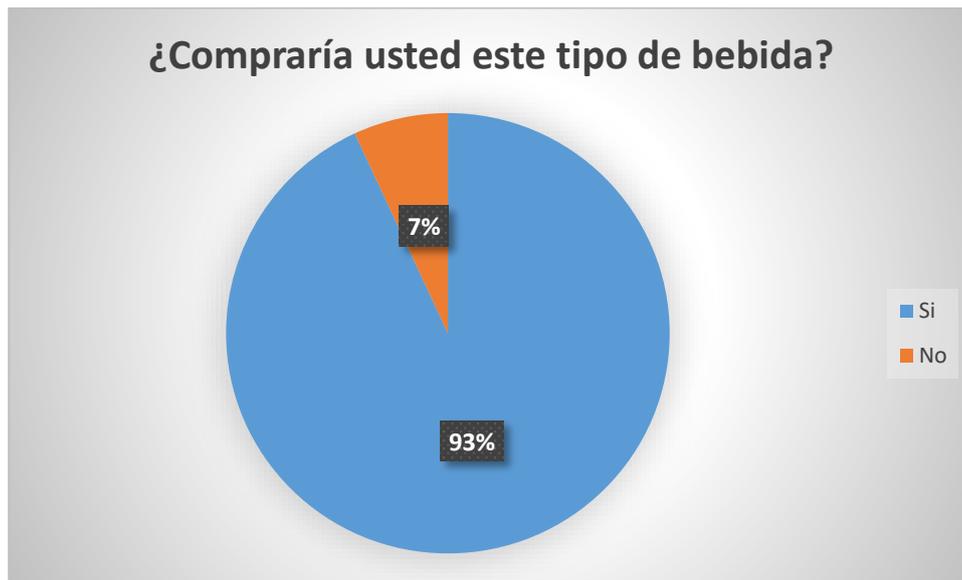
Tabla 36: Tabulación de las variables de la bebida 1. Fuente: Autor.



Gráfica 9: Resultado de encuesta de aceptación del producto. Fuente: Autor.



3.- ¿Compraría usted este tipo de bebida?



Gráfica 10: Tabulación de la pregunta 3.- ¿Compraría este tipo de bebida?

Fuente Autor.



5. Conclusiones

La bebida fermentada a partir del suero de leche es una buena alternativa de uso del suero en la dieta alimenticia, debido a su gran valor nutricional y ya que la mayoría del suero se desperdicia como efluente causando contaminación al ambiente.

En los diferentes tratamientos de experimentación de la fermentación del probiótico se determinó que en todos se realizó una fermentación completa esto se debe a que el fermento actúa con el mismo mecanismo en todos los tratamientos independientemente de la concentración que se utiliza dado que la fermentación ocurre durante las 24 horas gracias a la multiplicación exponencial de los microorganismos al estar expuestos a una atmósfera sin presencia de oxígeno.

Se determinó que en el tratamiento 4 se tuvo una mayor proliferación de microorganismos, esto se debe a que se utilizó una gran cantidad de fermento dando mejores resultados que los demás tratamientos en el tiempo de fermentación.

Se desarrolló una formulación para la bebida con los cálculos del tratamiento 4 que permite la estabilidad de la fermentación y la vida de anaquel del producto hasta los 21 días propuestos de estabilidad del probiótico.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis después de la elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de leche permiten afirmar que se ha obtenido un producto de buena calidad, inocuo, y con características prebióticas y probióticas.

Según el análisis bromatológico de la grasa (1%), glúcidos (9,31%) y considerando que la bebida no contiene sal, en el **anexo 4** (Tabla: Contenido de componentes y concentraciones permitidas en los alimentos y semáforo alimenticio de la bebida fermentada), se puede concluir según los datos obtenidos que la bebida es baja en calorías cumpliendo lo establecido en el tema del trabajo de titulación.

De acuerdo a los análisis de recuento de los microorganismos probióticos permanecieron viables en la bebida y al ser almacenada a 4°C, durante los 21



días de vida de anaquel, obteniendo valores superiores a 202400 UFC/ml superior a los 100000 UFC/ml según (INEN 2395, 2011) concluyendo que estos microorganismo pueden sobrevivir el tránsito a través del estómago, al ser ingeridos con productos lácteos.

La evaluación de las características sensoriales de la bebida fermentada (acidez/sabor/apariencia/textura/aroma) de acuerdo a los encuestados resultó en un puntaje promedio de la variable 4 de 37,4%, este resultado permite avalar al producto obtenido de calidad muy buena. Y tenemos una aceptación general de la bebida fermentada pudiendo dar paso a un estudio de mercado para el análisis correspondiente.

6. Recomendaciones

Se debe potenciar el desarrollo de nuevos productos en base de suero de leche para evitar la contaminación en ríos y efluentes por desecho del suero en queserías.

Aumentará el desarrollo de las industrias lácteas se incrementaría al vender este subproducto a bajo costo en vez de ser desechado.

Se daría un resalte a este producto de gran calidad nutritiva que podrá impulsar la solución a problemas de desnutrición y falta de alimentos ricos en nutrientes y a un bajo costo.

Se potenciara una disminución de las afecciones gastrointestinales en la población que consumirá este tipo de bebidas funcionales.



7. Bibliografía

- Alvídrez Morales, A., Gonzales Martínez , B. E., & Jimenez Salas, Z. (2002). TENDENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS: ALIMENTOS. *Revista Salud Pública y Nutrición* , 1.
- ANFABRA. (2006). *EL LIBRO BLANCO DE LAS BEBIDAS REFRESCANTES*. Madrid: ANFABRA.
- Chasquibol S., N. (2003). ALIMENTOS FUNCIONALES O FITOQUÍMICOS, CLASIFICACIÓN E IMPORTANCIA . *REVISTA PERUANA DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA*, 10.
- Collado, M. C. (29 de Noviembre de 2004). *CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DEL GÉNERO Bifidobacterium CON CARÁCTER PROBIÓTICO*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/50837297_Caracterizacion_de_cepas_del_genero_Bifidobacterium_con_caracter_probiotico
- FAO. (s.f.). *Depósito de documentos de la FAO*. Obtenido de Apéndice II: Proyecto de Norma General para el Uso de Términos Lecheros: <http://www.fao.org/docrep/meeting/005/W9503S/w9503s0g.htm>
- Hernandez , M. (2014). Suero de leche y sus aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Revista Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. Obtenido de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TsIA-82-Hernandez-Rojas-et-al-2014.pdf>
- INEN 0003. (s.f.). *LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS. TERMINOLOGIA*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0003.1984.pdf>
- INEN 0009. (Enero de 2012). *LECHE CRUDA. REQUISITOS*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0009.2008.pdf>
- INEN 0013. (s.f.). *LECHE. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0012.1973.pdf>
- INEN 0016. (s.f.). *LECHE. Determinación de proteínas*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0016.1984.pdf>
- INEN 0076. (2013). *LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS*. Obtenido de http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/11/rte_076.pdf
- INEN 1529-1. (1999). *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.1.1999.pdf>
- INEN 1529-15. (04 de 2009). *Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección* . Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.15.1996.pdf>
- INEN 1529-5. (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos*. REF. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.5.2006.pdf>
- INEN 1529-6. (02 de 1990). *CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES POR LA*



- TÉCNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE* . Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.6.1990.pdf>
- INEN 1529-8. (02 de 1990). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y E. coli*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.1529.8.1990.pdf>
- INEN 2074 . (Enero de 2012). *ADITIVOS ALIMENTARIOS PERMITIDOS PARA CONSUMO HUMANO. LISTAS POSITIVAS. REQUISITOS*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2074.2012.pdf>
- INEN 2395. (2011). *Leches fermentadas: Requisitos*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2395.2011.pdf>
- INEN 2594. (Agosto de 2011). *Suero de leche líquido. Requisitos*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.2594.2011.pdf>
- Lorente, F., & Serra, D. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta pediátr Espan*, 52.
- Madrid, A. (s.f.). *TEGNOLIGÍA QUESERA*. España: Mundi-Prensa.
- MAKYMAT. (s.f.). *Innovación-Calidad-Servivio*. Obtenido de *Bebidas Funcionales*: <http://www.makymat.com/contenido/archivospdf/BebidasFuncionales.pdf>
- Miranda, O., & Fonseca, P. (2014). ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A PARTIR DEL. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 8.
- NTE INEN 0013 . (s.f.). *Leche. Determinación de la acidez titulable*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0013.1984.pdf>
- NTE INEN 0973. (s.f.). *Agua potable. Determinación del pH*. Obtenido de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0973.1984.pdf>
- Olafnero, G., Abad, A., & Bendersky, S. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIATA*, 22-23.
- Páez Escobar, V. A. (2010). *Bebidas Fermentadas*. En V. A. Páez Escobar, *BEBIDAS FERMENTADAS* (págs. 5-6). Cali: ReCiTeIA.
- Parra Huertas, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Scielo.org.co*, 96-97. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>
- Poveda E., E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*. Obtenido de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182013000400011&script=sci_arttext
- Puerta Quintero, G. I. (2010). FUNDAMENTOS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL BENEFICIO DEL CAFE. *Cenicafe*, 8-9.
- Ramírez, J., Ulloa, P., & Velázquez, M. (2011). Bacterias Lácticas: Importancia en elimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año 2*, 2-3.
- Rivera, J. A., Muñoz Hernandez, O., & Rosas Peralta, M. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Boletín medico del Hospital Infantil de México*, 176-183.



- Rivera, J., Muñoz-Hernandez, O., & Rosas-Peralta, M. (2008). Consumo de bebidas para una vida saludable: Recomendaciones para la población mexicana. *Salud pública Méx Vol.50 no.2*, 180-185. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342008000200011
- Salinas, K., Olmos, U., D Berlijn, J., & Figueroa, M. (2014). *MANUAL PARA EDUCACIÓN AGROPECUARIA. ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÁCTEOS*. México.: TRILLAS.
- Silveira Rodríguez, M. B., & Megías, S. (2003). ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRICIÓN ÓPTIMA . *Revista Española de Salud Pública*.
- Sociedad Argentina de Nutrición. (Junio de 2009). *Bebidas Energizantes y su Consumo en Adolescentes*. Obtenido de Grupo de trabajo Nutrición y Pediatría: http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/bebidas_energizantes_consumo_adolescentes.pdf
- Taranto, M., Médici, M., & Font de Valdez, G. (2005). Alimentos Funcionales Probióticos. *Revista Química Viva*, 27.
- Vega, E. (Noviembre de 2008). *Producción de Alimentos por Actividad Bacteriana – Fermentación*. Obtenido de https://laboratoriomicroaplicada.files.wordpress.com/2008/11/alimentos_fermentados.pdf
- Zavala Pope, J. (Julio de 2005). *Aspectos Nutricionales y Tecnológicos de la Leche* . Obtenido de [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/7AE7E7AB111562710525797D00789424/\\$FILE/Aspectosnutricionalesytecnol%C3%B3gicosdelalache.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con3_uibd.nsf/7AE7E7AB111562710525797D00789424/$FILE/Aspectosnutricionalesytecnol%C3%B3gicosdelalache.pdf)



8. ANEXOS

7.1 Anexo 1: Ficha Técnica.



FD-DVS nu-trish® BB-12®

Información de Producto

Versión: 1 PI-EU-ES 15-12-2011

Descripción	Cultivo termófilo ácido láctico. El cultivo es una cepa individual definida con una larga historia de uso seguro. Una importante documentación clínica sobre posibles beneficios para la salud están disponibles bajo requerimiento, así como certificados de identificación y certificados de sanidad y origen. BB-12® es una marca registrada de Chr. Hansen.		
Taxonomía	Bifidobacterium		
Envase	No Material: 706146	Tamaño 20025 g	Tipo Sobre (s) en caja
Propiedades Físicas	Color:	Blanco a ligeramente rojizo o marrón	
	Aspecto Físico:	Granulado	
Aplicación	<p>Uso El cultivo es principalmente utilizado en la producción de productos lácteos probióticos. BB-12® puede ser utilizado solo o en combinación con otros cultivos ácido lácticos como cultivos de yogur o mesófilos aromáticos (tipo LD). Una evaluación de riesgos y control de puntos críticos ha sido desarrollada para productos lácteos fermentados. Para otras aplicaciones una evaluación de riesgos debería ser completada antes de que el producto sea liberado para la venta ya que los riesgos para la seguridad alimentaria son distintos de los productos fermentados.</p> <p>Dosis recomendada Se recomienda que BB-12® sea inoculado de acuerdo con el recuento deseado de células probióticas en el producto final. Esto está influido por la caducidad, el pH y la temperatura de almacenamiento del producto final. Para los productos fermentados la interacción con otras cepas además del tiempo de fermentación y la temperatura pueden también afectar al recuento final de células probióticas.</p>		



FD-DVS nu-trish® BB-12®

Información de Producto

Versión: 1 FI-EU-ES 15-12-2011

	<p>Directivas para su uso</p> <p>Sacar el cultivo del congelador justo antes de su utilización. No descongelar. Limpiar la parte superior del sobre con cloro. Abrir el sobre y añadir los gránulos liofilizados directamente al producto pasteurizado mientras se agita suavemente. Agitar la mezcla durante 10-15 minutos para distribuir el cultivo homogéneamente. La temperatura recomendada de incubación depende de la aplicación en la que se va a utilizar el cultivo. Para más información sobre aplicaciones específicas, por favor, consulte nuestros catálogos técnicos y recetas recomendadas.</p>
Gama	<p>La cepa individual BB-12® está disponible en forma congelada y liofilizada. También hay disponibles mezclas con BB-12® para producción de leche fermentada probiótica. Todas ellas han sido compuestas para proporcionar un alto recuento de BB-12® en el producto final cuando se aplican de acuerdo con nuestras recomendaciones.</p>
Almacenaje y manipulación	<p>$-18\text{ }^{\circ}\text{C} / +0\text{ }^{\circ}\text{F}$</p>
Vida útil	<p>Como mínimo 24 meses desde la fecha de fabricación cuando se almacena siguiendo las recomendaciones. A $+5^{\circ}\text{C}$ (41°F) la caducidad es de como mínimo 6 semanas.</p>
Información técnica	<p>Métodos analíticos</p> <p>Los métodos de referencia y analíticos están disponibles bajo petición.</p> <p>Otra Información</p> <p>BB-12® es anaerobio (ligera tolerante al oxígeno). El crecimiento de BB-12® depende una buena interacción con otras cepas fermentadoras. El cultivo no crecerá en leche por sí mismo, pero puede crecer lentamente en leche a temperaturas entre $37\text{-}43^{\circ}\text{C}$ ($98\text{-}109^{\circ}\text{F}$) en sinergia con cultivos fermentadores. BB-12® convierte lactosa en L+ ácido láctico y ácido acético.</p> <p>BB-12® es muy estable y tiene una alta resistencia hacia ácidos en productos lácteos fermentados.</p>
Legislación	<p>Chr. Hansen cumple con los requerimientos generales de seguridad alimentaria establecidos por el Reglamento 178/2002/EC. Las bacterias ácido lácticas son reconocidas de forma general como seguras y pueden ser utilizadas en alimentos, sin embargo, para aplicaciones específicas recomendamos que consulte la legislación nacional.</p> <p>El producto está destinado a ser utilizado en alimentos.</p>

www.chr-hansen.com

Página: 2 (4)

La información aquí contenida es según nuestro conocimiento verdadera y correcta, y presentado de buena fe. Puede sufrir modificaciones sin previo aviso. Ninguna garantía contra infringimiento a patentes está implícito o inferido. Esta información es ofrecida solamente para su consideración y verificación. Copyright© Chr. Hansen A/S. Todos los derechos reservados.

**FD-DYS nu-trish® BB-12®**

Información de Producto

Versión: 1 FI-EU-ES-15-12-2011

Seguridad alimentaria	No existe garantía de seguridad alimentaria implícita para aplicaciones de este producto distintas de las indicadas en la sección de utilización. Si desea utilizar este producto en otra aplicación por favor, contacte con su representante de Chr. Hansen para solicitar ayuda.				
Etiquetado	Etiquetado recomendado "cultivo ácido láctico" o "cultivo iniciador", sin embargo, la legislación puede variar. Por favor, consulte la legislación local. El etiquetado con el nombre de las cepas probióticas es posible previo acuerdo de utilización de marca registrada. Por favor, consulte con su representante local para más información.				
Marcas comerciales	Los nombres de productos, nombres de conceptos, logotipos, marcas y otras marcas comerciales mencionadas en este documento, figuren o no en mayúsculas, en negrita o con el símbolo ® o TM son propiedad de Chr. Hansen A/S o utilizados bajo licencia. Las marcas registradas que aparecen en este documento pueden no estar registradas en su país, aunque estén marcadas con un ®.				
Certificados alimentarios	<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">Kosher:</td> <td>Kosher Lácteos exclu. Pascua</td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">Halal:</td> <td>En proceso</td> </tr> </table>	Kosher:	Kosher Lácteos exclu. Pascua	Halal:	En proceso
Kosher:	Kosher Lácteos exclu. Pascua				
Halal:	En proceso				
Servicio técnico	Personal de los Laboratorios de Aplicación y Desarrollo de Productos de Chr Hansen están a su disposición si necesita más información.				

Información GMO

Con arreglo a la legislación de la Unión Europea*, podemos declarar que FD-DYS nu-trish® BB-12® no contiene OMG ni materias primas con la etiqueta MG**. Con arreglo a la legislación europea sobre etiquetaje en producto alimentario acabado**, podemos informar de que el uso de FD-DYS nu-trish® BB-12® no requiere etiquetado MG del producto alimenticio final. La posición de Chr. Hansen sobre GMO puede encontrarse en: www.chr-hansen.com/About-us/Policies-and-positions/Quality-and-product-safety.

* Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva del Consejo 90/269/CEE.

** Reglamento (CE) 1825/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. Reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de septiembre de 2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE.

**FD-DVS nu-trish® BB-12®**

Información de Producto

Versión: 1 RI-EU-ES 15-12-2011

Información sobre Alérgenos

List of common allergens in accordance with the US Food Allergen Labelling and Consumer Protection Act of 2004 (FALCPA) and EU labelling Directive 2000/13/EC with later amendments	Presente como ingrediente en el producto
Cereales que contengan gluten* y productos derivados	No
Crustáceos y productos a base de crustáceos	No
Huevos y productos a base de huevo	No
Pescado y productos a base de pescado	No
Cacahuets y productos a base de cacahuets	No
Soja y productos a base de soja	No
Leche y sus derivados (incluida la lactosa)	SI
Frutas de cáscara* y productos derivados	No
Lista de alérgenos de acuerdo con la Directiva sobre etiquetado 2000/13/EC de la UE, exclusivamente	
Aplo y productos derivados	No
Mostaza y productos derivados	No
Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo	No
Altramuces y productos a base de altramuces	No
Moluscos y productos a base de moluscos	No
Anhidrido sulfuroso y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro expresado como SO ₂	No

* Please consult the EU Labelling Directive 2000/13 Annex IIIa for a legal definition of common allergens, see European Union law at: www.eur-lex.europa.eu



7.2 Anexo 2: Pruebas de IMViC

CLASIFICACION DE LOS COLIFORMES POR LAS PRUEBAS "IMViC"					
	Gas en caldo B.G.B.L. 44-45,5°C	Prueba del indol 44 - 45,5° C	MR	VP	Crecimiento en Citrato
E. coli.					
Típico (tipo I)	+	+	+	-	-
Atípico (tipo II)	-	+	+	-	-
Intermedios					
Típico (tipo I)	-	+	+	-	-
Atípico (tipo II)	-	-	+	-	-
Enteobacter-ae rógenes:					
Típico (tipo I)	-	-	-	+	+
Atípico (tipo II)	-	+	-	+	+
Esterobacter- cloacae	-	-	-	+	+
Irregulares					
Tipo I	-				
Tipo II	+	-	-	-	-
Tipo VI	+	-	+	+	+
Irregulares, otros tipos	V*	V*	V*	V*	V*

Tabla 37: Clasificación de coliformes por las pruebas "IMViC". Fuente: INEN 1529-8.

7.3 Anexo 3: Prueba del indol

Indol: Subproducto de la degradación del aminoácido Triptofano por la enzima triptofanasa.



- Cultivar la bacteria en caldo de peptonas (alto contenido de Triptofano) por 48 h.
- Agregar al cultivo cinco gotas de reactivo de Kovacs (dimetilaminobenzaldehído).
- El reactivo de Kovacs reacciona con el indol dando un producto de color rojo.

Reacción – Formación de una fase orgánica amarilla



Salmonella
Enterobacter
Klebsiella

Reacción + Formación de una fase orgánica roja



E. coli
Proteus



7.4 Anexo 4: Tabla Contenido de componentes y concentraciones permitidas en los alimentos y semáforo alimenticio de la bebida fermentada.

Nivel Componentes	CONCENTRACION “BAJA”	CONCENTRACION “MEDIA”	CONCENTRACION “ALTA”
Grasa totales	Menor o igual a 3 gramos en 100	gramos Mayor a 3 y menor a 20 gramos en 100	gramos Igual o mayor a 20 gramos en 100 gramos
	Menor o igual a 1,5 gramos en 100 mililitros	Mayor a 1,5 y menor a 10 gramos en 100 mililitros	Igual o mayor a 10 gramos en 100 mililitros
Azúcares	Menor o igual a 5 gramos en 100 gramos	Mayor a 5 y menor a 15 gramos en 100 gramos	Igual o mayor a 15 gramos en 100 gramos.
	Menor o igual a 2,5 gramos en 100 mililitros	Mayor a 2,5 y menor a 7,5 gramos en 100 mililitros	Igual o mayor a 7,5 gramos en 100 mililitros
Sal (sodio)	Menor o igual a 120 miligramos de sodio en 100 gramos	Mayor a 120 y menor a 600 miligramos de sodio en 100 gramos	Igual o mayor a 600 miligramos de sodio en 100 gramos
	Menor o igual a 120 miligramos de sodio en 100 mililitros	Mayor a 120 y menor a 600 miligramos de sodio en 100 mililitros	Igual o mayor a 600 miligramos de sodio en 100 mililitros.

Tabla 38: Contenido de componentes y concentraciones permitidas en los alimentos. Fuente: INEN 0022



Imagen 24: Semáforo alimenticio de la bebida fermentada. Fuente: Autor:



7.5 Anexo 5: Encuesta



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ENCUESTA DE ACEPTACIÓN DIRIGIDA A PUBLICO EN GENERAL

La presente tiene por objeto evaluar la aceptación de un nuevo producto que consiste en bebida de tipo funcional, esto se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutrimental. Llenar la encuesta le tomará no más de 3 minutos. Gracias por su colaboración.

DATOS

Sexo: Masculino ____ Femenino _____

1.- ¿Conoce de algún tipo de bebida funcional que se venda en la localidad? Si la respuesta es afirmativa, indique el nombre del producto.

a) Sí

b) No

2.-Calificar la bebida según la escala

1	Me disgusta mucho
2	No me disgusta
3	Ni me gusta ni me disgusta
4	Me gusta
5	Me gusta mucho

Marque con una X la calificación que le parezca correspondiente a la calificación de cada variable.

Bebida fermentada					
Variable	Calificación				
Acidez	1	2	3	4	5
Textura	1	2	3	4	5
Apariencia	1	2	3	4	5
Sabor	1	2	3	4	5
Aroma	1	2	3	4	5
Aceptación del producto.	1	2	3	4	5

3.- ¿Compraría usted este tipo de bebida?

a) Si -----

b) No -----



7.6 Anexo 6: Resultado de análisis

Análisis microbiológico del suero de leche pasteurizado



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y ALIMENTOS
 Análisis Microbiológico

Datos de recepción

Solicitado por: Sr. Henry Cajamarca
 Muestra: Suero de queso pasteurizado
 Fecha informe: 11 de julio de 2016
 Fechas de análisis: del 04 al 08 de julio de 2016
 Nº de muestras: una
 Procedencia: Laboratorio de Lácteos – Universidad de Cuenca

Inspección de la muestra: Recolectada en recipiente plástico estéril

Muestra	Parámetro	Método	Unidad	Resultado	NTE INEN 2594:2011 Suero de leche líquido
Suero de queso pasteurizado	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	UFC/mL	2,1 x10 ³ UFC/mL	Límite máximo = 3 x10 ⁴ UFC/mL
	Recuento estándar en placa de <i>Escherichia coli</i>	NTE INEN 1529-8	UFC/mL	< 1,0 x10 ⁴ UFC/mL	Límite máximo = < 10 UFC/mL
	Detección de <i>Salmonella</i> /25 mL	NTE INEN 1529-15		Ausencia	Ausencia

Se siguieron las siguientes normas INEN:
 1529-1 Preparación de los medios de cultivo
 1529-2 Toma, envío y preparación de muestras para el análisis
 UFC= Unidades formadoras de colonias
 NTE= Norma Técnica Ecuatoriana
 < 1,0 x10⁴UFC/g= significa que no hay desarrollo de colonias en la primera dilución.

Valor del análisis: USD \$ 48

IVA 14% 6,72

Total a cancelar USD \$ 54,72 UNIVERSIDAD DE CUENCA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
 DE AGUA Y ALIMENTOS
Dra. Mariana Saá Cruz

Responsable de Laboratorio Analista

[Firma]
 Analista responsable

Av. 12 de Abril y Av. Loja S/N.
 Telef: 405 1000 Ext. 24 00 - 24 21
 CUENCA - ECUADOR





Análisis bromatológico de la bebida fermentada



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

LABORATORIO DE ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

0798

Resultado de Análisis

ANALISIS DE: Bebida Fermentada sabor a durazno
SOLICITADO POR: Sr. Henry Cajamarca
NÚMERO DE MUESTRAS: 1 FECHA: 05 de Julio de 2016
PROCEDENCIA: Muestra entregada en este laboratorio

PARÁMETRO/ N° DE MUESTRA:	1			Método de Ensayo
Humedad, % P/P	-			
Cenizas % P/P	-			
Fibra Cruda % P/P	-			
Grasa % P/P	1			GERBER
Glúcidos Totales % P/P	9.31			R. FEHLING
Proteína, % N	4.9			KJELDAHL
pH	-			
Acidez % (Ácido láctico)	0.07			NTE INEN 13
Nitrito de sodio, ppm	-			

VALOR DEL ANALISIS: 64 + IVA

UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio Tecnológico

f)



ANALISTA

B.Q.F. María Montaleza
NOMBRE



Análisis microbiológico de la bebida fermentada y primer recuento de los microorganismos probióticos.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y ALIMENTOS
 Análisis Microbiológico

Datos de recepción

Solicitado por: Sr. Henry Cajamarca
 Muestra: Bebida fermentada sabor a durazno
 Fecha informe: 11 de julio de 2016
 Fechas de análisis: del 05 al 08 de julio de 2016
 Nº de muestras: una
 Procedencia: Laboratorio de Lácteos – Universidad de Cuenca

Inspección de la muestra: Recolectada en recipiente plástico estéril

Muestra	Parámetro	Método	Unidad	Resultado	NTE INEN 2608:2012 Bebida de leche fermentada
Bebida fermentada sabor a durazno	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	UFC/mL	40 UFC/mL	Sin referencia en la norma
	Recuento estándar en placa de <i>Escherichia coli</i>	NTE INEN 1529-8	UFC/mL	< 1,0 x10 ¹ UFC/mL	Límite máximo = < 1 UFC/mL
	Detección de <i>Salmonella</i> /25 mL	NTE INEN 1529-15		Ausencia	Ausencia

Se siguieron las siguientes normas INEN:
 1529-1 Preparación de los medios de cultivo
 1529-2 Toma, envío y preparación de muestras para el análisis
 UFC= Unidades formadoras de colonias
 NTE= Norma Técnica Ecuatoriana
 < 1,0 x10¹UFC/g= significa que no hay desarrollo de colonias en la primera dilución.

Valor del análisis: USD \$ 48
 IVA 14% 6,72
 Total a cancelar USD \$ 54,72

UNIVERSIDAD DE CUENCA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
 DE AGUA Y ALIMENTOS

Dra. Mariana Saá Cruz

Responsable de Laboratorio-Analista
 Analista responsable

Av. 12 de Abril y Av. Loja S/N.
 Telef: 405 1008 Ext. 24 00 - 24 21
 CUENCA - ECUADOR





Segundo recuento de los microorganismos probióticos en la bebida fermentada



UNIVERSIDAD DE CUENCA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y ALIMENTOS
 Análisis Microbiológico

Datos de recepción

Solicitado por: Sr. Henry Cajamarca
 Muestra: Bebida fermentada sabor a durazno
 Fecha informe: 19 de julio de 2016
 Fechas de análisis: del 11 al 18 de julio de 2016
 Nº de muestras: una
 Procedencia: Laboratorio de Lácteos – Universidad de Cuenca

Inspección de la muestra: Recolectada en recipiente plástico estéril

Muestra	Parámetro	Método	Unidad	Resultado	NTE INEN 2608:2012 Bebida de leche fermentada
Bebida fermentada sabor a durazno	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	UFC/mL	4,4 x10 ² UFC/mL	Sin referencia en la norma

Se siguieron las siguientes normas INEN:
 1529-1 Preparación de los medios de cultivo
 1529-2 Toma, envío y preparación de muestras para el análisis
 UFC= Unidades formadoras de colonias
 NTE= Norma Técnica Ecuatoriana

Valor del análisis: USD \$ 12
 IVA 14% 1,68
 Total a cancelar USD \$ 13,68

UNIVERSIDAD DE CUENCA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
 LABORATORIO DE ANALISIS MICROBIOLOGICO
 DE AGUA Y ALIMENTOS

Dra. Mariana Saá Cruz

Responsable de Laboratorio-Analista
 Analista Responsable

Av. 12 de Abril y Av. Loja S/N.
 Telef: 405 1000 Ext. 24 00 - 24 21
 CUENCA - ECUADOR





Tercer recuento de microorganismos prebióticos en la bebida fermentada.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA Y ALIMENTOS
Análisis Microbiológico

Datos de recepción

Solicitado por: Sr. Henry Cajamarca
 Muestra: Bebida fermentada sabor a durazno
 Fecha informe: 01 de agosto de 2016
 Fechas de análisis: del 26 al 29 de julio de 2016
 N° de muestras: una
 Procedencia: Laboratorio de Lácteos – Universidad de Cuenca

Inspección de la muestra: Recolectada en recipiente plástico estéril

Muestra	Parámetro	Método	Unidad	Resultado	NTE INEN 2608:2012 Bebida de leche fermentada
Bebida fermentada sabor a durazno	Recuento estándar en placa de aerobios mesófilos	NTE INEN 1529-5	UFC/mL	7,6 x10 ³ UFC/mL	Sin referencia en la norma

Se siguieron las siguientes normas INEN:
 1529-1 Preparación de los medios de cultivo
 1529-2 Toma, envío y preparación de muestras para el análisis
 UFC= Unidades formadoras de colonias
 NTE= Norma Técnica Ecuatoriana

Valor del análisis: USD \$ 12
 IVA 14% 1,68
 Total a cancelar USD \$ 13,68

UNIVERSIDAD DE CUENCA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
 DE AGUA Y ALIMENTOS

Responsable de Laboratorio-Analista

Analista Responsable

Av. 12 de Abril y Av. Loja S/N.
 Telef: 405 1000 Ext. 24 00 - 24 21
 CUENCA - ECUADOR



UNIVERSIDAD DE CUENCA
 desde 1867

7.7 Anexo 7: Fotografías

Elaboración del queso y recolección del suero.



Recolección de suero, desuerado y mediciones de sus parámetros



Proceso de fermentación





Formulación de la bebida



Análisis y encuesta

