



**Efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad  
microbiológica de un yogurt natural**

Llumiquina Guamán, Pamela Karina

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Mgs. Larrea Cedeño, Gabriel Alejandro

25 de Enero del 2022



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería Agropecuaria**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación, **“Efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad microbiológica de un yogurt natural”** fue realizado por la señorita **Llumiyinga Guamán, Pamela Karina**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Sangolquí, 25 de enero de 2022**

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**GABRIEL  
ALEJANDRO LARREA  
CEDENO**

**Larrea Cedeño, Gabriel Alejandro**

C. C. 1709635039



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería Agropecuaria**

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Llumiyinga Guamán, Pamela Karina** con cédula de ciudadanía n° 1722812607, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad microbiológica de un yogurt natural** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 25 de enero de 2022

Firma:

*Pame Kari*  
.....

**Llumiyinga Guamán, Pamela Karina**

C.C.:1722812607



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería Agropecuaria**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Llumiyinga Guamán, Pamela Karina**, con cédula de ciudadanía n° 1722812607, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad microbiológica de un yogurt natural** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 25 de enero de 2022

Firma:

*Pame Kari*

**Llumiyinga Guamán, Pamela Karina**

C.C.:1722812607

## Reporte de verificación de similitud de contenidos




PERFIL TESIS PARA ANALISIS COPYLEAKS -LLUMIQUINGA P.d...

Scanned on: 14:3 January 24, 2022 UTC



Identical Words	19
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	0
Ommited Words	1629

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**GABRIEL  
ALEJANDRO LARREA  
CEDENO**

**Larrea Cedeño, Gabriel Alejandro**

DIRECTOR

## Dedicatoria

*Con todo el amor de mi corazón dedico este trabajo a:*

*A mi madre, por haber recorrido este largo viaje conmigo brindándome siempre su apoyo y amor incondicional, sus consejos y ánimos fueron parte fundamental para la culminación de esta hermosa etapa.*

*A mi padre, quien con sus valores y paciencia me ayudaron a superar todas las adversidades y me enseñaron a su vez a seguir siempre el camino correcto con responsabilidad y firmeza.*

*A mi hermano Jairo, que a lo largo de mi trayectoria estudiantil ha sido mi ejemplo a seguir, por su bondad, cariño e incondicionalidad.*

*A María Luisa Moreno, quien ha depositado siempre su confianza en mi y en el cumplimiento de todos mis propósitos.*

*A mi hermana Samantha, esperando que mi trayectoria le inspire en un futuro a cumplir sus metas.*

Pamela Llumiyinga Guamán.

## **Agradecimientos**

Terminar este proyecto no ha sido una obra fácil, por ello detallo a continuación mis más sinceros agradecimientos a:

Mi tutor, el Mgs. Gabriel Larrea quien estuvo dispuesto desde el primer instante en apoyarme en el desarrollo de mi trabajo de titulación, por su sabiduría y confianza depositadas en mi al disponer totalmente para mi uso el laboratorio de Poscosecha.

A la Ing. Ariana Drouet y al Dr. Darwin Rueda, quienes me abrieron amablemente las puertas del laboratorio de Agrobiotecnología y me capacitaron de inicio a fin en la consecuencia de este proyecto.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y al IASA I, que son y serán siempre el pilar de mi formación académica y personal, en donde conocí a entrañables amigos y profesores que supieron guiarme con sus conocimientos y perseverancia.

**Pamela Llumiyinga Guamán.**

## Índice de contenidos

<b>Carátula.....</b>	<b>1</b>
<b>Certificación.....</b>	<b>2</b>
<b>Responsabilidad de Autoría .....</b>	<b>3</b>
<b>Autorización de Publicación .....</b>	<b>4</b>
<b>Reporte de verificación de similitud de contenidos .....</b>	<b>5</b>
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>6</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>7</b>
<b>Índice de tablas .....</b>	<b>12</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>13</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>15</b>
<b>Capítulo I.....</b>	<b>16</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>16</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>16</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>19</b>



Objetivos Específicos .....	19
Hipótesis .....	19
<b>Capítulo II.....</b>	<b>20</b>
<b>Marco Referencial .....</b>	<b>20</b>
<b>El yogurt .....</b>	<b>20</b>
Clasificación del yogurt .....	20
Beneficios del yogurt .....	22
<b>Fermentación láctica.....</b>	<b>23</b>
Bacterias ácido-lácticas .....	23
<b>Miel de Abejas .....</b>	<b>24</b>
Características nutricionales de la miel.....	25
Clasificación de la miel de abeja.....	25
Usos de la miel.....	26
<b>El Polen .....</b>	<b>27</b>
Composición química del polen.....	27
Propiedades del polen en la salud humana .....	28
<b>Focus Group.....</b>	<b>28</b>
El Focus Group en la introducción de productos alimenticios al mercado.....	29
<b>Análisis Microbiológico en Alimentos .....</b>	<b>30</b>
Placas Petrifilm 3M .....	30
Requisitos microbiológicos del yogurt .....	30

<b>Capítulo III.....</b>	<b>32</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>32</b>
Ubicación del área de investigación .....	32
Establecimiento del proyecto .....	33
Preparación del yogurt.....	34
Preparación del cultivo láctico madre .....	34
Producción de ácido láctico .....	36
Calidad microbiológica .....	36
Identificación de <i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , Mohos y levaduras.....	39
Aceptabilidad comercial del yogurt con polen y miel.....	41
Análisis estadístico.....	43
<b>Capítulo IV.....</b>	<b>44</b>
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>44</b>
Producción de ácido láctico .....	44
Calidad microbiológica .....	49
Recuento de mohos y levaduras .....	49
Recuento de <i>Escherichia coli</i> .....	51
Recuento de <i>Staphilococcus aureus</i> .....	51
Aceptabilidad comercial .....	53

<b>Capítulo V.....</b>	<b>61</b>
<b>Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>61</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>63</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>64</b>

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Especificaciones de las leches fermentadas .....	20
<b>Tabla 2</b> Composición nutricional de la miel de abeja .....	25
<b>Tabla 3</b> Composición química del polen .....	27
<b>Tabla 4</b> Requisitos microbiológicos en yogurt.....	31
<b>Tabla 5</b> Descripción de los tratamientos .....	34
<b>Tabla 6</b> Condiciones de crecimiento para microorganismos en Placas Petrifilm 3M.....	37
<b>Tabla 7</b> Condiciones de crecimiento para microorganismos en Placas Petrifilm 3M.....	38
<b>Tabla 8</b> Media $\pm$ Desviación estándar de la producción de ácido láctico con siete tratamientos .....	44
<b>Tabla 9</b> Media $\pm$ Desviación estándar de la producción de ácido láctico con siete tratamientos al día 21.....	45
<b>Tabla 10</b> Modelos de regresión lineal de primer orden de la producción de ácido láctico vs el tiempo.....	45
<b>Tabla 11</b> Recuento microbiológico de Mohos y levaduras al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt.....	50
<b>Tabla 12</b> Recuento microbiológico de Escherichia coli al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt.....	51
<b>Tabla 13</b> Recuento microbiológico de Staphilococcus aureus al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt.....	52
<b>Tabla 14</b> Escala hedónica del yogurt con polen y miel .....	54

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Ubicación del Laboratorio de Agroindustrias y Agrobiotecnología .....	32
<b>Figura 2</b> Disposición del experimento en el laboratorio.....	33
<b>Figura 3</b> Flujograma para elaboración de yogurt con polen y miel .....	35
<b>Figura 4</b> Medición de ácido láctico .....	36
<b>Figura 5</b> Proceso de elaboración de diluciones seriadas de yogurt y siembra en Placas Petrifilm 3M .....	38
<b>Figura 6</b> Proceso de elaboración de diluciones seriadas de yogurt y siembra en medios selectivos y diferenciales .....	39
<b>Figura 7</b> Visualización de E. coli en Placas 3M Petrifilm™ .....	40
<b>Figura 8</b> Identificación de S. aureus en Placas 3M Petrifilm™ .....	40
<b>Figura 9</b> Reconocimiento de Mohos y levaduras en Placas 3M Petrifilm™ .....	41
<b>Figura 10</b> Evaluación de la aceptación de mercado del yogurt con polen y miel .....	42
<b>Figura 11</b> Producción de ácido láctico total respecto al tiempo del T4 y T7 .....	46
<b>Figura 12</b> Producción de ácido láctico total respecto al tiempo del T5 y T6 .....	47
<b>Figura 13</b> Resultados relevantes del recuento de mohos y levaduras en Placas Petrifilm 3M .....	50
<b>Figura 14</b> Resultados relevantes del recuento de S. aureus y E. coli en Placas Petrifilm 3M.....	52
<b>Figura 15</b> Características organolépticas del yogurt con polen y miel al día.....	55
<b>Figura 16</b> Características organolépticas del yogurt con polen y miel al día 21.....	56
<b>Figura 17</b> Evolución de las características organolépticas del tratamiento 5 .....	57
<b>Figura 18</b> Evolución de las características organolépticas del tratamiento 6 .....	58
<b>Figura 19</b> Evolución de las características organolépticas del tratamiento 7 .....	59

## Resumen

La presente investigación evaluó el efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad microbiológica de un yogurt natural incorporando. Se establecieron 7 tratamientos, los cuales fueron: T1: 0,5 % polen y 3% miel; T2: 0,5 % polen y 6 % miel; T3: 0,5 % polen y 9 % miel; T4: 1 % polen y 3 % miel; T5: 1 % polen y 6 % miel; T6: 1 % polen y 9 % miel; T7: 0 % polen y 0 % miel. Se analizó la producción de ácido láctico los 1, 7, 14 y 21 días después de la elaboración del yogurt. A los días 1 y 21 se identificó la presencia de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, mohos y levaduras. Adicionalmente se analizó el grado de aceptabilidad del yogurt al día 1 y 21. Los datos obtenidos para la producción de ácido láctico fueron analizados bajo un DCA con 3 repeticiones y se encontró diferencias entre tratamientos. Al día 21 el T4 y T7 presentaron la menor producción de ácido láctico (81 y 83 °D). En relación con el análisis microbiológico al día 1 se reportó presencia de colonias de mohos y *S. aureus* en T1 y T7. Las UFCs de levaduras se identificaron en los Tratamientos 1, 4 y 7 y con respecto a *E. coli* en todos los tratamientos se observó ausencia de este microorganismo. Por otro lado, en el grado de aceptabilidad del yogurt se halló preferencia por el T6 al día 1, sin embargo, al día 21 el tratamiento favorito fue el T7. En definitiva, se establece que la adición de polen y miel exhibió un efecto significativo entre tratamientos para la producción de ácido láctico, lo cual incidió directamente en las demás variables estudiadas.

**Palabras clave:** fermentación láctica, calidad microbiológica, miel, polen, yogurt.

### Abstract

The present investigation evaluated the effect of the addition of honey and bee pollen on the levels of lactic fermentation and the microbiological quality of a natural yogurt. 7 treatments were established, which were: T1: 0.5% pollen and 3% honey; T2: 0.5% pollen and 6% honey; T3: 0.5% pollen and 9% honey; T4: 1% pollen and 3% honey; T5: 1% pollen and 6% honey; T6: 1% pollen and 9% honey; T7: 0% pollen and 0% honey. Lactic acid production was analyzed 1, 7, 14 and 21 days after making the yogurt. On days 1 and 21, the presence of colony-forming units per gram (CFU/g) of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts was identified. Additionally, the degree of acceptability of the yogurt was analyzed on day 1 and 21. The data obtained for the production of lactic acid were analyzed under a DCA with 3 repetitions and differences were found between treatments. On day 21, T4 and T7 presented the lowest lactic acid production (81 and 83 °D). In relation to the microbiological analysis on day 1, the presence of colonies of mold and *S. aureus* was reported in T1 and T7. Yeast CFUs were identified in Treatments 1, 4 and 7 and, with respect to *E. coli*, in all treatments an absence of this microorganism was observed. On the other hand, in the degree of acceptability of the yogurt, preference was found for T6 on day 1, however, on day 21 the favorite treatment was T7. In short, it is established that the addition of pollen and honey exhibited a significant effect between treatments for the production of lactic acid, which directly affected the other variables studied.

**Keywords:** lactic acid fermentation, microbiological quality, honey, pollen, yogurt.

## Capítulo I

### Introducción

#### Antecedentes

En la actualidad, existe una predisposición a nivel mundial de consumir productos crecidamente nutritivos, inocuos y de precios asequibles. Por ello, muchos de los productos alimenticios han sido renovados mediante la adición de fibra, vitaminas y calcio, entre otros nutrimentos buscando siempre satisfacer las expectativas de los consumidores en cuanto a las tendencias de productos alimenticios saludables (Aguirre & Biollo, 2010; Albuja & Castro, 2002). En Ecuador usualmente es extraño hablar de alimentos nutraceuticos es por esto, que se quiere introducir este tema a través de un alimento distinguido como el yogurt.

El yogurt es calificado como un alimento estupendo, porque posee varias cualidades que benefician al bienestar del consumidor (Revilla, 2009). Se ha evidenciado que el yogurt tiene algunas propiedades ventajosas como: mejorar el sistema inmune y digestivo, y es de superior digestión que la leche, ya que el total de lactosa es mínima. Es por eso que, en comparación con la leche, el yogurt exhibe un valor nutricional más valioso (Rodríguez *et al.*, 2003; Hurtado, 2017).

Por otro lado, la miel de abejas es una sustancia de elevado valor energético por su excelente porcentaje de fructosa y glucosa, que merece ser consumida de manera directa o como edulcorante en la industria de los alimentos (Yapias & Bao, 2012). El consumo de miel de manera global varía según los diferentes países, así pues, se tiene que por habitante la cifra va de 250 g a 1.5 kg. En el caso de presentar una condición de salud buena, la miel incrementa el



rendimiento físico y contrarresta el cansancio intelectual así lo afirma Edmond Hillary, un apicultor que fue el primer hombre que escalo la cúspide del Everest (Prost, 2007).

Así mismo, el polen es otros de los productos de origen apícola de singular relevancia alimentaria, cuya ingesta se ha relacionado con los denominados biofármacos. El polen es un producto se puede consumir de diversas formas, de acuerdo con las preferencias del consumidor. De la misma forma, el empleo de este alimento se encuentra ligado al consumo de lácteos, como la leche, así como la miel que es utilizada comúnmente para endulzar distintas bebidas (Prost, 2007).

Además, el polen es un producto altamente proteico por su valioso contenido de aminoácidos esenciales, vitaminas, sales minerales, entre otros. Por consiguiente, se le otorga aplicaciones favorecedoras al organismo como prevenir enfermedades de distintos tipos como de próstata, del sistema respiratorio, circulatorio y digestivo (Benedetti & Pieralli, 1990; Lisete, 2010).

### **Justificación**

En Ecuador la industria alimentaria establece una de las más significativas, ya que los alimentos son productos de uso masivo, que se encuentran continuamente renovándose para adaptarse a las necesidades del cliente que exige siempre encontrar diversidad, calidad y precios equitativos. Por tanto, este sector brinda a los usuarios una cifra ilimitada de productos alimenticios, aun así, no todos exhiben un contenido nutritivo adecuado; así, por ejemplo, algunos alimentos abarcan excesivos colorantes y preservantes que promueven alteraciones en la salud. Por esto es importante la adición de sustancias nutracéuticas que incidan

positivamente en el mantenimiento de la salud de toda la población, específicamente en niños y longevos (Quinatoa, 2011).

En la miel y el polen de manera natural predominan las sustancias antioxidantes que tienen real importancia con la inmunidad. Por ello, estos productos provenientes de las abejas son calificados como alimentos funcionales, y se detallan como compuestos que conjuntamente contribuyen con otros componentes bioactivos. Por ende, es imperioso aprovechar las cualidades de distintos tipos de ingredientes primarios que al integrarse configuran alimentos nutraceúticos que no solo son nutritivos, sino que también optimizan la salud del consumidor (Yapias & Bao, 2012; CIL ECUADOR, 2020).

Según el Art. 13 de la Constitución de la República del Ecuador (2008) la población en general posee el derecho al consumo fehaciente y estable de alimentos inocuos, preponderantemente procesados localmente. Por este motivo y considerando que se han desarrollado insuficientes investigaciones con respecto al uso del polen y miel de abejas en la agroindustria, se pretende elaborar un yogurt a base de miel y polen de abejas como alternativa de procesamiento agroindustrial ya que, a través de la historia, el hombre ha destinado la miel de abejas como un producto endulzante y preservante. En nuestro país, la miel y el polen es designada principalmente a la ingesta directa y como medicina natural, teniendo poca aplicación en la industria láctea (Díaz & Paredes, 2014; Díaz, 2013).

En este sentido, en base a los escasos estudios microbiológicos desarrollados en el país para evaluar la incidencia de usar miel y polen como sustitutos del azúcar en la elaboración de yogurt, sobre el aumento o disminución del desarrollo de *Staphilococcus aureus*, *Escherichia*

*coli*, mohos y levaduras. Es preciso ejecutar este trabajo de investigación para garantizar el consumo seguro al cliente, puesto que de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (2016) las afecciones traspasadas por productos alimenticios sépticos instituyen una peligrosa consecuencia para la salud mundial.

## **Objetivos**

### ***Objetivo General***

Evaluar el efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad microbiológica de un yogurt natural.

### ***Objetivos Específicos***

- Evaluar los niveles de fermentación láctica en un yogurt natural al agregar cuatro concentraciones de miel y tres de polen.
- Evaluar el efecto de añadir miel y polen al yogurt natural sobre las poblaciones de *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, Hongos y levaduras.
- Analizar el grado de aceptabilidad del yogurt con polen y miel en el mercado a través del método del Focus Group.

## **Hipótesis**

**H<sub>0</sub>:** Los niveles de ácido láctico del yogurt donde se agregó miel y polen son similares a los niveles de ácido láctico donde no se agregó estos componentes.

**H<sub>1</sub>:** Los niveles de ácido láctico del yogurt donde se agregó miel y polen no son similares a los niveles de ácido láctico donde no se agregó estos componentes.

## Capítulo II

### Marco Referencial

#### El yogurt

Es un alimento fabricado a partir de la fermentación de la leche causada por dos tipos de microorganismos ácido-lácticos (*Streptococos termófilos* y *Lactobacilos bulgaricus*), los cuales se encargan de sintetizar los azúcares en ácido láctico y otros compuestos formando finalmente un producto con sabor, aroma y textura específicos (Yapias & Bao, 2012; Vargas G. , 2012).

**Tabla 1**

*Especificaciones de las leches fermentadas*

Requisitos	Entera		Semidescremada		Descremada		Método de ensayo
	Min %	Máx %	Min %	Máx %	Min %	Máx %	
Contenido de grasa	2,5	--	1,0	<2,5	--	< 1,0	NTE INEN 12
Proteína m/m	2,7	--	2,7	--	2,7	--	NTE INEN 16

*Nota.* Recuperado de Leches Fermentadas Requisitos, (p.3), por Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2011, Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 2395).

#### **Clasificación del yogurt**

Según Díaz (2013) se pueden diferenciar distintos tipos de yogurt de acuerdo con a los siguientes criterios: sabor, textura y contenido de grasa.

**Por la textura.** El yogurt puede diferenciarse por esta característica de las siguientes formas:

- Líquido

Para obtener este producto, la leche que se encuentra pasteurizada se inocula en tanques de fermentación en donde se produce la formación del coágulo del yogurt para luego ser batido y envasado en estado líquido.

- Batido

Al igual que el anterior, este tipo de yogurt se origina en los tanques de fermentación en donde se coagula. Luego se bate y se dosifica en los envases en estado medio líquido.

- Coagulado

A diferencia de los otros estados del yogurt, este se logra al envasar la leche pasteurizada y seguidamente inocular el fermento para que así se produzca la coagulación en cada frasco.

**Por el contenido de grasa.** Dependiendo del porcentaje de grasa de la leche con la que se elabora el yogurt tenemos:

- Entero

Es aquel yogurt que posee de 2.7 a 3 % de grasa, puesto que la leche con la que se elaboró no ha sufrido ningún tipo de alteración por lo que sus propiedades benefician a las características organolépticas del producto final como; sabor, olor, textura y color.

- Semidescremado

Hace referencia al yogurt que exhibe un contenido graso de 2.0 a 1 %.

- Descremado

Es aquel producto que deriva de la separación casi completa del componente graso de la leche entera. Este tipo de yogurt presenta un contenido inferior a 1 % de grasa.

**Por el sabor.** De acuerdo con la materia prima utilizada en la elaboración del yogurt para su endulzamiento se puede distinguir los siguientes tipos:

- Natural

Se caracteriza por no poseer adición de algún saborizante, esencia, polisacárido vegetal, fruta, azúcares o tinturas, facultando únicamente la añadidura de estabilizantes y conservantes.

- Frutado

En este tipo de yogurt se permite la integración de fruta ya sea en forma de pulpa o pedazos, también contiene aditivos, esencias, polisacárido vegetal y azúcar.

- Saborizado

Es aquel que posee saborizantes ya sea de origen natural o artificial además de otros aditivos autorizados.

### ***Beneficios del yogurt***

De acuerdo con Diaz (2013) debido a su contenido extenso de proteínas, hidratos de carbono, calcio, entre otros., el consumo de yogurt favorece muchas de las funciones primarias del ser humano.

**Ventaja en los procesos digestivos.** Puesto que el yogurt posee un gran número de bacterias benéficas, estas se encargan de competir con los microorganismos patógenos del intestino ocupando su lugar. De esta manera se reducen las diarreas al disminuir el pH del intestino.

**Asimilación de vitaminas.** Favorece el metabolismo y absorción de vitaminas como la K y B12, mientras la microflora del intestino este equilibrado.

**Equilibrio del sistema inmune.** Gracias a las bacterias probióticas presentes en el yogurt, se lleva a cabo la estimulación para la elaboración de las células encargadas de la defensa del organismo (inmunoglobulinas, células plasmáticas, linfocitos y macrófagos).

**Prevención del cáncer.** Según el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, las personas que presentan tendencia a consumir yogurt manifiestan un riesgo inferior de padecer esta enfermedad, puesto que se ha podido comprobar que los probióticos de este producto poseen un efecto anti-muta génico.

**Interviene en la motilidad del intestino.** Los probióticos de yogurt propician la producción de ácidos en el intestino, lo cual favorece los movimientos peristálticos ayudando así a la evacuación de las heces fecales.

### **Fermentación láctica**

La fermentación láctica se concibe por la acción de las bacterias del género *Lactobacillus*, que son microorganismos benéficos que sintetizan la lactosa presente en la leche en glucosa y finalmente en ácido láctico con el propósito de producir energía. Este proceso tiene gran importancia, puesto que los jugos digestivos no logran destruir este tipo de bacterias ni a sus ventajas en el organismo. Por ello, su modelo es replicado en la fabricación de yogurt (Vargas M. , 2020; Ortega, 2017).

### ***Bacterias ácido-lácticas***

Son un conglomerado de bacterias que se localizan principalmente en la leche y cuyo producto concluyente de su metabolismo es el ácido láctico. Dentro de este conjunto de

microorganismos se pueden hallar bacterias lácticas homofermentativas, es decir que originan de 70-90% de ácido láctico. Así se puede nombrar a: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* (Navas & Arciniegas, 2008; Gutiérrez, 2014).

***Streptococcus thermophilus***. Es un tipo de bacteria gram-positiva, cuyo ambiente de crecimiento se comprende entre una temperatura de 37 a 40 °C, a la cual utiliza los azúcares para la generación de sustancias de fermentación. Puesto que el producto final de su metabolismo es el ácido láctico, posee un alto interés en la industria láctica; sin embargo, exhibe un inferior poder de acidificación frente a los *Lactobacillus* (Navas & Arciniegas, 2008).

***Lactobacillus bulgaricus***. Es un microorganismo homofermentativo cuyo ambiente ideal de crecimiento se encuentra entre 42 a 45 °C. Puede originar hasta 2,7 % de ácido láctico causando el descenso de pH y la hidrolización de las proteínas, esta última función es relevante puesto que en el proceso se eximen aminoácidos como la valina, la cual es substancial para el desarrollo de *Streptococcus thermophilus* (Navas & Arciniegas, 2008; Riofrio, 2015).

### **Miel de Abejas**

La miel es una sustancia acuosa, dulce y espesa procedente de las abejas (*Apis mellifera*), primordialmente tomando como materia prima el néctar floral, aunque también puede ser producida a través de cualquier parte viva de la planta. Así pues, estos insectos liban y trasladan la miel hasta guardarla en los panales (Mamary & Meeri, 2002).



### ***Características nutricionales de la miel***

Díaz & Paredes (2014) mencionan que la constitución final de la miel es diversa, pero fundamentalmente está formada por azúcares de forma cuantiosa las cuales tienen proteínas y otros componentes, que habitualmente están relacionados con el polen. Además, es importante mencionar que el color de esta sustancia viscosa está ligada a su contenido nutricional y se puede encontrar desde tonos blancos hasta oscuros, predominando el color ámbar. De esta manera, los colores más oscuros corresponden a un contenido alto de hierro y vitaminas B y C, mientras que los colores claros exhiben a un nivel superior de vitamina A (Correa, 2015).

**Tabla 2**

#### *Composición nutricional de la miel de abeja*

<b>Nutriente</b>	<b>Cantidad Promedio en 100 g</b>
Agua	17,1 g
Carbohidratos Totales	82,4 g
Fructosa	38,5 g
Glucosa	31 g
Maltosa	7,2 g
Sucrosa	1,5 g
Proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales	0,5 g
Energía	304 Kcal

*Nota.* Recuperado de Evaluación del efecto de la adición de miel de abeja (*Apis sp.*) sobre las características físico-químicas y sensoriales del yogurt y cortado de leche como sustituto parcial de la sacarosa, (p,28), por Díaz & Paredes, 2014, Universidad de Nariño.

#### ***Clasificación de la miel de abeja***

Albuja & Castro (2002) mencionan que la miel se puede clasificar desde diferentes categorías como:

**Según su origen botánico.** La miel de abeja puede clasificarse de dos formas, ya sea como miel de flores que es aquella que se adquiere directamente del néctar de flores o como mielada, cuya manera de obtención es a través de las partes vivas de las plantas o de insectos chupadores que se encuentran en ellas.

**Según la manera de obtención por el hombre.** En esta clasificación se pueden encontrar; la miel de panal, cuyo nombre indica que se encuentra alojada en los panales de construcción y sin incubar y la miel centrifugada, aquella que se obtiene de la centrifugación de los panales a una temperatura de 40 °C.

**Según su empleo.** La miel puede ser de tipo comestible, que es aquella clasificada como de primera calidad por lo que es designada al uso inmediato. Por otro lado, la miel de pastelería al no ser de calidad es destinada a la fabricación de alimentos como aditivo.

### ***Usos de la miel***

De manera general, la miel posee diversas utilidades debido al poder bactericida que se le confiere. Esta cualidad de la miel se produce por la formación del peróxido de hidrógeno como resultado de los procesos de oxidación enzimática de la glucosa. Por este motivo, la miel es principalmente usada en el campo medicinal y algunos de sus beneficios son: aumentar el rendimiento deportivo, estimular la producción de glóbulos rojos y anticuerpos, equilibrar la función gastrointestinal, es utilizada como componente antiséptico, antihemorrágico y emoliente, entre otros (Mamary & Meeri, 2002).

## El Polen

El polen hace referencia a las microsporas de las plantas con semilla alojadas en los sacos polínicos, en donde habitualmente se localizan cuatro granos de polen. El polen se define como un producto alimenticio con alto valor proteico, puesto que posee 20 aminoácidos, en los que se incluyen varios que no son sintetizados por el organismo humano y deben ser asimilados por la dieta (Mora, 2017; Pascoala & Rodrigues, 2014).

### *Composición química del polen*

La constitución del polen cambia en base a la estación de cosecha y la región territorial (Prost, 2007). De este modo, este producto apícola se destaca por su contenido de compuestos nitrogenados como lo son los aminoácidos esenciales. De igual forma, el polen muestra un significativo grupo de minerales, tales como; el potasio (K), calcio (Ca), hierro (Fe), magnesio (Mg), zinc (Zn) y cobre (Cu). Finalmente, también es abundante en vitaminas del complejo B, vitamina C y E (Rosero & Herrera, 2010; Fuenmayor & Quicazán, 2011).

### Tabla 3

#### *Composición química del polen*

<b>Componentes</b>	<b>Valor</b>
<b>Proteínas (%)</b>	
Total	7,02 – 29,87
Triptófano (en proteína)	6,4
<b>Vitaminas (ug/g)</b>	
Tiamina (b3)	9,3 – 11,8
Riboflavina (b2)	18,5 – 23,5

<b>Componentes</b>	<b>Valor</b>
Ácido ascórbico	131 - 721
<b>Minerales (%)</b>	
Potasio	20 – 45
Calcio	1-15
Fósforo	0,6 – 26,6
Magnesio	1 – 12
Hierro	0,01 – 12
Cobre	0,05 – 0,08

*Nota.* Recuperado de Efecto de la miel y el polen en las características físicas, químicas y sensoriales de yogur natural batido, (p,5), por Rosero & Herrera, 2010, Universidad Zamorano.

### ***Propiedades del polen en la salud humana***

Al polen apícola se le atribuye propiedades importantes tanto para las abejas como para el ser humano, puesto que se le han comprobado un sin número de características de origen terapéutico, tales como; cualidades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, antirradiación, hepatoprotectores, inmunoestimulantes, anticancerosas y analgésicas locales. Además, se han señalado ventajas en la prevención de complicaciones de próstata, arteriosclerosis, gastroenteritis, enfermedades respiratorias, en el sistema cardiovascular y digestivo. Procura así mismo inmunidad corporal y retraso en el envejecimiento (Zuluaga, 2016; Mungsan, 2018; Komosinska & Olczyk, 2015).

### **Focus Group**

De acuerdo con Hamui y Varela (2013) el grupo focal es una práctica de indagación colectivista, y se centraliza en la multiplicidad y diversidad de las conductas y juicios de los

colaboradores en período de tiempo respectivamente breve. Esta metodología es especialmente útil para examinar los conocimientos y costumbres de los individuos en un escenario de interacción.

### ***Fundamento del Focus Group***

La técnica del Focus Group incluye un tópico determinado, preguntas de investigación específicas, objetivos definidos, justificación y directrices. De acuerdo con el objetivo, se desarrolla la guía de conferencia y la organización para su desenvolvimiento. Las entrevistas interactivas se emplean a conjuntos de 6 a 10 personas, no obstante, pueden oscilar entre 4 y 12. Además, los contribuyentes pueden corresponder a una misma sociedad para que se origine una charla informal sobre un contenido delimitado. El investigador ejerce regularmente como moderador realizando las preguntas y conservando dinámico el flujo de la conferencia (Tomat, 2012).

### ***El Focus Group en la introducción de productos alimenticios al mercado***

A diferencia de las demás metodologías usuales como el análisis observacional o la entrevista individual, el grupo focal permite alcanzar con bastante acierto el conocimiento acerca de las conductas, emociones, juicios y experiencias de los participantes debido a la intercomunicación entre ellos en un breve lapso. Por ello, al utilizar los resultados recabados se pueden identificar oportunidades para corregir o perfeccionar el producto, y de esta manera se logrará agregar un nuevo valor que permita cubrir aquellas necesidades que no estuvieron cubiertas a discreción de los panelistas y por extensión del mercado (Fernandez, 2016).

## **Análisis Microbiológico en Alimentos**

El estudio microbiológico se fundamenta en un grupo de técnicas precisas para evidenciar la cantidad total de patógenos contaminantes contenidos en un producto comestible. En la actualidad se han establecido diversas metodologías para simplificar el trabajo en laboratorio y conseguir resultados en un tiempo más corto. Por tal motivo, se ha efectuado el uso de Placas Petrifilm 3M, mismas que permiten ejecutar la siembra inmediata de la muestra sin la elaboración previa de medios de cultivo en cajas Petri (Salas, 2014; Campuzano & Mejía, 2015).

### ***Placas Petrifilm 3M***

Las Placas Petrifilm 3M son medios de cultivo selectivos y diferenciales condensados en una placa de plástico que facilitan la identificación inmediata de una gran pluralidad de microorganismos. Estas placas han sido elaboradas para el apropiado conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), en disparejos ejemplares de muestras como en agua o alimentos. Así mismo, exhibe un componente solidificante que puede disolverse en agua y un medidor de pH, mismo que matiza a las colonias para su pertinente recuento a través de cuadrículas (Salas, 2014).

### ***Requisitos microbiológicos del yogurt***

Las leches fermentadas han de presentar carencia de patógenos contaminantes, al realizar el estudio microbiológico. Por tanto, la norma ecuatoriana que se encarga de regular este tipo de ensayos corresponde a los requisitos descritos en la Tabla 2, para los principales microorganismos presentes en el yogurt.

**Tabla 4***Requisitos microbiológicos en yogurt*

<b>Requisito</b>	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>	<b>Método de ensayo</b>
Coliformes totales, UFC/g	5	10	100	2	NTE INEN 1529-7
Recuento de <i>E. coli</i> , UFC/g	5	<1	-	0	NTE INEN 1529-8
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	200	500	2	NTE INEN 1529-10
<i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g	3	0	-	0	ISO 6888-1 ó 2

En donde: n = número de muestras para analizar; m = criterio de aceptación; M = criterio de rechazo; c = número de unidades que pueden estar entre m y M.

*Nota.* Recuperado de Leches Fermentadas Requisitos, (p.4), por Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2011, Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 2395).

### Capítulo III

#### Materiales y Métodos

##### Ubicación del área de investigación

El presente estudio se desarrolló en las infraestructuras de los laboratorios de Poscosecha y Agrobiotecnología de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA I (Figura 1), Hacienda el Prado, perteneciente a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Parroquia Sangolquí, Cantón Rumiñahui, Provincia Pichincha. Geográficamente el laboratorio de Agroindustrias se ubica a  $0^{\circ}23'27.98''S$ ,  $78^{\circ}24'49.16''O$  y 2745 m.s.n.m. y de acuerdo con Aucancela (2018) las condiciones de laboratorio exhiben una ventilación adecuada y cuentan con una temperatura promedio de  $16^{\circ}C$  llegando a una temperatura máxima de  $21^{\circ}C$  y a una mínima de  $7^{\circ}C$  con una humedad del 90%.

##### Figura 1

*Ubicación del Laboratorio de Agroindustrias y Agrobiotecnología*



*Nota.* La figura representa la localización del área experimental (Google Maps, 2021).



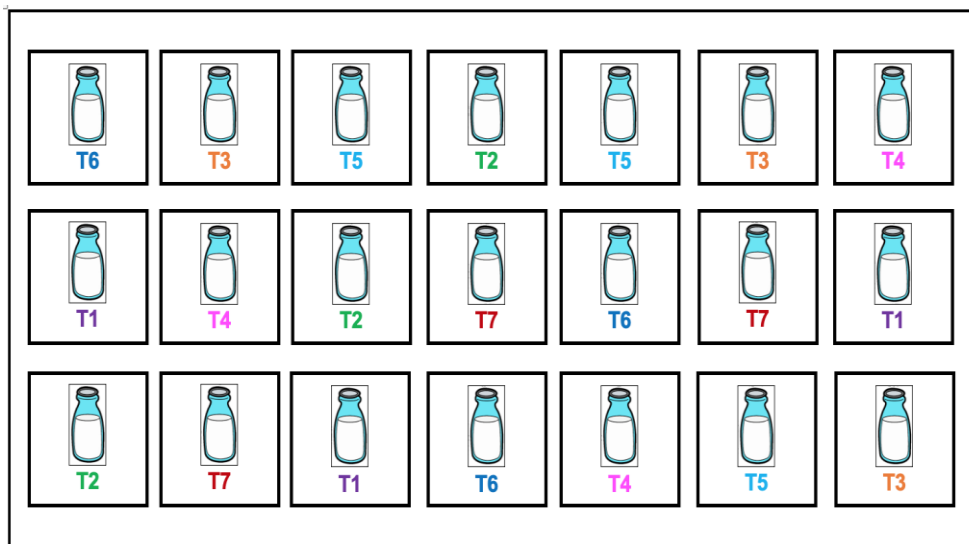
### Establecimiento del proyecto

La investigación se ejecutó a partir del mes de agosto hasta el mes de diciembre del 2021; tiempo en el cual se evaluaron parámetros como: producción de ácido láctico al día 1, 7, 14 y 21 después de la elaboración de yogurt, calidad microbiológica en el día 1 y el grado de aceptabilidad comercial del yogurt con polen y miel.

Se establecieron seis tratamientos como se indica en la Tabla 5, las unidades experimentales fueron los yogures de miel y polen de 1 Litro, mismos que en total resultaron 21 Litros, debido a que se presentaron 3 repeticiones para cada tratamiento. La disposición del experimento en el laboratorio se muestra en la figura 2.

**Figura 2**

*Disposición del experimento en el laboratorio*



*Nota.* La figura muestra la distribución de los tratamientos en el laboratorio de Poscosecha, en donde T: tratamiento.

**Tabla 5***Descripción de los tratamientos*

Tratamientos	Concentración de Polen (%)	Concentración de miel (%)
T1	0,5	3,0
T2	0,5	6,0
T3	0,5	9,0
T4	1,0	3,0
T5	1,0	6,0
T6	1,0	9,0
T7	0	0

*Nota.* La tabla representa la concentración de miel y polen dispuestos para cada tratamiento.

#### **Preparación del yogurt**

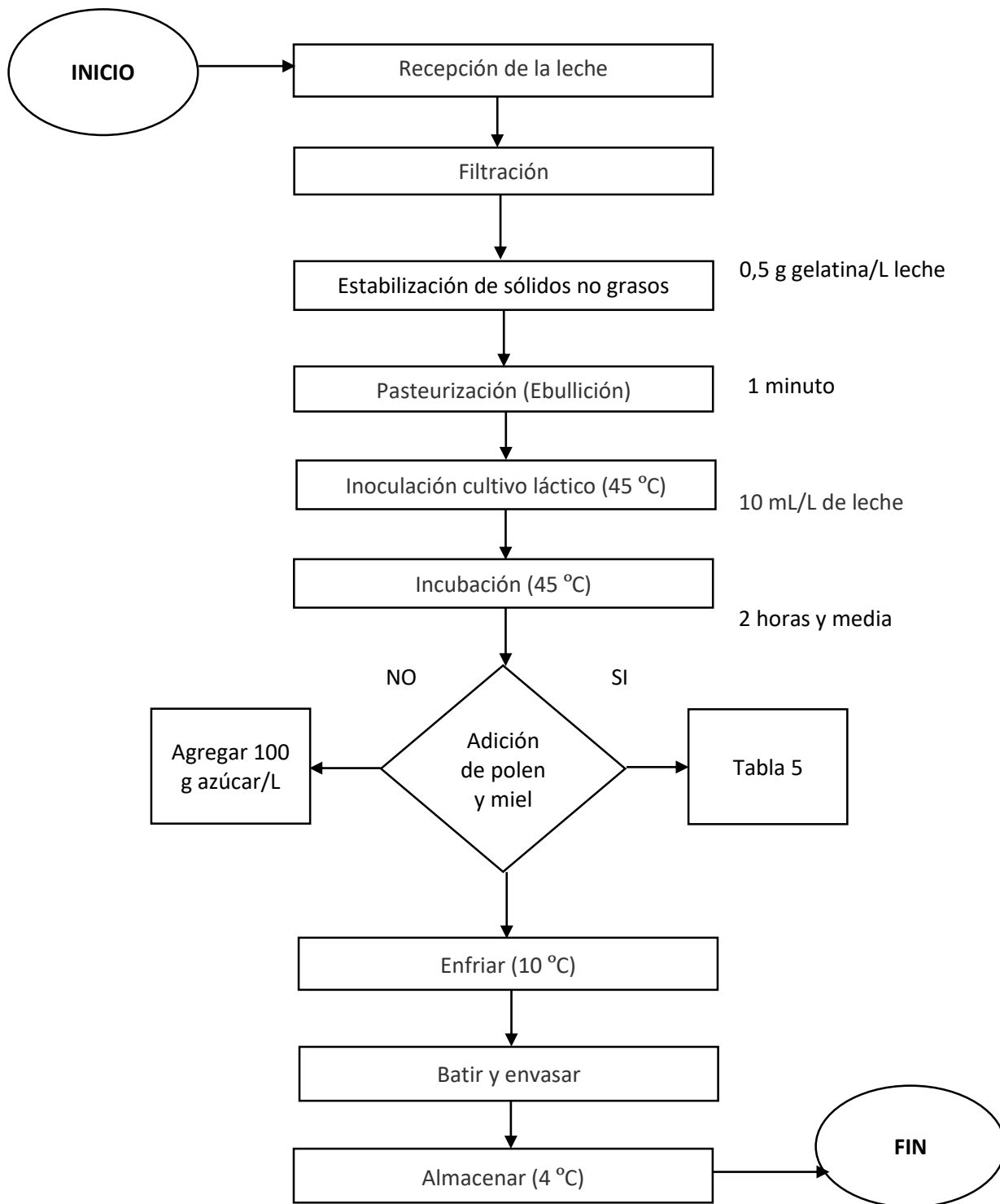
El proceso de elaboración del yogurt se adaptó al sistema que actualmente se utiliza en la Planta de Productos Lácteos - IASA I, con una modificación en el tiempo de incubación del yogurt como se muestra en la Figura 3.

#### **Preparación del cultivo láctico madre**

El cultivo láctico madre se elaboró a partir de un cultivo comercial concentrado que contenía *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* de la marca CHR HANSEN. Para ello, 1 L de leche se llevó hasta una temperatura de 45 °C, la cual fue necesaria para inocular el fermento. Luego la mezcla se envasó y se dejó reposar en la cámara de incubación a una temperatura de 45 °C por dos horas y media, después de este tiempo el resultado fue almacenado en el cuarto frío a 4 °C para conservar sus propiedades lactofermentativas.

Figura 3

Flujograma para elaboración de yogurt con polen y miel



Nota. La ilustración representa el proceso de elaboración de yogurt empleado en este estudio.

### Producción de ácido láctico

Para evaluar la producción de ácido láctico se aplicó la prueba de acidez titulable potenciométrica descrita por la NTE INEN 019 a los 1, 7, 14 y 21 días después de la elaboración del yogurt, siendo este último el tiempo de vida útil del yogurt almacenado a 4 °C especificado por la NTE INEN 2395:2011. Así pues, en un vaso de precipitación se agregó 9 ml de yogurt y 9 ml de agua destilada a los cuales se añadió 3 gotas de fenoftaleína 0,1% y se homogenizó con un agitador, luego se procedió a titular con Hidróxido de Sodio 0,1 Normal y con la ayuda de un medidor de pH (Boeco Germany, modelo BT-600) a pH: 8,3 se confirmó la lectura de volumen de NaOH 0,1N gastado el cual determinó los °Dornic presentes en cada tratamiento.

### Figura 4

*Medición de ácido láctico*



*Nota.* La imagen muestra la medición de ácido láctico en laboratorio.

### Calidad microbiológica

Para determinar la calidad microbiológica de los tratamientos en el día 1, se realizó el recuento de los microorganismos indicadores de contaminación (UFC/g) tomando como referencia la norma INEN 2395:2011 (Tabla 4); en la cual se especifica el reporte de *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, mohos y levaduras.

El análisis microbiológico se realizó mediante el recuento de colonias en las placas Petrifilm 3M, de acuerdo con la información de la Tabla 6, utilizando como referencia metodología desarrollada por Aucancela (2018). Para mantener las condiciones de asepsia se trabajó dentro de una cámara de flujo laminar clase II A (Thermo Forma, modelo 1284). A partir de las muestras de cada tratamiento, se prepararon diluciones seriadas hasta obtener una dilución de  $10^{-3}$  (Figura 5). A continuación, se inoculó 1 mL de la dilución en cada placa Petrifilm 3M, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se dejó reposar 5 minutos para permitir la formación del gel. Las placas se dejaron en incubación a 37 °C (temperatura estandarizada previamente) durante el tiempo especificado en la Tabla 6 para cada microorganismo de prueba.

**Tabla 6**

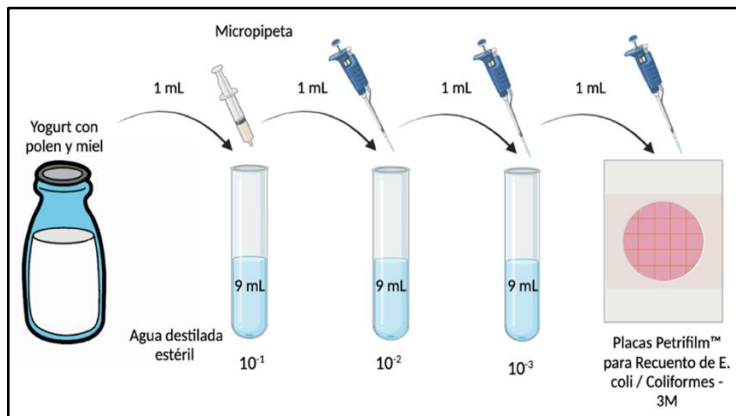
*Condiciones de crecimiento para microorganismos en Placas Petrifilm 3M*

Microorganismo	Placa Petrifilm 3M	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
<i>Staphylococcus aureus</i>	3M™ Petrifilm™ Placa Recuento Staph Express (No. Cat. 6490)	37 °C ± 1	24 horas
<i>Escherichia coli</i>	3M™ Petrifilm™ Placas E. coli / Coliformes (No. Cat. 6404)	37 °C ± 1	48 horas
Mohos y levaduras	3M™ Petrifilm™ Placas Hongos y Levaduras (No. Cat. 6407)	37 °C ± 1	5 días

*Nota.* Adaptado de Verificación del cumplimiento de los requisitos según norma INEN NTE INEN 2395:2011 y NTE INEN 2564:2011 en yogures y bebidas lácteas envasados en fundas de polietileno de baja densidad, comercializados en bares escolares de las Unidades Educativas Públicas de la ciudad de Riobamba, (p, 24), por Aguirre, 2018, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

**Figura 5**

Proceso de elaboración de diluciones seriadas de yogurt y siembra en Placas Petrifilm 3M



*Nota.* La Figura representa el protocolo para la elaboración de diluciones seriadas y siembra en placas Petrifilm 3M.

Finalmente, para verificar la calidad microbiológica del yogurt al día 21, se realizaron inoculaciones aplicando la técnica de siembra por extensión con una dilución  $10^{-3}$ , en medios de cultivo selectivos y diferenciales (Tabla 7), preparados para *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli*, Mohos y levaduras.

**Tabla 7**

Condiciones de crecimiento para microorganismos en Placas Petrifilm 3M

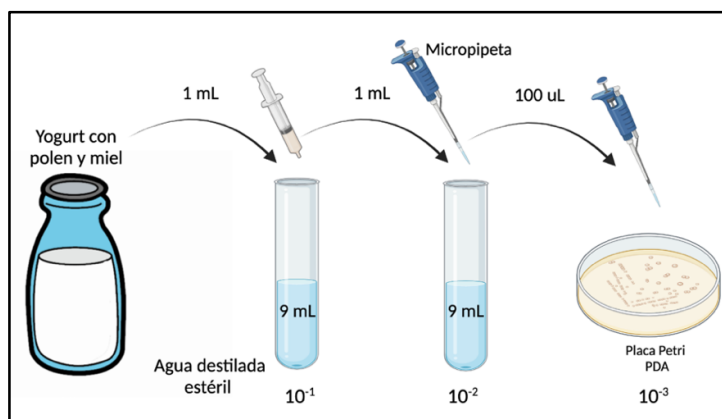
Microorganismo	Medios de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
<i>Staphilococcus aureus</i>	Thermo Scientific™ Agar MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (Ref. CM0361B)	37 °C ± 1	24 horas
<i>Escherichia coli</i>	Difco™ MacConkey Agar (Ref. 212123)	37 °C ± 1	48 horas

Microorganismo	Medios de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
Mohos y levaduras	Difco™ Potato Dextrose Agar - PDA (Ref. 254920)	37 °C ± 1	5 días

*Nota.* Adaptado de Verificación del cumplimiento de los requisitos según norma INEN NTE INEN 2395:2011 y NTE INEN 2564:2011 en yogures y bebidas lácteas envasados en fundas de polietileno de baja densidad, comercializados en bares escolares de las Unidades Educativas Públicas de la ciudad de Riobamba, (p, 24), por Aguirre, 2018, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

**Figura 6**

*Proceso de elaboración de diluciones seriadas de yogurt y siembra en medios selectivos y diferenciales*



*Nota.* La Figura representa el proceso de siembra por extensión de las muestras en placas Petri.

### ***Identificación de Staphilococcus aureus, Escherichia coli, Mohos y levaduras***

Para el reconocimiento de los diferentes microorganismos se utilizó la guía de interpretación para placas Petrifilm 3M detallado por el fabricante.

***Escherichia coli.*** Las colonias de *E. coli* se reconocieron por la aparición de un precipitado azul, lo cual produce que estas exhiban color azul o rojo-azul. El gas dispuesto

alrededor de las colonias reafirma su lectura (Figura 7).

### Figura 7

Visualización de *E. coli* en Placas 3M Petrifilm™

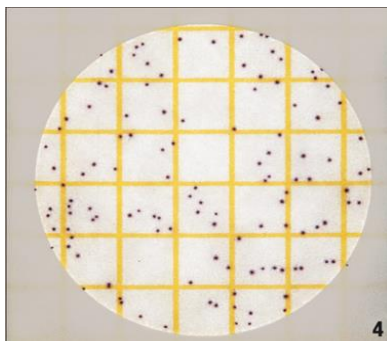


*Nota.* Recuperado de Guía de interpretación Placas Petrifilm™ para recuento de *E. coli*/Coliformes, (p,1), por 3M Food Safety, 2015, 3M Ciencia Aplicada a la Vida.

***Staphilococcus aureus.*** Para determinar la presencia de este microorganismo se distinguió zonas de color rosa, así pues, las colonias de *S. aureus* se distinguieron por su forma redonda, bordes lisos y color rojo-violeta (Figura 8).

### Figura 8

Identificación de *S. aureus* en Placas 3M Petrifilm™

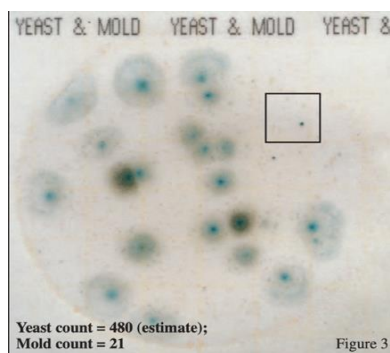


*Nota.* Recuperado de Guía de interpretación Placas Petrifilm™ Staph Express para recuento de *Staphilococcus aureus*, (p,3), por 3M Food Safety, 2017, 3M Ciencia Aplicada a la Vida.



**Mohos y levaduras.** Las levaduras se reconocieron por la presencia de UFC pequeñas con bordes delimitados, convexas y de color azul de estilo uniforme, mientras que para el recuento de mohos se consideró colonias grandes con bordes difusos y de color verde azulado, además aparecieron llanas con un eje oscuro (Figura 9).

**Figura 9** Reconocimiento de Mohos y levaduras en Placas 3M Petrifilm™



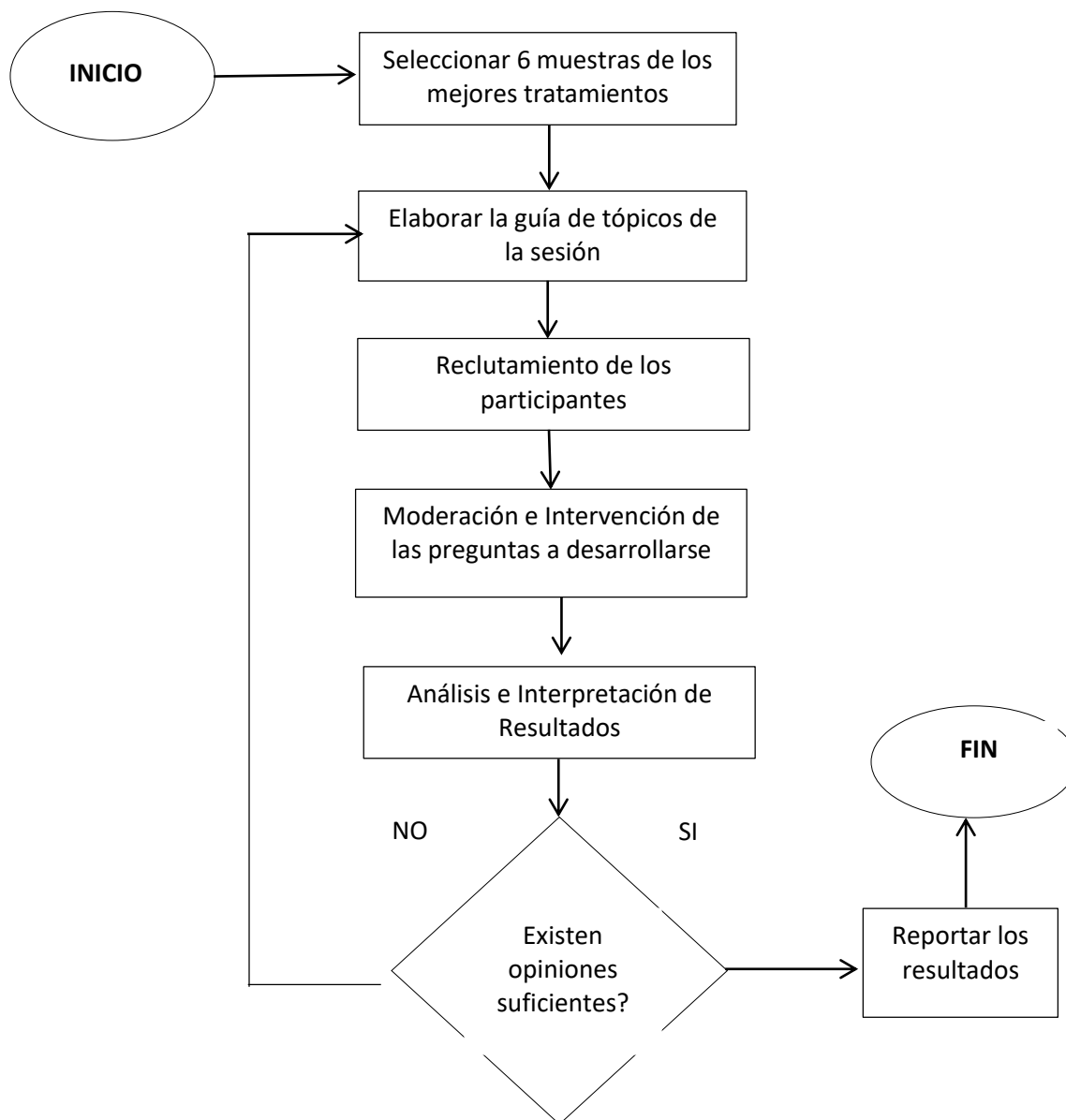
*Nota.* Recuperado de Guía de interpretación Placas Petrifilm™ para recuento de Mohos y levaduras (p,2), por 3M Food Safety, 2021, 3M Ciencia Aplicada a la Vida.

### **Aceptabilidad comercial del yogurt con polen y miel**

El análisis de mercado del yogurt con miel y polen se realizó mediante la técnica de marketing “*Focus Group*”. Se recolectó información a través de la plataforma de Google meet en 4 sesiones de un grupo de 6 personas entre 23 y 29 años, que presentaron una fuerte tendencia a consumir productos nutraceúticos, a las cuales previamente se les proporcionó una muestra de 100 mL de los mejores tratamientos con respecto a la variable producción de ácido láctico a partir del siguiente flujo de procesos (Figura 10).

**Figura 10**

*Evaluación de la aceptación de mercado del yogurt con polen y miel*



*Nota.* Adaptado de Evaluación de la estabilidad microbiológica y organoléptica de manjar de chocho (*Lupinus mutabilis Sweet*) con dos métodos de conservación, dos edulcorantes y a dos temperaturas, (p, 30), por Aucancela, 2018, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

### Análisis estadístico

La producción de ácido láctico se caracterizó mediante estadística descriptiva (Media y Desviación Estándar) y se evaluó mediante un Análisis de Varianza (ANAVA) para un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 3 repeticiones, en base al siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + T_i + E_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = Variable de respuesta

$u$  = Media general de la variable de respuesta

$T_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo nivel de polen y miel sobre la variable de respuesta

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental

Además, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey al 5% para los tratamientos y se determinó modelos de regresión lineal de primer orden para evaluar el efecto de los tratamientos y el tiempo en la producción de ácido láctico. Todos los análisis fueron realizados en el software estadístico INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2018).

La presencia de UFCs de *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus*, mohos y levaduras se evaluaron en base a la Norma Técnica Ecuatoriana (NTE INEN 2395), para estas variables no se aplicó un Diseño Experimental puesto que, sus datos no se ajustaron. Las variables sabor, color, olor, textura y apariencia general del yogurt se caracterizaron mediante gráficos de araña.

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio se clasificaron en tres etapas: producción de ácido láctico, calidad microbiológica y el grado de aceptabilidad comercial del yogurt con polen y miel.

#### Producción de ácido láctico

La producción de ácido láctico de los yogures mostró diferencias entre tratamientos ( $F_{6,77} = 2,40$ ;  $p = 0,0350$ ). Los yogures inoculados con una dosis de 0,5 % de polen y 3 % de miel (T1) exhibieron una producción total mayor de ácido láctico que los yogures del T4 que fueron inoculados con 1% de polen y 3 % de miel.

**Tabla 8**

*Media  $\pm$  Desviación estándar de la producción de ácido láctico con siete tratamientos*

Tratamientos	Ácido láctico (°D)
	Media $\pm$ D.E.
T1	83,75 $\pm$ 7, 64 <sup>a</sup>
T2	78,25 $\pm$ 10,90 <sup>ab</sup>
T3	78,50 $\pm$ 6,95 <sup>ab</sup>
T4	72,08 $\pm$ 6,63 <sup>b</sup>
T5	82,08 $\pm$ 11,45 <sup>ab</sup>
T6	76,75 $\pm$ 10,6 <sup>ab</sup>
T7	74,83 $\pm$ 6,94 <sup>ab</sup>

*Nota.* Medias en la misma columna con letras diferentes difieren estadísticamente (HSD Tukey = 11,08;  $p < 0,05$ ).

En el día 21, la producción de ácido láctico presentó diferencias entre tratamientos ( $F_{6,14} = 31,95$ ;  $p < 0,0001$ ). Los yogures del T4 y T7 fueron aquellos que presentaron la más baja producción de ácido láctico final en relación con los yogures del T5, el cual mostró la máxima cantidad de °Dornic como se puede evidenciar en la tabla 9.

**Tabla 9**

*Media  $\pm$  Desviación estándar de la producción de ácido láctico con siete tratamientos al día 21*

Tratamientos	Ácido láctico (°D)
	Media $\pm$ D.E.
T1	90,67 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>
T2	92,67 $\pm$ 2,52 <sup>b</sup>
T3	88,00 $\pm$ 1,73 <sup>b</sup>
T4	81,00 $\pm$ 2,00 <sup>c</sup>
T5	98,00 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>
T6	90,67 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>
T7	83,00 $\pm$ 2,00 <sup>c</sup>

*Nota.* Medias en la misma columna con letras diferentes difieren estadísticamente (HSD Tukey = 4,94;  $p < 0,05$ ).

**Tabla 10**

*Modelos de regresión lineal de primer orden de la producción de ácido láctico vs el tiempo*

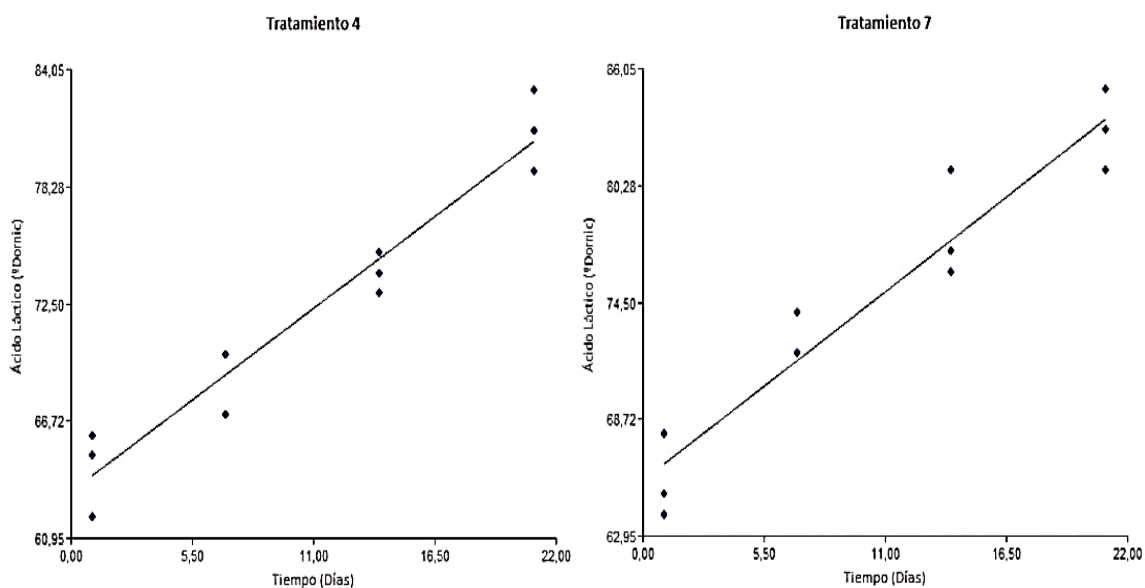
Tratamiento	Modelo	R <sup>2</sup>	CpMallows	p-valor	Error Relativo (%)	
					Erb <sub>0</sub>	Erb <sub>1</sub>
T1	°Dornic = 74,69 + 0,84 tiempo + ee	0,75	29,32	0,0003	19,04	2,73
T2	°Dornic = 63,51 + 1,37 tiempo + ee	0,97	334,35	0,0001	1,54	5,84

Tratamiento	Modelo	R <sup>2</sup>	CpMallows	p-valor	Error Relativo (%)	
					Erb <sub>0</sub>	Erb <sub>1</sub>
T3	$^{\circ}\text{Dornic} = 69,15 + 0,87 \text{ tiempo} + ee$	0,96	244,92	<0,0001	1,06	6,89
T4	$^{\circ}\text{Dornic} = 63,25 + 0,82 \text{ tiempo} + ee$	0,94	166,83	<0,0001	1,31	7,32
T5	$^{\circ}\text{Dornic} = 66,68 + 1,43 \text{ tiempo} + ee$	0,96	237,88	<0,0001	1,83	6,29
T6	$^{\circ}\text{Dornic} = 62,22 + 1,35 \text{ tiempo} + ee$	0,98	498,72	<0,0001	1,27	4,44
T7	$^{\circ}\text{Dornic} = 65,67 + 0,85 \text{ tiempo} + ee$	0,92	121,89	< 0,01	1,54	9,41

*Nota.* Los resultados de la tabla muestran los modelos matemáticos encontrados para cada tratamiento y sus criterios de valoración.

**Figura 11**

*Producción de ácido láctico total respecto al tiempo del T4 y T7*

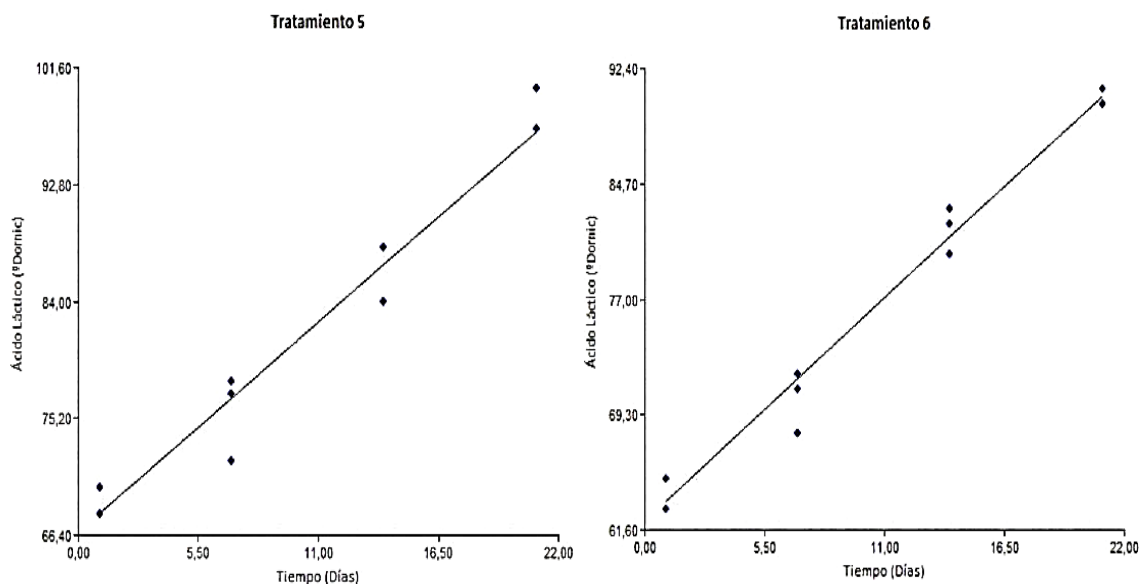


*Nota.* Las gráficas representan la producción de ácido láctico de 21 días para el T4 (Izquierda) y T7 (derecha).

Los tratamientos 4 y 7 fueron similares, y mostraron una producción de ácido láctico inferior total y al día 21 en comparación con los demás tratamientos (Tabla 8 y 9), aunque ambos tratamientos se diferencien totalmente por su contenido de miel y polen (Tabla 5). Los modelos de producción de ácido láctico en relación con el tiempo para estos tratamientos se detallan en la Tabla 10 y se visualizan en la Figura 11.

**Figura 12**

*Producción de ácido láctico total respecto al tiempo del T5 y T6*



*Nota.* La figura representa la producción de ácido láctico del T5 y T6 en 21 días, la cuales muestran una tendencia lineal.

En relación con la cantidad de °Dornic, los yogures inoculados con 1% de polen y 6% de miel (T5) exhibieron los valores más altos para esta variable al día 21 (Tabla 9), a diferencia del T6, se puede observar que el T5 muestra una pendiente mayor ya que su constitución se distingue del otro tratamiento por el porcentaje de miel (Tabla 5). Los modelos están

representados para estos tratamientos se describen en la Tabla 10 y en la Figura 12 se observa la evolución de este factor frente al tiempo.

En consecuencia, los resultados obtenidos para la producción de ácido láctico al día 21 exceptuando al T5, se encuentran dentro del rango dispuesto por la Norma INEN 2395 que establece valores de 85 – 95 °Dornic y fueron representados por un modelo de regresión lineal de primer orden como se describe en la Tabla 10. Por tanto, los tratamientos que presentaron la menor producción de ácido láctico al día 21 (T4 y T7) se asociaron a una vida útil mayor puesto que, de acuerdo con Quezada (2020) un exceso de producción de ácido láctico repercute negativamente en las propiedades organolépticas del yogurt (sabor, color, olor y textura), lo cual reduce la vida de anaquel de los productos.

Así mismo, Alcívar (2017) y Gonzales (2006) establecieron investigaciones análogas que confirmaron la existencia de una correlación positiva entre la producción de ácido láctico y el tiempo, lo cual concuerda con este estudio, ya que se observó que los valores de °Dornic aumentaban a través del tiempo para todos los tratamientos (Figura 11 y 12).

Los valores altos de °Dornic hallados en esta investigación (T5), pueden ser explicados por la adición de polen y miel al yogurt puesto que, ambos elementos poseen agentes fermentativos como lo indica Mora (2017) quien declaró que el polen sufre un proceso de fermentación cuando las condiciones de agua son altas, por lo cual, al encontrarse como una materia prima del yogurt, este elemento contribuye a la acidificación del producto.



Finalmente, la miel de abeja también es responsable de aportar acidez al yogurt por cuanto, las levaduras presentes en su composición que habitualmente corresponden al género *Saccharomyces* son las primordiales causantes de los procesos fermentativos en la miel y en los productos a los que se le incorpore este ingrediente, así lo menciona Cárdenas & Laporte (2008) en su trabajo que estudió la dinámica de la miel.

### **Calidad microbiológica**

A continuación, se muestran los resultados hallados en el análisis microbiológico para *E. coli*, *S. aureus*, mohos y levaduras al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt.

#### ***Recuento de mohos y levaduras***

En el ensayo microbiológico de mohos se determinó que el T1 y el T7 al día 1, presentaron un número de colonias (UFC/g) superior a los límites máximos permisibles descritos por la Norma INEN 2395 correspondiente a 500 UFC/g, como se muestra en la Tabla 9. Los demás tratamientos al día 1 exhibieron ausencia de este microorganismo. Por otro lado, al día 21 no se encontró colonias de mohos en ningún tratamiento.

En el recuento de levaduras al día 1, se halló UFCs presentes en T1, T4 y T7 que sobrepasaron los límites máximos permisibles, mientras que el resto de los tratamientos estuvieron dentro de los estándares de calidad microbiológica. Al día 21, las levaduras estuvieron presentes en el T1, T2, T5, T6 y T7 en rangos superiores a los referidos en la norma ecuatoriana (Tabla 11).

Tabla 11

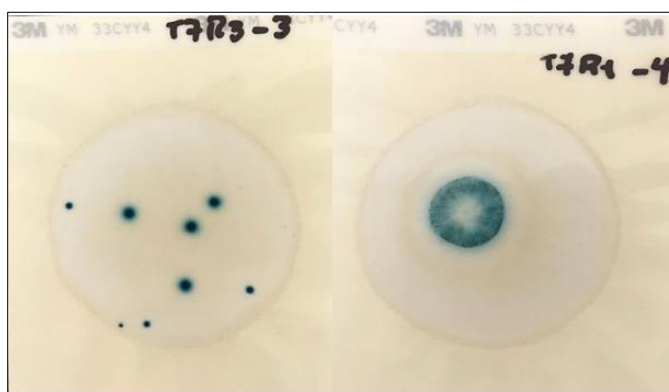
Recuento microbiológico de Mohos y levaduras al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt

Tratamientos	Mohos (UFC/g)		Levaduras (UFC/g)		Límites máximos permisibles (UFC/g)
	Día 1	Día 21	Día 1	Día 21	
T1	$2,85 \times 10^{32}$	0	$1 \times 10^{33}$	$3,66 \times 10^5$	
T2	0	0	0	$5 \times 10^3$	
T3	0	0	0	0	500
T4	0	0	$6,67 \times 10^2$	0	
T5	0	0	0	$5 \times 10^3$	
T6	0	0	0	$3 \times 10^3$	
T7	$1,71 \times 10^{32}$	0	$6,67 \times 10^2$	$1,7 \times 10^4$	

*Nota.* La tabla representa las medias de UFC/g de 3 repeticiones por tratamiento halladas en el recuento de mohos y levaduras.

Figura 13

Resultados relevantes del recuento de mohos y levaduras en Placas Petrifilm 3M



*Nota.* La ilustración muestra el desarrollo de mohos (derecha) y levaduras (izquierda) del T7 al día 5 después de la siembra.

### **Recuento de *Escherichia coli***

En el caso de *E. coli*, los resultados hallados para todos los tratamientos tanto para el día 1 y 21, cumplieron con los requisitos microbiológicos detallados por la Norma INEN 2395 como se especifica en la Tabla 12.

**Tabla 12**

*Recuento microbiológico de Escherichia coli al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt*

Tratamientos	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)		Límites máximos permisibles (UFC/g)
	Día 1	Día 21	
T1	0	0	
T2	0	0	
T3	0	0	
T4	0	0	---
T5	0	0	
T6	0	0	
T7	0	0	

*Nota.* La tabla representa las medias de UFC/g de 3 repeticiones por tratamiento halladas en el recuento de *Escherichia coli*.

### **Recuento de *Staphilococcus aureus***

Se encontró presencia de colonias de *S. aureus* al día 1 y 21 en las muestras de yogures de los tratamientos 1 y 7, los valores hallados sobrepasaron los límites máximos permisibles descritos en la Tabla 13. Esto sugiere que las dosis bajas de miel y polen no presentan propiedades antimicrobianas amplias para este microorganismo. Esto se confirmó con el T7, ya que este tratamiento contiene 0% de polen y miel en su composición y a su vez exhibió los valores más altos correspondientes a UFC/g para *S. aureus*.

**Tabla 13**

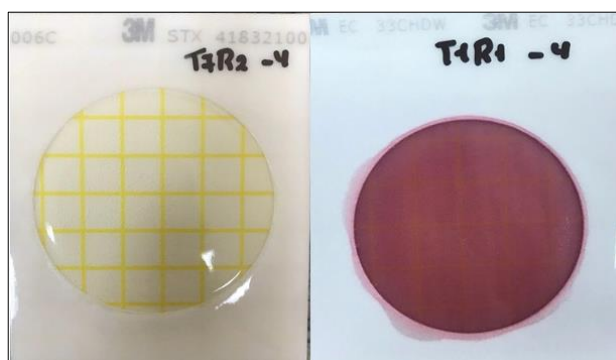
*Recuento microbiológico de Staphilococcus aureus al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt*

Tratamientos	<i>Staphilococcus aureus</i> (UFC/g)		Límites máximos permisibles (UFC/g)
	Día 1	Día 21	
T1	$2,67 \times 10^3$	$3,25 \times 10^5$	
T2	0	0	
T3	0	0	
T4	0	0	---
T5	0	0	
T6	0	0	
T7	$5 \times 10^3$	$6,4 \times 10^{31}$	

*Nota.* La tabla representa las medias de UFC/g de 3 repeticiones por tratamiento halladas en el recuento de *Staphilococcus aureus*.

**Figura 14**

*Resultados relevantes del recuento de S. aureus y E. coli en Placas Petrifilm 3M*



*Nota.* La Figura representa el desarrollo de *S. aureus* (izquierda) y *E. coli* (derecha) del T7 y T1 al día 1 y 2 respectivamente después de la siembra.

Los resultados obtenidos son comparables a los hallados por Aguirre (2018) quien en su estudio encontró que las condiciones de almacenamiento para productos lácteos (4 °C) interfiere en el desarrollo de mohos y levaduras, por lo que una exposición prolongada de esta temperatura repercute negativamente en su crecimiento como se puede apreciar en los resultados del día 21 para todos los tratamientos con respecto al recuento de mohos.

De la misma manera, Aguirre (2018) confirmó que el descenso de pH en el yogurt originado por las bacterias ácido lácticas, inhibe el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*. Por tanto, en la Tabla 12 se puede observar la ausencia de *E. coli* en todos los tratamientos, por lo cual los yogures evaluados se encuentran dentro del rango permisible para leches fermentadas de la Norma INEN 2395.

Todo lo expuesto anteriormente, coincide con Espinoza (2017) quien confirmó en su investigación que el polen de abeja posee propiedades antivirales, antimicrobianas y antifúngicas. Además, Zamora y Arias (2011) en su estudio encontró que la miel presenta propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias cuando es utilizada directamente o como endulzante en productos alimenticios. Igualmente, estos autores descubrieron que *S. aureus* es el microorganismo más susceptible a las propiedades antimicrobianas de la miel y adicionalmente observaron que *E. coli* también es vulnerable al efecto inhibitorio de la miel.

### **Aceptabilidad comercial**

La aceptabilidad comercial del yogurt con polen y miel se analizó a través del Focus Group, en donde 6 participantes evaluaron 5 variables: apariencia general, aroma, textura, color y sabor. Se utilizó una escala hedónica para cuantificar las variables como se especifica en la

Tabla 14. Los resultados obtenidos fueron representados gráficamente mediante diagramas radiales al día 1 y 21 después de la elaboración de yogurt.

**Tabla 14**

*Escala hedónica del yogurt con polen y miel*

<b>Variable</b>	<b>Puntuación</b>
<b>Aroma, Color y Apariencia general</b>	
Extremadamente agradable	5
Muy agradable	4
Agradable	3
Poco agradable	2
Nada agradable	1
<b>Sabor</b>	
Extremadamente dulce	5
Muy dulce	4
Dulce	3
Poco dulce	2
Nada dulce	1
<b>Textura</b>	
Extremadamente homogénea	5
Muy homogénea	4
Homogénea	3
Poco homogénea	2
Nada homogénea	1

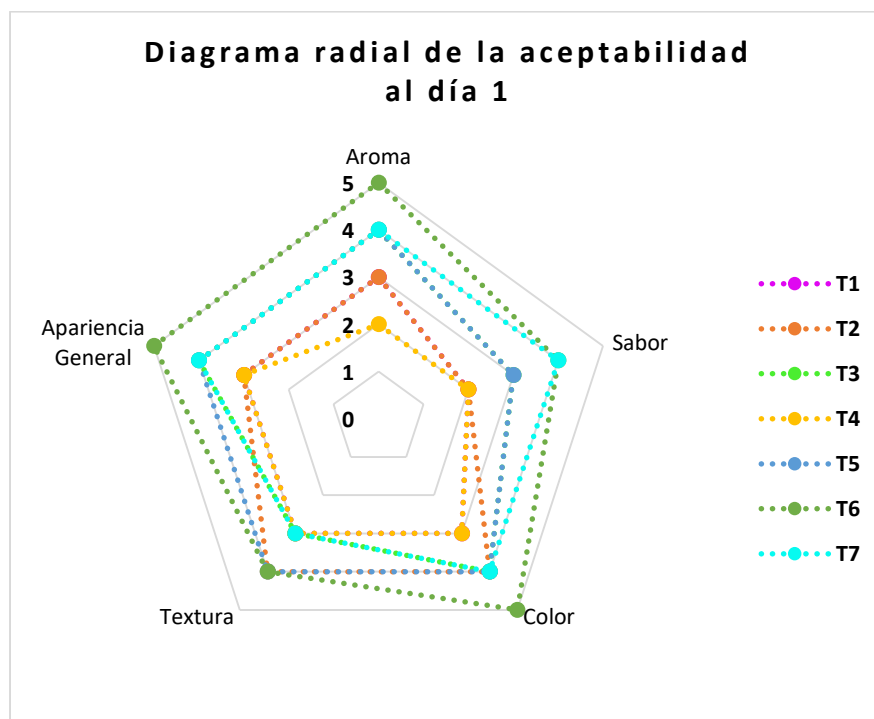
*Nota.* Recuperado de Elaboración de yogurt light con stevia como edulcorante, (pp, 23-26), por Peñafiel, 2014, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

A continuación, se muestran los resultados más relevantes hallados en este estudio para la aceptabilidad del yogurt con polen y miel:

Como se puede observar en la figura 15, el T6 presenta un área mayor en el diagrama radial frente a los demás tratamientos, puesto que sus valores promedio se encuentran más alejados del centro lo que le confiere los mejores resultados hallados en cuanto a las características organolépticas del yogurt evaluado (Tabla 14).

**Figura 15**

*Características organolépticas del yogurt con polen y miel al día 1*

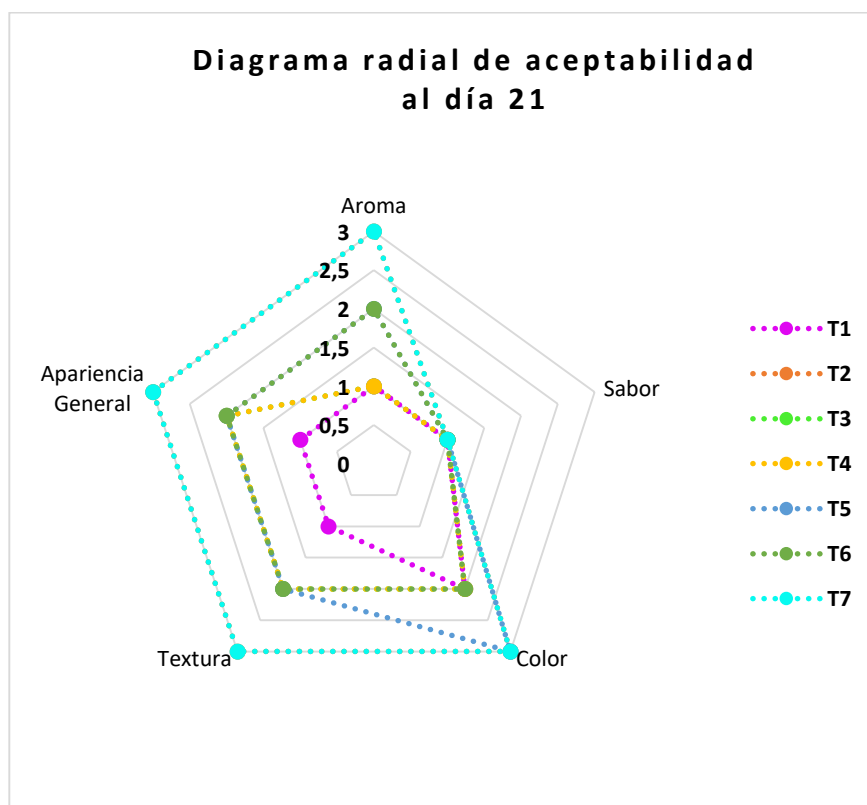


*Nota.* La gráfica representa los valores promedio de las características organolépticas del yogurt con polen y miel.

Sin embargo, se puede visualizar que el T7 también presenta puntajes promedio elevados, aunque este tratamiento no presentó en su composición polen y miel. Por otro lado, al día 21 el T7 es aquel que presenta la mayor área seguido por el T5 y T6 a diferencia de los demás tratamientos que disminuyen su área frente al tiempo (Figura 16).

**Figura 16**

*Características organolépticas del yogurt con polen y miel al día 21*



*Nota.* La gráfica representa los valores promedio de las características organolépticas del yogurt con polen y miel al día 21.

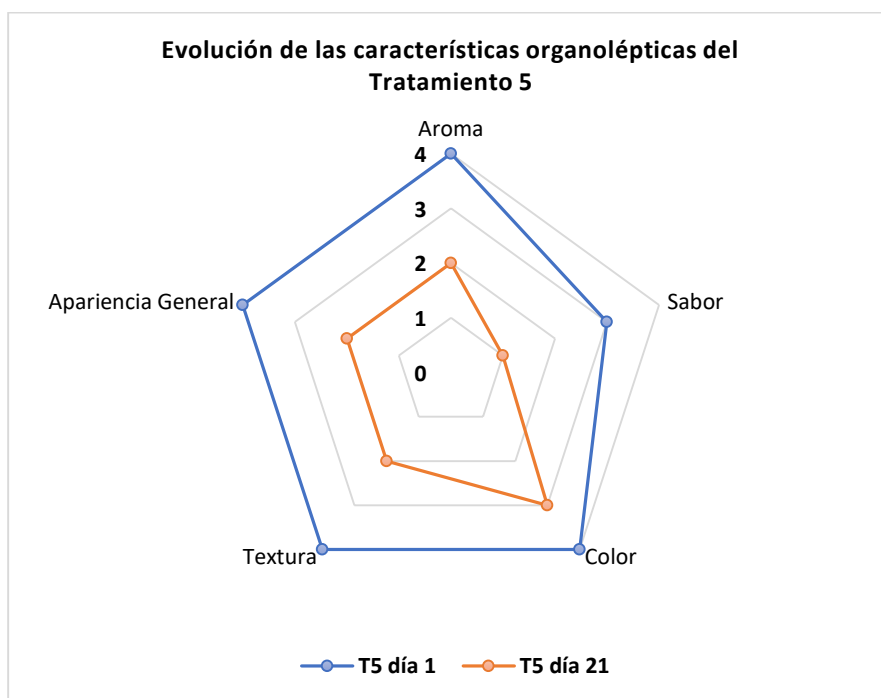
En la Figura 17, el T5 muestra una evolución de las características sensoriales del yogurt aceptable aun en el día 21, se puede apreciar la disminución notable del área graficada de



acuerdo con los variables evaluadas. Así pues, exceptuando a la variable sabor, todos los demás factores cumplen con valores admisibles para el consumidor.

**Figura 17**

*Evolución de las características organolépticas del tratamiento 5*

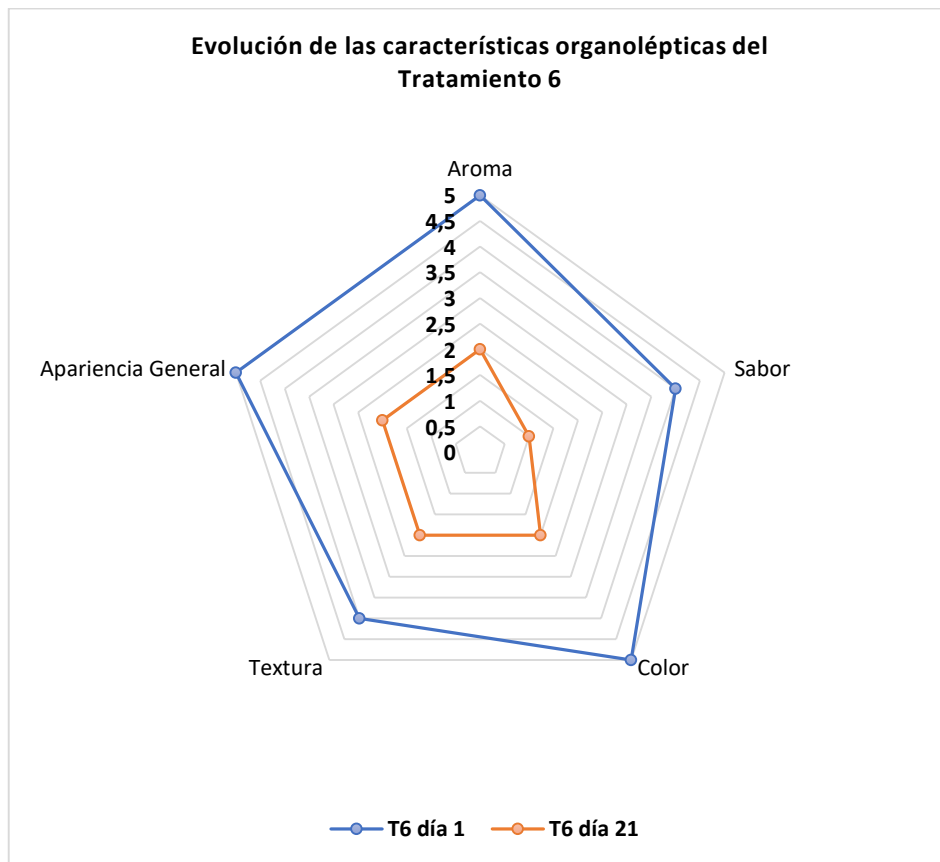


*Nota.* La gráfica representa los valores promedio de las características organolépticas del T5 al día 1 y 21.

El desempeño de las propiedades organolépticas del T6 se encuentra representado en la Figura 18, en donde se puede visualizar que el área en el día 1 es potencialmente mayor que en el día 21. Por tanto, se determinó que al día 21 el T6 ya no se consideró apto para el consumo pues sus características mostraron valores deficientes según los participantes de este estudio, aunque su valor en °Dornic se encuentre dentro de la normativa (Tabla 9).

Figura 18

*Evolución de las características organolépticas del tratamiento 6*

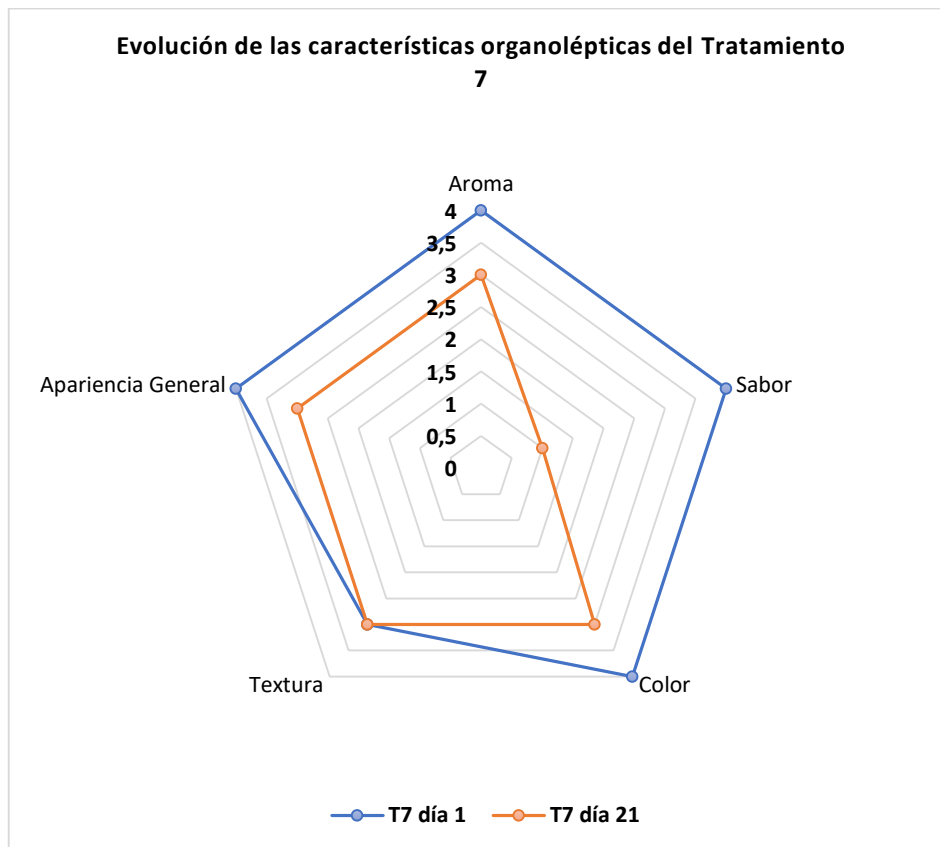


*Nota.* La Figura exhibe los valores promedio de las características organolépticas del T6 al día 1 y 21.

De igual forma en la figura 19, el T7 exhibió un área extensa al día 1 en comparación al día 21 para todas las propiedades organolépticas. A diferencia del T6, el T7 aun en el día 21 presentó valores promedio aceptables para las variables evaluadas, exceptuando al factor sabor cuyo resultado fue deficiente en todos los tratamientos al día 21.

Figura 19

*Evolución de las características organolépticas del tratamiento 7*



*Nota.* La ilustración presenta los valores promedio de las características organolépticas del T7 al día 1 y 21.

Finalmente, en relación con el grado de aceptación 5 de 6 participantes indicaron que el T6 fue el preferido para el consumo diario, puesto que este yogurt obtuvo los mejores puntajes para las 5 variables evaluadas como se puede apreciar en la Figura 18, esto se debe a que este tratamiento obtuvo las dosis más altas de miel y polen que le confirieron una cantidad de sólidos no grasos alta y un elevado valor de proteína respectivamente. Al mismo tiempo, los panelistas mencionaron su satisfacción al consumir un producto que contiene polen y miel en altas cantidades.

Por otro lado, un solo participante eligió el T7 como su favorito, pero concordó con los demás participantes en cuanto a los beneficios de consumir miel y polen en un yogurt. Estos resultados no concordaron con Días & Paredes (2014) quienes en su investigación reportaron que las dosis mayores de miel en yogurt no presentaban resultados satisfactorios con el público.

En cambio, Yapias y Bao (2012) en un trabajo similar consiguieron resultados semejantes a los encontrados en esta investigación, así pues, en su evaluación sensorial determinaron que los participantes prefieren los tratamientos que corresponden a las altas dosis de miel y polen, y a su vez Díaz & Sosa (2004) en su estudio mencionan que el consumidor prefiere productos que contengan materias primas que les proporcionen beneficios para la salud como es el caso del yogurt con polen y miel.

## Capítulo V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

En referencia a la producción de ácido láctico al día 1 y 21, se establecieron diferencias entre tratamientos. Al día 1, los yogures que menor cantidad de °Dornic presentaron fueron los correspondientes al T4, mientras que el T1 mostró una elevada producción de este factor. En el mismo contexto, al día 21 también se encontró que el T4 y T7 fueron los tratamientos que exhibieron los valores más bajos de °Dornic en relación con el T5 que fue el tratamiento con mayor producción para esta variable.

Se determinó que todos los tratamientos exceptuando al T5, cumplieron con los rangos de ácido láctico especificados por la Norma INEN 2395 (85-95 °Dornic) para leches fermentadas al día 21 almacenadas a 4°C.

Se desarrollaron modelos de regresión lineal de primer orden para analizar la producción de ácido láctico en relación con el tiempo, así pues, los resultados más relevantes se asociaron a aquellos tratamientos que presentaron menor cantidad de °Dornic al día 21: T4 ( $^{\circ}\text{Dornic} = 63,25 + 0,82 \text{ tiempo} + ee$ ) y T1 ( $^{\circ}\text{Dornic} = 74,69 + 0,84 \text{ tiempo} + ee$ ).

En el análisis microbiológico al día 1 y 21 se determinó ausencia de *E. coli* para todos los tratamientos, lo cual es un indicador de las Buenas Prácticas de Manufactura aplicadas en esta

investigación. De esta forma, se cumplió con los requisitos microbiológicos detallados por la norma INEN 2395.

Además, se encontraron UFCs de mohos al día 1 en el T1 y T7 cuyos tratamientos corresponden a las dosis más bajas (0,5% polen y 3% miel) y (0% de polen y miel) respectivamente, lo cual superó los límites permisibles estipulados en la norma ecuatoriana. Sin embargo, al día 21 se reportó ausencia de estas colonias en todos los tratamientos.

Las colonias de levaduras estuvieron presentes al día 1 en los tratamientos 1, 4 y 7 y su desarrollo fue más evidente al día 21, ya que se encontraron dispersas en más tratamientos (T1, T2, T5, T6 y T7), lo que determinó que sus valores sobrepasaron los límites máximos permisibles dispuestos en la Norma INEN 2395.

El recuento de *S. aureus* al día 1 y 21 mostró que los tratamientos 1 y 7 superaron los requisitos microbiológicos descritos por la normativa ecuatoriana. Los demás tratamientos se encontraron dentro del rango permisible.

En el Focus Group utilizado en para el análisis del grado de aceptabilidad, se estableció que el tratamiento que presentó en su composición los máximos porcentajes de polen y miel (T6) al día 1, fue el preferido por la mayoría de los panelistas en cuanto a las variables estudiadas (color, olor, sabor, textura y apariencia general). Por otro lado, al día 21 el T7 fue el favorito seguido del T5 y T6.

En las sesiones de Focus Group, todos los participantes mencionaron su satisfacción por consumir productos nutraceúticos en un producto de ingesta diaria como lo es el yogurt con polen y miel.

### **Recomendaciones**

Se recomienda estimar el tiempo de vida útil adecuado para que cada tratamiento se encuentre dentro del rango dispuesto por la norma INEN 2395, puesto que en esta investigación la mayoría de los tratamientos exceptuando el T5 se encontraron dentro de los límites lo que supone que la vida útil de los yogures evaluados debe ser mayor.

Es recomendable incorporar dosis más altas de polen y miel en yogurt puesto que, en esta investigación se hallaron resultados positivos para el grado de aceptabilidad del T6 que fue el tratamiento que mayor dosis presentó para estos factores frente al resto de tratamientos, teniendo en cuenta la producción de ácido láctico.

Es importante realizar pruebas de dosificación de cultivo madre, puesto que este factor determina la acidificación y coagulación final del yogurt y por extensión su tiempo de vida útil.

Se recomienda establecer en laboratorio un antibiograma del polen y la miel frente a los microorganismos principales contaminantes del yogurt descritos por la Norma INEN 2395.

Realizar un análisis organoléptico bajo un Diseño Experimental para analizar si existen diferencias estadísticas entre tratamientos.

## Bibliografía

- Aguirre, A. (2018). *Verificación del cumplimiento de los requisitos según norma INEN NTE INEN 2395:2011 y NTE INEN 2564:2011 en yogures y bebidas lácteas envasados en fundas de polietileno de baja densidad, comercializados en bares escolares de las Unidades Educativas Públicas de la ciudad de Riobamba*. [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].  
<http://dspace.espe.edu.ec/bitstream/123456789/8992/1/56T00799.pdf>
- Aguirre, K., & Biollo, R. (2010). *Efecto del uso de tres concentraciones de estabilizador y dos edulcorante artificiales en las propiedades físico-químicas y sensoriales de yogurt de fresa sin grasa y sin azúcar*. [Universidad Zamorano].  
<http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/1040568>
- Albuja, S., & Castro, R. (2002). *Proyecto de prefactibilidad para la producción y comercialización de miel de abejas a Española*. [Universidad Tecnológica Equinoccial].  
<http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/6453>
- Alcívar, O. (2016). *Evaluación de la acidez titulable en la elaboración de yogurt en base a la NORMA INEN 2395 en lácteos nacionales*. [Universidad Técnica de Machala].  
<http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/7661/1/alcivar.pdf>
- Aucancela, J. (2018). *Evaluación de la estabilidad microbiológica y organoléptica de manjar de chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) con dos métodos de conservación, dos edulcorantes y a dos temperaturas*. [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/21021/T-IASA%20I-005496.pdf?sequence=1&isAllowed=y>



- Benedetti, L., & Pieralli, L. (1990). *Apicultura: El individuo, la colectividad, el medio, los productos de la colmena, constitución y manejo del colmenar, apicultura especializada, adversidad y medidas de prevención, legislación apícola española*. Barcelona: Editorial Omega.  
[https://www.mieldemalaga.com/data/manual\\_apicultura.hon.pdf](https://www.mieldemalaga.com/data/manual_apicultura.hon.pdf)
- Cagua, M. (2020). *Desarrollo de una formulación de yogurt probiótico saborizado con polen de abeja (Apis Mellifera), en la ciudad de Guayaquil*. [Universidad de Guayaquil].  
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/51259/1/BINGQ-GS-20P81.pdf>
- Campuzano, S., & Mejía, D. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *Revista NOVA*, 13(23), 81-92. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702015000100008&script=sci\\_abstract&tIng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-24702015000100008&script=sci_abstract&tIng=es)
- Cárdenas, C., & Laporte, V. (2008). Características microbiológicas de la miel. Revisión bibliográfica. *Revista Veterinaria Cuyana*, 3(1), 32-33.  
[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/119164/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/119164/Documento_completo.pdf?sequence=1)
- CIL ECUADOR. (21 de Octubre de 2020). *La proteína láctea fortalece y cuida la salud de los seres humanos*. Obtenido de Centro de la Industria Láctea - CIL Ecuador:  
<https://www.cilecuador.org/post/la-prote%C3%ADna-l%C3%A1ctea-fortalece-y-cuida-la-salud-de-los-seres-humanos>
- Correa, G. (2015). Edulcorantes. *Revista Hacia la Promoción de la Salud*, 1(6), 31-46.  
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-479445>

- Díaz, B., & Sosa, S. (2004). Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogur. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3(3), 287-305. <https://www.redalyc.org/pdf/620/62030307.pdf>
- Díaz, D., & Paredes, C. (2014). *Evaluación del efecto de la adición de miel de abeja (Apis sp.) sobre las características físico-químicas y sensoriales del yogurt y cortado de leche como sustituto parcial de la sacarosa*. [Universidad de Nariño].  
<http://sired.udenar.edu.co/id/eprint/2104>
- Díaz, J. (2013). *Desarrollo de un Yogurt Tipo I de Plátano para la Empresa de Lácteos "El Belén"*. [Universidad Tecnológica Equinoccial].  
[http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5029/1/53537\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5029/1/53537_1.pdf)
- Di Rienzo J. et al. (2018). *Estadística para las ciencias agropecuarias*. ISBN.  
[https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/2968/mod\\_resource/content/0/Estadistica\\_para\\_las\\_Ciencias\\_Agropecuarias\\_-\\_Di\\_Rienzo.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/2968/mod_resource/content/0/Estadistica_para_las_Ciencias_Agropecuarias_-_Di_Rienzo.pdf)
- Espinoza, P. (2017). *Efecto antifúngico in vitro del extracto de propóleo ecuatoriano comparado con la nistatina sobre candida albicans*. [Universidad Central del Ecuador].  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15182/1/T-UCE-0015-902-2018.pdf>
- Fernandez, B. (2016). *El focus group como base para la introducción de productos alimenticios al mercado*. [Universidad Laica Vicente Rocafuerte de Guayaquil].  
<https://es.scribd.com/document/352409568/El-Focus-Group-Como-Base-Para-La-Introduccion-de-Produccion>
- Fuenmayor, C., & Quicazán, M. (2011). Desarrollo de un suplemento nutricional mediante la fermentación en fase sólida de polen de abejas empleando bacterias ácido lácticas probióticas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 20(23), 33-57.

[https://www.researchgate.net/publication/235946454\\_Desarrollo\\_de\\_un\\_suplemento\\_nutricional\\_mediante\\_la\\_fermentacion\\_en\\_fase\\_solida\\_de\\_polen\\_de\\_abejas\\_empleando\\_bacterias\\_acido\\_lacticas\\_probioticas](https://www.researchgate.net/publication/235946454_Desarrollo_de_un_suplemento_nutricional_mediante_la_fermentacion_en_fase_solida_de_polen_de_abejas_empleando_bacterias_acido_lacticas_probioticas)

Gonzales, A. (2006). *Establecimiento de una curva de acidificación del yogur Zamorano*.

[Universidad Zamorano].

<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/722/1/T2247.pdf>

Google Maps. (2021). *Mapa Satelital de IASA (Carrera Agropecuaria Universidad de las Fuerzas*

*Armadas)*. Obtenido de [https://www.google.com.ec/maps/place/IASA/@-0.3856124,-](https://www.google.com.ec/maps/place/IASA/@-0.3856124,-78.4172058,18.49z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5bbbd8644851b:0xc6c8b2bb6c026969!8m2!3d-0.3857137!4d-78.4164486?hl=es)

[78.4172058,18.49z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5bbbd8644851b:0xc6c8b2bb6c026969!8m](https://www.google.com.ec/maps/place/IASA/@-0.3856124,-78.4172058,18.49z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5bbbd8644851b:0xc6c8b2bb6c026969!8m2!3d-0.3857137!4d-78.4164486?hl=es)

[2!3d-0.3857137!4d-78.4164486?hl=es](https://www.google.com.ec/maps/place/IASA/@-0.3856124,-78.4172058,18.49z/data=!4m5!3m4!1s0x91d5bbbd8644851b:0xc6c8b2bb6c026969!8m2!3d-0.3857137!4d-78.4164486?hl=es)

Gutiérrez, A. (2014). *Desarrollo de dulce de leche (Arequipe) de bajo contenido calórico con*

*utilización de sucralosa y polidextrosa*. [Universidad Nacional de Colombia].

[https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21945/261674.2014.pdf?sequen](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21945/261674.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

[ce=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/21945/261674.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Hurtado, Y. (2017). *Proyecto de factibilidad para la creación de una empresa dedicada a la*

*producción de yogurt de uvilla en la Parroquia de Tambillo, Cantón Mejía*. [Universidad

Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15676>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2011). Requisitos de la leches fermentadas . *Normativa*

*INEN 2395:2011*. [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-2395-](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-2395-2r.pdf)

[2r.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-2395-2r.pdf)

ISO. (2014). *Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los jueces (ISO*

*8586-1)*. [https://es.scribd.com/document/124064241/NTP-ISO-8586-1-2008-Guia-](https://es.scribd.com/document/124064241/NTP-ISO-8586-1-2008-Guia-General-para-la-seleccion-Parte-1-Catadores)

[General-para-la-seleccion-Parte-1-Catadores](https://es.scribd.com/document/124064241/NTP-ISO-8586-1-2008-Guia-General-para-la-seleccion-Parte-1-Catadores)

- Komosinska, & Olczyk. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 10(11), 6-12.  
<https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Lisete, G. (2010). *Estudio de factibilidad para el procesamiento y comercialización de yogur en Pedro Vicente Maldonado – Pichincha*. [Universidad San Francisco de Quito].  
<http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/949>
- Mamary, M., & Meeri, A. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Journal of Nutrition Research*, 22(9), 1041-1047.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0271531702004062>
- Mora, W. (2017). *Aplicación de fermentación láctica en el desarrollo de productos para la generación de valor en polen apícola*. [Universidad Nacional de Colombia].  
<https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62433/1024527620.2017%20sin%20restricci%C3%B3n.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Mungsan, N. (2018). *Origen y diversidad del polen apícola*. [Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/63006/>
- Navas, I., & Arciniegas, J. (2008). *Estudio del proceso de elaboración del yogurt batido con extracto natural de albahaca (Osimum basilicum L)*. [Universidad Industrial de Santander]. <https://studylib.es/doc/5627767/estudio-del-proceso-de-elaboracion-del-yogurt>
- Organización Panamericana de la Salud. (2016). *Reunión de la Comisión Panamericana de Inocuidad de Alimentos* (informe nro.7). Paraguay.  
[http://www.panaftosa.org/copaia7/dmdocuments/COPAIA7\\_Punto\\_TermoReferencia\\_\[190716\]\\_espanol.pdf](http://www.panaftosa.org/copaia7/dmdocuments/COPAIA7_Punto_TermoReferencia_[190716]_espanol.pdf)

- Ortega, R. (2017). *Yogurt bebible de camu camu y durazno endulzado con stevia "vita màs"*. [Universidad San Ignacio de Loyola]. <https://repositorio.usil.edu.pe/handle/usil/2917>
- Pascoala, A., & Rodrigues, S. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 25(21), 22-33. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691513007552>
- Peñafiel, A. (2014). *Elaboración de yogurt light con stevia como edulcorante*. [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9753/1/84T00283.pdf>
- Prost, J. (2007). *Manejo de la Colmena*. Madrid, España: Ediciones Mundi prensa, 12-25. <https://es.scribd.com/document/357319376/Apicultura-Conocimiento-de-La-Abeja-Manejo-de-La-Colmena-Pierre-Jean-Prost-Mundi-Prensa-2007>
- Quinatoa, K. (2011). *Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa productora de yogurt de frutas no tradicionales (maracuyá, mango, morinda o noni) y su comercialización en la ciudad de Quito*. [Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/2145>
- Revilla, A. (2009). *Tecnología de la Leche: procesamiento, manufactura y análisis* (5 ed.). Honduras: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura, 4-11. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/7125>
- Riofrio, C. (2015). *Estudio de cultivo lácticos y la inulina en la vida útil de yogurt de arazá (Eugenia stipitata)*. [Universidad Técnica de Ambato]. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/11985>

Rodríguez, S., Monereo, S., & Molina, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima:

¿Cerca o lejos?. *Revista Española de Salud Pública*, 77(3), 317-331.

[https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1135-57272003000300003](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272003000300003)

Rosero, M., & Herrera, D. (2010). *Efecto de la miel y el polen en las características físicas,*

*químicas y sensoriales de yogur natural batido*. [Universidad Zamorano].

<https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/500/1/AGI-2010-T030.pdf>

Salas, J. (2014). La alimentación y nutrición a través de la historia. *Revista Alimentarte*, 14(34),

467-476. <https://es.scribd.com/doc/241830738/la-alimentacion-y-la-nutricion-a-traves-de-la-historia-pdf>

Tomat, C. (2012). El "focus group": nuevo potencial de aplicación en el estudio de la acústica

urbana. *Revista de Pensamiento e Investigación Social*, 12(2), 129-152.

[https://www.redalyc.org/pdf/537/Resumenes/Resumen\\_53723279006\\_1.pdf](https://www.redalyc.org/pdf/537/Resumenes/Resumen_53723279006_1.pdf)

3M Food Safety . (2017). Guía de Interpretación . *Placas Petrifilm™ Staph Express para recuento de Staphylococcus aureus*. 3M Ciencia Aplicada a la Vida .

<https://multimedia.3m.com/mws/media/14096820/guia-interpretacion-petrifilm-staph-express.pdf>

3M Food Safety. (2015). Guía de Interpretación . *Placas Petrifilm™ para recuento de E. coli/Coliformes*. 3M Ciencia Aplicada a la Vida .

<https://multimedia.3m.com/mws/media/16240980/3m-petrifilm-placas-e-coli-ec-guia-de-interpretacion.pdf>

3M Food Safety. (2021). Guía de Interpretación . *Placas Petrifilm™ para recuento de Mohos y levaduras* . 3M Ciencia para la Vida.

<https://multimedia.3m.com/mws/media/16240890/3m-petrifilm-placas-hongos-y-levaduras-ym-guia-de-interpretacion.pdf>

- Vargas, G. (2012). *Verificación de prerrequisitos de limpieza y desinfección en superficies como parte de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) de una empresa de catering en el servicio de cocina de un hospital de la ciudad de Quito mediante el control microbiológico de indicadores de contaminación*. [Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/10372>
- Vargas, M. (2020). Guía de Taller. *Tecnología de productos lácteos*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, 21-23.
- Yapias, A., & Bao, H. (2012). *Efecto de la miel y el polen en las características físicas, químicas, nutritivas y organolépticas en el yogurt natural batido*. [Universidad Nacional del Centro del Perú]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/500/1/AGI-2010-T030.pdf>
- Zamora, L., & Arias, M. (2017). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomed*, 22(2), 63-65.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2011/bio112c.pdf>
- Zuluaga, C. (2016). *Alorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico*. [Universidad Nacional de Colombia].  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56771>