



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Efecto de la adición de miel y polen de abeja sobre los niveles de fermentación láctica y la calidad

microbiológica de un yogurt natural

Pamela Karina Llumiquinga Guamán

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería Agropecuaria

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

Ing. Larrea Cedeño, Gabriel Alejandro Mgtr.

25 de enero del 2022



- **Introducción**
 - ✓ **Justificación**
 - ✓ **Objetivos**
 - ✓ **Marco Teórico**
- **Materiales y métodos**
- **Resultados y discusión**
- **Conclusiones**
- **Recomendaciones**



INTRODUCCIÓN



- ✓ **Consumo Per cápita/persona de yogurt en Ecuador (2016): 4,57 L.**
- ✓ **2014:** Semaforización de alimentos.
- ✓ **2020:** Aumento de producción de lácteos y sus derivados



- ✓ **Consumo Per cápita/persona de miel en Ecuador (2018): 1,1 libras**
- ✓ Elevado valor energético (fructuosa y glucosa)



- ✓ **Consumo Per cápita/población de polen en Quito (2014): 20,19 kg**
- ✓ Altamente proteico (aminoácidos esenciales, vitaminas, sales minerales)

JUSTIFICACIÓN



❖ → Diversidad, calidad y precios equitativos

❖ → Contenido nutritivo vs excesivos colorantes y preservantes

→ Miel y Polen (ingesta directa y medicina natural)

→ Poca aplicación en la industria láctea

Art. 13 de la Constitución de la República del Ecuador (2008): La población tiene derecho al consumo de alimentos inocuos.

Organización Panamericana de la Salud (2016): Afecciones traspasadas por productos alimenticios sépticos.

Alimentación saludable

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.



El yogurt

MARCO REFERENCIAL

Fermentación de la leche →
microorganismos ácido-lácticos
(*Streptococos termófilos* y *Lactobacilos bulgaricus*)

Sabor, aroma y textura específicos



Clasificación del yogurt

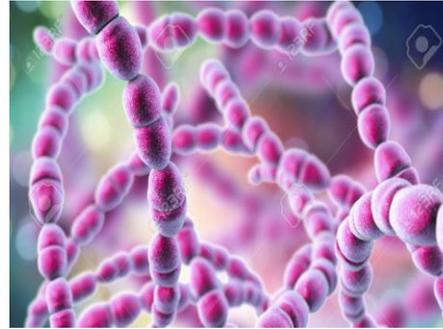
- ❖ **Por la textura:** Líquido, batido, coagulado
- ❖ **Por el contenido de grasa:** Entero, semidescremado, descremado
- ❖ **Por el sabor:** Natural, frutado, Saborizado

Beneficios del yogurt

- ❖ *Ventaja en los procesos digestivos*
- ❖ *Asimilación de vitaminas*
- ❖ *Equilibrio del sistema inmune*
- ❖ *Prevención del cáncer*
- ❖ *Interviene en la motilidad del intestino*

Fermentación láctica

- ❖ **BAL:** sintetizan la lactosa en glucosa → ácido láctico → energía.



- ❖ ***Streptococcus thermophilus*** (37 a 40 °C): utiliza los azúcares → sustancias de fermentación.
- ❖ Poder menor de acidificación vs Lactobacillus

- ❖ ***Lactobacillus bulgaricus*** (42 a 45 °C): Origina hasta 2,7 % de ácido láctico
- ❖ Descenso de pH e hidrolización de proteínas (valina /*Streptococcus thermophilus*)

- ❖ Jugos digestivos no logran destruir este tipo de bacterias ni a sus ventajas en el organismo.

Miel de Abejas

- ❖ Formada por azúcares y proteínas
- ❖ El color se asocia con el contenido nutricional
- ✓ **Oscuros:** alto hierro y vit B y C
- ✓ **Claros:** nivel superior de vit A



BENEFICIOS

- ❖ Aumenta el rendimiento deportivo
- ❖ Estimular la producción de glóbulos rojos y anticuerpos
- ❖ Equilibrar la función gastrointestinal
- ❖ Antiséptico, antihemorrágico y emoliente

El Polen

Producto alimenticio con alto valor proteico (20 aminoácidos)



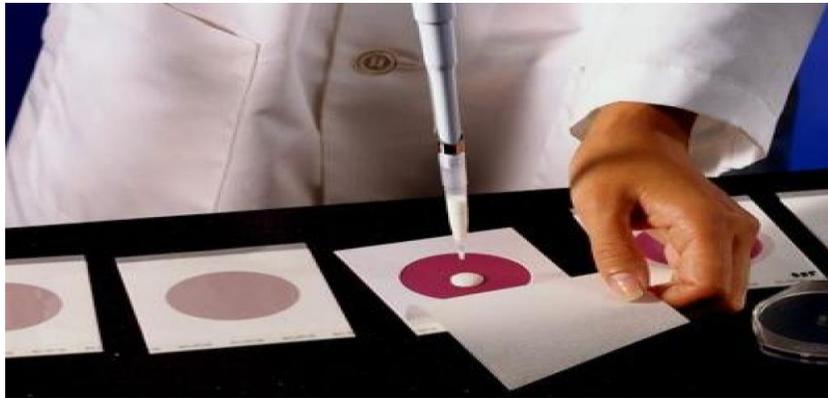
BENEFICIOS

- ❖ Antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, antioxidante, inmunoestimulantes, anticanceroso, etc.
- ❖ Prevención de complicaciones de próstata, gastroenteritis, enfermedades respiratorias, en el sistema cardiovascular y digestivo.

MARCO REFERENCIAL

Análisis Microbiológico en Alimentos

Técnicas para evidenciar la cantidad total de patógenos contaminantes contenidos en un producto comestible



Placas Petrifilm 3M

Medios de cultivo selectivos y diferenciales condensados → facilitan la identificación



Requisitos microbiológicos del yogurt

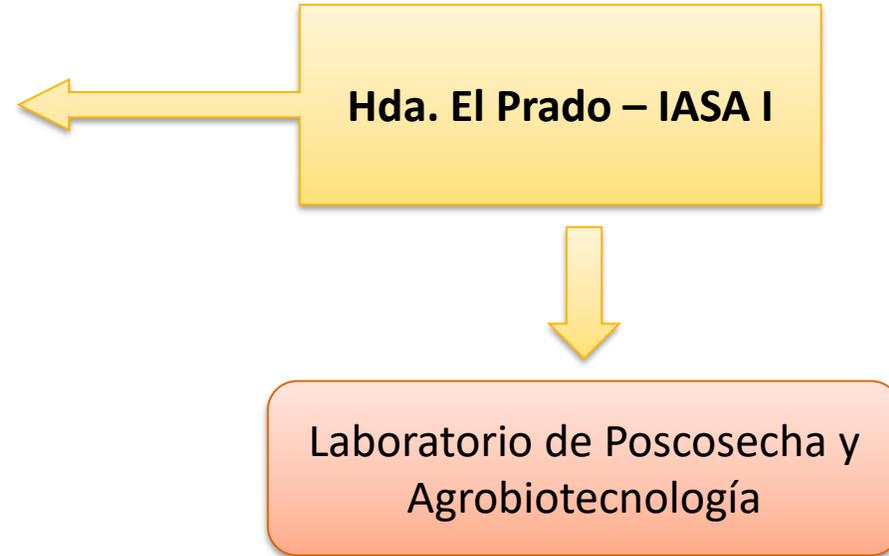
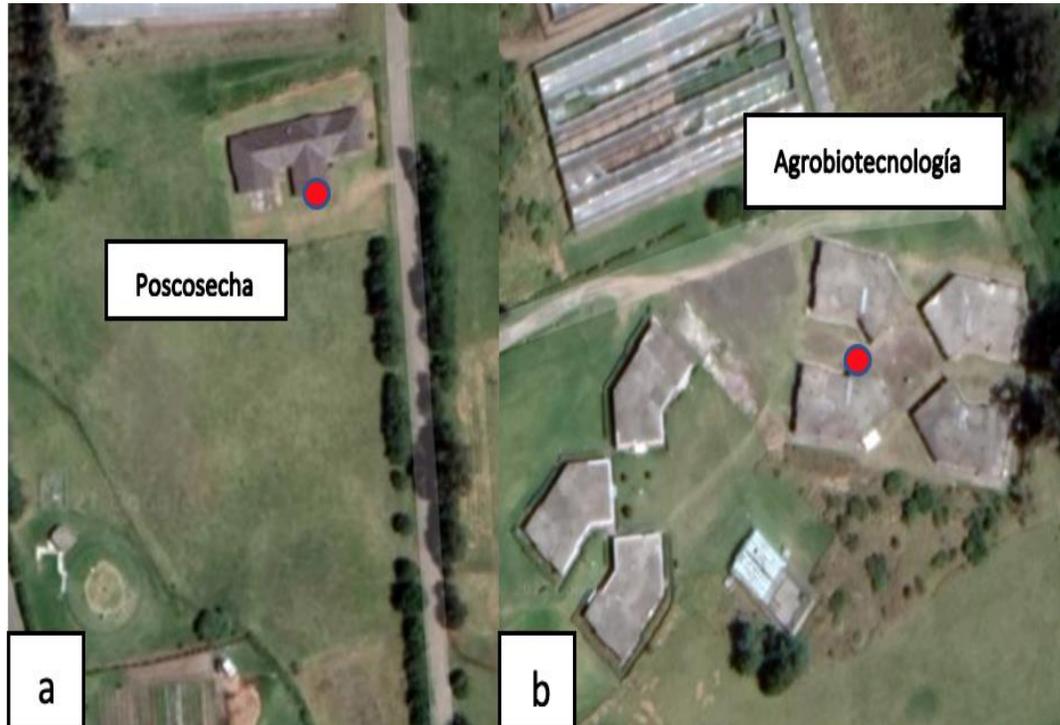
Norma Técnica Ecuatoriana
(NTE INEN 2395)

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del proyecto



Temperatura mínima	7 °C
Temperatura máxima	21 °C
Temperatura promedio	16 °C
Humedad relativa	90 %



Establecimiento del proyecto

Unidad experimental: Yogurt de polen y miel (1 L)



Número de repeticiones/tratamiento: 3

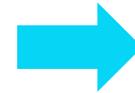


Total UE: 21 yogures de polen y miel

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



Preparación del cultivo láctico madre



1

- ✓ Lactobacillus bulgaricus
- ✓ Streptococcus thermophilus

2

1 L Leche

3

45 °C

4

4 °C

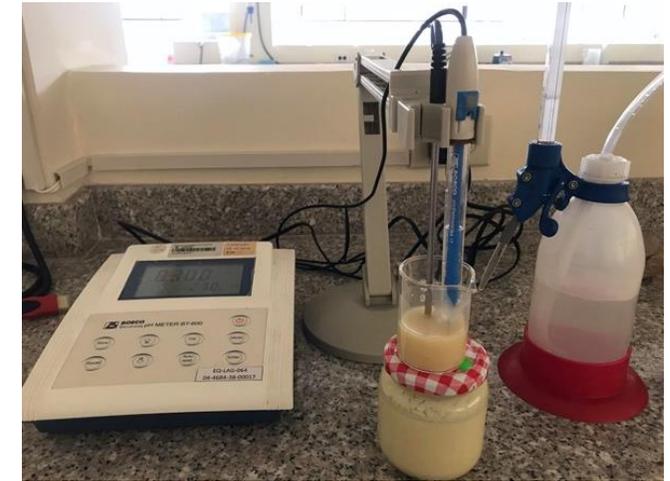
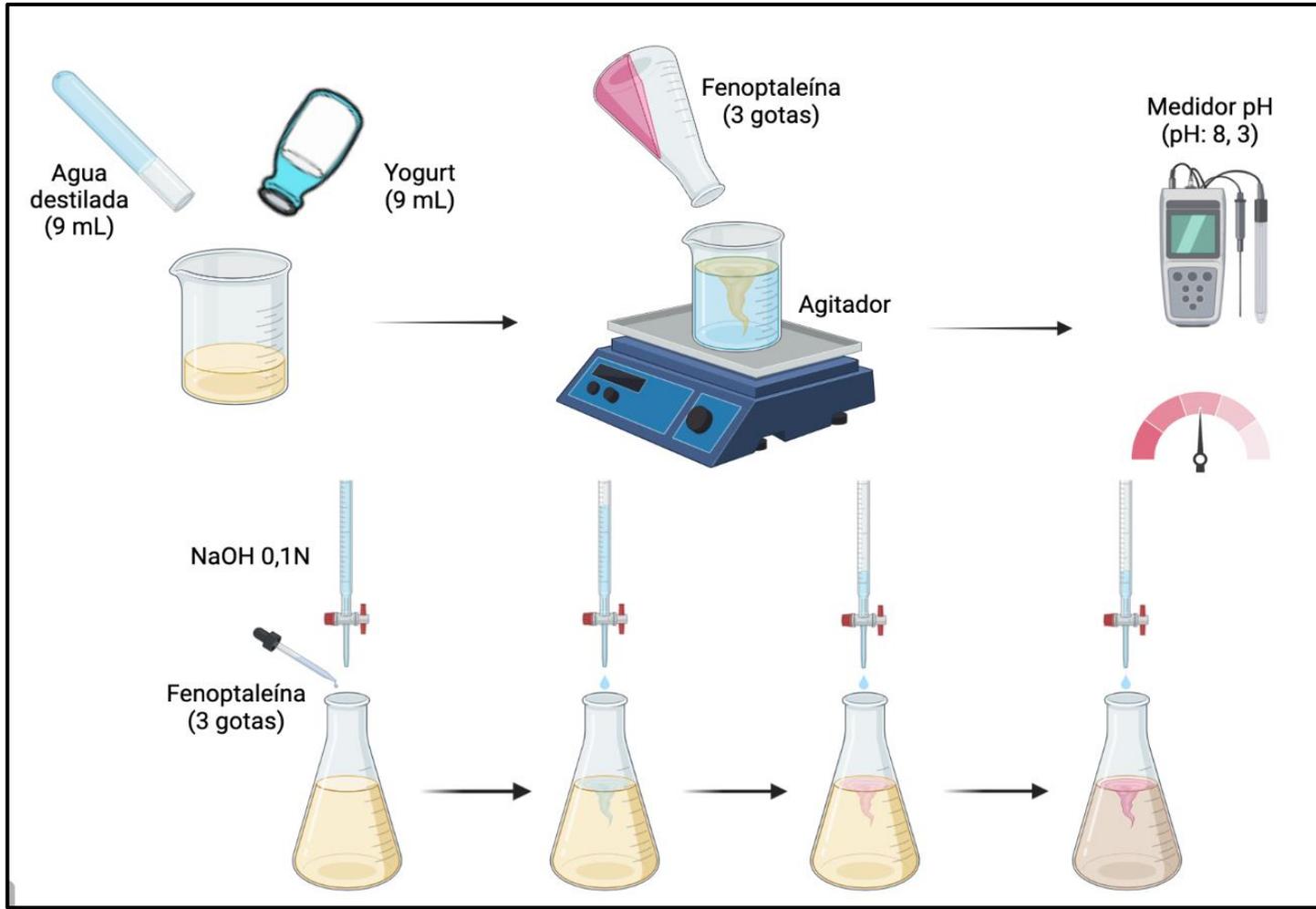
MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de yogurt con polen y miel



MATERIALES Y MÉTODOS

Producción de ácido láctico



- ✓ NTE INEN 19 → 1, 7, 14 y 21 días
- ✓ NTE INEN 2395:2011



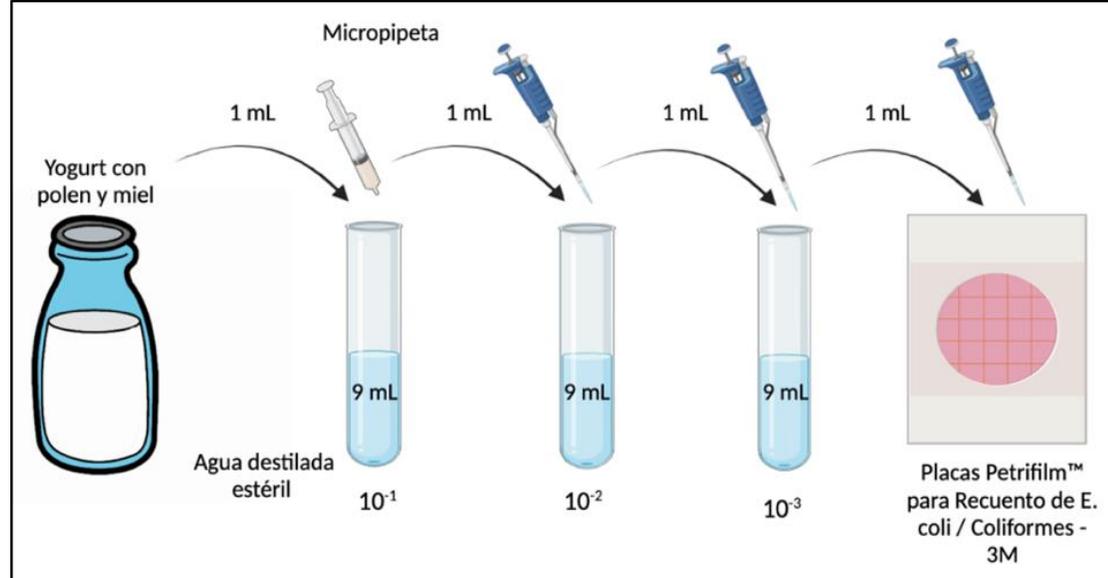
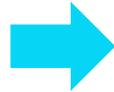
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Calidad microbiológica

MATERIALES Y MÉTODOS

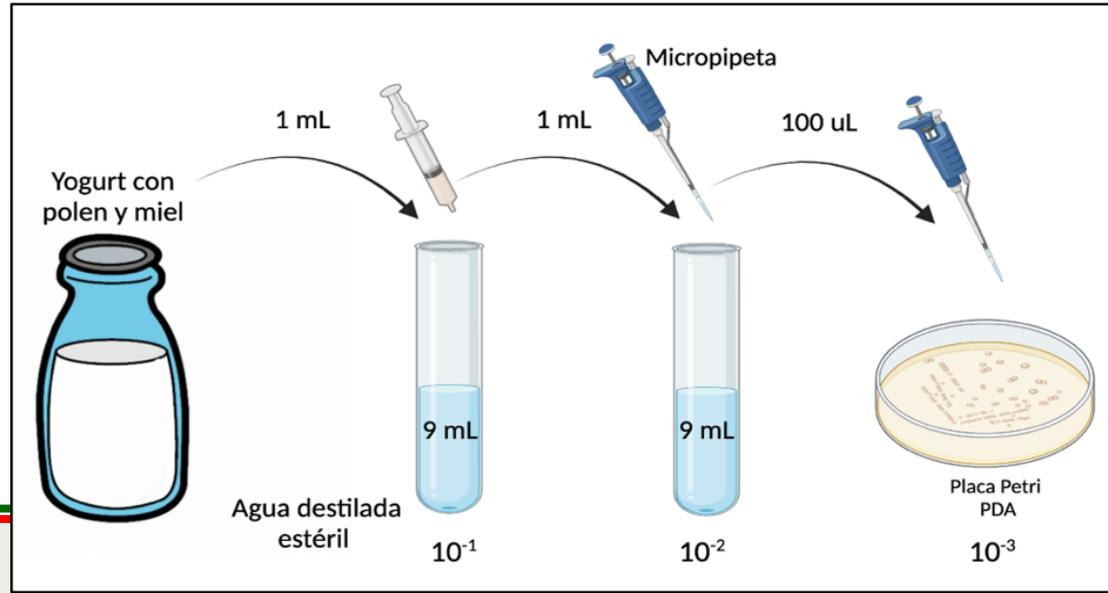
Día 1

Microorganismo	Placa Petrifilm 3M	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
<i>Staphilococcus 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



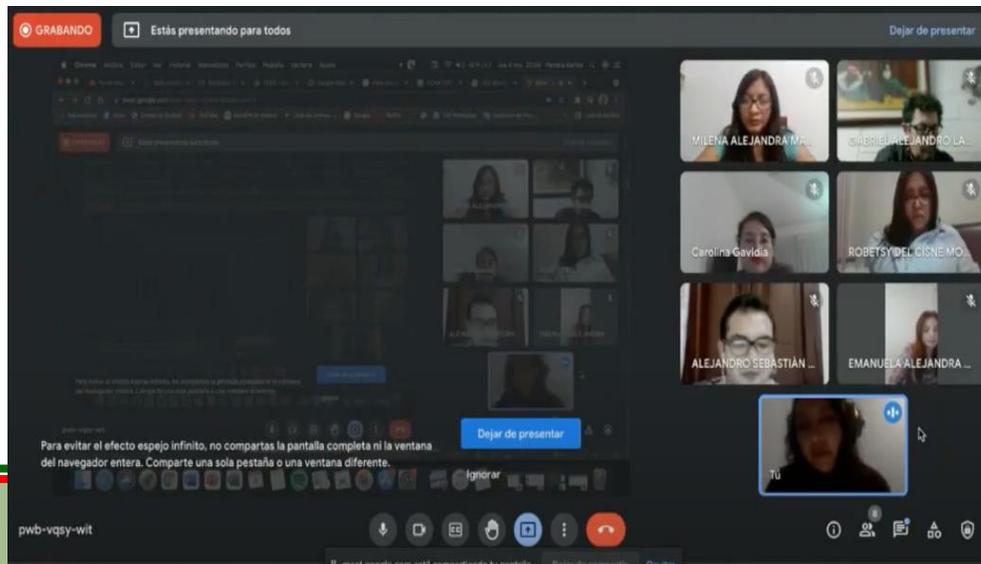
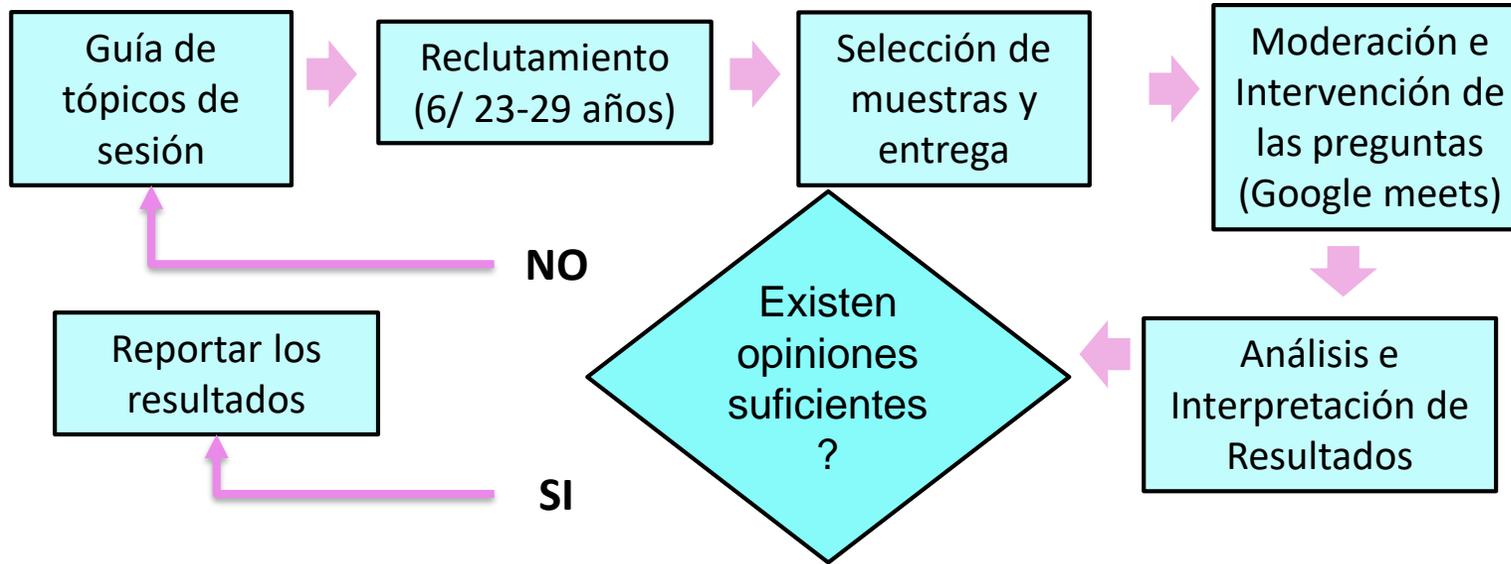
Día 21

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
Mohos y levaduras	Difco™ Potato Dextrose Agar -PDA (Ref. 254920)	37 °C ± 1	5 días



MATERIALES Y MÉTODOS

Aceptabilidad comercial del yogurt con polen y miel



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

Análisis Estadístico y variables medidas

Diseño Completamente al Azar (DCA)
con 3 repeticiones

- ❖ Producción de ácido láctico (° Dornic)
- ❖ Comparación de medias de Tukey al 5%
- ❖ Regresión lineal
- ❖ Software estadístico INFOSTAT

Norma Técnica Ecuatoriana
(NTE INEN 2395)

- ❖ Calidad microbiológica (UFC/g)
- ❖ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*,
mohos y levaduras

Gráficos de araña

- ❖ Aceptabilidad del yogurt
- ❖ Sabor, color, olor, textura y
apariencia general



Producción de ácido láctico

Tabla 1

Media ± Desviación estándar de la producción de ácido láctico total con siete tratamientos

Tratamientos	Ácido láctico (°D)
	Media ± D.E.
T1	83,75 ± 7,64 ^a
T2	78,25 ± 10,90 ^{ab}
T3	78,50 ± 6,95 ^{ab}
T4	72,08 ± 6,63 ^b
T5	82,08 ± 11,45 ^{ab}
T6	76,75 ± 10,6 ^{ab}
T7	74,83 ± 6,94 ^{ab}

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

Tabla 2

Media ± Desviación estándar de la producción de ácido láctico con siete tratamientos al día 21

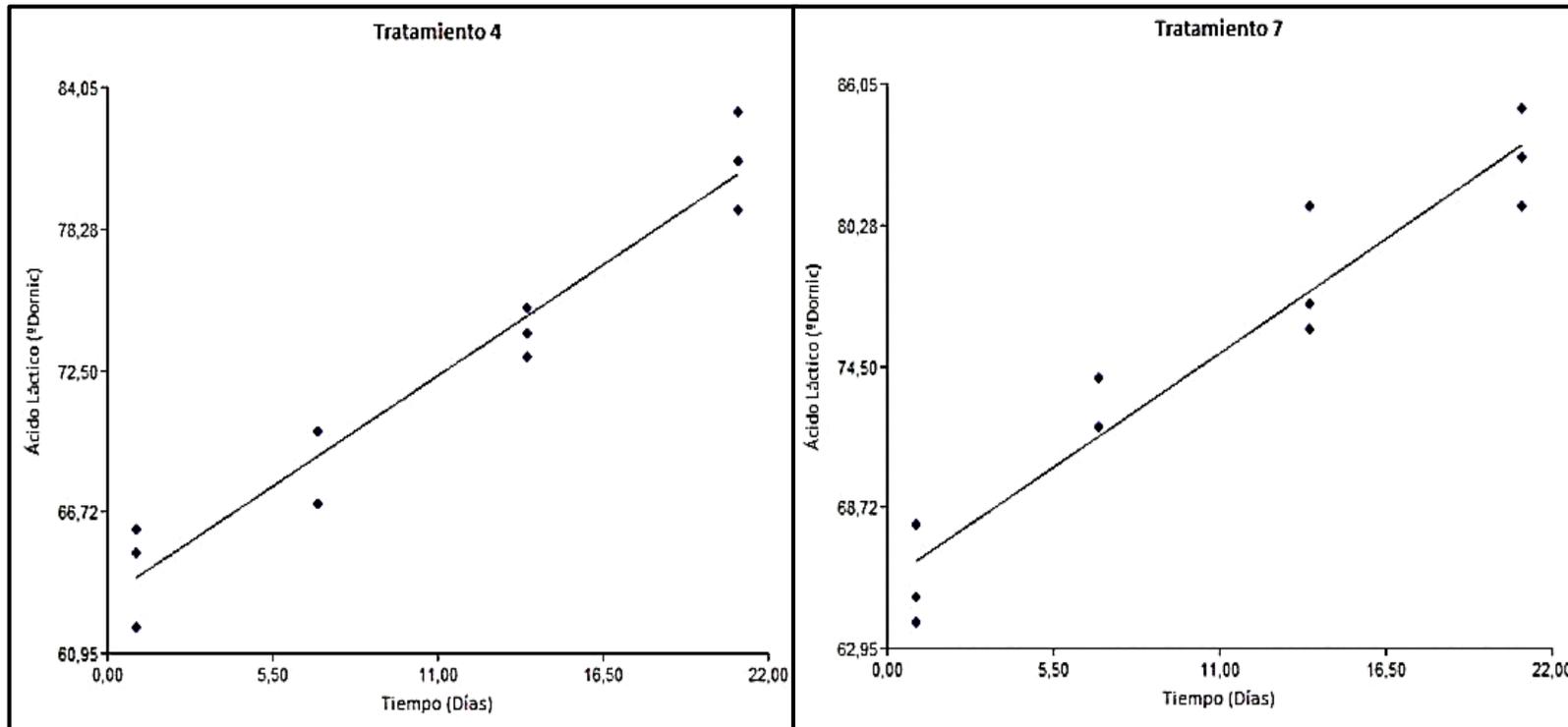
Tratamientos	Ácido láctico (°D)
	Media ± D.E.
T1	90,67 ± 1,15 ^b
T2	92,67 ± 2,52 ^b
T3	88,00 ± 1,73 ^b
T4	81,00 ± 2,00 ^c
T5	98,00 ± 1,73 ^a
T6	90,67 ± 0,58 ^b
T7	83,00 ± 2,00 ^c

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

Producción de ácido láctico

Figura 1

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



Norma INEN 2395: Valores de 85 – 95 °Dornic

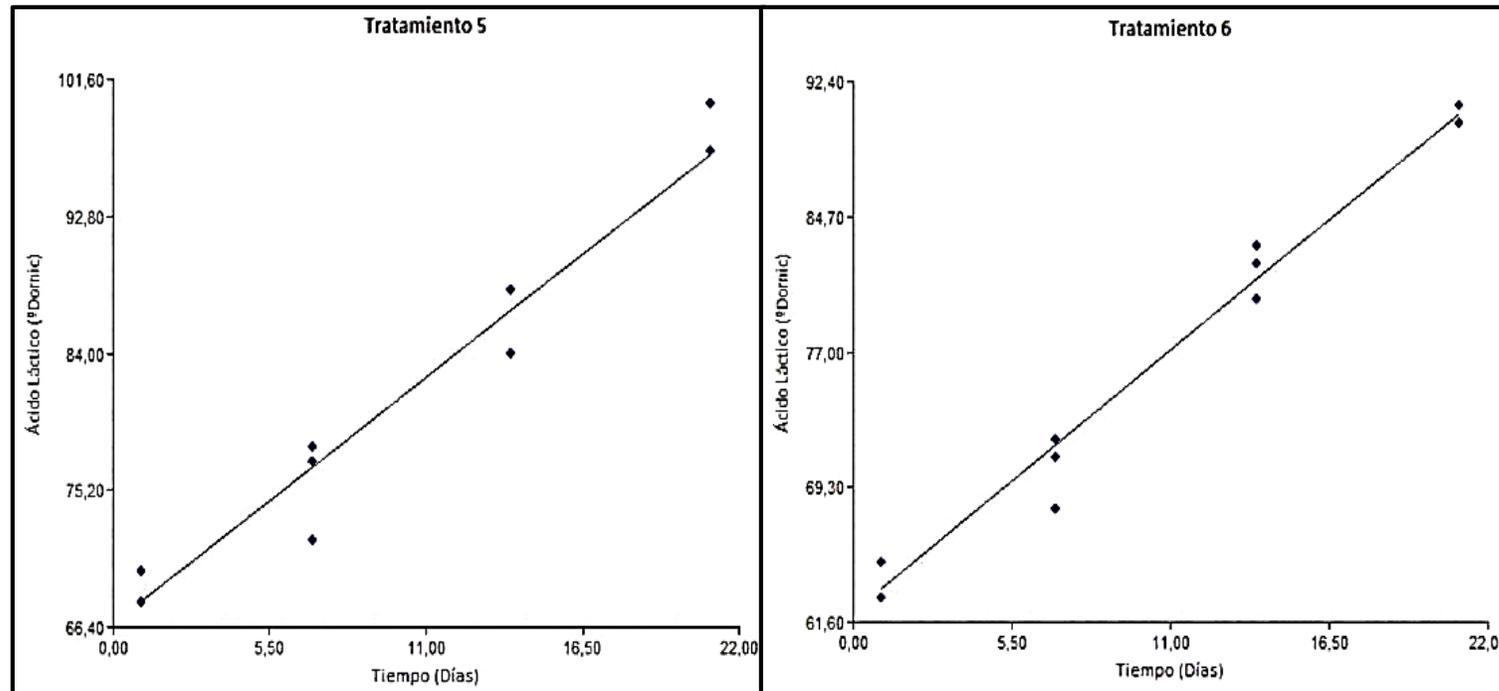
Alcívar (2017) y Gonzales (2006): Correlación positiva entre la producción de ácido láctico y el tiempo

Quezada (2020): Exceso de ácido láctico repercute negativamente en las propiedades organolépticas del yogurt

Producción de ácido láctico

Figura 2

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



Mora (2017): Los valores altos de °Dornic se relacionan con el proceso de fermentación que sufre el polen cuando las condiciones de agua son altas.

Cárdenas & Laporte (2008): La miel contiene levaduras (*Saccharomyces*) causantes de procesos fermentativos.

Producción de ácido láctico

Tabla 3

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

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



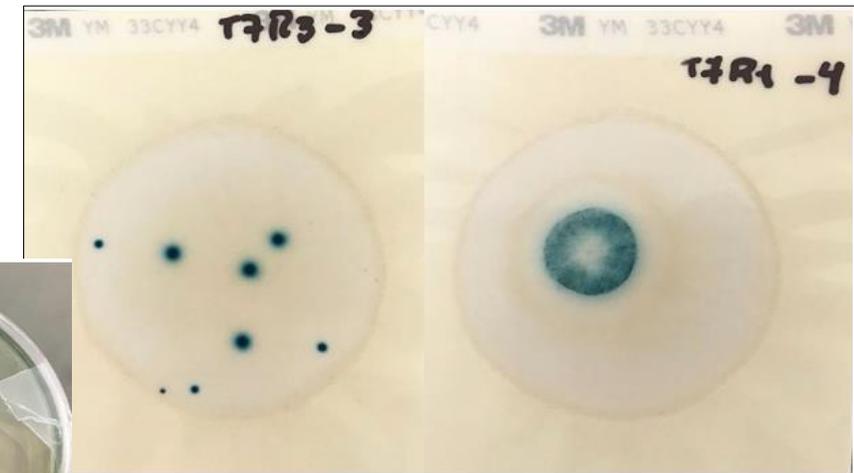
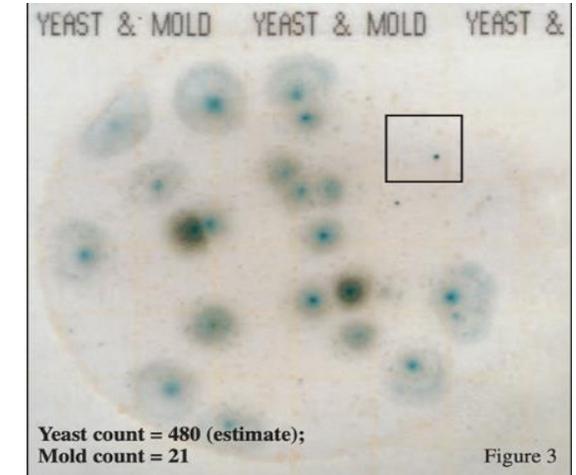
Calidad microbiológica

Recuento de mohos y levaduras

Tabla 4

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	1×10^{33}	$3,66 \times 10^5$	500
T2	0	0	0	5×10^3	
T3	0	0	0	0	
T4	0	0	$6,67 \times 10^2$	0	
T5	0	0	0	5×10^3	
T6	0	0	0	3×10^3	
T7	$1,71 \times 10^{32}$	0	$6,67 \times 10^2$	$1,7 \times 10^4$	



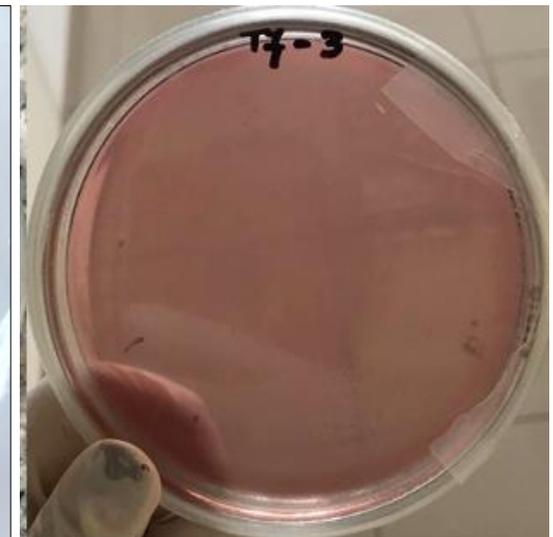
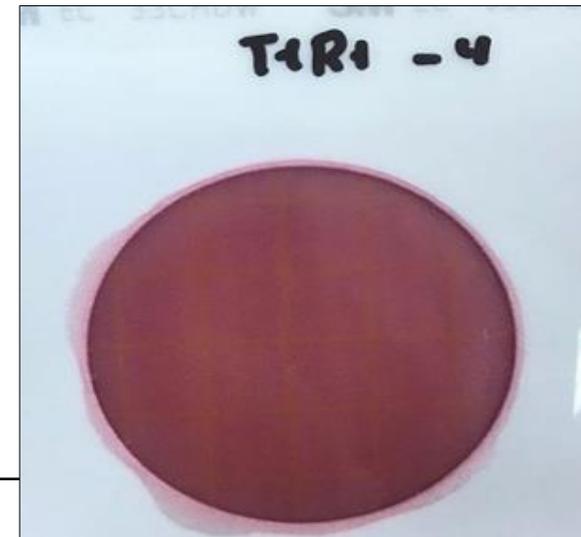
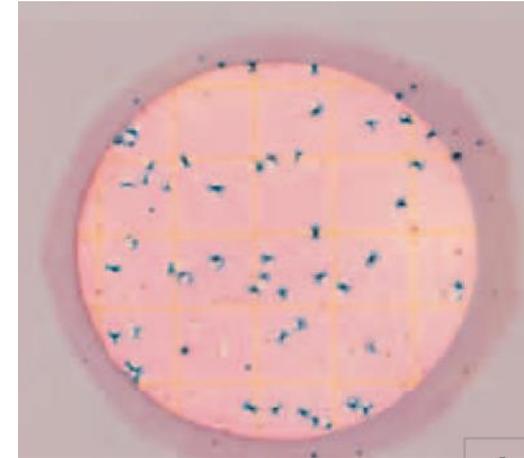
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de *Escherichia coli*

Tabla 5

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	



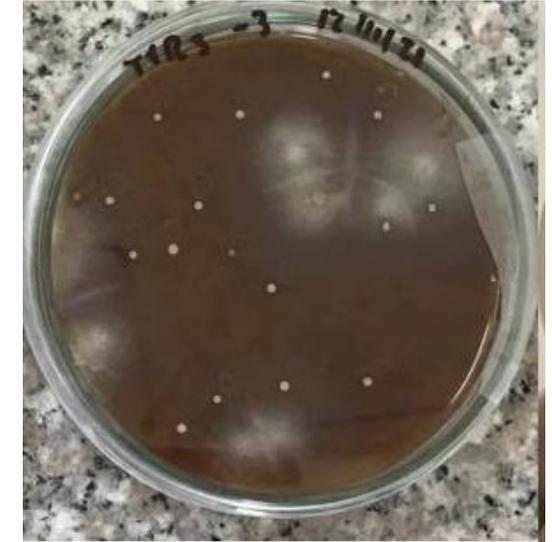
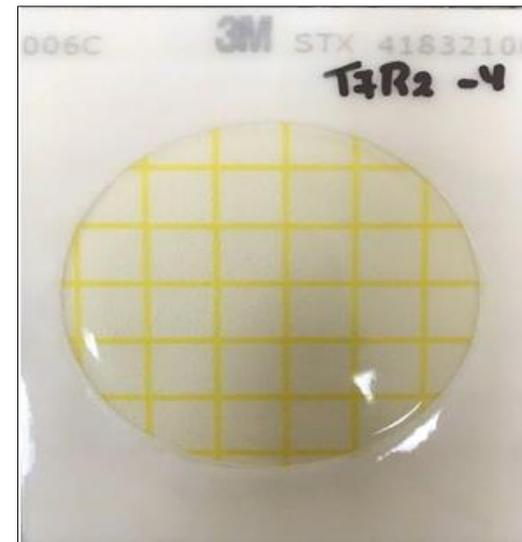
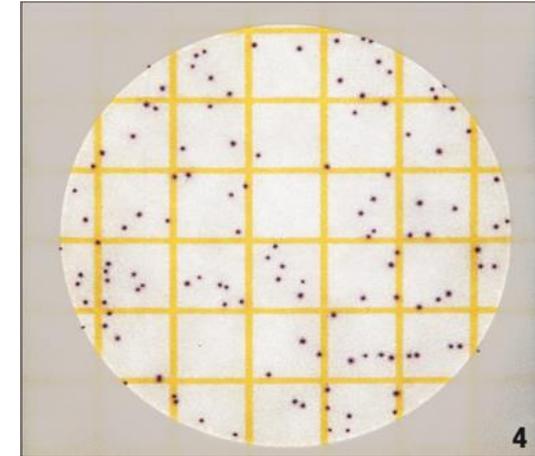
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de *Staphylococcus aureus*

Tabla 6

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

Tratamientos	<i>Staphylococcus 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	5×10^3	$6,4 \times 10^{31}$	



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aceptabilidad comercial

Figura 3

Características organolépticas del yogurt con polen y miel al día 1

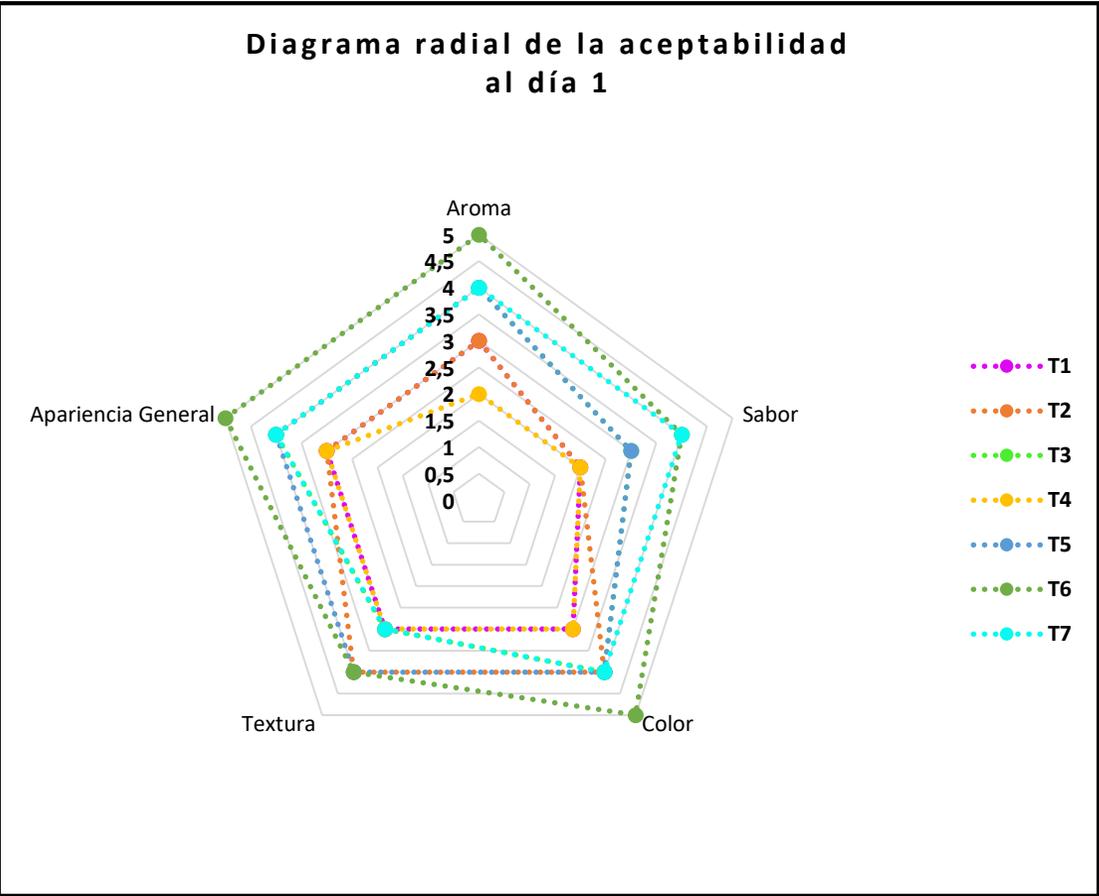
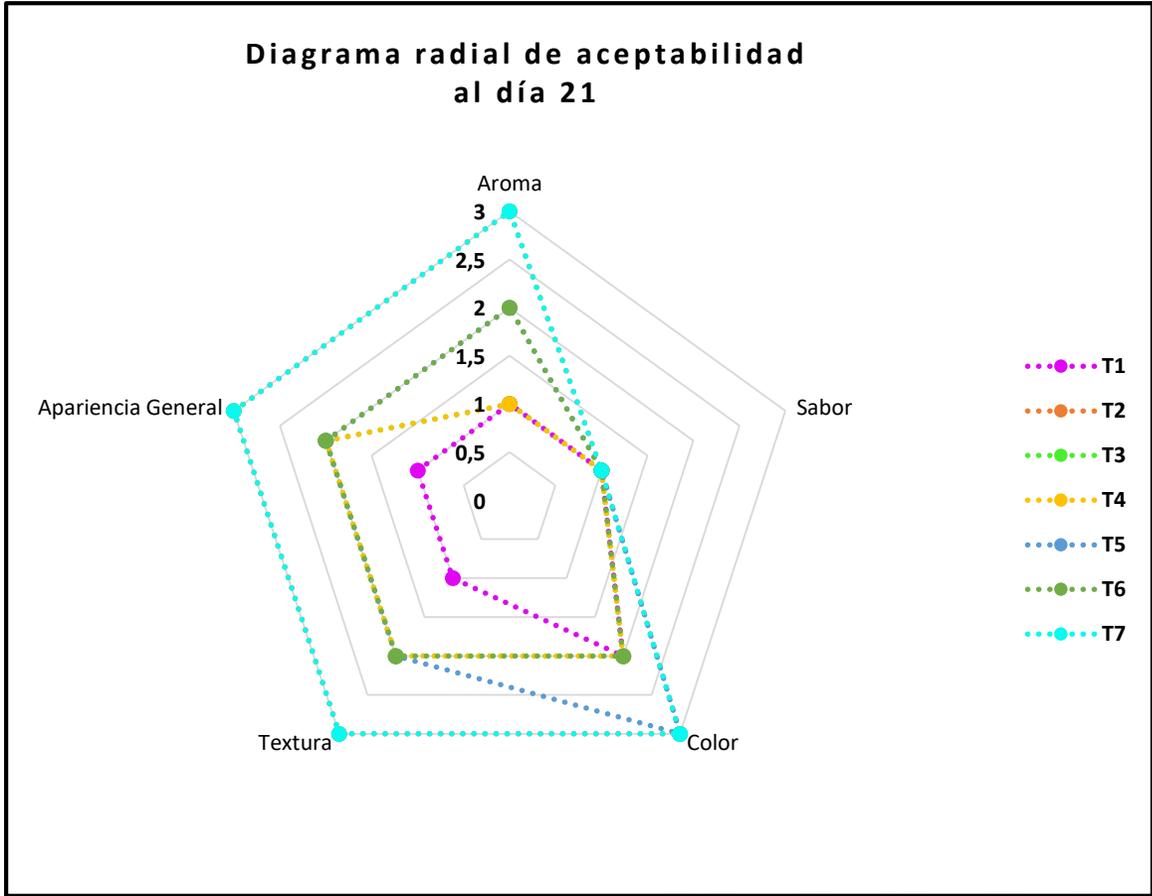
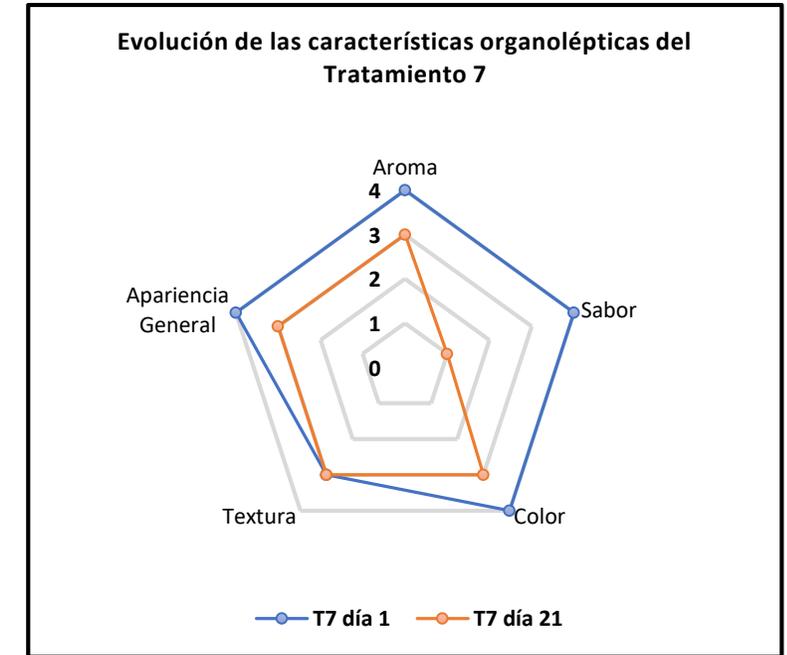
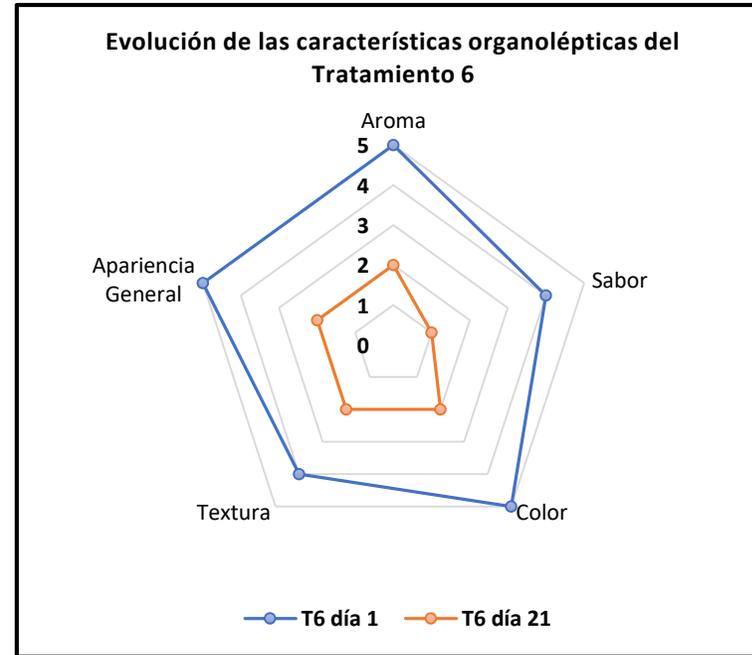
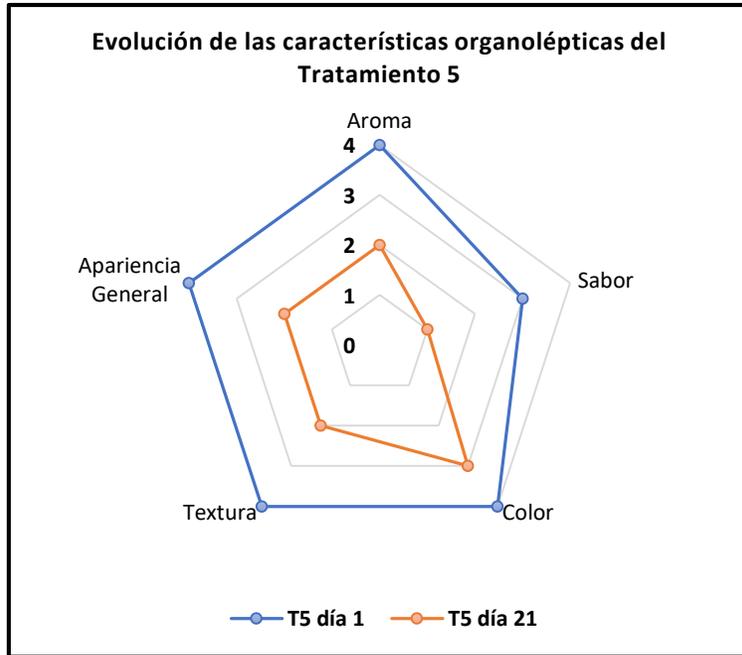


Figura 4

Características organolépticas del yogurt con polen y miel al día 21



Aceptabilidad comercial



Días & Paredes (2014): Dosis mayores de miel en yogurt no presentaron resultados satisfactorios.

Yapias y Bao (2012): Determinaron que los participantes prefieren las altas dosis de miel y polen en yogurt.

Díaz & Sosa (2004): El consumidor prefiere productos que proporcionen beneficios a la salud.

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.



CONCLUSIONES

- 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.



AGRADECIMIENTOS



Mgs. Gabriel Alejandro Larrea Cedeño

Ing. Ariana Drouet

Dr. Darwin Rueda

