



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

ELABORACIÓN DE BEBIDAS NO CONVENCIONALES

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTAN:

**GARCÍA CRUZ HELENA
RETANA TOBÍAS GABRIELA ILIANA**

DIRECTOR: M EN C. HERMILO SÁNCHEZ PINEDA

México, D.F. abril 2007



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México D. F. a 29 de Noviembre del 2006
Of. No. SA-UPIBI-1709-2006

GARCÍA CRUZ HELENA
ALUMNA DEL 7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con fecha 3 de mayo del 2006, queda registrado su Proyecto Terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" denominado " **DESARROLLO DE BEBIDAS NO CONVENCIONALES** ". bajo la dirección interna del M. en C. Hermilo Sánchez Pineda.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar, en el mismo, el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el mencionado Comité.

CONDICIONES

- 1.-Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
- 2.-Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
- 3.-Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas
- 4.-Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envía cordial saludo.

ATENTAMENTE
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PAZ"



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA
DIRECCIÓN ACADÉMICA

DR. GUSTAVO VALENCIA DEL ROSARIO
SUBDIRECTOR ACADÉMICO

ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo

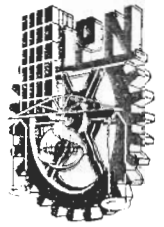
GVDI ARJR



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México D. F. a 29 de Noviembre del 2006
Of. No. SA-UPIBI-1722-2006

RETANA TOBIAS GABRIELA ILIANA
ALUMNA DEL 7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Presente

Comunico a Usted que, como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con fecha 3 de mayo del 2006, queda registrado su Proyecto Terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACIÓN" denominado " **DESARROLLO DE BEBIDAS NO CONVENCIONALES** ", bajo la dirección interna del M. en C. Hermilo Sánchez Pineda..

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la Opción Curricular de Titulación. Así mismo, me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar, en el mismo, el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el mencionado Comité.

CONDICIONES

- 1.- Permanecer en la misma modalidad en el Proyecto Terminal I, II y III
- 2.- Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto terminal II y en Proyecto Terminal III
- 3.- Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas
- 4.-Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura

Sin otro particular por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PAZ



INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ccp Expediente de Proyecto Terminal
Archivo

GVDI ARIR

ÍNDICE GENERAL

| | PAG |
|--|------------|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. MARCO TEÓRICO..... | 2 |
| 1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES..... | 2 |
| 1.1.1. Definición. | 3 |
| 1.1.2. Beneficios. | 5 |
| 1.2. BEBIDAS FUNCIONALES..... | 5 |
| 1.2.1. Innovación científica de las bebidas funcionales. | 6 |
| 1.2.2. Panorama actual de las bebidas funcionales. | 6 |
| 1.3. INGREDIENTES DE LAS BEBIDAS SABORIZADAS COMERCIALES..... | 7 |
| 1.3.1. Colorantes | 7 |
| 1.3.2. Conservadores | 7 |
| 1.3.3. Acidulantes | 8 |
| 1.3.4. Antioxidantes | 8 |
| 1.3.5. Edulcorantes | 8 |
| 1.3.6. Agentes de balance de peso y turbidez | 9 |
| 1.3.7. Hidrocoloides | 9 |
| 1.3.8. Saborizantes | 9 |
| 1.4. CARACTERÍSTICAS DE UNA BEBIDA SABORIZADA COMERCIAL..... | 9 |
| 1.4.1. Actividad del agua | 9 |
| 1.4.2. Tratamiento térmico | 10 |
| 1.4.3. Envasado | 10 |
| 1.5. FIBRA DIETÉTICA..... | 10 |
| 1.5.1. Definición y clasificación. | 10 |
| 1.5.2. Mecanismo de acción de la fibra dietética. | 11 |
| 1.5.3. Beneficios de consumo de la fibra dietética. | 12 |
| 1.5.4. Adición de Fibra en bebidas. | 12 |
| 1.6. PREBIÓTICOS..... | 13 |
| 1.6.1. Definición. | 13 |
| 1.6.2. Mecanismo de acción de los prebióticos en el organismo. | 13 |
| 1.6.3. Efectos producidos por los prebióticos. | 14 |
| 1.6.4. Relación prebiótico – prebiótico. | 14 |

| | PAG |
|--|------------|
| 1.7. PREBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS Y BEBIDAS FUNCIONALES..... | 15 |
| 1.7.1. INULINA. | 15 |
| 1.7.1.1. Definición y estructura química. | 15 |
| 1.7.1.2. Fuentes de inulina | 16 |
| 1.7.1.3 Propiedades | 16 |
| 1.7.1.4. Principales especificaciones de la inulina como producto comercial. | 17 |
| 1.7.1.5. Consumo | 18 |
| 1.7.2. ISOMALTOOLIGOSACÁRIDOS | 18 |
| 1.7.2.1. Definición y estructura química | 18 |
| 1.7.2.2. Fuentes | 18 |
| 1.7.2.3. Beneficios | 19 |
| 1.7.2.4. Principales especificaciones de los isomaltooligosacaridos como producto comercial. | 19 |
| 1.7.2.5. Consumo. | 20 |
| 1.7.3 FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE CADENA CORTA (BENEO-RAFTILOSE, NUTRAFLORA). | 21 |
| 1.7.3.1. Definición y estructura química. | 21 |
| 1.7.3.2. Fuentes de obtención | 21 |
| 1.7.3.3 Propiedades | 22 |
| 1.7.3.4. Especificaciones de los fructooligosacaridos como producto comercial | 23 |
| 1.7.3.5. Consumo | 24 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 25 |
| 3. OBJETIVOS..... | 25 |
| 4. MATERIALES, EQUIPO Y REACTIVOS | 26 |
| 5. METODOLOGÍA..... | 27 |
| 5.1. EFECTO PREBIÓTICO EN <i>Lactobacillus</i> | 28 |
| 5.1.1. Activación del microorganismo (<i>Lactobacillus delbruekii</i>) | 28 |
| 5.1.2. Elaboración del cultivo madre | 28 |
| 5.1.3. Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en presencia de prebióticos | 28 |
| 5.1.4. Viabilidad del microorganismo en almacenamiento (influencia del prebiótico) | 29 |

| | PAG |
|--|------------|
| 5.2. CARACTERIZACIÓN DE UNA BEBIDA PREBIÓTICA | 29 |
| 5.2.1. Formulación de la bebida-Método de Pearson. | 29 |
| 5.2.2. Descripción del proceso de elaboración | 30 |
| 5.2.3. Análisis sensorial | 31 |
| 5.3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS..... | 31 |
| 5.3.1. Sólidos totales | 31 |
| 5.3.2. Humedad | 32 |
| 5.3.3. Sólidos solubles (°Brix) | 32 |
| 5.3.4. Ph | 32 |
| 5.3.5 Acidez titulable | 33 |
| 5.3.6. Análisis de cenizas | 33 |
| 5.3.7. Determinación de fibra dietética | 34 |
| 5.4. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS..... | 34 |
| 5.4.1. Preparación de muestras | 34 |
| 5.4.2. Determinación de Organismos Mesofílicos Aerobios (OMA's) | 35 |
| 5.4.3. Determinación de microorganismos Coliformes totales | 35 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 36 |
| 6.1. EFECTO PREBIÓTICO EN LACTOBACILOS | 36 |
| 6.2. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA SABORIZADA | 40 |
| 6.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LA BEBIDA | 40 |
| 6.4. CALIDAD SANITARIA | 44 |
| 6.5. ANÁLISIS SENSORIAL DE LA BEBIDA SABORIZADA DURANTE EL PERIODO DE ALMACENAMIENTO. | 45 |
| 7. CONCLUSIONES..... | 46 |
| 8. RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO FUTURO..... | 46 |
| 9. BIBLIOGRAFIA..... | 47 |
| 10. ANEXOS..... | 48 |
| Anexo 1. Diagrama del proceso de elaboración de las bebidas. | |
| Anexo 2. Hoja de evaluación sensorial | |
| Anexo 3. Resultados de la evaluación sensorial | |
| Anexo 4. Procedimiento y reactivos de los métodos de investigación | |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | PAG |
|---|------------|
| Figura 1. Estructura química de la inulina..... | 15 |
| Figura 2. Estructura química de una isomaltosa..... | 18 |
| Figura 3. Estructura química de los fructooligosacáridos | 22 |
| Figura 4. Diagrama de la metodología empleada | 27 |
| Figura 5. Elaboración de la bebida prebiótica | 30 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | PAG |
|--|------------|
| Cuadro 1. Tipos de alimentos funcionales y efectos sobre el organismo..... | 4 |
| Cuadro 2. Efectos de la fibra en el organismo, conforme el paso en el aparato digestivo..... | 11 |
| Cuadro 3. Principales especificaciones de la inulina como producto comercial. | 17 |
| Cuadro 4. Diferencias de los principales atributos entre las dos presentaciones de IMO (Isomaltooligosacáridos) según su presentación..... | 20 |
| Cuadro 5. Pruebas de determinación de las propiedades de los FOS, según la confirmación de estudios..... | 22 |
| Cuadro 6. Principales propiedades de un producto comercial de fructooligosacáridos (BENEO-RAFTILOS)..... | 24 |
| Cuadro 7. Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la bacteria probiótica..... | 39 |
| Cuadro 8.- Principales características sensoriales de la bebida..... | 40 |
| Cuadro 9.- Caracterización física de la bebida..... | 44 |
| Cuadro 10. Resultados de la evaluación de la calidad sanitaria de la bebida en almacenamiento..... | 45 |

RESUMEN

Un alimento puede ser considerado "funcional", si está satisfactoriamente demostrado que influye en forma beneficiosa sobre una o más funciones del organismo, más allá de adecuados efectos nutricionales. Los prebióticos se ajustan perfectamente a la anterior definición, por lo cual, tienen la capacidad de ser incluidos en las formulaciones para generar alimentos y bebidas con dicha funcionalidad; Estas últimas se han establecido en la preferencia de los consumidores, ya que además contribuir a la hidratación, le proporcionan una mejor digestión, debido al porcentaje de fibra que proporciona el prebiótico. Por lo cual el objetivo de este trabajo fue incorporar este ingrediente funcional a una bebida base agua sabor naranja. Para la elaboración de esta bebida se realizó una cinética de crecimiento utilizando *Lactobacillus delbrueckii* como bacteria prebiótica, para observar el comportamiento con cada uno de los prebióticos utilizados (Isomaltooligosacáridos, inulina y fructooligosacáridos), manteniendo un blanco de control; Esto con el fin de conocer que prebiótico mantenía un crecimiento más estable y rápido tiempo de duplicación, y de esta manera establecer el principal criterio de elección para la realización de la bebida saborizada, no obstante, siempre teniendo en cuenta, que este prebiótico fuera capaz de resistir un p.H bajo. Una vez cumplido los anteriores criterios, se realizaron dos formulaciones, haciendo la diferencia entre dichas, un solo atributo, el "dulzor" (°Bx), este atributo se fue sometido a una evaluación sensorial, para obtener el grado de preferencia e inclinarnos a esta formulación, la cual se le aplicaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos correspondientes. El presente trabajo muestra los resultados obtenidos en la caracterización de una bebida funcional, y sus conclusiones obtenidas al respecto.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

El término alimento funcional surge por primera vez hace 14 años en Japón, donde actualmente gozan de una gran aceptación y demanda. Este país fue pionero en establecer un sistema de aprobación para los alimentos funcionales, basado en resultados de investigaciones sobre los beneficios para la salud de productos concretos o de sus componentes. De este modo, en la década de los 80's se publicó la reglamentación para los "Alimentos para uso específico de salud" ("Foods for specified health use" o FOSHU), referidos a aquellos alimentos que contienen componentes que desempeñan una función favorable y específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, que van más allá de su contenido nutricional.

En abril de 1996 se celebró en Francia la primera reunión plenaria en la que se discutió el estado actual de la ciencia de los alimentos funcionales. De acuerdo a los resultados obtenidos, se establecieron diferentes áreas de aplicación de los alimentos funcionales: crecimiento y desarrollo, metabolismo y utilización de sustancias, defensa antioxidante, prevención y tratamiento de enfermedades o factores de riesgo cardiovascular, fisiología o función del tracto gastrointestinal, comportamiento y funciones psicológicas (Arai, 1996).

Actualmente existen muchos alimentos funcionales en el mundo. Estados Unidos es uno de los países que tiene claro el objetivo de los alimentos funcionales para llegar a prevenir enfermedades en la población. Resulta fácil encontrar barras de cereales especiales para mujeres de mediana edad, suplementadas con calcio para prevenir la osteoporosis, o con proteína de soja para reducir el riesgo de cáncer de mama, con ácido fólico, para un corazón más sano, panecillos energizantes y galletas adicionadas con proteínas, zinc y antioxidantes.

En Alemania se comercializan golosinas con vitamina Q₁₀ y vitamina E. En Italia las góndolas de los supermercados ofrecen yogures con omega 3 y vitaminas y Francia ofrece azúcar con fructooligosacáridos añadidos para favorecer el desarrollo de la flora intestinal.

En los supermercados españoles ya se ofrecen unos 200 tipos de alimentos funcionales. La mayoría de ellos pertenecen al grupo de los lácteos, aunque también existen zumos con aportes extras de vitaminas, minerales, fibra o cereales con fibra (Arai, 1996).

1.1.1 Definición

Cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona.

El calificativo de funcional se relaciona con el concepto bromatológico de "propiedad funcional", o sea la característica de un alimento, en virtud de sus componentes químicos y de los sistemas fisicoquímicos de su entorno, sin referencia a su valor nutritivo.

En Europa se define alimento funcional a "aquel que satisfactoriamente ha demostrado afectar benéficamente una o mas funciones específicas en el cuerpo, mas allá de los efectos nutricionales adecuados en una forma que resulta relevante para el estado de bienestar y salud o la reducción de riesgo de una enfermedad" (Roberfroid, 2000).

Aunque el término alimentos funcionales no es una categoría de alimento legalmente reconocida por la Administración de alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos, recientemente sucedieron algunos cambios legislativos acerca de la información que deben contener las etiquetas de los productos relacionados con beneficios funcionales de los alimentos. Las regulaciones en la NLEA (Ley de Etiquetado y Regulación Nutricional) y de la DSHEA (Ley de Suplementos Dietéticos Salud y Educación) se encaminan a preparar el camino legal en que se debe fundamentar el uso de estos productos. La posición oficial de la U.S. Food & Drugs Administration (FDA) es: "Las sustancias específicas de los alimentos pueden favorecer la salud como parte de una dieta variada"

Los alimentos funcionales como tal, deben tener unas características determinadas como son:

- Ser alimentos que se manipulen para conseguir algún beneficio extra, por eliminación, reducción o adición de algún componente.
- Los alimentos funcionales son básicamente alimentos "clásicos" pero llevan incorporado nuevos componentes alimentarios o no alimentarios, siempre que tengan un claro efecto beneficioso.
- La base de la alimentación, es una alimentación completa y variada.
- Los alimentos funcionales, complementan la función nutritiva y la prevención de ciertas enfermedades. Hay que tener en cuenta que las cantidades deben ser las normalmente consumidas en la dieta. (Alvidrez, 2002).

La presentación de un alimento funcional, tiene que ser como la de un alimento, sin modificar sus características. Entre la gran variedad de alimentos funcionales que existen, destacan los enriquecidos con vitaminas, minerales, fibra alimentaria o ácidos grasos. Además, hay alimentos a los que se les ha añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que contienen cultivos vivos de microorganismos benéficos (Mazza, 2000). En el cuadro 1 se muestran algunos alimentos funcionales y que efectos presentan estos sobre el organismo.

Cuadro 1. Tipos de alimentos funcionales y efectos sobre el organismo.

| Ingredientes Funcionales | Efectos | Ejemplos |
|--|---|---|
| Probióticos | Mejoran la función intestinal | Lactobacilos y bifidobacterias |
| Prebióticos | Favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales beneficiosas | Fructooligosacáridos (Cereales integrales) |
| Vitaminas | Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y osteoporosis | Vitamina B6, Vitamina B12, ácido fólico, vitamina D y vitamina K. |
| Minerales | Reducen el riesgo de osteoporosis y fortalecen el sistema inmune. | Calcio, magnesio y zinc. (Productos lácteos) |
| Antioxidantes | Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores | Vitamina C y E, carotenos, flavonoides y polifenoles (zumos) |
| Ácidos grasos | Reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de tumores. Reducen los síntomas de la menopausia. | Ácidos grasos Omega 3. (Lácteos, huevos) Ácido Linoleico Conjugado (CLA) (Lácteos) |
| Fitoquímicos | Reducen los niveles de colesterol y los síntomas de la menopausia. | Fitoesteroles, isoflavonas y lignina. (Margarinas y lácteos) |
| Fuente: Mazza G; 2000; Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado. Acibia; Zaragoza, España. | | |

1.1.2. Beneficios

Los alimentos funcionales tienen como objetivo modificar o potenciar las “propiedades saludables” de alguno de sus componentes.

Según el concepto tradicional de nutrición, la principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para el buen funcionamiento del organismo. Este concepto de “*nutrición adecuada*” se está sustituyendo por el concepto de “*nutrición óptima*”, que se trata de aquella que además, contempla la posibilidad de que algunos alimentos mejoren nuestra salud y contribuyan a prevenir determinadas enfermedades.

Precisamente por este planteamiento aparecen los alimentos funcionales, cuyo desarrollo se basa en la relación entre dieta y salud. Se conocen muchas enfermedades crónicas que están relacionadas directamente con la nutrición y muchas de ellas podrían prevenirse con una dieta adecuada; un ejemplo de esta relación dieta-salud son las enfermedades cardiovasculares, ya que más del 30% de los casos se atribuyen a hábitos de alimentación inadecuados.

Se ha demostrado que existe una gran variedad de micro-componentes de la dieta que puede influir en la capacidad de un individuo para alcanzar todo su potencial genético y minimizar el riesgo de enfermar. La respuesta del organismo ante el consumo de un alimento funcional depende de diversos factores incluyendo los genéticos, el estado fisiológico y la composición de la dieta completa.

1.2. BEBIDAS FUNCIONALES

A pesar del creciente interés en las bebidas funcionales no existe una definición establecida a nivel universal, sin embargo, los expertos tienden a coincidir en que éstas son un alimento integral que pueden beneficiar a la salud más allá de la nutrición básica. Todas las bebidas contribuyen a la hidratación, pero algunas también proporcionan nutrientes importantes ingredientes funcionales que favorecen la salud o, en algunos casos, si se los incorpora como parte de una dieta saludable, reducen el riesgo de padecer determinadas enfermedades.

1.2.1. Innovación científica de las bebidas funcionales

La ciencia de las bebidas y de la innovación se ocupan de:

- Encontrar nuevos modos de contribuir a que las personas se sientan mejor, tengan un mejor desempeño y lleven vidas más sanas.
- Mantenerse a la vanguardia de las tendencias que emergen en temas de salud y ciencia de la nutrición, y comprender cómo éstas se relacionan con la salud y las necesidades de bienestar de las personas.
- Utilizar los conocimientos en nutrición, los recursos científicos y las percepciones del consumidor para brindar los beneficios nutritivos que los consumidores desean encontrar en bebidas deliciosas, prácticas y con un precio razonable.

Las necesidades y preferencias de los consumidores están en el centro de todo lo que hacemos para innovar nuestras bebidas. Al escuchar a los consumidores y aplicar nuestros conocimientos acerca de investigaciones sobre nutrición, formulación de bebidas y estilos de vida del consumidor, nos esforzamos en crear "soluciones en bebidas" que resuelvan los desafíos de la nutrición que se les plantean a las personas (www.beverageinstitute.org).

1.2.2. Panorama actual de las bebidas funcionales

A pesar de que los refrescos acaparan el mayor mercado con un 40% del volumen total, los consumidores adquieren cada vez más bebidas saludables, especialmente en los países desarrollados, ya que las principales razones como la obesidad, con debates sobre las restricciones publicitarias y de venta, están empujando al consumidor a replantearse las opciones.

El segmento de las bebidas funcionales es el que está creciendo con mayor rapidez, aunque desde una base escasa, debido a que en el año del 2003, estas ocupaban el último lugar dentro de toda la diversificación de bebidas. Las bebidas deportivas estuvieron en segundo lugar con un 13% seguida por las bebidas energéticas con un 8% y finalmente las bebidas funcionales con un 3%.

Entre los factores que apuntan hacia la creciente importancia de la funcionalidad en bebidas, se encuentran:

-
- Los principales fabricantes de refrescos recurren con una frecuencia cada vez mayor a la “funcionalidad añadida” como medio para avivar los productos dominantes.
 - Algunos fabricantes más pequeños han recurrido a la funcionalidad para diferenciar su oferta de productos.
 - La salud y el bienestar se han convertido en temas críticos de política pública, mientras el mundo afronta una epidemia de obesidad y los problemas de salud que conlleva.
 - Dado que la presión de los precios disminuye los márgenes, y en consecuencia los programas de inversión de los comerciantes de refrescos, la funcionalidad proporciona un rumbo hacia la futura rentabilidad.

Sigue habiendo muchos retos, como la comunicación efectiva de marketing, la necesidad de una educación del consumidor y la competición intensa para obtener distribución. Pero la importancia fundamental de la salud y el bienestar deberían allanar el camino para un crecimiento continuo de los productos funcionales (Roethenbaugh, 2005).

1.3. INGREDIENTES DE LAS BEBIDAS SABORIZADAS COMERCIALES

Para poder desarrollar productos novedosos, atractivos, económicos y sobre todo saludables es necesario conocer los principales ingredientes utilizados en la industria de bebidas para combinarlos adecuadamente y crear alternativas específicamente dirigidas para ciertos segmentos de la población. Los ingredientes principales utilizados en la industria de elaboración de bebidas saborizadas son los siguientes:

1.3.1. Colorantes

Los colorantes son sustancias químicas naturales o sintéticas que confieren color. Estos se clasifican en:

- Colorantes Naturales.- Entre ellos destacan: carotenoides, clorofilas, antocianinas, flavonoides, etc.
- Colorantes Sintéticos.- Es aquel que posee una pureza de grado alimentario, es soluble y está certificado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA).

1.3.2. Conservadores

Previenen el crecimiento microbiano de hongos, levaduras y bacterias. La efectividad de estos aditivos depende de varios factores como:

-
- Especificidad.- Algunos tienen un amplio espectro de acción, mientras que otros son específicos para un determinado grupo de microorganismos
 - El nivel inicial de contaminación.- Los productos altamente contaminados no pueden reducir su carga microbiana por adición de conservadores, ya que es un método preventivo y no correctivo.

El benzoato de sodio y el sorbato de potasio son los conservadores más utilizados, estos se utilizan en una concentración de 0.05 — 0.10% con respecto a la bebida final.

1.3.3. Acidulantes

Los ácidos desempeñan un papel fundamental en la determinación de la calidad sensorial de las bebidas, ya que ayudan a desarrollar el perfil de sabor deseado. Esto debe considerarse para obtener formulaciones que presenten un correcto balance azúcar-ácido.

1.3.4. Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos que retardan o reducen las reacciones de oxidación de las grasas y aceites. Existen dos categorías fundamentales de compuestos que se utilizan para evitar el deterioro oxidativo de los lípidos los donadores de protones. Los antioxidantes más utilizados para prevenir la oxidación de los aceites esenciales, son los donadores de protones: Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT), Terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y Galato de propilo, estos se utilizan en una concentración de 200 ppm (0.02%) con respecto a la cantidad de grasa o aceite presente en la fórmula.

1.3.5. Edulcorantes

Son compuestos que producen una percepción sensorial dulce. En términos genéricos se pueden dividir en naturales y sintéticos. Estos se clasifican en:

Edulcorantes Naturales: mono y oligosacáridos (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, etc.), glucósidos (filodulcina, esteviósido, osladina, glicirricina, etc.), alcoholes polihídricos (sorbitol, xilitol, etc.), proteínas (miralina, monelina y taumatina).

Edulcorantes Sintéticos: acesulfame K, aspartame, ciclamatos, dulcina, alitame.

1.3.6. Agentes de balance de peso y turbidez

Son compuestos que se utilizan para compensar la baja densidad de los aceites esenciales utilizados en la elaboración de concentrados emulsionados para bebidas. Entre los principales, destacan: resina esterificada, aceite vegetal bromado (BVO), acetato Isobutirato de sacarosa (SAIB), etc.

1.3.7. Hidrocoloides

Las gomas son polisacáridos de alto peso molecular que poseen propiedades coloidales. Son sustancias que son dispersables en agua fría o caliente para producir soluciones o mezclas con alta viscosidad. Debido a su naturaleza coloidal, también reciben el nombre de hidrocoloides. Se utilizan como espesantes, agentes gelificantes, estabilizantes, etc. Su función es proporcionar cuerpo y palatabilidad a las bebidas saborizadas, pueden ser utilizados como agentes de suspensión de sólidos en néctares y jugos con pulpa, mejorando su estabilidad y alargando su vida de anaquel. Entre ellos, se encuentran: goma arábiga, carboximetilcelulosa de sódica (CMC), goma de Xanthano, goma Guar, etc.

1.3.8. Saborizantes

Sustancia o mezcla de sustancias de origen natural, idénticas al natural y sintéticas artificiales, con o sin diluyentes inocuos, agregados o no, de otros aditivos que se utilizan para proporcionar o intensificar el sabor de los alimentos o bebidas. En la industria de bebidas se utilizan: aceites esenciales, esencias naturales, concentrado de frutas, esencias artificiales, concentrados artificiales, extractos destilados aromáticos (Rodríguez, 2006).

1.4. CARACTERÍSTICAS DE UNA BEBIDA SABORIZADA COMERCIAL

1.4.1. Actividad del agua

El agua no aporta nada de valor nutritivo de las bebidas, pero es muy necesaria para describir la composición de las mismas y para poder estimar su valor nutritivo, ya que los valores energéticos varían inversamente al contenido del agua. La cantidad de agua en dilución influye en el contenido de proteínas, grasas y carbohidratos que contribuyen al valor energético (Desrosier, 1983).

1.4.2. Tratamiento térmico

La pasteurización tiene como objetivo primordial la destrucción de células vegetativas, esporas de hongos y levaduras a temperaturas relativamente bajas (<100°C). A los alimentos los cuales se les aplica este tratamiento, presentan un menor deterioro térmico que los conservados por esterilización. Una desventaja de este método, es que las temperaturas tan bajas no eliminan la actividad enzimática residual, lo que puede llevar a un deterioro en el producto durante su almacenamiento. Un proceso de pasteurización debe asegurar:

- Un control microbiológico correcto.
- Destrucción de enzimas no deseadas.
- Baja presión de oxígeno en el alimento (Brennan *et al*; 1980).

1.4.3. Envasado

Es realizado calentado el producto y enfriándolo ligeramente, y se envasa a una temperatura mayor a 70°C. La ventaja que posee este tipo de envasado, es que los contaminantes que se encuentren en el interior del empaque y el cierre son destruidos por el líquido caliente, ello garantizar la esterilidad necesaria, que el producto esté libre de microorganismos (Ranken, 1993). El envasado de los productos alimenticios viene a darse como el resultado de una necesidad del productor de aumentar la vida útil para dar al consumidor productos de primera calidad y libre de patógenos que puedan dañar la salud humana (Potter, 1978).

1.5. FIBRA DIETÉTICA

1.5.1. Definición y clasificación

Es la materia vegetal resistente a la acción de las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal humano (polisacáridos no digeribles). Se clasifica en:

- Fibra soluble (en agua): pectinas, gomas y mucílagos. Las fuentes de fibra soluble son frutas, legumbres y vegetales. Su consumo en cantidades elevadas ha demostrado en estudios epidemiológicos una reducción del riesgo de enfermedad coronaria en hombres y mujeres.

- Fibra insoluble: celulosa, hemicelulosa, lignina y celulosa modificada. Las fuentes de fibra insoluble son cereales, granos, legumbres y vegetales. Su consumo parece hacer disminuir los niveles séricos de colesterol. (Ashwell, 2002).

1.5.2. Mecanismo de acción de la fibra dietética

En cuanto al mecanismo de acción de la fibra se ha comprobado que aumenta la velocidad del tránsito intestinal y el tamaño del bolo fecal, favoreciendo la expulsión al exterior de los carcinógenos ingeridos o endógenos.

Por todo esto, se puede concluir que las dietas con alto contenido en vegetales intactos y en fibra tienen un efecto protector frente al cáncer de colon y otras patologías. Contrariamente a lo que ocurre con el resto de los componentes de los alimentos, la fibra no es atacada por los enzimas del estómago y del intestino delgado, por lo que llega al colon sin degradar. (Cherbut y col., 1995; Lajolo y col., 2001).

La fibra insoluble es escasamente fermentada y tiene un marcado efecto laxante y regulador intestinal, mientras que la fibra soluble es fermentada en alta proporción y sus principales propiedades se relacionan con disminución de colesterol y glucosa en sangre y desarrollo de la flora intestinal (Kritchevsky; Bonafield; 1995).

El paso de la fibra a lo largo del aparato digestivo puede tener diversos efectos, que se resumen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Efectos de la fibra en el organismo, conforme el paso en el aparato digestivo.

| | |
|---|--|
| Sensación de saciedad | Menor ingesta de alimentos |
| Disminución del tiempo de tránsito intestinal de los alimentos | Regulación intestinal |
| Aumento de excreción | Control de estreñimiento |
| Mayor excreción de grasa y proteína | Menor contenido calórico de la dieta |
| Retraso de la absorción de glucosa | Menor índice glicémico |
| Mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana intestinal | Factor preventivo de cáncer intestinal |
| FUENTE: Calixto S; Cambrodon G;.2002. Fibra dietética en la cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional. | |

No obstante, hemos de tener en cuenta que una fibra concreta no tiene todos estos efectos, sino que solamente en alguno de ellos puede mostrar una acción significativa, por lo que es necesario para una ingesta cualitativamente óptima, utilizar diversos tipos de fibra y especialmente alimentos con alta proporción de fibra soluble. Los cereales tienen mayoritariamente fibra insoluble (con efecto en regulación intestinal), mientras que en las frutas y leguminosas la proporción de fibra soluble es alta, con mayores efectos sistémicos y metabólicos preventivos de enfermedades. Por ejemplo, el efecto hipocolesterolémico de la fibra solamente se ha evidenciado con el consumo prolongado de alguna fibra soluble (Calixto S Y Cambrodon G;.2002).

1.5.3. Beneficios de consumo de la fibra dietética

Los beneficios brindados a la salud por la ingesta de fibra son los siguientes:

- El primer efecto de la fibra, es la relación directa entre su ingesta y un correcto funcionamiento gastrointestinal. Ello fundamenta su uso como agente terapéutico en el tratamiento del estreñimiento.
- La diverticulosis también se ha asociado con dietas bajas en fibra y con alta presión intracolónica. La fibra aumenta la excreción y disminuye la presión colónica, por lo que tiene una acción terapéutica sobre esta dolencia.
- En tratamientos de obesidad se han evidenciado los efectos beneficiosos de la ingesta de alimentos ricos en fibra. Los mecanismos de acción de la fibra para producir pérdida de peso son múltiples (sensación de saciedad, aumento de excreción de grasa y proteína, menor índice glicémico, disminución del contenido calórico de la dieta).
- El posible papel de la fibra en la prevención del cáncer de colon procede de estudios realizados en poblaciones africanas, porque son poblaciones donde se consumen elevadas cantidades de alimentos vegetales intactos y presentan una baja incidencia de dicho cáncer. (Gibson y Roberfroid, 1995).

1.5.5. Adición de Fibra en bebidas

La fibra más utilizada para la fortificación de bebidas, es la fibra soluble proveniente de gomas como; arábica, guar, etc. La elección de la fibra soluble dependerá de las características organolépticas del producto final. La más utilizada por sus propiedades fisicoquímicas es la goma arábica, ya que ésta, puede ser adicionada a diferentes tipos de bebidas en polvo, bebidas carbonatadas, saborizadas, jugos y néctares. En contraste

la fibra insoluble no logra disolverse por lo que presenta un precipitado en la bebida. (Rodríguez, 2006).

1.6. PREBIÓTICOS

1.6.1. Definición

Los prebióticos se definieron en 1995 como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de manera benéfica al huésped estimulando el crecimiento, y/o la actividad de una o varias bacterias del cólon, y por tanto contribuyen a la salud.

Para considerar un componente como *prebiótico* debe estar suficientemente estudiado en humanos. Por esto, sólo los fructanos tipo inulina, que están presentes de forma natural en algunas plantas (raíces de ajos, cebollas, achicoria, entre otras), son usados por la industria alimentaria por sus propiedades tecnológicas y nutricionales (como sustitutivos de grasas o azúcar, o como fibra dietética).

Entre los prebióticos se incluyen tanto hidratos de carbono no digeribles/fermentables como otros compuestos menos definibles químicamente denominados fibras solubles de la dieta (Cummings; *et al* ; 2001).

1.6.2. Mecanismo de acción de los prebióticos en el organismo

En este sentido se ha mostrado que la proliferación de determinadas bacterias mediante la fermentación de hidratos de carbono no digeribles (efecto bifidogénico de fructanos parecidos a la inulina) puede inhibir la colonización del intestino por patógenos, ejerciendo un efecto protector frente a diversas alteraciones intestinales. La fermentación de los prebióticos puede promover algunas funciones fisiológicas específicas a través de la liberación de metabolitos por las bacterias, en especial los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato, etc) al intestino.

Los ingredientes prebióticos deben cumplir con 3 criterios; así, no deben ser digeridos por las enzimas del huésped, tienen que ser fermentados en el tracto gastrointestinal y han de ser selectivos en la estimulación de la flora intestinal y de la actividad metabólica. Así, el término “prebiótico” se utiliza para denominar a los productos, principalmente los hidratos de carbono, que fomentan el crecimiento de microorganismos beneficiosos (Rao, 1999).

1.6.3. Efectos producidos por los prebióticos

El efecto principal de los prebióticos, consiste en una interacción con la capacidad fermentadora del ecosistema gastrointestinal. Se cree que todos los efectos fisiológicos que se producen después del consumo del prebiótico se originan en la alteración de la función fermentadora del ecosistema gastrointestinal. El inicio del cambio fisiológico podría producirse mediante interacciones entre microbios, entre huésped y microbio y entre huésped y metabolitos bacterianos.

Los prebióticos favorecen las bacterias presentes en el cólon, más que proporcionar bacterias exógenas. Se trata de incrementar la cantidad de las bacterias “buenas” para el organismo (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*).

La utilización de los prebióticos por las bacterias colónicas conlleva en muchos casos la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lo que posee un impacto importante sobre el ambiente del intestino grueso, el metabolismo de macronutrientes y la prevención de enfermedades. Los AGCC se absorben con rapidez, utilizándose como fuente de energía entre comidas (Jie Z, *et al*; 2000).

Los ácidos grasos de cadena corta pueden actuar directa o indirectamente (mediante la modificación del pH) sobre las células intestinales y pueden participar en el control de varios procesos como la proliferación mucosal, la inflamación, la carcinogénesis colorectal, la absorción de minerales y la eliminación de compuestos nitrogenados (Williams y Jackson; 2000).

1.6.4. Relación probiótico-prebiótico

Los probióticos son aquellos microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma benéfica al desarrollo de la flora microbiana en el intestino, mientras que los prebióticos constituyen el sustrato (el “alimento”) de bacterias probióticas. Por lo tanto, su relación radica, en que las bacterias probióticas existentes en la flora intestinal produzcan ácidos grasos de cadena corta y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles (por ejemplo, fibra dietética, proveniente de prebióticos) (Cagigas A y Anesto J; 2002).

Para ser consideradas como probióticos, las bacterias deben de reunir algunas características como son: ser habitante normal del intestino humano, no patógena, no

toxigénica, capaz de sobrevivir y metabolizar en el ambiente intestinal y tener la capacidad de ejercer un efecto benéfico en el huésped.

Algunos de los microorganismos usados como probióticos humanos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei* spp *rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, entre otros (Roberfroid, 2000).

1.7. PREBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS Y BEBIDAS FUNCIONALES

1.7.1. INULINA

1.7.1.1. Definición y estructura química

Los fructanos tipo inulina son hidratos de carbono no reductores y solubles en agua. Su estructura puede ser lineal o ramificada y algunas veces cíclica.

Consisten de unidades fructosil (enlaces $\beta(2-1)$), que inicialmente presentan una molécula de glucosa a la cual se le unen por lo menos dos residuos de fructuosa (López, 2003 ; Wang; *et al*; 1999).

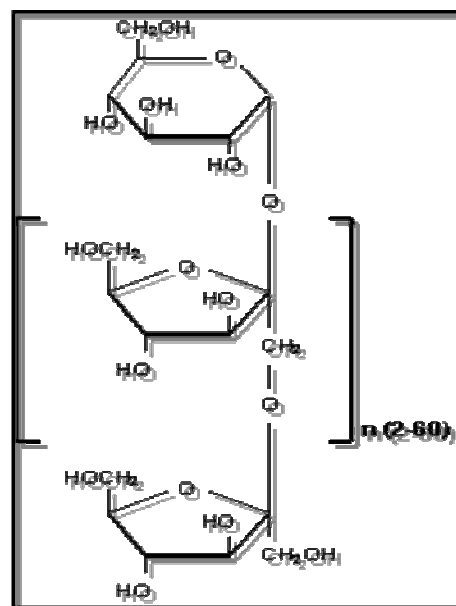


Figura 1. Estructura química de la inulina

1.7.1.2. Fuentes de inulina

La inulina es un ingrediente alimenticio natural obtenido de la raíz de la achicoria que también está presente en otros vegetales como (información en base seca): cebolla (2-6%), ajo (9-16%), plátano (0.3-0.7%), espárrago (10-15%), alcachofa de Jerusalén (15-20%) y achicoria (13-20%) (Quemener y Thibautl, 1994).

1.7.1.3 Propiedades

Dentro de las principales propiedades de este compuesto se encuentran las siguientes:

- Fuente de fibra, ya que la ingesta de estos activos a través de los alimentos contribuye a mejorar la protección y el equilibrio del intestino estimulando la flora intestinal a través de las bifidobacterias.
- Mantiene un bajo valor calórico, poder edulcorante y funciona como sustituto de grasa (Ortiz y col, 2006).
- Inhibición de desarrollo de cáncer, Rowland y col (1998), mostraron que la incidencia de focos de criptas aberrantes inducidos por carcinógenos como azoximetano y dimetilhidrazina, se redujo significativamente en ratas alimentadas con fructanos tipo inulina.

Taper y col (1997), reportaron que la velocidad de crecimiento de tumores implantados fue menor en ratas alimentadas con inulina en comparación con las ratas testigo, las cuales consumieron una dieta basal sin inulina y ningún otro tipo de agente con efecto prebiótico. El cáncer de colon, como la mayoría de los cánceres, evolucionan de lesiones precursoras, por lo cual el desarrollo o inhibición de criptas aberrantes puede servir para identificar y medir componentes de la dieta capaces de modular el desarrollo de cáncer de colon.

- Mejora la absorción del calcio, el efecto positivo de hidratos de carbono fermentables en la absorción mineral en el intestino se atribuye principalmente a la alta producción de AGCC, lo cual genera una disminución en el pH y un incremento en la concentración de minerales ionizados en el intestino. Como consecuencia, se incrementa la solubilidad y la difusión activa y pasiva de minerales a través de las células intestinales (Kruger y col; 2003).

Por otro lado, Coudray y col (2003) informaron que la absorción de la cantidad de calcio, aumento de 48mg/día (testigo) a 60.3mg/día consumiendo fructanos tipo inulina con un grado de polimerización (DP) promedio de 25, los fructanos de mayor longitud favorecieron más la absorción mineral.

- Efecto antilipogénico, este podría deberse a las concentraciones a la modificación de la disponibilidad de hidratos de carbono digeribles. (Delzenne y Kok; 1999). Los investigadores Kim y Shin (1998), informaron que las concentraciones de lípidos y triglicéridos disminuyeron significativamente en ratas alimentadas con extracto de inulina de achicoria al 5%, mostraron concentraciones significativamente menores que las alimentadas con extracto de achicoria al 1%; Sin embargo, las concentraciones hepáticas de colesterol fueron significativamente diferentes entre grupos. Estos efectos pueden deberse a alteraciones en la absorción o síntesis de colesterol, resultado de los cambios en la fermentación e incremento en la excreción fecal de lípidos y ácidos biliares.
- Efecto prebiótico, uno de los requisitos para que un ingrediente sea clasificado como “prebiótico”, es que este no debe de ser hidrolizado o absorbido en la parte superior del tracto intestinal (Gibson y Roberfroid; 1995); por lo tanto para conocer el efecto prebiótico de la inulina, se realizaron estudios con pacientes con ileostomía, ya que la medición del grado de digestibilidad que presenta cualquier sustancia *in vivo* es difícil, y a través de este estudio se puede aspirar el contenido ileal. Cummings y col encontraron que al menos el 88% de inulina y oligofructosa ingeridas alcanza el colon. Por otro lado, Nilsson y Bjorck (1998), incubaron inulinas derivadas de diferentes cereales de el jugo gástrico humano por 1 hora a 37°C y encontraron que a, pH 1.05, se hidrolizaron de 10 a 15% de los hidratos de carbono, pero a pH 1.8 el grado de hidrólisis fue menor a 1%.

1.7.1.4. Principales especificaciones de la inulina como producto comercial

En el cuadro 3 se muestran las especificaciones de la inulina:

Cuadro 3. Principales especificaciones de la inulina como producto comercial.

| | |
|--|---|
| Aspecto | Polvo blanco finamente granulado |
| Sabor | Ligeramente dulce |
| Solubilidad al agua | 120g/lt. (25°-350g/lt a 90°C) |
| Dispersabilidad en agua | Buena, aunque requiere de agitación |
| Densidad | 580 + 50 |
| Seguridad | No tóxico |
| Condiciones óptimas de almacenamiento | Fresco y seco, se debe de almacenar en su envase hermético original |
| Máxima duración | 8 meses |
| Irradiación | No irradiado |
| Origen vegetal | Adecuado para vegetarianos |
| Valor calórico | 1 Kcal/gramo para inulina pura |
| FUENTE: ORAFTI S.A, products Beneo™ Raftiline®, Chile, disponible en URL http://www.orafti.com [acceso 26 de Marzo 2007] | |

1.7.1.5. Consumo

No hay absolutamente ningún riesgo de consumo, aunque algunas personas pueden realmente sentir la ingesta de inulina debido a un tránsito intestinal más suave, como con cualquier otra fibra dietética, algunas personas reaccionan más fácilmente que otras. Para lo cual es prescindible mantener la dosis diaria de inulina recomendada, la cual de 5 a 8 gramos de inulina diaria (ORAFIT S.A, Beneo™ Raftiline®).

1.7.2. ISOMALTOOLIGOSACÁRIDOS

1.7.2.1. Definición y estructura química

Son oligosacáridos formados por dos monosacáridos, la isomaltosa se obtiene por hidrólisis de la amilopeptina y glucógeno.

Por lo tanto, un isomaltooligosacárido consiste en 2-10 unidades de la anhidroglucosa con los acoplamientos glucosídicos de α (1,6) (figura 3).

Estos se utilizan en bebidas, alimentos de leche, artículos de la confitería y pasteles, sin enmascarar su calidad del sabor natural, agregando efectos nutritivos que puedan mejorar los productos y consolidar su competitividad en el mercado. (Mizubuch y col, 2005).

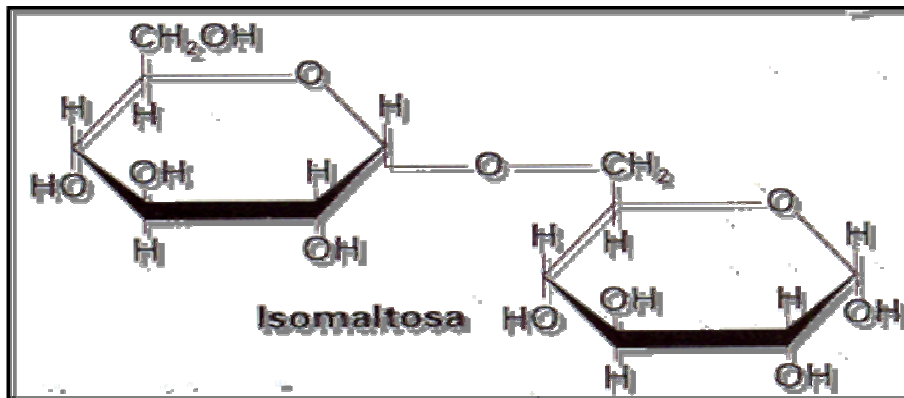


Figura 2. Estructura química de una isomaltosa.

1.7.2.2. Fuentes

Es un producto natural, obtenido a partir del almidón de maíz refinado por la modificación de la enzima (www.bioneutra.com).

1.7.2.3. Beneficios

Dentro de las principales propiedades de éste compuesto se encuentran las siguientes:

- Efecto sobre flora fecal humana, estos puede prevenir el crecimiento de las bacterias dañinas del intestino, aumentando el número de bifidobacterias, bacterias beneficiosas del intestino, mejora de esta manera la consistencia de heces.

También puede mejorar la perístasis de los intestinos, protegiendo contra el estreñimiento. Esto es provechoso para la gente especialmente para que los ancianos y los bebés prevengan enfermedades tales como estreñimiento, diarrea y desorden del intestino.

- Efecto prebiótico, ya que en el intestino estimulan el crecimiento de las bifidobacterias.
- Mejorar la digestión de productos lácteos, beneficiosa a la gente intolerante a la lactosa.
- Realza la función inmune, previniendo el efecto secundario causado por los antibióticos, ayuda a la disminución de posibles infecciones, a los efectos tempranos del envejecimiento.
- Es particularmente conveniente para el paciente diabético, porque su contenido no fermentable no puede aumentar del azúcar en la sangre y puede balancear la concentración de la insulina.
- Previene la caries; Las caries dentales son causadas por gomas insolubles que forman en la superficie de los dientes (placa), y ácidos debajo de esta placa atacando de esta manera el esmalte. Se ha demostrado que el IMO (isomaltooligosacáridos) en reduce la cantidad de placa formada y también reduce la cantidad de ácidos que atacan el esmalte (Shandong Y; 2005).
- Ejercer un efecto beneficioso sobre el colesterol (nivelándolo) y prevenir la hipertensión.
- Alivia la fatiga.
- Es un producto bajo en calorías.
- Mejora la absorción de calcio. (www.blog.china.alibaba.com)

1.7.2.4. Principales especificaciones de los isomaltooligosacáridos como producto comercial

El IMO (isomaltooligosacáridos), como producto comercial, tiene dos presentaciones: jarabe o polvo, sus principales atributos se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Diferencias de los principales atributos entre las dos presentaciones de IMO (Isomaltooligosacáridos) según su presentación.

| PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LAS DOS PRESENTACIONES DE IMO (Isomaltooligosacáridos) COMERCIAL | | |
|---|----------------------------------|---|
| ATRIBUTO | IMO LÍQUIDO | IMO SÓLIDO |
| Aspecto | Viscosidad y jarabe transparente | Polvo sólido sin la impureza que se puede considerar por el ojo |
| Color | Descolorido o amarillo claro | Blanco o amarillo claro |
| Olor | Ningún olor inusual | Ningún olor inusual |
| Gusto | Dulce suave y claro | Dulce suave y claro |
| FUENTE: Shandong Y; 2005; | | |

Las especificaciones principales de este producto son:

- Porcentaje de humedad alto, lo que le provee una gran resistencia contra la contaminación bacteriana.
- No fermentable por levaduras, previniendo el crecimiento del microorganismo, que mejorará grandemente la preservación de alimentos procesados.
- Es altamente soluble en agua.
- Actividad de agua baja.
- Su aporte calórico es de 11.3-13.8 KJ/g. (Kohmoto *et al*; 1992).
- Su dulzor es equivalente a 1/3 de azúcar. (www.diytrade.com).
- Resistencia ácida y térmica; ya que es estable en alimentos acidificados y no pierde sus propiedades si es expuesto a altas al calor.
- Mantiene una menor higroscopicidad en comparación con la sucrosa.
- Su viscosidad es similar a la de la sucrosa y puede utilizar enteramente o en parte como sustituto de esta en los productos sin cambiar la técnica de proceso (Mizubuch y col, 2005).

1.7.2.5. Consumo

Análisis clínicos efectuados por los proveedores del producto demostraron que el IMO (isomaltooligosacáridos) es un producto inocuo para la salud y no causa ningún daño, siempre y cuando este se use en la dosificación recomendada, la cual oscila entre 8 y 12

gramos por día del mismo, ya que de no ser así, en algunos casos puede presentarse diarrea (dosis letal más de 44 gramos al día) (Cornproducts S.A. IMO).

1.7.3 FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS DE CADENA CORTA

1.7.3.1. Definición y estructura química

El término oligosacáridos incluye un grupo de carbohidratos que consisten de 2 a 10 unidades de azúcares monoméricos, y se distinguen según la identidad de estos monómeros, según el tipo de unión entre ellos, según el tipo de estructura de la cadena (lineal, ramificada, radicales) y según sus uniones a otras estructuras no hidrocarbonadas (conjugados). Los mejor conocidos y caracterizados son los oligosacáridos de la serie de la rafinosa y los fructooligosacáridos (FOS). Los FOS son un tipo de fibra soluble compuesta de unidades de fructosa, los FOS constan estructuralmente de una molécula de sacarosa a la que se pueden unir por enlaces glicosídicos $\alpha(2-1)$ de 1 a 3 moléculas de fructosa dando lugar respectivamente a los fructooligosacáridos 1-kestosa (GF2), nistosa (GF3) y 1-fructosil-nistosa (GF4), como se muestra en la figura 4 (McKellar y col, 1993).

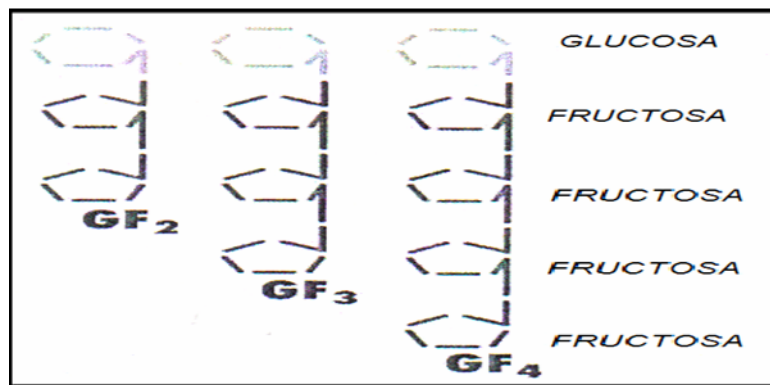


Figura 3.- Estructura química de los fructooligosacáridos

1.7.3.2. Fuentes de obtención

Se encuentra presente en cantidades grandes en las raíces de la achicoria; ya que los FOS, son un componente natural de la inulina y se obtiene mediante una hidrólisis enzimática parcial (Método de extracción de fuentes naturales)

Otro método es la producción de fructooligosacáridos a partir de sacarosa es un método utilizado actualmente en todo el mundo (Van J y col, 1999).

1.7.3.3 Propiedades

En el cuadro 7, se indican los distintos efectos que se atribuyen a los oligosacáridos no digeribles según los resultados de estudios realizados en humanos. Las pruebas se clasifican como fuertes (basadas en estudios confirmados en humanos), prometedoras (estudios en humanos que requieren confirmación), o preliminares (estudios de experimentación animal).

Cuadro 5.- Pruebas de determinación de las propiedades de los FOS, según la confirmación de estudios.

| EFEECTO | PRUEBAS (en humanos) |
|--|-----------------------------|
| Probiótico e interacción con la flora intestinal | Fuertes |
| Regulación del tránsito intestinal | Fuertes |
| Incremento de la absorción de minerales | Prometedoras |
| Efectos sobre el metabolismo lipídico | Preliminares |
| Cáncer de colon | Preliminares |
| FUENTE: (Van J y col; 1999) | |

De acuerdo con el cuadro anterior, las propiedades de los fructooligosacáridos, son las siguientes:

- Efecto prebiótico, los oligosacáridos no digeribles resisten la digestión en el intestino delgado y son sustratos potenciales de las bacterias que colonizan el intestino grueso. Teniendo como consecuencias: el aumento de la flora bacteriana que conlleva un aumento del bolo fecal y la producción de ácidos grasos de cadena corta como resultado de la fermentación, y efecto probiótico.
- Diversos estudios sugieren que la ingesta de oligosacáridos no digeribles aumenta la absorción de minerales, en particular del calcio.
- Respecto al efecto sobre el metabolismo lipídico, los datos disponibles no son suficientes, pero indican que una ingesta moderada de oligofructosa pueden afectar al metabolismo lipídico humano (reduciendo los niveles de triglicéridos en sangre).
- Reducción del riesgo de cáncer de colon, este efecto se ha demostrado en animales de experimentación, pero son necesarios estudios en humanos. El mecanismo que explica esta afirmación es el siguiente: La fibra envuelve sustancias cancerígenas

presentes en la dieta, reduciendo el tiempo de contacto de las mismas con la capa que recubre el intestino grueso. A La fermentación a cargo de bacterias intestinales de los FOS produce un medio ácido en el colon que inhibe la formación de metabolitos creados a partir de ácidos biliares de la bilis y de ciertos ácidos grasos, los cuales se sabe favorecen el crecimiento de células tumorales.

- Contribuyen a reducir el desarrollo de trastornos digestivos como el exceso de gases, ya que equilibran la flora intestinal reduciendo el desarrollo de bacterias putrefactivas.
- Mejoran el tránsito intestinal, lo que resulta beneficioso en caso de estreñimiento y de diarrea (Van J y col; 1999) y (Van J y col; 1999).
- Bloqueo de bacterias patógenas, algunos oligosacáridos tienen un efecto positivo en cuanto al secuestro de bacterias potencialmente patógenas. Muchas bacterias patógenas poseen adhesinas o lectinas superficiales que son proteínas que tienen la capacidad de unirse a determinados carbohidratos. Estos patógenos y sus toxinas se unen de forma específica al componente oligosacárido de los receptores glicoconjugados presentes en la membrana de los enterocitos, que son particularmente abundantes en enterocitos inmaduros. Por ejemplo bacterias como algunos serotipos de *E.coli* y *Salmonella* con adhesinas fimbriales tipo 1 se unen de forma específica a receptores que contienen oligomanosa unida por N a las glicoproteínas. Dado que la unión de las bacterias patógenas a la superficie de la mucosa intestinal es un paso esencial en la patogénesis de muchas bacterias, la posibilidad de producir oligosacáridos análogos a los receptores intestinales para inhibir el proceso de unión es de interés en la prevención de enfermedades (Oyofu y col, 1989).
- Según los estudios reportados por Yamashita en 1984 los fructooligosacáridos bajaron los niveles de azúcar en sangre en individuos diabéticos.

1.7.3.4. Especificaciones de los fructooligosacáridos como producto comercial

En el cuadro 6 se muestran las principales propiedades de los fructooligosacáridos como producto comercial.

Cuadro 6. Principales propiedades de un producto comercial de fructooligosacáridos (BENEO-RAFTILOSA).

| PROPIEDADES | CARACTERÍSTICA |
|--|---|
| Estado Físico | Polvo finamente granulado |
| Sabor | Dulce |
| Tipo de ingrediente | Higroscópico |
| Solubilidad | Altamente soluble |
| Actividad de agua | 0.1-0.2 |
| Estabilidad al calor | Estable al calor |
| Viscosidad | Similar a la de la sacarosa. La adición de este producto no causa gelificación. |
| p.H | Estable a p.H bajos |
| Efecto a las Reacciones de Maillard | Este producto no participa en las reacciones de Maillard (conserva su color). |
| Índice de refracción | Similar a la de la sacarosa. |
| Densidad | Similar a la de la sacarosa. |
| Condiciones de almacenamiento del producto y calidad de vida. | Puede ser almacenado a bajas temperaturas (5°C a un p.H bajo) y altas temperaturas (25°C en condiciones de humedad relativa de 3.33%) |
| FUENTE: ORAFI S.A, products Beneo™ Rafftilosa®, Chile, disponible en URL http://www.orafit.com [acceso 26 de Marzo 2007] | |

1.7.3.4. Consumo

Para favorecer el desarrollo de una flora bacteriana sana, generalmente se recomienda tomar 2,000 a 3,000 mg al día de suplementos FOS, con las comidas.

En los estudios sobre diabetes y niveles elevados de lípidos en sangre (colesterol y triglicéridos), se usaron cantidades de entre 8 y 20 gramos al día.

En general, los oligosacáridos son bien tolerados. Con consumos más elevados, superiores a 40 gramos al día, los FOS y otros oligosacáridos pueden inducir diarrea. (www.knox.com/healthnotes.com).

2. JUSTIFICACIÓN

Desde hace varios años se han descrito los beneficios del consumo de alimentos funcionales en la salud humana; siendo el efecto prebiótico el de más relevancia dentro de la alimentación actual. Sin embargo, el conocimiento sobre el beneficio de este tipo de alimento, no conducen necesariamente a cambios en las prácticas alimentarias, dado que un producto para que sea consumido como alimento debe ser atractivo para los sentidos y tener aceptación cultural. Es por esto, que se hace necesario tener en el mercado un producto con aportaciones prebióticas con una presentación de agua saborizada, ya que esta, le brindará al consumidor una sensación de frescura e hidratación en comparación con las bebidas lácteas prebióticas que por sus atributos no se destacan por estas cualidades. Por lo tanto, esta bebida además de brindar el crecimiento de algunas bacterias en el colon que pueden mejorar la salud del hospedero, será un producto atractivo desde el punto de vista sensorial y con los beneficios que le otorgará la fibra soluble, propiedad principal de un prebiótico.

La presente investigación pretende contribuir en el aprovechamiento de los prebióticos mediante la elaboración de una bebida saborizada artificialmente, con mayor vida útil gracias a la utilización de conservadores químicos permitidos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una bebida funcional con efecto prebiótico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los diferentes prebióticos utilizados con base a su crecimiento de bacterias benéficas en un medio selectivo para *Lactobacillus*.
- Realizar formulaciones para una bebida saborizada cítrica.
- Aplicar el método de evaluación sensorial más adecuado para el producto elaborado.
- Aplicar las técnicas microbiológicas de acuerdo con las Normas Oficiales Mexicanas, para identificar y cuantificar organismos mesofílicos aerobios y organismos coliformes para determinar la calidad sanitaria del producto.
- Realizar análisis físicos y químicos a la bebida elaborada.

4. MATERIALES Y EQUIPO

4.1. Materiales

- Material común de laboratorio.
- Placas Petrifilm para el recuento de coliformes totales
- Placas Petrifilm para el recuento de aerobios totales.
- Micropipetas.

4.2. Equipo

- Horno de circulación natural, Instrumentos analíticos Technicare B.G. Modelo SP1400 Serie 43-88, 30°C.
- Incubadora de laboratorio (37°C), Bacteriológica, Modelo EC51.
- Cuarto de enfriamiento (4°C), Taylor.
- Refractómetro ABB-3L
- Potenciómetro Hanna Instruments modelo pH ep®
- Báscula Digital, Item N. AR 3130 Readability=0.001g; Máxima capacidad 310g
- Báscula Digital Item N. eod120; Máxima capacidad 4,100g.
- Agitador-Termo-Parrilla; C-MAG HS751; Serie 115V.
- Agitador Serie 600646, 40-6000 (1/min.), 120V2, 50/60Hz, 5.0 amp.
- Autoclave de laboratorio, Marca Presto.

4.3. Reactivos

- NaOH (0.1N)
- Fenolftaleína.
- Acetona.
- Peptona de caseína.
- IMO-R1 (Lot. CP IK001, Corn Products International).
- Beneo-Raftilosa (Lot. BEBJ5DBJ5 Megafarma S.A de C.V)
- Beneo-Raftiline (Megafarma S.A de C.V)
- Cepa liofilizada de *Lactobacillus delbruekii*

1. METODOLOGÍA

DESARROLLO EXPERIMENTAL

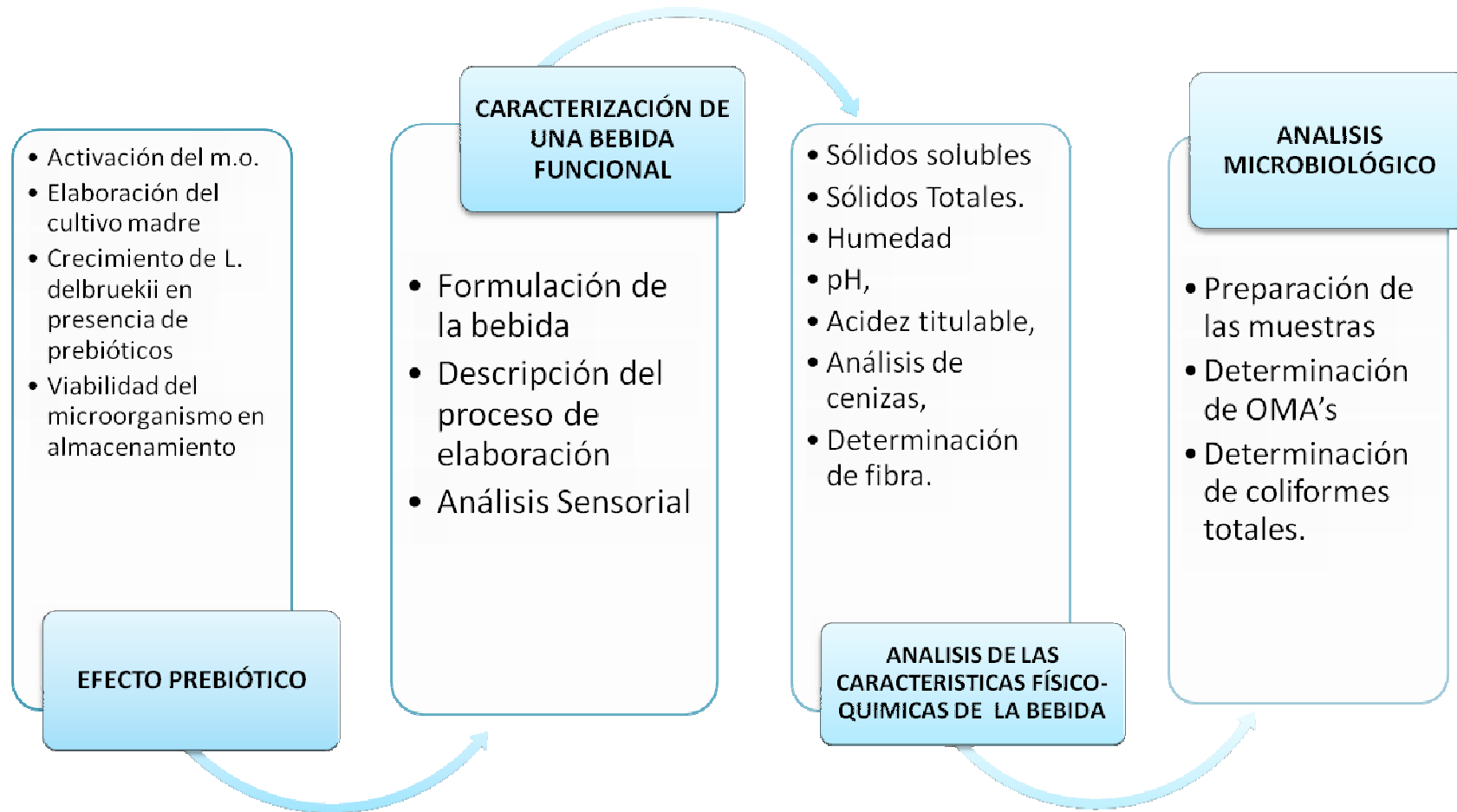


FIGURA 4. Diagrama de la metodología empleada

5.1. EFECTO PREBIÓTICO EN *Lactobacillus*.

5.1.1. Activación del microorganismo (*Lactobacillus delbrueckii*)

Debido a que la cepa que se utilizó estaba liofilizado primero se procedió a activarlo, suspendiendo aproximadamente 0.1g del microorganismo liofilizado en leche descremada reconstituida al 12% (p/v) pasteurizada a 63°C durante 30 min. Y se incubó a 37°C durante 48 h. Posteriormente, se aisló por la técnica de vaciado en placa incubando a 37°C por 24 horas en agar MRS. Después de este tiempo, se contaron las colonias por placa, y se verificó la pureza de los cultivos al microscopio (mediante tinción de Gram).

5.1.2. Elaboración del cultivo madre

Primero se esterilizó 800mL de leche descremada a 92°C por 30 min. Después se enfrió a 27°C para agregar el m.o. aislado en condiciones de esterilidad, el cual se incubó a 37°C por 48 h.

5.1.3. Crecimiento de *Lactobacillus* en presencia de prebióticos

Para poder determinar que efecto tienen los prebióticos en cuanto al crecimiento de bacterias probióticas (*Lactobacillus*) se colocó en cuatro matraces 200mL de leche descremada reconstituida al 12% (p/v) pasteurizada a 63°C durante 30min. En cada matraz se adicionó el prebiótico a evaluar (Matraz 1 “Isomaltooligosacáridos”, Matraz 2 “Beneo-raftilose”, Matraz 3 “Beneo-raftiline”), y se dejó un matraz (Matraz 4 “Sin prebiótico”), con el fin de tener un control. La concentración utilizada de cada prebiótico se tomó de la dosis mínima recomendada en las hojas de especificaciones de cada uno. Posteriormente se inoculó cada matraz al 5% (v/v), con el cultivo madre. El procedimiento anterior se llevó a cabo por duplicado. En esta etapa se determinó una cinética de crecimiento y el tiempo de generación del microorganismo con las siguientes ecuaciones.

Ecuación 1.) Velocidad específica de crecimiento.

$$\mu = \ln x_2 - \ln x_1 / t_2 - t_1$$

Ecuación 2.) Tiempo de duplicación

$$Td = (\ln 2) / \mu$$

5.1.4. Viabilidad del microorganismo en almacenamiento (Influencia del prebiótico)

Se determinó la viabilidad en agar MRS al t_0 con el fin de saber cuantas unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) se tenía inicialmente. Posteriormente se almaceno a 4°C durante 20 días, y cada 5 días se determinaba la viabilidad del microorganismo por la técnica de vaciado en placa en agar MRS, utilizando el método de vaciado en placa en agar MRS, incubando cada muestra a 37°C durante 48h, y contando el número de UFC/mL para cada muestra.

5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA BEBIDA PREBIÓTICA

El criterio asumido para establecer la formulación del producto se basó en los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento microbiano donde se observó que el prebiótico “Beneo-raftilose” mantenía un mejor tiempo de duplicación y una mayor velocidad de crecimiento con respecto a la cepa utilizada.

La formulación se llevó a cabo tomando en cuenta las hojas de especificaciones del prebiótico, donde nos indica la dosis mínima recomendada, y en el método de Pearson, para asociar las cantidades en las que debe estar cada ingrediente, respecto a la bebida que tiene las características que queremos para nuestra bebida.

5.2.1. Formulación de la bebida-Método de Pearson

El método de Pearson (cuadro de Pearson), se utiliza para mezclar adecuadamente sustancias que tienen distintos porcentajes en su concentración. Se basa en un cuadro donde se coloca el porcentaje deseado en el centro y en los extremos del lado izquierdo se colocan los porcentajes con los que se cuenta. Estos valores se restan diagonalmente y los resultados son valores absolutos.

Inicialmente, se estableció una serie de formulaciones teóricas, a partir de allí, se seleccionaron las formulaciones que cumplían con lo establecido en la NOM-086-SSA1-1994 y el PROY-NOM-218-SSA1/SCFI-2002.

Se elaboraron dos formulaciones, las cuales solo se diferenciaban en la concentración de sacarosa, la formulación A se le agregó una solución de sacarosa al 15% (p/v) y a la formulación B una solución de sacarosa al 12% (p/v), las cuales cumplieron con las especificaciones tanto fisicoquímicas como microbiológicas.

5.2.2. Descripción del proceso de elaboración

Para la elaboración de la bebida fría se utilizó el prebiótico que presentó una mayor afinidad en el crecimiento del *Lactobacillus*.

El prebiótico se dosificó con base en la dosis diaria recomendada que se especifica en la ficha técnica del prebiótico. Primero se disuelve el prebiótico con 200 mL de agua a 2500 rpm, después esta mezcla se divide en 3 porciones, la primera porción se mezcla con la goma para hidratarla, esto se realiza a una temperatura de 25-40°C, la segunda porción se mezcla con el agente de peso y el saborizante a 1500 rpm, la tercera porción se mezcla con el ácido cítrico, el benzoato de sodio y el colorante. La porción uno se mezcla con la porción dos a una temperatura de 20-25 °C y se homogeniza a 2500 rpm durante 30 min. A esta última mezcla se agrega la porción tres, y se homogeniza a 2500 rpm durante 5 minutos. Después se licua durante 15 mín. para hacer la emulsión. Posteriormente se envasa en botellas de plástico de Polietilen – Tereftalato (PETE) y se pasteuriza a una temperatura de 60°C durante 30 min. A continuación se almacenó a 4 °C para realizar una prueba de preferencia y evaluar cual de las dos bebidas es la más aceptada por el consumidor. En la figura 5 se muestra un diagrama del proceso de elaboración.

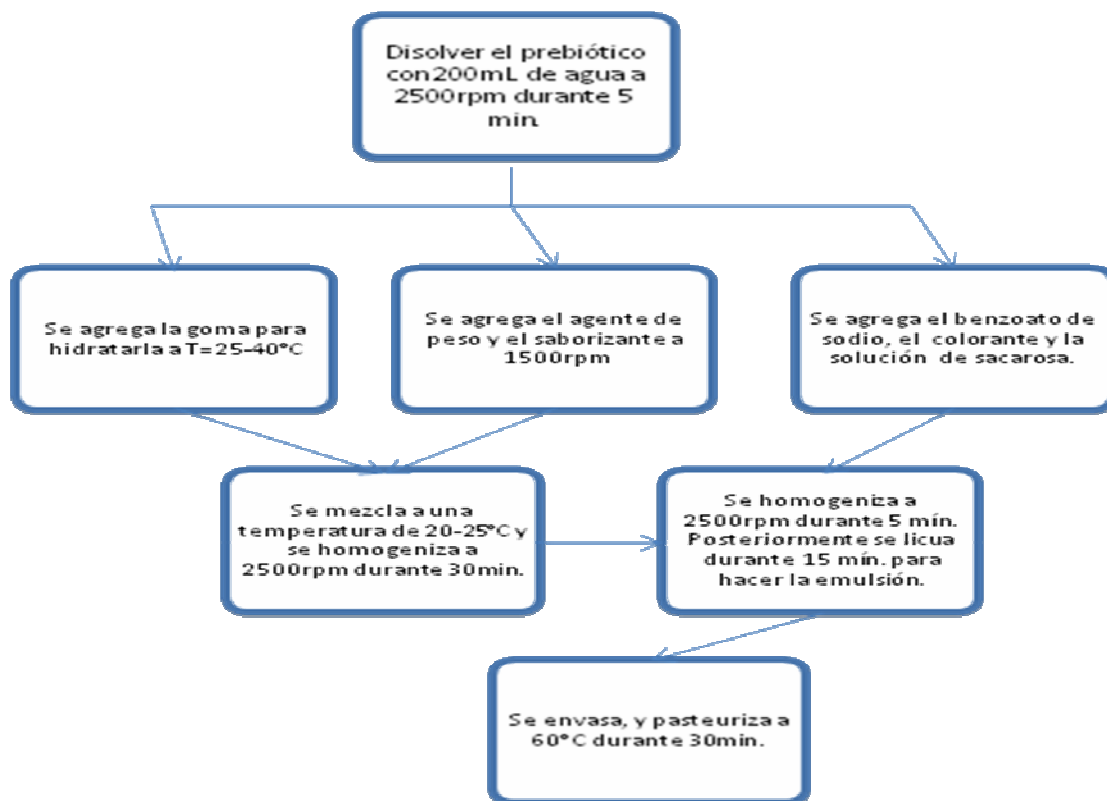


Figura 5.- Elaboración de la bebida prebiótica

5.2.3. Análisis sensorial

Se realizaron dos evaluaciones sensoriales la primera con el fin de determinar cual de las dos formulaciones es la más aceptada por el consumidor, esta se realizó con una prueba de preferencia con una escala de 5 puntos, la cual fue evaluada por los posibles consumidores (juez-afectivo), a los cuales se les brindó una explicación necesaria para que la prueba se realizara correctamente. De esta prueba se determinó que la formulación A, era la más aceptada por el consumidor, por lo tanto esta formulación fue la que se utilizó para realizar el análisis físico-químicos como microbiológicos, y poder determinar la vida útil de la bebida. Posteriormente, se realizó un segundo análisis sensorial con una prueba de diferencia, la cual se utilizó para determinar si existía alguna diferencia perceptible entre la muestra tomada al t_0 (0 días) y después del almacenamiento t_i (30 días) a 4°C, y así poder determinar si la bebida había sufrido algún cambio cuando se mantuvo en almacenamiento. Se utilizó una hoja de respuestas en donde se solicita la diferencia o igualdad entre dos muestras. Las muestras se presentaron en un par o una serie de pares de muestras, requiriendo que el juez determine si el par es diferente o iguales entre si. Cabe mencionar que los jueces que evaluaron esta prueba fueron jueces afectivos (consumidores) (Pedrero, 1989).

5.3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

5.3.1. Sólidos totales

Los sólidos totales fueron determinados por el método gravimétrico 925.23 del AOAC (1990); se pesaron de 5 mL de muestra, los cuales se colocaron en una estufa a 100°C, hasta un peso constante.

Ecuación 3.)

$$\% S_T = |P_1 - P_2| * 100$$

Donde:

% S_T = Sólidos Totales en %

P_1 es el peso inicial de la muestra

P_2 es el peso de la muestra desecada

5.3.2. Humedad

La humedad se determinó por el método de desecación en estufa a peso constante, la cual implica la pérdida de peso por evaporación, que sufre la bebida al someterlo a las condiciones preescritas expresadas en porcentaje, la cual se calcula en % de humedad perdido, con la siguiente ecuación (NOM-116-SSA1-1994).

Ecuación 4.)

$$\%H = \left| \frac{P_1 - P_2}{P_1} \right| * 100$$

Donde:

% H = Humedad en %

P₁ es el peso inicial de la muestra

P₂ es el peso de la muestra desecada

5.3.3. Sólidos solubles (°Brix)

La concentración en sólidos solubles se expresa en grados Brix. Originariamente, los grados Brix son una medida de densidad. Un grado Brix es la densidad que tiene, a 20° C, una solución de sacarosa al 1 %, y a esta concentración corresponde también un determinado índice de refracción.

Así pues, se dice que un zumo tiene una concentración de sólidos solubles disueltos de un grado Brix, cuando su índice de refracción es igual al de una solución de sacarosa al 1 % (p/v).

Como los sólidos no son solamente sacarosa, sino que hay otros azúcares, ácidos y sales, un grado Brix no equivale a una concentración de sólidos disueltos de 1g/10ml. Los grados Brix son, por tanto, un índice comercial, aproximado, de esta concentración que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa (NMX-F-103).

5.3.4. pH

Se basa en la medición electrométrica de la actividad de los iones hidrógeno presentes en una muestra del producto mediante un aparato medidor de pH (potenciómetro) (NMX-F-317-S).

5.3.5. Acidez titulable

La determinación de la acidez se lleva a cabo mediante una valoración ácido-base; los resultados que se obtienen corresponden a la suma de los ácidos minerales y orgánicos, en nuestro caso se determina en ácido cítrico (NOM-F-102-S). La fórmula utilizada para la determinación de la acidez titulable (g/100mL) fue la siguiente:

Ecuación 5.)

$$\% \text{Acidez Titulable} = \frac{(V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}}) * 64.04}{V_{\text{muestra}}} * 100$$

Donde:

V_{NaOH} = Volumen gastado de NaOH en la titulación

N_{NaOH} = Normalidad de la solución de NaOH

V_{muestra} = Volumen titulado de muestra.

Expresada en base a ácido cítrico.

5.3.6. Análisis de cenizas

Las temperaturas elevadas (550°C) destruyen la materia orgánica para dejar únicamente las sales minerales contenidas en el alimento, las cuales nos dan a conocer la cantidad de materia inorgánica contenida en el y con este valor determinar también la fibra dietética, que se encuentra en el producto. El método utilizado fue el de incineración con mufla. Esta determinación se realizó al t_0 y al t_f , con la finalidad de ver si existía un cambio que pudiera provocar el almacenamiento (NMX-F-66-S-1978).

Ecuación 6.)

$$PM = PCM - PCV$$

Ecuación 7.)

$$PC = PCC - PCV$$

Ecuación 8.)

$$\% \text{Cenizas} = \frac{PC}{PM} * 100$$

Donde:

PCM = Peso del crisol con muestra

PCV = Peso del crisol vacío

PM = Peso de la muestra

PCC = Peso del crisol con cenizas

PC = Peso de las cenizas

5.3.7. Determinación de fibra

Se determina con la precipitación de las fibras por adición de cuatro volúmenes de etanol. El residuo total es filtrado, lavado con etanol al 78%, etanol al 95% y acetona. Después del secado, se pesa el residuo. Un duplicado es analizado para proteína y otro es incinerado a 525°C, y se determinan las cenizas. El análisis de fibra dietética se determinó al t_0 y al t_f para ver los cambios que pudiera sufrir la bebida con el almacenamiento en cuanto al contenido de fibra. (NOM-086-SSA1-1994)

Ecuación 9.)

$$\% \text{Fibra} = \left(\frac{R - A - B}{P_m} \right) * 100$$

Donde:

R = Peso del residuo (promedio de los pesos (g) para el duplicado de muestras determinadas.

A y B = Pesos (g) de proteína y ceniza respectivamente

P_m = promedio de peso (g) de las dos muestras tomadas.

5.4. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS

5.4.1. Preparación de muestras

La preparación de las muestras se realizó conforme a la metodología marcada por la NOM-110-SSA1-1994 utilizando peptona de caseína para preparar el agua peptonada para las muestras.

5.4.2. Determinación de organismos aerobios totales

Esta prueba se realizó con el objetivo de cuantificar los microorganismos viables, y para determinar si este valor se encuentra en los límites que permite la norma para este tipo de bebidas, y nos indica si se está llevando un adecuado control sanitario. Para ello se utilizaron placas petrifilm_{MR} para el recuento de aerobios totales, incubando a 35°C \pm 1°C durante 48 h. Posteriormente se realizó el conteo de UFC/ml (NOM-092-SSA1-1994).

5.4.3. Determinación de microorganismos coliformes totales.

Este método se basa en que las bacterias coniformes fermentan la lactosa incubadas a 35 \pm 1°C durante 24-48 h resultando una producción de ácidos y gas. Para ello se utilizaron placas petrifilm_{MR} para el recuento de coliformes las cuales se incubaron a 35°C \pm 1°C por 48 h. y se realizo el recuento de UFC/mL (NOM-113-SSA1-1994).

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. EFECTO PREBIÓTICO EN LACTOBACILOS

Los carbohidratos de cadena corta, como son la inulina (BENEO-Raftiline), los Fructooligosacáridos (BENEO-Raftilose) y los Isomaltooligosacáridos (IMO, presentación jarabe) son el sustrato de las bacterias prebióticas, por ser fuente de carbono y de energía, considerando esta, la característica “principal”, al nombrar un producto como « prebiótico », además de que este no debe ser digerido por el epitelio intestinal y/o glándulas anexas, es decir debe llegar intacto al intestino donde se encontraran disponibles para ser fermentados por las bacterias sacarolíticas, especialmente *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Al considerarse el *Lactobacillus delbrueckii* una bacteria probiótica, se realizó una cinética de crecimiento para conocer su comportamiento en presencia de diferentes prebióticos, en los siguientes tiempos: 0, 5, 10, 15 y 20 días.

Tomando en cuenta las siguientes condiciones:

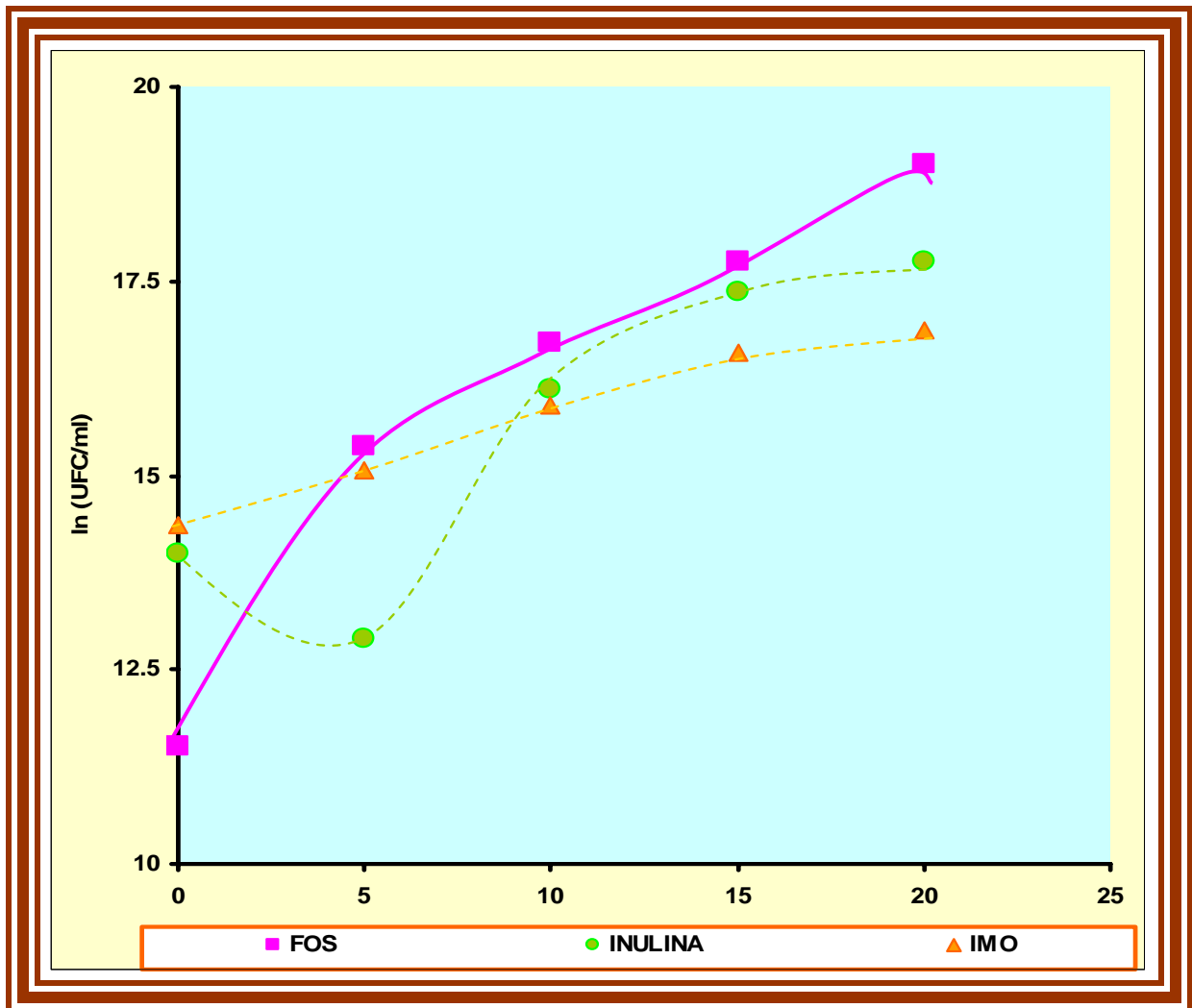
- El microorganismo debe presentar características que garanticen su crecimiento y supervivencia en el alimento (viabilidad), la cual se comprobó en la realización de la cinética.
- Garantizar su crecimiento durante su tránsito por el estómago e intestino delgado. (el microorganismo debe de tolerar un pH=2-3). El cual se comprobó al medir el pH al inicio y al final de la cinética de cada uno de los tres cultivos realizados (prebiótico + microorganismo).
- Mantener un mayor crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii*, en presencia de prebióticos, los primeros 10 días de la cinética en comparación con el blanco de control, este parámetro se estima, ya que la leche que se utilizó para inocular el testigo se encontraba estéril, desgrasada, sin presencia de vitaminas u otros nutrimentos que funcionaron como sustrato para la bacteria.

Debido a lo anterior se espera que el microorganismo tenga una velocidad de crecimiento específica menor en comparación a la velocidad que tenga la bacteria en presencia de prebiótico.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, en cuanto al pH, el microorganismo, tiene un crecimiento óptimo a un pH, en el rango de 3.7-3.4, en el medio de cultivo lo que indica que esta bacteria prebiótica puede sobrevivir a un pH bajo.

Se demostró la viabilidad del microorganismo, ya que dicho presenta recuentos en placa mayores a 1×10^6 UFC/ml en presencia de prebióticos esto se aprecia de mejor manera en la gráfica 1, que muestra el crecimiento del *Lactobacillus* en presencia de 3 prebióticos diferentes en las mismas condiciones de temperatura (37°C) y tiempo de incubación, concentraciones y medio de siembra.

Gráfica 1. Curva de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* en presencia de diversos prebióticos.



En la gráfica se observa a simple vista, que el *Lactobacillus delbrueckii*, creció más rápido en presencia de fructooligosacáridos (Beneo Raftilosa) seguido por inulina e IMO.

La inulina, no presenta crecimiento durante los primeros cinco días de la cinética, esto pudo deberse a que el microorganismo no se adaptaba al sustrato, Posteriormente presenta un crecimiento con dificultades, por el cual, el *Lactobacillus delbrueckii*, no demuestra afinidad con el sustrato proporcionado (inulina), posiblemente este prebiótico, sea más afín con bifidobacterias.

Para establecer de una manera confiable, el mejor desempeño funcional de cada uno de estos prebióticos, se expresaron los datos de manera matemática.

La expresión matemática del crecimiento microbiano es el tiempo de generación o de duplicación y la velocidad específica de crecimiento (μ), siendo el tiempo de generación, el tiempo en el que la población duplica su número durante un período determinado de tiempo y la constante de velocidad (μ), el equivalente al número de generaciones por unidad de tiempo, expresado a menudo como generaciones por hora.

Es importante mencionar que los tiempos de duplicación cambian notablemente según sea la especie microbiana, las condiciones ambientales y los nutrientes disponibles, Los valores varían desde menos de 10 minutos (0.17 h.) en unas pocas bacterias, hasta varios días en algunos microorganismos.

Una vez establecidas las ecuaciones, se realizaron las determinaciones de μ de cada uno de los prebióticos, durante la etapa de su crecimiento exponencial, es decir como t_1 y t_2 , se tomaron 5 y 10 días respectivamente.

En prebiótico “inulina”, la velocidad específica, se calculo de manera seccionada, debido a su comportamiento discontinuo en los 4 tiempos de generación, y así, expresar de una manera matemática, el comportamiento que se observa en su respectiva curva de crecimiento.

La manera de calcular de una manera seccionada una curva de crecimiento, es la siguiente: se toman t_1 y t_2 , 0 y 5 días respectivamente, y así sucesivamente (siguiente cálculo $t_1=5$ y $t_2=10$, etcétera) con su respectivo crecimiento expresado en \ln_1 y \ln_2 (logaritmo natural de las U.F.C/ml obtenidas en la cinética).

Los resultados obtenidos de la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación se muestran de una manera más detallada en el siguiente cuadro (cuadro 7):

Cuadro 7. Determinación de la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de la bacteria probiótica.

| PREBIÓTICO | Velocidad específica de crecimiento μ [generación/tiempo (días)] | | | | Tiempo de duplicación T_d [días] | | |
|------------|---|---------|---------|---------|---------------------------------------|----------|----------|
| | μ_1 | μ_2 | μ_3 | μ_4 | T_{d2} | T_{d3} | T_{d4} |
| IMO | 0.13 | | | | 5 | | |
| INULINA | No aplica | 0.62 | 0.08 | 0.07 | 1.1 | ≈7 | |
| | | | | | | | |
| FOS | 0.77 | | | | 1 | | |

En el cuadro anterior, los FOS, demostraron mantener una velocidad de crecimiento mayor y un T_d menor, que el caso de IMO e inulina.

Además este microorganismo, supera en crecimiento al blanco de control durante los primeros diez días, que fue el tiempo que se mantuvo estable el cultivo de este microorganismo con la leche, ya que una vez separadas las fases, este medio estaba totalmente acidificado y no se pudo realizar la cinética por más días. Esto se determina de una manera más confiable en la velocidad de crecimiento específico que alcanzó el blanco de control durante sus primeros diez días, la cual fue de 0.11 aproximadamente, obteniendo esta μ , se demuestra que efectivamente una bacteria prebiótico crece en presencia de prebiótico, funcionando estas como sustrato selectivo de dichas.

Este dato no fue graficado debido a que la cinética para el blanco de control no tuvo seguimiento, por las razones que se especifican anteriormente.

Es importante, mencionar que el prebiótico FOS es estable a pH bajo, este dato es determinado de acuerdo a las especificaciones que el producto contenía en su hoja técnica del producto.

Por lo tanto , se decidió realizar dos formulación de una bebida base agua adicionando como prebiótico fructooligosacáridos, para obtener una bebida funcional, que además de brindar un efecto benéfico a las bacterias que habitan la flora intestinal, aporte fibra al organismo, ya que los prebióticos, son considerados fuente de fibra para el organismo.

6.2. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA BEBIDA SABORIZADA

Con el fin de determinar la preferencia del consumidor por alguna de las dos formulaciones se realizó una prueba de preferencia la cual dio como resultado que la bebida de formulación A, fue la más aceptada por el consumidor, los cuales se muestran en el anexo 3.

Utilizando las tablas del apéndice VII (Anzaldúa, 1994). Se localizó el número de jueces que intervinieron en la prueba y en las tablas se encuentra el número mínimo de respuestas coincidentes para que exista diferencia significativa. Para 60 jueces que fueron los que evaluaron las bebidas se tiene que el mínimo de jueces coincidentes debe ser mínimo de 39 con un nivel de probabilidad de 5%. Por lo tanto, si existe diferencia significativa al 5% entre la formulación A (15°Bx) y la formulación B (12°Bx), ya que 49 de los jueces prefirieron la bebida preparada con la formulación A.

Las características principales que presenta la formulación A que fue la más aceptada por el consumidor se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 8.- Principales características sensoriales de la bebida.

| Característica sensorial de la formulación seleccionada | FORMULACIÓN A (BENEO-Raftilose) |
|--|---|
| Color | Naranja intenso |
| Olor | Característico a las bebidas sabor naranja |
| Sabor | Ligeramente dulce, con notas cítricas sabor naranja. |
| Aspecto | No presenta cuerpos extraños, ni sedimentación de partículas. |
| Consistencia | Líquida y homogénea |

6.3. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA BEBIDA

6.3.1. Determinación de Sólidos totales

El porcentaje de sólidos totales de la bebida que se realizó al inicio y al final del periodo de almacenamiento durante 5 semanas no sufrió un cambio significativo ya que los

valores obtenidos fueron de 9.5 y 9.8% de sólidos totales al inicio y al final del almacenamiento respectivamente.

El porcentaje de sólidos totales de la muestra no sufrió un cambio considerable en un periodo de aproximadamente 5 semanas, por lo cual la muestra se mantiene con un porcentaje de sólidos totales aproximadamente de 9.7%, para su caracterización como bebida.

6.3.1. Determinación de Humedad

El porcentaje de humedad obtenido en la bebida al inicio y al final de almacenamiento a una temperatura de 4°C, fue de 90.5 y 90.2 respectivamente lo cual nos indica que no existe una pérdida significativa de humedad de la bebida durante este periodo (30 días).

6.3.2. Sólidos solubles (°Brix)

Los grados Brix es un índice de suma importancia en la evaluación de bebidas porque son indicadores de fermentación, que causa la pérdida del producto cuando el tratamiento térmico o el envasado se realizan de una forma incorrecta.

De las dos formulaciones elaboradas, se eligió la bebida que se llevo a 15°Bx, ya que fue la que más agrado durante el análisis sensorial.

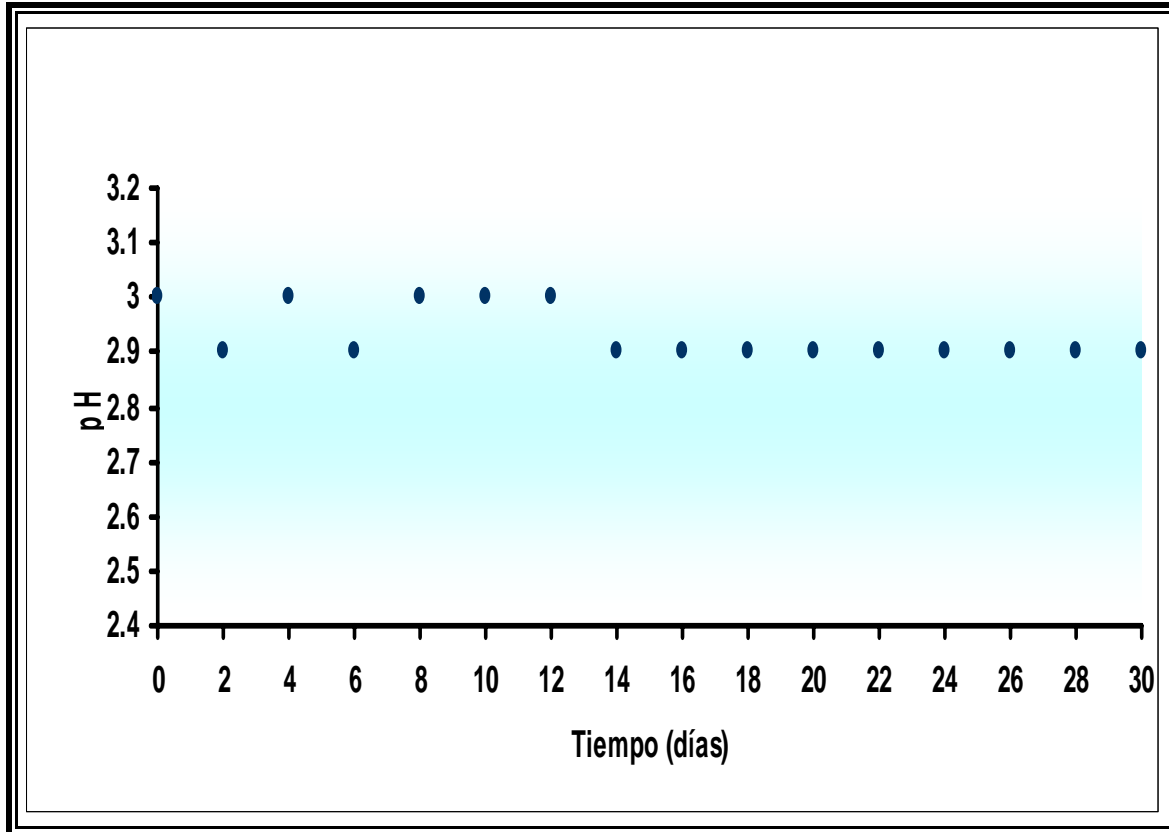
El comportamiento de sólidos solubles que tuvo la bebida durante el primer mes de almacenamiento, se mantuvo estable, manteniendo un valor final de 15°Bx

6.3.3. Determinación del pH

El pH es un elemento muy importante en la conservación de bebidas líquidas, ya que de este depende el desarrollo de bacterias, hongos, levaduras y mohos. El pH de esta bebida al momento de prepararla, fue de alrededor de 3, condición que no facilita el desarrollo de microorganismos.

En la gráfica 2 se muestran los resultados obtenidos en el monitoreo del pH durante el periodo de almacenamiento.

Gráfica 2. Comportamiento del pH de la bebida en almacenamiento.



En la gráfica, se puede apreciar, que el comportamiento del pH en la bebida se desestabilizó al principio del período de tiempo en el cual se realizaron las pruebas de análisis, pero después de esta inestabilidad, el pH comienza a mantenerse de nuevo dentro del intervalo de pH de 3-2.8, esta mínima variación de datos se debe a la inestabilidad de la emulsión al principio del período de almacenamiento.

Por lo tanto, el prebiótico FOS, es estable a pH ácidos, por lo cual no se involucra en el deterioro químico de la bebida, ya que esta al paso de un período de tiempo sigue conservando sus propiedades como al inicio de su elaboración.

6.3.4. Acidez titulable

La acidez titulable se basa en la cantidad de ácidos que contenga la bebida, esta se determinó tomando en cuenta la medición de ácido cítrico.

El porcentaje de acidez obtenido en la bebida fue muy bajo (0.32%), lo que indica que el comportamiento de el ácido cítrico en la bebida no influye en las características esenciales de esta.

El comportamiento de la acidez durante el primer mes de almacenamiento fue estable, por lo tanto, esta mantiene sus propiedades en sabor, color, aroma en el período establecido. En las pruebas anteriores (°Bx, pH y acidez) no se realizó un análisis estadístico para conocer si entre los datos se encontraba una diferencia significativa, ya que a simple vista se aprecia que los datos obtenidos en la medición de p.H, acidez total y °Bx son muy parecidos entre sí para determinar su nivel de significancia.

6.3.5. Determinación de cenizas

El análisis de cenizas se determinó en el tiempo inicial y en el tiempo final del periodo de almacenamiento (30 días) a 4°C, cuyos valores obtenidos fueron de 0.125 y 0.12% respectivamente. Teniendo en cuenta que la determinación se hizo por duplicado, y los resultados que se presentan son las medias de estos, por lo tanto podemos decir que la bebida es estable, ya que no existe un cambio en la cantidad de materia inorgánica contenida en la bebida.

Es importante saber que cantidad de cenizas tiene el alimento por su participación en algunas funciones del organismo como dar rigidez al esqueleto, suministran el material para la acidez o alcalinidad de los jugos gástricos y otras secreciones.

6.3.6. Determinación de fibra total

Esta determinación se realizó al inicio y al final del almacenamiento a 4°C, para observar si existe alguna influencia del almacenamiento de la bebida en cuanto al cambio de contenido de fibra de la bebida obteniendo un valor inicial de 2.5 y de 2.4 % al final, por lo tanto el periodo de almacenamiento no afecta el contenido de fibra de la bebida.

Con base a este valor de fibra y a la NOM-086-SSA1-1994, se puede decir que la bebida cumple con las especificaciones de contenido de fibra.

En el cuadro 14 se presenta la caracterización física de la bebida saborizada en función de algunas de sus propiedades, como son los sólidos solubles, el pH, el contenido de grasa y proteína que como podemos observar su valor no es significativo, ya que los ingredientes utilizados no aportan gran cantidad de grasa ni de proteína.

Cuadro 9.- Caracterización física de la bebida.

| Característica formulación | % |
|-----------------------------------|----------|
| A | |
| Ceniza | 0.125 |
| pH | 3 |
| Sólidos Solubles (°Bx) | 15 |
| Humedad | 90.3 |
| Sólidos totales | 9.7 |
| Fibra total | 2.5 |

6.4. CALIDAD SANITARIA

Como se mencionó anteriormente, la calidad sanitaria de la bebida se evaluó con la determinación de bacterias coliformes y la determinación de organismos mesofílicos aerobios (OMA's) utilizando placas petrifilm_{MR} y haciendo el recuento de colonias de cada placa. En el cuadro 15 se muestran los resultados obtenidos de estas determinaciones.

Cabe mencionar que estas determinaciones se realizaron cada 5 días durante 30 días a la bebida almacenada a 4°C.

Cuadro 10. Resultados de la evaluación de la calidad sanitaria de la bebida en almacenamiento.

| Tiempo (días) | | Dilución | Organismos mesofílicos UFC/ml de bacterias aerobias en placas petrifilm _{MR} incubadas a 35°C+1°C por 48h | Organismos coliformes en placas petrifilm _{MR} para recuento de coliformes Totales incubadas a 35°C+1°C por 48h. |
|---|----|------------------|--|---|
| T ₀ | 0 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| T ₁ | 5 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| T ₂ | 10 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| T ₃ | 15 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| T ₄ | 20 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| T ₅ | 25 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| T ₆ | 30 | 10 ⁻¹ | <100c | <100c |
| Límite establecido por PROY-NOM-218- SSA1/SCFI-2002 | | | 50 | 10 |

Como se observa en el cuadro 15 todas las muestras en periodo de almacenamiento no muestran una variación en cuanto al contenido de mesofílicos aerobios y coliformes totales, manteniéndose constantes para ambos (<100c), durante todo el periodo, lo que nos indica que la bebida es estable a estas condiciones de almacenamiento, ya que no presentan ninguna alteración microbiológica y por tal motivo cumple con lo especificado en el PROY-NOM-218-SSA1/SCFI-2002.

6.5. ANÁLISIS SENSORIAL DE LA BEBIDA SABORIZADA DURANTE EL PERIODO DE ALMACENAMIENTO.

Esta evaluación se realizó con el fin de conocer si entre las dos bebidas hay una diferencia significativa al inicio y al final del almacenamiento, se realizó una prueba de comparación pareada simple a un nivel de probabilidad de 0.05, la cual dio como resultado que no existe diferencia significativa entre las dos bebidas, ya que el valor total de respuestas correctas es menor del 50%. Por lo tanto podemos decir que en almacenamiento la bebida no pierde sus características organolépticas. En el anexo se muestran los resultados de esta prueba.

7. CONCLUSIONES

-
- El microorganismo utilizado cumple con el requisito de viabilidad al presentar recuentos mayores de 1×10^6 .
 - Los prebióticos como la inulina, los fructooligosacáridos y los isomaltooligosacáridos, estimulan el crecimiento de *Lactobacillus*, ya que estos fungen como sustrato de las bacterias probióticas por ser fuente de carbono.
 - El crecimiento de *Lactobacillus* en presencia de Beneo-Raftilose (FOS prebiótico de presentación comercial) es considerablemente el mejor en cuanto al tiempo de duplicación de esta bacteria.
 - Las pruebas físicas y químicas realizadas al producto muestran la estabilidad del mismo, ya que sin cambios en el p.H, ácidos total y °Bx demuestran que la bebida no ha sido modificada por algún microorganismo o en su caso por la intervención del prebiótico como principal ingrediente en su formulación.
 - El contenido de fibra en la bebida alcanzó los límites permisibles por la norma NOM-086-SSA1-1994, que establece que el contenido mínimo de una bebida adicionada con fibra es de 2.5, por lo tanto nuestra bebida cumple con este requerimiento, ya que durante el periodo de almacenamiento no sufre ningún cambio.

8. RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO FUTURO

Las recomendaciones propuestas para el seguimiento del proyecto son las siguientes:

- Crear una conciencia social más amplia en lo que respecta a los efectos fisiológicos durante el consumo regular de alimentos que contengan prebióticos.
- Validar el efecto bifidogénico suministrando a individuos adultos una dieta controlada con las dosis recomendadas de los prebióticos, verificando que estos hallan modificado significativamente la composición de la microbiota fecal.

9. BIBLIOGRAFIA

-
- Alvidrez A; González M; Jiménez Z; 2002; Salud Pública y Nutrición RESPYN. Vol. 4 No. 3.
 - Anzaldúa Morales, A; 1994; La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.
 - Arai S. Studies on functional foods in Japan. State of the art. Biosci. Biotech. Biochem. 1996, 60; 9-15.
 - Ashwell M. Concepts of functional foods. ILSI Europe concise monograph series. Brussels: ILSI Europe, 2002.
 - Brennan, J; Butters, J; Cowell, N; Lilly, A. 1980, Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Segunda edición. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.
 - Cagigas A, Anesto J; Prebióticos y probióticos una relación beneficiosa; Revista Cubana Alimentent Nutr; 200,16(1);63-68
 - Calixto S; Cambrodon G;.2002. Fibra dietética en la cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional.
 - Coudray C; Bellanger J; Vermorel M; et al. Two polyol, low digestible carbohydrates improve the apparent absorption of magnesium but not of calcium in healthy young men; J Nutrition; 2003;133;90-93.
 - Cherbut, C.; Barry, J.L.; Lairon, D. y Durand, M. Dietary fiber mechanisms of action in human physiology and metabolism. John Libbey Eurotext, France, 1995.
 - Cummings Jh, Macfarlane GT Y Englyst HN: Prebiotic digestión and fermentation. Am J Clin Nutr, 2001, 73 (2 Suppl): 415S-420S.
 - Delzenne N; Kok N; Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models; J Nutrition; 1999; 129;1467-1470.
 - Desai A.R., Powell I.B., Shah N.P. 2004. Survival and activity of Probiotic Lactobacilli in skim milk containing prebiotics. J. of Food Science. 69,(3): FMS57-FMS60
 - Desrosier, N. 1983. Elementos de tecnología de alimentos. 6ta impresión. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V., México, D.F.
 - Diario de la Seguridad Alimentaria; 2004; Alimentos Funcionales; CONSUMER Eroski; 13776.
 - Gibson, G.R. & Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiots: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 1995; 125: 1401-1412.
 - Jie Z, Bang-Yao L, Ming-Jie X, Hai-Wei L, Zu-Kang Z, TingSong W y Craing SA: Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. Am J clin Nutr; 2000, 72:1503-1509.

-
- Kim M; Shin H, The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats J. Nutrition, 1998;128;1731-1736.
 - Kohmotot T; Tsuji K; Kaneko T; Shota M; Fukui F; Takaju H; Nakawa Y; Ichikawa T; Kobayaohi S; Metabolism of ¹³C-isomalto-oligosaccharides in healthy men; Bioscience Biotechnology 1992;56;937-940.
 - Kritchevsky, D. y Bondfield, C, Dietary fiber in health and disease. Eagan Press, Minnesota; 1995.
 - Kruger M; brown K; Collet G; Layton L; Schollum L; The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat, Exp Biol Med; 2003;228;683-688.
 - Lajolo, F..M.; Saura-Calixto, F.; de Penna, E. W. y de Menezes, E. W; 2001 Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Livraria Varela, São Paulo.
 - López MG, Mancilla NA, Mendoza G; Molecular structure of fructans from Agave tequila Weber var. azul. J. Agric Food Chem 2003,51;7835-7840.
 - Mckellar, R.C, Molder, H.W. y Mullin, J.; Bifidobacteria and microflora, (1993; 12; 75-86.
 - Mazza G; 2000; Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado. Acribia; Zaragoza, España.
 - Método de la AOAC: 44-10; 1983. Determinación de Humedad.
 - Método de la AOAC 925.23 del AOAC. Determinación de sólidos totales.
 - Nilsson U; Bjorck I; Availability of cereal fructans and inulin in the rat intestinal tract; J Nutrition; 1998;118;1482-1486.
 - NOM-086-SSA1-1994 Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificación en su composición. Especificaciones nutrimentales.
 - NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
 - NOM-112-SSA1-1994 Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
 - NOM-113-SSA1-1994 Método para la cuenta de organismos coliformes totales en placa.
 - NOM-120-SSA1-1994 Prácticas de Higiene y Sanidad para el Proceso de Alimentos, Bebidas no Alcohólicas y Alcohólicas
 - NOM-F-102-S. Alimentos para humanos. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas.

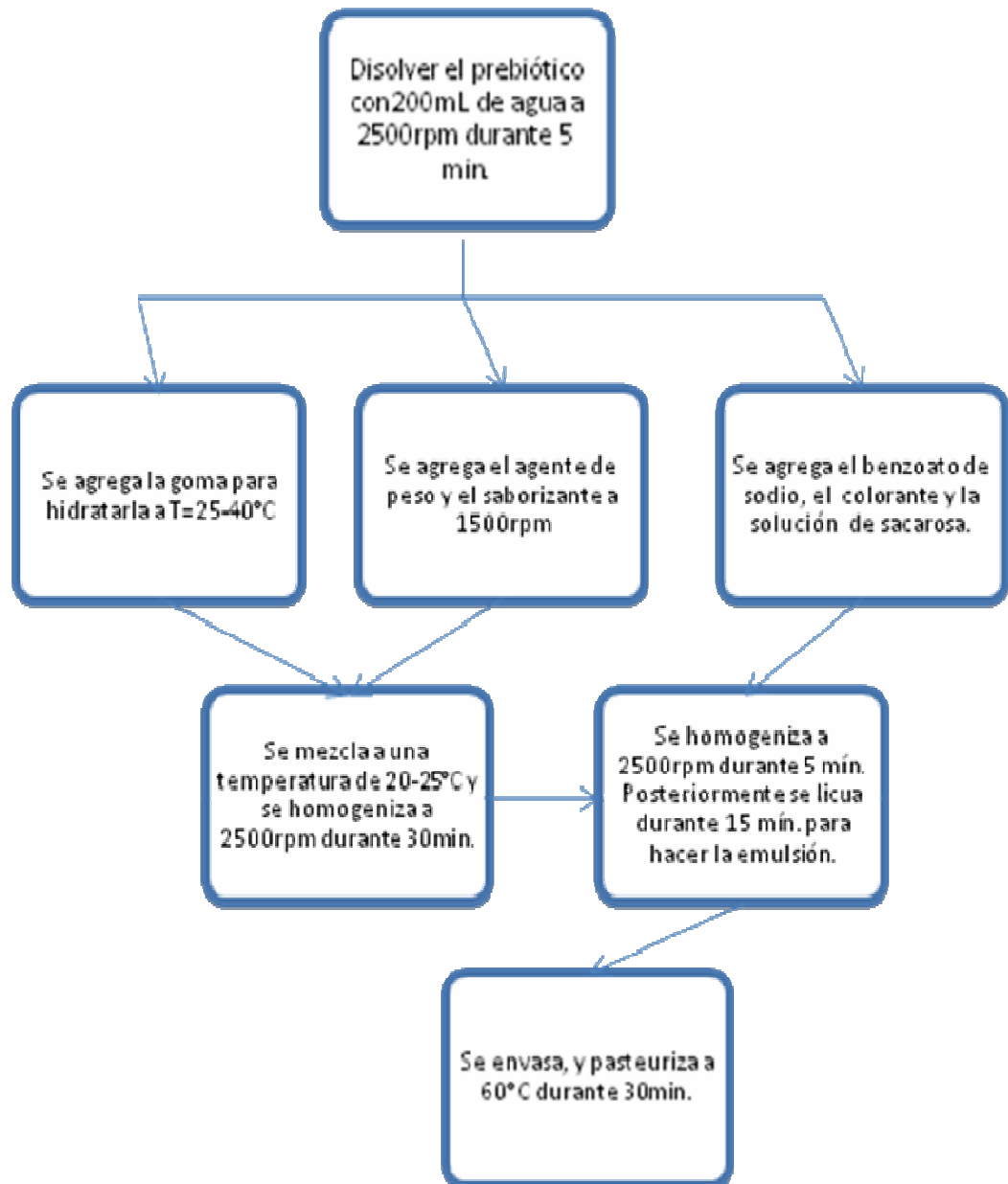
-
- NOM-F-619-NORMEX-2006 Alimentos Determinación de densidad relativa en bebidas no alcohólicas-Método de prueba.
 - NMX-F-66-S-1978. Método para la determinación de cenizas en alimentos.
 - NMX-F-103. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de Grados Brix.
 - NMX-F-317-S. Alimentos para humanos. Determinación de pH. (Determinación de pH en alimentos).
 - Ortiz G.M; Acatitla V.A; Mora E.R; Hernández S; Elaboración de una leche fermentada simbiótica con inulina como prebiótico; Carnilac, Alfa Editores Técnicos; 2006;21;6;19-29.
 - Oyofó B.A; Droleskey R.E; Norman J.O; Mollenhauer h.h; Ziprin R.L; Corrier D.E Y Deloach J.R; 1998. *Poult. Sci.* 68: 1351-1356.
 - Pedrero D.L; Pangborn R.M; 1989; Evaluación sensorial de los alimentos Métodos Analíticos; Editorial Alambra Mexicana; México; páginas: 103-107
 - Potter, N. 1978. La ciencia de los alimentos. HARLA. México, D.F. México. P 749.
 - PROY-NOM-218-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Bebidas no alcohólicas, sus congelados y productos concentrados para prepararlas. Especificaciones Sanitarias.
 - Quemener B; J.f. Thibault; Determination of inulin and oligofructose in foods products and integration in the AOAC method for measurement of total dietary fiber; *Lebensm Wiss. Technol.*, P. Coussement 1994,27,125-132.
 - Ranken, M. 1993. Manual de industrial de los alimentos. Segunda edición. Editorial ACRIBIA, Zaragoza, España. Pag. 671
 - Rao C.V; Sanders M.E; Indranie C; Simiv; Ready V.S; Prevention of colonic preneoplastic lesions by the probiotics *Lactobacillus acidophilus*; *NCSMTM IN S344-rad*, *Ind. J. Onscold.* 1999; 5:939-44.
 - Roberfroid MB. 2000. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(6): 1669S-1664S.
 - Roberfroid, M.B., 2000. Prebiotics And Probiotics: Are They Functional Foods?. *Am. J. Clin. Nut.* 71 (6):1682 S-1687S.
 - Rodríguez E; Ingredientes para bebidas; Alfa Editores; 2006,15,4,35-40.
 - Roethenbaugh Gary; 2005; artículo publicado por Zenith Internacional.
 - Rowland I; Rumemey C; Cotts J; Lievense L; Effects of *bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats; *Carcinogenesis*; 1998;19;281-285.
 - Shandong Y; 2005; Technology Isomaltooligosaccharide Biotechnology Co., Lozhoubio_chem®

-
- Taper H; Delzene N; Roberfroid M; Growth Inhibition of transplantable mouse tumors by non-digestible carbohydrates; *Int J Cancer*; 1997;71;1109-1112.
 - Van J, Cummings J, Delzenne N et al. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr* 1999;81:121-132.
 - Van J, Franck A, Roberfroid M. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides. *Br J Nutr* 1999;82(4):329.
 - Wang J, Sporns P, Low N; Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS; quantification of fructooligosaccharides; *J Agric Food Chem* 1999;120;351-359.
 - Williams CM y Jackson KG: Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. *Br J Nutr*, 2002, 87 Suppl 2:261-264.
 - Yamashita K, Kawai K, Itakura M. Effect of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutr Res* 1984;4:961-6.

OTRAS FUENTES:

- ©BioNeutra Inc, BIONEUTRA Natural Health products, [en línea]; E.U.A; [2006], disponible en URL <http://www.bioneutra.com>, acceso 30 de marzo 2007.
- Glucidos: disacáridos disponible URL <http://www.biologia.oligosacáridos.com>, [acceso 30 de Marzo 2007].
- Healthnotes, Inc. Copyright ©; Fructo-oligosaccharides (FOS) and Other Oligosaccharides; [2004] disponible en URL <http://www.knox.com/healthnotes.com>; [acceso 30 de marzo del 2007].
- Ismaltooligasaccharides-products IMO-500 www.blog.china.alibaba.com, [acceso 30 de marzo 2007].
- ORAFTI S.A, products Beneo™ Raftiline®, Chile, disponible en URL <http://www.orafti.com> [acceso 26 de Marzo 2007].
- Sector alimenticio; Inulina; [2006-02-01]; disponible en URL <http://www.quiminet.com>, [acceso 19 de marzo 2007].
- The Coca-Cola Company, [2006] Todos los derechos reservados; The Beverage Institute for Health & Wellness; acceso URL <http://www.beverageinstitute.org>, [acceso 19 Marzo 2006].
- NORMA Oficial Mexicana NOM-116-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa.

DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DE LA BEBIDA PREBIÓTICA



La única diferencia entre la formulación A y la formulación B es la concentración de sacarosa contenida en cada una para la formulación A se utilizó una solución de sacarosa al 15% y para la formulación B se utilizó una solución de sacarosa al 10%.

Hoja de respuestas presentada a los evaluadores para la prueba de preferencia.

Nombre: _____
 Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Por favor prueba las dos muestras que se le presentan. Primero pruebe la muestra marcada con _____, enjuáguese y después pruebe la muestra marcada con _____.

INDIQUE CUAL DE LAS DOS MUESTRAS PREFIERE USTED.

Prefiero la muestra: _____

Comentarios:

MUCHAS GRACIAS

Hoja de respuestas presentada a los evaluadores para la prueba discriminativa.

Nombre: _____
 Fecha: _____

INSTRUCCIONES: Pruebe las dos muestras que se le presentan primero la muestra marcada con XXXX y después la muestra marcada con YYYY y enjuáguese la boca entre cada muestra. Indique si son iguales o diferentes:

| Muestras | | Diferentes | Iguales |
|----------|------|------------|---------|
| XXXX | YYYY | | |

En que característica encuentra iguales o diferentes las muestras:

 _____.

Cuadro A. Resultados de la prueba de preferencia de la formulación A y formulación B.

| N° de Jueces | Formulación A | Formulación B | N° de jueces | Formulación A | Formulación B |
|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| 1 | 1 | 0 | 31 | 1 | 0 |
| 2 | 1 | 0 | 32 | 1 | 0 |
| 3 | 1 | 0 | 33 | 1 | 0 |
| 4 | 1 | 0 | 34 | 1 | 0 |
| 5 | 0 | 1 | 35 | 0 | 1 |
| 6 | 1 | 0 | 36 | 0 | 1 |
| 7 | 1 | 0 | 37 | 0 | 1 |
| 8 | 1 | 0 | 38 | 1 | 0 |
| 9 | 1 | 0 | 39 | 1 | 0 |
| 10 | 1 | 0 | 40 | 1 | 0 |
| 11 | 1 | 0 | 41 | 0 | 1 |
| 12 | 1 | 0 | 42 | 0 | 1 |
| 13 | 1 | 0 | 43 | 0 | 1 |
| 14 | 1 | 0 | 44 | 0 | 1 |
| 15 | 1 | 0 | 45 | 0 | 1 |
| 16 | 1 | 0 | 46 | 1 | 0 |
| 17 | 1 | 0 | 47 | 1 | 0 |
| 18 | 1 | 0 | 48 | 1 | 0 |
| 19 | 1 | 0 | 49 | 1 | 0 |
| 20 | 1 | 0 | 50 | 1 | 0 |
| 21 | 1 | 0 | 51 | 1 | 0 |
| 22 | 1 | 0 | 52 | 1 | 0 |
| 23 | 1 | 0 | 53 | 1 | 0 |
| 24 | 1 | 0 | 54 | 1 | 0 |
| 25 | 1 | 0 | 55 | 1 | 0 |
| 26 | 1 | 0 | 56 | 1 | 0 |
| 27 | 1 | 0 | 57 | 1 | 0 |
| 28 | 1 | 0 | 58 | 1 | 0 |
| 29 | 1 | 0 | 59 | 0 | 1 |
| 30 | 0 | 1 | 60 | 1 | 0 |
| | | | PREFERENCIAS | 49 | 11 |

Cuadro B. Resultados de la prueba discriminativa.

| N° de juez | arreglo de muestras | | Núm. De respuestas correctas | N° de juez | arreglo de muestras | | Núm. De respuestas correctas |
|------------|---------------------|---|------------------------------|-------------------------------|---------------------|----|------------------------------|
| | A | B | | | A | B | |
| 1 | A | B | 0 | 32 | B | A | 0 |
| 2 | A | A | 1 | 33 | A | B | 0 |
| 3 | B | B | 1 | 34 | A | A | 1 |
| 4 | B | A | 0 | 35 | B | B | 1 |
| 5 | A | B | 0 | 36 | B | A | 0 |
| 6 | A | A | 1 | 37 | A | B | 0 |
| 7 | B | B | 1 | 38 | A | A | 1 |
| 8 | B | A | 0 | 39 | B | B | 0 |
| 9 | A | B | 0 | 40 | B | A | 0 |
| 10 | A | A | 1 | 41 | A | B | 0 |
| 11 | B | B | 1 | 42 | A | A | 1 |
| 12 | B | A | 0 | 43 | B | B | 1 |
| 13 | A | B | 0 | 44 | B | A | 0 |
| 14 | A | A | 1 | 45 | A | B | 1 |
| 15 | B | B | 1 | 46 | A | A | 1 |
| 16 | B | A | 0 | 47 | B | B | 0 |
| 17 | A | B | 0 | 48 | B | A | 0 |
| 18 | A | A | 0 | 49 | A | B | 0 |
| 19 | B | B | 0 | 50 | A | A | 1 |
| 20 | B | A | 0 | 51 | B | B | 1 |
| 21 | A | B | 0 | 52 | B | A | 0 |
| 22 | A | A | 1 | 53 | A | B | 0 |
| 23 | B | B | 1 | 54 | A | A | 1 |
| 24 | B | A | 0 | 55 | B | B | 1 |
| 25 | A | B | 0 | 56 | B | A | 0 |
| 26 | A | A | 1 | 57 | A | B | 0 |
| 27 | B | B | 1 | 58 | A | A | 1 |
| 28 | B | A | 0 | 59 | B | B | 1 |
| 29 | A | B | 0 | 60 | B | A | 0 |
| 30 | A | A | 1 | Total de respuestas correctas | | 26 | |
| 31 | B | B | 0 | | | | |

* Cada respuesta correcta equivale a 1; cada respuesta incorrecta equivale a 0

PROCEDIMIENTO Y REACTIVOS DE LOS MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.

Sólidos totales.

- Colocar en una charola de aluminio de 2 a 3 mL de muestra y pesarlos
- Colocar en una estufa a 100°C hasta peso constante.
- Pesar y determinar los sólidos totales en la muestra.

Sólidos solubles (°Brix)

- Calibrar el refractómetro de Abbe, con una gota de agua ya que esta corresponde a 0% de sólidos solubles.
- Colocar una gota de la muestra en el refractómetro medir los °Bx.
- Lavar con agua destilada.

Humedad.

- Colocar la cápsula en una cama de arena previamente limpia y calcinada en l mufla
- Pesar la cápsula y agregar 5mL de la muestra
- Colocar la cápsula en una parrilla de calentamiento y evaporar al máximo
- Introducir la cápsula a la estufa hasta alcanzar el peso constante, en t=5h aproximadamente.
- Sacar la cápsula y colocarla en el desecador y dejar reposar
- Pesar la muestra y realizar los cálculos de determinación de humedad

ANÁLISIS QUÍMICOS.

p.H

- Reactivos
 - Solución reguladora de pH 4
 - Solución reguladora de pH 7
- Calibrar el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4 y pH 7
- Homogenizar la muestra
- Sumergir el electrodo en la muestra de manera que los cubra perfectamente
- Hacer la medición de pH.
- Sacar el electrodo y lavarlo con agua.

Acidez titulable

- Reactivos

- Solución 0.1N de hidróxido de sodio.
- Fenolftaleína
- Colocar aproximadamente 20mL de la muestra en un vaso de precipitados
- Adicionar 2 gotas de fenolftaleína
- Titular la muestra con la solución de NaOH 0.1N hasta aparecer un color rosa claro por 10s.
- Anotar los mL gastados en la titulación
- Calcular el % de acidez titulable en ácido cítrico.

Análisis de cenizas

- Colocar a peso constante el crisol, colocándolo en la mufla a 550°C durante media hora.
- Sacar el crisol y dejarlo enfriar en un desecador
- Pasar el crisol vacío en una balanza analítica, agregar aproximadamente un mililitro de muestra y volver a pesar
- Incinerar la muestra con el mechero evitando que se incendie.
- Cuando la muestra esté completamente incinerada, pasar el crisol a la mufla y dejar durante una hora y media a 550°C.
- Transcurrido este tiempo, sacar el crisol con las pinzas, dejar enfriar dentro del desecador y pesar.
- Calcular % de cenizas en la bebida.

Determinación de fibra dietética.

- Caliente las hornillas. Estas deben estar calientes cuando los vasos de 600mL se coloquen sobre ellas.
- Transfiera 2mL de la muestra en cada vaso alto.
- Agregue 200 ml de ácido sulfúrico al 1,25 % hirviendo e inmediatamente colocarlo en la hornilla. Hierva exactamente por 30 minutos.
- Filtre la solución caliente a través del papel de filtro. Lave con agua hirviendo varias veces con porciones de 50 ml cada vez, hasta que el agua de lavado no tenga reacción ácida. Filtre con succión.
- Regresar el residuo con mucho cuidado a su vaso original utilizando el frasco lavador, conteniendo 200 ml de NaOH al 1,25 % hirviendo. Hierva durante 30 minutos.

- Retirar de la hornilla, filtrar inmediatamente sobre crisol Gooch. Lavar el residuo con agua hirviendo, hasta la eliminación del hidróxido de sodio en el filtrado, y lavar finalmente con pequeñas porciones de alcohol.
- Llevar el residuo a la estufa y secar a 105 ° C por espacio de 2 horas. Enfriar y pesar.
- Coloque en la mufla a 500-600° C hasta que el contenido sea de color blanco (aproximadamente una hora).

ANALISIS MICROBIOLÓGICOS.

Agua peptonada

- Disolver 1 gramo de peptona de caseína por un litro de agua destilada
- Distribuir en porciones de 90 o en volúmenes múltiplos de 9 según se requiera.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- Almacenar a una temperatura de 4°C±1°C por un tiempo no mayor a un mes.

Determinación de Organismos Mesofílicos Aerobios (OMA's)

- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana.
- Levantar la lámina semitransparente superior.
- Colocar 1mL de la dilución 10⁻¹ en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución.
- Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispersor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.
- Presionar suavemente el dispersador para distribuir la muestra.
- Esperar 1min aprox. para que solidifique el gel.
- Incubar las placas cara arriba, a 35±1°C durante 48h
- Transcurrido este tiempo, contar las colonias y expresar los resultados.

Determinación de microorganismos Coliformes totales.

- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana.
- Levantar la lámina semitransparente superior.
- Colocar 1mL de la dilución 10⁻¹ en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución.

ANEXO 4.

- Con el lado rugoso hacia abajo, coloque el dispersor sobre la película superior, cubriendo totalmente la muestra.
- Presionar suavemente el dispersador para distribuir la muestra.
- Esperar 1min aprox. para que solidifique el gel.
- Incubar las placas cara arriba, a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48h.
- Transcurrido el tiempo, contar las colonias y expresar resultados.