



UNIVERSIDAD LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**CON RECONOCIMIENTO DE VALIDEZ OFICIAL DE
ESTUDIOS**

No. 972038 DE FECHA 24 DE ENERO DE 1997

**DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y
ACEPTACIÓN DE UN YOGUR SIMBIÓTICO
ADICIONADO CON FRUCTANOS DE AGAVE
TEQUILANA WEBER VARIEDAD AZUL**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A
MARÍA FERNANDA VARGAS CONTRERAS

**ASESOR DE TESIS: M. EN C. MARÍA LORENA
CASSÍS NOSTHAS**

Ciudad de México

2016


México D.F., 7 de Marzo de 2016


MTRO. RAÚL ALBERTO HAUSER LUNA
DIRECTOR DE GESTIÓN ESCOLAR
UNIVERSIDAD LA SALLE
PRESENTE

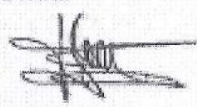
Le informo que la C. María Fernanda Vargas Contreras pasante en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad La Salle en la carrera de Licenciatura en Química de Alimentos con reconocimiento de validez oficial de estudios de la Secretaría de Educación Pública, según acuerdo número 972038 de fecha 24 de Enero de 1997, ha elaborado el trabajo titulado: **DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y ACEPTACIÓN DE UN YOGUR SIMBIÓTICO ADICIONADO CON FRUCTANOS DE AGAVE TEQUILANA WEBER VARIEDAD AZUL**, de conformidad a la modalidad de titulación aprobada para esta Licenciatura.


Le comunico además, que el trabajo que fue elaborado bajo mi conducción, tiene la calidad suficiente para ser la base de sustentación de su Examen Profesional.


ATENTAMENTE

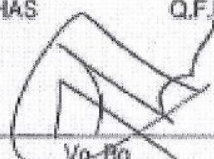

 MTRA. MARIATLORENA CASSIS NOSTHAS
 DIRECTOR DE TESIS


 DR. OSCAR RODOLFO RODAS SUÁREZ
 REVISOR


 MTR. MARCOS FRANCISCO BÁEZ FERNÁNDEZ
 REVISOR


 Vo. Bo.
 MTRA. MARÍA LORENA CASSIS NOSTHAS
 JEFE DE CARRERA


 Vo. Bo.
 Q.F.B. ANA-BELÉN OGANDO JUSTO
 SECRETARIA ACADÉMICA


 Vo. Bo.
 MTR. JOSÉ ELÍAS GARCÍA ZAHOUL
 DIRECTOR
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Agradecimientos

- A Dios, por llenarla de bendiciones como lo es el conseguir uno de los más grandes logros de mi vida, así como poder darle esa satisfacción a una de las personas más importantes que es mi madre.
- A mi mamá Rosa Iris Contreras, por ser una mujer extraordinaria, que, gracias a ella, soy lo que soy, por su apoyo y amor incondicional, su exigencia, y motivación de siempre impulsarme a ser la mejor en cualquier ámbito de mi vida.
- A mi papá Hildegardo Vargas, por su apoyo y cariño incondicional, por darme la oportunidad de estudiar una carrera y por ser un pilar en mi vida.
- A mis amigos Rocío, Eduardo, Pilar, Samanta, Karla y Ximena por todo su apoyo y comprensión durante este arduo proceso, sus palabras de aliento y motivación que me animaron a seguir adelante y dejar lo mejor de mí en mi trabajo.
- A mi querida y admirada asesora de tesis y jefa de carrera, la M. en C. Lorena Cassis, por ser una mujer excepcional, por darme todo su apoyo, entrega, sabiduría, enseñanzas, motivación y amistad que, sin ella, este trabajo no hubiera sido posible, ayudándome siempre a dar lo mejor, hacer lo mejor y dándome una madurez mental necesaria para mi crecimiento personal y profesional, por llevarme a una institución que me ayudó a incrementar y afianzar conocimientos, por su tiempo y esfuerzo, sus palabras de aliento y cariño, por hacerme una mejor persona, tanto en lo personal como en lo profesional, gracias por todo.
- A la Universidad La Salle, especialmente a la Facultad de Ciencias Químicas por darme una de las mejores carreras y ayudar a desarrollarme como una profesionista comprometida, dedicada y disciplinada.
- A mis maestros, por las enseñanzas y conocimientos impartidos, por las experiencias transmitidas, por todas las horas de paciencia y dedicación y sobre todo por incentivar el cariño a mi profesión.
- Al Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán INCMNSZ, especialmente al Departamento de Ciencia y Tecnología y a la Dra. Josefina Morales por abrirme las puertas de esta gran institución y permitirme desarrollar este trabajo en sus instalaciones, proporcionándome además, grandes conocimientos y crecimiento personal y profesional.
- A la QBP María de la Luz Colón, por darme todos los conocimientos microbiológicos plasmados en este trabajo, por su tiempo, dedicación, paciencia y enseñanzas.

Índice

Resumen	4
Marco teórico	6
yogur	6
Características de las Bacterias Lácticas	7
Producción y consumo de yogur	8
Tipos de Yogur	9
Yogur Deslactosado	11
Alimentos funcionales	12
Probióticos	14
Prebióticos	19
Simbióticos	24
Beneficios de los Pro, Pre y Simbióticos	24
Antecedentes	26
Planteamiento de problema	28
Justificación	29
Pregunta de investigación	30
Hipótesis	30
Objetivos	30
Diseño metodológico	31
Desarrollo experimental	31
Métodos de ensayo	36
Resultados y discusión	38
pH, acidez, viscosidad y volumen de suero	38
Cinéticas de fermentación	50
Análisis microbiológicos	56
Evaluación sensorial	57
Vida de anaquel	58
Análisis fisicoquímicos	61
Conclusiones	63
Bibliografía	64
Anexo 1	71
Anexo 2	86

Resumen

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, el yogur se define como el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH, enriquecida en extractos secos por medio de la concentración de esta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los fermentos lácteos. Su consumo en los últimos años, se ha incrementado drásticamente debido a que los consumidores asocian el yogur como un alimento saludable ya que se ha demostrado que su consumo induce beneficios a la salud ligados a la presencia de bacterias vivas que logran sobrevivir en el tracto gastrointestinal. Por sus propiedades biológicas y químicas inhibe la proliferación de organismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* y *Salmonella*, los cuales pueden ingresar al organismo por medio de los alimentos; también mejora la digestión de la lactosa (para los intolerantes a ella) a nivel intestinal. Es un buen tratamiento y prevención de diarreas, ya que neutralizan los efectos de las enterotoxinas con eficacia, además, disminuye los niveles de colesterol en la sangre. Contiene un mínimo de 1000 millones de microorganismos vivos por gramo, y dentro de sus propiedades se encuentran: estabilizar la biota intestinal, favorecer la absorción de las grasas, tratamiento de diarreas y estreñimiento, facilitar el aprovechamiento de nutrientes, disminuir la concentración de colesterol y reducir los efectos negativos de los antibióticos. De estos, el 61,87% del yogurt que se consume en nuestro país es bebible, le sigue en preferencias con 32,32 % el de cuchara y en tercer él licuado con 5,81 %. En este sentido, el yogur bebible, se considera como una buena opción por su fácil manejo y transporte además de una buena aceptación a cualquier hora del día y su alto valor nutritivo. Un alimento es funcional si contiene un componente alimenticio con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, cuyos efectos positivos justifican que sea funcional (fisiológico) o incluso saludable. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio en la salud del huésped. Para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico tiene que ser habitante normal del tracto gastrointestinal humano, no ser patógeno ni tóxico, presentar un tiempo corto de reproducción, ser estable al contacto con el ácido, bilis, enzimas y oxígeno, tener capacidad para adherirse a la mucosa intestinal, mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal, y producir sustancias antimicrobianas. Los prebióticos se definen como "sustancias no digeribles que cuando son consumidas, provee un efecto benéfico en el huésped por estimulación selectiva o actividad limitada de un número de bacterias". Los prebióticos estimulan el

crecimiento preferencial de un número limitado de bacterias, especialmente aunque no exclusivamente, lactobacilos y bifidobacterias. Este efecto sobre el crecimiento de bacterias benéficas, depende de la concentración inicial de las especies probióticas nativas y del pH intraluminal. La inulina es el nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas de fructosa. Es, por lo tanto, un fructosano o fructano, que se encuentran generalmente en las raíces, en tubérculos y rizomas de ciertas plantas como sustancia de reserva. Forma parte de la fibra alimentaria.

La fibra soluble natural obtenida de los fructanos de la piña del Agave Tequilana Weber variedad azul, es de alta solubilidad, de estructura ramificada. Los beneficios de los fructanos en la salud se debe fundamentalmente a la presencia de los enlaces $\beta(2-1)$ y $\beta(2-6)$. Finalmente un área promisoría en el desarrollo de estos ingredientes alimenticios son los simbióticos, los cuales pueden ser definidos como la combinación de probióticos y prebióticos. Además de aumentar la supervivencia y actividad de los probióticos, esta combinación permite estimular el desarrollo de cierto tipo de bacterias presentes en la microbiota intestinal como son los lactobacilos y bifidobacterias.

La metodología que se realizó de acuerdo al desarrollo experimental fue: selección y adquisición de materias primas, selección y elaboración de la fórmula base, elaboración del yogur con fibra, cinética de fermentación para el conteo de bacterias lácticas, 3 series de fermentaciones por triplicado, evaluación de los productos, vida de anaquel, fisicoquímico, fibra soluble Microbiológicos, evaluación sensorial, prueba de nivel de agrado

Se elaboró un yogur bebible simbiótico adicionado de *L. acidophilus* y *B. animalis* y fructanos de agave, con un nivel de agrado entre 6,5 y 7,5 (gusta mucho), para los 4 sabores que se evaluaron (pay de limón, fresa, maracuyá y piña colada).

La cinética de fermentación de las cepas probióticas de *L. acidophilus* y *B. animalis* en presencia de fructanos de agave, evidenció las propiedades estimulantes de crecimiento y de protección para las bacterias probióticas manteniendo el número de UFC/mL durante la vida de anaquel.

Se obtuvo 10^5 UFC/mL de bacterias probióticas al final de la vida de anaquel, la cual se mantuvo estable durante los 21 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), comprobándose que el uso de ingredientes prebióticos constituyente un agente protector de la viabilidad de los probióticos.

El contenido de fibra soluble presente al final de la vida de anaquel (después de 26 días de almacenamiento) fue de 2g/100, que corresponde al 40% del total de fibra adicionada al inicio.

Marco Teórico

La industria de alimentos (incluyendo la del sector lácteo), actualmente se enfrenta a un consumidor cada vez más informado, más exigente y consciente de que "somos lo que comemos"; en este sentido, los consumidores demandan productos que contribuyan a mejorar su salud y por tanto su calidad de vida. ⁽¹⁾

Actualmente, las tendencias de consumo de productos alimenticios, se encuentran en constantes cambios y dentro de este contexto, el sector lácteo se enfoca en elaborar productos reducidos en grasa o azúcar o adicionados con ingredientes tales como vitaminas, probióticos, prebióticos, fibra, los cuales representan una opción funcional para mejorar la dieta de los consumidores. ⁽¹⁾

Dentro del mercado de la salud, los alimentos funcionales experimentan un crecimiento muy importante y el sector lácteo es el líder en cuanto a alimento funcional, siendo el yogur el producto que más se emplea. ⁽¹⁾

Yogur

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010 ⁽²⁾, el yogur se define como el producto obtenido de la fermentación de leche, estandarizada o no, por medio de la acción de microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, obteniendo como resultado la reducción del pH.

Se prepara a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en extractos secos por medio de la concentración de esta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los fermentos lácteos. ⁽³⁾

La fermentación ácido láctica de la leche para la obtención del yogur, se debe a la acción del cultivo lácteo iniciador de *Streptococcus salivarius* subesp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que al ser inoculados en la leche,

transforman la lactosa en ácido láctico, provocando una serie de cambios que brindan el sabor, olor, textura y cualidades nutricionales del yogur, además de sus efectos terapéuticos. Por sus propiedades biológicas y químicas inhibe la proliferación de organismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter sp* y *Salmonella sp*, los cuales pueden ingresar al organismo por medio de los alimentos; también mejora la digestión de la lactosa (para los intolerantes a ella) a nivel intestinal. Se utiliza como tratamiento para la prevención de diarreas, ya que neutralizan los efectos de las enterotoxinas con eficacia, además, disminuye los niveles de colesterol en la sangre, etc. ⁽³⁾ Contiene un mínimo de 100 millones de microorganismos vivos por gramo, y dentro de sus propiedades se encuentran las siguientes: estabiliza la biota intestinal, favorece la absorción de las grasas, indicado para el tratamiento de diarreas y estreñimiento, facilita el aprovechamiento de nutrientes, disminuye la concentración de colesterol y reduce los efectos negativos de los antibióticos. ⁽³⁾

Características de las Bacterias Lácticas

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus, (especie que incluye tres subespecies: *delbrueckii*, *bulgaricus* y *lactis*) es una bacteria Gram (+), no móviles, no formadora de esporas, homofermentativa obligada con exclusiva producción de ácido D-(-)- láctico y con una temperatura óptima de crecimiento de 40 a 44°C ⁽⁴⁾

Tradicionalmente, se utiliza en combinación con ***Streptococcus thermophilus*** (normalmente en una relación cuantitativa de 1:3), para la elaboración del yogur, en proto-cooperación lo que a menudo resulta una tasa de acidificación más alta, un pH final más bajo, una estimulación en la producción de compuestos aromáticos y una mejora en la estabilidad del producto final, en comparación cuando se utilizan monocultivos ⁽⁵⁾. Se desarrolla en una verdadera simbiosis, en la que el *S. thermophilus* inicia la fermentación láctica, desarrollándose intensamente hasta llegar a un pH de 5,5 en donde la acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles (por ejemplo, ácido fórmico que

produce), crea las condiciones ideales para que se desarrolle *L. bulgaricus*. La actividad proteolítica de los lactobacilos, estimula a su vez el crecimiento y la actividad acidificante de los estreptococos. Los lactobacilos, desarrollan aparte una actividad lipolítica por lo que se liberan ácidos grasos y se produce además acetaldehído, constituyéndose así en los principales productores del aroma del yogur. *S. thermophilus* crece formando pares o cadenas mediante células esféricas o elipsoides mientras que *L. bulgaricus* presenta forma de bacilo largo. ⁽⁶⁾

***Streptococcus thermophilus*:** Es una bacteria Gram (+), de forma esférica, con un diámetro de 0,5 a 2,0 micrómetros; catalasa negativa, no presenta movilidad y no forma esporas; su temperatura óptima de crecimiento es entre 40 y 45°C; es homofermentativa, ya que hidroliza la lactosa en galactosa y glucosa, a través de una α -galactosidasa y posteriormente se transforma en ácido láctico L (+) por la vía Embden Meyerhof Parnas (EMP). Fermenta además la fructosa y la sacarosa, y es el responsable del aroma agradable del producto, debido a la formación de compuestos carbonilos tales como el acetaldehído y el diacetilo ^(7,8)

Producción y consumo de yogur

De acuerdo a la Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera del INEGI ⁽⁹⁾, en el año 2011, el mercado de yogur en México, registró ventas cerca de 625,3 millones de ton, con un crecimiento del 8% en valor de enero a diciembre, en los yogur de cuchara, para beber y licuado. Particularmente, el yogur para beber alcanzó una producción de 398,345 ton, volumen mayor en comparación con el yogur de cuchara y el yogur licuado (Tabla 1).

El 61,87% del yogur que se consume en nuestro país es bebible, le continúa en preferencias con 32,32 % el de cuchara y en tercer lugar el licuado con 5,81 %. En este sentido, el yogur bebible, se categoriza como el yogur agitado con baja viscosidad y se considera como una buena opción por su fácil manejo y transporte además de una buena aceptación a cualquier hora del día, por su alto valor nutritivo, por lo que es una área creciente de interés, basada en la conveniencia,

facilidad de transporte y habilidad para entregar todos los beneficios nutricionales y de salud de un yogur batido. El consumo per cápita de yogur en México ronda los 8.5 kilogramos al año, entre una cuarta o una quinta parte de lo que se consume en países como Francia o España, países donde se come entre 26 y hasta 36 kg por persona anualmente. ^(7, 8)

Por otro lado, los yogures naturales o sin sabor, son a nivel mundial la segunda opción más popular, proporcionando un lanzamiento al mercado, cerca del 12% y en tercer lugar, los sabores exóticos. ⁽¹⁷⁾

Tabla 1. PRODUCCION INDUSTRIAL NACIONAL DE YOGUR

Volumen: Toneladas

Yogur	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Natural	72,472	76,959	80,386	82,262	79,169	74,978	90,750
C/Frutas	149,272	136,114	200,340	168,308	186,048	210,591	204,656
P/Beber	200,005	212,493	334,314	362,313	362,117	387,352	398,345
Liculado	25,940	23,351	22,079	19,858	20,239	33,403	37,174
Total	447,689	448,917	637,119	632,741	647,573	706,324	730,925

Fuente: INEGI ⁽⁹⁾

Tipos de Yogur

Se puede clasificar de acuerdo a varios criterios, como según su **consistencia** en: yogur batido, yogur bebible y yogur aflanado.

Para la elaboración del **yogur batido**, el producto se cultiva en fermentadores adecuados, luego se rompe y se enfría el gel por la acción del batido, se acondiciona y se envasa el producto.

Para el caso del **yogur bebible**, éste se elabora cultivando la leche inoculada con el cultivo iniciador; ya fermentado, el gel se enfría ligeramente y se pasa por el homogeneizador (a baja o sin presión), con el fin de romper la estructura del gel y lograr un cuerpo fluido, con menos consistencia que el yogur batido.

Y finalmente, el **yogur aflanado** se obtiene fermentando la leche previamente inoculada con el cultivo láctico, en los envases que se presentarán en el mercado. No se somete al batido, sino que el gel se mantiene estructurado durante su vida de anaquel. Previamente a la fermentación, se coloca una base de frutas en el fondo del vaso, para que así el consumidor realice la mezcla del yogur y la fruta en el momento de degustarlo. ⁽¹⁰⁾

En el mercado nacional, se encuentran 3 tipos principales de yogur: el yogur rígido y semirrígido (aflanado), el yogur batido y el yogur líquido. Actualmente se comercializan en las formas de: natural, con frutas y saborizado. Los yogur de tipo rígido y batido, presentan un elevado contenido de sólidos (14 a 16%) y la diferencia entre ellos es el proceso de elaboración.

Por lo general, para aumentar el contenido de sólidos, se lleva a cabo una evaporación, osmosis inversa, ultrafiltración y la adición de leche descremada en polvo. De acuerdo a la norma de yogur, el contenido de sólidos no grasos de leche debe ser de 8,5% con un mínimo de grasa del 3% para el producto entero y menor de 0,5% para el yogur descremado, con una acidez total que puede variar de 0,9 a 1,1% como ácido láctico. ^(10, 11)

Por otro lado, durante su elaboración se pueden utilizar diversos aditivos como son los edulcorantes (sacarosa, aspartame y sacarina), saborizantes y colorantes; adición de fruta (elaborada con mermeladas, pulpas, jarabes y fruta fresca); estabilizantes, para proporcionar textura y cuerpo al yogur, como son la pectina, gelatina, carragenina, alginatos, goma guar, goma de algarrobo, almidones y féculas.

En el caso del yogur líquido o de bajo contenido de sólidos (10 a 12%), éste tiende a presentar el fenómeno de sinéresis (separación del suero) por lo que para evitar su presencia, es necesario utilizar estabilizantes en una concentración de 0,3 a 0,5%.

Yogur Deslactosado

Se sabe que no todos los seres humanos pueden digerir la leche con la misma facilidad, debido a una baja actividad de la lactasa intestinal que presentan algunas personas. La incidencia de mala absorción de la lactosa de la leche, en personas de Europa del Este, Mediterráneo, África, América Latina y Austria, es del 60%; en americanos de raza blanca es del 19% aproximadamente, y en chinos, japoneses, nigerianos, aborígenes australianos, etc. es casi del 100%.⁽¹²⁾

La lactosa (azúcar de la leche), aunque es consumida como un disacárido, no se absorbe como tal, ya que para que esto suceda, primeramente la lactosa debe desdoblarse en glucosa y galactosa, monosacáridos utilizados por el organismo, como fuente de energía. Dicha hidrólisis, la realiza la enzima lactasa, la cual está presente en el intestino delgado. Sin embargo, la baja actividad de la lactasa intestinal, también conocida como mala absorción de la lactosa, puede presentarse en varios casos tales como una rara anomalía congénita, en niños muy desnutridos que tienen una mala absorción de calorías de las proteínas o por el nacimiento prematuro. En la etapa adulta, la disminución de la actividad enzimática es evidente particularmente después de los 40 y 50 años de edad.⁽¹³⁾

Es por ello que en el mercado lácteo, la tendencia es elaborar productos con las mismas cualidades de la leche con lactosa, sin modificar su composición, pero con un bajo contenido de la misma. Dichos productos se conocen como "deslactosados" o "de fácil digestión", los cuales pueden existir en sus diferentes presentaciones entera, descremada, semidescremada o light.⁽¹³⁾

En la actualidad, el uso de la enzima lactasa no sólo se limita a este tipo de leche, sino que se busca aplicar también en productos fermentados como el yogur. En este caso, el contenido de lactosa es menor y la presencia de las bacterias lácticas, permitirá que una persona intolerante o mala digestora de la lactosa, pueda consumir sin problema este tipo de producto.⁽¹³⁾

Por otro lado, el uso de la enzima lactasa, para la elaboración de yogures deslactosados, presenta ciertas ventajas como: una mayor reducción del

contenido de lactosa en el producto fermentado; asimismo, como la lactosa no contribuye al dulzor del producto fermentado, dependiendo del grado de hidrólisis requerido, los azúcares resultantes tendrán un poder edulcorante mayor de tal forma que se reduce la adición de azúcar en el producto; mejora la apariencia del yogur proporcionándole una consistencia más cremosa; a menudo, la hidrólisis de la lactosa, estimula el crecimiento de las bacterias iniciadoras del yogur lo que conlleva a una mayor producción de ácido láctico como consecuencia de un menor tiempo de fermentación. ⁽¹⁴⁾

Las nuevas tendencias en el desarrollo de nuevos productos en el área de lácteos, como los yogures adicionados con probióticos o simbióticos, han aumentado ya que la demanda de este tipo de productos por el consumidor requiere que ofrezca beneficios a la salud. El yogur se considera un vehículo adecuado para para la adición de este tipo de ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales.

Alimentos funcionales

En los últimos años, las tendencias mundiales en alimentación muestran un marcado interés de los consumidores hacia ciertos alimentos, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Por lo que para responder a las exigencias de productos con valor agregado que no solo aporten los beneficios básicos de la leche sino también de nutrientes adicionales que favorezcan la salud de los consumidores, la industria láctea promueve el uso de diferentes ingredientes funcionales tales como los probióticos, prebióticos, vitaminas, proteínas, minerales, entre otros. ⁽¹⁰⁾ Estas variaciones en los patrones de alimentación, han generado una nueva área de desarrollo en las ciencias de los alimentos y de la nutrición que corresponde a la de los **Alimentos Funcionales**. ⁽¹¹⁾

Un alimento es funcional si contiene un componente alimenticio con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, cuyos efectos positivos justifican que puede reivindicarse que es funcional (fisiológico) o incluso saludable.

⁽¹⁵⁾

En México, se definen a los alimentos funcionales como "alimentos – o componentes o ingredientes de alimentos, o bien productos elaborados a los que se les atribuye alguna acción curativa o preventiva más allá de sus propiedades alimentarias" ⁽¹⁶⁾

Otro factor que también ha contribuido al "desarrollo" de los alimentos funcionales ha sido los avances tecnológicos que actualmente se tienen como es la biotecnología, así como la investigación científica, en donde se documenta los beneficios que ofrecen estos alimentos a la salud.

Es un hecho que los consumidores han comenzado a ver a la dieta como parte esencial para la prevención de las enfermedades no transmisibles como es el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la osteoporosis entre otras. De esta manera, es que se presenta un fenómeno denominado "de auto-cuidado" (*self-care*), factor principal que motiva a los consumidores en la decisión de compra de alimentos saludables y el que regirá el crecimiento de la industria de los alimentos funcionales. ⁽¹³⁾

Actualmente, los productos lácteos son los de mayor expansión en relación al desarrollo de alimentos funcionales, siendo el yogur, uno de los alimentos que más se utiliza como alimento funcional y al que se le puede adicionar otros ingredientes tales como probióticos, prebióticos o simbióticos. ⁽¹⁷⁾

Dado que en los últimos años el mercado de yogur se ha incrementado y reflejado en términos de actividad y competitividad, ocasiona que la industria láctea explore oportunidades de innovación en sabores, en donde los sabores de fruta, que son los que dominan este mercado, permitan la entrada a una amplia gama de tipos de fruta, desde la tradicional fresa y durazno hasta los sabores más inusuales, como la papaya, ciruela y coco.

Probióticos

Se menciona que los productos lácteos son el vehículo adecuado para el transporte de probióticos por varias razones ⁽¹⁸⁾:

- ✓ **Protección de la bacteria:** los productos lácteos neutralizan la acidez de los ácidos estomacales y de las altas concentraciones biliares en el intestino delgado, que pueden reducir por muerte o daño la concentración de bacterias.
- ✓ **Refrigeración:** la refrigeración de los lácteos promueve la estabilidad de los probióticos.
- ✓ **Imagen de los cultivos vivos:** el uso de cultivos vivos en los productos lácteos da una imagen positiva ante los consumidores lo cual facilita la transmisión de mensajes de salud.
- ✓ **Salud:** las propiedades de salud de los probióticos, se combinan con las propiedades saludables de los productos lácteos para crear un alimento funcional. Se ha demostrado el efecto benéfico de los productos lácteos adicionados con probióticos, en la homeostasis de la microbiota intestinal, control de la hipertensión, osteoporosis, cáncer, intolerancia a la lactosa y la disminución en la concentración de colesterol, entre otros.

Los probióticos se definen como microorganismos o bacterias vivas que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del huésped. ⁽¹³⁾ Estos microorganismos no colonizan permanentemente al hospedero, por lo que su ingesta debe ser continua o periódica.

Para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico tiene que ser habitante normal del tracto gastrointestinal (TGI) humano, no ser patógeno ni tóxico, presentar un tiempo corto de reproducción, ser estable al contacto con el ácido, la bilis, las enzimas y el oxígeno, presentar capacidad para adherirse a la mucosa intestinal, mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal y producir sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos, ácidos grasos, bacteriocinas); modular la respuesta inmune e influir en la actividad metabólica ⁽¹⁹⁾.

Los probióticos al modificar la microbiota intestinal, influyen directa e indirectamente en el estado nutricional del huésped a través de la producción de vitaminas, minerales (Ca, Zn, Fe, Mg, Cu y P) y ácidos grasos de cadena corta, degradación de sustancias alimenticias no digeridas, estimulación de la respuesta inmune y protección contra microorganismos patógenos.⁽²¹⁾ Es importante considerar que para lograr estos efectos, los probióticos deben mantener su viabilidad, es decir, deben sobrevivir a su paso por el TGI en número suficiente y en un estado metabólico activo, misma que debe mantenerse desde la producción y consumo, hasta el término del tránsito por el TGI para evaluar sus efectos benéficos.^(22, 23)

No hay acuerdos generales en cuanto a la concentración mínima necesaria del probiótico para alcanzar ventajas terapéuticas. Algunos autores sugieren niveles de concentración mayores a 10^8 UFC/mL, llegando incluso a superar las 10^9 UFC/mL.⁽²⁴⁾

Debido a esto, la importancia de los probióticos es relevante, ya que tiene una aplicación tanto a nivel de salud humana, pero también a nivel industrial, particularmente en la elaboración de productos lácteos fermentados, ya que hasta ahora es **la matriz alimentaria más empleada para la incorporación de probióticos.**⁽²⁵⁾

Particularmente para el caso de los alimentos fermentados, en el mercado europeo los productos lácteos constituyen el 65% de los alimentos funcionales, dentro de los cuales los alimentos que siempre se encuentran a la vanguardia son los que contienen probióticos⁽¹⁷⁾. Desde 1990 han aparecido en Europa varias bebidas fermentadas como "Actimel" (*L. casei immunitas*), "LC1" (*L. johnsonii*, La1), "Yakult" (*L. casei Shirota*), "Vifit" (*Lactobacillus GG*) y "Fyos" (*L. rhamnosus*).

Sin embargo, existen varios factores que afectan la viabilidad de las bacterias probióticas en el yogur, incluida la acidez, el pH, el contenido de oxígeno, la temperatura de almacenamiento, etc.; como una alternativa para mantener la viabilidad de dichas bacterias probióticas, ha sido la adición de sustratos que poseen un efecto específico de estímulo en el crecimiento de estas bacterias

presentes en el colon como son los oligosacáridos que además, poseen un efecto benéfico en la salud humana. La utilización de estos oligosacáridos por las bifidobacterias del colon, generan la producción de ácidos grasos de cadena corta, de vitaminas, actividad antimicrobiana y una estimulación del sistema inmune. (26, 27)

Bifidobacterium animalis ssp. lactis

Las bifidobacterias son habitantes normales del TGI y se encuentran presentes durante toda la vida. Constituyen una de las diversas especies predominantes de la microbiota del colon a niveles que van de 10^8 - 10^{11} bacterias/g. (28)

Son microorganismos anaerobios estrictos con morfología bífida, en forma de bacilos, no productoras de gases, Gram (+), no formadoras de esporas, no móviles y catalasa negativa. La forma puede ser variada, pueden ser bacilos cortos, curvos, circulares y bifurcados en forma de Y.

La eficacia de la adición de las bacterias probióticas, depende de la concentración de inóculo y de su viabilidad, la cual debe de mantenerse durante el almacenamiento y la vida útil del producto, y su sobrevivencia en el ambiente intestinal.

Lactobacillus acidophilus 3

Es una bacteria Gram (+), aerotolerante principalmente, su crecimiento se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas; se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, no esporulados, sus colonias son de 2-5 mm, convexas, suaves, con bordes enteros, opacas y sin pigmentos; fermenta la maltosa (29).

Esta bacteria se encuentra de forma natural en el TGI y en ciertas leches fermentadas tradicionales. Es resistente a las secreciones ácidas y a la bilis y cuando se ingiere, es capaz de sobrevivir al tránsito a lo largo del TGI. Se

considera como probiótico debido a que su consumo en ciertas cantidades puede ejercer diversos beneficios sobre la salud. ⁽³⁰⁾

Lactobacillus acidophilus se utiliza normalmente en combinación con otras cepas probióticas o cultivos de yogur para la producción de productos lácteos ya que ambas son muy estables y presentan una alta resistencia frente a los ácidos en los productos lácteos fermentados. ⁽³¹⁾

Efectos Benéficos

Los efectos potenciales de las bacterias probióticas se resumen de la siguiente manera ⁽²⁹⁾:

- ✓ Producción de nutrientes de especial importancia para la mucosa intestinal, tales como ácidos grasos, particularmente los de cadena corta y aminoácidos como: arginina, glutamina y cisteína
- ✓ Producción de micronutrientes, especialmente vitaminas (algunas del complejo B) antioxidantes y aminos (histamina, 5-HT, piperidina, tiramina, cadaverina, pirrolidina, agmatina, espermidina y putrecina)
- ✓ Prevención del sobrecrecimiento de microorganismos potencialmente patógenos, algunas de estas bacterias producen sustancias específicas con efecto antibiótico
- ✓ Estimulación del sistema de defensa inmunointestinal
- ✓ Eliminación de toxinas y sustancias innecesarias del lumen (lactobacilos producen esteroides a partir del colesterol del colon y esto ayuda a reducir niveles circulantes de colesterol)
- ✓ Participación en la regulación de funciones intestinales, tales como: utilización de moco, absorción de nutrientes, movilidad gastrointestinal y flujo de sangre, lo cual ocurre a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta, hormonas, enzimas, poliminas y citoquinas y óxido nítrico.

Los productos del metabolismo de los probióticos, parten desde la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC, principales productos de fermentación de las bacterias), ⁽³²⁾ hasta ácidos orgánicos esenciales como el ácido fólico. Estos

compuestos, crean un medio ambiente ácido en el intestino por la disminución del pH y modulan una serie de eventos fisiológicos y benéficos en el huésped. La liberación de varias enzimas dentro del lumen intestinal por la presencia de las bacterias probióticas, ejerce efectos sinérgicos en la digestión y alivio de síntomas por la mala absorción intestinal ⁽³³⁾ y son capaces de sintetizar vitaminas, especialmente del complejo B.

El efecto barrera generado por algunos probióticos, puede derivar de una modulación positiva de la capa mucosa que separa el lumen intestinal de los colonocitos. De hecho, los probióticos pueden cambiar la barrera de la mucosa intestinal, la regulación de la permeabilidad intestinal y mejorar la inmunidad del TGI, permitiendo la prevención del sobrecrecimiento de bacterias y virus patógenos. Las diarreas causadas por el crecimiento de bacterias patógenas, es la más común debido al uso indiscriminado de antibióticos debido a que eliminan cualquier microorganismo presente en el intestino, incluidos bacterias benéficas, lo que ocasiona un riesgo de colonización de bacterias patógenas. Los probióticos pueden inhibir este crecimiento por la liberación de sustancias inhibitoras o bacteriocinas, como se ha demostrado con algunas cepas *in vitro* ⁽³⁴⁾

Varios estudios han evidenciado que los probióticos aceleran el tiempo de tránsito colónico en un 20 %. Otros estudios han concluido que *B. animalis* puede permanecer en el TGI y actuar como coadyuvante a la respuesta inmune humoral ⁽³⁵⁾

La viabilidad de *Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus acidophilus* en los yogur depende de un número de factores tales como la cepa probiótica incorporada, el cultivo iniciador de yogur utilizado y cualquier interacción entre las especies presentes, las condiciones de cultivo, tiempo de fermentación y condiciones de almacenamiento, el pH del yogur (post-acidificación durante el almacenamiento), la concentración de azúcar (presión osmótica), contenido de sólidos de la leche, la disponibilidad de nutrientes, la presencia de peróxido de hidrógeno, contenido de oxígeno disuelto (especialmente para *Bifidobacterium spp.*), la capacidad amortiguadora y la concentración de β -galactosidasa en el yogur.

Prebióticos

Los prebióticos se definen como “sustancias no digeribles que cuando son consumidas, provee un efecto benéfico en el hospedero por estimulación selectiva o actividad limitada de un número de bacterias” ⁽³⁶⁾

En el 2007, Roberfroid define a los prebióticos como “ingrediente, que es fermentado selectivamente, que permite cambios específicos tanto en la composición y/o actividad en la microbiota intestinal, confiriéndole beneficios sobre el bienestar y salud del huésped” ⁽³⁶⁾

En el 2010, (La Asociación Internacional de Probióticos y Prebióticos ISAPP, 2010) define a los prebióticos como un ingrediente dietario que es selectivamente fermentado y que produce cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal y conferirle beneficios a la salud del hospedero. ⁽³⁷⁾

Los prebióticos estimulan el crecimiento preferencial de un número limitado de bacterias, especialmente aunque no exclusivamente, lactobacilos y bifidobacterias. Este efecto sobre el crecimiento de bacterias benéficas, depende de la concentración inicial de las especies probióticas nativas y del pH intraluminal. ⁽³⁸⁾

De todos los prebióticos disponibles, los únicos respaldados por estudios para ser clasificados como ingredientes alimenticios funcionales son los fructanos tipo inulina y fructooligosacáridos (FOS). ⁽³⁷⁾

Inulina o fructanos:

La **inulina** es el nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas de fructosa. Es, por lo tanto, un fructosano o fructano, que se encuentran generalmente en las raíces, en tubérculos y rizomas de ciertas plantas como sustancia de reserva. Forma parte de la fibra alimentaria. ⁽³⁹⁾

La inulina estimula el crecimiento de bacterias benéficas de la microbiota intestinal. Esto se debe a que llega al estómago y al duodeno prácticamente sin presentar cambios y en el intestino delgado casi sin digerir. Posteriormente, llega

al intestino grueso y es ahí donde se encuentra disponible para ser metabolizada por algunos de las bacterias intestinales, particularmente las bifidobacterias y los lactobacilos, promoviendo, su establecimiento y crecimiento de bacterias benéficas.⁽⁴⁰⁾

Estructuralmente, la inulina es un hidrato de carbono polidisperso de fructosas y en algunos casos con un extremo glucosídico, con uniones β (2,1) lo que hace que la inulina no sea digerible. De manera pura, son cristales esféricos, cuyo peso molecular se encuentra 5,600 a 6,300 dependiendo del grado de polimerización. El polvo obtenido es de color blanco, amorfo, higroscópico, sabor y olor neutro, no cariogénico y se utiliza para una mejora en el sabor y textura de los alimentos como sustituto de grasa y/o azúcar, reduciendo así el contenido energético del producto final.⁽³⁹⁾

La oligofruktosa o fructooligosacáridos es una mezcla de oligosacáridos que se obtienen por hidrólisis enzimática parcial de la inulina por lo que presenta un menor grado de polimerización, posee un sabor neutro; se utiliza para preparar productos lácteos bajos en calorías, postres congelados y productos de panificación, como sustituto de azúcar y como aporte de fibra además de que mejora las propiedades de retención de agua.^(40, 41) Reduce la actividad de agua y por lo tanto propicia la estabilidad microbiológica, de modificar los puntos de fusión y ebullición; provee cuerpo y sinergismo con los edulcorantes principalmente con la combinación de acelsufame K-aspartame.^(42, 43, 44, 45)

Entre sus atributos se encuentra el comportamiento fisiológico semejante a la fibra soluble y un valor calórico de 1.5 Kcal/g⁽⁴⁶⁾

Tanto la inulina como la oligofruktosa, son consideradas en la Comunidad Europea, como ingredientes alimenticios naturales y en los E.U. son reconocidas como GRAS (Generally Recognized As Safe).^(46, 47)

En México, la NOM-086-SSA1-1994 informa que dentro de los nutrimentos que se permiten adicionar a los alimentos se encuentra la fibra dietética; sin embargo no existe aún legislación respecto a este tipo de prebióticos.⁽⁴⁸⁾

Debido a su estructura química (enlace β (2-1) y β (2-6)), dichas fibras no pueden ser hidrolizadas por las enzimas digestivas pero son fermentadas selectivamente por la microbiota intestinal.⁽⁴⁹⁾

Los productos de dicha fermentación son:

- 40% se convierte en biomasa (aumento de las bacterias intestinales, principalmente bifidobacterias).
- 10% se convierte en gases (H_2 , CO_2 y CH_4).
- 50% se convierte en ácidos grasos de cadena corta (60% ácido acético, 25% ácido láctico 10% ácido propiónico y 5% ácido butírico).^(50, 51)

Dentro de las inulinas, se encuentra otro grupo de fructanos conocidos como:

Inulina o fructanos de Agave tequilana Weber variedad Azul

La planta del Agave tequilana Weber variedad azul, presenta ciertas características que la hacen la diferencia con otros agaves, ya que es una planta carnosa en forma de roseta, fibrosa, de color azul o verde grisáceo originado por el alto contenido de ceras que impiden que la planta pierda agua. Sus hojas son rígidas, con espinas marginales y apicales; almacena inulina en el tallo y es productora de fructuosa.

Es una de las plantas más importantes de México desde el punto de vista económico y tradicionalmente es cultivado como materia prima para la producción de productos destilados como es el tequila. La fibra soluble natural obtenida de los fructanos de la piña del Agave Azul Tequilana Weber, es de alta solubilidad, de estructura ramificada.^(29, 38) Los beneficios de los fructanos en la salud se debe fundamentalmente a la presencia de los enlaces que hidrolizan las bacterias de colon⁽⁵⁰⁾

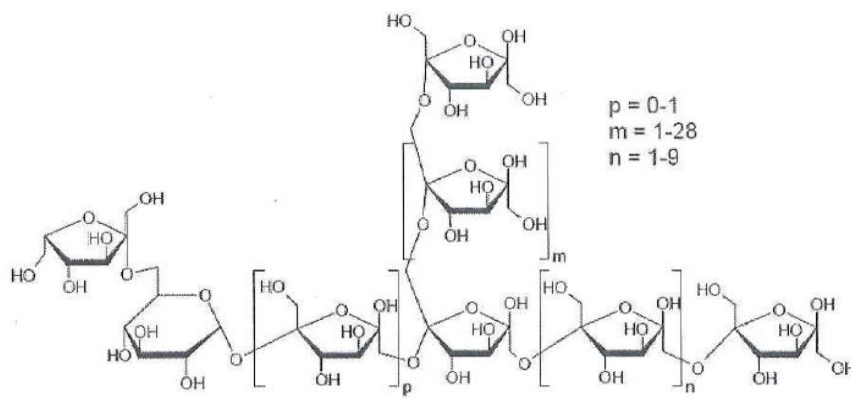


Figura 1. Estructura de Fructanos de *Agave tequilana* Weber⁽⁵⁰⁾

Debido a la cantidad de beneficios en la salud, la inulina o fructanos de agave han sido aplicados en diferentes tipos de alimentos como confitería, concentrados de frutas, postres lácteos, **yogur** y queso fresco, alimentos horneados, chocolates, helados y salsas.⁽⁵⁰⁾

El yogur adicionado con prebióticos como la inulina, mejora la viabilidad del *Lactobacillus acidophilus* y del *L. casei*, durante su almacenamiento en refrigeración. Se ha demostrado que este polisacárido estimula el crecimiento del probiótico ya que a bajas concentraciones de la misma, son suficientes para estimular el crecimiento así como para conservar la viabilidad de los probióticos en el yogur.⁽²⁴⁾

Características fisicoquímicas

La inulina es poco soluble en agua (más soluble la oligofructosa) y posee la capacidad de formar microcristales en agua y en la leche, los cuales no son perceptibles en la boca, logrando proporcionar una textura cremosa y una sensación grasosa en la boca, que permite que sea utilizada como sustituto de grasa en productos horneados, rellenos, productos lácteos, etc.⁽⁵⁰⁾

Se han realizado varios estudios en donde se utiliza la inulina de achicoria para la producción de yogur, entre otros alimentos, sin embargo, no hay antecedentes con referencia al uso del agave. La principal diferencia entre moléculas de la inulina de achicoria y la de agave, es que ésta última su estructura es ramificada y las provenientes de gramíneas son lineales y la distribución del tamaño de moléculas o grado de polimerización entre ellas varía. Sin embargo la composición química es la misma y todos los fructanos tipo inulina de diferentes orígenes, hasta hoy estudiados han mostrado coincidencia en sus efectos prebióticos. ^(51, 52)

Dentro de las características que presentan los fructanos de agave son:

- Una mayor solubilidad, equivalente a la de los fructooligosacáridos (FOS) , por lo tanto pueden aplicarse mas facilmente en bebidas.
- La inulina es poco soluble y tiene la propiedad de formar microcristales cuando se usa en agua o leche.
- Posee cualidades funcionales similares a los jarabes de azúcar o glucosa; son mas solubles que la sacarosa y proporciona entre un 30-50% del dulzor, conservando sus propiedades funcionales.
- Agente espesante,
- Edulcorante bajo en calorías
- Modificador de texturas

De los efectos informados sobre la adición de los fructanos en las características físicas de los productos lácteos, particularmente en el yogur, se menciona que a concentraciones elevadas de estos fructanos, provoca un engrosamiento gradual de la red de proteína inducida por el ácido, generando además un aumento en la sinéresis y permeabilidad. ⁽⁴³⁾

En el caso de la adición de oligosacáridos, pueden presentar efectos a pesar de que no tienen propiedades gelificantes y no modifican la viscosidad. ⁽⁵³⁾ Es considerado un ingrediente funcional por sus efectos fisiológicos y bioquímicos, presentan una mejora en la salud y reducción del riesgo de muchas enfermedades.

Simbióticos

Los simbióticos son la combinación de probióticos y prebióticos. Además de aumentar la supervivencia y actividad de los probióticos, esta combinación permite estimular el desarrollo de cierto tipo de bacterias presentes en la microbiota intestinal como son los lactobacilos y bifidobacterias. ⁽⁵⁴⁾

El consumo de un probiótico en combinación con un prebiótico, puede resultar en efecto sinérgico, mejorando la supervivencia del probiótico por la disponibilidad de sustrato para fermentación. De aquí que la combinación de probióticos y prebióticos, pudiera ser un recurso atractivo para mantener la microbiota intestinal nativa del adulto, mantener la función intestinal y reducir la susceptibilidad a las infecciones. ⁽⁵⁵⁾

Beneficios de los Pro, Pre y Simbióticos.

Es común en los productos lácteos, que las bacterias lácticas sean combinadas con otras bacterias para asegurar las características sensoriales, por lo que es importante realizar una adecuada selección de las cepas y un control en el proceso de fermentación, para lograr una adaptación óptima del probiótico al alimento y una viabilidad máxima. ⁽⁵⁶⁾ En la Tabla 3, se presentan las bacterias ácido lácticas utilizadas como probióticas.

El propósito de incorporar bacterias **probióticas** al organismo humano, es revertir o disminuir la pérdida de estas bacterias benéficas en el intestino por diversos factores como es la edad, el uso de antibióticos, el estrés, entre otros, lo que provoca una proliferación de bacterias patógenas; una propiedad importante que presentan estas bacterias es que poseen la capacidad de sobrevivir al tracto gastrointestinal y persistir el tiempo suficiente en el intestino para proveer efectos benéficos a la salud. ⁽⁵⁷⁾

Algunos estudios clínicos han demostrado la eficacia de los probióticos para el tratamiento de pacientes con síndrome de colon irritable, en donde se ha evaluado

la combinación de probióticos en los que se incluyen *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. En el caso de *L. acidophilus*, esta bacteria está asociada con la reducción de los niveles de dolor en la inflamación intestinal, así como *B. infantis* y *B. lactis* que alivian los síntomas de colon irritable; estas bacterias, aunadas a los efectos de la fibra (prebiótico), aceleran el tránsito intestinal y aumentan la producción de heces diarias, lo que alivia la constipación. ⁽⁵⁸⁾

Las bifidobacterias como *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum* constituyen la mayor parte de la microbiota del intestino humano, algunos de sus beneficios incluye la inhibición de bacterias patógenas, la reducción en las concentraciones de colesterol y en el riesgo de cáncer de colon, estimula el sistema inmune, mejora la tolerancia a la lactosa, mejora la absorción de calcio y síntesis de vitaminas. También presentan un papel importante en el control de la presión sanguínea, así como un efecto anti-hipertensivo por la ingestión de probióticos.

En la Tabla 3, se presentan algunas cepas de bifidobacterias empleadas en aplicaciones comerciales.

Tabla 3. Algunas cepas de bifidobacterias empleadas en aplicaciones comerciales

Cepa	Fuente
<i>B. animalis ssp. lactis</i> Bb12	Chr. Hansen
<i>B. lactis</i> HOWARU TM /B1	Danisco
<i>B. lactis</i> LAFTI® B94	DSM Food Specialties
<i>B. longum</i> SBT-29281	Snow Brand Milk Products Co. Ltd
<i>B. breve</i> strain Yakult	Yakult
<i>B. lactis</i> HN019(DR10)	Fonetarra
<i>B. animalis</i> DN173010(Bioactivia)	Danone
<i>B. longum</i> BB536	Morinaga milk industry Co.Ltd.

No se cuenta con datos que evidencien que la fibra pueda afectar tanto la fermentación para la obtención del yogur, como para la producción de bacterias

ácidos lácticos, las cuales no disminuyen al adicionar fibra al yogur ni las propiedades de la fibra se ven afectadas por estas.

Antecedentes

Los efectos debido a la adición de los pro y prebióticos en las características físicas de productos lácteos se han informado por varios autores.

Shin y colaboradores, 2000, ⁽⁵⁹⁾ observaron que en leche descremada adicionada con inulina y oligosacáridos en concentraciones del 0% a 5% se incrementó el tiempo de duplicación y el crecimiento de *Bifidobacterium* spp.

Bozanić y colaboradores, 2001 ⁽⁶⁰⁾ encontraron que la firmeza de los yogurts elaborados con leche de cabra y leche de vaca, mejoraron con la adición de inulina.

Guven y colaboradores, 2005 ⁽⁶¹⁾ elaboraron un yogur libre de grasa a partir de leche descremada con la adición de 1 %, 2 % y 3 % de inulina; los resultados obtenidos demostraron que la sinéresis presente en el yogurt se incrementó con el uso de leche descremada y la adición de 2 y 3 % de inulina.

Kip y colaboradores, 2006, ⁽⁶²⁾ informaron el efecto de la adición de 2 tipos de inulina DP9 y DP23 a diferentes concentraciones (0-4%) en las propiedades sensoriales de un yogur bajo en grasa preparados a partir de leche espumosa. Los resultados obtenidos mostraron que al utilizar concentraciones de 1.5 % y 4 %, la viscosidad y la consistencia se incrementaron significativamente por la adición de inulina, presentando mejores características con una concentración del 3%, lo que contribuyó a una palatabilidad cremosa de los yogures.

Aryana y colaboradores, 2007 ⁽⁵⁸⁾ evaluaron el efecto en las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales por la utilización de inulina de cadena corta (P95), cadena media (GR) y cadena larga (HP) en una concentración de

1.5% (p/p) para la elaboración de un yogur libre de grasa inoculado con *L. acidophilus*. La cuenta de bacterias y el color se evaluaron al tiempo 1, 11 y 22 días de elaborado los productos. Los resultados obtenidos mostraron que el yogur elaborado con inulina de cadena corta (P95) presentó un pH bajo y un incremento en la sinéresis en comparación con el yogur elaborado con inulina de cadena media (GR) y cadena larga (HP). El yogur elaborado con inulina HP presentó un mejor cuerpo, sabor y textura que el resto de los yogures. La cuenta de *L. acidophilus* fue más alta en los yogures elaborados con inulina de diferentes longitudes de cadena que el yogur testigo. El uso de prebióticos no afectó el color ni la viscosidad del yogur inoculado con *L. acidophilus*.

Ruiz R JA y colaboradores, 2009 ⁽²⁴⁾ elaboraron un yogur firme en la que utilizaron los cultivos iniciadores *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* y la incorporación de cepas probióticas (*Bifidobacterium spp* y *Lactobacillus acidophilus*) y Raftiline HP (inulina de achicoria). Se elaboraron 3 formulaciones de yogur: F1= leche pasteurizada + cultivo láctico + cepas probióticas; F2= leche pasteurizada + cultivo láctico + cepas probióticas + Inulina; F3= leche pasteurizada + cultivo láctico (Control). Los resultados obtenidos mostraron que la F2 (Probióticos + Inulina) presentó un pH ligeramente superior al control el cual no fue estadísticamente diferente en cuanto a la acidez y la viscosidad; durante el almacenamiento, la adición de inulina mejoró la viscosidad del yogur además de que no se observó sinéresis en el producto.

Allgeyer L.C. y colaboradores, 2010 ⁽⁶³⁾ evaluaron 3 tipos de fibra: maíz, polidextrosa e inulina de achicoria, las cuales fueron adicionados cada una como excelente fuente de fibra (5g/porción) y como buena fuente de fibra (2.5g/porción) en una base de yogur bebible. Cada uno de los yogures contenían una mezcla de probióticos (*Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* LA-5). Se elaboró un yogur control sin fibra. Los yogures fueron evaluados por 110 consumidores en donde calificaron la aceptación en general (aroma, apariencia, sabor y textura) de cada uno de ellos. Los resultados obtenidos mostraron que los

yogures elaborados con inulina de achicoria y povidextrosa presentaron mayor preferencia que el yogur elaborado con fibra de maíz. Los yogures bebibles con pre y probióticos fueron caracterizados como productos que presentan un nivel medio de dulzura y alta viscosidad, por lo que para obtener una aceptación de este tipo de productos, los consumidores prefieren un yogur bebible de textura no tan viscosa y un sabor no tan dulce ni tan ácido.

Debido a que no existen antecedentes relacionados con el desarrollo de bebidas lácteas tipo yogur adicionada con fructanos de agave, se plantea el uso de este tipo de ingredientes funcionales de origen nacional como una opción novedosa y saludable para el consumidor.

Planteamiento de problema

Diversas enfermedades crónicas están relacionadas directamente con la nutrición y muchas de ellas podrían prevenirse con una dieta adecuada. La salud y el bienestar, se han convertido en un aspecto de gran importancia, de modo que cada vez más el consumidor actual, demanda alimentos que presenten un sabor agradable, bajos en grasa y en calorías y adicionalmente con beneficios a la salud.

El yogur es uno de los alimentos que más se utiliza como alimento funcional debido a sus beneficios naturales además de que se le pueden añadir con facilidad algún nutrimento funcional como son los prebióticos y probióticos (simbióticos), siendo una alternativa sencilla para mejorar la salud.

Actualmente, el consumo de fibra en México está por debajo de la ingesta diaria recomendada (25g) por lo que ha ocasionado mayores problemas en la salud pública, el consumo adecuado de fibra en la dieta ha demostrado la reducción del riesgo de contraer enfermedades como diabetes, cáncer, cardiovasculares, obesidad, entre otras.

Se han realizado varios estudios sobre los efectos de la inulina de achicoria, sin embargo pocos son conocidos sobre los beneficios de los fructanos de agave,

siendo estos probados in vitro, mostrando resultados superiores a las muestras utilizadas con achicoria.

Justificación

La mayoría de los consumidores, buscan alternativas más sanas para conservar o mejorar su salud. Dentro del mercado de la salud, los alimentos funcionales han experimentado un crecimiento muy importante, particularmente el mercado de productos lácteos, que es quizá, el de mayor expansión.

El yogur es uno de los alimentos que más se utiliza como funcional y al que se le pueden añadir más nutrimentos funcionales. Es un vehículo ideal para los probióticos porque contienen nutrientes importantes para que sobrevivan dichas especies, incrementa el valor terapéutico del mismo y ayuda a los consumidores a ingerir alimentos nutritivos que ofrezcan beneficios adicionales a la salud. Por otra parte, la fibra soluble aporta un valor energético bajo, lo que permite la elaboración de productos con mayor contenido de fibra y menor densidad calórica; además la fibra propicia el aumento de la microbiota intestinal benéfica.

Para este estudio, se seleccionó elaborar un yogur bebible elaborado partir de leche descremada y deslactosada como un alimento de potencial éxito por ser un producto de consumo diario en nuestra población. Para la elaboración de yogur, la adición de una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus* además de una mezcla probiótica de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium subsp. lactis* y un prebiótico como los fructanos de agave (fibra soluble) proveniente del agave Tequilana Weber variedad azul en el yogur, permitirá obtener un producto simbiótico que contenga bacterias benéficas viables y estables, con características sensoriales de sabor y acidez agradable, bajo en grasa y rico en fibra soluble, de consumo habitual en nuestra dieta.

Pregunta de investigación

¿Cuál será el efecto sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas, sensoriales y de estabilidad, de la adición de una mezcla probiótica y de fructanos provenientes del Agave tequilana Weber variedad azul, en la elaboración de un yogur bebible?

Hipótesis

Si el yogur bebible adicionado con una mezcla probiótica y fructanos provenientes del Agave tequilana Weber variedad azul, (simbiótico), entonces presentará mejores características fisicoquímicas, microbiológicas, sensoriales y de estabilidad comparado con un yogur bebible sin probióticos y sin fructanos.

Objetivos

General

Desarrollar y caracterizar un yogur bebible simbiótico, adicionado con probióticos y fructanos de Agave tequilana Weber variedad azul como sustituto de grasa.

Particulares

El yogur elaborado con fructanos de Agave tequilana Weber variedad Azul deberá presentar las siguientes características:

- Obtener al menos un contenido de fibra soluble de 5g en una porción de 110g (106 mL).
- Mantener una cuenta de bacterias probióticas mínima o al menos de 10^7 UFC/g, al término de la vida de anaquel.
- Mantener una viscosidad y un pH estable a lo largo de la vida de anaquel de 21 días a temperatura de refrigeración (4°C)
- Obtener una aceptación sensorial al menos del 70% de los sujetos consumidores de este tipo de productos.

Metodología

A) Desarrollo experimental

A1. Selección y adquisición de materias primas.

Las **materias primas** seleccionadas para la elaboración del yogur bebible, fueron: leche deslactosada light (líquida y en polvo) como materias primas principales, las cuales se adquirieron en tienda de autoservicio a un costo de \$16,50/L y \$53,00/480 g, respectivamente

Para la inoculación de la leche, se utilizó como **cultivo iniciador** la cepa comercial LYOFAST Y 150 B 10u L-C058147A "SACCO", la cual contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Dicha cepa fue donada por el empresa Raff S.A. de C.V.

La **Cepa Probiótica** utilizada fue la cepa comercial LYOFAST AB 1 10 dosis L-C058131A "SACCO" que contiene una mezcla de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, y se seleccionó por su capacidad probiótica además de que se tiene el antecedente que dichas bacterias probióticas sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal. Dicha cepa fue donada por la empresa Raff S.A. de C.V.

Los sabores fresa, pay de limón, maracuyá y piña colada, fueron seleccionados con base en las tendencias de consumo de bebidas lácteas. Dichos sabores fueron donados por la empresa de sabores Robert de México, S.A. de C.V.

Finalmente, los **fructanos** provenientes del Agave tequilana Weber variedad azul, se seleccionaron como fuente de fibra soluble (ingrediente funcional) para la elaboración del producto, ya que se tiene como antecedente que este tipo de fibras proporcionan características químicas, sensoriales, funcionales y tecnológicas, adecuadas al producto. Dicha materia prima fue donada por la Empresa Bustar Alimentos, Guadalajara, Jalisco.

A.2. Selección y elaboración de la fórmula base. Con base en la revisión bibliográfica, se seleccionó la fórmula base para la elaboración del yogur. Para la elaboración del yogur, se siguió el diagrama de proceso que se presenta en la Figura 1^a

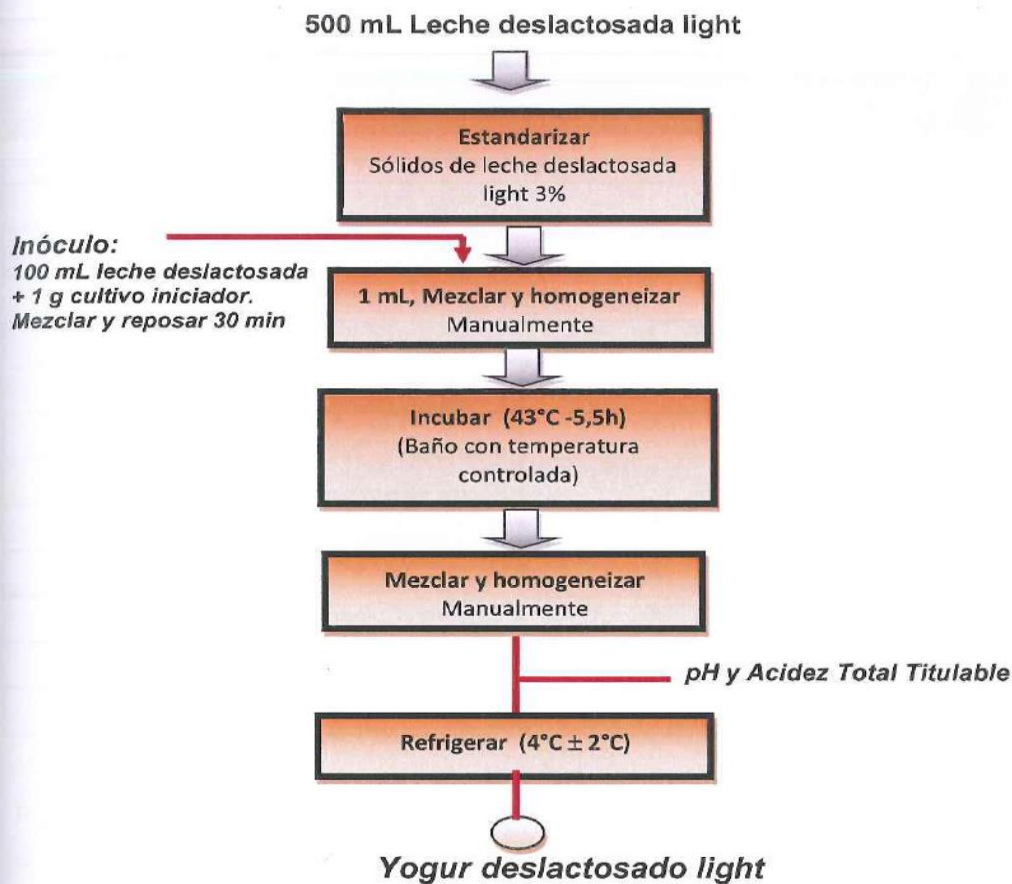


Figura 1. Proceso de Elaboración de Yogurt batido ⁽⁶⁴⁾

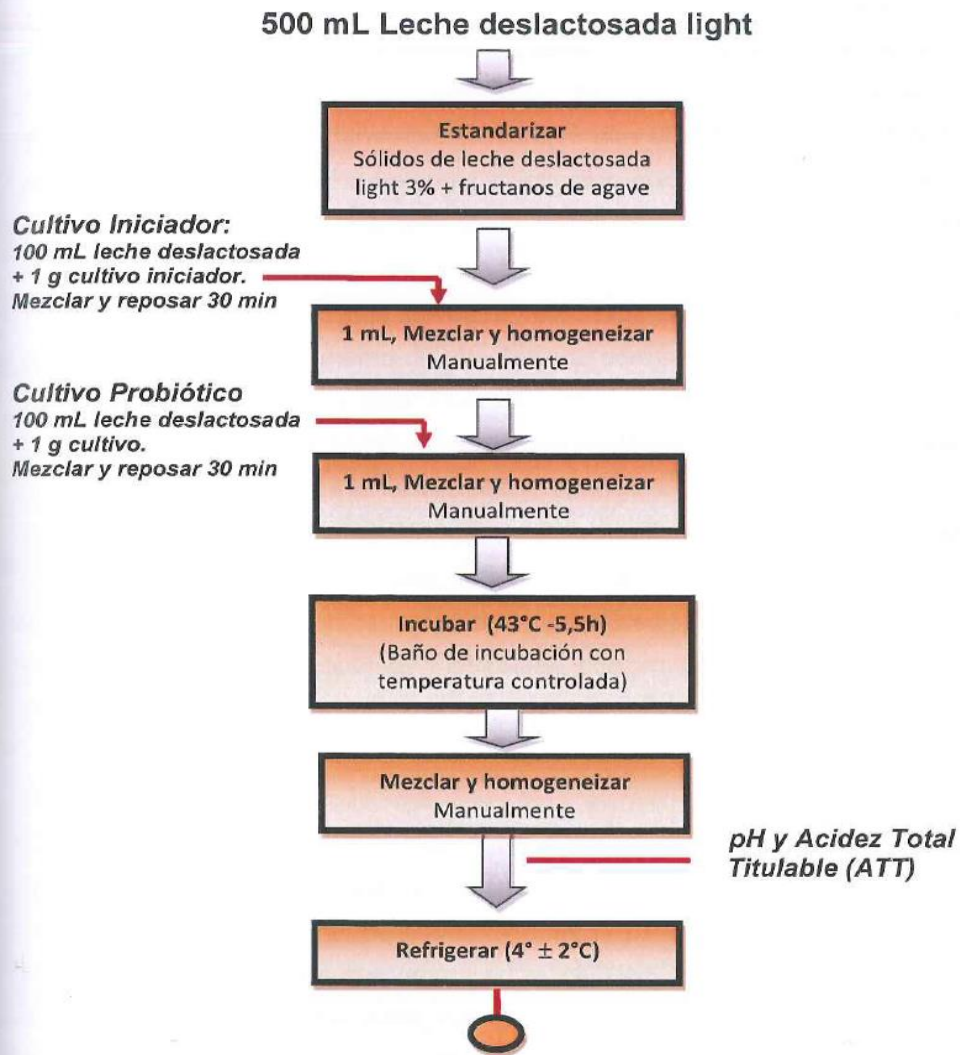
A.3. Elaboración del yogur con fibra

Se prepararon 13 diferentes formulaciones, dentro de las cuales se incluyó la formulación base y una formulación ya adicionada con fructanos de agave, sin adición de sólidos de leche; durante las fermentaciones se tomaron muestras al inicio y posteriormente cada hora y se determinó pH, acidez total titulable, volumen de suero, viscosidad y sólidos totales.

Tabla de porcentajes

Formulación	Yogur	% solidos	% fructanos de agave
1	Yogur base	3	-
2		-	3
3	Yogur natural + solidos de leche + fructanos de agave	1	3
4		1	5
5		1	7
6		2	3
7		2	5
8		2	7
9		3	3
10		3	5
11		3	7
12		5	3
13		7	5

Para la elaboración del yogur adicionado con fructanos de agave, se siguió el diagrama de proceso que se presenta en la Figura 2.



Yogur simbiótico deslactosado light

Figura 2. Elaboración del yogur simbiótico ⁽⁶⁴⁾

A.4. Evaluación de los productos

Con el objeto de conocer el intervalo de crecimiento de las bacterias ácido lácticas y las bacterias probióticas, se llevaron a cabo 3 cinéticas de fermentación, cada una de ellas por triplicado: 1. Elaboración del yogur adicionado con el cultivo iniciador; 2. Elaboración del yogur adicionado con el cultivo iniciador + el cultivo probiótico y 3. Elaboración del yogur adicionado con el cultivo iniciador + cultivo probiótico + los fructanos de agave. Se utilizaron para ello, 2 diluyentes, el primero preparado en el laboratorio de microbiología del Departamento de Ciencia y Tecnología de INCMNSZ que contiene peptona y NaCl y el segundo diluyente, preparado en el Departamento de Infectología, compuesto de KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , L-cisteína-HCl, Tween 80 y agar. Durante cada una de las cinéticas, se determinó el conteo de bacterias lácticas y el conteo de bacterias probióticas a los tiempos 0 (inicial), 3 h y al término de la fermentación, 5,5 h.

El yogur finalmente obtenido, se evaluó mediante los siguientes análisis: fisicoquímico ⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾, fibra soluble ⁽⁷⁰⁾, pH ⁽⁷¹⁾, acidez total titulable ⁽⁷²⁾, sólidos totales ⁽⁷³⁾, viscosidad ⁽⁷⁴⁾, cuenta e identificación de bacterias lácticas y probióticas, hongos filamentosos y levaduras, coliformes, *Salmonella* sp, *S. aureus* (inicio) ⁽⁷⁵⁻⁸⁰⁾.

Evaluación sensorial ⁽⁸¹⁾:

Con base en estudios de consumo de bebidas lácteas fermentadas y a las tendencias de consumo actual, se seleccionaron 4 sabores para la evaluación del yogur simbiótico: fresa, pay de limón, maracuyá y piña colada.

Participaron 40 personas que labora en el INCMNSZ, de ambos sexos, de edad entre 25-55 años, no entrenados, consumidores de este tipo de productos. Se les aplicó una prueba de Nivel de Agrado con escala hedónica de 9 puntos en donde 0 corresponde a "Disgusta Muchísimo" y 9 corresponde a "Gusta Muchísimo". A cada uno de los sujetos se les presentaron en vasos desechables, 4 muestras de yogur simbiótico con los 4 sabores seleccionados, codificados con números aleatorios, conteniendo aproximadamente 25 mL de yogur. Se le pidió a cada uno de ellos que probaran las muestras en el orden presentado y que encerraran con

un "círculo" el valor en la escala que exprese su gusto o disgusto para cada una de las muestras. Además, se les solicitó que entre muestra y muestra tomaran un poco de agua para eliminar el sabor residual de la muestra anterior.

Paralelamente, se aplicó una encuesta de frecuencia de consumo, marca y criterio de elección de compra de yogures comerciales. (Anexo 2)

Los resultados obtenidos de la evaluación se analizaron en excel a través de una prueba estadística de Análisis de Varianza, a un nivel de $p < 0,05$

A.6. Vida de anaquel

El yogur finalmente obtenido se envasó en recipientes de plástico (PET) conteniendo aproximadamente 106 mL de yogur bebible y se almacenaron bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 21 días. Durante el almacenamiento se tomaron muestras a diferentes tiempos (7, 14 y 21 días) y se le determinó pH, acidez total titulable, viscosidad, presencia o no de sinéresis, cuenta de bacterias lácticas (7, 14 y 21 días) coliformes totales, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y evaluación sensorial.

B) Métodos de ensayo

El yogur simbiótico final se sometió a los siguientes análisis:

Fisicoquímicos, por medio de los métodos de las Normas Oficiales y Normas Mexicanas, en los que se incluyen:

- Humedad ⁽⁶⁵⁾; cenizas ⁽⁶⁶⁾; proteína ⁽⁶⁷⁾; extracto etéreo ⁽⁶⁸⁾, hidratos de carbono, por diferencia y aporte calórico, por cálculo.
- Fibra soluble de acuerdo al método del AOAC 991.43, Ch.32, p7 ⁽⁷⁰⁾
- pH, por medio de la NOM-F-317-S-1978 ⁽⁷¹⁾
- Acidez total titulable, por medio de la NMX-F-716-COFOCALEC-2006 ⁽⁷²⁾
- Sólidos totales, por medio de la NMX-F-103-1982 ⁽⁷³⁾
- Viscosidad a través del manual del viscosímetro de Brookfield ⁽⁷⁴⁾
- Microbiológicos, de acuerdo a los Métodos Oficiales de la Secretaría de Salud, en los que se incluyen: Bacterias ácido lácticas ^(75, 76); hongos filamentosos y levaduras NOM-210-SSA-1-2014 ⁽⁷⁷⁾; Coliformes Totales

NOM-210-SSA-1-2014⁽⁷⁸⁾; *Salmonella* ⁽⁷⁹⁾; *Staphylococcus aureus* en alimentos ⁽⁸⁰⁾.

- Evaluación sensorial, prueba de nivel de agrado con escala hedónica de 9 puntos donde 1 corresponde a "Disgusta Mucho" y 9 a "Gusta Mucho" ⁽⁸¹⁾

Microbiológicos

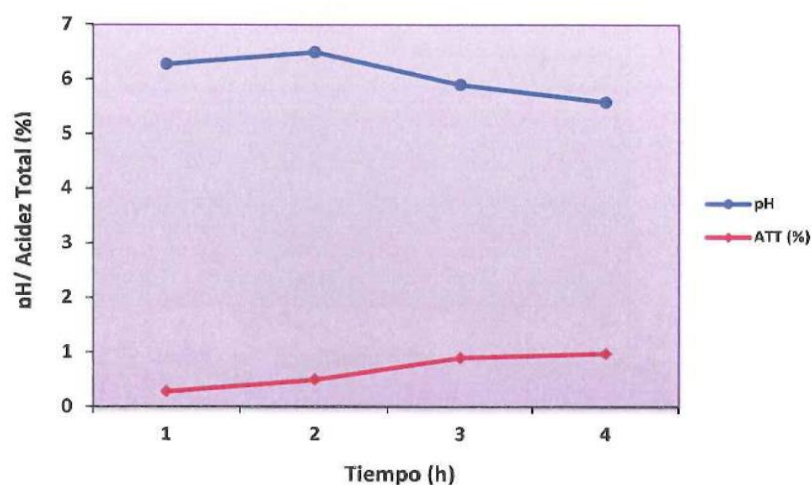
Con base en la norma oficial NOM-185 –SSA1-2002 ⁽⁸²⁾, al yogur simbiótico, se le realizaron las siguientes determinaciones microbiológicas:

- Cuenta de bacterias lácticas ^(75, 76)
- Hongos filamentosos y levaduras ⁽⁷⁷⁾
- Coliformes totales ⁽⁷⁸⁾,
- *Salmonella spp* ⁽⁷⁹⁾
- *Staphylococcus aureus* ⁽⁸⁰⁾.

Para ello, se llevó a cabo la selección y preparación de los medios de cultivo (Anexo 1)

Resultados y Discusión

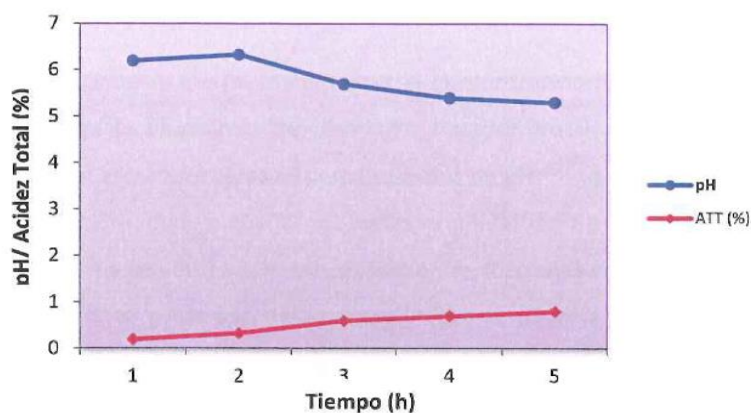
En la gráfica 1, se presentan los resultados de pH y acidez total titulable obtenidos en el yogur natural (control), enriquecido con 3% de sólidos de leche. Se observa que el yogur elaborado, cumple con las especificaciones de la Norma NOM 185⁽⁸²⁾ tanto en pH como en el porcentaje de acidez, por lo que con base en estos resultados se procedió a elaborar el yogur adicionado con diferentes concentraciones de fructanos de agave.



Gráfica 1. pH y acidez total en el yogur natural (control) con 3% de sólidos

De los resultados de pH y % de acidez obtenidos en el yogur natural adicionado con 3% de fructanos de agave comparados con el yogur natural base (gráfica 2), se observa que existe una ligera diferencia tanto en el pH como en la acidez en el yogur adicionado con fructanos de agave a las 5 horas de fermentación, obteniéndose un producto ligeramente más ácido. Esta disminución de pH puede explicarse por la adición de la inulina, en este caso fructanos de agave ya que la concentración de aminoácidos y ácidos orgánicos en el yogur pueden aumentar al aumentar la actividad y viabilidad de los probióticos por la adición de prebióticos.⁽⁸³⁾

Con respecto a la viscosidad (cuadro No. 1) se observa que el yogur natural (base) enriquecido con 3% de sólidos presentó una mayor viscosidad que el yogur adicionado con 3% de fructanos de agave, esto debido a la presencia de sólidos de leche adicionados al yogur natural no así para el yogur con fructanos, en donde la fibra de agave únicamente le proporcionó una textura ligera.



Grafica 2. pH y porcentaje de acidez total en el yogur adicionado con 3% de fructanos de agave vs yogur natural control

Cuadro No.1. Viscosidad del yogur natural (Base) adicionado con 3% de sólidos vs yogur natural (Base) 3% de fructanos de agave

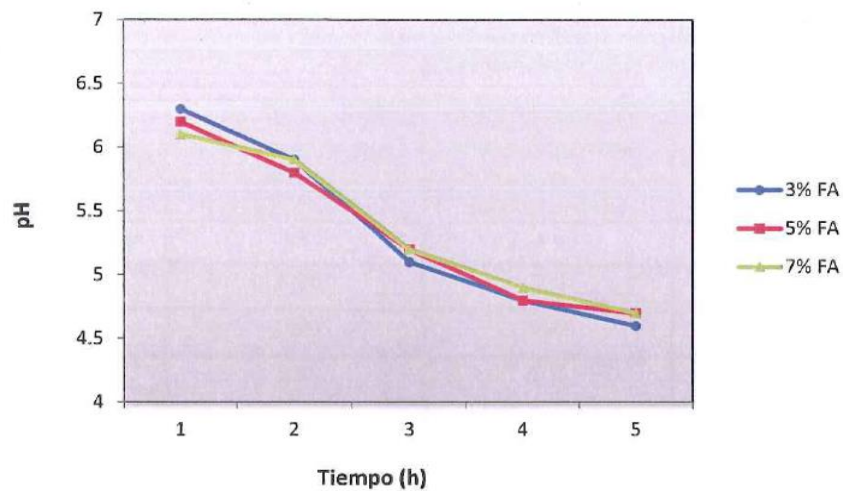
Viscosidad (cps)	Yogur natural	Yogur natural + 3% FA
rpm / Aguja	#6	#5
2	1000	2000
4	750	1000
10	2500	800
20	350	500

Con base en estos resultados se planteó elaborar el yogur adicionado con 3% 5% y 7% de fructanos de agave adicionados con diferentes porcentajes (1%, 2% Y 3%) de sólidos de leche descremada deslactosada.

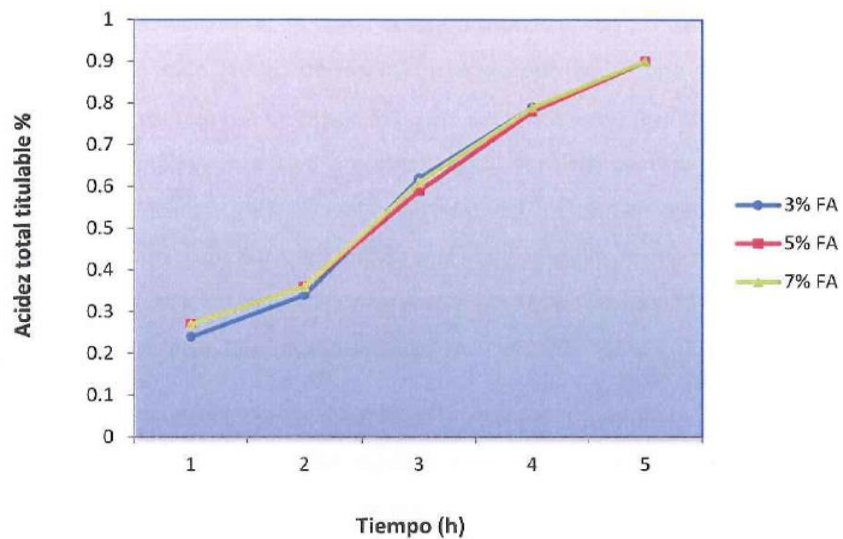
En las gráficas 3 y 4 se presentan los resultados de pH y acidez total titulable (ATT) obtenidos del **yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 1% de sólidos de leche descremada deslactosada**. Se observa que en cuanto a los valores de pH y acidez total en los yogur que contienen 3%, 5% y 7% de fructanos de agave no existen cambios importantes, comprobándose que el aumento en la concentración de fructanos de agave al yogur bajo en grasa no afecta en dichos parámetros⁽⁸⁴⁾.

Sin embargo, se observa que al incrementar la concentración de fructanos en el yogur (7%) se disminuye la viscosidad del producto (Cuadro No.2); estas variaciones en la viscosidad pueden estar asociadas a ligeros cambios de pH⁽⁸⁵⁾ ya que la viscosidad del gel disminuye a pH ácidos, dado a que las proteínas se solubilizan a pH bajos.

Así mismo, conforme se aumenta la concentración de fructanos en el yogur (cuadro No. 2) se detecta una mayor presencia de sinéresis y esto se observa claramente en el yogur adicionado con 7% de fructanos de agave. La presencia de sinéresis se debe a que se produce un engrosamiento gradual de la red de proteínas dando lugar a un aumento en el número de enlaces de las partículas, por lo cual la red se contrae y expulsa el líquido intersticial que encierra, lo que ocasiona un aumento en la sinéresis, una disminución en la permeabilidad, y una mejora en la suavidad del producto⁽⁸⁶⁾. Además un bajo contenido de grasa y un alto contenido de caseína, probablemente pueda contribuir a la presencia de este fenómeno.



Gráfica 3. pH en el yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 1% de sólidos de leche descremada deslactosada



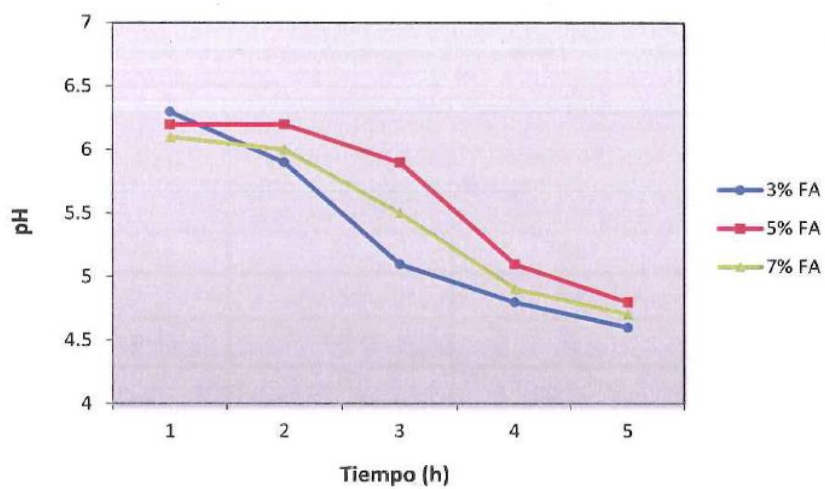
Gráfica 4. Acidez en el yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 1% de sólidos de leche descremada deslactosada

Cuadro No.2. Viscosidad y volumen de suero obtenido en el yogur natural (Base) adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 1% de sólidos de leche

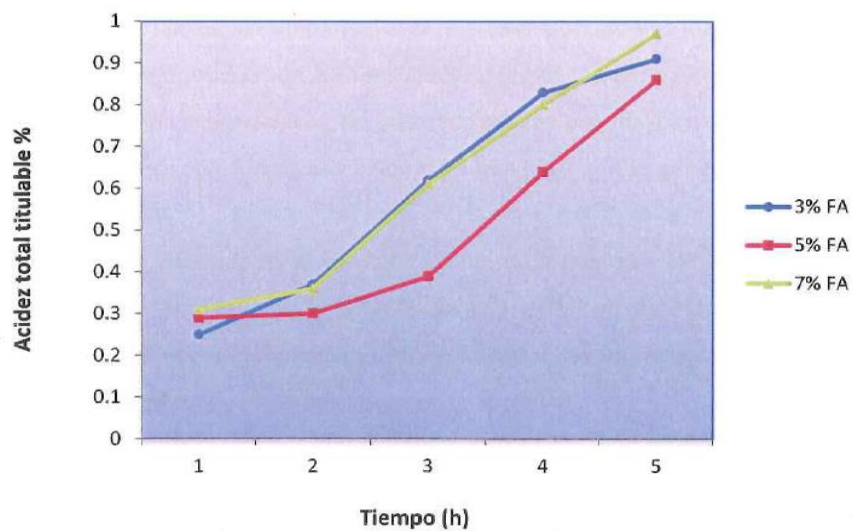
Viscosidad (cps)	Yogur Natural + 3% Fructanos de agave enriquecido con 1% sólidos de leche	Yogur Natural + 5% Fructanos de agave enriquecido con 1% sólidos de leche	Yogur Natural + 7% Fructanos de agave enriquecido con 1% sólidos de leche
rpm /Aguja	#5	#4	#3
2	2000	500	50
4	1500	500	50
10	800	300	200
20	700	200	30
Volumen de suero (mL)	44	50	67

En las gráficas 5 y 6 se presentan los resultados obtenidos del **yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave y enriquecido con 2% de sólidos de leche descremada deslactosada**. Se observa una disminución en los valores de pH, debido a la producción de ácido láctico de las bacterias, lo que causa una desestabilización de las micelas de las proteínas a un pH de 5,1 – 5,2 produciéndose una coagulación completa del gel a un pH de 4.5; en cuanto a la acidez, la cual depende del tipo de bacteria utilizada, se observa que el % de acidez fue mayor en comparación con los resultados obtenidos en el yogur adicionado con 1% de sólidos, lo cual era esperable ya que durante la fermentación cerca del 20 al 30% de la lactosa presente en la leche, se transforma en ácido láctico, lo que le proporciona un ligero sabor ácido.

Un comportamiento similar se observó en la viscosidad y volumen de suero obtenido en el yogur adicionado con 2% de sólidos de leche, en donde al incrementar la concentración de fructanos en el yogur, se apreció una disminución en la viscosidad y una mayor presencia de sinéresis en el producto. (Cuadro 3).



Gráfica 5. pH en el yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 2% de sólidos de leche descremada deslactosada



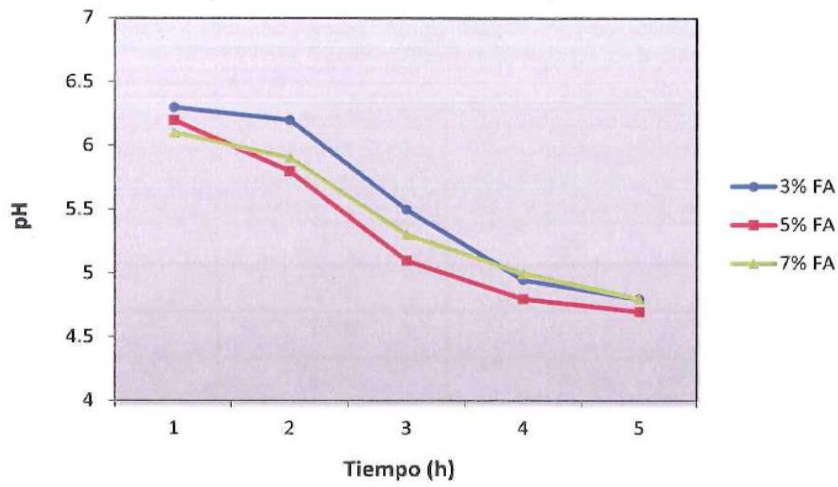
Gráfica 6. Acidez en el yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 2% de sólidos de leche descremada deslactosada

Cuadro No.3 Viscosidad y volumen de suero obtenido en el yogur natural (Base) adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 2% de sólidos de leche

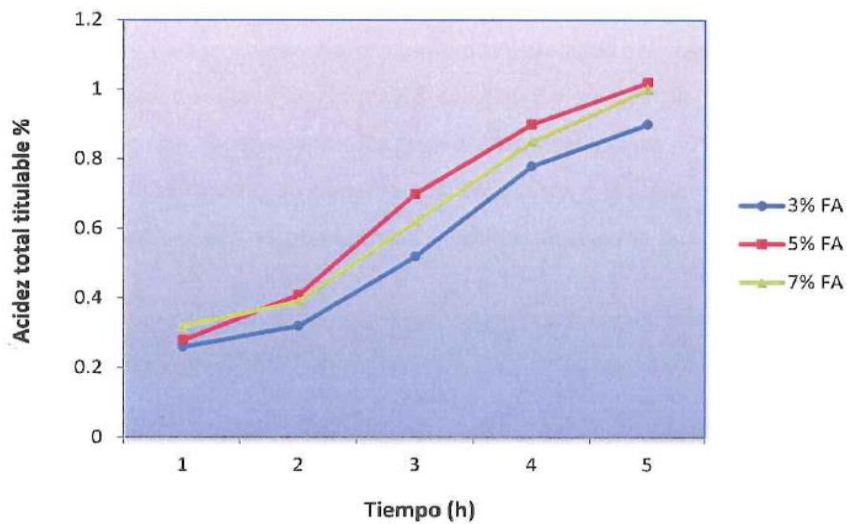
Viscosidad (cps)	Yogur Natural + 3% Fructanos de agave enriquecido con 2% Sólidos de leche	Yogur Natural + 5% Fructanos de agave enriquecido con 2% Sólidos de leche	Yogur Natural + 7% Fructanos de agave enriquecido con 2% Sólidos de leche
rpm/ Aguja	#5	#3	#2
2	1000	50	200
4	1000	50	150
10	600	150	120
20	400	30	100
Volumen de suero (mL)	32	50	69

En las gráficas 7 y 8 se presentan los resultados obtenidos del **yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche descremada deslactosada**. Se observa, que en cuanto a los valores de pH y acidez total no existen cambios importantes, sin embargo, el % de acidez obtenido es mayor en comparación de los yogures enriquecidos con 2% de sólidos. Esto nos indica que conforme se aumenta los sólidos de leche en el producto, las bacterias poseen una mayor disponibilidad de sustrato que estimulan su actividad y crecimiento, lo que hace que se genere una mayor acidez en el producto final.

En cuanto a la viscosidad y al volumen de suero obtenido en los yogur (Cuadro No. 4) se observa que, como en los resultados anteriores, al incrementar la concentración de fructanos en el yogur, se disminuye la viscosidad y hay una mayor presencia de sinéresis en el producto debido a las variaciones en la acidez.



Gráfica 7. pH en el yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche descremada deslactosada



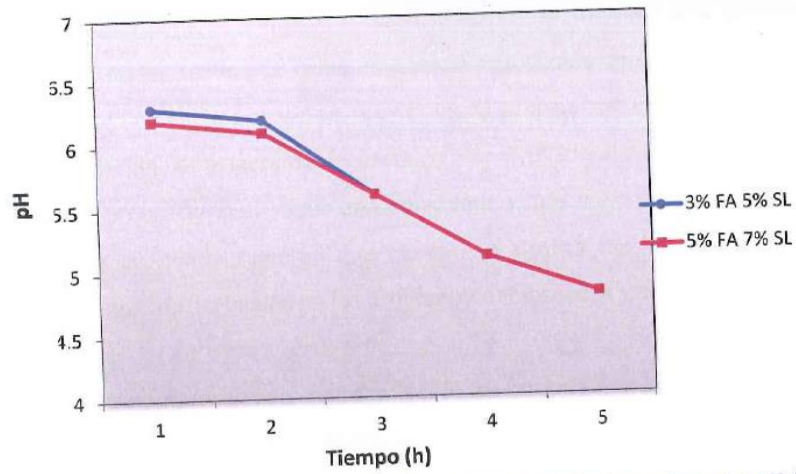
Gráfica 8. Acidez en el yogur base adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche descremada deslactosada

Cuadro No.4. Viscosidad y volumen de suero obtenido en el yogur natural (Base) adicionado con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche

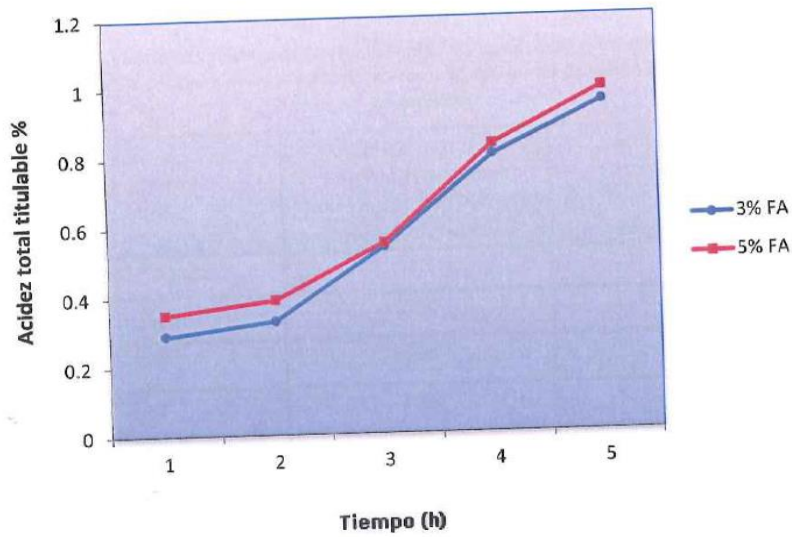
Viscosidad (cps)	Yogur Natural + 3% Fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche	Yogur Natural + 5% Fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche	Yogur Natural + 7% Fructanos de agave enriquecido con 3% de sólidos de leche
rpm / Aguja	#6	#5	#4
2	1500	1000	500
4	1000	1000	500
10	2500	600	300
20	350	400	300
Volumen de suero (mL)	15	20	40

Con base en los resultados obtenidos, particularmente de viscosidad y volumen de suero en los yogures elaborados, se propuso aumentar el porcentaje de sólidos de leche al 5% y 7% y conservar la concentración de fructanos de agave al 3 y 5%.

En las gráficas 9 y 10 se presentan los resultados obtenidos del **yogur base adicionado con 3% de fructanos de agave enriquecido con 5% de sólidos de leche** y el **yogur base adicionado con 5% de fructanos de agave enriquecido con 7% de sólidos de leche descremada deslactosada**. Se observa que en cuanto a los valores de pH y acidez total obtenidos, ambos yogur no presentaron modificación alguna que afectara el proceso de fermentación.



Gráfica 9. pH obtenidos en el yogur natural adicionado con 3% de fructanos de agave + 5% de sólidos de leche y en el yogur natural adicionado con 5% de fructanos de agave + 7% de sólidos de leche descremada deslactosada



Gráfica 10. Porcentaje de Acidez total titulable en el yogur natural adicionado con 3% de fructanos de agave + 5% de sólidos de leche y en el yogur natural adicionado con 5% de fructanos de agave + 7% de sólidos de leche descremada deslactosada

Por lo que respecta a la viscosidad (cuadro No. 5) se observa que al aumentar la concentración de los sólidos de leche así como de fructanos de agave al yogur, éstos le proporcionaron una mejor viscosidad, muy parecida al yogur natural base, favoreciéndose la formación del gel por el incremento proteico. Por otro lado el aumento en el porcentaje de fructanos, proporcionó al yogur una consistencia más cremosa, lo que coincide con otros estudios en donde sugieren que cuando se alcanza niveles superiores a 3% de fructanos, es cuando la inulina o los fructanos aportan una consistencia agradable al yogur.⁽⁸¹⁾

En relación al volumen de suero (cuadro No. 5), se observa que la sinéresis disminuyó al aumentar la concentración de los fructanos, debido a su capacidad de retención de agua además de que a esta concentración, se estabiliza la formación y mantenimiento del gel lo que proporcione una mayor consistencia al producto, afectando de manera positiva la viscosidad.⁽⁸⁷⁾

Cuadro No.5 Viscosidad y volumen de suero obtenido en el yogur natural adicionado con 3% de fructanos de agave + 5% de sólidos de leche y 5% de fructanos de agave + 7% de sólidos de leche descremada deslactosada

Viscosidad (cps)	Yogur Natural + 3% Fructanos de agave adicionado con 5% de sólidos de leche	Yogur Natural + 5% Fructanos de agave adicionado con 7% de sólidos de leche
rpm / Aguja	#6	#6
2	500	500
4	250	250
10	1000	1000
20	150	150
Volumen de suero (mL)	40	32

En el cuadro no. 6 se resumen los resultados del porcentaje de sólidos obtenidos en los diferentes yogur elaborados con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave adicionados con 1%, 2%, 3%, 5% y 7% de sólidos de leche. Se observa que el porcentaje de sólidos obtenidos en los diferentes yogur, cumplen con las especificaciones de la NOM-181-SCFI-2010 ⁽²⁾, en donde se indica que el porcentaje mínimo de sólidos totales debe de ser de 8.25%.

Con base en éstos resultados, se seleccionó el yogur natural elaborado con **leche deslactosada y descremada adicionado con 5% de fructanos de agave y 7% de sólidos de leche, para continuar con el estudio.**

Cuadro No. 6 Porcentaje de sólidos totales obtenidos en los yogur elaborados con 3%, 5% y 7% de fructanos de agave y 1%, 2%, 3%, 5% y 7% de sólidos de leche.

Yogur natural	Yogur natural + 3% FA	Yogur natural + 3% FA + 1% SL	Yogur natural + 3% FA + 2% SL	Yogur natural + 3% FA + 3% SL
8,2	8,9	9,9	10,1	11,0

↓

Yogur natural + 5% FA + 1% SL	Yogur natural + 5% FA + 2% SL	Yogur natural + 5% FA + 3% SL	Yogur natural + 7% FA + 1% SL	Yogur natural + 7% FA + 2% SL	Yogur natural + 7% FA + 3% SL	Yogur natural + 3% FA + 5% SL	Yogur natural + 5% FA + 7% SL
12	12,1	13,5	13,7	14,0	14,7	12,2	14,6

F

FA=Fructanos de Agave SL= sólidos de leche

Cinéticas de Fermentación del Cultivo Iniciador y Bacterias Probióticas: Conteo de Bacterias Lácticas y Probióticas

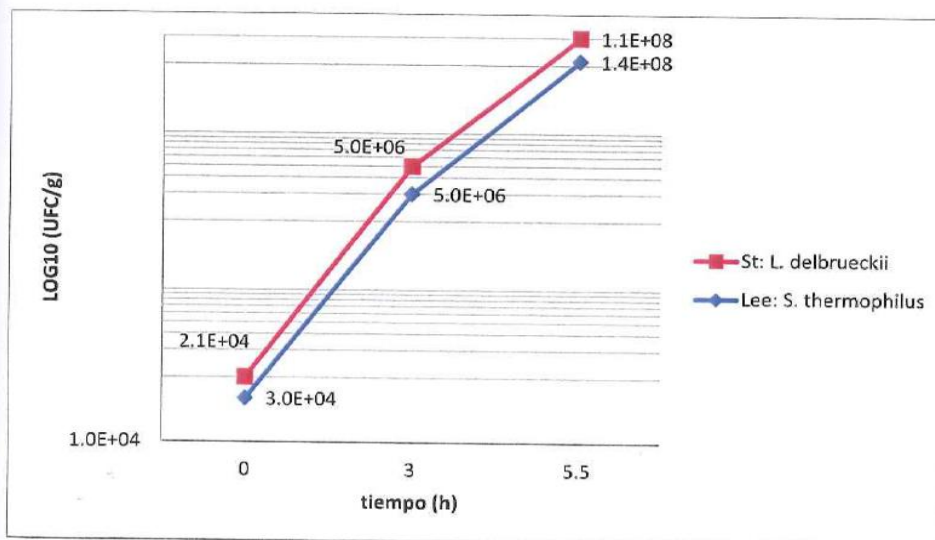
Con base en los resultados obtenidos en el yogur natural elaborado con leche deslactosada y descremada adicionado con **5% de fructanos de agave y 7% de sólidos de leche**, se llevaron a cabo 3 series de fermentaciones por triplicado, obteniéndose, el promedio en cada una de las fermentaciones.

De los resultados obtenidos de la **cinética de crecimiento del cultivo iniciador** (Cuadro 7), se observa que en el tiempo cero (basal) en el medio de cultivo Lee se tiene una cuenta bacteriana inicial de 3×10^4 UFC/g de *Streptococcus thermophilus* y en el medio de cultivo ST, de 2×10^4 UFC/g de *Lactobacilos delbrueckii subsp. bulgaricus*, obteniéndose al

final de la fermentación (5 h y media) en el medio Lee, una cuenta de bacterias de 1.4×10^8 y en el medio de cultivo ST, 1.1×10^8 UFC/g respectivamente; esto nos indica que existe un cambio sustancial de bacterias del orden de 4 logaritmos, (Gráfica No. 11), lo que corresponde de manera general, al comportamiento normal de otras leches fermentadas, que cumple con las especificaciones de la NOM 181-SCFI-2010⁽²⁾ que es el crecimiento de bacterias lácticas hasta un 10^8 al término de la fermentación.

Cuadro No. 7 Cuenta de bacterias lácticas (*L. delbrueckii* sp. *Bulgarius* y *S. thermophilus*) en el yogur base (cultivo iniciador)

Medio de cultivo	0	Tiempo (h)	5.5
Lee	3.0×10^4	5×10^6	1.4×10^8
St	2.1×10^4	5×10^6	1.1×10^8



Gráfica 11 cinética de crecimiento de las bacterias lácticas del cultivo iniciador *L. delbrueckii* subsp. *Bulgarius* y *S. thermophilus* para obtención del yogur natural

En las figuras 1, 2, 3 y 4 se presenta la morfología colonial y microscópica de las bacterias lácticas aisladas al término de la cinética de fermentación del yogur natural elaborado con el cultivo iniciador de *S.thermophilus* y *L.delbrueckii subsp. bulgaricus*.



Figura 1. Morfología colonial de *S. thermophilus* en el Agar Lee

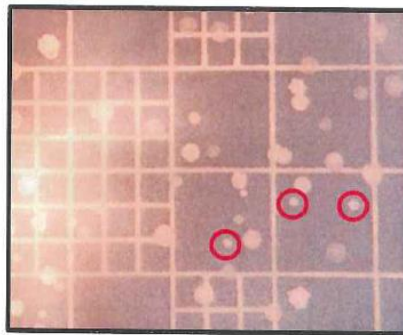


Figura 2. Morfología colonial de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* en Agar St

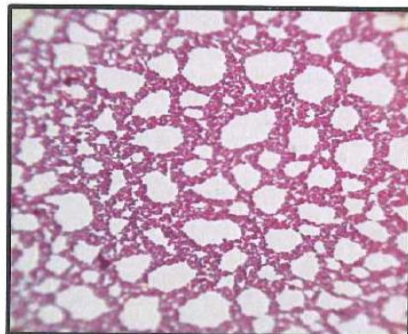


Figura 3. Morfología microscópica de *S. thermophilus*



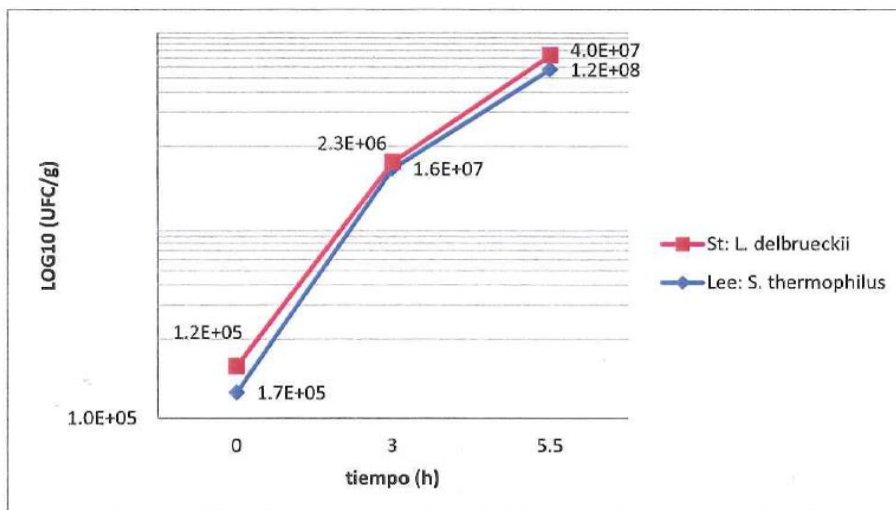
Figura 4. Morfología microscópica de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*

Los resultados obtenidos de la cinética de fermentación del yogur adicionado con el cultivo probiótico se presentan en el Cuadro 8. Para llevar a cabo esta cinética, se realizó una sustitución de la glucosa por maltosa en el medio de cultivo Lb, con el objeto de que el *L. acidophilus* fermentara la maltosa, favoreciéndose así su crecimiento, su aislamiento y por tanto el conteo bacteriano, obteniéndose al final de la fermentación una cuenta de bacterias de 4×10^5 UFC/mL, lo que representó un aumento de 1 log a las 5,5h de fermentación. Por lo que respecta al *Bifidobacterium animalis*, la adición de la dicloxacilina (antibiótico

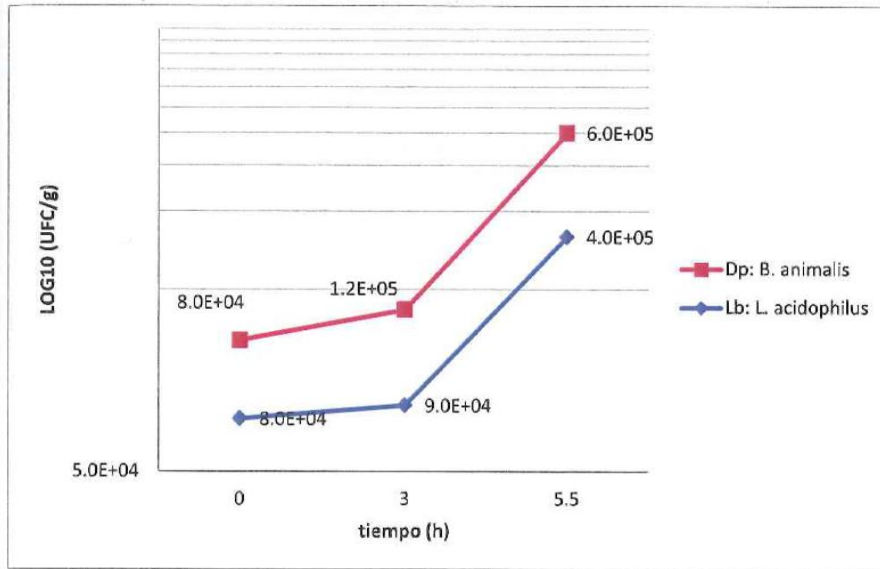
que inhibe el crecimiento del *Lactobacillus*), en el medio de cultivo DP, permitió el crecimiento, la identificación y el conteo del *B. animalis*, obteniéndose a las 3 horas de fermentación un incremento de 1 logaritmo y a las 5,5 h de fermentación una cuenta de bacterias de 6×10^5 UFC/mL., un (Gráficas No. 12 y 13).

Cuadro No. 8 Cuenta de Bacterias lácticas (*L. delbrueckii* sp. *Bulgaricus* y *S. thermophilus*) y bacterias probióticas (*L. acidophilus* y *B. animalis*) en la cinética de fermentación del yogur adicionado con el cultivo probiótico

Medio de cultivo	0	Tiempo (h)	5.5
Lee	1.7×10^5	3	1.2×10^8
St	1.2×10^5	3	4×10^7
Lb	8×10^4	3	4×10^5
Dp	8×10^4	3	6×10^5



Gráfica 12 cinética de crecimiento de las bacterias lácticas del cultivo iniciador *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* para la obtención del yogur natural



Gráfica 13 cinética de crecimiento del cultivo probiótico *L. acidophilus* y *B. animalis* para la obtención del yogur simbiótico

En las figuras 5, 6, 7 y 8 se presenta la morfología colonial y microscópica de las bacterias probióticas aisladas al término de la cinética de fermentación del yogur natural elaborado con el cultivo probiótico de *L. acidophilus* y *B. animalis*

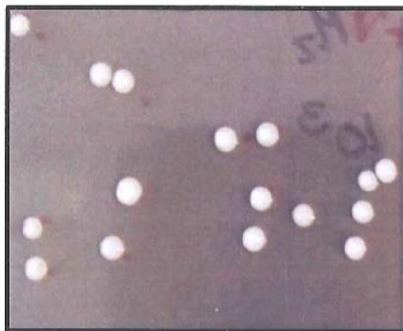


Figura 5. Morfología colonial de *B. animalis* en agar Dp

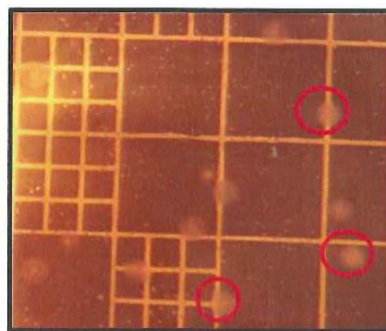


Figura 6. Morfología colonial de *L. acidophilus* en agar Lb



Figura 7. Morfología microscópica de *B. animalis*

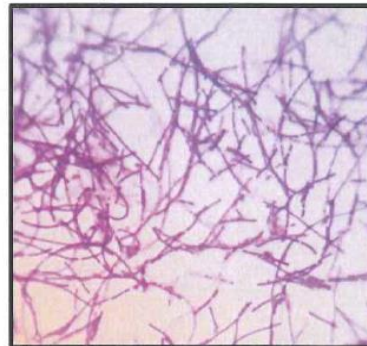


Figura 8. Morfología microscópica de *L. acidophilus*

En el Cuadro 9, se presentan los resultados obtenidos del conteo de bacterias lácticas del cultivo iniciador y de las cepas probióticas, para la obtención del yogur simbiótico (probiótico + prebiótico); se observa que en el caso del cultivo iniciador, la presencia del prebiótico no provocó cambios en el crecimiento de dichas bacterias (Gráfica No.14), sin embargo, para la cepa probiótica, se observa que al final de la fermentación se obtuvo una cuenta de *Lactobacillus acidophilus* de 4×10^5 UFC/g, y de *Bifidobacterium animalis* de 2×10^6 UFC/g.

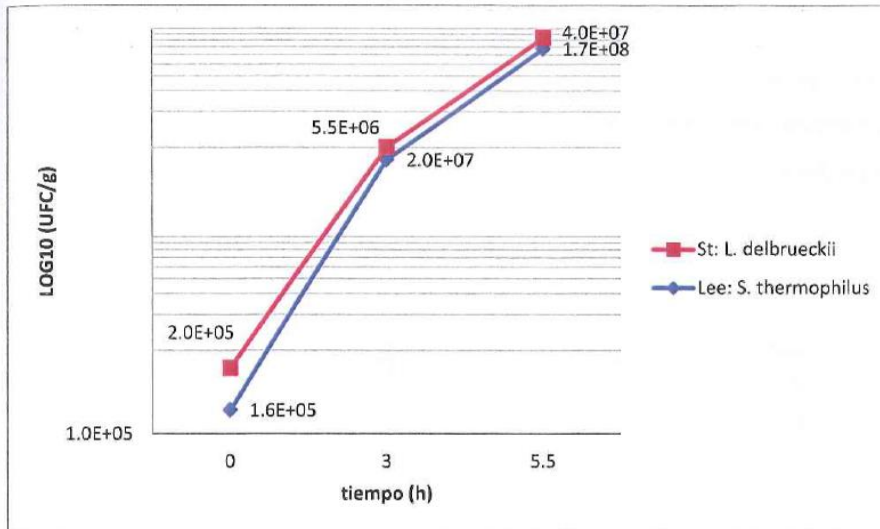
El obtener una menor concentración del *Lactobacillus acidophilus* se debe a que la molécula de lactosa fue hidrolizada por las bacterias del cultivo iniciador para la producción de glucosa y galactosa, por lo que dicho sustrato fue benéfico para el crecimiento del *Bifidobacterium animalis* ⁽⁶⁸⁾; por otro lado, la adición de los fructanos de agave al yogur resultó ser un sustrato excelente para las bifidobacterias, esto debido probablemente a que presentaron una mayor afinidad por los fructanos de bajo grado de polimerización ⁽⁸⁶⁾, lo que posiblemente influyó en su crecimiento (Gráfica No.15).

Cuadro No. 9 Cuenta de bacterias lácticas (*L. delbrueckii* sp. *Bulgarius* y *S. thermophilus*) y bacterias probióticas (*L. acidophilus* y *B. animalis*) en la cinética de fermentación para la obtención del yogur simbiótico

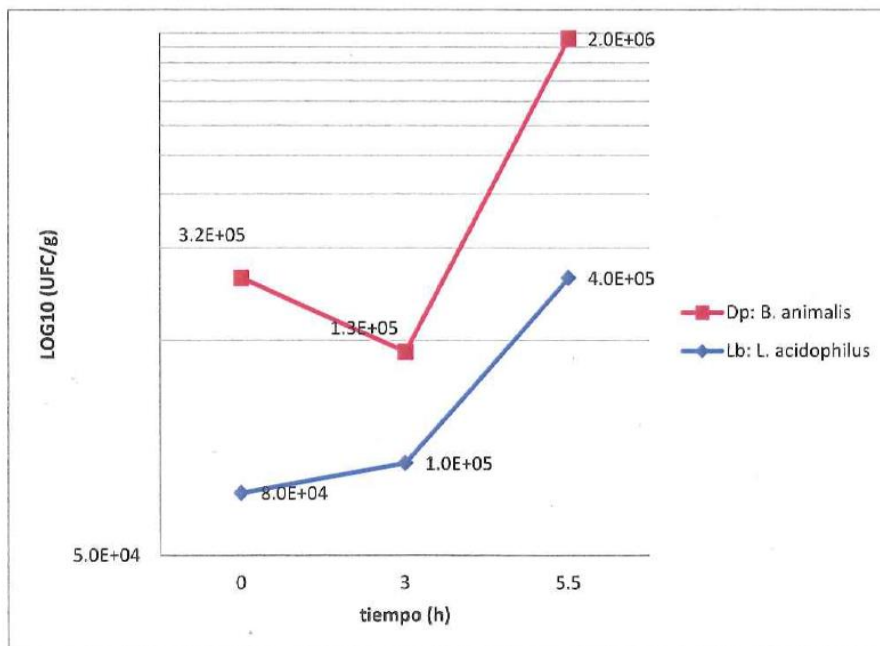
Medio de Cultivo	0	Tiempo (h)	
		3	5.5
Lee	1.6×10^5	2×10^7	1.7×10^8
St	2×10^5	5.5×10^6	4×10^7
Lb	8×10^4	1×10^5	4×10^5
Dp	3.2×10^5	1.3×10^5	2×10^6



Morfología microscópica de *B. animalis*



Grafica 14 cinética de crecimiento del cultivo probiótico *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *S. thermophilus* en el yogur adicionado con fructanos de agave, para la obtención del yogur simbiótico



Grafica 15 cinética de crecimiento del cultivo probiótico *L. acidophilus* y *B. animalis* en el yogur adicionado con fructanos de agave, para la obtención del yogur simbiótico

Análisis microbiológicos

Los resultados obtenidos del análisis microbiológico del yogur simbiótico se presentan en el Cuadro 10. Se observa que el yogur simbiótico obtenido se encuentra dentro de los límites permitidos de la NOM-243-SSA1-2010⁽⁸⁸⁾, por lo que resultó ser un producto apto para el consumo humano.

Cuadro 10. Análisis microbiológico del yogur simbiótico

Microorganismo	Yogur simbiótico	Límite máximo NOM-243-SSA1-2010
Organismos Coliformes totales	≤10 UFC/mL	≤10 UFC/g o mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤100 UFC/mL	≤100 UFC/g o mL
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25mL	Ausente en 25g o mL
<i>Mohos y levaduras</i>	≤10 UFC/mL	50 UFC/g o mL

En las figuras 9, 10, 11, 12 y 13 se presenta la morfología colonial de *E.coli*, *S.aureus* y *Salmonella thyphi*

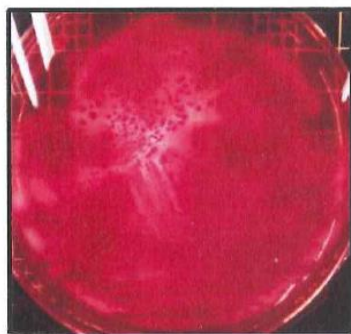


Figura 9. Morfología del testigo positivo (*Escherichia coli*) en agar bills rojo violeta

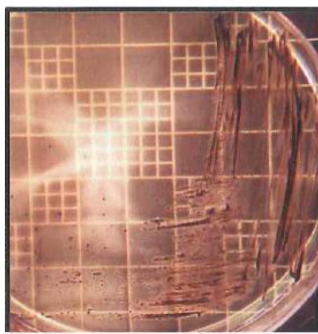


Figura 10. Morfología del testigo positivo (*Staphylococcus aureus*) en agar Baird-Parker



Figura 11. Morfología del testigo positivo (*Salmonella thyphi*) en agar XLD

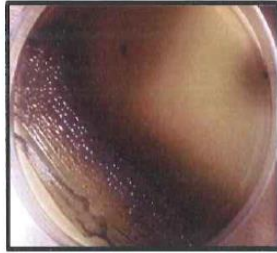


Figura 12. Morfología del testigo positivo (*Salmonella thyphi*) en agar SB



Figura 13. Morfología del testigo positivo (*Salmonella thyphi*) en agar VB

Evaluación sensorial

De los resultados obtenidos de la evaluación sensorial (Cuadro 11), se observa que los 4 sabores seleccionados se encontraron en el intervalo de "Gusta Mucho", siendo el yogur de sabor piña colada el que presentó mayor agrado.

Cuadro 11. Nivel de agrado del yogur simbiótico de sabor, piña colada, fresa, pie de limón y maracuyá

Yogur simbiótico Sabor	Media \pm DE
Piña colada	7,5 \pm 1,22
Fresa	6,8 \pm 1,51
Pie de Limón	6,7 \pm 1,82
Maracuyá	6,3 \pm 1,82



Vida de anaquel

En el cuadro 12, se presentan los resultados obtenidos del conteo de bacterias lácticas obtenidas durante la vida de anaquel del yogur simbiótico almacenado bajo condiciones de refrigeración (a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$); se observa que en el cultivo iniciador, a los 15 días de almacenamiento el *S. thermophilus* presentó una disminución en el conteo de bacterias de 1 log, no así para el *L. delbrueckii* que se mantuvo estable durante los 21 días de almacenamiento obteniéndose al final de la vida de anaquel una cuenta de bacterias de 1×10^7 UFC/mL; esta disminución en el conteo de *S. thermophilus* se debe probablemente a que el cultivo madre que se prepara para la obtención del yogur, posee una vida útil de 3 a 5 días y al no encontrar el sustrato adecuado dentro del medio, inicia su fase de muerte. De acuerdo a la NOM 181-SCFI-2010⁽²⁾, ambas bacterias lácticas se encuentran dentro del límite mínimo establecido de 10^7 UFC/mL a los 21 días de almacenamiento, lo que cumple con las especificaciones de la norma.

En cuanto al cultivo probiótico, se observa que el conteo de ambas bacterias se mantuvieron estables durante los 21 días de almacenamiento, por lo que se obtuvo al final de la vida de anaquel una cuenta de bacterias de 5×10^5 UFC/mL para el *L. acidophilus* y de 3×10^5 UFC/mL para el *B. animalis*. La estabilidad de dichas bacterias probióticas durante el almacenamiento se debe en primer lugar, a que ambas bacterias no se encuentran en las condiciones de temperatura óptimas de crecimiento y en segundo lugar, la presencia de los fructanos de agave favorecieron la protección de *B. animalis* y del *L. acidophilus* durante los 21 días de almacenamiento. Nuestros resultados coinciden con lo informado en otro estudio en donde se señala que el uso de prebióticos favorece la estabilidad de los probióticos al momento del almacenamiento.⁽⁷⁵⁾ Sin embargo, puede existir la posibilidad que después de 30 días de almacenamiento en refrigeración, la cuenta de bacterias probióticas puede llegar a disminuir debido a una pérdida en la viabilidad hasta de un 70%⁽⁷⁶⁾

De acuerdo a la NOM 181-SCFI-2010⁽²⁾, si se añade un cultivo externo al cultivo iniciador, éste debe de estar presente en una concentración mínima de 10^5 UFC/mL, por tanto,

dicha concentración resultará de la cantidad de inóculo que se adicione inicialmente a la leche ya que quedó demostrado que la estabilidad de los probióticos dependerá de la presencia de prebióticos tales como los fructanos de agave.

Cuadro No. 12. Cuenta de bacterias lácticas *L. delbrueckii* sp. *Bulgaricus* y *S. thermophilus* y bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. animalis* en el yogur simbiótico, almacenado bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), durante 21 días.

Medio de Cultivo/ (UFC/g)	Tiempo (días)				NOM 181-SCFI, 2010
	0	7	14	21	
Lee	1.5×10^8	1.2×10^8	5×10^7	4.5×10^7	Min. 10^7
St	4×10^7	2.5×10^7	2×10^7	1×10^7	Min. 10^7
Lb	6×10^5	5×10^5	5.5×10^5	5×10^5	Min. 10^6
Dp	6×10^5	4×10^5	6×10^5	3×10^5	Min. 10^6

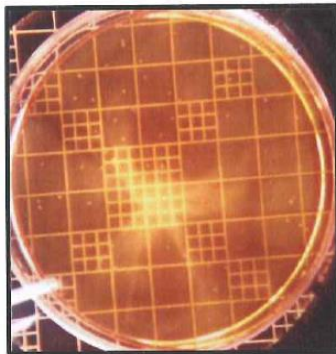
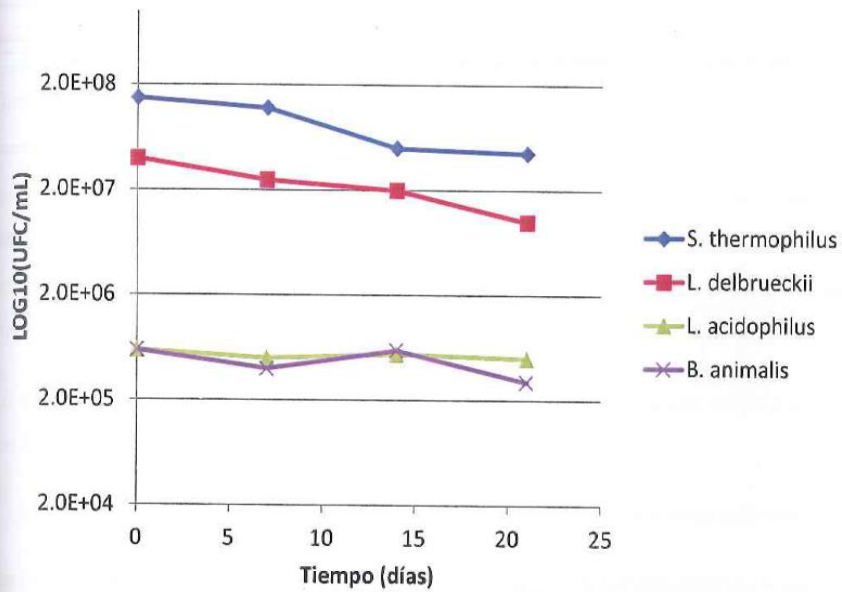


Figura 16. Morfología colonial de *L. acidophilus* en agar Lb



Figura 17. Morfología colonial de *B. animalis* en agar Dp



Grafica 16 cinética de crecimiento de bacterias lácticas *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *S. thermophilus* y bacterias probióticas *L. acidophilus* y *B. animalis* en el yogur simbiótico almacenado bajo condiciones de refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 21 días

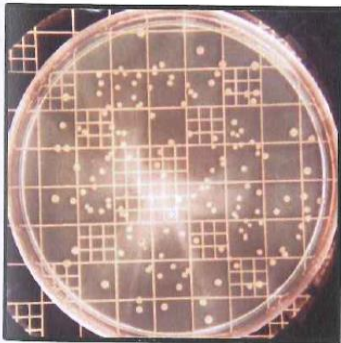


Figura 14. Morfología colonial de *L. delbrueckii* en agar St

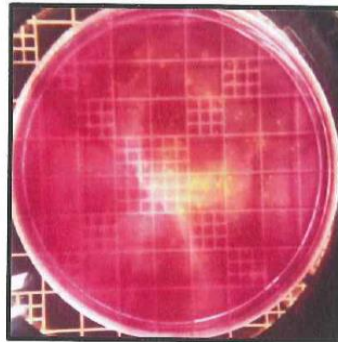


Figura 15. Morfología colonial de *S. thermophilus* en agar Lee

Análisis fisicoquímicos

En el cuadro 13 se presentan los resultados de pH y acidez total titulable del yogur simbiótico; se observa una ligera disminución en el pH y un ligero aumento en el porcentaje de acidez, debido a la presencia de los pro y prebióticos los cuales han demostrado que incrementan la concentración de ácidos orgánicos así como la proteólisis durante la fermentación, por el incremento de la actividad y viabilidad de los probióticos ⁽⁸⁹⁾. De acuerdo a la NOM 181-SCFI-2010 ⁽²⁾ los valores de pH y acidez obtenidos en el yogur simbiótico se encontraron dentro de las especificaciones de la norma.

En cuanto a la viscosidad, se observa que el yogur simbiótico se mantuvo estable durante los 21 días de almacenamiento y sin la presencia de sinéresis.

Cuadro No. 13 pH y Acidez Total Titulable del yogur simbiótico almacenado bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C} - 21$ días)

Ensayo		NOM 181-SCFI-2010
pH Inicial	4,7	4 - 5
pH Final	4,6	
ATT Inicial (%)	1,03	Min 0,5%
ATT Final (%)	1,1	
Viscosidad Inicial (cps)	1000	
Viscosidad Final (cps)	1000	

De acuerdo a la NMX-703-COFOCALEC-2004 ⁽⁹⁰⁾, en la que se menciona que para bacterias que fermentan los productos, el yogur deberá contener valores viables de la suma de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, como mínimo de 10^7 UFC/g; para el caso de productos que contienen cultivos lácticos alternativos adicionales, éstos deberán encontrarse en valores mínimos de 10^6 UFC/g y deberán permanecer viables, activos y abundantes hasta la fecha de caducidad del producto.

En el Cuadro 14 se presentan los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico del yogur simbiótico realizado en un laboratorio acreditado, a los 26 días de almacenamiento; se observa que de acuerdo a la NOM 181-SCFI-2010 ⁽²⁾, el valor de proteína debe ser como

mínimo del 2,9%, mientras que de grasa butírica, no debe exceder del 15%; en el yogur simbiótico elaborado se obtuvo valores de 4,7% y 1,9% (bajo en grasa) respectivamente, por lo que dichos valores cumplen con las especificaciones de la norma.

Con respecto a la fibra soluble, se observa que después de casi un mes de su elaboración, se obtuvo una disminución del 60% de fibra, lo cual pudo deberse a las condiciones de su análisis en el laboratorio o bien a que las bacterias probióticas (*Bifidobacterium animalis* y *Lactobacillus acidophilus*) utilizaron como sustrato a los fructanos de agave, lo que permitió que dichas bacterias se mantuvieran estables a lo largo de la vida de anaquel.

Cuadro No. 14 Análisis fisicoquímicos del yogur simbiótico almacenado bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)

YOGUR SIMBIÓTICO		REFERENCIAS
Ensayo	(g/100g)	
Humedad	86,4	NOM-116-SSA1-1994 ⁽⁶⁵⁾
Cenizas	1,4	NMX-607-NORMEX-2013 ⁽⁶⁶⁾
Grasa	1,9 1,3	NOM-086-SSA1-1994 ⁽⁹¹⁾
Proteína	4,7 3,3	METODO KJELDAHL NMX-F-608-NORMEX-2011 ⁽⁶⁷⁾
Hidratos de carbono	12,4 15,7	-
Aporte calórico	85,40 Kcal (360,55KJ)	88 Kcal -
Fibra soluble	2,0	AOAC OFFICIAL METHOD 991,43 ⁽⁷⁰⁾

Conclusiones

- Se logró elaborar un yogur bebible simbiótico adicionado de *L. acidophilus* y *B. animalis* y fructanos de agave, mediante un proceso sencillo y repetible con un nivel de agrado entre 6,5 y 7,5 (gusta mucho), para los 4 sabores evaluados.
- Se mejoraron las condiciones de proceso de homogenización del producto por la adición de los fructanos de agave, para obtener un yogur bebible simbiótico, de textura tersa, cremosa y ausencia de sinéresis.
- Las cinéticas de fermentación obtenidas para el crecimiento de las bacterias del cultivo iniciador, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus*

salivarius subsp. *thermophilus*, responden de manera general, al patrón normal de comportamiento de otras leches fermentadas.

- La cinética de fermentación de las cepas probióticas de *L. acidophilus* y *B. animalis* en presencia de fructanos de agave, evidenció las propiedades estimulantes de crecimiento y de protección para las bacterias probióticas manteniendo el número de UFC/mL durante la vida de anaquel.
- Microbiológicamente el yogur simbiótico adicionado con fructanos de agave, resultó ser un producto apto para consumo humano con una población de bacterias lácticas al final de la vida de anaquel de 10^7 UFC/mL.
- El número de bacterias probióticas al final de la vida de anaquel fue de 10^5 UFC/mL la cual se mantuvo estable durante los 21 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), comprobándose que el uso de ingredientes prebióticos constituyente un agente protector de la viabilidad de los probióticos.
- El contenido de fibra soluble presente al final de la vida de anaquel (después de 26 días de almacenamiento) fue de 2g/100, que corresponde al 40% del total de fibra adicionada al inicio.
- La disminución en el contenido de fibra se debió probablemente, a que los fructanos son el sustrato de las bacterias probióticas lo que permitió su estabilidad a lo largo de la vida de anaquel.
- Para que se produzca un efecto benéfico en la salud de los consumidores, se requerirá de un consumo de dos porciones (220 mL) al día del yogur simbiótico.

Recomendaciones:

- Se recomienda realizar una cinética de fermentación de cada uno de los probióticos utilizados con los fructanos de agave durante 24 horas, con el objeto de conocer el tiempo en el que se obtiene una concentración máxima de UFC/mL de cada una de las bacterias probióticas.

Bibliografía

1. Tendencia en Fortificación de productos lácteos. Los productos con valor añadido son los que impulsan el sector lácteo con un marcado aumento en la demanda de lo saludable y funcional. Mundo lácteo y cárnico. Alimentatec España. Julio/agosto 2007.
2. NORMA Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.
3. Rubio M V.; 2009, La fermentación: un proceso con muchos beneficios.
4. Germond, J.-E., Lapiere, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G. E. & Dellaglio, F. (2003). Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Mol Biol Evol* 20, 93–104.
5. Herve-Jimenez, L. Guillaouard I, Guedon E, Gautier C, Boudebbouze S, Hols P, Monnet V, Rul F, Maguin E. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Proteomics*. 2009; 75: 2062-73
6. Benitez AA. Cepas mexicanas para yogurt. *Tecnología de Alimentos: Industria y Mercado*, Vol. 32 (9): 36,38, octubre 1997.
7. Rivas, F P., Garro, O. Preparación de cultivos iniciadores. Optimización del sustrato de crecimiento. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006; Facultad de Agroindustrias, UNNE. Universidad Nacional del Nordeste.
8. Guerrero A, Daniza M. Producción de leche fermentada utilizando bacterias probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*) con leche de cabra y vaca. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado. Lima, Perú, 2005.
9. INEGI. Encuesta Mensual de la Industria Manufacturera del INEGI 2011.
10. Villegas de Gante A. Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Manual de Prácticas. Ed Trillas, México, 2011.
11. Mundo Lácteo y Cárnico. Julio-Agosto 2005. Pp 22-23.
12. Crovetto MM, Vio del R F. Antecedentes internacionales y nacionales de la promoción de Salud en Chile: lecciones aprendidas y proyecciones futuras. *Rev. Chil Nutr.* 2009 Mar 36 (1): 32-45
13. Informe de un Grupo de Estudios de la OMS. Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Ginebra: *Organización Mundial de la Salud. OMS*; 2003. 258p
14. Allgeyer L.C.; Miller M.J.; Lee S.Y. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics. *American Dairy Science Association*, 2010.
15. FUFOS,ILSI, Europa, 1999
16. Bourges, H., "El significado de la dieta como unidad de la alimentación", en R. Ramos Galván (ed.), *El manual moderno*, cap. 24, 1985.
17. Alvidrez MA, González MB, Jiménez SZ. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. Facultad de Salud Pública y Nutrición, 2002; 3:3 Universidad Autónoma de Nuevo León.

18. Reid G, Sanders ME, Gaskins H, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer, T. New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2003; 37(2): 105-118.
19. Iñiguez PC, Acedo FE. Mecanismos de adhesión al tracto gastrointestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*. *RESPYN* 2006; 7: 2.
20. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwen-hoek* 82:279-289
21. Figueroa I, Gómez-Ruiz L, García GM, Cruz-Guerrero A. El beneficio de los probióticos. *Ind Aliment* 2006: 22-27.
22. Ouwehand AC, Salminen SJ. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J* 1998; 8: 749-758.
23. Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol*, 2005; 99: 287-296.
24. Ruiz R J.A.; Ramírez MAO. Elaboración de yogurt con probióticos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus acidophilus*) e inulina. Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela 2009: 223-242
25. Hayes M, Coakley M, O'Sullivan L, Stanton C, Hill C, Fitzgerald GF, Murphy JJ. Cheese as a delivery vehicle for probiotics and biogenic substances. *Australian J Dairy Technol.* 2006; 61 (2): 132-141
26. Sibel AA, Fenderya S, Akulut N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology* 2004, 39, 613-621
27. Parvez S., Malik K.A., Kang S. AH; Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 2006, 1171-1185
28. Perdigon y col., 2003.
29. Samaniego F, LM, Sosa CM. *Lactobacillus spp*: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía. Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Matanzas, Cuba.
30. Villalobos, 2005.
31. Mikkil Jungersen 1,* , Anette Wind 2,†, Eric Johansen 2,†, Jeffrey E. Christensen 3,†, Birgitte Stuer-Lauridsen 2,† and Dorte Eskesen 1. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12. 2, 92-110
32. Mortensen RA, Nielsen GH. Concerted action TELENURSING. In: Henry SB, Holzemer WL, Tallberg M, Grobe SJ (eds.) Informatics: The infrastructure for quality assessment and improvement in nursing. Proceedings of the Fifth International Nursing Informatics Symposium Post-Conference. UC Nursing Press, San Francisco; 1996: 36-45
33. Naidu, A.S., Bidlack, W.R., and Clemens, R.A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 13-126
34. De Roos NM, Schouten G, Katan MB. Yoghurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:277-80

35. Link-Amster, H., Rochat, F., Saudan, K. Y., Mignot, O. and Aeschlimann, J. -M. (1994) Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 10, 55-64
36. Gibson and Roberfroid (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995 Jun;125 (6):1401-12.
37. Tungland BC. A natural prebiotic: understanding the metabolic and physiological effects of inulin. *The World of Ingredients* 1998: 38-41.
38. Broussard EK, Surawicz CM. Probiotics and prebiotics in clinical practice. *Nutr Clin Care* 2004; 7(3): 104-113.
39. Gibson G, Angus F (2000) *Ingredients Handbook. Prebiotics and Probiotics.* Inglaterra: Leatherhead Food RA Publishing. Pp. 1-18.
40. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Brit J Nutr* 2002; 87(2): S287-S291. 29
41. Orafiti®: Active Food Ingredients. Innovar con Raftiline® y Raftilose®. www.orafti.com
42. Gómez E, Tuohy K M, Gibson G R, Klinder A y Costabile A. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *J Appl Microbiol*, 2010; 108:2214-2121.
43. Materias primas y auxiliares consumidas por los establecimientos manufactureros por clase de actividad, familia y tipo de materias primas y auxiliares, INEGI, 2003.
44. Dutcosky SD, Grossmann MVE, Silva RSSF, Welsch AK. Combined sensory optimization of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments. *Food Chem*, 2006; 98: 630-638.
45. Barrios E. Tendencia "On the go". *Énfasis Alimentación* 2009; 4: 68-69.
46. Niness KR. Inulin and Oligofructose: What Are They? *J Nutr* 1999; 129: 1402S-1406S.
47. Pantanelli A. Cereales listos para desayuno. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (S.A.G.P. y A.).
48. Euromonitor, Sweet and salty snacks, 2008.
49. Gómez E, Tuohy K M, Gibson G R, Klinder A y Costabile A. In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of Agave fructans. *J Appl Microbiol*, 2010; 108:2214-2121.
50. López M, Mancilla-Margalli NA, Mendoza-Díaz G. Molecular Structures of Fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *J Agric Food Chem*. 2003; 51: 7835-7840.
51. Valenzuela-Zapata AG. Las denominaciones de origen Tequila y Mezcal y la biodiversidad en el género Agave sp.
52. López M. Fructanos y Agavinas: Estructura, función y aplicaciones. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de investigación y de Estudios avanzados del IPN Unidad Irapuato.
53. Kaur N. Gupta AK, Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition, Department of Biochemistry and Chemistry, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India, vol. 27, No. 7, December 2002
54. Quera PR, Quigley E, Madrid SAM. El rol de los prebióticos, probióticos y simbióticos en gastroenterología. *Gastroent Latinoam* 2005; 16: 218-228.

55. Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JCM, McMurdo MET, Macfarlane GT. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 28-37.
56. http://www.tradinorganic.com/pdf/Tradin_Inuline_FOS.pdf
57. Mancilla-Margalli, NA and López, M. Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasyliirion Species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006; 8.
58. Aryana K.J.; Plauche S.; Rao R.M.; McGrew P.; Shah N.P.; Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and lactobacillus acidophilus. *Food Microbiology and Safety. Journal of Food Science* vol. 72, 2007
59. Shin HS, Lee JH, Pestka JJ, Ustunol Z. Growth and viability of comercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *J. Food Sci* 2000; 65; 884-7
60. Bozanic R, Rogelj I, Tratnik, I. Fermented acidophilus goats milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. *Mijekarstvo* 2001; 56 (11):618-22.
61. Guven M, Yasar K, Karaca OB, Hayaloglu AA. The efecto inulin as a fat replacer on the quality of set type low fat yogurt manufacture. *Int J Dairy Technol* 2005; 58(3);180-4
62. Kip P, Meyer D and Jellema R. Inulins improve sensoric and textural properties of low fat yogurts. *Int. Dairy J* 2006; 16: 1098-1103.
63. Allgeyer, LC, Miller M.J., and Lee S.-Y. Drivers of Liking for Yogurt Drinks with Prebiotics and Probiotics. *Journal of Food Science*, 2010; 75(4).
64. Introducción a la tecnología de alimentos. Academia del área de plantas piloto de alimentos. Editorial Limusa. Primera reimpresión pags. 13 a 25
65. Norma Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Determinación de Humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa.
66. NMX-F-607-NORMEX-2002. Alimentos. Determinación de cenizas en alimentos. Métodos de prueba (Cancela a las NMX-F-452-1992 y NMX-F-066-S-1978). Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 03/05/02.
67. NMX-F-608-NORMEX-2002. Alimentos. Determinación de proteínas en alimentos. Método de prueba (cancela a la NMX-F-068-1980). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 03/05/02. Extracto etéreo NMX-615-NORMEX-2004
68. NMX-F-615-NORMEX-2004. Alimentos. Determinación de extracto etéreo (Método Soxhlet) en alimentos. Método de prueba (cancela a la NMX-F-089-S-1978). Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 21/05/04
69. NOM-184-SSA-1-2002. Apéndice Normativo C, inciso 1.
70. AOAC 997.08. Método de Fructanos. (Inulina y Oligofructosa)
71. NMX-F-317-S-1978 determinación de pH en alimentos
72. NMX-F-716-COFOCALEC-2006. Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos. Determinación de acidez en leche fluida, leche rehidratada y leche reconstituida- métodos de prueba.
73. NMX-F-1 03-1982. Alimentos- Frutas y derivados- determinación de grados Brix.
74. Manual del Viscosímetro de Brookfield

75. American Public Health Association. Compendium of methods for the Microbiological examination of foods. 2nd Ed (1984) Chap 16 Acid-producing microorganisms.
76. Api 50 CHL. Biomerieux Ref 50300
77. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
78. NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de coliformes totales.
79. NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
80. NOM-115-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
81. Galván R JA et al. Efecto de la adición de inulina en polvo en el nivel de agrado y viscosidad en un yogur. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto.
82. NORMA Oficial Mexicana NOM-185-SSA1-2002, Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias.
83. Hardi, J. y V. Slacanac. 2000. Examination of coagulation kinetics and rheological properties of fermented milk products: The influence of starter culture, milk fat content and addition of inulin. Mijekarstvo. 50(3):217-226.
84. Staffolo, M., N. Bertola, M. Martino y A. Bevilacqua. 2004. Influence of dietary fiber addition on sensory and rheological properties of yogurt. Int. Dairy J. 14:263-268.
85. Yuan, G. and S. -L. Wong. 1995. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* groE regulatory mutants: evidence for orf39 in the dnaK operon is a repressor gene on regulating the expression of both groE and dnaK. J. Bacteriol. 177: 6462-6468.
86. Guven, M., K. Yasar, O. Karaca y A. Hayaloglu. 2005. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. Int. J. Dairy Technol. 58(3):180-184.
87. González DOE, et al. Utilización de inulina en la formulación de un yogur descremado de leche de cabra. Mundo lácteo y cárnico, 2014; pp 11-16
88. NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
89. O.N. Donkor, S.L.I. Nilmini, P. Stolic, T. Vasiljevic, N.P. Shah Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage Int. Dairy J., 17 (2007), pp. 657-665
90. NMX-F-703-COFOCALEC-2004, Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Leche y Producto Lácteo (o Alimento Lácteo)-Fermentado o Acidificado-Denominaciones, Especificaciones y Métodos de Prueba. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de noviembre de 2004.
91. Norma Oficial Mexicana Nom-086-Ssa1-1994, Bienes Y Servicios. Alimentos Y Bebidas No Alcoholicas Con Modificaciones En Su Composicion. Especificaciones Nutrimientales.
92. Frazier W.& Westhoff D. (1994) Microbiología de los Alimentos. 4th ed. Acribia, España. 23-50

93. Beuchat L.R. & Cousin M.A. (2001) "yeasts and molds". In: Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (eds.) APHA. Washington. 209-215.
94. Vanderzant, C. and S.F. Splittstoesser (ed.) 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd. American Public Health Association, Washington, D.C.
95. Downes F.P., and Ito K., (Eds.), 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, D.C.
96. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods, Eds. C. Vanderzant and D. Splittstoesser, Third Edition, APHA., Washington, D. C. (1992)
97. Estrada A J D. Efecto de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* en las características físico-químicas y sensoriales del yogur de fresa Zamorano. Zamorano, Carrera de Agroindustria Alimentaria. Honduras, Diciembre 2007.
98. Apiweb(CD-ROM) BioMérieux. 2010
99. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwen-hoek* 82:279-289
100. González S J F. Estudio de la encapsulación de *Bifidobacterium animalis ssp. Lactis* y su uso como probiótico. Sección de estudios de posgrado e investigación en alimentos. Instituto Politécnico Nacional; Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, DF.; 2009
101. Frank, J.F., G.L., Criste, and L.B. Bullerman (G.H. Richardson, Tech. Comm.) 1993. Test for groups of microorganisms. P 271-286. In, Marshall, R.T. (ed.) Standards methods for the microbiological examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
102. Kloosterman R.E., Cullen K.D., McClatchey K.D. Comparison of Two Commercial Systems for the Rapid Identification of Streptococci (1984) ASM St. Louis C198.
103. Urias-Silvas J.E.; Cani P.D.; Delmee E.; Neyrinck A.; Lopez M.G.; Delzenne N. M.; Physiological effects of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasyilirion* spp. The Authors 2007, *British Journal of Nutrition* (2008), 99, 254-261
104. Saarela M., Mogensen G., Fonden R., Matto J. and Matilla S. T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84: 197-215.
105. Hekmat S, Reid G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standar yogurt, science direct. *Nutrition Research* 26, 2006
106. Won Min Y.; Un Park S.; Sil Jang Y.; Kim Y.; Rhee P.; Hyun Ko S.; Joo N.; Im Kim S.; Kim Ch.; Kyung Chang D. Effect of composite yogurt enriched with acacia fiber and *Bifidobacterium lactis*. *World Journal of Gastroenterology*. September 7, 2012
107. Physico-chemical properties, probiotic survivability, microstructure, and acceptability of a yogurt-like symbiotic oats- based product using pre-polymerized whey protein as a gelation agent
108. Sensory and microbiological quality of yogurt drinks with prebiotics and probiotics
109. Granata M., Brandi G.; Borsari A.; Gasbarri R.; Di Giola D.; Synbiotic yogurt consumption by healthy adults and the elderly: the fate of bifidobacteria and LGG

- probiotic stain, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, marzo 2013; 64 (2): 162-168.
110. Jungersen M, Wind A., Johansen E., Christensen J E., Stuer-Lauridsen B., Eskesen D., The science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12. *Journal microorganisms*. March 2014.
 111. Pedrero D, Pangborn RM. Evaluación Sensorial de los alimentos. Métodos Analíticos. Editorial Alambra Mexicana. Primera edición, 1989. México.
 112. Perdigon G, de Moreno de LeBlanc A, Valdez J, Rachid M. Role of yogurt in the prevention of colon cancer. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002, 56
 113. Aryana Kayanush J; McGrew Paula, Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 2007
 114. De Man JC., Rogosa M., Sharpe ME. A medium for the Cultivation of Lactobacilli (1960). *J. Appl. Bact.* 23, 130-135.
 115. Food and Drug Administration (2003). *Bacteriological Analytical Manual*. 9th ed. Arlington, VA: AOAC.
 116. Memorias del 2° simposio internacional sobre fibra dietética, fibra y salud, editorial INNSZ, pags. 15 y 61
 117. Obregón G OP. Enciclopedia de la fibra. Kelloggs, Co.pag. 83
 118. De Krause, L, Kathleen M, Escott-Stump S. Nutrición y Dietoterapia. Editorial McGraw Hill, Decima edición, pags. 722-945
 119. <http://www.acamextequila.com.mx/amt3/elagave.html>.
 120. Zacarias I, Pizarro T, Rodríguez L, González D, Domper A, Programa "5 al día" para promover el consumo de verduras y frutas en Chile. *Rev Chil Nutr.* 2006 Oct; 33 (S1): 276-280
 121. Joint FAO/WHO Working Group. Guidelines for the evaluation of Probiotics in foods. London Ontario, Canada: Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. FAO/WHO; 2002 April 30- May 1, 11p
 122. De Man JC., Rogosa M., Sharpe ME. A medium for the Cultivation of Lactobacilli (1960). *J. Appl. Bact.* 23, 130-135.
 123. Driessen F. M., Ubbels J. and Stadhouders J., 1977, *Biotechnol. Bioeng.*, 19: 821
 124. W. L. Kulp, V. White, A modified medium for plating *L. acidophilus*, *Sciencie*, 76, 17 (1932)
 125. Hartemink, R., and F. M. Rombouts. 1999. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J. Microbiol. Meth.* 36: 181-192.
 126. Gorbach, S.L. 2002. Probiotics in the third millennium. *Dig. Liver Dis.* 34 (suppl. 2): S2-S7.
 127. Beerens, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 155-157.
 128. Dave, R.I., and N.P. Shah. 1995. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 79: 1529-1536

ANEXO 1

Preparación de los Medios de Cultivo para las bacterias del Cultivo Iniciador y para la cepa probiótica de *L. acidophilus* y *B. animalis*

Análisis microbiológicos

Morfología colonial: Para la evaluación de la morfología colonial de las bacterias del cultivo iniciador y de las bacterias probióticas, se incluyeron las siguientes características:

- Tamaño (mm)
- Color
- Forma: circular, ovalada, triangular
- Elevación: plana, cóncava, convexa
- Superficie: lisa o rugosa
- Aspecto: húmedo o seco
- Borde: enteros o irregulares
- Luz reflejada: brillante o mate
- Luz transmitida: translúcida u opaca
- Consistencia: suave o dura

Coliformes totales en placa

Los coliformes totales son bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, lactosa-positivas y constituyen un grupo microbiano que se definen más por las pruebas utilizadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos; se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en un periodo no mayor a 48h y temperatura de incubación de 30-37°C. Son bacilos Gram (-), aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. El grupo coliforme está formado varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Se encuentran tanto en el intestino del hombre como el de los animales, pero también en otros ambientes como: agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc. Dentro del grupo de coliformes totales existe un subgrupo que es el de coliformes fecales, los cuales pueden fermentar la lactosa con producción de ácido y

gas en 24-48h. a temperatura de 44-45°C, en presencia de sales biliares, siendo el más significativo *Escherichia coli*.⁽⁹²⁾

Medios de cultivo para su identificación:

- Agar billis rojo violeta: este es un medio selectivo para la investigación presuntiva y recuento de coliformes en alimentos, productos lácteos, etc. En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura, aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano; las sales biliares y el cristal violeta, inhiben el desarrollo de bacterias Gram (+) y el rojo neutro, se utiliza como indicador de pH. Los coliformes fermentan la lactosa, producen ácido, lo que ocasiona que disminuya el pH del medio y cambie a rojo intenso; se produce precipitación de sales biliares, pudiendo observar colonias rojo púrpura con halo rosa (de precipitación).

Salmonella

El género pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram (-), anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, catalasa (+), oxidasa (-), suelen ser móviles; provoca una infección gastrointestinal conocida como salmonelosis (por 4-7 días) produciendo calambres abdominales, dolor de cabeza, fiebre, diarrea acuosa severa y en ocasiones náusea y vómito. Es por esto que es de suma importancia detectar la presencia de *Salmonella* en los alimentos, ya que solo puede ser ingerida mediante un alimento contaminado después de la preparación. Normalmente se encuentra en alimentos crudos como: huevo, carne, leche no pasteurizada.⁽⁹²⁾

Medios de cultivo para su identificación:

- Caldo lactosa: es un medio de pre-enriquecimiento no selectivo, no contiene inhibidores, permite recuperar células dañadas, diluye sustancias tóxicas o inhibitorias y favorece el desarrollo de todos los microorganismos presentes. El extracto de carne y la peptona son la fuente de carbono y nitrógeno.

- ❖ Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV): es un medio de enriquecimiento selectivo para *Salmonella*, contiene un sistema de buffer de fosfatos, altas concentraciones de sales de magnesio y sodio. El enriquecimiento selectivo de especies de salmonela se debe a la capacidad de estos microorganismos de sobrevivir y multiplicarse a presiones osmóticas relativamente altas (por concentraciones altas de cloruro de magnesio), a pH relativamente bajo, y porque se suprime el efecto tóxico del verde de malaquita hacia la *Salmonella* debido a la presencia de cloruro de magnesio (el verde de malaquita es inhibidor). Se esteriliza a 116°C por 15 min.
- ❖ Caldo tetrionato: utilizado para el enriquecimiento selectivo de *Salmonella*, contiene peptona que provee los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano y carbonato de calcio que neutraliza y adsorbe metabolitos tóxicos. La selectividad está dada por la presencia de sales biliares y tetrionato (compuesto generado en el medio de cultivo al reaccionar el tiosulfato de sodio con la solución yodo-yoduro) que inhiben el desarrollo de microorganismos Gram + y algunas enterobacterias. *Salmonella* contiene la enzima tetrionato reductasa y puede crecer satisfactoriamente en el medio de cultivo.
- ✓ Medio selectivo y diferencial: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD): se utiliza para aislar y diferenciar patógenos entéricos, especialmente *Salmonella* y *Shigella*. El pH final del medio debe ser de 7.5, sin necesidad de esterilizar por autoclave; el desoxicolato de sodio inhibe el crecimiento de bacterias Gram (+); posee xilosa, sacarosa, lactosa, lisina y rojo de fenol como indicador. La xilosa no es fermentada por *Shigella*, la lisina es el sistema indicador de *Salmonella* (consume inicialmente a la xilosa, obteniéndose un medio amarillo por producción de ácido, después descarboxila la lisina regresando el pH a alcalino y produciendo colonias rojas o

rosas) si hay presencia de H_2S , se produce una reacción del tiosulfato de sodio y citrato de amonio, obteniéndose sulfuro de hierro formando colonias con centro negro.

- Morfología colonial característica de *Salmonella*
 - Tamaño: 1 mm
 - Color: rojo con centro negro
 - Forma: circular
 - Elevación: plana
 - Superficie: lisa
 - Aspecto: húmedo
 - Borde: enteros
 - Luz reflejada: brillante
 - Luz transmitida: translúcida
 - Consistencia: suave

- ✓ Medio selectivo y diferencial: Agar Sulfito de Bismuto (SB): es un medio enriquecido y selectivo para el aislamiento de *Salmonella typhi* y otros bacilos entéricos. No se esteriliza por autoclave, el pH final del medio debe ser de 7.5, se debe agitar para dispersar el precipitado antes de vaciarlo en cajas Petri, contiene peptonas, extracto de carne y dextrosa, sulfito ferroso que indica la presencia de H_2S . El bismuto inhibe el crecimiento de bacterias Gram +; se observa en el medio colonias negras o verdes y pueden estar rodeadas por una zona negra o café oscuro con brillo metálico verde

- Morfología colonial característica de *Salmonella*
 - Tamaño: 2 mm
 - Color: negras con brillo metálico y halo café
 - Forma: circular
 - Elevación: plana
 - Superficie: lisa
 - Aspecto: húmedo
 - Bordes: enteros

- Luz reflejada: brillante
 - Luz transmitida: traslucido
 - Consistencia: suave
- ✓ Medio selectivo y diferencial: Agar Verde Brillante (VB): el medio de cultivo verde brillante inhibe a las bacterias Gram (+), y a la mayoría de Gram (-) (bacilos); el rojo de fenol es un indicador de pH que cambia a amarillo por el ácido producido en la fermentación de lactosa y sacarosa. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 min.
- Morfología colonial característica de *Salmonella*
 - Tamaño: 2 mm
 - Color: rosa
 - Forma: circular
 - Elevación: plana
 - Superficie: rugosa
 - Aspecto: húmedo
 - Borde: irregulares
 - Luz reflejada: brillante
 - Luz transmitida: traslucido
 - Consistencia: suave
 - Bioquímica preliminar: Agar Lisina Hierro (LIA): se usa para diferenciación de organismos entéricos basada en su capacidad para descarboxilar o desaminar la lisina y producción de H₂S. Indicador púrpura de bromocresol. El pH final del medio debe ser de 6.7, se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 min. Para la descarboxilación, es necesario un medio ambiente ácido y la presencia del sustrato específico; se observa cuando existe descarboxilación de la lisina en el fondo y la estría púrpura y el fondo negro (producción de H₂S).
 - Bioquímica preliminar: Triple Azúcar Hierro (TSI): diferenciación de bacilos entéricos Gram (-) por

fermentación de hidratos de carbono con o sin producción de gas y H_2S ; el pH final del medio debe ser de 7.3 y esterilizar en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min. Indicador rojo de fenol. Fermentación de glucosa solamente: se observa superficie alcalina (roja) y el fondo ácido (amarillo) cuando la glucosa se termina; y al no ser capaz el microorganismo de metabolizar la lactosa o la sacarosa, empieza a catabolizar las peptonas produciendo amonio generando pH alcalino en la superficie y el fondo ácido. Fermentación de lactosa y/o sacarosa y glucosa: reacción acida en todo el tubo, superficie y fondo. No fermentación de lactosa, sacarosa y glucosa: pueden utilizar las peptonas del medio resultando el medio todo alcalino o superficie alcalina sin cambio en el fondo. Producción de ácido sulfhídrico: capaces de liberar el azufre de los aminoácidos azufrados, se produce un precipitado de sulfuro ferroso de color negro.

- Bioquímica completa: Api 20E: es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram (-), consta de 21 test bioquímicos estandarizados y miniaturizados, y una base de datos. La presencia de enzimas y/o productos metabólicos generados durante el periodo de incubación reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o al agregar algún reactivo para su revelado. La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, esta se lleva a cabo mediante la

comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra la carta de colores. Los resultados se obtienen con el programa api web.⁽⁹³⁾

Staphylococcus aureus

Es una bacteria anaerobia facultativa, Gram (+), productora de coagulasa y catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), inmóvil, no esporulada, no posee cápsula; contiene 32 especies, de las cuales 16 de ellas se localizan en los humanos, algunas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran solo entre la biota de otros mamíferos y aves. Es una bacteria patógena ya que produce una toxina que es resistente al calor. La principal fuente de contaminación de los alimentos es el humano y los animales; el humano al estar infectado o ser portador, lo transmite a los alimentos durante su elaboración; su importancia es que es un microorganismo capaz de producir toxinas que al ingerirse causa la intoxicación alimentaria más frecuente a nivel mundial.

- Agar de Baird-Parker: es un medio parcialmente selectivo, diferencial y de pre-enriquecimiento que utiliza la capacidad de los estafilococos de reducir el telurito de potasio y detectar la lecitinasa a partir de la lecitina de huevo, contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento. La glicina, el cloruro de litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La base del medio se esteriliza a 121°C por 15 min. Al llegar a una temperatura de 40°C se agrega la emulsión de huevo; la yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y la actividad de lipasa. Se obtienen colonias gris oscuro o negras (reducción de telurito), circulares, brillantes, convexas, lisas, zona opaca y halo claro (lecitinasa y lipasa).

✓ Morfología colonial característica de *Staphylococcus aureus*

- Tamaño: 2 mm
- Color: negra halo claro
- Forma: circular
- Elevación: convexa
- Superficie: lisa
- Aspecto: húmedo
- Borde: enteros
- Luz reflejada: brillante
- Luz transmitida: opaca
- Consistencia: suave

❖ Caldo BHI: Sus siglas significan Brain, Heart Infusion, es un medio de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de organismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos. La infusión de cerebro-corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Las peptonas y la infusión son fuentes de nitrógeno orgánico, carbono, azufre, vitaminas. Se utiliza para microorganismos selectivos y no selectivos, incluidas las bacterias aeróbicas y anaeróbicas.

- ✓ Prueba de identificación: Coagulasa: es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina. *S. aureus* produce formas de coagulasa. Se toman 0.2 mL del cultivo BHI, se le agrega 0.2 mL de plasma de conejo y solución salina estéril, se incuba a baño maría a 35°C, después de 6h. observar formación de coagulo.
- ✓ Prueba de identificación: Termonucleasa: es una encima que hidroliza el DNA. El color de la reacción está basado en las propiedades metacromáticas del azul de toluidina O. Cuando la termonucleasa hidroliza el DNA el color del agar cambia de azul a rosado debido al indicador azul de toluidina. Se debe calentar el resto del cultivo BHI en baño de agua hirviendo, se deja enfriar y se

agrega una gota a un orificio del agar azul toluidina, se incuba a 35°C en cámara húmeda de 4 a 24h. La aparición de un halo rosa extendido de 1 mm alrededor de la perforación indica la hidrólisis del DNA.

Hongos y levaduras

Se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como biota normal de un alimento, o como contaminante en equipos mal sanitizados. Son causantes de la descomposición de los alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras, se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable (bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales e hidratos de carbono, baja temperatura de almacenamiento, presencia de antibióticos, etc.), por lo tanto puede ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales, cajetas, mermeladas, etc. Es importante detectar la presencia de hongos y levaduras ya que, además de que causan deterioro del alimento, también sintetizan metabolitos tóxicos (micotoxinas) y tienen la habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Crecen a una humedad mayor de 20%, pueden considerarse mesófilos porque crecen a temperaturas de 25-30°C, son aerobios, crecen en un amplio intervalo de pH (entre 2 y 8.5) aunque crecen mejor a pH ácido. Los hongos son filamentosos, las levaduras son unicelulares, ovoide o esteroide; necesitan mayor humedad que los hongos para crecer (A_a 0.88 a 0.94).^(94, 95)

Medios de cultivo para su identificación:

- Agar papa dextrosa: es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos; puede ser suplementado con antibióticos o ácidos para inhibir el crecimiento bacteriano; la base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación. La infusión de papa promueve un crecimiento abundante de los hongos y levaduras. El pH final del medio debe ser de 3.5 con ácido tartárico al 10% el tiempo de incubación es de 25°C por 5 días; después de la

incubación se seleccionan las cajas con 10 - 150 colonias, las levaduras se observan como colonias de color crema o blanco de formas geométricas y consistencia suave. Los hongos crecen como colonias difusas, filamentosas o con aspecto de polvo y de varios colores.⁽⁹⁶⁾

Bacterias lácticas

Es un grupo heterogéneo de bacterias Gram (+) no esporuladas que tienen en común la capacidad de producir ácido láctico por fermentación de hidratos de carbono. Son microorganismos con una limitada capacidad biosintética, por lo tanto requieren factores de crecimiento complejos como vitaminas del grupo B, purinas, pirimidinas y aminoácidos. Son inmóviles, poseen gran tolerancia a la acidez.

- Agar Lee: este medio de cultivo es utilizado para la cuantificación de las bacterias iniciadoras del yogur (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) contiene fosfato de potasio, extracto de levadura, triptona, agar, sacarosa, carbonato de calcio y lactosa. El *Streptococcus* fermenta la sacarosa, por eso la colonia es de color amarilla, porque el medio se vuelve más ácido, y el *Lactobacillus* fermenta solo lactosa, y genera colonias de color blanco. La triptona y el extracto de levadura proveen nitrógeno, lactosa y sacarosa, los cuales son los hidratos de carbono fermentables; el carbonato de calcio junto con el fosfato de potasio son agregados como buffer para evitar que el pH disminuya drásticamente, por la formación de ácido láctico; el púrpura de bromocresol es el indicador. Después de esterilizar, se agrega el púrpura de bromocresol estéril con agitación. El pH final del medio debe de ser 7.0⁽⁹⁷⁾

Este medio se prepara a partir de sus ingredientes y su formulación es:

• Triptona	10 g
• Extracto de levadura	10 g
• Lactosa	5 g
• Sacarosa	5 g
• Carbonato de calcio	3 g
• Fosfato de potasio	0,5 g
• Purpura de bromocresol	10 mL
• Agar	18 g
• Agua desionizada	1000 mL

En este medio se logra aislar solamente al *Streptococcus thermophilus sp. bulgaricus*, a continuación se presenta la descripción de su morfología:

Morfología colonial *Streptococcus thermophilus sp. bulgaricus*

- ✓ Tamaño: 2 mm
- ✓ Color: amarillo
- ✓ Forma: circular
- ✓ Elevación: plana
- ✓ Superficie: lisa
- ✓ Aspecto: húmedo
- ✓ Borde: entero
- ✓ Luz reflejada: brillante
- ✓ Luz transmitida: opaca
- ✓ Consistencia: suave

Las colonias desarrolladas en el agar Lee se identifican microscópicamente con la tinción de Gram y la identificación bioquímica con las tiras de api 50CHL.

- ❖ Tinción de Gram: la identificación bacteriana se puede realizar con la tinción de Gram, las bacterias pueden ser Gram (+) y Gram (-). Los pasos a realizar en una tinción Gram son: preparar un frotis, fijar con calor, teñir con cristal violeta (1min); solución de lugol (1min.) y se forma el complejo CV-I. alcohol-cetona, (15 seg.), se deshidratan las paredes celulares,

disminuye la permeabilidad: Gram (+) se mantiene el complejo CV-I, siguen violetas; las Gram (-) se separa el complejo; por último la safranina (1min.), en donde las células no decoloradas siguen siendo violetas Gram (+) y las decoloradas se tiñen de color rosado.

❖ Aislamiento: resiembra en el medio Lee

- ✓ Api 50CHL: es una galería de investigación que permite el estudio del metabolismo de 49 hidratos de carbono estandarizados y miniaturizados, en donde se identifican las bacterias del género *Lactobacillus*. Cada bacteria tiene un código específico para su identificación de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas.⁽⁹⁸⁾
- ✓ Api 20Strep: es un sistema estandarizado que asocia 20 ensayos bioquímicos de un gran poder discriminante. Permite realizar un diagnóstico de grupo o por especie, de la mayoría de los estreptococos y enterococos. Cada bacteria presenta un código específico para su identificación de acuerdo a los resultados de las pruebas bioquímicas.⁽⁹⁸⁾

- Lb: Es un medio parcialmente selectivo para el aislamiento y recuento de lactobacilos a partir de alimentos y biota intestinal. Este medio se utiliza para la identificación de *L. bulgaricus*; sin embargo, se realizó una modificación en la fórmula original, en el que se sustituyó la glucosa por la maltosa, hidrato de carbono que es fermentado por *L. acidophilus* y no por *L. bulgaricus*, para facilitar el aislamiento de *L. acidophilus*. Se adicionó también a la fórmula, el rojo de fenol para visualizar el vire del medio, al hidrolizarse la maltosa. La triptona, el extracto de levadura y de carne proporcionan el nitrógeno, carbono y otros compuestos como la vitamina B₁₂. El Tween 80, provee los ácidos grasos necesarios para el metabolismo del *Lactobacillus*. Finalmente, el jugo de tomate provee un medio ácido para la bacteria^(99, 100).

Este medio se prepara a partir de sus ingredientes y su fórmula es:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de carne	10 g
maltosa	20 g
Fosfato dipotasico	2 g
Jugo de tomate filtrado	40 mL
Tween 80	1 g
Buffer de acetato	80 mL
Agar	20 g
Agua desionizada	780 mL

Después de calentar para la disolución de los ingredientes, se ajusta el pH a 6.8 y se agregan 80 mL de buffer de acetato (113,55 g de acetato de sodio y 9,90 g de ácido acético/L). Se esteriliza a 121°C por 15 min.

Morfología colonial *Lactobacillus acidophilus*

- ✓ Tamaño: 2 mm
- ✓ Color: blanca
- ✓ Forma: circular
- ✓ Elevación: plana
- ✓ Superficie: rugosa
- ✓ Aspecto: seco
- ✓ Borde: irregular
- ✓ Luz reflejada: mate
- ✓ Luz transmitida: opaca
- ✓ Consistencia: suave

- ST: este medio se utiliza para la identificación *S. thermophilus* y de *L. bulgaricus* en productos lácteos como yogur. Se basa en la formulación original del medio Lee, sin embargo, en este medio, únicamente se logró aislar al *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus*. El extracto de levadura y la caseína proporcionan el nitrógeno, el

fosfato dipotásico previene el desbalance de pH en el medio. El pH final del medio es de 6.8; se esteriliza a 121°C por 15 min. El color del medio va de un tono crema a un color amarillo.^(101, 102)

Este medio se prepara a partir de sus ingredientes y su fórmula es:

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	10 g
Fosfato dipotasico	2 g
Agar	15 g
Agua desionizada	1000 mL

Morfología colonial *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus*

- ✓ Tamaño: 1 mm
- ✓ Color: blanca
- ✓ Forma: circular
- ✓ Elevación: convexa
- ✓ Superficie: lisa
- ✓ Aspecto: humeda
- ✓ Borde: entero
- ✓ Luz reflejada: brillante
- ✓ Luz transmitida: opaca
- ✓ Consistencia: suave

- DP: es un medio utilizado para el aislamiento de Bifidobacterias. Su base es el agar Columbia, suplementado con ácido propiónico, a un pH de 5. Se ha demostrado que el ácido propiónico inhibe los hongos y muchas bacterias diferentes de las Bifidobacterias. El pH bajo del medio contribuye adicionalmente a la inhibición de otros organismos. La cisteína es un agente reductor^(26, 27, 28). Para la preparación de este medio, se realizó una modificación en la formulación en la que se utilizó un antibiótico (dicloxacilina) para la inhibición del *Lactobacillus*.

Este medio se prepara a partir de sus ingredientes y su fórmula es:

Agar Columbia	42 g
Glucosa	5 g
Clorhidrato de cisteína	0.5 g
Ácido propiónico	5 mL
Dicloxacilina al 0.2%	1 mL
Agua desionizada	1000 mL

Se adiciona el agar Columbia y el clorhidrato de cisteína en 1 L de agua desionizada y se esteriliza por 18 min. Al enfriarse se adiciona en condiciones estériles, el ácido propiónico, la solución de dicloxacilina y la glucosa; posteriormente se ajusta el pH a 6.8.

Morfología colonial *Bifidobacterium animalis sp. lactis*

- ✓ Tamaño: 2 mm
- ✓ Color: blanca
- ✓ Forma: circular
- ✓ Elevación: convexa
- ✓ Superficie: lisa
- ✓ Aspecto: húmedo
- ✓ Borde: entero
- ✓ Luz reflejada: brillante
- ✓ Luz transmitida: opaca
- ✓ Consistencia: suave

ANEXO 2

EVALUACIÓN SENSORIAL DE YOGUR

SEXO: _____

EDAD: _____

FECHA: _____

Por favor, conteste las siguientes preguntas, seleccionando su respuesta:

1. ¿Qué tan frecuentemente consume yogur?

- a) 5 veces a la semana b) una vez a la semana c) Una vez cada 15 días d) Ninguna

2. ¿Qué marca de yogur consume?

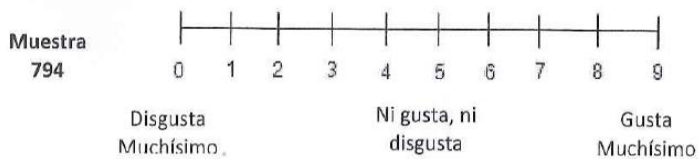
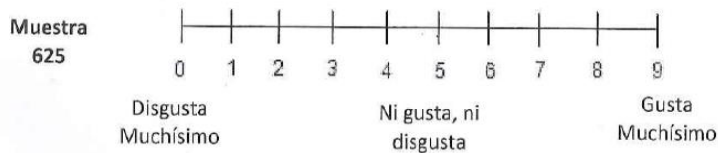
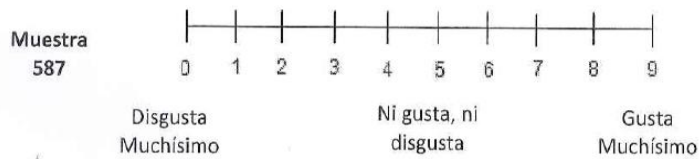
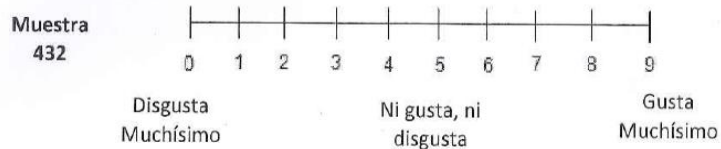
- a) Danone b) Alpura c) Lala d) Yoplait e) otros _____

3. ¿En qué basa su criterio de elección de compra de yogur?

- a) Sabor b) Contenido calórico c) Marca d) Precio e) otros _____

4. A continuación se le presentan 4 muestras; pruébelas en el orden que a continuación se le presentan y encierre en un "círculo" el número de la escala que exprese su gusto o disgusto para cada una de ellas.

¡MUCHAS GRACIAS!



Observaciones o Comentarios:
