



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FUNCIONAL TIPO
YOGURT A PARTIR DE ACEITES VEGETALES,
INULINA Y *Saccharomyces boulardii*”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICOFARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

p. Q.F.B. EUNICE TRANQUILINO RODRÍGUEZ

ASESORES DE TESIS:

DC. JOSÉ OCTAVIO RODILES LÓPEZ.

DC. HÉCTOR EDUARDO MARTÍNEZ FLORES.

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO, NOVIEMBRE DEL 2012.

GRACIAS...

A Dios; por darme la oportunidad de vivir, por su gran amor y por haberme permitido llegar hasta esta etapa de gran satisfacción.

A mis padres; porque gracias a su ejemplo, a su apoyo, a sus consejos, a sus oraciones, y a la inmensa motivación de superación constante, me han convertido en una persona de bien, no me alcanzará la vida para agradecerles todo lo que me han y me siguen dando, los quiero mucho!

A mis hermanos; kike y kevin por ser como son, por estar a mi lado siempre; compartiendo toda clase de momentos, por crecer y formarnos juntos y saber que estamos para apoyarnos incondicionalmente.

Al amor de mi vida; Yamin, por el gran amor, comprensión, confianza y tranquilidad que me has brindado siempre y saber que estás y estarás toda la vida.

A toda mi familia; A mis tíos, tías, abuelos, primos y a mis primas que son como mis hermanas, porque estuvieron aconsejándome y animándome en todo momento convirtiéndose en un gran pilar en mi formación.

A mis asesores; el D.C. J. Octavio Rodiles y el D.C. Héctor E. Martínez, por la confianza que me brindaron y me siguen brindando aún, por su apoyo y tiempo para realizar este trabajo, por impulsar mi formación personal y académica, y ser un gran ejemplo a seguir.

Al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Q.F.B. de la U.M.S.N.H.; al Q.F.B. Ricardo Soria, a la Q.F.B. Karla G. Domínguez y a la Q.F.B. Karina por su tiempo, paciencia y ayuda en las determinaciones microbiológicas.

Al Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Q.F.B. de la U.M.S.N.H.; a la M.C. Rosy García y a la M.C. Diana Maya, por permitirme el uso del equipo de laboratorio, por su amabilidad y asesoría para realizar análisis bromatológicos y fisicoquímicos.

A la empresa Aarus Karlasham AAK; a la Ing. Laura Calderón, a la Ing. Nereida Calderón por el apoyo y tiempo brindado para la realización de este trabajo. Al Ing. Galo Set, por su gentileza y ayuda en las determinaciones de perfil de ácidos grasos.

***A mis amigos:** A Silvia, por haberme regalado tu amistad desde el primer día que entramos en la Facultad, por tu alegría y ser una amiga fiel e incondicional. Yvette, por estar presente siempre apoyándome, y ofreciéndome tu amistad y compañía a lo largo de este proyecto que iniciamos y terminamos juntas. Vianney, por tantos consejos llenos de sabiduría que me han permitido crecer como persona y saber que siempre contaré contigo. Claudia, por ser una gran persona y amiga, por tus ganas de superación que inspira a todos los que están a tu alrededor, incluyéndome. Juan Luis, por tu sencillez, calidez y simpático sentido del humor.*

***A mis profesores:** al M.C Rafael Zamora por haberme asesorado y apoyado en la realización de la técnica de Microencapsulación, al D.C. Raúl Cortes, por sus observaciones, orientación y accesibilidad que me brindó resolviendo mis dudas de una manera sencilla.*

***A mis compañeros de laboratorio:** que de una forma u otra me ayudaron y apoyaron siempre que lo necesite de una manera cordial, ya sea con un consejo, con su compañía o con orientación académica durante la realización de este trabajo: Mireya, Leslie, Roberto, Gloria, Marce Zarahí, Kira, Adriana, Esther, Tsanda y Nora.*

RESUMEN

El yogurt es considerado tradicionalmente como un alimento saludable debido principalmente a que su contenido bacteriano ayuda a evitar algunos tipos de desordenes estomacales e intestinales. Sin embargo, para que este alimento brinde estos beneficios y sea considerado como un alimento probiótico debe cumplir con una concentración mínima de bacterias lácticas en el orden de 1×10^7 UFC/ml.

La propuesta fue elaborar y desarrollar un yogurt que cumpla con dichas especificaciones y que además incluya ingredientes funcionales que intensifiquen su valor como son grasas vegetales en sustitución de la grasa butírica; estas no contienen colesterol, y sumado a esto, tiene mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, que tienen un efecto positivo en la disminución de triglicéridos en sangre, y a su vez una menor cantidad de ácidos grasos saturados que están relacionados con el incremento de triglicéridos en sangre; inulina que brindara un carácter funcional agregado actuando como prebiótico, 4%; y la levadura *Saccharomyces boulardii* como probiótico.

Se estandarizó la formulación usando aditivos químicos para lograr la estabilidad de la misma. Se usaron emulsificantes del tipo mono y diglicéridos en una concentración de 0.5% para la incorporación de grasa vegetal y gredina en una concentración de 0.5%, para evitar sinéresis e incrementar la viscosidad.

El producto final, además de grasa vegetal e inulina, incluyó la levadura *Saccharomyces boulardii* en una concentración final de 1.4×10^7 UFC/mL. El producto terminado fue almacenado a una temperatura de 4 °C. Sin embargo, la levadura fermentó el producto ocasionando cambios sensoriales desagradables a las 48 horas, por lo que se decidió microencapsular a la levadura por el método de emulsión, demostrando que durante 7 días en refrigeración a 4°C, no se perciben cambios organolépticos desagradables.

Debido a que la levadura fermentó el producto se elaboró otro que sólo contiene grasas vegetales, inulina y aditivos, se evaluó su vida de anaquel por un periodo mayor de 21 días a 4°C se encontró que este producto mantiene su estabilidad fisicoquímica y tiene características organolépticas aceptables, además de mantener una concentración de bacterias lácticas en el orden de 3.4×10^9 UFC/mL, siendo una característica probiótica deseada en este tipo de productos.

Palabras clave: yogurt, aceites vegetales, ácidos grasos insaturados, prebiótico, inulina, probiótico, bacterias lácticas, *Saccharomyces boulardii*.

ABSTRACT

Yogurt is traditionally regarded as a healthy food mainly because its bacterial content helps prevent some types of stomach and intestinal disorders. However, this food to provide these benefits and is considered as a probiotic food must comply with a minimum concentration of lactic bacteria in the order of 1×10^7 CFU / mL.

The proposal was developed and developing a yogurt that meets these specifications and also includes functional ingredients that enhance their value as are vegetable fats in fat replacement butírican these contain no cholesterol, and added to this, it has more unsaturated fatty acids , which have a positive effect in lowering blood triglyceride, and also a minor amount of saturated fatty acids are associated with increased blood triglycerides, inulin which provide a functional character acting as a prebiotic added, 4%, and the yeast *Saccharomyces boulardii* as probiotic.

Formulation was standardized using chemical additives for stability thereof. Emulsifiers were used mono and diglycerides of a concentration of 0.5% for the incorporation of vegetable fat and gelatin at a concentration of 0.5% to avoid syneresis and increase the viscosity.

The final product, in addition to vegetable fat and inulin, the yeast *Saccharomyces boulardii* included in a final concentration of 1.4×10^7 CFU / mL. The finished product was stored at a temperature of 4 ° C. However, the fermented product yeast caused unpleasant sensory changes at 48 hours, it was decided to yeast microencapsulated by the emulsion method, showing that during 7 days in a refrigerator at 4 ° C, no unpleasant organoleptic changes are perceived .

Because the yeast fermentation product containing only elaborate other vegetable fats, inulin and additives, shelf life was evaluated for a period greater than 21 days at 4 ° C was found that this product maintains its physicochemical stability and has features acceptable organoleptic, while maintaining a concentration of lactic bacteria in the order of 3.4×10^9 CFU / mL, being a desired feature in this type probiotic products.

Keywords: yogurt, vegetable oils, unsaturated fatty acids, prebiotic, inulin, probiotic lactic acid bacteria, *Saccharomyces boulardii*.

Índice General

RESUMEN

I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- Antecedentes históricos	2
2.- Alimentos funcionales	2
3.- Yogurt	3
3.1.- Clasificación	4
3.2.- Aspectos Microbiológicos	5
3.2.1.- Cultivo iniciador	5
3.2.2.- Uso de los cultivos Iniciadores y fermentos madre	5
3.2.3.- Fermentación	5
3.3.- Aspectos bioquímicos	6
3.3.1.- <i>Streptococcus thermophilus</i>	6
3.3.2.- <i>Lactobacillus bulgaricu sbsp. delbrueckii</i>	7
3.3.3.- Simbiosis de los microorganismos del yogurt	8
3.4.- Aspectos Fisicoquímicos	11
3.4.1.- Propiedades reológicas	11
3.4.2.- Estabilizantes	12
3.5.- Aspectos nutricionales	13
3.5.1.- Vitaminas y minerales	14
3.6.- Yogurt como alimento funcional	14
4.- Probióticos	15
4.1.- Mecanismos de acción	15
4.2.- Beneficios para la salud	17
4.3.- <i>Saccharomyces bolulardii</i> como probiótico	18
4.3.1.- Aplicaciones clínicas	19
4.4.- Micro encapsulación	20
4.4.1.- Técnica de goteo de solución de microorganismos	20
4.4.2.- Técnica de emulsión	21
4.4.3.- Materiales de encapsulación	21
A.- Grasas	21
B.- Proteínas	22
C.- Polímeros	22
5.- Prebióticos	22
5.1.- Inulina	23
5.1.1.- Usos industriales	24
5.1.2.- Benéficos a la salud	25

6.- Grasas y Aceites	25
6.1.- Ácidos grasos saturados	26
6.2.- Ácidos grasos insaturados	26
6.2.1.- Metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados	28
II.- JUSTIFICACIÓN	29
III.- HIPÓTESIS	29
IV.- OBJETIVOS	30
1.- Objetivo general.....	30
2.- Objetivos específicos	30
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.- Diseño experimental	31
2.- Materias primas.....	32
2.1.- Leche	32
2.2.- Cultivo láctico	32
2.3.- Probiótico	32
2.4.- Prebiótico (inulina)	32
2.5.- Sustituto de grasa de leche	32
3.- Métodos	33
3.1.- Análisis bromatológico.....	33
3.1.1.- Humedad.....	33
3.1.2.- Proteína.....	33
3.1.3.- Lípidos.....	33
3.1.4.- Cenizas	33
3.1.5.- Fibra total, fibra soluble e insoluble	33
3.1.6.- Carbohidratos	33
3.2.- Preparación del cultivo láctico madre	33
3.3.- Análisis físicoquímicos	34
3.3.1.- Acidez.....	34
3.3.2.- Determinación de pH.....	34
3.3.3.- Grado de sinéresis.....	34
3.3.4.- Viscosidad y propiedades reológicas.....	35
3.4.- Producción de biomasa de <i>Saccharomyces boulardii</i>	35
3.5.- Micro encapsulación.....	36
3.6.- Análisis microbiológico	37
3.6.1.- <i>L. bulgaricus</i> y <i>S. termophilus</i> en yogurt	37
3.6.2.- Mohos y levaduras en alimentos	38
3.6.3.- Cuenta de coliformes totales en placa	39
3.7.- Perfil de ácidos grasos.....	40
3.8.- Evaluación sensorial.....	40

VI.- RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	41
1.- Estandarización de los componentes del yogurt	42
1.1.- Análisis químico de un yogurt comercial.....	42
1.1.1.- Adición de grasas vegetales.....	43
1.1.2.- Adición de inulina	43
1.1.3.- Elaboración del cultivo madre.....	44
2.- Proceso de elaboración	47
2.1.- Diagrama de flujo para el proceso de elaboración	47
2.2.- Pruebas panel.....	50
2.3.- Adición del probiótico. <i>Sacharomyces boulardii</i>	53
3.- Formulación final estandarizada.....	54
4.- Análisis comparativo de producto en el mercado	57
4.1.- Propiedades fisicoquímicas	58
4.2.- Análisis bromatológico.....	61
4.2.1.- Perfil de ácidos grasos	63
4.3.- Análisis organoléptico	65
5.- Vida de anaquel	66
VII.- CONCLUSIONES	70
VIII.- BIBLIOGRAFIA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica utilizada para producir yogurt a partir de leche	9
Figura 2. Influencia de la temperatura sobre crecimiento microbiano	10
Figura 3. Influencia del inóculo y el tiempo sobre el crecimiento microbiano	10
Figura 4. Interacción de la flora normal y los probiotico con el huésped	16
Figura 5. Efecto fisiológico de <i>Saccharomyces boulardii</i>	19
Figura 6. Estructura química de la inulina	24
Figura 7. Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados	28
Figura 8. Método de elaboración del cultivo madre.....	34
Figura 9. Producción de biomasa de <i>Saccharomces boulardii</i>	35
Figura 10.Procedimiento de emulsificación	36
Figura 11.Cambios de pH en función del tiempo	44
Figura 12.Cambios en acidez en función del tiempo	44
Figura 13.Influencia del inculo en cambios de ph en función del tiempo.....	45
Figura 14. influencia del inculo en cambios de acidez en función del tiempo.....	45
Figura 15.Diagrama de flujo para la elaboración del yogurt.....	47
Figura 16.Esquematización de los agregados formados en el producto.....	47
Figura 17.Separación de la fase lipídica y acuosa del aceite vegetal	48
Figura 18.Presencia de sinéresis.....	49
Figura 19.Prueba panel. Análisis comparativo de tres formulaciones elaboradas	51
Figura 20.Prueba panel. Apariencia general de las tres formulaciones.....	52
Figura 21.Diagrama de flujo. Adición de <i>saccharomyces boulardii</i>	53
Figura 22.Encapsulación de <i>saccharomyces boulardii</i>	54
Figura 23.Comparación del ph en productos lácteos fermentados.....	58
Figura 24.Comparación de la acidez en productos lácteos fermentados.....	59
Figura 25.Comparación del grado de sinéresis en productos lácteos fermentados	60
Figura 26.Comparación de los perfiles de viscosidad	60
Figura 27.Comparación de la viscosidad de diferentes productos lácteos fermentados	61
Figura 28.Cromatografía. Perfil de acido grasos de la grasa vegetal	64
Figura 29.Pruebas panel. Análisis comparativo de tres productos	65
Figura 30.Pruebas panel. Apariencia general de tres productos.....	66
Figura 31.Vida de anaquel. Viscosidad.....	67
Figura 32.Prueba panel. Vida de anaquel	68
Figura 33.Prueba panel. Apariencia general.....	68

Figura 34. Producto terminado	69
-------------------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del Yogurt de Acuerdo a sus Ingredientes	4
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de <i>Streptococcus thermophilus</i>	7
Tabla 3. Clasificación Taxonómica de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	8
Tabla 4. Mecanismos de Acción de Agentes Probióticos	17
Tabla 5. Beneficios de agentes Probióticos	17
Tabla 6. Clasificación Taxonómica de <i>Saccharomyces boulardii</i>	18
Tabla 7. Especificaciones Microbiológicas.....	37
Tabla 8. Escala Hedónica para Análisis Sensoriales.....	40
Tabla 9. Humedad y Sólidos Totales	42
Tabla 10. Análisis Bromatológico	42
Tabla 11. Formulación 1. Bebida Funcional tipo Yogurt	46
Tabla 12. Aditivos Químicos	49
Tabla 13. Formulaciones Elaboradas	50
Tabla 14. Formulación Final de la Bebida Funcional tipo Yogurt	55
Tabla 15. Análisis Bromatológico de la Formulación Final	55
Tabla 16. Análisis Físicoquímico de la Formulación Final	56
Tabla 17. Análisis Microbiológico de la Formulación Final	57
Tabla 18. Comparación. Humedad y Sólidos Totales.....	62
Tabla 19. Comparación Bromatológica	62
Tabla 20. Perfil de Ácidos Grasos de Grasa butírica y Aceite vegetal	63
Tabla 21. Vida de Anaquel medida en la Formulación Final durante 21 días	66

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay un creciente interés de incluir en la dieta humana alimentos funcionales, los cuales además de su valor nutritivo intrínseco aportan beneficios a la salud. El yogurt es un gel viscoso, obtenido de la fermentación de la leche por los microorganismos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, considerados éstos como probióticos, por lo cual es un representante de los alimentos funcionales (Torres, 2009).

Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica a la salud del huésped al ser administrados en cantidades mínimas de 1×10^7 UFC/mL (Boza *et al.*, 2010). Pruebas realizadas con animales y estudios *in vitro* han demostrado que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción perjudicial de ciertos agentes patógenos (Miranda, 2009).

La levadura *Saccharomyces boulardii* se ha considerado un probiótico; ya que cuando recorre el tracto gastrointestinal genera efectos fármaco dinámicos semejantes a los efectos fisiológicos de la flora intestinal normal (Buts, 2007).

Por otro lado, los prebióticos, como la inulina, son ingredientes de la dieta no digeribles en el estómago e intestino delgado, que producen acciones benéficas estimulando selectivamente el crecimiento y actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero, es decir, estimulan el crecimiento y desarrollo de los probióticos. Estudios *in vivo* muestran que solo 4 g de inulina diarios son efectivos para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon (Madriral y Sangronis 2007).

Los lípidos vegetales que se usaron en este trabajo fueron derivados del aceite de palma y se caracterizan por la ausencia de colesterol además de que son ricos en ácidos grasos insaturados como el oleico que está relacionado con la disminución de triglicéridos y colesterol en sangre, y el linoleico, que es un ácido graso esencial que ayuda a disminuir las concentraciones de colesterol en sangre (Gil y Sánchez, 2010), a demás el ácido linoléico interviene en el crecimiento del organismo, formación del tejido nervioso, formación y renovación de piel, pelo y uñas así como en la síntesis de prostaglandinas (Aires *et al.*, 2005).

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El yogurt tuvo sus orígenes en el medio Oriente; sin embargo, los productos a los que se refieren en esa época son en realidad leches fermentadas en forma empírica, con la participación de microorganismos presentes en la leche o en el medio ambiente, ya que el descubrimiento de los microorganismos y sus características se llevó a cabo hasta finales del siglo XVII, su utilidad y funciones se detectaron y desarrollaron en el siglo XIX. Desde sus orígenes las leches fermentadas han sido ingeridas por sus propiedades medicinales para el alivio de desordenes estomacales e intestinales (Hernández *et al.*, 2003).

Durante la primera mitad del siglo XX el bacteriólogo ruso Metchnikoff relacionó la buena salud y la longevidad de los campesinos de la zona de los Balcanes con el consumo de un producto fermentado, a partir de leche, al cual le llamaban *Yahourth*. Por este motivo, se considera que las leches fermentadas fueron las precursoras de lo que hoy se conoce como yogurt. Después de la segunda guerra mundial, la tecnología del yogurt tuvo un avance muy significativo (Hernández *et al.*, 2003).

Una de las propiedades más destacables del yogurt es su capacidad de regenerar la flora intestinal, la cual se ve muy afectada por una mala alimentación y sobre todo, por infecciones y el abuso de medicamentos como los antibióticos. Debido a la creciente demanda del yogurt, la industria láctea alrededor del mundo le ha dado tal importancia, que hoy en día, y día con día salen a la venta diferentes tipos de yogurts, y todos muy bien recibidos por los consumidores (Ledezma, 2010).

2. ALIMENTOS FUNCIONALES

El concepto de nutrición está evolucionando. La *nutrición adecuada*, entendida como *suficiente*, dirigida a evitar déficits en la salud, ha dejado de ser la meta en las sociedades desarrolladas. Emerge la concepción de la alimentación como *nutrición óptima*. Su objetivo es la calidad de vida y el bienestar integral del individuo. La nutrición adquiere un nuevo enfoque terapéutico y preventivo; participa en la promoción de la salud y es ya considerada como factor de protección ante una larga serie de circunstancias patológicas (Silveira *et al.*, 2003).

Los Alimentos Funcionales (AF) son un concepto no definido aún de forma consensuada en la comunidad científica. Un AF es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con

actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, con un efecto fisiológico añadido por encima de su valor nutricional y cuyas acciones positivas justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional fisiológico o incluso saludable. Como puede apreciarse, las fronteras son difusas, tanto con los medicamentos como con casi cualquier alimento, en el más amplio de los sentidos (Silveira *et al.*, 2003).

Otra definición de un alimento funcional sería aquel que contiene un componente o nutriente con actividad selectiva beneficiosa, lo que le confiere un efecto fisiológico adicional a su valor nutricional. El efecto positivo a la salud se refiere a una mejoría de las funciones del organismo o a la disminución del riesgo de adquirir una enfermedad (Madrigal y Sangronis, 2007).

Cabe mencionar que un factor clave en el desarrollo de la industria de los alimentos funcionales es la aceptación del público consumidor de tales alimentos, para ello se necesita que los consumidores estén convencidos de los beneficios a la salud que le brindan tales productos.

Por lo que la industria de los alimentos debe evitar etiquetar en esta categoría cualquier producto sin la previa validación de beneficios a la salud; y los organismos reguladores de salud sólo deben permitir el uso de declaraciones de salud cuando esté debidamente validado su efecto positivo. En ese sentido, es donde los sectores académicos y de investigación deben participar en el proceso de evaluar y autenticar el beneficio a la salud del alimento para que tal etiquetado sea imparcial y fidedigno. Esta evaluación debe abarcar el estudio de las funciones orgánicas afectadas por el alimento o ingrediente funcional, incluyendo su papel en el mantenimiento de la salud o en la prevención de enfermedades, la identificación y validación de los biomarcadores, así como estudios de causa-efecto donde se evalúe la seguridad y la dosis (Alvídrez *et al.*, 2002).

Esto favorece el surgimiento de un nuevo campo de investigación en donde especialistas en nutrición, en ciencia y en tecnología de alimentos trabajen activamente analizando los productos que se venden actualmente con supuestos beneficios a la salud (Alvídrez *et al.*, 2002).

3. YOGURT

Existen definiciones bien establecidas para el producto llamado yogurt en la legislación mexicana, tales como:

NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-181-SCFI-2010.- Se define yogurt al producto obtenido de la fermentación de la leche, estandarizada o no, por medio de la acción de los

microorganismos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, y teniendo como resultado la reducción del pH.

NORMA MEXICANA. NMX-F-444-1983.- Se define yogurt como el producto lácteo preparado a partir de leche entera, parcial o totalmente descremada, enriquecida en extractos secos por medio de la concentración de ésta o agregando leche en polvo, tratada térmicamente y coagulada biológicamente por la fermentación obtenida de la siembra en simbiosis de los fermentos lácteos *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

3.1. CLASIFICACIÓN

En la tabla 1 se muestra la clasificación de los yogures acorde a sus ingredientes.

Tabla 1. Clasificación del Yogurt de Acuerdo a sus Ingredientes.

TIPO DE YOGURT	DEFINICIÓN
Natural	Producto de leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> a partir leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada.
Azucarado	Es el yogurt natural al que se le han añadido azúcar.
Edulcorado	Es el yogurt natural al que se le han añadido edulcorantes autorizados.
Frutas, Zumos y Otros Productos	Es el yogurt natural al que se le han añadido frutas, zumos y otros productos naturales.
Aromatizados	Es el yogurt natural al que se le han añadido agentes aromáticos autorizados.
Pasteurizado	Es el yogurt que se pasteuriza después de la fermentación para aumentar la vida de anaquel.

(Hernández *et al.*, 2003).

3.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

3.2.1. CULTIVO INICIADOR

Un cultivo iniciador (fermento), es una o más cepas, ya sea de una o varias especies, utilizadas para inocular un determinado producto con el fin de llevar a cabo una fermentación. Dichos microorganismos fermentadores deben ser viables y estar presentes en el producto terminado en una cantidad mínima de 1×10^7 UFC/g (Sánchez, 2005).

3.2.2. USO DE LOS CULTIVOS INICIADORES Y FERMENTOS MADRE

Los cultivos iniciadores están preparados para su uso directo en la cuba, o bien para preparar fermentos madre que servirán para preparar el cultivo para la producción (Romero y Mestres 2004).

La preparación de los fermentos madre se realiza sembrando una cantidad del cultivo iniciador sobre una pequeña cantidad de leche desnatada que ha recibido tratamiento térmico severo. La leche inoculada se incuba hasta que su pH desciende a un valor alrededor de 4.4 y a continuación se enfría por debajo de 5°C, y en estas condiciones las propiedades del estárter se mantienen durante 36 h como máximo (Romero y Mestres 2004).

3.2.3. FERMENTACIÓN

La fermentación de alimentos se define como el uso de ciertos sustratos por algunos microorganismos para producir una serie de sustancias específicas en ausencia de oxígeno. Los sustratos pueden ser carbohidratos, proteínas o lípidos. Así mismo, cada tipo de fermentación es producida por un tipo específico de microorganismo, y éstos pueden ser bacterias, hongos o levaduras.

Hoy se sabe que son las enzimas de los microorganismos las que desarrollan el proceso de fermentación. Una enzima es un tipo de proteína con capacidad catalítica que acelera una reacción química y dicta la manera en que se debe realizar. En general, los microorganismos que

fermentan los carbohidratos no permiten el desarrollo de aquellos microorganismos que degradan proteínas y lípidos. Los alcoholes o ácidos orgánicos presentes en los alimentos fermentados vía carbohidratos evitan la proliferación de otros microorganismos; y éste es el principio para que funcionen como un sistema de conservación de alimentos. Las fermentaciones con un pH menor a 4.5 evitan el desarrollo del *Clostridium botulinum* (Rodiles, 2011).

La fermentación industrial maneja una serie de factores físicos que guían el proceso; siendo los principales la temperatura, el pH, la presencia o ausencia de oxígeno, y la concentración de sal y/o azúcar. Así mismo, es también común el uso de iniciadores. Éstos normalmente son los microorganismos resultantes de la fermentación del día anterior y que se usan para iniciar el nuevo ciclo industrial. La fermentación usa cierto tipo de microorganismos para evitar el crecimiento de otros microorganismos, siendo la fermentación un método de conservación biológica (Rodiles, 2011).

3.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Los microorganismos encargados de convertir la leche en yogurt son el *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus*.

3.3.1. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus fue descrito por primera vez por Orla-Jensen en 1919. Su nombre procede del término griego “*therme*” que significa calor y del término “*philus*” que significa afinidad. Estas son células esféricas u ovoides de 0.7-0.9 μm de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas. Son anaerobios facultativos, con metabolismo homofermentativo, Gram positivos, y catalasa negativos. La temperatura óptima de crecimiento es de 42-45°C. La resistencia al calor, la habilidad para crecer a 52°C y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos. Se encuentra actualmente dentro del grupo de los estreptococos orales (Collado, 2004).

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *Streptococcus thermophilus*.

<i>Streptococcus thermophilus</i>	
Clasificación Científica	
Dominio	Bacteria
Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Streptococcaceae
Género	<i>Streptococcus</i>
Especie	<i>Thermophilus</i>

(Ortíz, 2012).

3.3.2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii subespecie *bulgaricus* se presenta en forma de bacilos alargados con una punta redondeada, separados o formando cadenas. El tamaño en la leche es de 0.8-1 μm de ancho y de 4-8 μm de largo (Romero y Mestres 2004). Este microorganismo es un Gram positivo, inmóvil, no formadora de esporas, homofermentativa con exclusiva producción de ácido D (-) láctico y con una temperatura óptima de crecimiento de entre 42-43 °C.

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *Lactobacillus delbrueckii*.

<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	
Clasificación Científica	
Dominio	Bacteria
Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Lactobacillae
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>Delbrueckii</i>
Subespecie	<i>Bulgaricus</i>

(Ortíz, 2012).

3.3.3. SIMBIOSIS DE LOS MICROORGANISMOS DEL YOGURT

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* es tradicionalmente empleado en combinación con *Streptococcus thermophilus* para la elaboración de yogurt, la utilización de las dos bacterias a menudo resulta en tasas de acidificación más altas, un pH final más bajo, estimulación de la producción de compuestos aromáticos y mejora de la estabilidad del producto final, en comparación a cuando se utilizan monocultivos (Ávila *et al.*, 2010).

Estos microorganismos crecen en forma óptima en un intervalo de temperatura entre 40 y 45°C, y su metabolismo se detiene a temperaturas por debajo de los 10°C. Ambos microorganismos tienen requerimientos nutricionales complejos que son suplidos por la leche; utilizan la lactosa como fuente de energía y la transforman en ácido láctico. Durante el metabolismo de los microorganismos se producen algunos metabolitos que son los responsables del olor característico del yogurt, entre ellos, los más importantes son: acetaldehído, diacetilo y la acetoina. También se obtienen ácidos volátiles como: fórmico, acético, propiónico, butírico, isovalérico, caproico; los cuales sinérgicamente con los metabolitos mencionados anteriormente originan el aroma característico del yogurt (Hernández *et al.*, 2003).

El acetaldehído es la sustancia responsable del aroma que se encuentra en mayor concentración en el yogurt, entre 25 a 55 ppm; y se produce por la vía de Embden-Meyerhof.

Los dos microorganismos actúan en forma sinérgica, es decir, las bacterias se estimulan mutuamente. Ambas especies pueden crecer a pH bajo, pero *S. thermophilus* crece mejor al inicio de la fermentación cuando el pH es alto. El pH disminuye durante la fermentación, por la producción de ácido láctico, hasta alcanzar un valor inferior a 5.5. La acidez, el consumo de oxígeno y la liberación de sustancias volátiles que produce este microorganismo crean las condiciones ideales para que se desarrolle *L. bulgaricus*. Por otro lado, al liberar aminoácidos de la caseína el bacilo estimula el crecimiento de *S. thermophilus* y, entonces se producen ácidos grasos y acetaldehído (Hernández *et al.*, 2003).

Otro efecto positivo es la disminución de pH que inhibe a los microorganismos como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* que no crecen en ambientes tan ácidos, así como otros microorganismos que pueden deteriorar el producto.

Desde el punto de vista bioquímico, la lactosa es hidrolizada dentro de la célula bacteriana por una lactasa generando unidades de glucosa y galactosa. La glucosa es metabolizada por la vía de Embden-Meyerhof hasta ácido pirúvico, el cual se convierte en ácido láctico por acción de la deshidrogenasa láctica presente en ambos microorganismos. Por otro lado, ambas bacterias carecen de la enzima alcohol deshidrogenasa, por lo que son incapaces de transformar el acetaldehído en etanol (Hernández *et al.*, 2003). En la figura 1 se muestra la ruta metabólica Embden-Meyerhof.

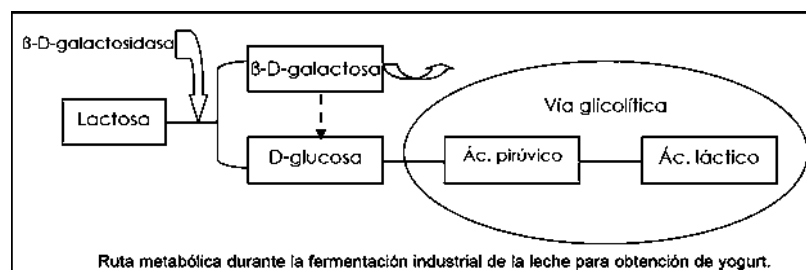


Figura 1. Ruta metabólica utilizada para producir yogurt a partir de leche.

La proporción en la que se inoculan los microorganismos es de 1:1 (*Streptococcus: Lactobacillus*). Al final de la fermentación la proporción en que se hallan estos microorganismos depende de las condiciones de producción y se encuentran en función directa de las características organolépticas deseadas del yogurt. Así por ejemplo, a una temperatura de 43°C,

la proporción de microorganismos al concluir la fermentación es de 1:1, mientras que a 45°C se favorece la producción de *Lactobacillus* con una relación de 1:2 y se obtiene un yogurt muy ácido. En la figura 2 se muestra el efecto de la temperatura sobre la relación de cultivo entre dichas cepas bacterianas (Hernández *et al.*, 2003).

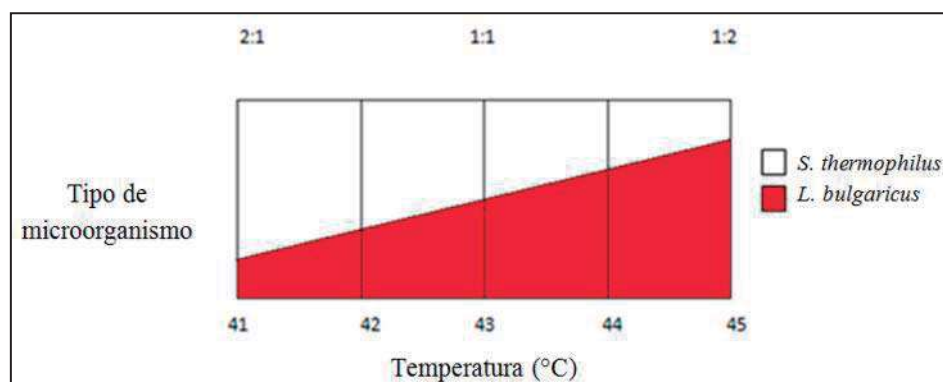


Figura 2. Influencia de la temperatura sobre el crecimiento microbiano.

La cantidad de inóculo y el tiempo de fermentación también influyen en las características finales del yogurt. Para producir un yogurt a 43°C durante dos horas y media, con una relación final de microorganismos de 1:1, es necesario inocular una cantidad de cultivo equivalente al 3% v/v de la leche que se desea fermentar. Si el yogurt se fermenta en tres horas, se inocula la leche con un 2% del cultivo (en relación con la cantidad de leche empleada). Este comportamiento se presenta en la figura 3.

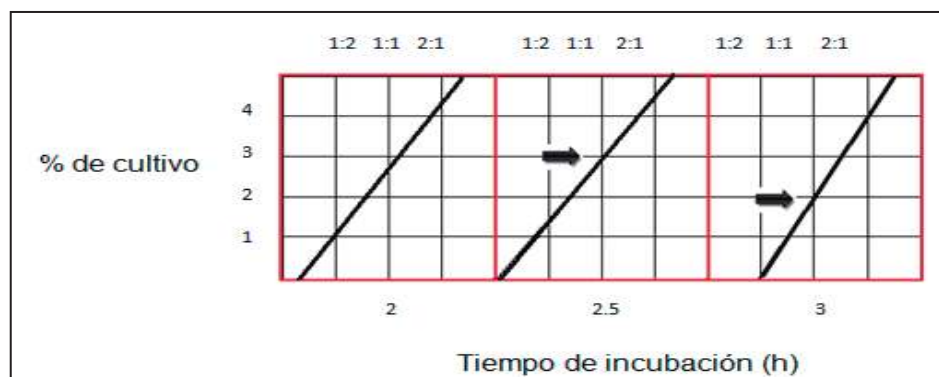


Figura 3. Influencia del inóculo y el tiempo sobre el crecimiento microbiano.

3.4. ASPECTOS FISICOQUÍMICOS

Entre las propiedades fisicoquímicas del yogurt que se pueden mencionar son: acidez, capacidad de retención de agua, color, composición proximal, firmeza, grado de sinéresis, pH, propiedades reológicas, sólidos totales y tamaño de partícula, entre otros. Estas propiedades son afectadas por las condiciones particulares que se sigan durante la manufactura de este producto lácteo (Valderrama, 2001).

3.4.1. PROPIEDADES REOLÓGICAS

La Reología es una disciplina científica que se dedica al estudio de la deformación y flujo de la materia o, más precisamente, de los fluidos. La palabra reología proviene del griego *ρειν* la cual significa fluir.

El comportamiento reológico del yogurt se debe en buena medida al gel estructural que presenta. Este gel se forma durante la fermentación, cuando los microorganismos del yogurt metabolizan la lactosa presente en la leche para cubrir sus necesidades energéticas, produciendo ácido láctico y otros compuestos. La producción gradual de ácido láctico provoca la solubilización del fosfato de calcio y citrato asociados a la micela, lo que conduce a la desestabilización de las micelas de caseína, que, dependiendo de la intensidad del tratamiento térmico, estarán formando complejos con las proteínas del lacto suero desnaturalizadas (Romero y Mestres 2004).

Durante el intervalo de pH de 6.6 a 5.3, el tamaño de las micelas se mantienen constantes pero en el intervalo de pH entre 5.3 y 4.6, o inferior, el tamaño de las micelas va decreciendo gradualmente. A medida que se va produciendo ácido láctico y el pH se aproxima al punto isoeléctrico de las caseínas: 4.6-4.7, se van neutralizando las cargas negativas de las micelas de caseína, que se van aproximando y coalesciendo. Cuando se llega al pH del punto isoeléctrico, las caseínas junto con las proteínas del lacto-suero desnaturalizadas forman el gel constituido por una red de estructura regular que atrapa en su interior el resto de los componentes de las leche, incluyendo el agua (Romero y Mestres, 2004).

Las propiedades de flujo o viscosas del yogurt exhiben dependencia tanto de la razón de corte como del tiempo.

El yogurt presenta un comportamiento de flujo complejo no newtoniano, dependiente del esfuerzo cortante y del tiempo, por lo que es de importancia estudiar la reología de este producto lácteo con respecto al proceso, manejo y desarrollo de productos como aspectos de control de calidad (Valderrama, 2001).

3.4.2. ESTABILIZANTES

En cuanto a la estabilidad del yogurt, cabe mencionar que existen factores que pueden causar sinéresis en el yogurt entero tipo batido; y entre los más importantes está el rompimiento del gel durante el almacenamiento y el transporte del mismo. Para evitar esto, es necesario utilizar estabilizantes en la elaboración de este tipo de yogurt con los cuales se logre mantener o mejorar sus características físicoquímicas (Mendoza *et al.*, 2007).

Existen una gran variedad de compuestos que se pueden adicionar a la leche como estabilizantes con objeto de lograr características adecuadas. Entre ellos se encuentra las gomas naturales, como son: arábica, de tragacanto y guar; así como algunas gomas modificadas como son carboximetilcelulosa, metil-celulosa, celulosa microcristalina, y algunos polisacáridos como las pectinas. También se emplean almidones modificados y almidones en su forma nativa. Se ha demostrado que la pectina en el yogurt en una concentración del 0.1 a 0.2% incrementa la viscosidad hasta en un 4% (Mendoza *et al.*, 2007).

Schonbrum (2002), estudió los efectos de tres estabilizantes sobre las características reológicas del yogurt batido: gelatina, carboximetilcelulosa y pectina de alto metoxilo, mostrando que los yogures elaborados con los dos últimos estabilizantes tenían viscosidad muy alta y presentaban color rosado, siendo inaceptable por los consumidores. Por otro lado, Castillo *et al.* (2004), estudiaron la influencia de la pectina sobre las propiedades reológicas del yogurt, y obtuvieron que la concentración adecuada era de 0.15 %, ya que presentaba un mejoramiento en sus propiedades reológicas, químicas y sensoriales.

Sin embargo, cabe mencionar que algunos estabilizantes presentan deficiencias, como en el caso de la gelatina, la cual solidifica a 25°C, por lo que puede causar problemas durante la fase de refrigeración, además de que confiere una textura rugosa al coágulo. Otro ejemplo son las pectinas, las cuales a elevadas temperaturas pierden la capacidad de formar geles. Además, la capacidad de gelificar de las pectinas está determinada por factores intrínsecos, como son su peso

molecular, su grado de esterificación, que a su vez dependen de las condiciones de fabricación (Mendoza *et al.*, 2007).

Por otra parte, los almidones modificados presentan mejores propiedades que los almidones nativos; pero éstos utilizan productos químicos como HCl y H₂SO₄ en su elaboración y por tanto aumentan los costos de producción (Mendoza *et al.*, 2007).

3.5. ASPECTOS NUTRICIONALES

Algunas personas no toleran la leche, ya que su consumo les causa desordenes estomacales y esto se debe a que estas personas no poseen en su sistema digestivo la enzima lactasa, encargada de hidrolizar la lactosa de la leche en glucosa y galactosa. Las bacterias de yogurt mejoran la digestión de la lactosa. Se ha demostrado que los individuos que digieren mal la lactosa pueden digerir mejor la del yogurt que la de la leche. Se observó en niños que absorbían mal la lactosa, que los que ingerían yogurt fresco sufrían de modo significativo menos síntomas gastrointestinales que cuando tomaban leche. La leche fermentada tratada térmicamente daba síntomas intermedios (Miranda, 2009).

Drouault *et al.* (2002) y Corthier (2003), han demostrado que la lactasa en un modelo animal, y en presencia de *S. thermophilus* estimula la digestión de lactosa en ratones que la absorben mal. Los resultados de estos investigadores demuestran que esta bacteria del yogurt viva en el tracto intestinal, junto a las enzimas bacterianas, son indispensables para la digestión de la lactosa, produciéndose la digestión en el interior de la célula bacteriana. Estos datos son consistentes con los reportados por Pelletier *et al.* (2001).

El yogurt como todos los lácteos proporciona proteínas de elevado valor biológico. El contenido de proteínas suele ser mayor que en la leche bronca y es una proteína de alta digestibilidad debido a la suma de dos efectos (Hernández *et al.*, 2003):

- Las enzimas proteolíticas de los microorganismos presentes en el yogurt actúan sobre las proteínas, liberando péptidos y aminoácidos libres.
- El descenso del pH produce la precipitación de la caseína en finas partículas, lo que facilita la acción de las enzimas intestinales una vez en el organismo.

3.5.1. VITAMINAS Y MINERALES

El contenido de vitaminas del yogurt depende de múltiples factores, entre ellos, la leche de partida, el enriquecimiento previo del extracto seco y las cepas bacterianas elegidas.

El yogurt es una buena fuente de vitaminas tipo tiamina, riboflavina, cobalamina, piridoxina, ácido fólico y vitamina A. El consumo de 125 g de yogurt cubre casi el 20 % de las ingestas recomendadas de riboflavina para una adulto joven, el 10 % de vitamina cobalamina y más del 5 % de tiamina; además, constituye una excelente fuente de minerales y con una relación calcio/fósforo excelente. Debido a la acidez del medio, algunos minerales como el hierro, el cobre y el zinc, pueden formar sales parcialmente solubles. Además, los iones de calcio, magnesio y fósforo forman complejos con productos resultantes de la hidrólisis proteica (péptido, aminoácidos etc.) que favorecen la absorción de dichos minerales (Hernández *et al.*, 2003).

3.6. YOGURT COMO ALIMENTO FUNCIONAL

El yogurt fresco es un alimento funcional porque es un alimento probiótico. En un informe reciente del Grupo de Trabajo Conjunto de la FAO y la OMS para la Evaluación de Probióticos en Alimentos, se recomienda la siguiente definición para probióticos: «Microorganismos vivos presentes en el yogurt fresco que han sido administrados en contenidos adecuados para conferir los beneficios de los probióticos, y donde la identidad de la cepa microbiana utilizada, no es un aspecto sustancial.

Esto es debido a que los fermentos del yogurt fresco han demostrado ser activos siempre en la digestión de la lactosa en el intestino con independencia de la cepa a que pertenezcan. Las bacterias del yogurt fresco sobreviven a su paso por el intestino humano. Las bacterias específicas de yogurt fresco, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* están presentes en el yogurt en contenidos superiores a 10^7 UFC/g. Tras consumir yogurt, las bacterias permanecen activas en el intestino, aunque no lo colonizan, y ejercen importantes efectos fisiológicos. Bianchi *et al.* (1984) hallaron bacterias vivas en heces de humanos que habían ingerido yogurt fresco. Por otro lado, Brigidi *et al.* (2003), detectaron en un estudio bacterias vivas en el duodeno, manteniendo su actividad beta-galactosidasa sobre 5 sujetos sanos, que tomaron 250 g de leche fermentada con *S. thermophilus* durante 10 días; y detectaron *S. thermophilus*, ya desde el tercer día de ingesta, mediante PCR en muestras fecales.

Se tiende a justificar el carácter probiótico de las bacterias, si, entre otros criterios, se encuentran vivas en las heces. Mucho más importante que este detalle es que los microorganismos probióticos estén vivos y activos en el íleon y colon proximal, y en el ciego. Este aspecto es vital porque se trata de una zona de gran interacción con la mucosa intestinal. En este lugar del intestino, las bacterias del yogurt muestran gran vitalidad y actividad (Torres, 2009).

4. PROBIÓTICOS

Los probióticos son microorganismos vivos; tanto bacterias como levaduras que sobreviven al paso a través del tracto gastrointestinal, y producen efectos benéficos sobre una o más funciones del organismo, además de los inherentes a la nutrición (Taranto *et al.*, 2005; Araya *et al.*, 2002).

4.1. MECANISMOS DE ACCIÓN

Pruebas realizadas con animales y estudios *in vitro* han demostrado que las cepas probióticas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción de agentes patógenos específicos mediante distintos mecanismos de acción, que aún no han sido completamente esclarecidos.

Entre los mecanismos más significativos que se han propuesto destaca la privación a los patógenos de los nutrientes específicos, los cuales están presentes en cantidades limitadas en el intestino; si las bacterias beneficiosas consumen estos nutrientes necesarios para el desarrollo de agentes patógenos limitan así su proliferación (Amores *et al.*, 2004).

Los microorganismos probióticos compiten con patógenos no sólo por los nutrientes sino también por el espacio físico. Algunas bacterias pueden inhibir la adherencia de los patógenos a los sitios receptores por un mecanismo de obstrucción estérica o de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de microorganismos patógenos por inhibición competitiva en los lugares de adhesión (Amores *et al.*, 2004).

Así mismo, los probióticos producen numerosas sustancias antimicrobianas específicas como las bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y ácido láctico, por lo que

se reduce el pH luminal; este se considera el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas como *E. coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Amores *et al.*, 2004).

En la figura 4 se presenta esquemáticamente la forma en que los probióticos y la flora normal interactúan contra agentes patógenos y en la Tabla 4 se presentan los principales mecanismos de acción por parte de los agentes probióticos (Organización Mundial de Gastroenterología, 2008).

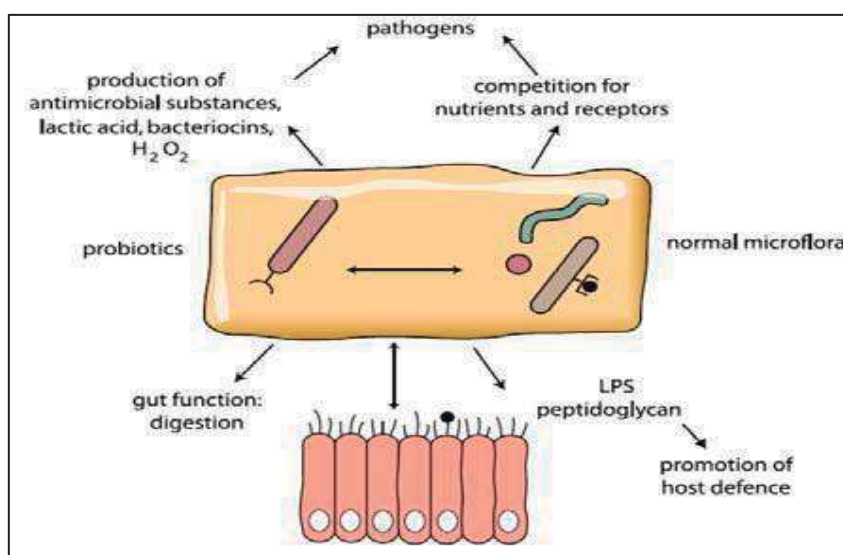


Figura 4. Interacción de la flora normal y los probióticos con el huésped.

Tabla 4. Mecanismos de Acción de Agentes Probióticos.

ACCIÓN	MECANISMO	EJEMPLO
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutrientes	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. paltarum</i> . <i>S. boulardii</i>
Actividad antimicrobiana	Producción de sustancias con acción antimicrobiana (H ₂ O ₂ , bacteriocinas, ácidos orgánicos)	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>S. boulardii</i>
Inmuno-moduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>L. reuteri</i>
Actividad enzimática	Disminución en la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosa, pro-carcinógenos, etc.	<i>S. thermophilus</i> . <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Bifidobacterium</i> .

(Amores, *et al.*, 2004).

4.2. BENEFICIOS PARA LA SALUD

Al uso de probióticos se le atribuyen numerosos efectos saludables. En la tabla 5 se presenta un resumen de dichos beneficios.

Tabla 5. Beneficios de Agentes Probióticos.

MICROORGANISMO	EFEECTO BENEFICIOSO
<i>L. acidophilus</i> LC1	Equilibrio flora intestinal, efecto en sistema inmunitario
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Reducción de actividad de enzimas pro-cancerígenas
<i>L. jonsonii</i> LA1	Inmuno estimulador, tratamiento de gastritis y úlceras
<i>L. rhamnosus</i> GG	Inmuno estimulador, diarrea, inflamación del intestino
<i>L. bulgaricus</i>	Inmuno estimulador, absorción de lactosa
<i>L. casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos
<i>B. bifidum</i>	Diarrea por rotavirus, equilibrio de la microbiota
<i>S. thermophilus</i>	Inmuno estimulador, absorción de lactosa
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

(Amores, *et al.*, 2004).

4.3. SACCHAROMYCES BOULARDII COMO PROBIÓTICO

Saccharomyces boulardii es una levadura natural no modificada genéticamente que fue aislada originalmente de la corteza del árbol del litchi en Indochina.

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Saccharomyces boulardii*.

<i>Saccharomyces boulardii</i>	
Clasificación Científica	
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Subfilo	Sacharomycotina
Clase	Sachcaromycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Sachcaromycetaceae
Género	<i>Saccharomyces</i>
Especie	<i>Boulardii</i>

(Zamora, 2011).

Esta levadura muestra un crecimiento óptimo a una temperatura de aproximadamente 37°C y, por ello, se le considera como una “levadura de temperatura extremadamente alta” (Buts, 2007).

Saccharomyces boulardii es resistente a la acidez gástrica y a la proteólisis y puede almacenarse rápidamente en grandes cantidades en el tracto gastrointestinal, manteniendo niveles constantes en su forma viable (Macfarland y Bernasconi, 1993).

En animales hologénicos (con flora bacteriana normal), la levadura *Saccharomyces boulardii* se elimina rápidamente en unos cuantos días. Esto significa que cuando la flora es normal, *Saccharomyces boulardii* no se instala en el tracto gastrointestinal.

En la figura 5 se muestra el efecto fisiológico atribuido a esta levadura (Czerucka *et al.*, 1989; Czerucka *et al.*, 1994; Vidon *et al.*, 1986). Acorde a la misma, tenemos que:

- A. *Saccharomyces boulardii* (Sb) aumenta la concentración de la IgA secretora (IgAs) en el lumen intestinal y la expresión de la enzimas de membrana en el borde en cepillo

(BBM). El aumento de su expresión parece ser correlacionada con una secreción de las poli-aminas en el catabolismo de la levadura.

B. La toxina del cólera (CT) cuando se une a la superficie celular del epitelio intestinal induce a la adenilato ciclasa (AC) y la expresión resultante es una secreción de cloruro (Cl^-). *Saccharomyces boulardii* produce una proteína 120 kDa, que inhibe la activación de (AC) que resulta en una disminución de la secreción de cloruro.

C. *Saccharomyces boulardii* produce una proteinasa de 54 kDa, que ejerce una actividad proteolítica en las toxinas A y B de *Clostridium difficile*. Además, esta levadura produce una proteína fosfatasa de 63 kDa que desfosforila LPS de *Escherichia coli* entero patógena.

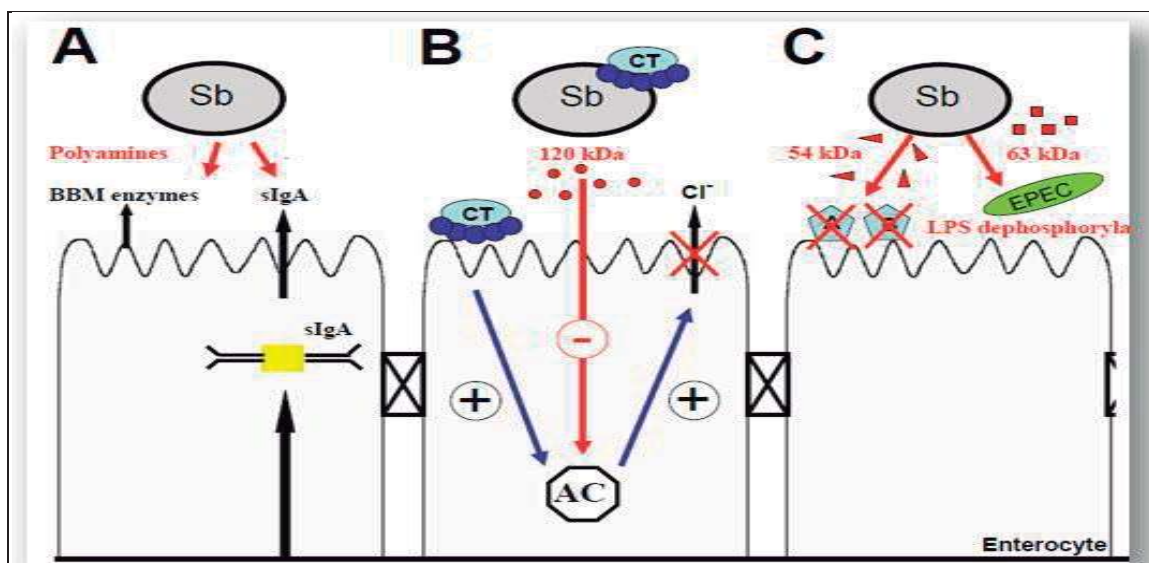


Figura 5. Efectos fisiológicos de *Saccharomyces boulardii*.

4.3.1. APLICACIONES CLÍNICAS

Hoy en día, *Saccharomyces boulardii* posee una serie de aplicaciones clínicas:

- Prevención y tratamiento de diarrea aguda. Se ha probado que sirve para reducir la severidad y duración de la diarrea infecciosa aguda en niños (Organización Mundial de Gastroenterología, 2008).

- Prevención y tratamiento de recaídas de la diarrea post-antibióticos, especialmente en las causadas por *Clostridium*, ya que antagoniza el efecto de la toxina A de *Clostridium difficile* (Amores *et al.*, 2004).

4.4. MICROENCAPSULACIÓN

Existen una gran variedad de técnicas para asegurar que los microorganismos probióticos se mantengan viables en los alimentos y logren llegar al intestino delgado vivos. Una de estas es la microencapsulación, la cual es un proceso en que los microorganismos son introducidos en una matriz o sistema de pared, con el objetivo de impedir su pérdida y protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento (Caicedo, 2010).

Las técnicas de encapsulación aplicadas a probióticos para uso en productos lácteos o en la producción de biomasa se pueden clasificar en dos grupos dependiendo del método utilizado para formar las perlas.

4.4.1. TÉCNICA DE GOTEO DE SOLUCIÓN DE MICROORGANISMOS

Es la técnica más antigua y común para elaborar cápsulas a base de hidrocoloides. Esta consiste en preparar una solución hidrocoloidal, adicionar los microorganismos a ésta, y hacerla pasar por una aguja de jeringa (a nivel laboratorio) o tubos de extrusión (para planta piloto), para formar gotas, estas se dejan caer en caída libre a una solución endurecedora (como el cloruro de calcio). El tamaño y la forma de la perla dependen del diámetro de la boquilla y la distancia de adición. Este método es el más popular debido a su facilidad, simplicidad, bajo costo y condiciones discretas de formulación. El material de soporte usado para la técnica de extrusión es el alginato, debido a las propiedades funcionales que este posee, como la fortaleza en su composición que contribuye a la formación del gel (Caicedo, 2010).

4.4.2. TÉCNICA DE EMULSIÓN

En esta técnica, un pequeño volumen de suspensión hidocoloidal con microorganismos (fase discontinua) se adiciona a un gran volumen de aceite vegetal (fase continua). La mezcla se homogeniza para formar una emulsión de agua en aceite utilizando un emulsificante. Una vez que la emulsión se forma, esta se puede insolubilizar para formar cápsulas de gel en la fase aceitosa. El tamaño de la perla es controlado por la velocidad de agitación. Esta técnica ha sido usada para encapsular bacterias ácido lácticas, como se reportó en el trabajo de Homayouni *et al.*, (2008).

El aceite vegetal es usado en esta técnica como fase continua. En algunos casos se adicionan emulsificantes para mejorar la emulsión, porque el emulsificante disminuye la tensión superficial y se refleja en el tamaño de las esferas.

4.4.3. MATERIALES DE ENCAPSULACIÓN

Existe una amplia variedad de materiales para cobertura que pueden ser usados para encapsular ingredientes alimentarios, donde se incluyen aceites hidrogenados, ceras, maltodextrinas, almidones y gomas que proporcionan una encapsulación uniforme. En general existen tres categorías: grasas, proteínas y polímeros (Caicedo, 2010).

A. GRASAS

La cera de carnauba, el alcohol estearílico y el ácido esteárico son grasas que funden a una determinada temperatura y son erosionables por la acción de las lipasas que existen en la cavidad gástrica (Caicedo, 2010).

B. PROTEÍNAS

La gelatina fue el primer material utilizado en la microencapsulación, y es, en la actualidad, un material con un importante potencial. La albúmina y el colágeno también se han empleado en la obtención de micro partículas (Caicedo, 2010).

C. POLÍMEROS

Debido a su gran versatilidad, la familia de los polímeros es la más utilizada en la microencapsulación de sustancias. Dentro de ella están los polímeros naturales, los semi-sintéticos y los sintéticos. Los polímeros naturales principalmente son de naturaleza polisacárida, ya sea de origen animal o vegetal; y se destacan el alginato, el dextrano, la goma arábica y el quitosano (Saez *et al.*, 2007).

5. PREBIÓTICOS

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que producen efectos benéficos estimulando selectivamente el crecimiento y actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero (Cagigas y Blanco, 2002).

En 1976, Trowel, los describió como diferentes compuestos de origen vegetal que presentan como común denominador el estar constituidos por macromoléculas no digeribles, debido a que las enzimas del intestino humano no pueden hidrolizarlas.

Recientemente se define como el citoesqueleto de los vegetales, una sustancia aparentemente inerte que puede ser fermentada por algunas bacterias, pero no desdoblada por las enzimas digestivas, por lo que resulta no absorbible.

Cabe señalar que para que una sustancia, o grupo de sustancias, puedan ser definidas como prebióticos deben cumplir los requisitos siguientes:

- Ser de origen vegetal.
- Formar parte de un conjunto muy heterogéneo de moléculas complejas.
- No ser digerida por las enzimas digestivas.
- Ser parcialmente fermentada por las bacterias del colon.
- Ser osmóticamente activas.

Toda fibra dietética llega al intestino grueso sin haber sido transformada digestivamente; y donde las bacterias del colon, con sus numerosas enzimas digestivas de gran actividad metabólica, la pueden digerir en mayor o menor medida en dependencia de su composición química y de su estructura (Cagigas y Blanco, 2002).

Esto implica que la fibra dietética sea considerada como un agente prebiótico. La inulina está clasificada como una fibra dietética y como un agente prebiótico (Roberfroid, 2000).

5.1. INULINA

La inulina es un carbohidrato no digerible que está presente en muchos vegetales, frutas y cereales. En la actualidad, a nivel industrial se extrae de la raíz de la achicoria (*Cichorium intybus*) y se utiliza ampliamente como ingrediente en alimentos funcionales. La inulina y sus derivados son generalmente llamados fructanos, que están constituidos básicamente por cadenas lineales de fructosa con una molécula terminal de glucosa (Madrigal y Sangronis, 2007).

En Agaveceae se han encontrado diversas estructuras de fructanos. En agave americana la inulina fue identificada como principal carbohidrato de reserva. Los tallos de agave Veracruz y Agave tequilana almacenan una mezcla compleja de fructo oligosacáridos, inulinas, neo series de inulinas y fructanos ramificados (Ulloa *et al.*, 2010).

En la figura 6 se muestra la estructura química de la inulina, donde se muestra **A**: con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil); **B**: con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil).

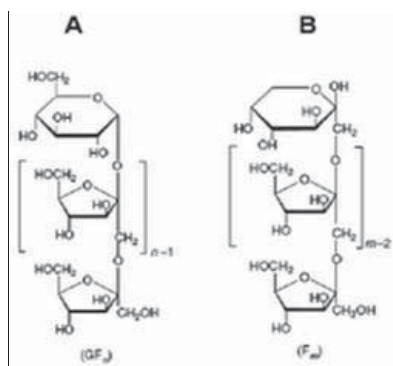


Figura 6. Estructura química de la inulina.

La presencia de ciertas cantidades de inulina o sus derivados en la formulación de un producto alimenticio es condición suficiente para que dicho producto pueda ser considerado como “alimento funcional” (Roberfroid, 2005).

Los fructanos como la inulina, por su configuración química no pueden ser hidrolizados por las enzimas digestivas del hombre y de animales, por lo que permanecen intactos en su recorrido por la parte superior del tracto gastrointestinal, pero son hidrolizados y fermentados en su totalidad por las bacterias de la parte inferior del tracto gastrointestinal (intestino grueso y colón). Así, este tipo de compuestos se comportan como fibra dietética (Slavin, 2003).

5.1.1. USOS INDUSTRIALES

La inulina mejora la aceptabilidad de yogures elaborados con leche descremada, impartándole una mayor cremosidad, también actúa como agente espesante, retiene el agua y estabiliza geles.

Los geles se pueden formar por efecto mecánico o térmico, y el obtenido por el segundo método presenta mejor textura y firmeza (Kim *et al.*, 2001).

La capacidad de formar gel es determinante en su uso como sustituto de grasas en productos lácteos, untables, aderezos, salsas y otros productos en los que las propiedades funcionales que otorgan las grasas son indispensables para lograr los efectos sensoriales deseados por los consumidores (Franck, 2006).

5.1.2. BENEFICIOS A LA SALUD

El uso de la inulina o sus derivados, además de sus usos industriales, aportan beneficios directos a la salud. El primero de ellos es su función de fibra dietética, con los efectos fisiológicos atribuibles a este tipo de compuestos, como son la disminución de los niveles lipídicos y glucosa en sangre y la acción laxante. Otro beneficio comprobado es la capacidad de modular la flora intestinal por su efecto prebiótico. La inulina y sus derivados tienen un aporte calórico reducido, máximo de 1.5 kcal/g, atribuibles a la resistencia que presenta a la digestión y posterior hidrólisis y fermentación por la flora intestinal selectiva del intestino grueso. Solo los ácidos grasos de cadena corta obtenidos como producto metabólico de la actividad bacteriana en el intestino grueso contribuyen a proveer energía al individuo. Cabe señalar que el valor calórico de 1.5 kcal/g es usado para propósitos legales de información en el etiquetado (Madrigal y Sangroris, 2007).

Así mismo, por su efecto hipoglucemiante, la inulina se recomienda en la dieta de individuos con problemas de diabetes. Por otro lado, investigaciones con ratas y humanos indican un incremento de la absorción de calcio y otros minerales cuando se usa inulina y sus derivados en la dieta, con consecuencias positivas en el contenido y densidad de los huesos. En adolescentes, la dosis necesaria para observar esos resultados fue 8 g/día de inulina durante 8 semanas (Bosscher *et al.*, 2005). También se demostró el efecto positivo de la inulina y sus derivados en la absorción de magnesio (Coudray *et al.*, 2003).

6. GRASAS Y ACEITES

Las grasas y los aceites son alimentos fundamentales en la dieta, que además de constituir la principal fuente de energía para el organismo, aportan elementos indispensables como vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, esteroides precursores de hormonas, entre otros, y además, son responsables de la palatabilidad y aroma de los alimentos.

Se entiende por aceite, aquella materia lípida que se conserva en estado líquido en los países templados. Un ejemplo típico son los aceites de girasol, soya, oliva, etc. Por otro lado, las grasas son lípidos en estado sólido a temperatura ambiente. Hoy en día, se puede convertir un aceite en una grasa por un proceso industrial llamado “hidrogenación”.

Los lípidos son una parte integral de casi todos los alimentos. Contribuyen con suavidad en la corteza de pastelería, en los pastelillos de grasa y en las galletas. Las grasas contribuyen o modifican el sabor de los alimentos e influyen en su “sensación bucal”.

La longitud y el grado de insaturación determinan el tipo de ácido graso, sus efectos metabólicos y, concretamente como súper-modulador de los niveles de colesterol sanguíneo y desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV). El papel de las grasas de la dieta sobre el riesgo cardiovascular no solo está dado por una cantidad de grasa sino por el tipo y la distribución cualitativa en la dieta (Gil, 2010).

6.1. ÁCIDOS GRASOS SATURADOS

Los ácidos grasos saturados están presentes principalmente en las grasas animales y en algunas vegetales como la de palma y el coco, en la grasa de la leche y en los derivados lácteos. Estas grasas producen una elevación en los niveles séricos de colesterol aumentando por lo tanto el riesgo cardiovascular. Por otra parte, existe una graduación importante en el efecto deletéreo de estas grasas, siendo el peor el ácido mirístico (14:0), seguido del palmítico (16:0), láurico (12:0), mientras que el esteárico (18:0) parece tener un efecto neutro (Gil, 2010).

6.2. ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS

Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) presentan un efecto beneficioso sobre el perfil lipídico, en especial el ácido oleico que genera pocos derivados de cadena larga, al menos en situaciones fisiológicas.

A nivel lipídico origina una reducción de triglicéridos, del colesterol total, y la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL), la cual se encarga del transporte del colesterol del hígado a los tejidos a través de las arterias y cuando esta fracción se encuentra en exceso se puede acumular en arterias y favorecer la arteriosclerosis. Además, el ácido oleico es una de las pocas sustancias conocidas capaz de inducir la elevación de la fracción de la lipoproteína de alta densidad (HDL) que se encarga de recolectar el colesterol de la tejidos y llevarlo al hígado para

su excreción, y con ello retirar el colesterol de arterias, evitando así que se acumule (Mataix 2001).

Por otro lado, el grupo de los ácidos grasos poliinsaturados indispensables (AGPIs), ácido linoleico n-6 y ácido linolénico n-3 se obtienen a través de la dieta y son precursores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPIs-CL) araquidónico (AA) y docosahexaenoico (ADH), respectivamente (Gil, 2010).

Los AGPIs pueden reducir la concentración de triglicéridos en la sangre a través de la oxidación de ácidos grasos por medio de la activación de PPAR α (factores de transcripción) o a través de la represión de SREBP-1 (factores de transcripción) que inhibe la lipogénesis. Debido a su efecto hipolipémico y a su efecto anti inflamatorio, los AGPIs podrían tener efectos benéficos en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Las principales fuentes alimenticias de AGPIs n-6 son los aceites de maíz, cártamo y soya; y las de AGPIs n-3 son la linaza y los aceites de pescados, canola y de soya (Gil, 2010).

El descubrimiento de que algunos ácidos grasos puedan actuar como ligandos de factores de transcripción indican que estos ácidos grasos no son solamente moléculas pasivas que aportan energía, sino que también son reguladores metabólicos. Los ácidos grasos que provienen de la dieta entran a los enterocitos por medio de una proteína que transporta ácidos grasos localizada en la pared intestinal. Los ácidos grasos con más de 14 carbonos, como es el caso del ácido linoleico (AL) y el ácido linolénico (ALN), se esterifican para formar triglicéridos dentro del enterocito y pasan a la circulación sanguínea a través de la vía linfática en forma de quilomicrones (Rodríguez *et al.*, 2005).

La enzima lipoproteína lipasa (LPL), que se encuentra en la pared interna de los capilares sanguíneos, hidroliza los triglicéridos presentes en las lipoproteínas de los quilomicrones liberando ácidos grasos, incluyendo los AGPIs (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los AGPIs libres se incorporan en los triglicéridos del tejido adiposo e inhiben la expresión génica de enzimas involucradas en la lipogénesis; así mismo, en el músculo incrementan la oxidación de ácidos grasos y reducen la acumulación de triglicéridos; en la glándula mamaria lactante, se utilizan para la síntesis de los lípidos de la leche, en el hígado son incorporados a triglicéridos y suprimen la síntesis de lípidos y estimulan la oxidación de ácidos grasos (Rodríguez *et al.*, 2005).

En la figura 7 se muestra el metabolismo de los ácidos grasos esenciales.

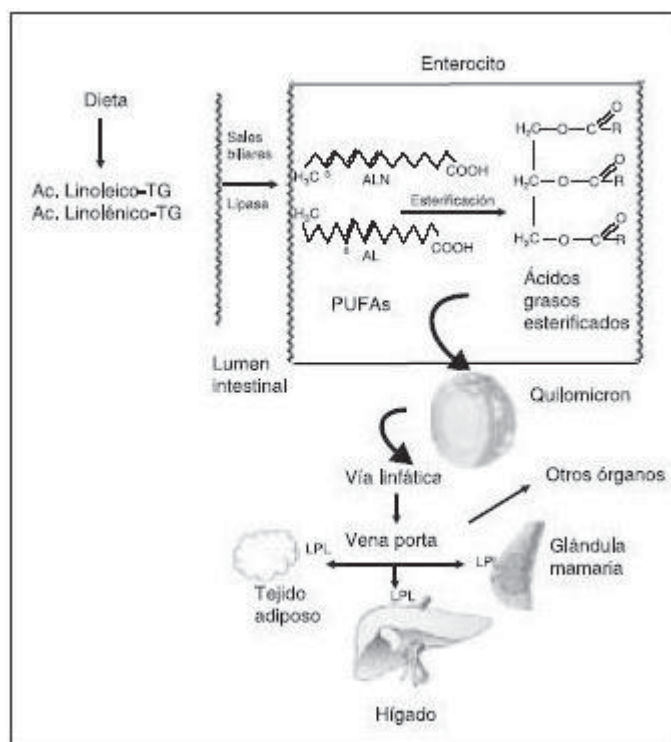


Figura 7. Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados.

6.2.1. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

En 1952, Kinsell *et al.*, y Groen *et al.*, fueron los primeros en reportar que la sustitución de grasa animal por aceite vegetal en la dieta de humanos producía una disminución en la concentración de colesterol en suero. La acción hipocolesterolémica e hipotrigliceridémica del ácido linoleico en humanos se confirmó por varios grupos de investigación, observándose que el consumo de este ácido graso disminuía la concentración de triglicéridos y colesterol en un 50% en sujetos hiperlipémicos.

El ácido linoleico de la dieta cambia la distribución del colesterol entre el plasma y los tejidos, este se utiliza principalmente en rutas oxidativas. Posteriormente se demostró que la mitocondria hepática de la rata oxida al ácido linoleico 10 veces más rápido que un ácido graso saturado, como el ácido palmítico (Rodríguez *et al.*, 2005).

Estos hallazgos indicaban que probablemente el efecto hipocolesterolémico del ácido linoleico podría deberse a cambios en el metabolismo de los ácidos grasos más que a cambios en el metabolismo del colesterol (Rodríguez *et al.*, 2005).

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un gran interés por parte de la industria alimenticia de elaborar nuevos productos que contengan componentes que proporcionen calidad nutricional y que al mismo tiempo brinden beneficios a la salud. Estos alimentos han adquirido gran importancia y popularidad, por lo que la población los consume con mayor frecuencia y así disminuyen el riesgo a adquirir una gran variedad de enfermedades y por lo tanto mejorar su calidad de vida.

Por este motivo se busca desarrollar un nuevo producto lácteo fermentado tipo yogurt que incorpora agentes prebióticos, probióticos y sustituye grasas animales por grasas vegetales libres de colesterol.

Los agentes probióticos incluyen a los microorganismos bacterianos *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, naturales en el yogurt, a demás de la adición de la levadura *Saccharomyces boulardii*; y como agente prebiótico; la inulina, estos componentes funcionales se presentarán en el producto terminado en cantidades adecuadas para brindar un carácter funcional significativo a dicho alimento; el incluir grasa vegetal en lugar de grasa animal brindara dos efectos positivos en el producto: por una parte disminuye el costo del producto por ser la grasa vegetal de menor precio que la grasa animal y por otro lado está el beneficio a la salud, ya que la grasa vegetal tienen menor cantidad de ácidos grasos saturados y mayor cantidad de ácidos grasos insaturados que la grasa animal; la suma de estos componentes en el producto serán muy atractivos para el consumidor por el carácter funcional que brinda el producto en la salud humana.

III. HIPÓTESIS

La adición de agentes funcionales; prebióticos (inulina) y probióticos (*Saccharomyces boulardii*), no modificará las propiedades de un yogurt elaborado con grasas vegetales.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una formulación estable para una bebida funcional tipo yogurt utilizando grasas vegetales, con la incorporación de inulina como agente prebiótico, la levadura *Saccharomyces boulardii* como agente probiótico, y evaluar su vida de anaquel.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar un Cultivo Madre a partir de las bacterias lácticas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.
- Selección de la leche que se usará como materia prima para la fermentación.
- Sustituir la grasa butírica presente en la leche por grasas vegetales y obtener la bebida tipo yogurt por la fermentación de dicha leche usando el Cultivo Madre.
- Establecer los niveles de inulina como agente prebiótico, y observar sus propiedades como agente espesante sobre la estabilidad de la bebida funcional tipo yogurt.
- Incorporar y determinar la viabilidad del microorganismo *Saccharomyces boulardii* como agente probiótico en la bebida funcional tipo yogurt.
- Probar diferentes aditivos químicos para lograr que la bebida tipo yogurt sea estable como producto terminado con la incorporación de los aceites vegetales y los agentes prebióticos y probióticos.
- Determinar la vida de anaquel del producto terminado.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO EXPERIMENTAL

De acuerdo con los objetivos de este trabajo, se establecieron una serie de puntos que se deben cumplir para la elaboración del producto lácteo, entre los cuales están:

- Utilizar una leche descremada para sustituir la grasa animal por grasa vegetal. Esta leche debería de contener la mínima cantidad de grasa butírica, y siendo seleccionadas las leches marca Siluette® y Svelty®, las cuales tienen un contenido de grasa de leche de 0.2% y con ello ideales para la incorporación de la grasa vegetal de palma.
- Selección de las grasas vegetales. Se usaron grasas provenientes de la empresa AarhusKarlsham (AAK), localizada en Morelia, Michoacán.
- Una fuente de fibra soluble que actué como prebiótico como es la inulina.
- Incorporación de un agente probiótico como es la levadura *Saccharomyces boulardii*.

A continuación se diseñaron diversos pasos a seguir:

1. Adquirir las bacterias *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* para la elaboración del yogurt.
2. Elaborar un cultivo madre con las características adecuadas de pH y acidez, usando como sustrato la leche Siluette® y Svelty®, y conocer cuál de las dos leches presenta mejores características fisicoquímicas para la elaboración de la bebida tipo yogurt.
3. Realizar un análisis bromatológico y fisicoquímico a un yogurt comercial, además de consultar Normas Oficiales Mexicanas y Normas Mexicanas que nos permitirán formular nuestro producto de una manera adecuada.
4. Elaborar diferentes formulaciones en las cuales se incorpora grasa vegetal, tomando como base la concentración de grasa butírica encontrada en el yogurt comercial.
5. Selección e incorporación de emulsificantes para estabilizar las grasas vegetales en el yogurt.
6. Incorporar el agente prebiótico, inulina, en una concentración del 4 %.
7. Usar diferentes tipos y concentraciones de aditivos hasta llegar a la formulación estable libre de sinéresis.
8. Realizar análisis bromatológicos, fisicoquímicos y microbiológicos al producto terminado.
9. Análisis sensorial del producto terminado.
10. Incorporar la levadura *Saccharomyces boulardii* como agente probiótico en el yogurt a una temperatura de 25 °C y evaluar los cambios organolépticos del producto en almacenamiento 4°C.

11. Evaluar la vida de anaquel del producto terminado. Se incluyen pruebas de pH, % de ácido láctico, sinéresis, viscosidad, conteo de bacterias lácticas y de la levadura *Saccharomyces boulardii*, además de un análisis organoléptico por un lapso de 21 días.

2. MATERIAS PRIMAS

2.1. LECHE

Se empleó leche líquida marca Svelty® y marca Silhouette® que contienen 0.2% de grasa.

2.2. CULTIVO LÁCTICO

Se usaron los microorganismos *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *Streptococcus salvarius* spp. *thermophilus* de la empresa Danisco. Este es un cultivo liofilizado que se utilizó para elaborar el cultivo madre usando como sustrato la leche desgrasada.

2.3. PROBIÓTICO

Cultivo de *Saccharomyces boulardii* proporcionado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

2.4. PREBIOTICO (INULINA)

Fibra soluble extraída del Agave Tequilana subespecie *waver* variedad azul. Esta tiene un 97% de inulina y un 3% de fructosa. Proporcionada por el Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.

2.5. SUSTITUTOS DE GRASA DE LA LECHE

Grasas vegetales de palma de consistencia sólida proporcionadas por la empresa AarhusKarlsham (AAK) ubicada en Morelia, Michoacán, México.

3. MÉTODOS

3.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

3.1.1. HUMEDAD.

Se utilizó el método de AOAC (2000) número 934.01

3.1.2. PROTEÍNA.

Se utilizó el método de MacroKjeldahl.

3.1.3. LÍPIDOS.

Se utilizó el método de Gerber.

3.1.4. CENIZAS.

Se utilizó el método de incineración. Normas Sanitarias de Alimentos. Tomo 1. Norma técnica general de métodos físicos y químicos para el análisis de alimentos.

3.1.5. FIBRA DIETETICA. SOLUBLE E INSOLUBLE.

Se uso el método enzimático de Prosky *et al.* (1988).

3.1.6. CARBOHIDRATOS

Se calcularon por diferencia.

3.2. PREPARACIÓN DEL CULTIVO LÁCTICO MADRE

La elaboración de un cultivo madre a partir de un cultivo láctico liofilizado consta de varias etapas como son la activación de este cultivo, seguido de la propagación del mismo y así poder obtener un cultivo madre que se utiliza en la elaboración del yogurt (Romero y Mestres 2004).

El cultivo madre se elaboró a partir de un cultivo láctico liofilizado (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*) que se inoculó en dos tipos de leches descremadas: Siluette® y Sveltty®, y se llevo a cabo su fermentación, este método se muestra en la figura 8.

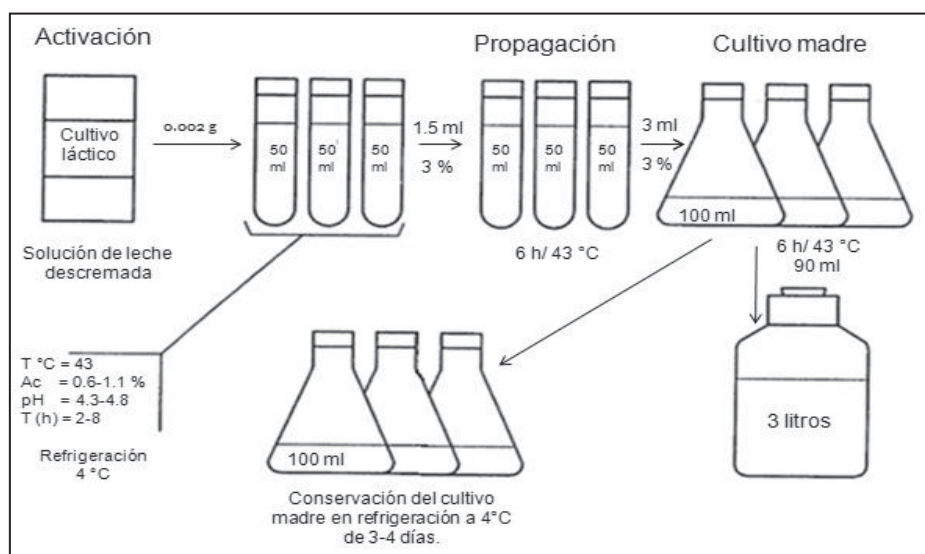


Figura 8. Método de elaboración del cultivo madre.

3.3. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

3.3.1. ACIDEZ.

Se usó la técnica de titulación ácido-base.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE PH

Se utilizó la técnica del potenciómetro.

3.3.3. GRADO DE SINÉRESIS.

Se utilizó la técnica descrita por Guinee *et al.*, (1995).

Se pesaron 10 g de la muestra y se colocaron en tubos para centrifuga por triplicado. Centrifugar por 20 min a 5,000 rpm. Después de la centrifugación se obtuvo el peso del sobrenadante.

Cálculos

Se calculó el grado de sinéresis (p/p), mediante la relación del peso de la muestra y el peso del sobrenadante.

3.3.4. VISCOSIDAD Y PROPIEDADES REOLÓGICAS.

Se utilizó el viscosímetro digital Brookfield DV-III. (Brookfield Engineering Laboratories Inc. Middleboro, MA), para realizar las determinaciones. Se colocaron las muestras en vasos de 400 mL y se utilizó la aguja LV4. Se tomaron mediciones de viscosidad y torque a las diferentes velocidades de giro (0.5-100 rpm) a 11 °C.

3.4. PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *SACCHAROMYCES BOULARDII*

La levadura *Saccharomyces boulardii* se sembró en Agar Papa Dextrosa para activar su metabolismo, y se incubó por 3 días a 25 °C. Se realizaron 3 resiembras de la misma.

Se inocularon 50 ml de caldo nutritivo con la levadura activada hasta llegar a una concentración de 6×10^8 UFC/ml cuantificación realizada por patrones de turbidez usado la escala MacFarland. Este cultivo se incubó a 25 °C en agitación por 48 h (Zamora, 2011).

Una vez obtenido el pre-inoculo se verificó su pureza por una tinción Gram y se inoculó en 450 ml de caldo nutritivo y se incubó en las condiciones descritas anteriormente, al término de la incubación se realizó un conteo de las levadura vivas procedentes del caldo nutritivo, el método de conteo en placa que se uso fue el descrito en la NOM-111-SSA1-1994.

La biomasa que se obtuvo se centrifugo a 5,000 rpm por 10 min, obteniendo un botón celular, mismo que fue incorporado en la bebida tipo yogurt a 25 °C al final de la fermentación láctica.

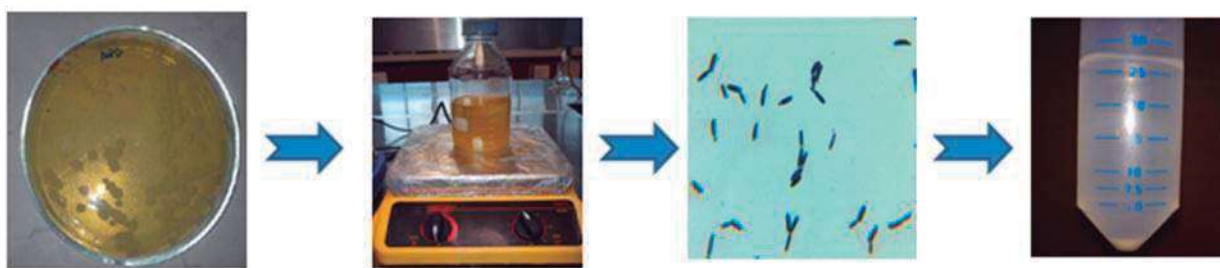


Figura 9. Producción de biomasa de *Saccharomyces boulardii*.

3.5. MICROENCAPSULACIÓN

Durante la elaboración del yogurt se observó que al agregar el probiótico *Saccharomyces boulardii* hubo cambios organolépticos en el producto terminado. Se decidió aislar y encapsular dicho microorganismo para evitar dichos cambios sensoriales.

La encapsulación del microorganismo fue realizada mediante una adaptación de la técnica de emulsión propuesta por Rosas-Flores (2008) y Ariza *et al.* (2010). La técnica está basada en la formación de una emulsión agua en aceite (W/O).

La metodología a seguir fue la siguiente:

En un vaso de precipitados se colocaron 100 ml de agua destilada estéril, este se colocó en una parrilla con agitación entre 60-80 °C, se agregaron 0.05 g de mucílago de nopal, 0.05 g de inulina y 1 g de alginato de sodio lentamente por las paredes hasta que se disolvieron los componentes, se atemperó y se agregó el botón celular (*Saccharomyces boulardii*) obtenido por centrifugación, resultado del crecimiento de las cepas puras de *Saccharomyces boulardii* en caldo nutritivo durante 48 h y se agregó a la mezcla CaCO_3 hasta disolución completa. El conjunto de estos componentes conformaron la Fase acuosa.

En forma separada, se mezclaron 200 mL de aceite de canola (Aceite Capullo®, México) con 2.5 mL de Tween 80 (fase oleosa). En agitación constante la fase acuosa se adicionó a la fase oleosa, permitiendo la formación de la emulsión W/O, y en seguida se agregaron 40 mL del mismo aceite, mezclado con 1.7 ml de ácido acético para iniciar el proceso de gelificación.

Este sistema se mantuvo en agitación durante 20 min para la completa formación de las cápsulas y posteriormente se dejó reposar por 30 min. Finalmente, se decantó y filtro, las cápsulas fueron lavadas con agua destilada estéril y dos veces con una solución buffer de fosfatos (pH = 7.2) para eliminar los residuos de aceite (Zamora, 2011).

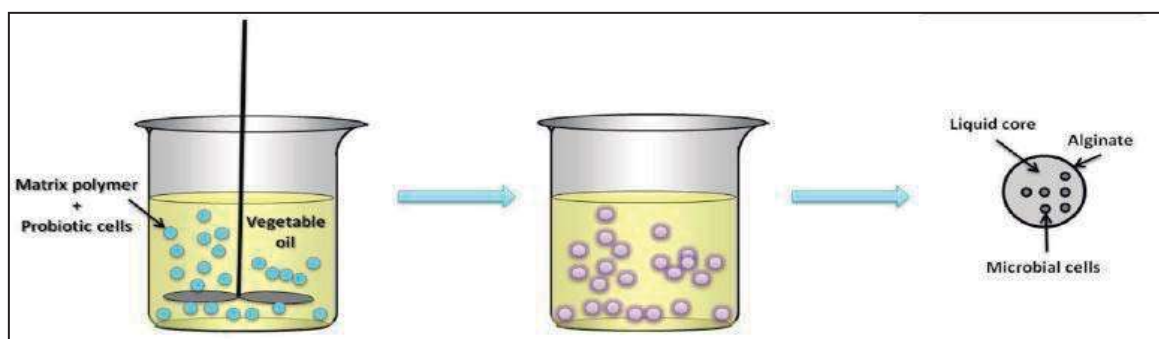


Figura 10. Procedimiento de emulsificación.

3.6. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

De acuerdo a la NMX-F-444-1983, el yogurt debe cumplir con las especificaciones microbiológicas anotadas en la tabla 7.

Tabla 7. Especificaciones Microbiológicas.

ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS	
Organismos coliformes. Máximo	10 UFC/g
Hongos. Máximo	10 UFC/g
Levaduras. Máximo	10 UFC/g
Bacterias lácticas vivas. Mínimo	2,000.000 UFC/g

3.6.1. *L. BULGARICUS* Y *S. THERMOPHILUS* EN YOGURT.

Se usó la técnica acorde a la NC ISO 7889: 2009.

Se homogeneizó la muestra de yogurt y se pesaron de 10 g de la muestra en un recipiente estéril, y se pesaron 90 g del diluyente (agua peptonada 1%) para obtener la dilución 1:10.

Preparación de diluciones decimales:

- Se realizaron diluciones seriadas en tubos con 9.0 mL de solución amortiguadora de peptonas y añadiendo 1.0 mL de la primera dilución al primer tubo.
- Se repitió esta operación hasta obtener la dilución requerida (10^{-7}) y utilizando una pipeta diferente para cada dilución.

Inoculación e Incubación:

Se colocaron 10 μ L de las cuatro últimas diluciones en cajas Petri. Se inoculó *S. thermophilus* en agar M17 y *L. bulgaricus* en agar MRS acidificado. Método realizado por cuadruplicado.

Se incubaron las placas destinadas para la numeración de *L. bulgaricus* a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 h en jarra de anaerobiosis, en la que se incrementó la concentración de CO_2 con la técnica de reducción de oxígeno con vela, para un mejor crecimiento de estos microorganismos. Las placas destinadas para la enumeración de *S. thermophilus* se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h en aerobiosis. Después del periodo de incubación específico para cada microorganismo se contaron las placas que tenían entre 15 y 300 colonias.

Confirmación:

Se tiñeron las colonias utilizando el método de Gram comprobándose que eran bacilos Gram positivos los microorganismos que crecieron en el medio MRS; y cadenas de cocos Gram-positivo, aquellos que crecieron en el medio M17. Se utilizó la técnica de catalasa con H_2O_2 , corroborando que los microorganismos que crecieron en los medios MRS y M17 eran catalasa negativos.

Cálculos

Se utilizaron las cuentas de las placas que contenían entre 15 y 300 colonias. El número de microorganismos característicos por gramo es igual a:

$$\text{Número} = \frac{C}{(n_1 + 0.1n_2) d}$$

Donde:

C: Suma de colonias contadas en las placas n_1 y n_2 .

n_1 : Número de placas contadas en la menor dilución.

n_2 : Número de placas contadas en la mayor dilución.

d: Dilución en la cual la primer cuenta se obtuvo.

3.6.2. MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS

Se usó la técnica acorde a la NOM-111-SSA1-1994. Se uso el microorganismo tipo levadura *Saccharomyces boulardii* como agente probiótico mismo que se cuantificó por este método.

Se tomaron 10 mL de la muestra de yogurt con pipeta estéril y se pasaron a un matraz Erlenmeyer que contenía 92.0 mL de una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2 (dilución 1:10). Se homogeneizó la muestra y se tomaron 10 mL de la solución anterior y se transfirió a un matraz Erlenmeyer que contenía 92.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2. Se agitó. Se realizó esta operación tantas veces como diluciones fueron necesarias para el análisis.

Diluciones hasta 10^{-3} para el reporte de mohos y levaduras en general del yogurt terminado. Y hasta 10^{-7} para el conteo del probiótico *Saccharomyces boulardii*, en donde se colocaron 10 μ L de las cuatro últimas diluciones en cajas Petri en Agar Papa Dextrosa acidificado a pH de 3.5. Se dejo secar y se invirtieron las cajas, mismas que se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Se utilizó una pipeta estéril para cada dilución. El análisis se realizó por duplicado y cuadruplicado respectivamente.

Se contaron las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, se seleccionaron aquellas placas que contenían entre 10 y 150 colonias. Se realizó una tinción de Gram para la observación microscópica de las levaduras obtenidas.

Cálculos

Los cálculos se aplicaron a aquellas placas que contienen entre 10 y 150 colonias características. Se calculó el número levaduras por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente.

3.6.3. CUENTA DE COLIFORMES TOTALES ENPLACA.

Se uso la técnica acorde a la NOM-113-SSA1-1994.

Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} de la muestra de yogurt en solución amortiguadora de fosfatos, y se colocó 1 ml de las diluciones en cajas petri, se utilizó una pipeta estéril para cada una.

Se vertieron de 15 a 20 ml del medio Agar de bilis rojo violeta (RVBA) mantenido a 45 °C en baño maría en las cajas petri. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el tiempo en que se vierte en el medio de cultivo no debe exceder los 20 minutos. El método se realizó por duplicado.

Se preparó una caja control de 15 ml de agar para verificar esterilidad.

Después de que el medio se solidificó en la caja, se vertieron 4 ml del Agar RVBA a 45 °C, en la superficie del medio inoculado y se dejó solidificar. Se Invirtieron cajas y se incubaron durante 24 ± 2 horas, y después del tiempo estipulado se contaron el número de colonias.

Cálculos

Los cálculos se aplicaron a aquellas placas que contenían entre 15 y 150 colonias características en dos diluciones consecutivas. Se calculó el número de coliformes por mililitro de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente.

3.7. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

La grasa vegetal de palma fue extraída por el método Soxhlet a partir de un liofilizado del yogurt. Se cuantificó el perfil de ácidos grasos por el Método CHEM32, Cromatografía de Gases, se usó la columna de la marca Agilent Technologies, técnica realizada en la empresa AarhusKarishamn (AAK) ubicada en Morelia, Michoacán, México.

3.8. EVALUACIÓN SENSORIAL

Se realizaron pruebas panel para detectar el grado de aceptación en los parámetros de color, olor, sabor y textura, también conocidos en conjunto como *flavor* en los yogures elaborados: Yogurt con aceite vegetal e inulina, yogurt con aceite vegetal, inulina y sacarosa y yogurt con aceite vegetal, inulina y mermelada de frambuesa. A demás el producto elaborado se comparó con otros yogures comerciales: Yoplait® y Bio Balance®. Y se evaluó sensorialmente durante la vida de anaquel.

Se aplicó una prueba afectiva a 16 panelistas inexpertos, utilizando una escala hedónica de cinco puntos que va desde me gusta mucho con calificación 5 a me disgusta mucho con calificación 1.

Tabla 8. Escala Hedónica para Análisis Sensoriales.

ESCALA HEDÓNICA	
Me gusta mucho	5
Me gusta	4
Ni me gusta ni me disgusta	3
Me disgusta	2
Me disgusta extremadamente	1

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se elaboró una bebida tipo yogurt con grasas vegetales de palma, inulina y *Saccharomyces boulardii* como agente probiótico. La concentración de grasas vegetales que se debían incorporar al producto a elaborar fue basada en un análisis bromatológico realizado a un yogurt comercial Yoplait®. Éste análisis fue de utilidad al mismo tiempo para conocer la cantidad sólidos totales presentes y así tener una base para formular nuestro producto, la cantidad de inulina se estableció de acuerdo a una revisión bibliográfica.

Se elaboró un cultivo madre usando como sustrato leche Silhouette® y leche Svelty®; mismas que fueron fermentadas por las bacterias lácticas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, resultando con mejores características de pH y acidez la leche Silhouette®.

Para el proceso de elaboración del yogurt se mezclaron la leche Silhouette® con inulina y grasas vegetales, se llevaron a pasteurización y se fermentaron usando el cultivo madre como inóculo.

Cabe señalar, que una vez obtenido el producto se observaron agregados de grasa vegetal, por lo cual se adicionaron emulsificantes para estabilizar la emulsión entre la leche y las grasas vegetales, y posteriormente se adiciono la inulina y se pasteurizó. El producto se inoculó con el cultivo madre y este se llevó a fermentación, con esto se evitaron los agregados de grasa. Sin embargo este producto presento sinéresis y baja viscosidad por lo que se utilizaron aditivos que lograron brindarle mayor estabilidad e incrementar la viscosidad.

Finalmente se realizó un análisis sensorial al producto, el cual presentó un sabor poco agradable por lo que se formularon 2 nuevos productos, uno con sacarosa y otro con mermelada de frambuesa. En base a pruebas sensoriales se concluyó que el producto que presentó mejor aceptación fue el que además de inulina, grasas vegetales y aditivos contenía sacarosa.

A este producto se le adicionó la levadura *Saccharomyces boulardii* después de haberse llevado a cabo la fermentación láctica. Sin embargo, se presentaron características sensoriales desagradables a las 48 h de almacenamiento; probablemente por un fenómeno de fermentación por parte de la levadura sobre el producto terminado. En base a esto, se decidió encapsular a la levadura y así se logró evitar la fermentación del producto por dicho microorganismo durante su almacenamiento, obteniéndose que en 7 días en almacenamiento no se percibieran cambios sensoriales desagradables. Cabe señalar que la encapsulación no es parte de este trabajo, por lo que no se incluyó en la formulación final.

Al producto elaborado, denominado YOG AAK, mismo que contiene inulina, grasas vegetales, aditivos y sacarosas pero no la levadura *Saccharomyces boulardii*, se le realizaron

análisis bromatológico, fisicoquímico y microbiológico, además de que se comparó con productos en el mercado, y se realizaron análisis de vida de anaquel a dicho producto.

1. ESTANDARIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL YOGURT

1.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE UN YOGURT COMERCIAL

Como ya se mencionó, para la formulación de nuestro yogurt se tomó como referencia datos obtenidos de un análisis bromatológico realizado a un yogurt comercial (Yoplait®). Estos resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Humedad y Sólidos Totales.

Componente	Yogurt Yoplait® (%)
Humedad	79.02 ± 0.061
Sólidos totales	20.98 ± 0.077
Total	100

Tabla 10. Análisis Bromatológico.

Componente	Yogurt Yoplait® (%)
Humedad	79.02 ± 0.061
Carbohidratos	14.28
Fibra dietética	0.00
Lípidos	2.50 ± 0.081
Proteínas	3.30 ± 0.069
Cenizas	0.90 ± 0.083
Total	100

En base a los datos anteriores se estableció lo siguiente:

1.1.1. ADICIÓN DE GRASAS VEGETALES

Los lípidos presentes en un yogurt comercial entero (Yoplait®) están en una concentración de 2.5%, estos lípidos fueron sustituidos por aceite de palma proporcionados por la empresa AAK. Estas grasas se caracterizan por no contener colesterol y por tener una menor cantidad de ácidos grasos saturados y mayor cantidad de ácidos grasos insaturados con respecto a la grasa de la leche. Debido a que la leche Silhouette® y Svelty® presenta un 0.2 % de grasa butírica, solo se adicionaran 2.3 % de grasa vegetal para dar un total de 2.5% misma cantidad que se presenta en un yogurt comercial.

1.1.2. ADICIÓN DE INULINA

La incorporación de inulina en la bebida tipo yogurt, además de proporcionar el carácter funcional al producto, le brindará cierta viscosidad por tratarse de una fibra de tipo soluble.

La inulina con 97 % de pureza se adicionó en una concentración de un 4 %; debido a que esta es la concentración necesaria para incrementar el número de bacterias beneficiosas en el colon (Rao, 1999) y (Jenkins *et al.*, 1999). Así mismo Abrams *et al.*, (2005) y Bosscher *et al.*, (2005), demostraron que la dosis necesaria para observar esos resultados fue 8 g/día de inulina durante 8 semanas.

1.1.3. ELABORACIÓN DEL CULTIVO MADRE

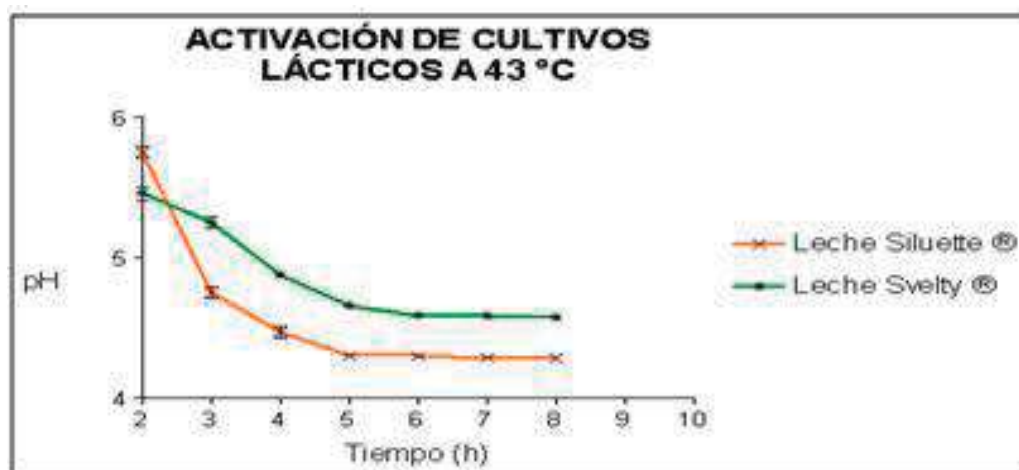


Figura 11. Cambios de pH en función del tiempo.

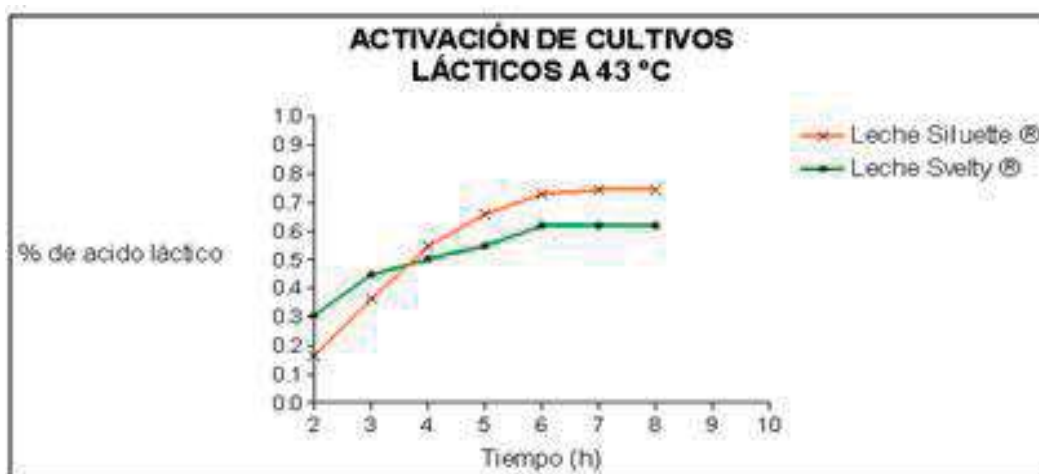


Figura 12. Cambios de acidez en función del tiempo.

La activación de cultivos lácticos arrojó mejores características de pH y acidez utilizando leche Siluette® como sustrato para el cultivo láctico, como se presenta en la figura 11 y 12.

Esto puede ser debido a que la leche Siluette® presenta mayor cantidad de lactosa, que es el sustrato utilizado por las bacterias lácticas para producir ácido láctico y por tanto se produce un

mayor descenso en el pH. Hay que destacar que esta es una característica importante en este tipo de productos ya que el yogurt se caracteriza por ser un producto lácteo con cierta acidez.

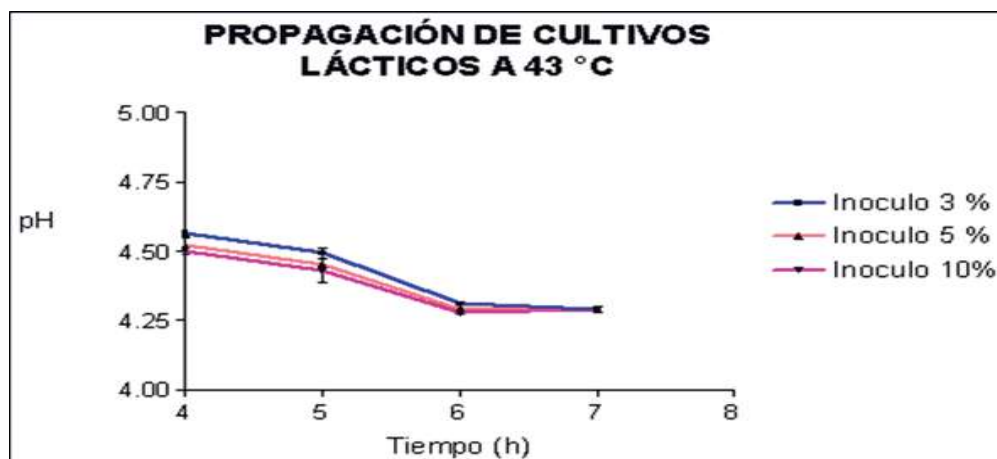


Figura 13. Influencia del inóculo en cambios de pH en función del tiempo.

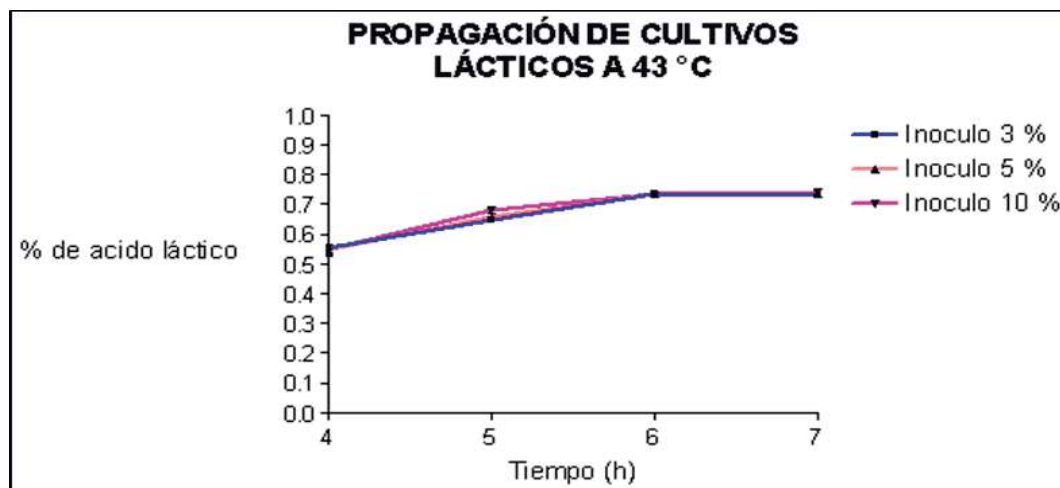


Figura 14. Influencia del inóculo en cambios de acidez en función del tiempo.

La propagación del cultivo láctico se realizó inoculando la leche Silhouette® con un inóculo activado de bacterias lácticas en una concentración de 3%, 5% y 10%. Las distintas concentraciones se utilizaron para observar la influencia que tiene la cantidad de inóculo en el tiempo de fermentación; sin embargo como se muestra en las figuras 13 y 14, se comportan de

una manera muy similar, de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 %, nos indica que no existió diferencia estadística significativa entre ellas. Se observó que a las 6 h de incubación, ya no hay una mayor producción de ácido láctico ni descenso del pH. Las bacterias lácticas llegan a una fase estacionaria que puede darse debido al cultivo láctico empleado o a la concentración de lactosa presente en la leche, por tanto fue el momento ideal para detener la fermentación.

Acorde a los resultados, se determinó que las condiciones óptimas de fermentación para obtener el cultivo madre fueron: inóculo al 3% de cultivos lácticos a una temperatura de 43°C por 6 h, y con lo cual se obtiene un cultivo madre con un pH de 4.34 ± 0.025 y con 0.74 ± 0.004 % de ácido láctico. Este cultivo madre se debe utilizar como inóculo al 3% a una temperatura de incubación de 43°C durante 6 h para la producción del yogurt a elaborar. Romero y Mestres (2004) describen que para que un cultivo iniciador mantenga sus propiedades es necesario que su tiempo de incubación, temperatura de incubación y pH final sean siempre las mismas, por lo que es muy importante mantener las condiciones anteriormente descritas durante su elaboración.

En función a las propiedades fisicoquímicas se seleccionó la leche Silhouette® como sustrato para el proceso de fermentación.

Acorde a los datos anteriores, se elaboró la primera formulación, la cual se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Formulación 1. Bebida funcional tipo yogurt.

Componente	%
Leche Silhouette	90.7
Grasas vegetales	2.3
Inulina	4.0
Cultivos lácticos (inóculo)	3.0
Total	100

Nota: Para que el producto tenga una concentración del 4 % de inulina se deberán de beber 103 g de yogurt y para consumir 8 g de inulina al día se deberán beber 206 g de yogurt.

2. PROCESO DE ELABORACIÓN

2.1. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA ELABORACIÓN

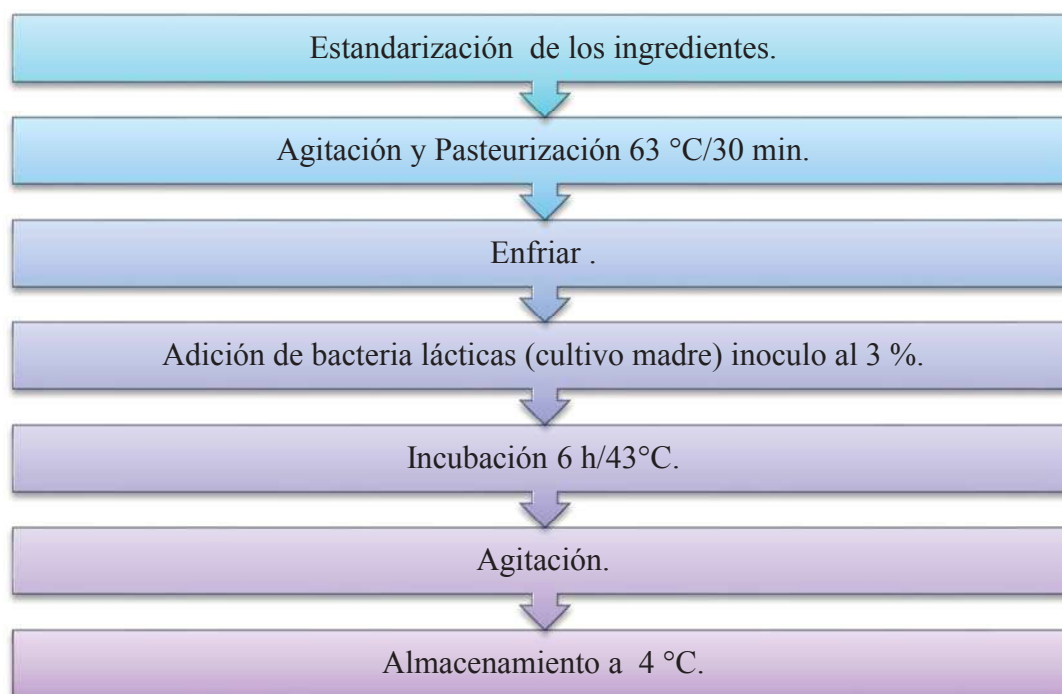


Figura 15. Diagrama de flujo para la elaboración del yogurt.

En la figura 15 se muestra un diagrama de flujo para la elaboración de la bebida tipo yogurt, mismo que se basó en lo descrito por Tamime y Robinson en 1991, con ciertas modificaciones.

Existen algunos detalles que es necesario describir en el proceso de elaboración del producto, como es la incorporación de la grasa vegetal. Cuando se obtiene el producto terminado se presentan agregados de grasa vegetal, debido a una deficiente estabilidad de la emulsión.

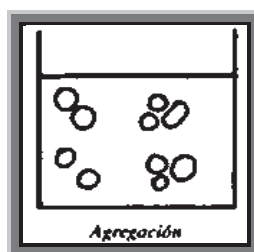


Figura 16. Esquematización de los agregados de grasa vegetal formados en el producto.

Esto puede ser debido a que durante la estandarización se observó que la grasa vegetal no se incorporó adecuadamente en la leche Silhouette®. En la figura siguiente se muestra la separación de las fases acuosa y lipídica.



Figura 17. Separación de fases lipídica y acuosa.

En función de la separación de fases, se emplearon emulsificantes tipo mono y diglicéridos en diferentes concentraciones: 0.1%, 0.3% y 0.5%. Presentándose mejor la incorporación de la grasa vegetal en la leche a una concentración del 0.5 % de emulsificantes.

La adición de este tipo de emulsificantes mono y diglicéridos se debe hacer a 60 °C y en agitación para aumentar la superficie de contacto entre el agua y el aceite con lo que se reduce la tensión interfacial, y esto contribuyen a que los enlaces hidrofílicos y lipófilos logren captar el agua y el aceite y se logre formar la emulsión de una manera satisfactoria.

Al usar los emulsificantes se incorpora totalmente la grasa vegetal en la leche durante la estandarización con ayuda del efecto mecánico y térmico; sin embargo, durante la pasteurización se separa una fracción de la grasa adicionada, misma que se incorpora satisfactoriamente después de la fermentación. El descenso de pH parece tener un efecto positivo en la formación de la emulsión. Esto puede deberse al efecto de los emulsificantes que se suman al efecto de las proteínas presentes como son las caseínas y las proteínas del suero desnaturalizadas, las cuales forman una red donde se atrapan a todos los componentes al llegar a un pH entre 4.6 y 4.7 (Romero *et al.*, 2004). Badui (1993) describe que las proteínas al romper sus enlaces disulfuro forman enlaces hidrofílicos y lipófilos por debajo de su punto isoeléctrico.

Sin embargo, en esta formulación se presentaron fenómenos de sinéresis, a las 48 h de almacenamiento en refrigeración a una temperatura de 4°C. Ver imagen 17.



Figura 18. Presencia de sinéresis en yogurt.

Debido a que se observaron problemas de viscosidad y sinéresis en la Formulación 1, para mejorar estas características se utilizaron los hidrocoloides; goma guar, almidón y grenetina. Estos aditivos tienen la capacidad de formar geles en líquidos como la leche y por tanto incrementar viscosidad y evitar sinéresis.

Los aditivos químicos utilizados a diferentes concentraciones se muestran en la Tabla 12, así como sus características finales.

Tabla 12. Aditivos Químicos.

Aditivo	Lotes	Concentración	Características
Goma Guar	I	0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%	Presenta sinéresis, aspecto arenoso y alteración del sabor en concentraciones desde 0.05 hasta 0.3 %.
Almidón	II	0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%	Presenta sinéresis y alteración del sabor en concentraciones desde 0.05 hasta 0.3 %.
Grenetina	III	0.5%, 0.6%, 0.7%	No presenta sinéresis a una concentración del 0.5%, por encima de esta concentración presenta gelificación.

En función a estos resultados, se concluye, que la grenetina tuvo la capacidad de estabilizar mejor la formulación evitando sinéresis además de incrementar la viscosidad del producto, ya que por ser un agente gelificante forma un red tridimensional ordenada que atrapa en su interior gran cantidad de la fase líquida, debido a la formación de puentes de hidrogeno. La concentración óptima fue de 0.5%. La grenetina, presentó una mejor capacidad para retener el agua a comparación con las gomas y el almidón que son aditivos utilizados para la estabilización del

yogurt descrito por Mendoza *et al.*, (2007). Esto puede ser debido a que durante el proceso que se utilizó para la elaboración del yogurt la goma guar reaccionó al primer contacto con el agua formándose grumos y no se obtuvo una mezcla homogénea ya que no se contaba con el equipo necesario como son mezcladoras, además pudo precipitar las proteínas contenidas en el producto cuando se calentó a un pH neutral durante la pasteurización a 63°C.

El almidón nativo que se incorporó al producto no logró estabilizar el producto ya que su estabilidad pudo haberse perdido durante el proceso a altas temperaturas y también pudo afectarle el pH bajo (Cubero *et al.*, 2002) que presenta el producto terminado.

2.2. PRUEBAS PANEL

Cabe hacer mención que mediante pruebas paneles se observó que el yogurt elaborado con grasas vegetales, inulina y aditivos (Formulación 2), no presentó un buen sabor, por lo que se prepararon dos nuevos productos:

a) Usando sacarosa; la concentración fue definida tratando de igualar el contenido de sólidos totales que hay el yogurt comercial Yoplait®, con ayuda del análisis bromatológico realizado anteriormente.

b) Usando mermelada de frambuesa; la concentración utilizada fue del 15 %, misma que fue propuesta por Téllez (2007). Dichas formulaciones se muestran en la siguiente Tabla.

Tabla 13. Formulaciones Elaboradas.

Componentes	Formulación 2 (%)	Formulación 3 (%)	Formulación 4 (%)
Leche Silluette®	89.7	85	74.7.
Inulina	4.0	4.0	4.0
Grasa vegetal	2.3	2.3	2.3
Emulsificantes	0.5	0.5	0.5
Grenetina	0.5	0.5	0.5
Sacarosa	-	4.7	-
Cultivos lácticos	3.0	3.0	3.0
Mermelada de frambuesa	-	-	15.0
Total	100	100	100

Los resultados de dichos análisis sensoriales se muestran en las siguientes figuras.

Como se muestra en la figura 19, la Formulación 3 presentó mejores características organolépticas de color y textura que las formulaciones 2 y 4. Asimismo, la Formulación 4 presenta mejores características de olor y sabor que la Formulación 2 y 3.

En la figura 20 se presenta la calificación global de cada formulación obtenida del promedio de la suma de las características de color, olor, sabor y textura también conocidas en conjunto como *flavor*, esto para conocer cuál es la formulación mejor aceptada por los panelistas.

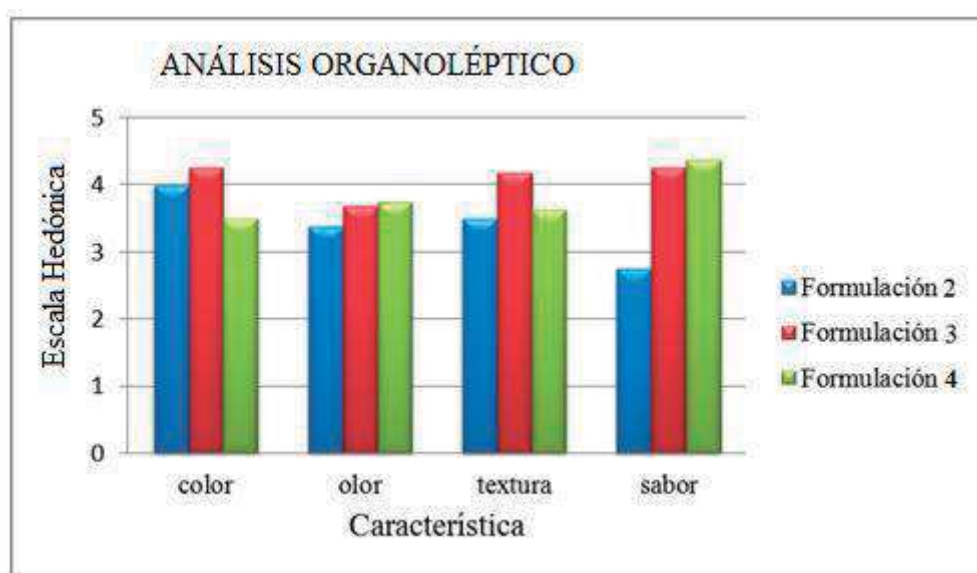


Figura 19. Prueba Panel. Análisis comparativo de tres formulaciones elaboradas.

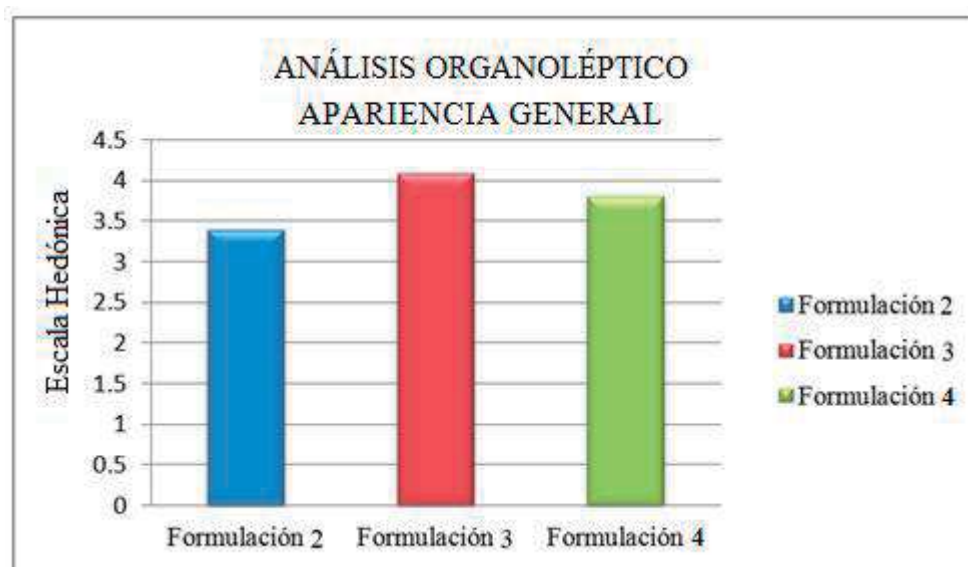


Figura 20. Prueba Panel. Apariencia general de las tres formulaciones.

La formulación mejor aceptada por los panelistas fue la Formulación 3, con una calificación de 4.09 en base a la escala hedónica utilizada. Así mismo, la Formulación 4 tuvo una calificación de 3.81 y la Formulación 2 de 3.4.

Una vez seleccionada la Formulación 3, se evaluaron una serie de parámetros bromatológicos, fisicoquímicos y microbiológicos, así como la estabilidad del producto al adicionar el probiótico *Saccharomyces boulardii*, se comparo con productos en el mercado y se evaluó su vida de anaquel.

2.3. ADICIÓN DEL PROBIÓTICO. *SACCHAROMYCES BOULARDII*

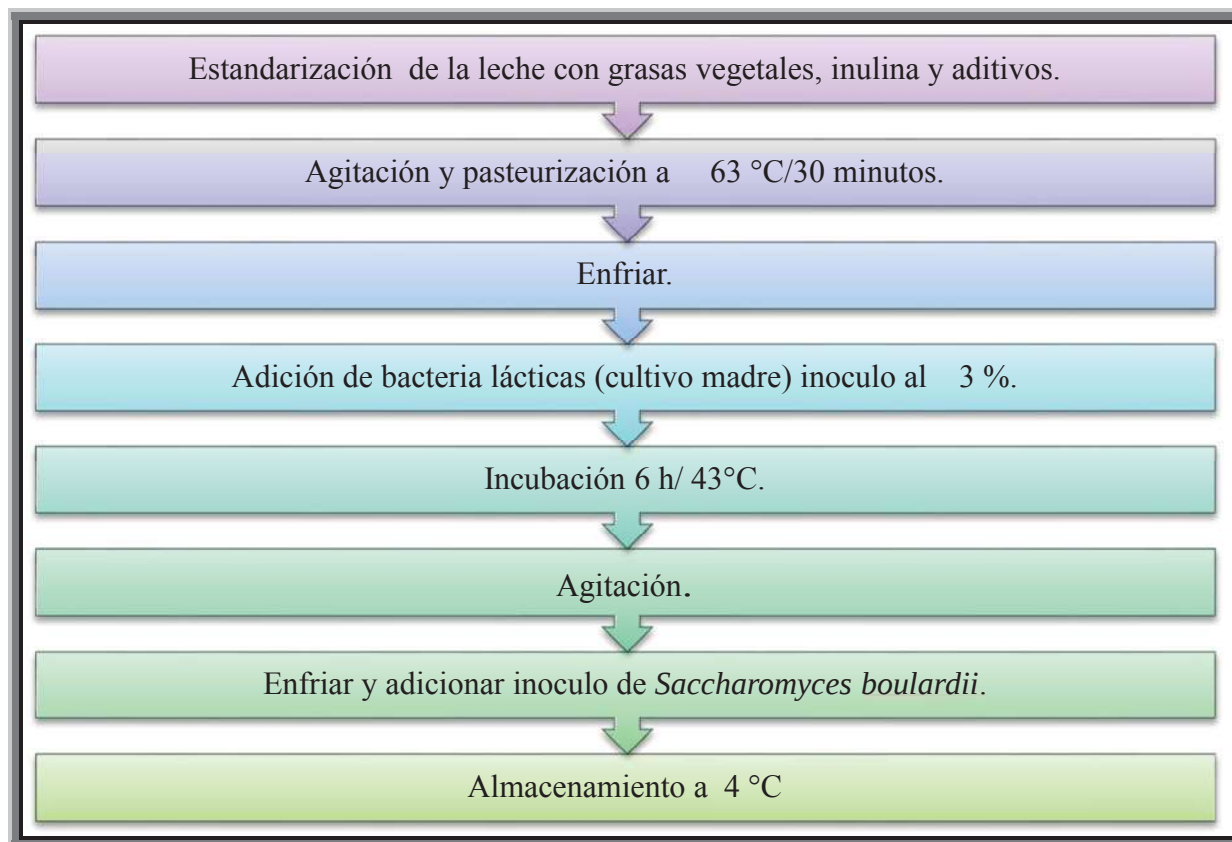


Figura 21. Diagrama de flujo. Adición de *Saccharomyces boulardii*.

La levadura *Saccharomyces boulardii* se incorporó a la Formulación 3, en una concentración de 1.4×10^7 UFC/mL que corresponde al botón celular obtenido al centrifugar la biomasa obtenida de un caldo nutritivo inoculado con *S. boulardii* e incubado por 48 h en agitación a 25 °C.

Este yogurt presentó características sensoriales desagradables a las 48 h de almacenamiento a 4 °C; atribuidos a los productos de fermentación de dicha levadura, ya que pudo haber usado como fuente de carbono a la sacarosa y posiblemente el ácido láctico ya que han sido reportados como sustratos fermentables por la especie *S. cerevisiae* (Hours *et al.*, 2005); de igual manera (Barranco, 1996) describe que *S. cerevisiae* es productor de inulinasas, y probablemente estas enzimas actuaron sobre la inulina presente en el producto y contribuyeron en el sabor desagradable del mismo.

Por otro lado, en cuanto a las características fisicoquímicas del producto terminado con la levadura no se presentaron alteraciones, tales como sinéresis a simple vista o cambios en pH y acidez.

Debido a la fermentación del producto por la levadura *Saccharomyces boulardii*, se protegió por medio de la técnica de microencapsulación, utilizando el método de emulsión propuesto por Zamora (2011), y se incorporó a la bebida tipo yogurt, obteniendo resultados favorables, ya que después de una semana de almacenamiento no se percibían cambios sensoriales desagradables.



Figura 22. Microencapsulación de *Saccharomyces boulardii*.

Cabe señalar, que la evaluación de la viabilidad de la levadura microencapsulada en la bebida tipo yogurt con respecto al tiempo no es parte de este trabajo; sin embargo se comprobó que se debe proteger dicho microorganismo para evitar el contacto con un sustrato tan rico en nutrientes como lo es el yogurt.

3. FORMULACIÓN FINAL ESTANDARIZADA

En este apartado se presenta la Formulación Final (Formulación 3).

Así mismo, se detallan los resultados de los análisis bromatológico, fisicoquímico y microbiológico realizados a la Formulación Final de la bebida funcional tipo yogurt. Dichos resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 14. Formulación Final de la Bebida Funcional tipo Yogurt.

Ingrediente	%
Leche silhouette®	85.0
Cultivos lácticos	3.0
Grasa vegetal	2.3
Inulina	4.0
Sacarosa	4.7
Grenetina	0.5
Emulsificantes	0.5
Total	100

La formulación que se muestra contiene la grasa vegetal como sustituto de grasa de la leche y la inulina como prebiótico, así como aditivos que logran estabilizarla y evitando así la pérdida de la emulsión (O/W) y sinéresis. No se incorporó la levadura debido a que el producto presenta problemas de fermentación durante su almacenamiento cuando se incorpora de manera libre y se requieren análisis adicionales para agregarla en forma encapsulada y asegurar su viabilidad.

Tabla 15. Análisis Bromatológico de la Formulación Final.

Componente	Formulación Final (%)
Humedad	77.96 ± 0.06
Carbohidratos	10.62
Fibra dietética	4.62 ± 0.05
Lípidos	2.50 ± 0.85
Proteína	3.60 ± 0.49
Cenizas	0.70 ± 0.02
Total	100

La formulación final presenta un buen balance de proteína, ya que el mínimo permitido por la NOM-181-SCFI-2010 es de 2.9%, y la cantidad de lípidos vegetales es muy semejante a los

lípidos de origen animal presentes en el yogurt comercial de aproximadamente 2.5 %. En cuanto a la fibra dietética, es muy buena fuente de fibra, la cual está compuesta por fibra presente en la leche Silhouette® que se cuantifico por el método de Prosky *et al.*, (1984) resultando de 0.74 %, a la cual se sumo a la fibra soluble que representa la inulina 3.88 % teniendo un resultado final de fibra de 4.62 %.

Tabla 16. Análisis Fisicoquímico de la Formulación final.

Parámetro	Formulación Final
Ph	4.6 ± 0.028
Acido láctico (%)	0.698 ± 0.009
Sinéresis (%)	73.2 ± 0.852
Viscosidad	192.7±5.87 cP a 4 rpm

Las características de pH se encuentran dentro de lo esperado, 3.7 a 4.6, cuyos valores son reportados por Rivas (2000). El porcentaje de acido láctico se encuentra dentro de lo establecido por la NOM-181-SCFI-2010.

La sinéresis o capacidad de retención de agua, es un fenómeno que varía dependiendo de cada tipo de yogurt, en este caso se observó una sinéresis alta, pero el producto no la presentó a simple vista, hay que recordar que esta cuantificación se hizo por el método de centrifugación descrita por Guinee *et al.* (1995).

La viscosidad que presenta esta bebida, está clasificada dentro de los yogurts semiespesos según lo reportado por Téllez (2007).

Tabla 17. Análisis Microbiológico de la Formulación Final.

Microorganismo	Unidades	Formulación Final	Límite Mínimo	Límite Máximo
Hongos	UFC/ml	No detectable	-	10
Levaduras	UFC/ml	No detectable		10
Coliformes totales	UFC/ml	No detectable	-	10
Bacterias lácticas	UFC/g	314000000000	2000000	-

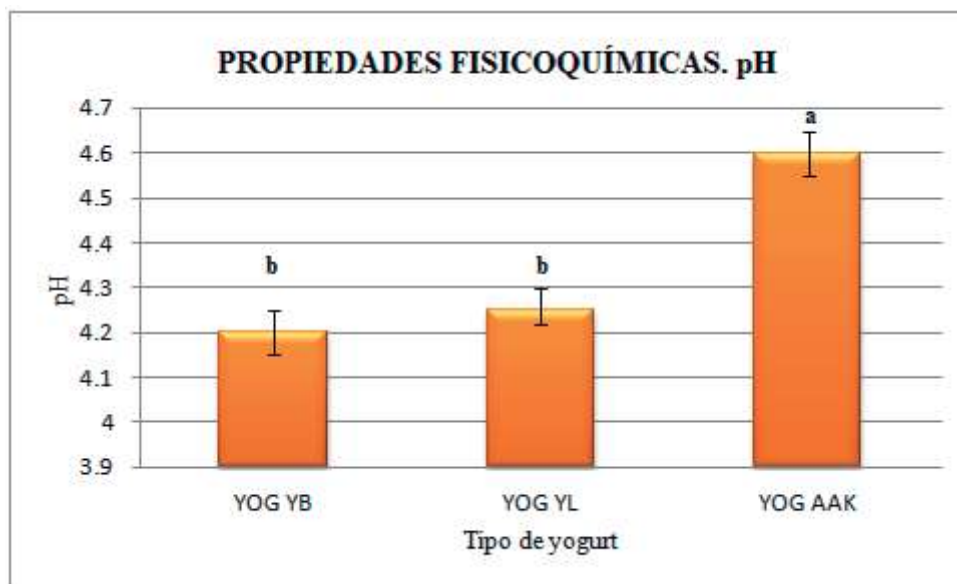
El análisis microbiológico muestra que existió una cantidad mínima de microorganismos no deseados en este tipo de productos de acuerdo a Normas establecidas, así mismo mostró una cantidad adecuada de bacterias lácticas, *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*.

En necesario hacer este tipo de análisis al producto para tener la certeza de que se está elaborando de manera adecuada, debido a que puede haber fuentes de contaminación tanto en la materia prima como en el proceso.

4. ANÁLISIS COMPARATIVO CON PRODUCTOS EN EL MERCADO

A continuación se muestra un análisis comparativo del producto terminado (Formulación final), denominado como YOG AAK, con dos productos en el mercado: Un yogurt de consistencia líquida Yoplait® (YOG YL) y otro de consistencia semisólida Yoplait® (YOG YB).

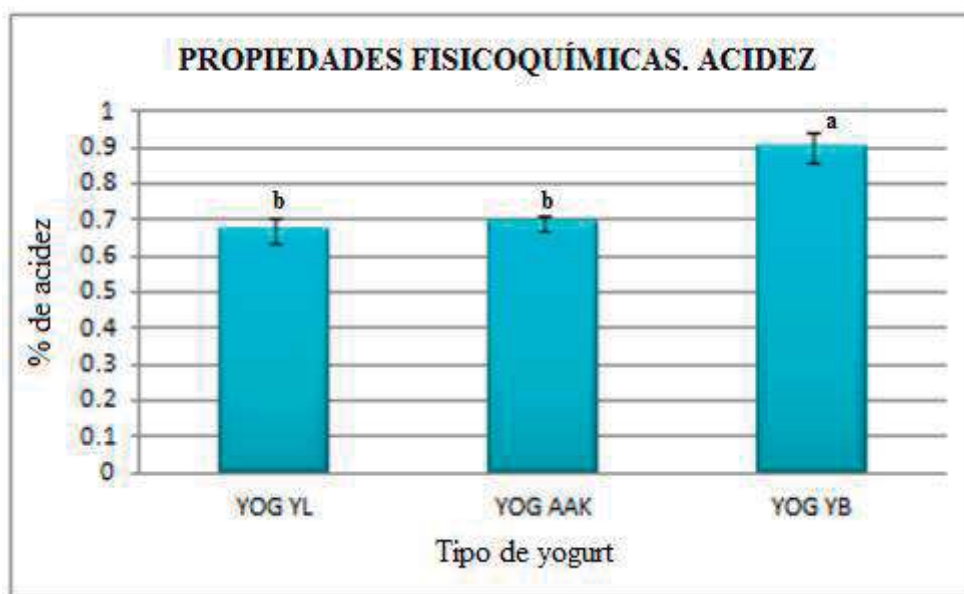
4.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS



^{a,b}, Letras iguales no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 23. Comparación del pH en productos lácteos fermentados.

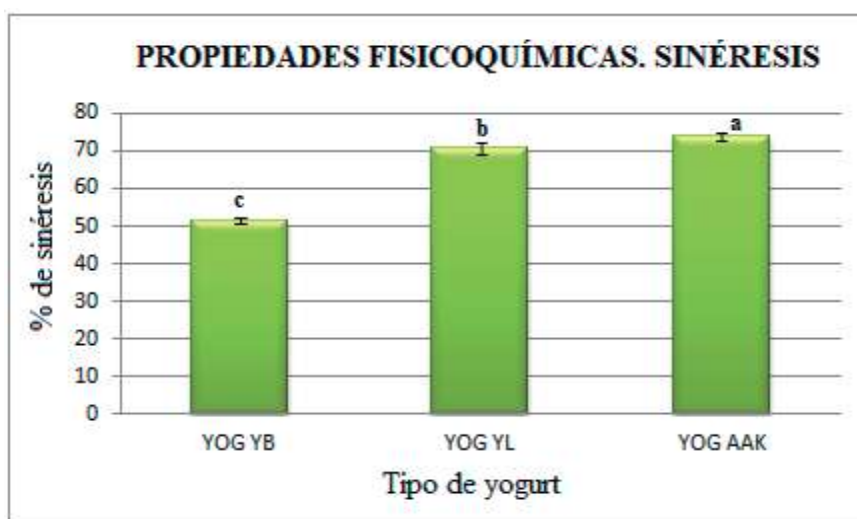
El pH del producto YOG AAK es de 4.60 en comparación con los comerciales YOG YB y YOG YL que son de 4.20 y 4.25 respectivamente; el producto elaborado, al igual que los que están en el mercado, están dentro del rango de pH de 4.0 a 4.6, y este valor contribuye a la hidratación de las proteínas y por tanto a la consistencia del yogurt. Se menciona que a un pH inferior de 4.0 se favorece a la contracción del coágulo y por tanto a la sinéresis; por otro lado, a un pH superior a 4.6 influye desfavorablemente en la consistencia del producto terminado (Romero y Mestres, 2004).



^{a,b}, Letras iguales no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 24. Comparación de la acidez en productos lácteos fermentados.

La acidez del producto YOG AAK es de 0.7% de ácido láctico, y por lo tanto cumple con la NOM-181-SCFI-2010 que indica que debe de contener un mínimo de 0.5 % de ácido láctico, este parámetro es de suma importancia debido a que el ácido láctico está en función de la concentración de las bacterias lácticas presentes en el producto (Profeco, 2006). Así mismo el YOG YB y YOG YL con un 0.67 % y 0.90 % de ácido láctico cumple con esta Norma.



a,b,c Letras iguales no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Figura 25. Comparación del grado de sinéresis en productos lácteos fermentados.

La sinéresis está íntimamente relacionada con los constituyentes de cada producto, y el tipo y cantidad de aditivos, así como el proceso de elaboración utilizado en cada formulación. Por otro lado, la agitación a temperaturas relativamente altas influye en la sinéresis del producto (Tamime y Robinson, 1991). Cabe hacer mención que durante la elaboración del producto, YOG AAK, fue necesario realizar agitación a altas temperaturas para una adecuada incorporación de la grasa vegetal; que puede haber contribuido a presentar un alto porcentaje de sinéresis: 73.87 %, con respecto a los observados en los productos comerciales: YOG YB = 70.79%, y YOG YL = 51.47 %.

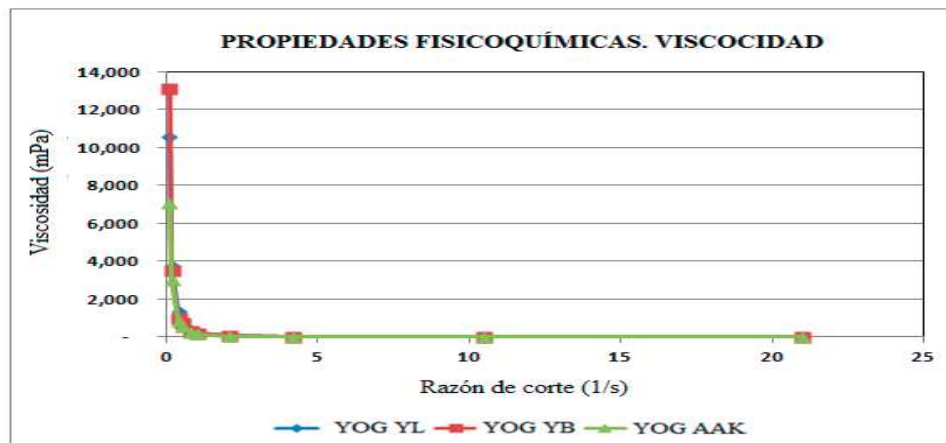


Figura 26. Comparación de los perfiles de viscosidad.

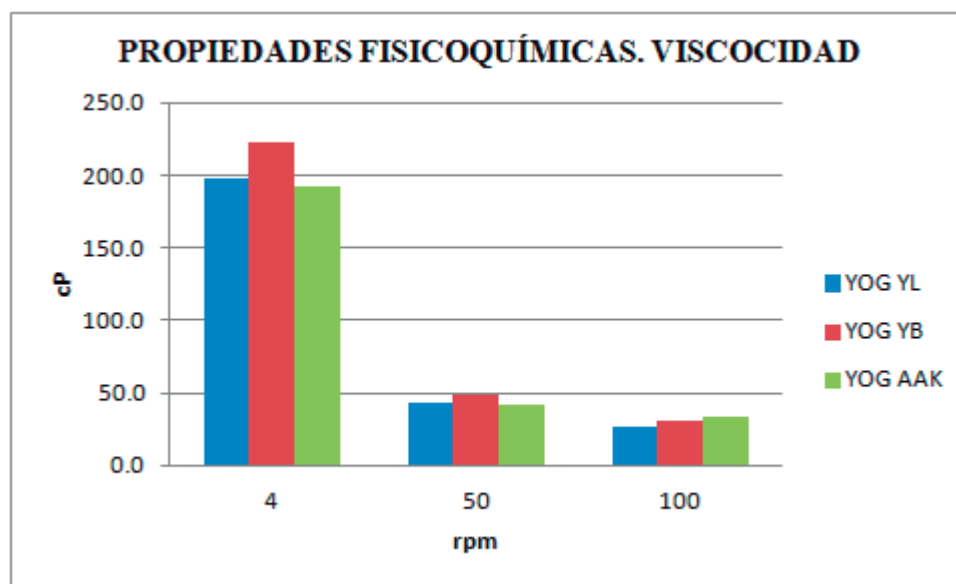


Figura 27. Comparación de la viscosidad de diferentes productos lácteos fermentados.

El tipo de comportamiento reológico que se presenta en las muestras de yogurt fue no newtoniano tixotrópico ya que como se puede observar en la Figura 27 la viscosidad va disminuyendo al aplicar fuerza. Este tipo de productos dentro de un lapso de tiempo recuperan su viscosidad inicial tras un tiempo de reposo. Además se puede observar que el producto YOG YB presenta mayor viscosidad que los productos YOG YL y YOG AAK, esta característica está relacionada con la cantidad de sólidos totales entre mayor sea esta mayor será su viscosidad, otro factor clave son los aditivos empleados en cada formulación, sin embargo también se observa que el comportamiento del YOG AAK es más estable al aplicar fuerza, a comparación de los productos YOG YL y YOG YB.

4.2. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

A continuación se presentan los resultados del análisis bromatológico entre el yogurt elaborado (YOG AAK) y un yogurt comercial Yoplait® (YOG YB).

Tabla 18. Comparación Humedad y Sólidos Totales.

Componente	YOG AAK (%)	YOG YB (%)
Humedad	77.96± 0.06	79.02± 0.061
Sólidos Totales	22.04±0.23	20.98±0.354
Total	100	100

Tabla 19. Comparación Bromatológica.

Componente	YOG AAK (%)	YOG YB (%)
Humedad	77.96 ± 0.06	79.02 ± 0.061
Carbohidratos	10.62	14.28
Fibra dietética	4.62 ± 0.05	0.00
Lípidos	2.50 ± 0.65	2.50 ± 0.91
Proteína	3.60 ± 0.49	3.30 ± 0.069
Cenizas	0.70 ± 0.02	0.90 ± 0.083
Total	100	100

En el análisis bromatológico que se muestra en la tabla 19, se obtienen resultados favorables debido a que se muestra una diferencia de aproximadamente 1 % del contenido de sólidos totales de la formulación elaborada (YOG AAK) con el yogurt comercial Yoplait® (YOG YB); esto debido a que se agregó inulina como fibra soluble en la bebida, misma que disminuyo el dulzor, por lo cual se tuvo que adicionar sacarosa en una concentración de 4.7 %, en lugar de 3.7 %, que hubiese sido la concentración ideal para que nuestra bebida funcional tipo yogurt tuviera la misma cantidad de sólidos totales que el yogurt comercial Yoplait®; ésta es la razón de que presente mayor contenido de sólidos totales el producto YOG AAK elaborado en el presente trabajo en comparación con el YOG YB.

4.2.1. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

En la Tabla 20 se muestra el análisis de perfil de ácidos grasos, tanto para la grasa butírica, grasas naturales de la leche de vaca, y la grasa usada para el desarrollo de nuestro nuevo producto. Estas grasas, principalmente aceite de palma, fueron proporcionadas por la empresa AAK.

Tabla 20. Perfil de ácidos grasos de grasa butírica y vegetal (Palma).

Ácidos grasos	Grasa de leche de vaca * (%)	YOG AAK (%)
Saturados		
Butírico	3.6	
Caproico	2.3	
Caprílico	1.2	
Cáprico	2.2	
Láurico	3.6	0.205
Mirístico	10.7	1.06
Pentadecanoico	1.7	
Palmítico	25.9	44.3
Esteárico	10.1	5.94
Araquidónico	0.7	
Otros	0.8	
Total	62.8	51.5
Monoinsaturados		
Miristoleico	1.0	
Margárico		
Palmitoleico	1.9	
Oleico	26.2	39.02
Otros	1.6	
Total	30.7	39.02
Poli insaturados		
Linoleico	2.0	8.35
Alfa-Linolénico		0.18
Linolénico	0.7	
Linoelaidico		0.13
Gladoleico		0.11
Otros	0.2	
Total	2.9	8.77

*(Fox y Cameron, 2002).

Como se muestra en la tabla anterior, al sustituir la grasa butírica de la leche por el aceite vegetal desde el punto de vista de la salud existe un beneficio, debido a que la grasa vegetal tiene menor cantidad de ácidos grasos saturados (51.5 %), en comparación con la grasa butírica de la leche que contiene un 62.8 %, contribuyendo con ello a disminuir los riesgos de una Enfermedad Cardiovascular. Además, contiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (47.79 %), que ayudan a disminuir la cantidad de triglicéridos en sangre comparados con los 33.6% de la grasa butírica de la leche (Rodríguez *et al.*, 2005).

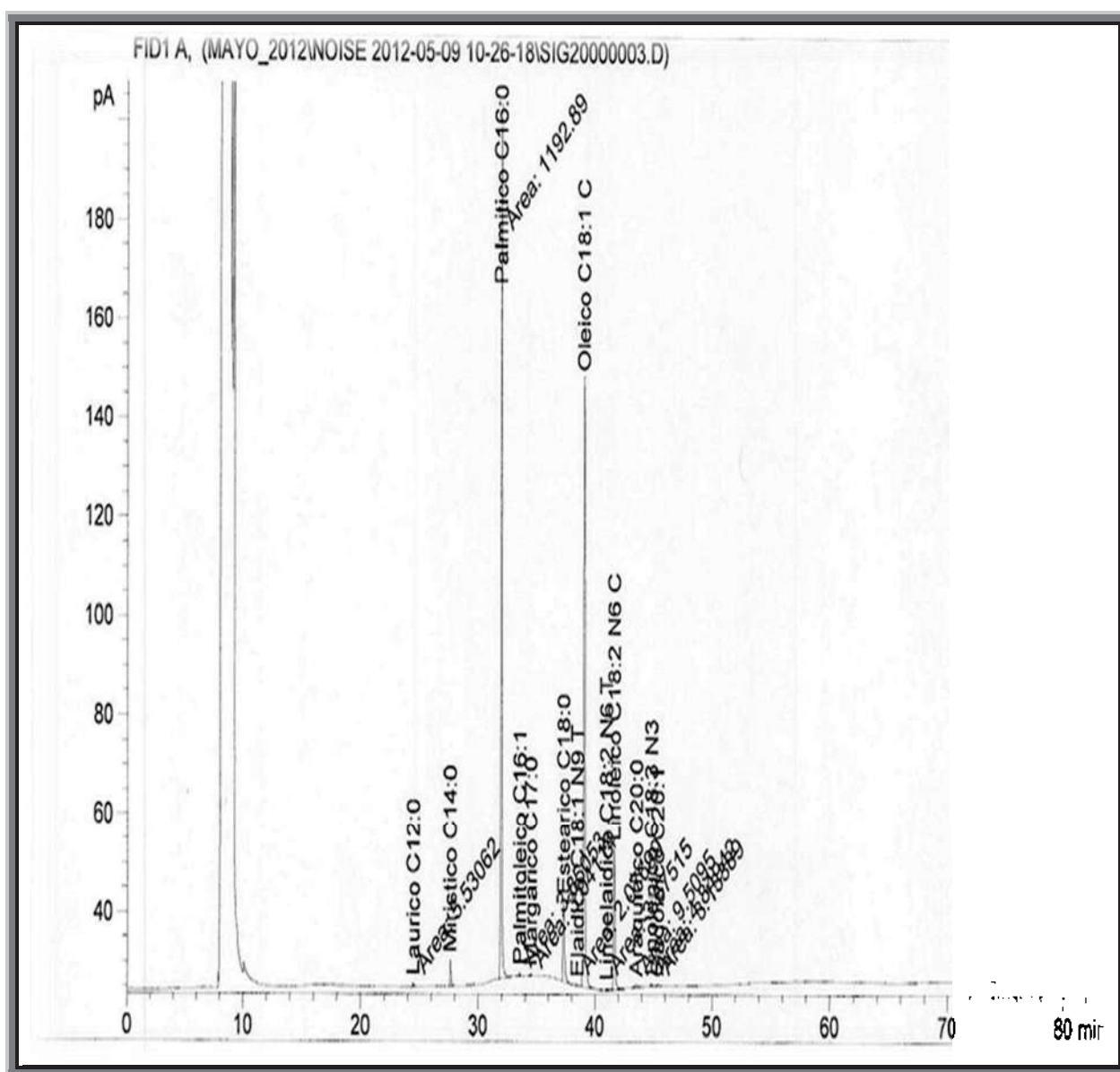


Figura 28. Cromatografía. Perfil de Ácidos Grasos de la Grasa Vegetal.

4.3. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

A continuación se presenta un análisis comparativo de tres productos lácteos que son; Yoplait de consistencia semisólida (YOG YB) y Bio Balance (BB) y el elaborado en este trabajo (YOG AAK).

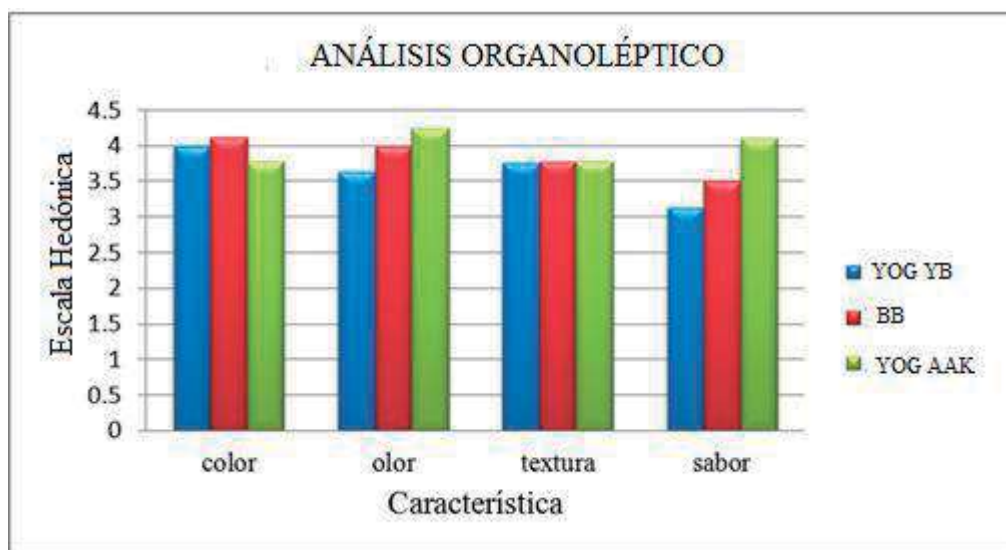


Figura 29. Pruebas Panel. Análisis comparativo de tres productos.

El análisis organoléptico muestra que el producto YOG AAK presentó mejores características de color, textura y sabor que los productos Yoplait y Bio Balance, lo que nos indica que es muy bien aceptado por el público; pero se debe continuar trabajando con este parámetro, con la adición de algún tipo de colorante o mermelada.

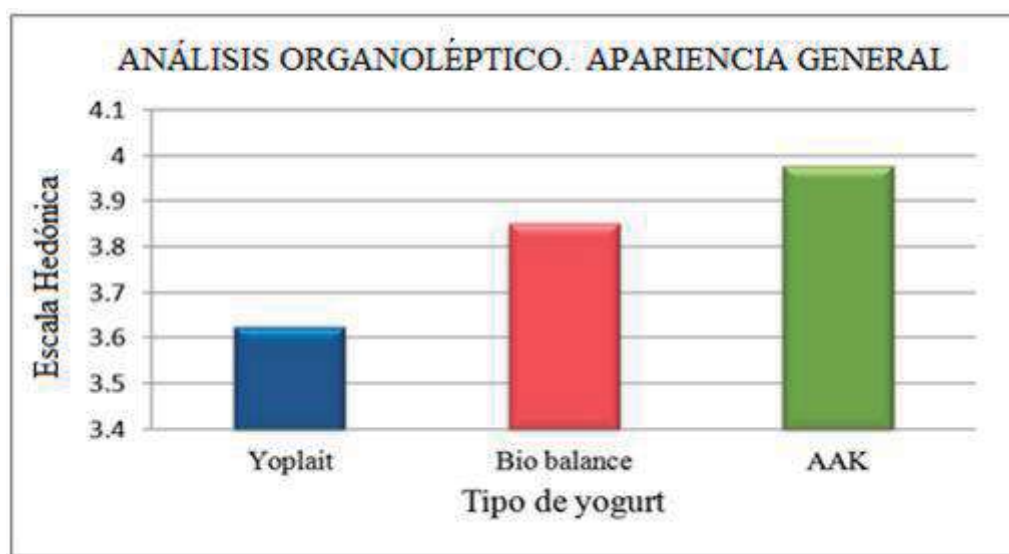


Figura 30. Prueba Panel. Apariencia general de tres productos.

Como se muestra en la figura 29, se observa una muy buena aceptación global por parte de los panelistas hacia nuestro producto, inclusive por encima del Bio Balance y el Yoplait; aunque los tres productos se encuentran en un buen rango de aceptación.

5. VIDA DE ANAQUEL

A continuación se presentan los resultados de las pruebas de vida de anaquel de la formulación final (YOG AAK) de la bebida funcional tipo yogurt, los cuales corresponden a las siguientes tablas y figuras.

Tabla 21. Vida de Anaquel medida en la Formulación Final durante 21 días.

Parámetro	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Ph	4.6 ± 0.028^a	4.58 ± 0.042^a	4.58 ± 0.018^a	4.56 ± 0.05^a
Ácido láctico (%)	0.698 ± 0.009^a	0.710 ± 0.004^a	0.713 ± 0.006^a	0.716 ± 0.009^a
Sinéresis (%)	73.13 ± 0.852^a	$72.85 \pm 0.966^{a,b}$	$72.30 \pm 1.050^{b,c}$	71.75 ± 0.752^c
Bacterias Lácticas Vivas (UFC/g)	3.14×10^{11}	-	-	3.4×10^9

^{a,b,c}. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa, letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Acorde a los resultados de la tabla 22; vida de anaquel de 21 días, se observa que el pH y la acidez no presentan variaciones significativas. Esto es quizá debido a que durante la fermentación se llegó a una fase donde el cultivo láctico después de 6 h de incubación no continuo la fermentación, y esta característica se mantiene durante el almacenamiento a 4°C, a diferencia de lo reportado por Díaz *et al* (2004), que describen que aun en refrigeración las bacterias lácticas continúan fermentando el producto.

Por otro lado, se observa que la sinéresis disminuye durante la vida de anaquel. Esto se puede deber a la presencia de inulina que por ser una fibra tiene la capacidad de absorber agua, así mismo se puede deber al tipo de estabilizantes incorporados en la formulación, esta característica es favorable ya que ayuda a mantener la estructura del producto.

La concentración de bacterias lácticas en el producto cumple con las Normas Oficiales, ya que al final de su vida de anaquel de 21 días cuenta con una concentración de bacterias lácticas de 3.4×10^9 UFC/g, tomando en cuenta que lo mínimo necesario para considerar un alimento como probiótico es de 1×10^7 UFC/g, lo cual se cumple a la perfección.

Como se puede observar en la Figura 31, la viscosidad incrementa durante su almacenamiento, esto puede ser debido a que tiene un alto porcentaje de inulina, esta fibra soluble tiene la capacidad de retención de agua, y puede influir en el incremento de la viscosidad, de igual manera que pudo haber influido en la disminución del porcentaje de sinéresis que se presenta durante su almacenamiento.

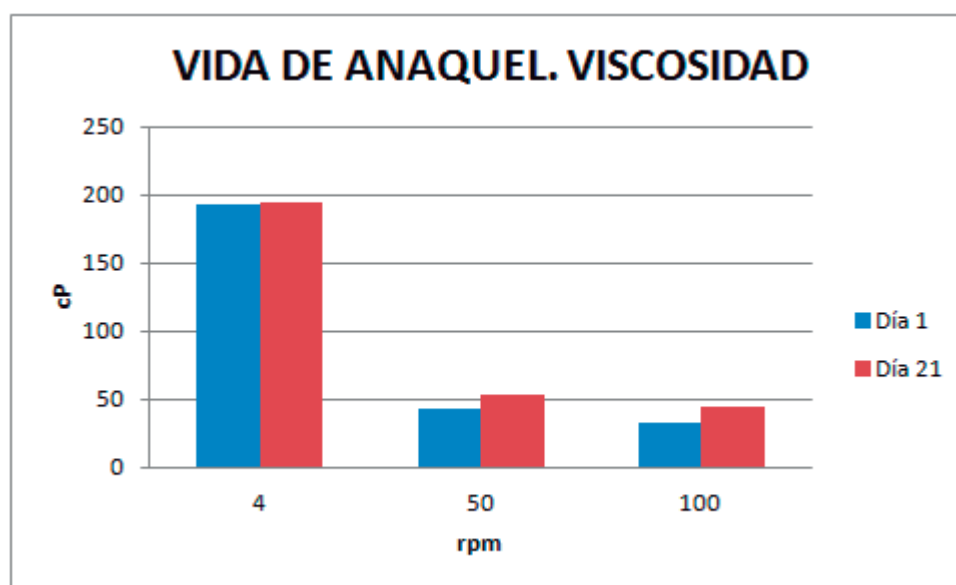


Figura 31. Vida de anaquel. Viscosidad.

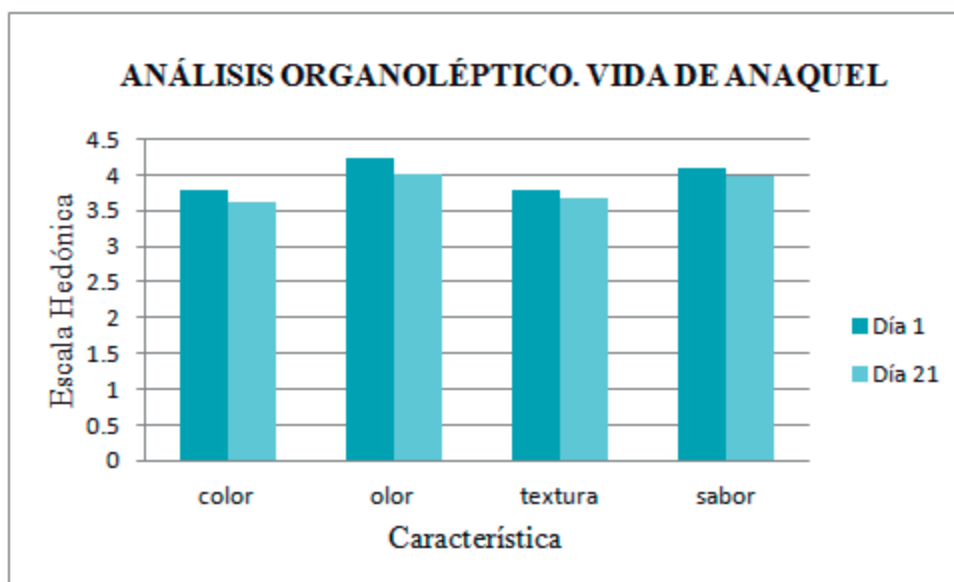


Figura 32. Prueba Panel. Vida de anaquel.

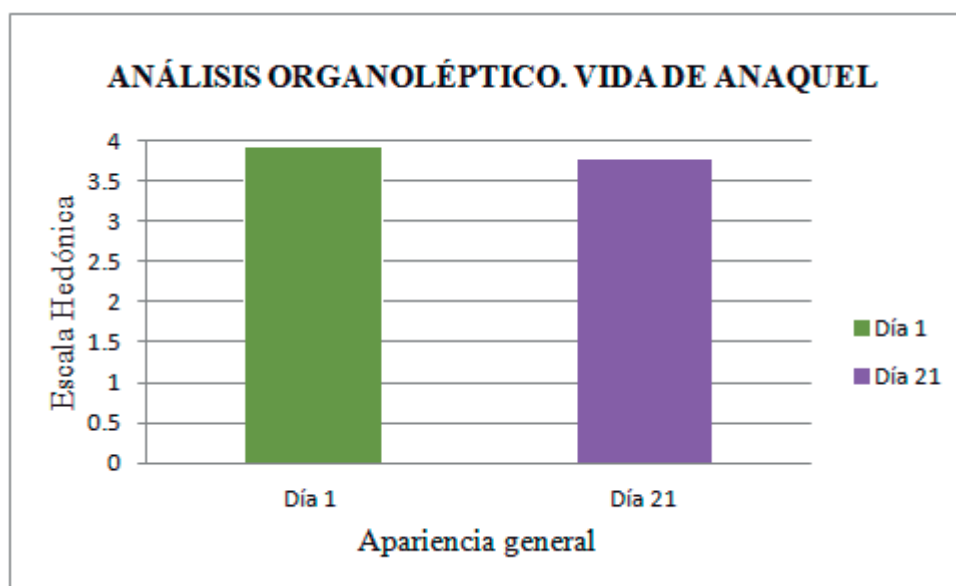


Figura 33. Prueba Panel. Vida de anaquel. Apariencia general.

El análisis organoléptico de la bebida tipo yogurt en almacenamiento muestra una buena aceptación por el público al inicio, disminuyendo un poco a los 21 días de almacenamiento, encontrándose entre el punto 3: Ni me gusta Ni me disgusta y el punto 4: Me gusta, sin embargo el resultado es muy favorable encontrándose en un muy buen rango de aceptación.

En la figura siguiente se muestra el producto terminado.



Figura 34. Producto terminado.

VII. CONCLUSIONES

- ☞ Se usaron satisfactoriamente las bacterias lácticas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para la elaboración de un yogurt usando como sustrato una leche descremada con menos del 0.2% de grasa. Se probaron dos tipos de leche y la que mejor funcionó fue la leche comercial Silhouette® debido a que presentó mejores características de pH y acidez que la leche Svelty®; las condiciones óptimas de fermentación de la leche Silhouette® fueron un inóculo al 3% durante 6 h a 43 °C.
- ☞ Fue adecuado detener la fermentación láctica en una fase cercana a la estacionaria para evitar cambios organolépticos durante el almacenamiento.
- ☞ Se adicionaron satisfactoriamente grasas vegetales al producto fermentado, proporcionadas por la empresa AAK. Se adicionaron aditivos químicos para estabilizar el producto como emulsificantes tipo mono y diglicéridos para incorporar la grasa vegetal así como grenetina para evitar sinéresis durante el almacenamiento en el producto.
- ☞ El descenso del pH producido durante la fermentación tiene un efecto positivo en la incorporación de grasa vegetal.
- ☞ La adición de grenetina en una concentración del 0.5 % evitó sinéresis e incrementó la viscosidad en el producto; efecto contrario que se presentó al incorporar aditivo como gomas o almidón.
- ☞ La levadura *Saccharomyces boulardii* puede ser incorporada en este tipo de productos lácteos, pero de una manera microencapsulada; ya que de lo contrario se fermenta el producto al segundo día de almacenamiento a 4°C, debido a la gran cantidad de nutrientes que tiene dicho producto.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abrams s, griffin i, hawthorne k, liang l, gunn s, darlington g, ellis k. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. Am j clin nutr 2005; 82: 471-476.

Ada lydia de las cagigas reig, jorge blanco anesto prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. revista cubana aliment nutr 2002;16(1):63-8

Aires David, Capdevila Núria, Segundo María José. (2005). Ácidos grasos esenciales. Vol. 24, N° 4.

Alvírez Morales Alicia, González Martínez Blanca Edelia, Jiménez Salas Zacarías. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos Funcionales. Universidad Autónoma de Nuevo León (México). Vol. 3, N°3.

Amores R., Calvo A. Mestre J. R. y Martínez Hernández R. (2004). Probióticos. Rev. Esp. Quimioterap. Vol. 17, N°2.

Araya M., Morelli L., Reid G., Sanders M., Staton C., (2002). "Guidelines for the Evaluation of probiotics in food". [WWW.WHO.INT](http://www.who.int).

Ariza o. t. j., totoaus s. a., pérez ch. m. l. 2010. relación entre la textura de geles de alginato de sodio con gelana o kappa-carragenina/algarrobo y viabilidad en la encapsulación de bacterias lácticas. tese. ecatepec méxico.

Ávila José, Ávila Manuel y Tovar Belkis. (2010). Determinación de las condiciones de crecimiento in vitro de una cepa probiótica (*lactobacillus delbruekii subsp. Bulgaricus*) aislada del tracto intestinal de terneros (*bos taurus*). Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Vol. 1, N° 1, 058-069.

Badui D. S. (1993). Química de los alimentos. Ed. Alambra Mexicana. México D. F. Pp. 48-53.

Bianchi-Salvadori B, Camaschella P, Bazzigaluppi E. (1984). Distribution and adherence of *Lactobacillus bulgaricus* in the gastroenteric tract of germ-free animals. *Milchwissenschaft*; 39(7): 387-391.

Brigidi P, Swennen E, Vitali B, Rossi M, Matteuzzi D. (2003). PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in feces of human subjects after oral bacteriotherapy and yogurt consumption. *Int J Food Microbiol*; 81(3): 203-209

Bosscher D, Van Loo J, Franck A. (2005). Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *Int Dairy J*; 16: 1092-1097.

Boza Esteban M, Morales H. Ileana, Henderson Marjorie. (2010). Desarrollo de un queso maduro con adición del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* lc-01. *Rev chil nutr* Vol. 37, N°2.

Buts Jean Paul. (2007). Revista de Gastroenterología del Perú. Ejemplo de un medicamento probiótico. *Saccharomyces boulardii* liofilizada. Vol. 25, N° 2.

Caicedo Cipagauta Yanina Maricel. (2010). Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas micro encapsuladas en helados. Universidad Nacional de Colombia. Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Tesis Especialista en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Castillo M., Borregales C., Sanchez M. (2004). Influencia de la pectina sobre la propiedades reológicas del yogur. *Rev Fac. Farma* Vol 46 (2): 33-37.

Collado Amores Maria Carmen. (2004). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Universidad politécnica de valencia. Departamento de Biotecnología. Tesis doctoral.

Corthier G. (2003). Probiotiques: adaptation à l'environnement digestif. Accepted for publication by Cahiers de Nutrition et de Diététique.

Coudray C, Demigné C, Rayssiguier Y. (2003). Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. J Nutr; 133: 1-4

Cubero N., Monteferrer A. y Villalta J., (2002). Aditivos alimentarios. Colección tecnológica de alimentos. Ediciones Mundo-prensa, Madrid, España.

Czerucka D, Nano JL, Bernasconi P, Rampal P. (1989). Réponse à la toxine cholérique de deux lignées de cellules épithéliales intestinales. Effet de *Saccharomyces boulardii*. Gastroenterol Clin Biol; 13: 383-7.

Czerucka D, Roux L, Rampal P., (1994) *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3', 5' -cyclic monophosphate induction in intestinal cells. Gastroenterology; 106: 65-72.

Díaz Jiménez B., Sosa Morales M. E., Vélez Ruiz J. F., (2004). Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. *Rev Mex. Ing. Quim.* Vol. 3 287-305.

Drouault S, Anba J, Corthier G. *Streptococcus thermophilus* Is Able To Produce a β -Galactosidase Active during Its Transit in the Digestive Tract of Germ-Free Mice. *Appl Environm Microbiol* 2002; 68(2): 938-941.

Fox A. Brian y Cameron G. Allan (2002). Ciencia de los alimentos nutrición y salud. Editorial Limusa. Páginas 87-112.

Franck A. (2006). Inulin. En: Food Polysaccharides and Their Applications. Editor Stephen A. Segunda Edición. Nueva York, USA: Marcel Dekker; 733 pp.

Gil Hernández Angel, Sánchez de Medina Contreras Fermín. (2010). Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. Editorial Médica Panamericana. Páginas 271-275.

Groen, J., Tijong, B. K., Kamminga, C. E. & Willebrand, A. F. (1952). Influence of nutrition, individuality and some other factors, including various forms of stress on the serum cholesterol: an experiment of nine months duration in 60 normal volunteers. Voeding 13: 556–590.

Homayouni, A. Azizi, M.R. Ehsani, M.S. Yarmand, S.H. Razavi. (2008). Effect of microencapsulation and resistant Storch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chemistry. Iran.

Hernández Alicia, Alfaro Ileana, Arrieta Ronaldo. (2003). Microbiología industrial. Editorial EUNED. Páginas 66-74.

Hours, R.A.; Ferreyra, M.M.; Schvab, M.C.; Gerard, L.M.; Zapata, L.M.; Davies, C.V. (2005). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de jugos de naranja destinados a vinificación, en: Ciencia, Docencia y Tecnología 31: 219-239.

Jenkins D, Kendall C, Vuksan W. Inulin, oligofructose and intestinal function. J Nutr 1999; 129: 1431-1433.

K. Kailasapathy; K. Sultana. (2003). Survival and (beta)-D-galactosidase activity of encapsulated and free Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis in ice-cream. Australian Journal of Dairy Technology.

Kinsell, L. W., Partridge, J., Boling, L., Margen, S. & Michaels, G. (1952). Dietary modification of serum cholesterol and phospholipid levels. J. Clin. Endocrinol. 12: 909–928.

Kim Y, Faqih M, Wang S. (2001). Factor affecting gel formation of inulin. Carb Polym, 46: 135-145.

Mcfarland L., Bernasconi P. (1993). *Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative biotherapeutic agent. Microbiol Ecology Health Dis; 6; 57-171.

Madrigal Lorena y Sangronis Elba. (2007). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. La inulina y sus derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. Vol. 57, N° 4, 387-396.

Ledezma Ramirez (2010). Evaluación de la viabilidad según ISO 7889/idf 117 de los cultivos iniciadores *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* en yogurt y helado en almacenamiento y validación de un método para la enumeración del probiótico *Bifidobacterium lactis*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Mataix J.,(2001). Nutrición y alimentación humana. Madrid: Ergón.

Mendoza Navarro R., Trujillo Navarro y Duran Osorio D. (2007). Evaluación del almidón de ñame espino (*dioscorea rotundata*) como estabilizante en la elaboración de yogur entero tipo batido. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. Vol. 2, N°5, 97-105.

Miranda Andrea. (2009). Percepción e impacto en los consumidores de probióticos. Universidad Isalud. Licenciatura en Nutrición. Tesina Nutrición.

Nava de duran Jamili Carolina. (2008). Evaluación de bacterias ácido lácticas evaluadas como probióticos. Universidad Los Andes. Departamento de Biología. Tesis Biología.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-181-SCFI-2010, yogurt-denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

NMX-F-444-1983. ALIMENTOS. Yoghurt o leche búlgara. Foods. Yoghurt or bulgarian milk. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

Pelletier X, Laure-Boussuge S, Donazzolo Y. (2001). Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. Eur J Clin Nutr; 55(6): 509-512.

Rao A. Dose response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. J Nutr 1999; 129: 1442-1445.

Roberfroid MB. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods? Am J Clin Nutr;71:1682S-7S.

Roberfroid MB. (2005). Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. Boca Raton, USA: CRC Press. 370 pp

Rodríguez Cruz Maricela, Tovar R. Armando, Prado Martha y Torres Nimbe. (2005). Revista de Investigación Clínica. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios a la salud. Vol. 57, N° 3.

Romero del Castillo Shelly Roser, Mestres Lagarriga Josep. (2004). Productos lácteos. Tecnología. Editorial Ediciones UPC. Páginas 109-134.

Saez Vivian, Hernández José Ramón, Peniche Carlos. (2007). Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. Departamento de desarrollo de formulaciones, centro de ingeniería genética y biotecnología. Cuba.

Sánchez Martínez Jorge Ignacio. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: Actividad metabólica y producción de Exopolisacáridos. Universidad de Oviedo. Facultad de Biología. Tesis doctoral.

Schonbrun R. (2002) The effects of various stabilizers on the mouthfeel and other attributes of drinkable yogurt. Abstract of Thesis Presented to the Graduate School of the University of Florida in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.

Silveira Rodríguez Manuela Belén, Monereo Megías Susana y Molina Baena Begoña. (2003). Revista española de salud pública. Alimentos funcionales y nutrición óptima. Vol. 77. Nº 3, 317-331.

Slavin J. (2003). Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrients data bases. J Food Com Anal; 16: 287-291

Tamime A. Y. y R. K. Robinson. (1991). Yogur Ciencia y Tecnología. Ed. Acribia, España.

Taranto M., Medici M., Front G., (2005). Alimentos funcionales probióticos. Química viva, 4 (1), 26.

Téllez Ruiz Gerardo. (2007). Desarrollo de un Yoghurt bajo en grasa suplementado con prebióticos de alto peso molecular. Tesis de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Torres Aured Ma. Lourdes. (2009). Los fermentos lácteos en el siglo XIX. Los sitios de Zaragoza, enfermedad, salud y propaganda. Pp. 449-462.

Trowell HC, Southgate DAT, Wolevwe TMS. (1976). Dietary fiber redefined. Lancet; 1:1967-8.

Organización Mundial de Gastroenterología. (2008). Probióticos y Prebióticos.

Ortiz M. L. (2012). Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Alcalá.

Ulloa José Armando, Espinosa Andrews Hugo, Cruz Rodríguez Gladis Karina, Ulloa Petra Rosas, Ulloa Rangel Blanca estela, Ramírez Ramírez José Carmen. (2010). Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. Revista Fuente Año 2, N° 5.

Valderrama O. José. (2001). Centro de Información Tecnológica. Vol. 12, N° 6, 35-39.

Vidon N, Huchet B, Rambaud JC. (1986). Influence de *Saccharomyces boulardii* sur la secretion jéjunale induite chez le rat par la toxine cholérique. Gastroenterol Clin Biol; 10: 13-6.

Yogurt-Enumeración de los microorganismos característicos-Técnica del conteo de colonias a 37 °C (ISO 7889:2009).

Zamora Vega Rafael. (2011). Desarrollo de un alimento funcional a base de *Saccharomyces boulardii* e Inulina. Tesis del Instituto Politécnico Nacional.

http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_06/yogur_jul06.pdf