

**Mejoramiento del Proceso de Producción de una Bebida Probiótica Elaborada a partir de  
Aguamiel de *Agave salmiana* Desarrollada en la Universidad Popular Autónoma del Estado  
de Puebla, México.**

**Alexandra del Rosario Acevedo Caselles, Juan Carlos Flórez Cubides**

**Trabajo de Grado para Optar por el Título de Ingeniero Químico**

**Director**

**Carlos Jesús Muvdi Nova**

**PhD., MSc. en Ingeniería de Procesos, Ing. Químico**

**Co-director**

**Beatriz Pérez Armendáriz**

**PhD., MSc. en Biotecnología, Ing. en Alimentos**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

**Bucaramanga**

**2017**

*A Dios y a la Virgen del Rosario, por guiarme y cuidarme durante mi vida y darme el apoyo espiritual que necesito para salir adelante.*

*A mi mami, Emperatris Caselles, por apoyarme siempre durante toda mi carrera, por brindarme todo su cariño y ser esa persona incondicional y única para mí.*

*A mi hirminiti, Natalia Acevedo, por ser ella, por ser mi apoyo y mi voz de aliento en todo momento, por ser la mejor de todas.*

*A mi papi, a pesar de no estar siempre a mi lado, desde pequeña me formó con grandes valores para ser la mujer que soy ahora.*

*A mis abuelos y a toda mi familia, siempre seré un orgullo y ejemplo para ustedes.*

*A Juanca, mi compañero de vida. Gracias por esta experiencia juntos, por tu apoyo y tu amor, sé que los dos estamos hechos para grandes cosas. Nuevos retos nos esperan por vivir y lugares por conquistar.*

*A mis amigos, compañeros de Universidad y de Intercambio, y familia AIChE UIS, disfruté junto a ustedes estos años de carrera y de aprendizaje.*

*Gracias a cada una de estas personas, ya que fueron un pilar importante para lograr este primer objetivo, ser una Ingeniera Química UIS.*

*Alexandra del Rosario Acevedo Caselles*

*A Dios por darme fortaleza, sabiduría y confianza para afrontar los retos que se presentan día a día.*

*A mi mami Aleyda Cubides Mateus por su amor, ternura y apoyo incondicional pues a pesar de cualquier situación que se presente sé que lo hará toda la vida.*

*A mi papá Carlos Alberto Flórez Vergara por sus regaños, consejos, por ser mi ejemplo a seguir y por los valores que me ha inculcado desde niño.*

*A mi hermano Daniel Felipe Flórez Cubides porque me hace creer que soy un héroe para él y por aceptar los consejos que le puedo brindar para que sea una mejor persona de lo que yo puedo ser.*

*A mis nonos Anacelia y Aureliano por ayudar a mis padres en mi crianza y seguirme brindarme tanto cariño como cuando era un niño.*

*A Alexandra del Rosario Acevedo Caselles mi novia por ser mi apoyo durante más de dos años, ayudarme a ser mejor persona cada día y compartir su tiempo conmigo, espero que este sea el inicio de algo mucho más lindo en nuestras vidas y poder conocer todo el mundo tomados de la mano.*

*Finalmente, a todos los amigos que me llevo de esta etapa de mi vida pues me ayudaron a hacer más amena esta experiencia sacándome de la rutina, olvidando los problemas que se presentan constantemente y apoyarme en mis aventuras.*

*Juan Carlos Flórez Cubides*

### Agradecimientos

A la **Universidad Industrial de Santander**, nuestro hogar, lugar que nos formó como excelentes ingenieros íntegros dispuestos a mejorar la situación del país.

A la profesora **Beatriz Pérez Armendáriz**, por recibirnos con tanta alegría desde el primer momento y acompañarnos durante la realización de este proyecto.

Al profesor **Carlos Jesús Muvdi Nova**, por ser una persona ejemplar, dedicarnos su tiempo y aconsejarnos en todo momento.

Al **Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla** y al **Laboratorio Biotecnoambiental**, por abrir sus puertas a estos dos extranjeros dispuestos a dar lo mejor de cada uno para la realización de esta pasantía.

A **México**, por enseñarnos su diversidad cultural y la amabilidad de su gente, pues en todo momento nos sentimos como en casa, y los amigos que nos regaló porque con ellos esta experiencia jamás se olvidará. Esperamos volver.

**Tabla de Contenido**

Introducción.....	14
Objetivos.....	18
1. Metodología.....	19
1.1. Fase 1: Determinación de la influencia de la relación aguamiel:agua en la cantidad final de microorganismos presentes en la bebida.....	19
1.2. Fase 2: Elaboración de las distintas formulaciones de la bebida.....	21
1.3. Fase 3: Definición del tiempo de incubación del inóculo con base en la curva de crecimiento microbiano.....	22
1.4. Materiales, métodos experimentales y de cuantificación.....	23
1.4.1. Materiales, insumos y equipos.....	23
1.4.2. Métodos de cuantificación, análisis y experimentales.....	24
2. Análisis y discusión de resultados.....	25
2.1. Determinación de la influencia de la relación aguamiel:agua en la cantidad final de microorganismos presentes en la bebida.....	25
2.2. Elaboración de las distintas formulaciones de la bebida.....	28
2.3. Definición del tiempo de incubación del inóculo con base en la curva de crecimiento microbiano.....	32
2.3.1. Parte I.....	32
2.3.2. Parte II.....	36
3. Conclusiones.....	40
4. Recomendaciones.....	41
Referencias Bibliográficas.....	42
Apéndices.....	47

**Lista de Tablas**

Tabla 1. Formulaciones para el diseño experimental factorial $2^3$ .....	21
Tabla 2. Caracterización de la materia prima (aguamiel) y el pulque. ....	26
Tabla 3. Cantidad final de microorganismos en la bebida para distintas relaciones de aguamiel:agua. ....	28
Tabla 4. Pruebas ANOVA y Tukey para las diferentes propiedades organolépticas evaluadas...	29
Tabla 5. Prueba Tukey al sabor entre las formulaciones. ....	30
Tabla 6. Cantidad final de microorganismos de las formulaciones del diseño factorial. ....	32
Tabla 7. Resultados del análisis bromatológico para las bebidas a 0,5L y 4L. ....	35
Tabla 8. Bandas de absorción en $\text{cm}^{-1}$ del análisis por espectroscopía infrarroja.....	39

**Lista de Figuras**

Figura 1. Planta maguey pulquero (Agave salmiana).....	14
Figura 2. Diagrama metodológico. ....	19
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida, Aparicio (2014). ....	25
Figura 4. Valoración total prueba de satisfacción del diseño experimental. ....	28
Figura 5. Diagrama de araña para las pruebas sensoriales realizadas a las formulaciones evaluadas. .....	31
Figura 6. Curvas cinéticas de crecimiento microbiano para los microorganismos evaluados.....	33
Figura 7. Diferencia de preferencia entre las bebidas probióticas elaboradas.....	34
Figura 8. Seguimiento de pH y °Brix de las bebidas a 0,5L y 4L durante su elaboración. ....	36
Figura 9. Diferencia de preferencia entre bebidas comerciales y la bebida probiótica .....	37
Figura 10. Espectro infrarrojo de todas las muestras analizadas .....	38
Figura 11. Estructura química de la inulina .....	39

**Lista de Apéndices**

Apéndice A. Cuestionarios pruebas de análisis sensorial. .... 47

Apéndice B. Resultados análisis estadísticos pruebas anova y tukey..... 49

Apéndice C. Resultados análisis bromatológico..... 52

Apéndice D. Tabla de roessler para análisis de prueba dúo-trío..... 54

Apéndice E. Resultados espectroscopía infrarroja. .... 55

## Resumen

**Título:** Mejoramiento del proceso de producción de una bebida probiótica elaborada a partir de aguamiel de *Agave Salmiana* desarrollada en la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, México\*

**Autores:** Alexandra del Rosario Acevedo Caselles y Juan Carlos Flórez Cubides.\*\*

**Palabras claves:** Aguamiel, Bebida Probiótica, *Agave Salmiana*, *Lactobacillus leichmannii*, *Bacillus tequilensis*.

### Descripción:

El aguamiel producto de tradición mexicana, obtenido del maguey pulquero (*Agave salmiana*), ha perdido interés por parte las nuevas generaciones en México debido a la gran oferta de bebidas refrescantes y alcohólicas en el mercado, sumado a los mitos existentes sobre su proceso de obtención; afectando la economía de los productores de aguamiel del país. Por tal razón, la UPAEP ha realizado estudios para la elaboración de un nuevo producto a base de aguamiel, siguiendo la tendencia del desarrollo de alimentos saludables, aprovechando el alto contenido de fructanos (inulina) presentes en el aguamiel; los cuales otorgan un carácter prebiótico. Ésto llevó a la creación de una bebida probiótica mediante la adición de bacterias ácido lácticas, la cual a pesar de los buenos resultados que presentó como alimento funcional, se encontró limitada en características sensoriales como olor y sabor. De esta manera se evidencia la necesidad de reformular la bebida manteniendo sus propiedades nutreacéticas.

Por lo tanto, se planteó una mejora del proceso de elaboración de la bebida reduciendo costos de materia prima mediante la dilución con agua potable al 50%, manteniendo su carácter probiótico y asegurando su inocuidad. A través de un diseño experimental y pruebas sensoriales se reformuló la bebida con 10% °Brix, 0,5 mL de saborizante de coco/100 mL de bebida y la bacteria *L. Leichmannii*. Posteriormente, se redujo a 14h el tiempo de incubación del inóculo de la bacteria siguiendo la cinética de crecimiento microbiano y se encontró que el potencial de la bebida para ingresar en el mercado de probióticos es favorable. También, se realizó el escalamiento del proceso de 0,5L a 4L observando que las bebidas no presentan cambios en las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Laboratorio Biotecnoambiental. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D. en Ingeniería de procesos. Codirector: Beatriz Pérez Armendáriz. Ingeniera en Alimentos, M.Sc., Ph.D. en Biotecnología.

### Abstract

**Title:** Improvement of the process of a probiotic drink production prepared from aguamiel of *Agave Salmiana* developed at the Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Mexico\*

**Authors:** Alexandra del Rosario Acevedo Caselles and Juan Carlos Flórez Cubides.\*\*

**Keywords:** Aguamiel, Probiotic Drink, *Agave Salmiana*, *Lactobacillus leichmannii*, *Bacillus tequilensis*.

#### **Description:**

The aguamiel is a product of Mexican tradition, obtained from the maguey pulquero (*Agave salmiana*). It has lost interest by the new generations in Mexico due to the great offer of refreshing and alcoholic drinks in the market, plus to the existing myths about his obtaining process; affecting the economy of the country's producers of aguamiel. Therefore, the UPAEP has made studies for the development of a new product based on aguamiel, following the trend of the development of healthy food, taking advantage of the high content of fructans (inulin) present in the aguamiel which grant a prebiotic character. This led to the formulation of a probiotic drink through the addition of lactic acid bacterias, which despite the good results that presented as functional food, it found limited in sensory characteristics such as smell and taste. In this way, it is evident the need to reformulate the drink maintaining its nutreaceutical properties.

Therefore, it was proposed an improvement of the drink elaboration process, reducing raw material costs through the dilution with 50% potable water, maintaining its probiotic character and securing its harmlessness. Through an experimental design and sensory tests, the drink was reformulated with 10% ° Brix, 0.5 mL of coconut flavoring / 100 mL of drink and *L. Leichmannii* bacteria. Subsequently, the incubation time of the inoculum of the bacteria was reduced to 14h following the kinetics of microbial growth and it was found that the potential of the drink to enter the probiotic market is favorable. Also, was performed the scaling of the process from 0.5L to 4L, observing that the drink does not present changes in the organoleptic, physicochemical and microbiological properties.

---

\* Undergraduate Project

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Laboratorio Biotecnoambiental. Director: Carlos Jesús Muvdi Nova. Ingeniero Químico, M.Sc., Ph.D. en Ingeniería de procesos. Codirector: Beatriz Pérez Armendáriz. Ingeniera en Alimentos, M.Sc., Ph.D. en Biotecnología.

### **Presentación del Laboratorio de Investigación Biotecnoambiental.**

En la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), se encuentra el Laboratorio de Investigación Biotecnoambiental, el cual es un espacio para el desarrollo de proyectos de investigación en áreas como alimentos, biotecnología, ambiental, biología molecular y nanotecnología. En este lugar fue desarrollado este trabajo de investigación, en la modalidad de pasantía de investigación, dirigido por la Doctora Beatriz Pérez Armendáriz, Directora de la Facultad de Biotecnología (UPAEP, 2017, párr.1).

La Doctora Beatriz Pérez Armendáriz es Ingeniera en Alimentos, Maestra en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de Iztapalapa (UAM) y Doctora en Ciencias con especialidad en Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (IPN). Su interés en el área científica se relaciona con las áreas de Biotecnología de Alimentos y Biotecnología Ambiental, con líneas de investigación en Microbiología aplicada a la producción de alimentos funcionales con énfasis en probióticos y Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (UPAEP, 2017, párr. 1-5).



## Introducción

El agave también conocido como maguey, planta de la familia *Agavaceae*, ha tenido una gran importancia económica y cultural en México pues desde la época prehispánica ha sido aprovechado para diferentes fines de los cuales destacan la formulación de alimentos y bebidas (Muñiz *et al.*, 2013, p. 12). Una de las especies más importantes del altiplano de México es el maguey pulquero (*Agave salmiana*) (Narváez *et al.*, 2016, p. 34), reconocida por sus hojas anchas, fuertes, carnosas, de color verde, de tallo corto y macizo, con forma de roseta y tamaños que van desde 1,50m a 3,40m de altura y hasta 5m de diámetro, como se observa en la Figura 1. Esta planta se encuentra en zonas áridas, ya sean terrenos planos o montañosos como lo es la zona central de México (Cortés y Basurto, 2005, párr. 2).



*Figura 1.* Planta maguey pulquero (*Agave salmiana*). Adaptado de: World of Succulents.

El principal producto obtenido es el aguamiel, líquido acuoso extraído del interior de la planta justo antes de la floración, compuesto principalmente por carbohidratos (fructosa), potasio, magnesio, calcio y vitamina C (Flores y Aguilar, 1995, párr. 10; Bautista y Arias, 2008, p. 48). La fermentación de éste es destinada tradicionalmente a la elaboración de pulque, el cual es una bebida alcohólica nutritiva (Flores *et al.*, 2009, párr. 2), olvidada por las nuevas generaciones mexicanas debido a la gran diversidad de bebidas alcohólicas disponibles en el mercado (Muñiz *et al.*, 2013,

p. 13). El aguamiel presenta mayoritariamente fructooligosacáridos los cuales son la forma soluble de la inulina; polímero de fructosa unido a una glucosa terminal denominado fructano (Bautista y Arias, 2008, p. 49; Muñiz *et al.*, 2013, p. 18). Los fructanos forman una fibra soluble que fomenta el desarrollo selectivo de bacterias benéficas en la flora intestinal, otorgando a este producto la característica de prebiótico favoreciendo la salud del consumidor (Urías, 2008, p. 17). Dichas bacterias ayudan a que los compuestos presentes en los alimentos que no son digeribles en la parte superior del tracto intestinal sean absorbidos en el intestino grueso (Narváez *et al.*, 2016, p. 39).

Con el fin de atribuirle un valor agregado a este recurso de tradición, la UPAEP ha trabajado en el desarrollo de una bebida con carácter probiótico a partir del aguamiel de *Agave salmiana*. El proceso diseñado inicialmente por Aparicio (2014) consiste en un tratamiento térmico de pasteurización en el cual se elimina la flora microbiana que existe en el aguamiel, evitando que el líquido se fermente hasta el punto de convertirse en pulque (DiCYT, 2016, párr. 3).

Asimismo, con la intención de aumentar las propiedades nutreacéticas de la bebida se le atribuyó un carácter probiótico mediante la adición de microorganismos. Esto con el objetivo de mantener un balance microbiano en el intestino, generando cambios benéficos en la salud del consumidor (Rodríguez, 2009, p. 7). Por lo general, los microorganismos que brindan estos beneficios son las bacterias fermentadoras productoras de ácido láctico, como por ejemplo, las pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Cabezas, 2009, p. 4). Para el proceso, Aparicio (2014) aisló del aguamiel una cepa, la cual identificó mediante pruebas bioquímicas encontrando que esta correspondía a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, siendo este el nombre formal de *Lactobacillus leichmannii* (ATCC® 7830™); dicha cepa fue seleccionada y adquirida para la etapa de fermentación en la elaboración de la bebida probiótica.

A partir de estudios sensoriales realizados a la bebida por Aparicio (2014), se determinó un bajo grado de aceptabilidad de ésta, pues los jueces la asimilaron como bebida refrescante y no como bebida probiótica como se esperaba. Por lo que González y Hernández (2016) en un trabajo posterior, decidieron cambiar la bacteria a usar por *Bacillus tequilesis*, aislada igualmente del aguamiel, esto con el fin aumentar la aceptabilidad de la bebida. Adicionalmente, recomendaron transmitir a la población los beneficios que la bebida otorga a la salud al consumirse, ya que puede ser sugerida en la dieta de personas con diabetes o intolerantes a la lactosa (DiCYT, 2016, párr. 5). Del estudio realizado por González y Hernández (2016) se encontró que la bebida continuó presentando deficiencias en propiedades como olor y sabor, pues comparándola respecto a bebidas comerciales los jueces prefieren éstas sobre la bebida probiótica.

Cabe aclarar que los análisis de las propiedades organolépticas se realizan a través de pruebas sensoriales, las cuales se encargan de analizar los alimentos por medio de los sentidos de acuerdo a las sensaciones que se experimentan en el momento de su consumo (Hernández, 2005, p. 12). Existen diferentes pruebas sensoriales, para este estudio son relevantes dos tipos, la discriminativa con prueba dúo-trío la cual permite diferenciar si dos muestras son perceptiblemente diferentes o similares a una muestra de referencia. La afectiva de preferencia en la que el juez elige el producto que más le agrade; y de satisfacción donde a través de una escala hedónica de cinco puntos el panelista otorga información puntual sobre el grado de satisfacción que tiene con un producto (Severiano *et al.*, *s.f.*, p. 97).

Finalmente, en este trabajo se analizaron las diferentes variables que intervienen en las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida, buscando una mejora en su proceso de elaboración para favorecer el consumo del producto respecto a los similares disponibles en el mercado. Esta estrategia contribuiría con el propósito del Gobierno de México

de evitar la desaparición del aguamiel como materia prima tradicional en su cultura, desarrollando proyectos para la producción de nuevos productos funcionales que aún no han sido explotados (Muñiz *et al.*, 2013, p. 19). Adicionalmente, la UPAEP adelanta estudios sobre la influencia de la bebida en la microbiota intestinal de pacientes con estrés y colon irritable, generando un alto interés tanto social como biotecnológico.

## Objetivos

### Objetivo General

Mejorar el proceso de producción de una bebida probiótica elaborada a partir de aguamiel de *Agave salmiana* desarrollada en la UPAEP mediante el análisis de las variables del proceso que influyen en las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida.

### Objetivos Específicos

- Determinar la influencia de la relación aguamiel:agua en la cantidad final de microorganismos presentes en la bebida, cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, y reduciendo los costos de materia prima.
- Elaborar distintas formulaciones con base en la bebida desarrollada en la UPAEP bajo diferentes condiciones de operación a través de un diseño experimental, para seleccionar la formulación con la mejor aceptación.
- Definir el tiempo de incubación del inóculo con base en la curva de crecimiento microbiano, asegurando el contenido reglamentario de microorganismos y mejorando esta etapa del proceso de elaboración.

## 1. Metodología

En la Figura 2 se muestra el diagrama metodológico empleado en el proyecto de investigación desarrollado en tres fases.

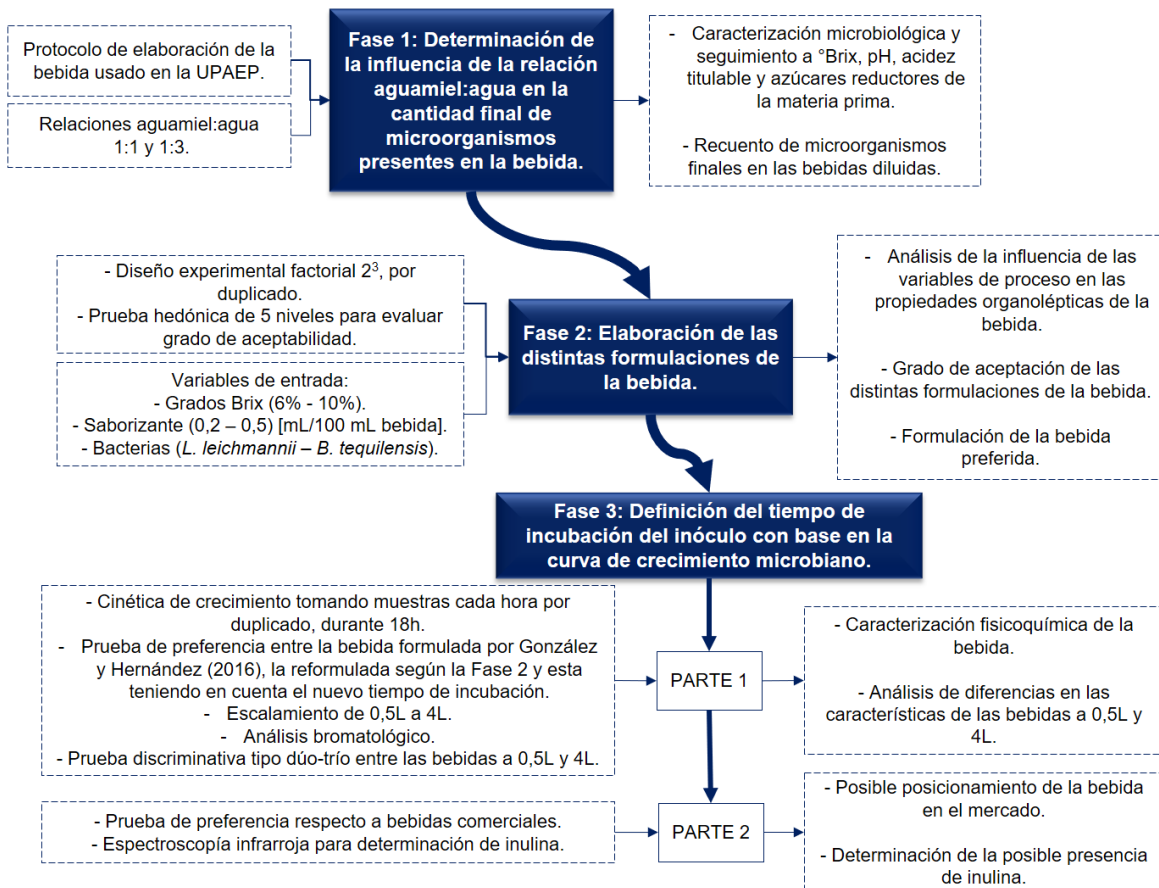


Figura 2. Diagrama metodológico.

### 1.1. Fase 1: Determinación de la influencia de la relación aguamiel:agua en la cantidad final de microorganismos presentes en la bebida

Inicialmente, se llevó a cabo un análisis microbiológico y un seguimiento de distintas propiedades fisicoquímicas de la materia prima de dos productores de aguamiel y pulque de dos localidades con diferentes costos. Esto con el fin de determinar las condiciones de llegada del aguamiel y

comparar entre sí los dos lotes para elegir el productor que asegure la mejor calidad de la materia prima. Adicionalmente, se contrastaron estos dos con el pulque (bebida fermentada) del segundo productor, con la finalidad de encontrar diferencias entre la materia prima antes y después de su fermentación natural. Esto se realizó con base en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) para el conteo de microorganismos mesófilos, hongos y levaduras, coliformes totales y *salmonella-shigella*. También se realizó un seguimiento de propiedades fisicoquímicas como °Brix, azúcares reductores, pH y acidez titulable.

Posteriormente, usando el protocolo de elaboración de la bebida establecido por Aparicio (2014), mostrado en la sección 1.4.2. “Métodos de cuantificación, análisis y experimentales”, se realizó un análisis de la influencia de la relación aguamiel:agua sobre la cantidad final de microorganismos en la bebida, adicionando 500µL de inóculo de la bacteria, ya sea *Lactobacillus leichmannii* o *Bacillus tequilensis*. Para evaluar la posibilidad de disminuir costos de materia prima, se reformuló el proceso en la fase inicial, adicionando agua potable al aguamiel a pasteurizar en dos relaciones de aguamiel:agua, 1:1 y 1:3. Se buscó que estas formulaciones conservaran el mismo orden de magnitud final de microorganismos ( $10^7$  UFC/mL) que la formulación original de la bebida (relación 1:0), cumpliendo con lo establecido por la norma NOM-181-SCFI-2010 para que la bebida sea considerada probiótica.

La cantidad final de microorganismos se verificó mediante un recuento en un microscopio con cámara de Neubauer, que da el resultado en Células/mL. No fue posible obtener esta información en UFC/mL, debido a que *L. leichmannii* solo crece en medio líquido y en este medio no es posible realizar el conteo de colonias formadas.

## 1.2. Fase 2: Elaboración de las distintas formulaciones de la bebida

Las variables analizadas y sus niveles alto y bajo se presentan en la Tabla 1. La evaluación se realizó a través de un diseño experimental tipo factorial  $2^3$ , por duplicado, con pruebas de 0,5L. Las variables de entrada se eligieron en función de las propiedades organolépticas de la bebida y que a su vez fueran relevantes en cada una de las etapas del proceso de elaboración.

Tabla 1.

*Formulaciones para el diseño experimental factorial  $2^3$ .*

Prueba	° Brix [%]	Saborizante de coco [mL/100 mL bebida]	Tipo de Bacteria
1	6	0,2	<i>L. leichmannii</i>
2	10	0,2	
3	6	0,5	
4	10	0,5	
5	6	0,2	<i>B. tequilensis</i>
6	10	0,2	
7	6	0,5	
8	10	0,5	

El diseño experimental fue evaluado sensorialmente mediante un análisis de satisfacción en el cual se usó una escala hedónica de 5 puntos que va desde, me disgusta mucho (1) hasta me gusta mucho (5). Las pruebas de análisis sensorial se realizaron con paneles de jueces no entrenados de 25 personas para cada prueba (los cuestionarios utilizados se encuentran en el Apéndice A).

Los datos obtenidos de las pruebas se analizaron estadísticamente, a través del programa InfoStat V.2016, mediante una prueba ANOVA obteniendo información de la influencia ( $p$ -valor $<0,05$ ) de las variables evaluadas en el diseño experimental sobre las propiedades organolépticas de la bebida como apariencia, olor y sabor (González y Hernández, 2016; García y Pacheco, 2010, p. 484). Posteriormente, sobre las variables del diseño experimental que presentaron influencia en la prueba anterior (ANOVA) se efectuaron pruebas Tukey. Esto permitió

determinar el nivel para las variables analizadas que asegura la preferencia en términos de apariencia, olor y sabor; obtenido a partir de diferencias significativas entre sus medias.

Finalmente, con otra prueba Tukey adicional, pero esta vez para las formulaciones respecto a cada propiedad organoléptica y con base en los resultados estadísticos anteriores, se seleccionó la formulación que obtuvo un mayor grado de aceptabilidad para las propiedades evaluadas.

### **1.3. Fase 3: Definición del tiempo de incubación del inóculo con base en la curva de crecimiento microbiano**

La Fase 3 se dividió en dos partes. La primera parte se inició con el análisis de la cinética de crecimiento de las dos bacterias (*L. leichmannii* y *B. tequilensis*), buscando reducir el tiempo de incubación del inóculo, pero manteniendo la cantidad mínima de microorganismos finales en la bebida requeridos por la norma. Esto debido a que el tiempo seleccionado por Aparicio (2014) fue de 48h, sin tener en cuenta el comportamiento de las bacterias y su efecto sobre las características organolépticas que estas pudieran generar en la bebida.

La cinética en medio de cultivo líquido *Man, Rogosa y Sharpe* (caldo MRS) se realizó por el método de turbidimetría, a través de un espectrofotómetro el cual registra la densidad óptica con una longitud de onda de 560 nm (Departamento de Biotecnología, 2010, p. 52). Las bacterias fueron cultivadas a 37°C por duplicado tomando muestras cada hora, durante 18h, con un inóculo de 100 µL de bacteria en 10 mL de caldo MRS. La temperatura escogida es la recomendada para la incubación de bacterias ácido lácticas (Rodríguez, 2009, p. 42); siendo ésta también la temperatura corporal promedio de un ser humano (Alpizar y Medina, 1998, p. 80), lugar donde se encontrarán dichas bacterias después del consumo de la bebida.

Posteriormente, se realizó una prueba de preferencia entre la bebida formulada por González y Hernández (2016), la bebida seleccionada del diseño factorial y esta última modificando el tiempo

de incubación del inóculo siguiendo la cinética de crecimiento previamente establecida. Esto se realizó con el fin de determinar la diferencia en el grado de aceptación y elegir la bebida a usar en un escalado a 4L para observar posibles cambios en las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas (Llano, 2007, p. 52).

Se realizó la caracterización fisicoquímica a la bebida seleccionada en la prueba de preferencia a 0,5L y a su respectivo escalado a 4L mediante un análisis bromatológico, en el cual se evaluó: humedad, cenizas, carbohidratos totales, proteína cruda, grasa, azúcares reductores totales, fibra cruda y contenido energético total, realizado por Bioteccsa Laboratorios S.A. Igualmente, se realizó un seguimiento a propiedades como °Brix y pH durante las etapas del proceso y un recuento de microorganismos totales finales a las bebidas ya mencionadas. Además, se efectuó una prueba discriminativa tipo dúo-trío con el fin de determinar si existían diferencias significativas en el sabor entre la bebida formulada a 0,5L y la escalada a 4L.

En la segunda parte se realizó una prueba de preferencia respecto a dos bebidas comerciales, una refrescante y otra líder en el mercado de probióticos, para evaluar el posible posicionamiento de la bebida en el mercado. Finalmente, se llevó a cabo una espectroscopía infrarroja para determinar la posible presencia de inulina en el aguamiel puro y pasteurizado y en la bebida elaborada a 0,5L y a 4L, usando como referencia inulina comercial.

#### **1.4. Materiales, métodos experimentales y de cuantificación.**

1.4.1. Materiales, insumos y equipos. Aguamiel (Nanacamilpa, Tlaxcala, México), agua potable Epura, azúcar refinada Chedraui, bacterias *Lactobacillus leichmannii* y *Bacillus tequilensis*, inulina premium de agave azul orgánico Biotesa, caldo MRS Merck, agar cuenta estándar Bioxon, agar papa-dextrosa Difco, agar rojo bilis violeta Merck, agar *salmonella-shigella*

Merck, DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico), NaOH en lentejas (Hidróxido de sodio), solución buffer pH 4 y 7 Baker.

Autoclave AESA CU250, balanza scout Pro, contador de colonias Sol Bat Q20 2626, campana de flujo laminar, refractómetro Pocket Atago, pH-metro Conductronic, parrilla de inducción doble Ecocinare, incubadora ECOSHEL 9165, microscopio Zeiss, cámara de Neubauer Improved Brightline, espectrofotómetro UV Científica Vela VE-5100UV.

#### 1.4.2. Métodos de cuantificación, análisis y experimentales.

- Métodos de cuantificación y análisis: Recuento de microorganismos mesófilos (NOM-092-SSA1-1994), hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994), coliformes (NOM-113-SSA1-1994) y *salmonella-shigella* (NOM-114-SSA1-1994), °Brix en un refractómetro Pocket Atago, pH con un pH-metro Conductronic, acidez titulable (NMX-F-102-S-1978), cantidad mínima de microorganismos probióticos (NOM-181-SCFI-2010), recuento de microorganismos por método Celeromics, azúcares reductores por medio del método colorimétrico DNS (Ácido 3,5-dinitrosalicílico) en un espectrofotómetro UV Científica Vela VE-5100 UV (Ávila et al., 2012), estudio cinético a 100µL de inóculo en tubos 10mL de caldo MRS tomando muestras cada hora durante 18h por duplicado, análisis estadísticos en InfoStat V.2016.

- Protocolo de elaboración de la bebida probiótica: Propuesto por Aparicio (2014), el cual se encuentra resumido en la Figura 3. Éste inicia con la obtención de la materia prima la cual se encuentra a temperatura ambiente. Posteriormente, sigue una etapa de pasteurización a 80°C durante 30min en la cual pasados los primeros 20min se agrega el azúcar para ajustar su contenido a 16 °Brix. Una vez enfriado se debe agregar el inóculo, el cual es activado 48h antes en un matraz con 50mL de caldo MRS y 750µL de bacteria a 37°C. La bebida ya inoculada se incuba durante 48h para que ocurra el proceso de fermentación láctica a 37°C, después de pasado el tiempo de

incubación a la bebida se le agrega 0,4mL de saborizante de coco cada 100mL de bebida con el fin de hacer su sabor más agradable. Finalmente, se envasa y se refrigera a 4°C con un tiempo de vida de anaquel de 19 días.

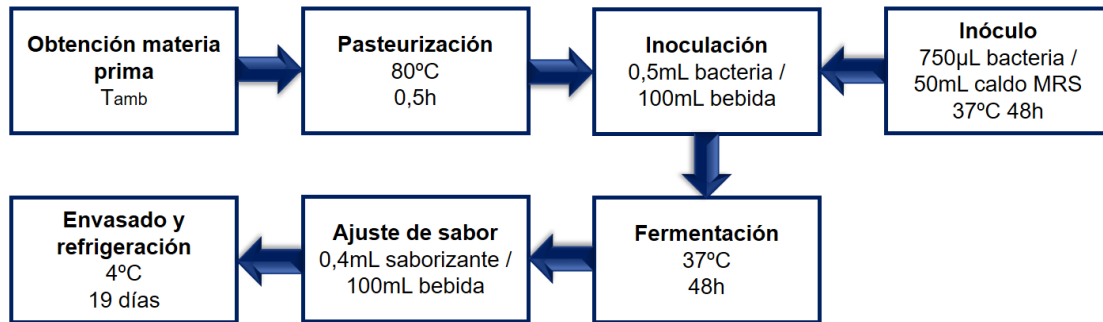


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la bebida, Aparicio (2014).

## 2. Análisis y Discusión de Resultados

### 2.1. Determinación de la influencia de la relación aguamiel:agua en la cantidad final de microorganismos presentes en la bebida

La caracterización microbiológica y el seguimiento de propiedades como °Brix, azúcares reductores, pH y acidez titulable de la materia prima fue realizada a dos proveedores de aguamiel y pulque diferentes, como se muestra en la Tabla 2.

Los resultados obtenidos de la caracterización microbiológica se muestran en la Tabla 2-a), donde se evidencia una cantidad mayor de microorganismos presentes en el lote aguamiel I respecto al lote aguamiel II en todas las pruebas realizadas. El lote aguamiel I presentó crecimiento de coliformes totales mostrando una menor calidad sanitaria con la posibilidad de que algunos de los microorganismos detectados sean patógenos (Anmat, 2014, p. 5). A diferencia de éste, el lote

aguamiel II no presentó crecimiento de este tipo de microorganismos por lo que fue necesario corroborar dicho resultado a través de una prueba en agar *salmonella-shigella* donde no se registró ninguna formación de este tipo de colonias; lo cual es de gran importancia pues al ser un producto de tipo alimenticio no debe contener ningún microorganismo que pueda afectar la salud del consumidor (MinSalud, 2013, párr. 1).

Tabla 2.

*Caracterización de la materia prima (aguamiel) y el pulque.*

*a) Caracterización microbiológica*

<b>Lote</b>	<b>Mesófilos* [UFC/mL]</b>	<b>Hongos y levaduras* [UFC/mL]</b>	<b>Coliformes Totales* [UFC/mL]</b>
Aguamiel I	$5,5 \pm 2,5 \times 10^4$	$1,8 \pm 2,5 \times 10^7$	$8,3 \pm 1,5 \times 10^6$
Aguamiel II	$4,3 \pm 4,2 \times 10^3$	$3,5 \pm 4,9 \times 10^6$	SC**
Pulque	$5,0 \pm 5,0 \times 10^4$	$1,1 \pm 0,8 \times 10^6$	SC**

\*Desviación estándar obtenida de realizar el conteo a placas de diferentes diluciones.

\*\* SC: Sin crecimiento.

*b) Seguimiento a propiedades fisicoquímicas.*

<b>Lote</b>	<b>pH [1]</b>	<b>Acidez titulable [%/100 mL muestra]</b>	<b>°Brix [%]</b>	<b>Azúcares reductores [mg/mL]</b>
Aguamiel I	3,92	19,5	4,8	11,86
Aguamiel II	3,91	15,6	3,7	8,74
Pulque	3,84	15,4	2,1	6,30

La presencia de microorganismos mesófilos, hongos y levaduras pone en duda la calidad de la materia prima, pero es normal un recuento elevado de estos microorganismos en el producto, pues es un alimento perecedero que presenta un proceso natural de fermentación alcohólica a gran velocidad (Anmat, 2014, p. 5). Igualmente, el aguamiel fue sometido a un proceso de pasteurización a 80°C, en el cual se busca eliminar la flora microbiana que pueda contener la materia prima, especialmente los patógenos. Para estudios posteriores se podría pensar en la esterilización térmica como una opción de aseguramiento de inocuidad del producto aumentado su vida de anaquel.

El seguimiento realizado a las distintas propiedades fisicoquímicas se muestra en la Tabla 2-b), en la cual se observa que el lote aguamiel I presenta un mayor valor en las propiedades evaluadas. Siendo lo anterior incoherente porque un producto al tener elevada acidez, sus °Brix y azúcares reductores deberían ser menores pues éstos son el sustrato usado por las bacterias que producen ácidos orgánicos como el ácido láctico; lo que evidencia una posible adulteración adicionando azúcar a la materia prima. Esto se atribuye a que el lote aguamiel I es comercializado por un intermediario el cual no lo produce directamente, por lo tanto, este lo puede manipular a su conveniencia, mientras que el lote aguamiel II proviene de un productor y comercializador el cual si presenta coherencia en los resultados de las propiedades evaluadas generando mayor confiabilidad. Esto permitiría pensar en la necesidad de implementar pruebas analíticas instrumentales directas que posibiliten la caracterización de la materia prima para asegurar la calidad y evitar su uso en estado de adulteración.

Por otra parte, en los análisis realizados respecto al pulque, se observa que presentó una cantidad menor de levaduras y azúcares reductores comparado con el aguamiel. Esto es debido a que las levaduras son las encargadas de realizar la fermentación alcohólica natural del aguamiel a pulque utilizando estos últimos como sustrato (Ingraham e Ingraham, 1998, p. 736; Vázquez y Dacosta, 2007, p. 251).

Por consiguiente, y a pesar de tener un costo tres veces mayor en comparación al otro proveedor, se escogió como proveedor el segundo productor de aguamiel, originario de Nanacamilpa, ya que posee una mejor calidad microbiológica sumado a que existe menor riesgo de manipulación de la materia prima.

Por lo anterior, se decidió replantear la disminución de costos de materia prima realizando diluciones con agua potable. En la Tabla 3 se pueden observar los resultados del conteo de

microorganismos finales en la bebida para distintas relaciones aguamiel:agua. Se evidenció que la relación 1:1 conserva el mismo orden de magnitud de microorganismos respecto a la bebida original (1:0). Por lo tanto, se logró una disminución de costos de materia prima del 50%, ya que la relación 1:1 mantiene el orden de  $1 \times 10^7$  Células/mL para ambas bacterias; asegurando su carácter probiótico de acuerdo con la NOM-181-SCFI-2010.

Tabla 3.

*Cantidad final de microorganismos en la bebida para distintas relaciones de aguamiel:agua.*

Relación aguamiel:agua	<i>L. leichmannii</i> [Células/mL]	<i>B. tequilensis</i> [Células/mL]
1:0	$2,01 \times 10^7$	$2,28 \times 10^7$
1:1	$1,33 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$
1:3	$8,51 \times 10^6$	$5,97 \times 10^6$

## 2.2. Elaboración de las distintas formulaciones de la bebida

Las formulaciones del diseño experimental fueron elaboradas de acuerdo a las relaciones entre las variables establecidas, como se mostró en la Tabla 1. Para seleccionar la formulación con mayor grado de aceptabilidad se realizó un análisis sensorial mediante una prueba de satisfacción. Según Mondino y Ferratto (2006) una vez asegurada la higiene de un alimento las propiedades organolépticas son el criterio más importante y determinante para la elección de un producto por parte del consumidor. Los datos obtenidos de la prueba se muestran en la Figura 4.

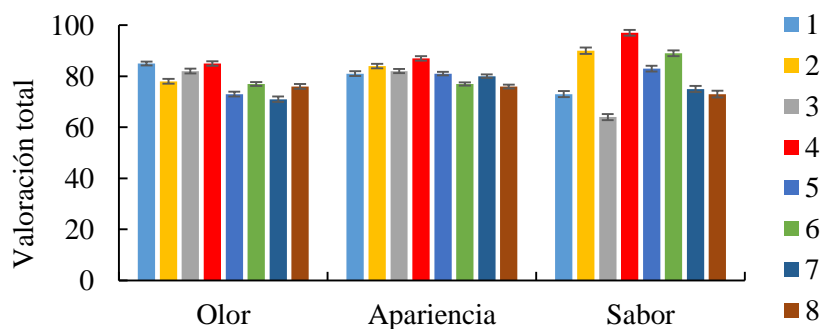


Figura 4. Valoración total prueba de satisfacción del diseño experimental.

Se puede observar que estos resultados poseen una valoración total cercana en algunas propiedades, por lo que es necesario analizarlos estadísticamente mediante pruebas ANOVA y Tukey, para encontrar la influencia y diferencias significativas entre ellos. Los resultados estadísticos más relevantes de cada prueba se muestran en la Tabla 4 (el Apéndice B presenta en detalle los resultados).

Tabla 4.

*Pruebas ANOVA y Tukey para las diferentes propiedades organolépticas evaluadas.*

Propiedad	ANOVA		Tukey			
	Variable	p-valor	Nivel	Media	Letra**	
Apariencia	NI	-	-	-	-	
Olor	Tipo de bacteria	0,0103	<i>B. tequilensis</i>	2,97	A	
			<i>L. leichmannii</i>	3,30	B	
Sabor	°Brix	0,0015	6%	2,95	A	
			10%	3,49	B	
	°Brix-Tipo de bacteria	0,0067	6%	<i>L. leichmannii</i>	2,74	A
			6%	<i>B. tequilensis</i>	3,16	AB
			10%	<i>B. tequilensis</i>	3,24	AB
			10%	<i>L. leichmannii</i>	3,74	B

\*NI: Ninguna variable influye. \*\*: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Inicialmente, en el análisis estadístico realizado a la apariencia se observa que ninguna de las variables del diseño experimental arrojó influencia sobre ésta, debido a que las interacciones de la prueba ANOVA no cumplen con el criterio del  $p\text{-valor} < 0,05$ . Además, los jueces indicaron que todas las formulaciones conservaban la misma apariencia por lo que no se percibía una diferencia entre ellas.

Considerando ahora el olor, se evidencia la influencia del Tipo de bacteria sobre esta propiedad presentando un p-valor de 0,0103, por lo que fue necesario realizar la prueba Tukey, la cual arrojó un valor mayor para la media de *L. leichmannii* indicando que es la preferida por el panel evaluador. Teniendo en cuenta la información anterior y la otorgada por los jueces, se determinó que *L. leichmannii* otorga un olor suave a las formulaciones y *B. tequilensis* un olor fuerte similar

al pulque; este último aspecto genera un rechazo de los evaluadores (de origen mexicano) debido a los mitos existentes sobre la elaboración de dicha bebida (Hernández, 2016, párr. 1). Por lo tanto, se seleccionó *L. leichmannii* como la bacteria con más aceptación.

Finalmente, en los análisis estadísticos realizados al sabor, se observa que los °Brix y la interacción °Brix-Tipo de bacteria influyen sobre esta propiedad (p-valor < 0,05). Con base en las pruebas Tukey se evidencia que se prefieren las bebidas con un mayor grado de dulzor (10%), lo que refleja el gusto por parte de la comunidad mexicana en el consumo de alimentos dulces desde etapas iniciales de la vida (Schiffman y Graham, 2000); y con la bacteria *L. leichmannii*, confirmando esto la elección anterior de dicha cepa como la más aceptada por parte de los jueces.

Además de determinar que variables influían en las distintas propiedades organolépticas evaluadas, se tuvo en cuenta un análisis estadístico Tukey entre las formulaciones del diseño experimental y cada una de estas propiedades. Se eligió la bebida preferida buscando aquella que obtuviera mayor diferencia significativa en cada una de las propiedades, teniendo en cuenta los resultados anteriores. En la Tabla 5, se muestra el análisis estadístico del sabor entre las formulaciones, ya que fue la única propiedad que presentó diferencias significativas; los resultados de las pruebas a la apariencia, olor y sabor se encuentran en el Apéndice B.

Tabla 5.

*Prueba Tukey al sabor entre las formulaciones.*

Propiedad	Formulación	Media	Letra*
Sabor	3	2,56	A
	8	2,92	AB
	1	2,92	AB
	7	3,00	AB
	5	3,32	AB
	6	3,56	AB
	2	3,60	B
	4	3,88	B

\*: Medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Las formulaciones 2 y 4 obtuvieron mayor diferencia significativa respecto a las demás, siendo las más preferidas por parte de los evaluadores. Éstas son semejantes según el criterio Tukey (comparten una letra en común), por lo que no se diferencian entre sí, ya que la formulación con la que se realizó cada una de ellas solo cambia en la cantidad de saborizante agregado y esta variable no arrojó influencia sobre ninguna propiedad organoléptica. Por lo tanto, el criterio para seleccionar la formulación más aceptada entre estas dos, es la media obtenida en la prueba Tukey. De esta manera se escogió la formulación 4 contando con 10% de °Brix, 0,5 mL de saborizante de coco/100 mL de bebida y la bacteria *L. Leichmannii*.

Para observar mejor los resultados obtenidos se realizó un diagrama de araña, como se muestra en la Figura 5. Éste permite percibir las diferencias entre las distintas formulaciones de la bebida (Ferreiro, 2009, párr. 13). En este diagrama se corrobora la elección de la formulación 4 (en color rojo) como la más aceptada por parte del panel de evaluadores, ya que sobresale con mayor valoración en cada propiedad organoléptica; dicha formulación fue usada para la etapa posterior del proyecto.

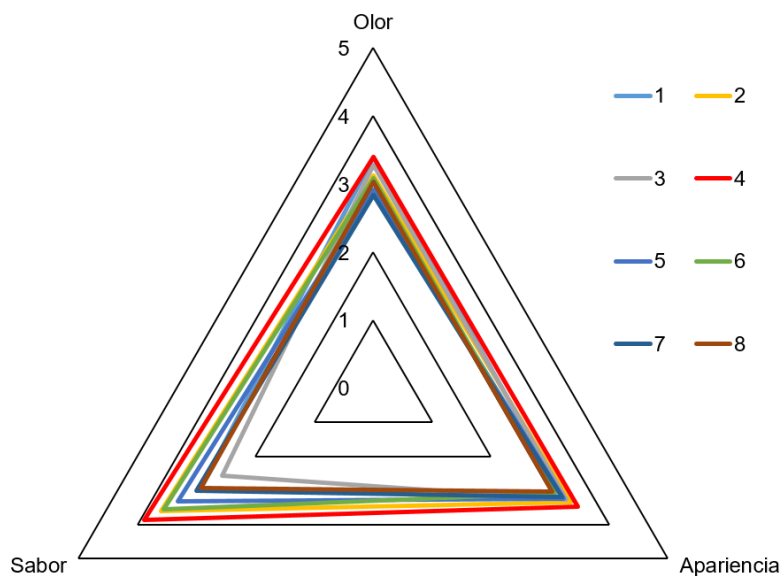


Figura 5. Diagrama de araña para las pruebas sensoriales realizadas a las formulaciones evaluadas.

Finalmente, para verificar el cumplimiento de la norma NOM-181-SCFI-2010 a cada formulación se le realizó un recuento de microorganismos finales, obteniéndose los datos que se muestran en la Tabla 6. Allí se evidencia que la formulación 4 presenta un orden de magnitud de microorganismos igual al requerido.

Tabla 6.

*Cantidad final de microorganismos de las formulaciones del diseño factorial.*

Formulación	Células/mL*	Formulación	Células/mL*
1	$1,98 \pm 0,51 \times 10^7$	5	$1,20 \pm 0,27 \times 10^7$
2	$1,65 \pm 0,11 \times 10^7$	6	$9,31 \pm 0,27 \times 10^6$
3	$1,45 \pm 0,01 \times 10^7$	7	$8,72 \pm 1,10 \times 10^6$
4	$1,37 \pm 0,33 \times 10^7$	8	$8,99 \pm 1,00 \times 10^6$

\*Desviación estándar calculada a partir de recuento por duplicado.

### 2.3. Definición del tiempo de incubación del inóculo con base en la curva de crecimiento microbiano

#### 2.3.1. Parte I

La primera parte de la Fase 3 se inició con la realización de la curva de crecimiento microbiano para las dos bacterias trabajadas, como se muestra en la Figura 6. Estas curvas se componen de diferentes fases, donde la exponencial es la de mayor importancia para el proceso pues es en la etapa en la que el incremento del número de microorganismos es máximo (Bikandi, 2014, párr. 3).

Se puede observar que la fase exponencial para *L. leichmannii* se encuentra entre las 10-15h y para *B. tequilensis* entre 7-14h de prueba; las ecuaciones lineales de dicha fase se ubican en cada gráfica. De estas ecuaciones se destaca la pendiente de la línea ( $m$ ) como la constante de velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), lo que indica que *L. leichmannii* crece más lento respecto a *B. tequilensis*, beneficiando la duración del proceso, pues se reduce el tiempo de incubación del inóculo de *L. leichmannii* a menos de la tercera parte del propuesto por Aparicio (2014).

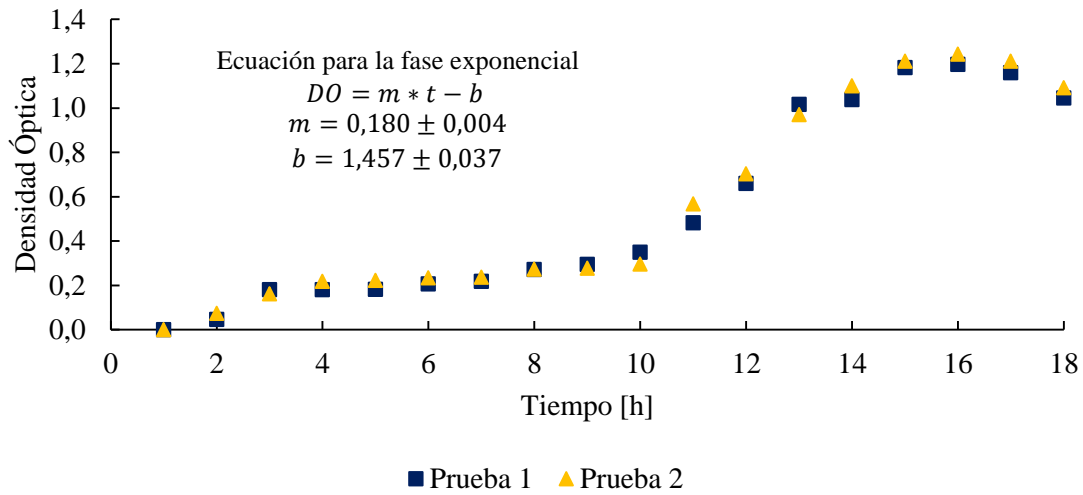
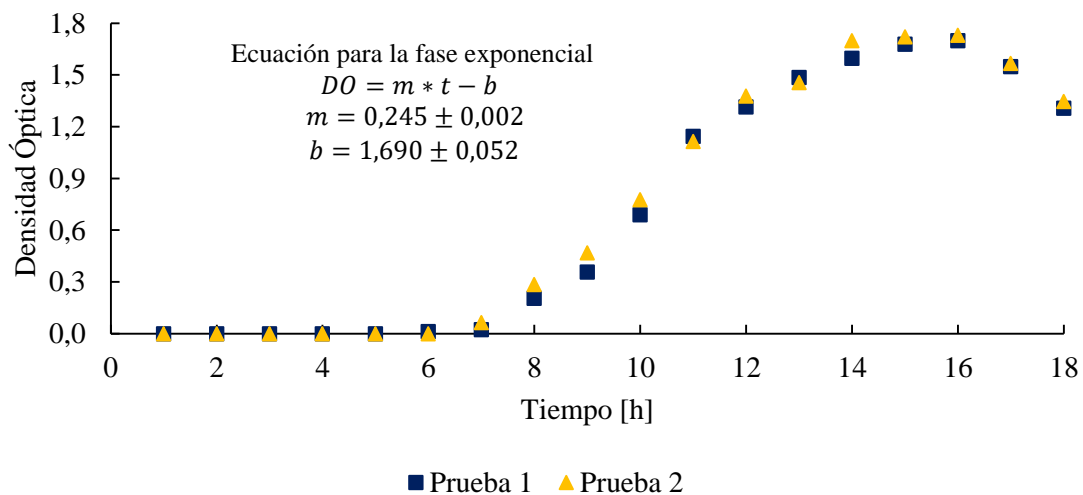
a) *Lactobacillus leichmannii*.b) *Bacillus tequilensis*

Figura 6. Curvas cinéticas de crecimiento microbiano para los microorganismos evaluados.

Posteriormente, se realizó una prueba de preferencia entre la bebida formulada por González y Hernández (2016), la bebida formulada según la Fase 2 (incubación de inóculo de 48h) y la bebida formulada teniendo en cuenta el nuevo tiempo de incubación (incubación de inóculo de 14h); en la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos de la prueba.

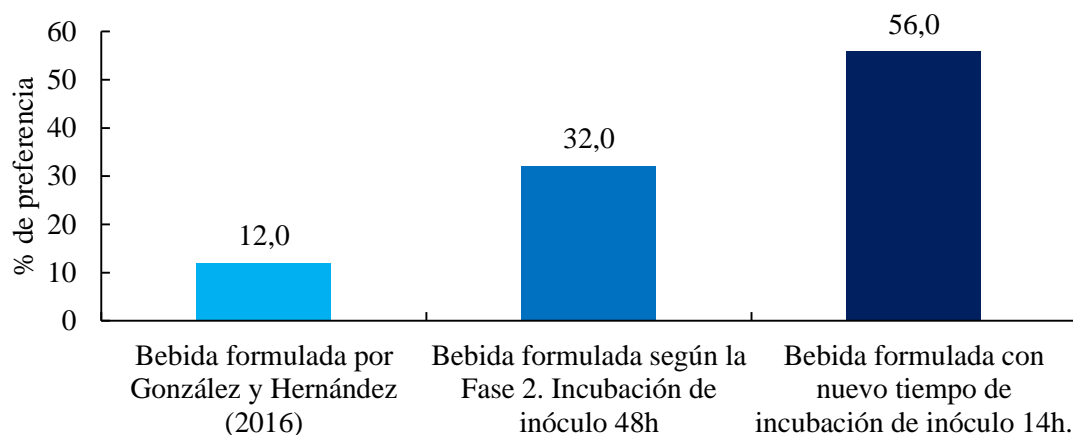


Figura 7. Diferencia de preferencia entre las bebidas probióticas elaboradas.

Se evidenció una mejora en el grado de aceptabilidad de las bebidas desarrolladas en el trabajo respecto a la formulada por González y Hernández (2016), pues ésta continúa siendo rechazada por los evaluadores como se reportó en su trabajo, ocupando el último lugar en la prueba de preferencia. Se encontró que la bebida formulada teniendo en cuenta el nuevo tiempo de incubación fue la preferida por los jueces, diferenciándose en un 44% y 24% de la formulada por González y Hernández (2016) y la formulada en la Fase 2, respectivamente.

Posteriormente, se realizó el escalamiento del proceso de 0,5L a 4L con la bebida elegida anteriormente, para observar posibles diferencias entre sí; igualmente, se realizó un análisis bromatológico a dichas bebidas, como se muestra en Tabla 7 (se pueden observar los resultados originales en el Apéndice C).

Los resultados obtenidos poseen una desviación media baja para cada parámetro evaluado, lo cual indica que existe similitud entre las bebidas. Haciendo esto referencia a que las dos bebidas obtenidas a la escala de 0,5L y 4L son semejantes en sus propiedades fisicoquímicas.

Tabla 7.

*Resultados del análisis bromatológico para las bebidas a 0,5L y 4L.*

Parámetro	Bebida a	Bebida a	Media	Desviación
	0,5L	4L		Media
	[%]	[%]		[%]
Fibra Cruda	0,08	0,05	0,065	0,015
Carbohidratos Totales	7,71	8,86	8,285	0,575
Grasa por Hidrolisis Acida	0,16	0,10	0,130	0,030
Proteína cruda en alimentos	0,28	0,24	0,260	0,020
Humedad en alimentos	91,72	90,69	91,205	0,515
Cenizas en alimentos	0,05	0,06	0,055	0,005
Azúcares Reductores Totales	8,00	7,90	7,950	0,050
Contenido Energético Total [kcal/100g]	33,40	37,30	35,350	1,950
Contenido Energético Total [kJ/100g]	141,80	158,40	150,100	8,300

Adicionalmente, se tuvo en cuenta el seguimiento al pH y °Brix durante cada etapa de elaboración de la bebida, como se muestra en la Figura 8, ya que estas propiedades pueden afectar el producto de interés tratándose de un proceso biológico (Llano, 2007, p. 37; Hernández y Martínez, 2012, p. 16). De esta figura se observa que no existe un cambio notable entre las dos bebidas en cada etapa. Además, se puede percibir que conservan la misma tendencia para las dos propiedades. También se realizó un conteo de microorganismos finales a las bebidas a 0,5L y 4L dando como resultado  $1,06 \times 10^7$  y  $1,20 \times 10^7$  Células/mL, respectivamente, evidenciando que ambas bebidas cumplen con la cantidad mínima de microorganismos según la norma NOM-181-SCFI-2010.

Asimismo, se efectuó una prueba sensorial dúo-trío para determinar si existen diferencias significativas en el sabor de las bebidas a 0,5L y 4L. Según Catania y Avagnina (2007) los resultados obtenidos de la prueba pueden ser interpretados con la tabla de Roessler *et al.* (1948) (Apéndice D) la cual relaciona la cantidad de jueces y el nivel de significancia (para este trabajo fue de 5%), con la cantidad de respuestas mínimas correctas para determinar si hay diferencia significativa. En la prueba, 11 de 25 evaluadores obtuvieron una respuesta correcta respecto a ¿cuál

bebida era igual a la de referencia? Teniendo en cuenta que el resultado es inferior a 18 (número mínimo para establecer una diferencia entre las bebidas), se puede asegurar que no existen diferencias en el sabor en la bebida al momento de su escalado.

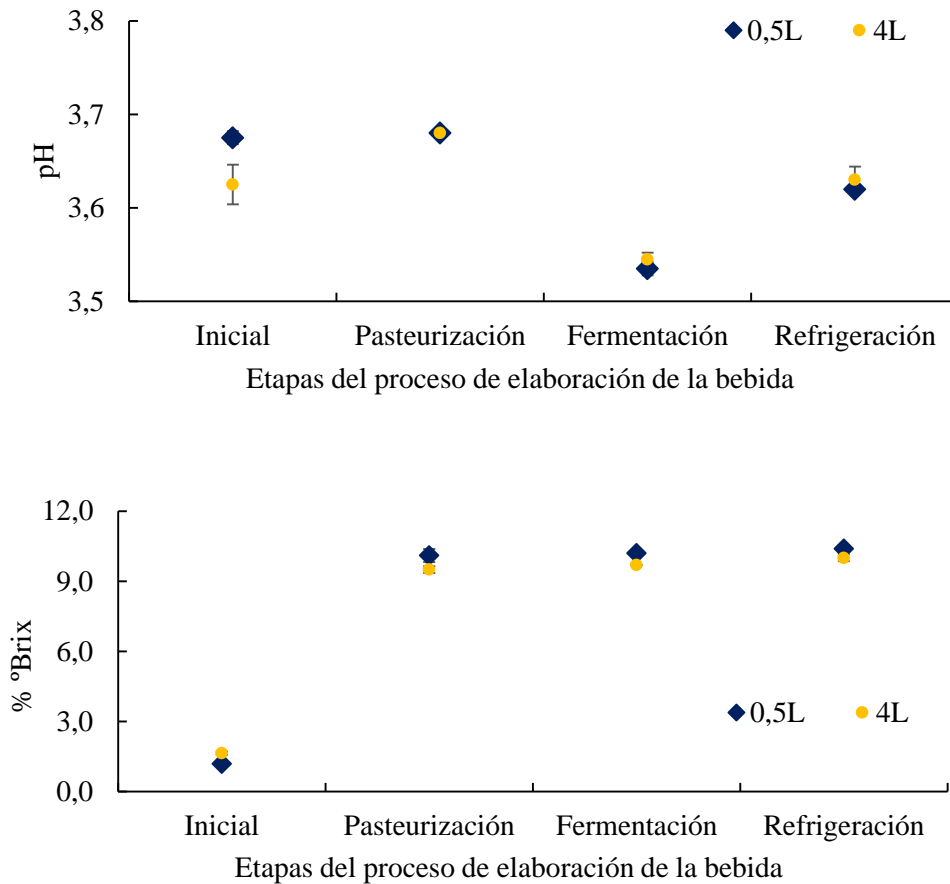


Figura 8. Seguimiento de pH y °Brix de las bebidas a 0,5L y 4L durante su elaboración.

### 2.3.2. Parte II

En la segunda parte de la Fase 3 se realizó una prueba de preferencia de la bebida formulada en la Parte I de esta fase respecto a dos bebidas comerciales, un probiótica y una refrescante, para evaluar el posible posicionamiento de la bebida en el mercado. La primera bebida comercial es un producto lácteo fermentado llamado Yakult® líder en el mercado de probióticos en México

(García, 2000, p. 331), y la segunda es Zuko<sup>®</sup> sabor horchata bebida refrescante tradicional en el mismo país (Monroy *et al.*, 2013, p. 1).

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de preferencia, indicando que la bebida probiótica obtenida en este trabajo es la segunda más elegida por los jueces; lo cual significa una mejora respecto a los resultados obtenidos por González y Hernández (2016), ya que para su estudio la bebida se ubicó en el último lugar. Cabe resaltar que la diferencia en la preferencia de la bebida formulada respecto al Yakult<sup>®</sup> (4%) fue baja, además, la bebida fue preferida sobre el Zuko<sup>®</sup> en un 12%, por lo que muestra el potencial de la bebida probiótica obtenida al ingresar al mercado.

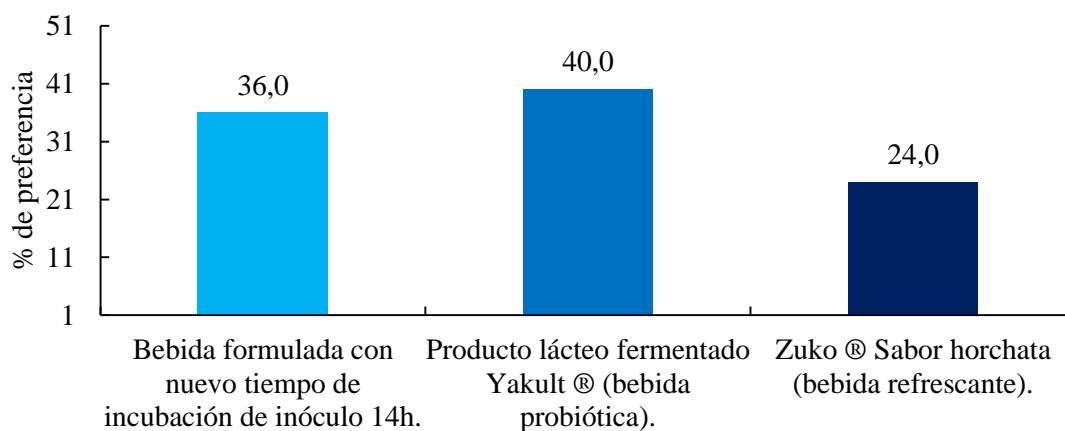


Figura 9. Diferencia de preferencia entre bebidas comerciales y la bebida probiótica.

Finalmente, se realizaron pruebas por espectroscopía infrarroja IR para confirmar la presencia de inulina en el aguamiel puro y pasteurizado, en las bebidas formuladas a escala de 0,5L y 4L, respecto a inulina comercial. En la Figura 10 se presenta un ejemplo de un espectro IR el cual contiene todas las muestras analizadas; las bandas de absorción obtenidas se presentan en la Tabla 8 (los espectros IR individuales se muestran en el Apéndice E).

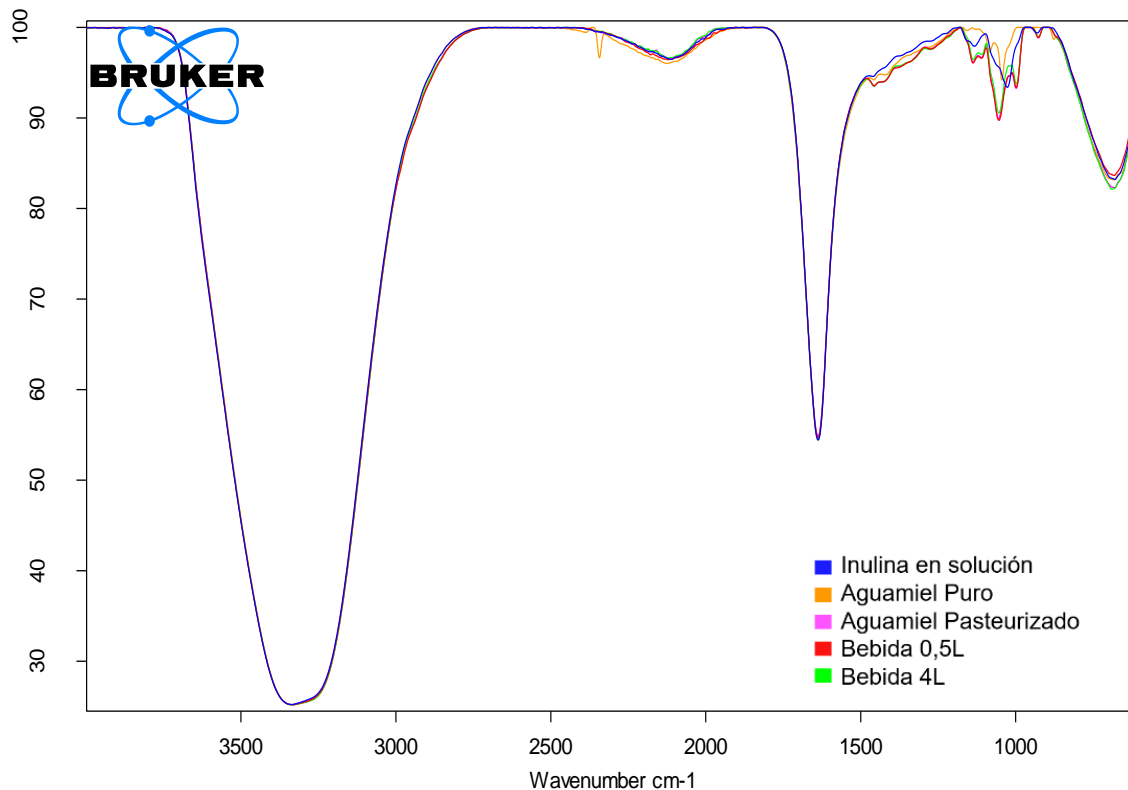


Figura 10. Espectro infrarrojo de todas las muestras analizadas.

Se observa que los espectros presentan bandas características similares, las cuales fueron analizadas con base en la literatura de McMurry (2012). La primera banda se ubica entre 3400-3650  $\text{cm}^{-1}$  con característica fuerte y ancha, identificándose como un grupo O-H; la segunda se ubica en un rango de absorción 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$  con característica fuerte, indicando la presencia de enlaces C-O; otras bandas importantes son las que se presentan entre 800-1300  $\text{cm}^{-1}$  señalando la presencia de enlaces C-C; finalmente, según Álvarez (2007) la banda entre los rangos 960-730  $\text{cm}^{-1}$  se conoce como la región de la huella dactilar propia de los polisacáridos.

Comparando lo anterior con la estructura química de la inulina, Figura 11, se puede observar que los enlaces identificados forman parte de ella y junto con la similitud de los espectros en sus bandas de absorción se refleja la posibilidad de que la inulina se encuentre en la bebida obtenida, ya que esta no se hidroliza durante el proceso de fermentación de las bacterias debido a su carácter

prebiótico. Por tanto, se podría pensar en utilizar la espectroscopía Raman o HPLC para determinar la cantidad de inulina presente en la bebida (Gutierrez y Otero, 2014, p. 1).

Tabla 8.

*Bandas de absorción en  $cm^{-1}$  del análisis por espectroscopía infrarroja.*

Inulina Comercial	Aguamiel	Aguamiel Pasteurizado	Bebida 0,5L	Bebida 4L
3336,60	3333,20	3332,83	3336,73	3334,88
	2343,20			
		2170,30		
2113,21	2124,59	2116,89	2121,18	2119,69
1637,47	1637,87	1637,73	1637,70	1637,76
	1457,59	1457,14	1456,46	1456,96
			1274,55	
1133,45		1137,72	1137,48	1137,31
		1110,14	1109,90	1109,46
	1083,83			
		1055,34	1054,35	1054,57
	1044,72			
1026,81				
		998,51	998,38	997,84
930,98		926,75	927,16	926,50
	877,07			
679,40	683,06	681,05	682,45	688,76

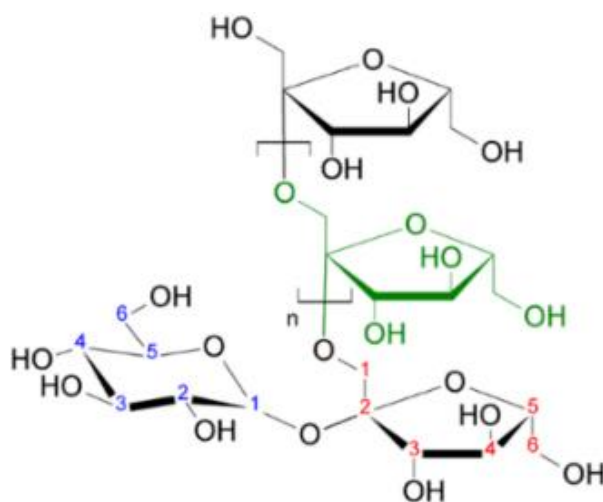


Figura 11. Estructura química de la inulina. Adaptado de: Scientific Psychic.

### 3. Conclusiones

Se determinó la influencia de la relación aguamiel:agua en la cantidad final de microorganismos presentes en la bebida, evidenciando que al realizar las diluciones, su efecto sobre la disminución de la población microbiana fue bajo, lo que permitió trabajar hasta con una dilución del 50% (relación 1:1), asegurando el requerimiento de la norma NOM-181-SCFI-2010. Con esto se logró disminuir los costos de materia prima a la mitad, utilizando un aguamiel que asegure los requerimientos de calidad, reduciendo el riesgo sanitario y de adulteración con azúcares.

Mediante la elaboración de las distintas formulaciones se determinó que existe influencia de las variables establecidas en el diseño experimental sobre las propiedades organolépticas evaluadas. El Tipo de bacteria afecta el olor de la bebida, por otra parte, los °Brix y la interacción °Brix-Tipo de bacteria influyen en el sabor; pero la apariencia no se relaciona con ninguna de las variables estudiadas. A partir de los resultados obtenidos del análisis estadístico se seleccionó la bebida con mayor potencial de aceptación, con las siguientes condiciones: 10% °Brix; 0,5 mL de saborizante de coco/100 mL de bebida y la bacteria *L. Leichmannii*.

A partir del estudio del crecimiento microbiano se logró reducir el tiempo de incubación de la bacteria *L. leichmannii* de 48h a 14h, ya que la bebida continúa cumpliendo con los requisitos reglamentarios para ser considerada probiótica. Además, esta bebida fue seleccionada como la preferida por los jueces y en el momento de su escalado a 4L se encontró que no presenta diferencias significativas en sus características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas. Finalmente, los resultados muestran el potencial de la bebida para ingresar favorablemente en el mercado de probióticos, al mostrar similitudes de preferencia con respecto a una de las bebidas probióticas líder en México.

#### **4. Recomendaciones**

Implementar pruebas analíticas instrumentales que posibiliten la caracterización de la materia prima para asegurar la calidad y evitar su uso en estado de adulteración.

Sustituir la etapa de pasteurización por una esterilización térmica del aguamiel, previo al proceso productivo, como una opción de aseguramiento de inocuidad del producto, aumentando su vida de anaquel.

Determinar la cantidad de inulina presente en la bebida, utilizando un método cuantitativo, como espectroscopía Raman o HPLC.

### Referencias Bibliográficas

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (Anmat). (2014). *Microorganismos indicadores Volumen 3*. Buenos Aires: Ministerio de Salud de Argentina.
- Agencia Iberoamericana para la Difusión de la Ciencia y la Tecnología (DiCYT), (2016). *Universitarios crean una bebida de agave con probióticos para regular los niveles de azúcar*. Ciudad de México: Autor. Recuperado de <http://www.dicyt.com/noticias/universitarios-crean-una-bebida-de-agave-con-probioticos-para-regular-los-niveles-de-azucar>
- Alpízar, L. y Medina, E. (1998). La fiebre conceptos básicos. *Revista Cubana de Pediatría*, 70(2), 80.
- Álvarez, F. (2007). *Evaluación del glucomanano de Konjac como excipiente base en formas de dosificación sólidas de liberación modificada* (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Aparicio, E. (2014). *Desarrollo de una bebida hecha a base de aguamiel adicionada con bacterias ácido lácticas* (Tesis de pregrado). Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México.
- Bautista, N. y Arias, G. (2008). Estudio químico bromatológico de aguamiel de Agave Americana L. (Maguey). *Ciencia e investigación*, 11(2), 46-50.
- Bikandi, J. (2014). *Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano*. Departamento de inmunología, microbiología y parasitología, Universidad del País Vasco.
- Cabezas, M. (2009). *Evaluación de la Capacidad de Colonización Intestinal de un Lactobacillus sp Proveniente de un Fermento Comercial* (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

Catania, C. y Avagnina, S. (2007). *El análisis sensorial*. Curso Superior de Degustación de Vinos, 29, 4-5.

Cortés, L. y Basurto, F. (2005). *Agave salmiana Otto ex Salm*. Grupo Etnobotánico Latinoamericano (GELA): Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de <http://www.ibiologia.unam.mx/gela/pp-1.html>

Departamento de Biotecnología. (2010). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Estados Unidos. American Type Culture Collection (ATCC). *Lactobacillus leichmannii* (ATCC® 7830™).

Ferreiro, E. (2009). Evaluación sensorial en bebidas. *Revista Énfasis Alimentación*. Recuperado de <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/14641-evaluacion-sensorial-bebidas>

Flores, A. y Aguilar, L. (1995). Características físico-químicas del aguamiel producido por las tres especies de *Agave spp* que se cultivan en el estado de Tlaxcala y el efecto del raspado en la variación de su composición. *XXVI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos*. Puerto Vallarta, Jalisco.

Flores, A., Castañeda, E., Sánchez, F., Romero, L. y Ruiz, J. (2009). Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero *Agave salmiana* en el altiplano mexicano. *Agricultura sostenible*, 6.

García, A y Pacheco, E. (2010). Evaluación de una bebida láctea instantánea a base de harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) con la adición de ácido fólico. *Revista Chilena de Nutrición*, 37(4),480-492.

García, M. (2000). Leches fermentadas como vehículos de probióticos. *Archivos de Investigación Pediátrica de México, Suplemento Especial*, 11.

González, D. y Hernández, D. (2016). *Evaluación de la funcionalidad de una bebida biotecnológica a base de aguamiel* (Tesis de pregrado). Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, México.

Gutierrez, V. y Otero, J. (2014). Espectroscopía Raman: Fundamento y aplicaciones. *Researchgate*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Javier\\_Otero3/publication/280720782\\_Espectroscopia\\_Raman\\_Fundamento\\_y\\_aplicaciones/links/55c28a6108aeb975673e460b.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Javier_Otero3/publication/280720782_Espectroscopia_Raman_Fundamento_y_aplicaciones/links/55c28a6108aeb975673e460b.pdf)

Hernández, E. (2005). *Evaluación sensorial*. Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

Hernández, M. (24 de noviembre de 2016). *¿Sabes cómo se prepara el pulque?* El Universal. Recuperado de <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/menu/2016/11/24/sabes-como-se-prepara-el-pulque>

Hernández, S. y Martínez, C. (2012). *Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cascaras de Ananas comosus (piña) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados brix) usando como microorganismo productor Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de pregrado). Universidad de el Salvador, San Salvador, El Salvador.

Ingraham, J. y Ingraham, C. (1998). *Introducción a la microbiología*. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.

Llano, A. (2007). *Escalamiento de proceso de producción de un insecticida biológico a escala piloto para la empresa Productos Naturales de La Sabana S.A., Alquería* (Tesis de pregrado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Mc Murry, J. (2012). *Química Orgánica Octava Edición*. Belmont, Estados Unidos: Cengage Learning.

México, Norma Oficial Mexicana (NOM-181-SCFI-2010). Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

Ciudad de México: Secretaria de Gobernación. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010)

Ministerio de Salud y Protección Social (MinSalud). (2013). *Calidad e inocuidad de alimentos*. Recuperado de <https://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/inocuidad-alimentos.aspx>

Mondinio, M. A. y Ferratto, J. (2006). El análisis sensorial, una herramienta para la evaluación de la calidad desde el consumidor. *Revista agromensajes de la facultad*, (4), 16-23.

Monroy, M., Aztatzi, A. y García R. (2013). *Herramientas de ingeniería industrial aplicadas en la creación de un plan de negocio* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

Muñiz, D., Rodríguez, R., Rodríguez, R., Contreras, J. y Aguilar, C. (2013). Producción Artesanal del Aguamiel: Una Bebida Tradicional Mexicana. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5(10), 12-19.

Narváez, A., Martínez, T. y Jiménez, M. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, (56), 33-44.

Rodríguez, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del genero Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

Roessler, E., Warren, J. & Guymon, J. (1948). Significance in triangular test. *Food Res*, 13,503.

Schiffman, S., Graham, B., Sattely, E. & Peterson, M. (2000). Elevated and sustained desire for sweet taste in african-americans: A potential factor in the development of obesity. *Nutrition* 2000, 16(10), 886-893.

Severiano, P., Gómez, D., Méndez, C., Pedrero, D., Gómez, C., Ríos, S., Escamilla, A. y Utrera, M. (s.f.). *Manual de evaluación sensorial*. Ciudad de México: Universidad Autónoma de México.

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP). (2017). *Laboratorios y/o centros de investigación*. Puebla: Autor. Recuperado de [http://www.upaep.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=1545&Itemid=953](http://www.upaep.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=1545&Itemid=953)

Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP). (2017). *Claustro Académico Dra. Beatriz Pérez Armendáriz*. Recuperado de [http://www.upaep.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13422&Itemid=2588&pin=9013796&pin2=5003000&pin3=52](http://www.upaep.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=13422&Itemid=2588&pin=9013796&pin2=5003000&pin3=52)

Urías, J. (2008). *Efecto prebiótico de los fructanos de Agaves y Dasyilirion y su implicación en el metabolismo de glucosa y lípidos de ratones* (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, México.

Vázquez, H. y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, investigación y tecnología*, 8(4), 251.

## Apéndices

### Apéndice A. Cuestionarios pruebas de análisis sensorial.

Cuestionario Prueba de Análisis Sensorial					
Edad:			Sexo:		
Se le pide de la manera más atenta realizar ésta prueba en silencio y procurar no comunicarse con las personas de su alrededor. Si se presenta alguna duda por favor levante su mano. A continuación, se le presentarán cuatro muestras codificadas en las cuales evaluará olor, apariencia y sabor, evalúelas de izquierda a derecha como se le presentan e indique el nivel de satisfacción marcando con una X el recuadro que usted considere en el siguiente formulario.					
Clave del producto	Me disgusta mucho (1)	Me disgusta (2)	No me gusta ni me disgusta (3)	Me gusta (4)	Me gusta mucho (5)
OLOR					
280					
532					
807					
938					
APARIENCIA					
280					
532					
807					
938					
SABOR					
280					
532					
807					
938					

Cuestionario Prueba de Análisis Sensorial de Preferencia		
Edad:		Sexo:
Se le pide de la manera más atenta realizar ésta prueba en silencio y procurar no comunicarse con las personas de su alrededor. Si se presenta alguna duda por favor levante su mano.		
A continuación, se le presentarán tres muestras codificadas, por favor pruebe cada una de ellas de izquierda a derecha como se le presentan. Indique con un círculo el número de la muestra que prefiere, solo debe seleccionar una.		
Nota: Recuerde tomar agua entre cada muestra y tener en cuenta aspectos como apariencia, olor y sabor en el momento de su elección.		
575	169	407
Gracias por su colaboración.		

**Cuestionario Prueba de Análisis Sensorial Dúo - Tríó**

Edad:

Sexo:

Se le pide de la manera más atenta realizar esta prueba en silencio y procurar no comunicarse con las personas de su alrededor. Si se presenta alguna duda por favor levante su mano.

A continuación, se le presentarán tres muestras codificadas, una de referencia marcada con una R y dos codificadas. Una de las muestras codificadas es igual a R, indique con una X el número de la muestra que considera es igual a la referencia.

Nota: Recuerde tomar agua entre cada muestra y tener en cuenta aspectos como apariencia, olor y sabor en el momento de su elección.

Muestra	Muestra igual a la referencia
422	
894	

Gracias por su colaboración.

**Cuestionario Prueba de Análisis Sensorial de Preferencia**

Edad:

Sexo:

Se le pide de la manera más atenta realizar esta prueba en silencio y procurar no comunicarse con las personas de su alrededor. Si se presenta alguna duda por favor levante su mano.

A continuación, se le presentarán tres muestras codificadas, por favor pruebe cada una de ellas de izquierda a derecha como se le presentan. Indique con un círculo el número de la muestra que prefiere, solo debe seleccionar una.

Nota: Recuerde tomar agua entre cada muestra y tener en cuenta aspectos como apariencia, olor y sabor en el momento de su elección.

575

169

407

Gracias por su colaboración.

## Apéndice B. Resultados análisis estadísticos pruebas ANOVA y Tukey.

## Apariencia

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,52	7	0,50	0,83	0,5672
Brix	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
Bacteria	2,00	1	2,00	3,28	0,0716
Brix*Bacteria	1,28	1	1,28	2,10	0,1488
Esencia	0,02	1	0,02	0,03	0,8564
Brix*Esencia	0,02	1	0,02	0,03	0,8564
Bacteria*Esencia	0,18	1	0,18	0,30	0,5874
Brix*Bacteria*Esencia	0,02	1	0,02	0,03	0,8564
Error	116,96	192	0,61		
Total	120,48	199			

## Olor

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,67	7	1,10	1,35	0,2279
Brix	0,13	1	0,13	0,15	0,6950
Bacteria	5,44	1	5,44	6,72	0,0103
Brix*Bacteria	0,84	1	0,84	1,04	0,3086
Esencia	5,0E-03	1	5,0E-03	0,01	0,9375
Brix*Esencia	0,60	1	0,60	0,75	0,3888
Bacteria*Esencia	0,25	1	0,25	0,30	0,5832
Brix*Bacteria*Esencia	0,41	1	0,41	0,50	0,4806
Error	155,68	192	0,81		
Total	163,36	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24989

Error: 0,8108 gl: 192

Bacteria Medias n E.E.

T 2,97 100 0,09 A

L 3,30 100 0,09 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Sabor

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34,24	7	4,89	3,48	0,0016
Brix	14,58	1	14,58	10,36	0,0015
Bacteria	0,08	1	0,08	0,06	0,8118
Brix*Bacteria	10,58	1	10,58	7,52	0,0067
Esencia	3,38	1	3,38	2,40	0,1228
Brix*Esencia	0,32	1	0,32	0,23	0,6339
Bacteria*Esencia	2,42	1	2,42	1,72	0,1912
Brix*Bacteria*Esencia	2,88	1	2,88	2,05	0,1541
Error	270,08	192	1,41		
Total	304,32	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,32914

Error: 1,4067 gl: 192

Brix	Medias	n	E.E.	
6,00	2,95	100	0,12	A
10,00	3,49	100	0,12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61042

Error: 1,4067 gl: 192

Brix	Bacteria	Medias	n	E.E.	
6,00	L	2,74	50	0,17	A
6,00	T	3,16	50	0,17	A B
10,00	T	3,24	50	0,17	A B
10,00	L	3,74	50	0,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Apariencia por formulación

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,52	7	0,50	0,83	0,5672
Muestra	3,52	7	0,50	0,83	0,5672
Error	116,96	192	0,61		
Total	120,48	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67051

Error: 0,6092 gl: 192

Muestra	Medias	n	E.E.	
938,00	3,04	25	0,16	A
532,00	3,08	25	0,16	A
807,00	3,20	25	0,16	A
280,00	3,24	25	0,16	A
259,00	3,24	25	0,16	A
702,00	3,28	25	0,16	A
428,00	3,36	25	0,16	A
974,00	3,48	25	0,16	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Olor por formulación

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7,68	7	1,10	1,35	0,2279
Muestra	7,67	7	1,10	1,35	0,2279
Error	155,68	192	0,81		
Total	163,36	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,77358

Error: 0,8108 gl: 192

Muestra	Medias	n	E.E.
807,00	2,84	25	0,18 A
280,00	2,92	25	0,18 A
938,00	3,04	25	0,18 A
532,00	3,08	25	0,18 A
428,00	3,12	25	0,18 A
702,00	3,28	25	0,18 A
974,00	3,40	25	0,18 A
259,00	3,40	25	0,18 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Sabor por formulación

## Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	34,24	7	4,89	3,48	0,0016
Muestra	34,24	7	4,89	3,48	0,0016
Error	270,08	192	1,41		
Total	304,32	199			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,01890

Error: 1,4067 gl: 192

Muestra	Medias	n	E.E.
702,00	2,56	25	0,24 A
938,00	2,92	25	0,24 A B
259,00	2,92	25	0,24 A B
807,00	3,00	25	0,24 A B
280,00	3,32	25	0,24 A B
532,00	3,56	25	0,24 A B
428,00	3,60	25	0,24 B
974,00	3,88	25	0,24 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Apéndice C. Resultados análisis bromatológico.



**BIOTECCSA LABORATORIOS**  
BIOTECCSA, S.A. DE C.V.

**CALIDAD, INOCUIDAD  
Y SERVICIO**



Calle 20 de Noviembre No. 923 Pte., Col. Cumuripa. Tel.: (01 644) 414-36-54 Fax: (01 644) 413-05-06 RFC: B10-970908-SF7  
C.P. 85140. Cd. Obregón, Sonora, México laboratorios@bioteccsa.com.mx www.bioteccsa.com.mx

SISTEMA DE CALIDAD BAJO LA NORMA ISO/IEC 17025 NMX-EC-17025-IMNC

### INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS

CD. OBREGÓN SONORA, A 25 DE JULIO DEL 2017

**UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA, A.C.**

21 SUR 1103

SANTIAGO, PUEBLA, PUEBLA, CP. 72410 Tel. (222) 2299400 ext. 7774

At'n: SR JUAN CARLOS FLORES

**No. DE INFORME: 20558-1-1**

No. de Orden: 20558

No. DE LAB: 20558-1

Identificación de la Muestra: BEBIDA PROBIOTICA

Fecha y Hora de Muestreo: 12/07/17 9:00

Fecha y Hora de Recepción: 17/07/17 16:28

Muestreado por: CLIENTE

Cantidad de muestra: 1 L

Descripción visual:

MUESTRA LIQUIDA RECIBIDA EN RECIPIENTE PLASTICO CERRADO

Temperatura de muestreo: 4°C

Temperatura de recepción: 25.0°C

#### DETERMINACIÓN ANALÍTICA

PARÁMETRO	UNIDADES	RESULTADO	MÉTODO ANALÍTICO	ANALIZADO	AA
Fibra cruda	%	0.08	962,09 AOAC 2010	21/07/17	B
Carbohidratos Totales	%	7.71	NOM-051-SCFI/SSA1-2010	24/07/17	N
Contenido Energetico Total (Kilocalorias)	kcal/100g	33.4	NOM-051-SCFI/SSA1-2010	24/07/17	N
Contenido Energetico Total (Kilojoules)	kJ/100g	141.8	NOM-051-SCFI/SSA1-2010	24/07/17	N
Grasa por Hidrolisis Acida	%	0.16	NMX-F-427-NORMEX-2006	21/07/17	N
Proteina cruda en alimentos	%	0.28	NMX-F-608-NORMEX-2011	19/07/17	N
Humedad en alimentos	%	91.72	NMX-F-083-1986	18/07/17	N
Cenizas en alimentos	%	0.05	NMX-F-607-NORMEX-2013	19/07/17	N
Azucares Reductores Totales	%	8.0	NOM-086-SSA1-1994	18/07/17	N



**BIOTECCSA LABORATORIOS**  
BIOTECCSA, S.A. DE C.V.

**CALIDAD, INOCUIDAD  
Y SERVICIO**



Calle 20 de Noviembre No. 923 Pte., Col. Cumuripa. Tel.: (01 644) 414-36-54 Fax: (01 644) 413-05-06 RFC: BIO-970908-SF7  
C.P. 85140. Cd. Obregón, Sonora, México laboratorios@biotecsa.com.mx www.biotecsa.com.mx

SISTEMA DE CALIDAD BAJO LA NORMA ISO/IEC 17025 NMX-EC-17025-IMNC

## INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS

CD. OBREGÓN SONORA, A 25 DE JULIO DEL 2017

**UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA, A.C.**

21 SUR 1103

SANTIAGO, PUEBLA, PUEBLA, CP. 72410 Tel. (222) 2299400 ext. 7774

At'n: SR JUAN CARLOS FLORES

**No. DE INFORME: 20558-2-1**

No. de Orden: 20558

No. DE LAB: 20558-2

Identificación de la Muestra: BEBIDA PROBIOTICA (4L)  
 Fecha y Hora de Muestreo: 12/07/17 9:00  
 Fecha y Hora de Recepción: 17/07/17 16:28  
 Muestreado por: CLIENTE  
 Cantidad de muestra: 1 L  
 Descripción visual: MUESTRA LIQUIDA RECIBIDA EN RECIPIENTE PLASTICO CERRADO  
 Temperatura de muestreo: 4°C  
 Temperatura de recepción: 25.0°C

### DETERMINACIÓN ANALÍTICA

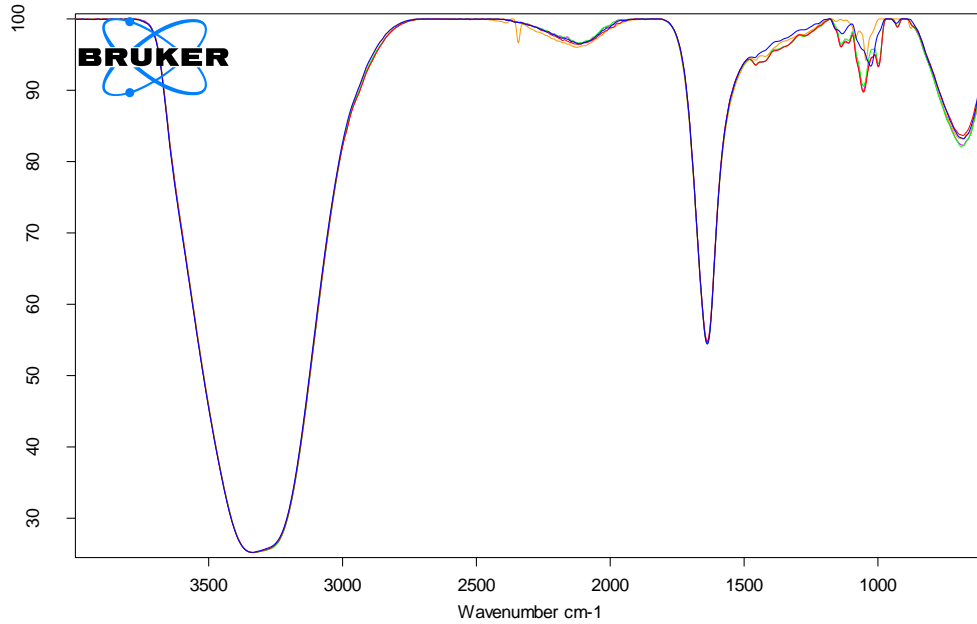
PARÁMETRO	UNIDADES	RESULTADO	MÉTODO ANALÍTICO	ANALIZADO	AA
Fibra cruda	%	0.05	962,09 AOAC 2010	21/07/17	B
Carbohidratos Totales	%	8.86	NOM-051-SCFI/SSA1-2010	24/07/17	N
Contenido Energetico Total (Kilocalorias)	kcal/100g	37.3	NOM-051-SCFI/SSA1-2010	24/07/17	N
Contenido Energetico Total (Kilojoules)	kJ/100g	158.4	NOM-051-SCFI/SSA1-2010	24/07/17	N
Grasa por Hidrolisis Acida	%	0.10	NMX-F-427-NORMEX-2006	21/07/17	N
Proteina cruda en alimentos	%	0.24	NMX-F-608-NORMEX-2011	19/07/17	N
Humedad en alimentos	%	90.69	NMX-F-083-1986	18/07/17	N
Cenizas en alimentos	%	0.06	NMX-F-607-NORMEX-2013	19/07/17	N
Azucars Reductores Totales	%	7.9	NOM-086-SSA1-1994	18/07/17	N

## Apéndice D. Tabla de Roessler para análisis de prueba dúo-trío.

**Tabla 1** Tabla de interpretación estadística de las pruebas por pares para niveles de significancia del 5%, 1% y 0,1% (Roessler y otros 1948).

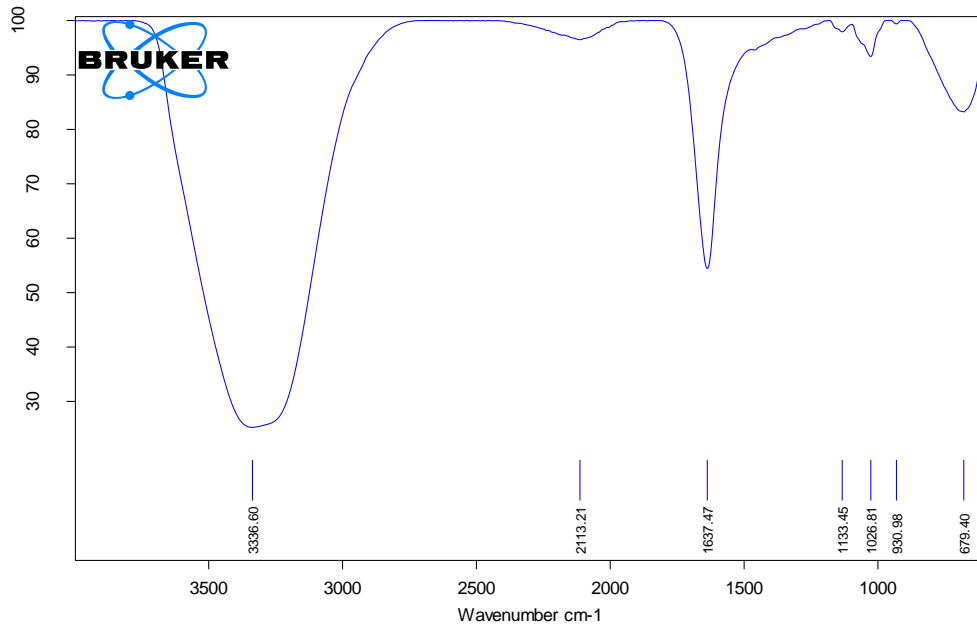
Cantidad de jueces	Cantidad de respuestas correctas necesarias para determinar si hay diferencias significativas		
	5%	1%	0,1%
7	7	7	-
8	7	8	-
9	8	9	
10	9	10	10
11	9	10	11
12	10	11	12
13	10	12	13
14	11	12	13
15	12	13	14
16	12	14	15
17	13	14	16
18	13	15	16
19	14	15	17
20	15	16	18
21	16	17	19
22	16	17	19
23	16	18	20
24	17	19	20
25	18	19	21
26	18	20	22

Apéndice E. Resultados espectroscopía infrarroja.



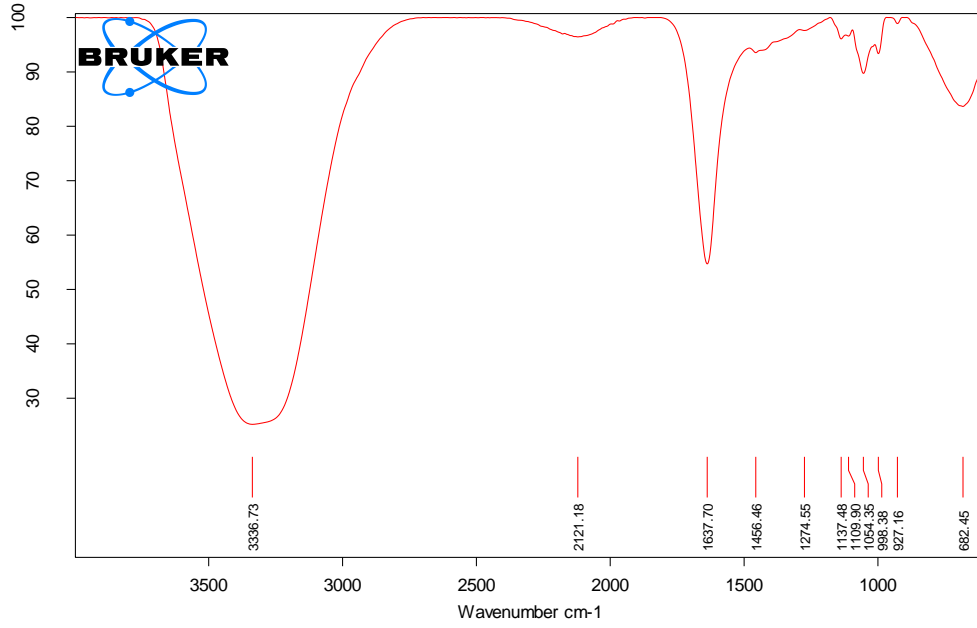
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-067 Inulina en solución.0	QF17-067 Inulina en solución.0	13/07/2017
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-068 Solución normal 1L.0	QF17-068 Solución normal 1L.0	13/07/2017
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-069 Solución escalada 4L.0	QF17-069 Solución escalada 4L.0	13/07/2017
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-070 Aquamiel.0	QF17-070 Aquamiel.0	lectura directa 13/07/2017
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-071 Aquamiel pasteurizado.0	QF17-071 Aquamiel pasteurizado.0	13/07/2017

Page 1/1

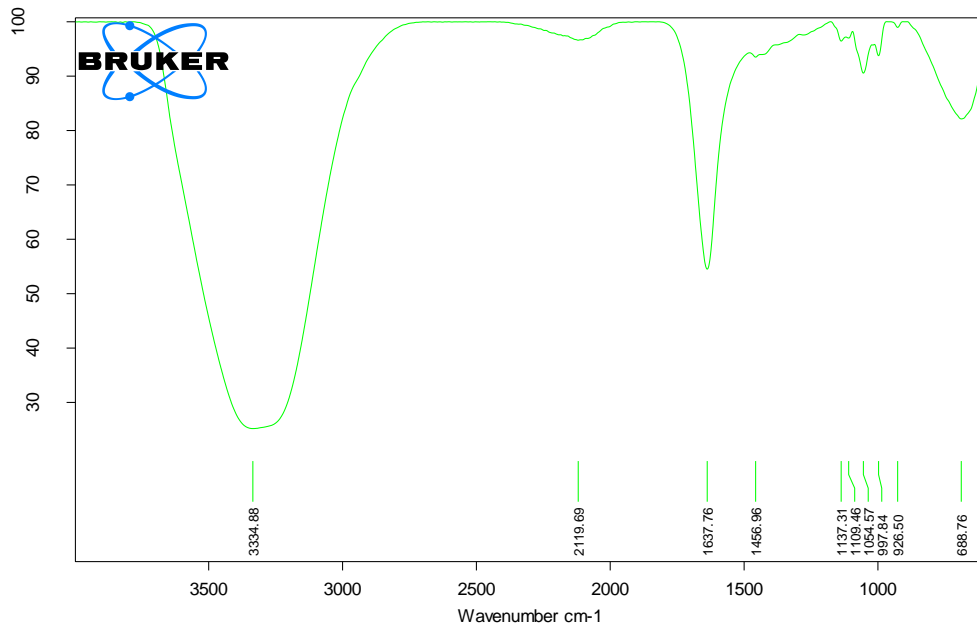


C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-067 Inulina en solución.0	QF17-067 Inulina en solución.0	13/07/2017
---	--------------------------------	------------

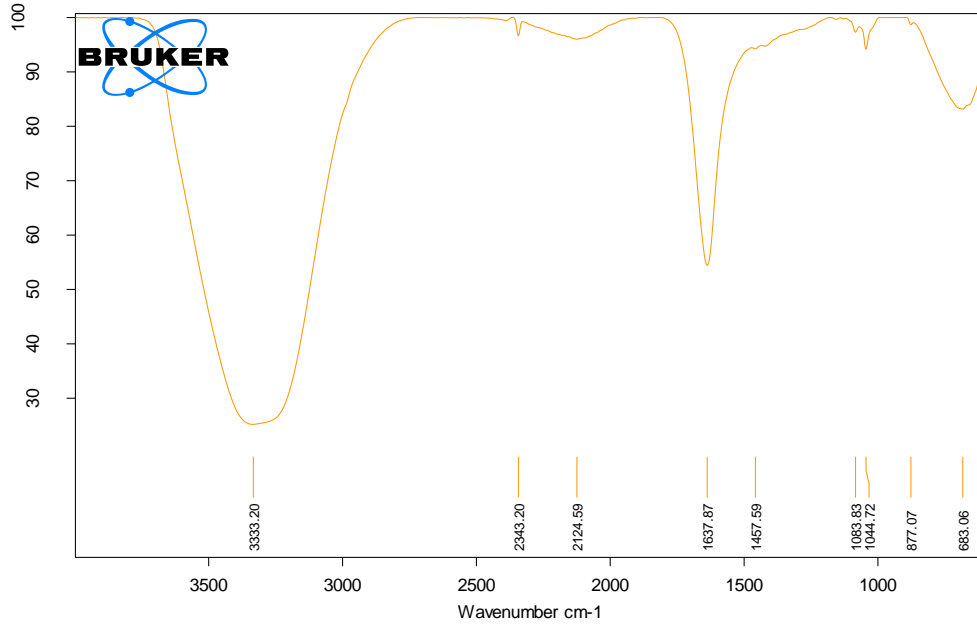
Page 1/1



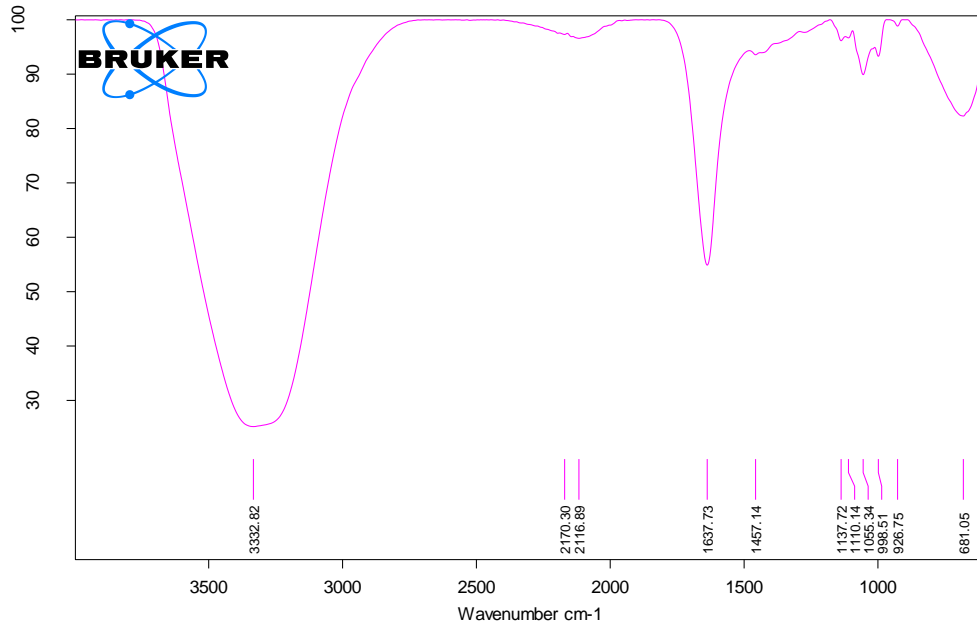
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-068 Solución normal 1L.0 QF17-068 Solución normal 13/07/2017



C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2017\QF17-069 Solución escalada 4L.0 QF17-069 Solución escalada 13/07/2017



C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\spectros modificados\2017\QF17-070 Aguamiel.0 QF17-070 Aguamiel lectura dir 13/07/2017



C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\spectros modificados\2017\QF17-071 Aguamiel pasteurizado.0 QF17-071 Aguamiel pas 13/07/2017