



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: EFECTO DE SPIRULINA (*Arthrospira platensis*) SOBRE LA
VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN YOGUR
NATURAL EN LA HACIENDA “EL PRADO”**

AUTOR: PARRA ZAMORA, ANTONIO DAVID

DIRECTORA: VARGAS ARBOLEDA, MARTHA CECILIA

SANGOLQUÍ

2017

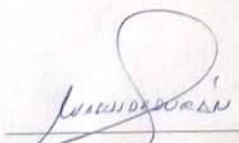


DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación *“EFECTO DE SPIRULINA (Arthrospira platensis) SOBRE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN YOGUR NATURAL EN LA HACIENDA “EL PRADO”* realizado por el señor *ANTONIO DAVID PARRA ZAMORA*, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, además el trabajo cumple con los requisitos teóricos, científicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor *ANTONIO DAVID PARRA ZAMORA* para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de septiembre de 2017


MARTHA CECILIA VARGAS ARBOLEDA
DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ANTONIO DAVID PARRA ZAMORA**, con cedula de identidad No. 1724382807, declaro que el trabajo de titulación ***“EFECTO DE SPIRULINA (*Arthrospira platensis*) SOBRE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN YOGUR NATURAL EN LA HACIENDA “EL PRADO”***, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respaldado los derechos de intelectuales de terceros considerándolos en las citas y bibliografías.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 9 de septiembre de 2017

ANTONIO DAVID PARRA ZAMORA

CC: 172438280-7



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **ANTONIO DAVID PARRA ZAMORA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la bibliografía virtual de la institución el presente trabajo de titulación “**EFEECTO DE SPIRULINA (Arthrospira platensis) SOBRE LA VIABILIDAD DE MICROORGANISMOS BENÉFICOS EN YOGUR NATURAL EN LA HACIENDA EL PRADO**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y mi responsabilidad.

Sangolquí, 9 de septiembre de 2017

ANTONIO DAVID PARRA ZAMORA

CC: 172438280-7

DEDICATORIA

A mi amada familia.

AGRADECIMIENTO

A Dios por el regalo de la existencia.

A mis padres y hermanas quienes han sido siempre mi fuente de fuerza y apoyo incondicional.

A la Ing. Martha Cecilia Vargas, quien supo guiarme durante este proceso con amabilidad, brindándome su confianza y conocimientos.

Al Dr. Juan Ortiz por la paciencia y colaboración constante durante este proceso.

A la Ing. Daysi Muñoz Sevilla, por ayudarme a mejorar mis competencias profesionales con la mejor actitud y cordialidad, su ayuda fue de gran importancia para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos por sus consejos.

Al Laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos como a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por todo lo aprendido a lo largo de la carrera.

Antonio Parra

ÍNDICE DE CONTENIDO

CARÁTULA

CERTIFICACIÓN	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 El Problema	3
1.2.1 Los Efectos	3
1.2.2 Las Causas	3
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Hipótesis	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Microalgas para el consumo humano	5
2.2 Composición química general	6
2.2.1 Proteína y aminoácidos	6
2.2.2 Carbohidratos	7
2.2.3 Lípidos	7

2.2.4	Vitaminas	8
2.3	Spirulina (<i>Arthrospira platensis</i>)	9
2.3.1	Generalidades	9
2.3.2	Posición taxonómica	10
2.4	Yogur	12
2.4.1	Fermentación láctica	12
2.4.2	Yogur como alimento funcional	12

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA		14
3.1	Ubicación del lugar de investigación	14
3.1.1	Ubicación ecológica	14
3.2	Materiales	14
3.2.1	Biológicos.....	14
3.2.2	Insumos de laboratorio	15
3.2.3	Equipos.....	15
3.2.4	Reactivos	16
3.3	Métodos.....	16
3.3.1	Elaboración del yogur.....	16
3.3.2	Acidez titulable	17
3.3.3	Conteo de bacterias ácido lácticas.....	18
3.3.4	Análisis sensorial.....	19
3.3.5	Análisis bromatológico	20
3.3.5.1	Proteína total	20
3.3.5.2	Grasa cruda.....	21
3.3.5.3	Azúcares totales	22
3.3.5.4	Cenizas	23
3.3.5.5	Sodio	24
3.3.6	Diseño experimental.....	24
3.3.6.1	Factores	24
3.3.6.2	Tratamientos a comparar	24

3.3.6.3	Tipo de diseño.....	24
3.3.6.4	Características de las Unidades Experimentales.....	25
3.3.6.5	Croquis del diseño.....	25
3.3.7	VARIABLES del estudio.....	25
3.3.8	Análisis estadístico.....	26
3.3.8.1	Esquema de análisis de varianza.....	26
3.3.8.2	Coefficiente de variación.....	26
3.3.8.3	Análisis funcional.....	26

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 28

4.1	Resultados.....	28
4.1.1	Viabilidad de bacterias ácido lácticas.....	28
4.1.2	Acidez titulable.....	29
4.1.2.1	pH durante la fermentación.....	29
4.1.2.2	Acidez titulable durante la fermentación.....	30
4.1.2.3	Acidez titulable durante almacenamiento refrigerado.....	32
4.1.3	Análisis sensorial.....	33
4.1.4	Análisis bromatológico.....	34
4.2	Discusión.....	35
4.2.1	pH durante la fermentación.....	35
4.2.2	Acidez titulable durante la fermentación.....	35
4.2.3	Acidez titulable durante el almacenamiento refrigerado.....	36
4.2.4	Viabilidad de bacterias ácido lácticas.....	36
4.2.5	Análisis sensorial.....	37
4.2.6	Análisis bromatológico.....	37

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 38

5.1	Conclusiones.....	38
5.2	Recomendaciones.....	38
5.3	Bibliografía.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estado de la producción de microalgas para 2006.....	5
Tabla 2	Composición química de algunas especies de microalgas y alimentos comunes (% de materia seca).....	6
Tabla 3	Perfil de aminoácidos de algunas especies de microalgas y alimentos comunes.	7
Tabla 4	Principales ácidos grasos polinsaturados de importancia	8
Tabla 5	Contenido de vitaminas en mg/kg de materia seca de microalgas, ingesta diaria sugerida (IDR) y otras fuentes comunes.	9
Tabla 6	Composición típica de <i>Arthrospira platensis</i> de la empresa Andes-Spirulina c.a	11
Tabla 7	ANAVA de yogur bajo tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> y cinco tiempos de almacenamiento refrigerado	28
Tabla 8	Promedio \pm E.E de muestras de yogur bajo tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> durante cinco tiempos de almacenamiento refrigerado	28
Tabla 9	Promedio \pm error estándar de UFC/ml de bacterias ácido lácticas en 5 tiempos de almacenamiento refrigerado	29
Tabla 10	Promedio \pm error estándar de pH de yogur durante 5 horas de fermentación	30
Tabla 11	Promedio \pm error estándar de % ac. Láctico en masa de yogur suplementado con tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> durante 5 horas de fermentación ..	31
Tabla 12	ANAVA del % de ácido Láctico en masa de yogur natural bajo 3 niveles de <i>Arthrospira platensis</i> y 5 tiempos de.....	32
Tabla 13	Promedio \pm error estándar del % ac. Láctico en masa de yogur suplementado con tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> durante 5 tiempos de almacenamiento.	33
Tabla 14	Promedio \pm error estándar de preferencia de yogur bajo tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i>	34
Tabla 15	Análisis bromatológico de dos muestras de yogur.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Arthrospira platensis</i>	10
Figura 2	Lugar de investigación (IASA I)	14
Figura 3	Elaboracion del yogur.....	17
Figura 4	Titulación de las muestras	18
Figura 5	Diluciones y plateo de las muestras de yogur.....	19
Figura 6	Conteo de (UFC/ml) de yogur	19
Figura 7	Prueba sensorial realizada en el IASA.....	20
Figura 8	Determinación de proteína total.....	21
Figura 9	Extracción de grasa cruda.....	22
Figura 10	proceso para determinación de azúcares totales	23
Figura 11	Determinación de cenizas mediante calcinación	23
Figura 12	Croquis del diseño experimental de la investigación	25
Figura 13	Esquema de procesos del proyecto de investigación.....	27
Figura 14	Promedio \pm error estándar de Log UFC/ml yogur bajo tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> durante 5 tiempos de almacenamiento refrigerado	29
Figura 15	Comportamiento pH de muestras de yogur bajo tres niveles de suplementación con <i>Arthrospira platensis</i> durante 5 horas de fermentación.....	30
Figura 16	Comportamiento del % ac. Láctico en masa de yogur suplementado con tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> durante 5 horas de fermentación. .	32
Figura 17	Promedio \pm error estándar del % ac. Láctico en masa de yogur suplementado con tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i> durante 5 tiempos de almacenamiento.	33
Figura 18	Promedio \pm error estándar de preferencia de yogur bajo tres niveles de <i>Arthrospira platensis</i>	34

RESUMEN

Los productos lácteos como el yogur son consumidos de forma regular por la población del Ecuador, esto debido a sus propiedades benéficas como el mejoramiento de la digestibilidad de la lactosa, aumento del valor nutritivo y promoción del equilibrio de la microbiota intestinal, proporcionada por las bacterias ácido lácticas; la viabilidad de estas bacterias tiene gran importancia en la funcionalidad de estos alimentos y su tiempo de vida útil. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres niveles de biomasa seca de *Arthrospira platensis* (0,025%; 0,050% y 0,075%) sobre la viabilidad de bacterias ácido lácticas y acidez titulable del yogur durante 28 días de almacenamiento refrigerado 5°C; también se determinó pH y acidez titulable durante la fermentación en intervalos de 1 h durante 5 h. El estudio se desarrolló en el laboratorio de Acuicultura y planta de Lácteos de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. El cultivo iniciador utilizado fue CHOOZIT™ 800 LYO que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. No se encontraron diferencias significativas para las variables estudiadas ($p > 0,05$), sin embargo la viabilidad de bacterias ácido lácticas y acidez titulable se mantuvieron sobre el requerimiento mínimo durante todo el ensayo.

PALABRAS CLAVE

- PROBIOTICOS
- *Arthrospira platensis*
- VIABILIDAD DE BACTERIAS
- YOGUR

ABSTRACT

Dairy products such as yogurt are consumed on a regular basis by the population of Ecuador because of their beneficial properties such as improved lactose digestibility, increased nutritional value and promoting balance of intestinal microbiota provided by acid lactic bacteria; the viability of lactic acid bacteria has a great importance in the functionality of these foods and their shelf life. The objective of this study was to evaluate the effect of three levels of dry biomass of *Arthrospira platensis* (0,025%; 0,050% and 0,075%) on the viability of lactic acid bacteria and titratable acidity of yogurt during 28 days of refrigerated storage at 5°C. The study was developed in the laboratory of Aquaculture and Dairy plant of the University of the Armed Forces - ESPE. pH and Titratable acidity were also measured during fermentation at intervals of 1 h for 5 h. The starter culture used was CHOOZIT™ 800 LYO containing strains of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. No significant differences were found for the studied variables, however the viability of lactic acid bacteria and titratable acidity were maintained over the minimum requirement throughout the test.

KEYWORDS

- PROBIOTICS
- *Arthrospira platensis*
- BACTERIA VIABILITY
- YOGHURT

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En Ecuador para el 2014, se registró un promedio de 5,6 millones de litros de leche diarios a nivel nacional. Las provincias más representativas son Azuay con 14,55 % y Pichincha con el 12,78 % (INEC, 2014); Según (FAO, 2003), por producto lácteo se entiende un “producto obtenido mediante cualquier elaboración de la leche, que puede contener aditivos alimentarios y otros ingredientes funcionalmente necesarios para la elaboración.

A nivel mundial se prevé un aumento en el consumo de estos productos a razón de 2% anual en países en vías de desarrollo, esto debido al aumento del poder adquisitivo de la población, crecimiento demográfico y acceso a mejores alternativas de conservación, no así en países desarrollados donde si bien se estima un aumento del consumo este será menor al 1% (OECD/FAO, 2013).

Entre estos tenemos a las leches fermentadas como el yogur, kéfir, leche acidófila, kumis entre otros; estos productos lácteos se obtienen a través de la fermentación láctica, por medio de la acción de microorganismos idóneos que producen cambios a nivel químico y físico precisamente en la textura y acidificación de los mismos (FAO, 2010).

En las últimas décadas con el constante mejoramiento de la calidad de los alimentos, tendencia al cuidado de la salud, así como los estudios científicos e investigación, los alimentos probióticos han ganado mayor relevancia. Según la FAO (2010) los probióticos se definen como “microorganismos viables que ingeridos en las cantidades apropiadas otorgan beneficios a la salud que superan las necesidades básicas nutricionales”.

La funcionalidad de estos microorganismos se ve afectada por diversos factores físico-químicos, relativos a la cepa probiótica, al alimento vehículo y al consumidor (Vinderola, Binetti, Burns, & Reinheimer, 2010). Uno de los más importantes factores para la calidad de estos es la viabilidad de los microorganismos desde su adición, hasta que llegan al consumidor; actualmente la normativa del INEN 2395:2011 con respecto a las leches fermentadas estipula que el conteo mínimo debe ser 10^7 UFC/g de producto.

La viabilidad de bacterias ácido lácticas se ve claramente influenciada por el tiempo de almacenamiento en refrigeración, en la mayoría de los casos viéndose disminuida, lo que denota la baja estabilidad de las cepas lácticas (Schillinger, 1999). Como alternativa frente a esto se han realizado varias investigaciones prometedoras en países como Turquía, Brasil e India en cuanto al uso de microalgas verde-azuladas y su capacidad para mantener la viabilidad de los cultivos probióticos (Baheshtipour, Mortazavian, Haratian , & Darani, 2012).

La utilización de microalgas para alimentación humana se condiciona a pocas especies debido al estricto control sobre seguridad alimentaria, factores comerciales, demanda del mercado y formulación específica, sin embargo la Organización de las Naciones Unidas resalta los beneficios nutricionales de las microalgas alimenticias como una ayuda eficaz para la reducción de la desnutrición en países en vías de desarrollo.

1.1 Justificación

Las leches fermentadas, entre estas el yogur, conforman un grupo de alimentos de ingesta regular en una dieta saludable, siendo claros exponentes dentro de los alimentos funcionales; sin embargo aún con el uso de conservantes y refrigeración (4-8°C) tienen una corta vida útil (28-35 días), tiempo durante el cual los microorganismos benéficos pierden viabilidad, lo que evidencia la necesidad de métodos para la conservación de la misma (Siro , Kopolna, & Lugasi, 2008); En Ecuador estos productos se consumen desde la década de los 60 dándose un proceso de industrialización, diversificación y consumo creciente hasta la actualidad (Vizcarra, 2015)

El artículo 9 de la LEY ORGÁNICA DEL RÉGIMEN DE LA SOBERANÍA ALIMENTARIA manifiesta: “El Estado asegurará y desarrollará la investigación científica y tecnológica en materia agroalimentaria, que tendrá por objeto mejorar la calidad nutricional de los alimentos, la productividad, la sanidad alimentaria, así como proteger y enriquecer la agrobiodiversidad.”

Las microalgas han sido consumidas por los seres humanos durante milenios y actualmente es una industria creciente que produce miles de toneladas de biomasa al año, específicamente en el ámbito nutricional se producen especies de los géneros *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella*, esto debido a su producción de moléculas de alto

valor como ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), alto contenido de proteína, vitaminas y pigmentos. (Spolaore, Joannis-Cassan , Duran , & Isambert, 2006); Actualmente en Ecuador no existen estudios de investigación que relacionen el efecto de la biomasa de microalgas sobre el valor nutricional y la viabilidad de bacterias lácticas en yogur

1.2 El Problema

La pérdida progresiva de cualidades nutritivas y organolépticas del yogur natural sin conservantes, debido a la post acidificación y la disminución de la viabilidad de sus microorganismos benéficos. Esto limita su tiempo de vida útil, lo que repercute de forma adversa en los efectos benéficos sobre el consumidor.

1.2.1 Los Efectos

- Alteración de las cualidades nutritivas y organolépticas.
- Reducción del tiempo de vida útil del producto.
- Disminución en la adquisición de este tipo de alimentos.
- Pérdida de los efectos benéficos sobre el consumidor.

1.2.2 Las Causas

- Largos periodos de almacenamiento y ruptura de la cadena de frío.
- Cepa probiótica utilizada en la fabricación del yogur.
- Propiedades fisicoquímicas del alimento vehículo.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes dosis de Spirulina (*Arthrospira platensis*) en la viabilidad de microorganismos benéficos del yogur natural en la Hcda, El Prado.

1.3.2 Objetivos específicos

Evaluar en campo dosis respuesta de bacterias ácido lácticas con la inclusión de tres niveles de *Arthrospira platensis* (0.025%,0.050% y 0.075%) y 5 tiempos de almacenaje de yogur natural.

Determinar la acidez titulable de las muestras durante 5 tiempos de almacenamiento.

Analizar la calidad de yogurt bajo el mejor tratamiento mediante una prueba sensorial y otra bromatológica.

1.4 Hipótesis

H0: La adición de spirulina (*Arthrospira platensis*) a los procesos fermentativos en la fabricación de yogur natural mantiene la viabilidad de microorganismos benéficos y la vida útil de yogur natural durante su almacenamiento.

H1: La adición de spirulina (*Arthrospira platensis*) a los procesos fermentativos en la fabricación de yogur natural mejora la viabilidad de microorganismos benéficos e incrementa la vida útil de yogur natural durante su almacenamiento.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Microalgas para el consumo humano

Las microalgas son organismos fotosintéticos muy diversos en cuanto a forma, tamaño y especies, muy adaptables a diferentes hábitats y latitudes geográficas; representan un importante recurso bioacuático con diversas aplicaciones ligadas a la biotecnología azul tales como farmacéuticos, nutraceuticos, energía, remediación ambiental, agricultura, alimentación humana y animal.

En el ámbito nutricional se tiene conocimiento del gran potencial de estos organismos ya que presentan perfiles bioquímicos con altas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido α -linoleico, ácido araquidónico, y ácido eicosapentanoico; además de proteína de alta calidad y pigmentos antioxidantes (Kent, Welladsen, Mangott, & Li, 2015).

A principios de los años 50's comenzaron los estudios acerca de las microalgas como futura fuente de sustitución proteica, esto con motivo de la alta tasa de crecimiento poblacional, conforme las décadas avanzaron las producciones a larga escala comenzaron a aparecer principalmente en Asia con la primera planta de *Chlorella vulgaris* en Japon, y después en México se comenzó con la extracción y producción de *Arthrospira platensis* del lago Texcoco (Spolaroe *et al.*, 2006).

Tabla 1
Estado de la producción de microalgas para 2006

Microalga	Producción anual	País	Aplicaciones y productos
<i>Arthrospira</i>	3000 t peso seco	China, India, USA, Myanmar, Japan	Nutrición humana y animal, cosméticos ficobilioroteinas
<i>Chlorella</i>	2000 t peso seco	Taiwan, Alemania, Japan	Nutrición humana, acuicultura, cosméticos
<i>Dunaliella salina</i>	1200 t peso seco	Australia, Israel, USA, China	Nutrición humana, cosmeticos, β -caroteno
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 t peso seco	USA	Nutrición humana
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 t DHA aceite	USA, India, Israel	Acuicultura, astaxantina
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 t DHA aceite	USA	DHA aceite
<i>Shizochytrium</i>	10 t DHA aceite	USA	DHA aceite

Fuente: (Spolaroe *et al.*, 2006).

La biomasa obtenida en forma de polvo a escala industrial permite una amplia diversificación de productos basados en microalgas, la presentación más común y mejor aceptada comercialmente es en forma de comprimidos, encapsulados, extractos, suplementos solubles, además también existen productos más elaborados como pan, pasta, galletas, chocolates entre otros (Chacón-lee & González-Mariño, 2010).

2.2 Composición química general

Las microalgas son capaces de acumular y sintetizar una amplia gama de compuestos nutritivos y de interés comercial para la industria alimenticia, ya sea como aditivo para alimentos funcionales y nutraceuticos o para su consumo directo; sin embargo el tipo y cantidad de estas sustancias dependerá de varios factores tales como como: temperatura, pH, nutrientes, intensidad de radiación y fotoperiodo (Becker , 2007).

Tabla 2
Composición química de algunas especies de microalgas y alimentos comunes (% de materia seca)

Microoaga	Proteína	Carbohidratos	Lípidos
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra sp.</i>	6-20	33-64	11-21
<i>Arthrospira máxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
Carne	43	1	34
Soya	37	30	20
Levadura	39	38	1

Fuente: (Becker, 2007., Spolaroe *et al.*, 2006)

2.2.1 Proteína y aminoácidos

La mayoría de microalgas presentan altas cantidades de proteína, sin embargo los datos obtenidos usualmente se sobreestiman ya que existen otros compuestos nitrogenados como ácidos nucleicos, glucosaminas, aminos y otros compuestos

presentes en la pared celular, sin embargo los niveles proteicos de las microalgas en general son superiores a los de muchos alimentos convencionales; en cuanto al contenido de aminoácidos las microalgas presentan valores favorables comparados con alimentos convencionales y los contenidos recomendados por la FAO/WHO para 100 g de proteína, con excepción de aminoácidos sulfurados como cisteína y metionina que se presentan en cantidades menores (Becker , 2007).

Tabla 3
Perfil de aminoácidos de algunas especies de microalgas y alimentos comunes

Source	Ile	Leu	Val	Lys	Phe	Tyr	Met	Cys	Try	Thr	Ala	Arg	Asp	Glu	Gly	His	Pro	Ser
WHO/FAO	4.0	7.0	5.0	5.5	6.0			3.5	1.0									
Egg	6.6	8.8	7.2	5.3	5.8	4.2	3.2	2.3	1.7	5.0	–	6.2	11.0	12.6	4.2	2.4	4.2	6.9
Soybean	5.3	7.7	5.3	6.4	5.0	3.7	1.3	1.9	1.4	4.0	5.0	7.4	1.3	19.0	4.5	2.6	5.3	5.8
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.8	8.8	5.5	8.4	5.0	3.4	2.2	1.4	2.1	4.8	7.9	6.4	9.0	11.6	5.8	2.0	4.8	4.1
<i>Dunaliella bardawil</i>	4.2	11.0	5.8	7.0	5.8	3.7	2.3	1.2	0.7	5.4	7.3	7.3	10.4	12.7	5.5	1.8	3.3	4.6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3.6	7.3	6.0	5.6	4.8	3.2	1.5	0.6	0.3	5.1	9.0	7.1	8.4	10.7	7.1	2.1	3.9	3.8
<i>Arthrospira maxima</i>	6.0	8.0	6.5	4.6	4.9	3.9	1.4	0.4	1.4	4.6	6.8	6.5	8.6	12.6	4.8	1.8	3.9	4.2
<i>Spirulina platensis</i>	6.7	9.8	7.1	4.8	5.3	5.3	2.5	0.9	0.3	6.2	9.5	7.3	11.8	10.3	5.7	2.2	4.2	5.1
<i>Aphanizomenon sp.</i>	2.9	5.2	3.2	3.5	2.5	–	0.7	0.2	0.7	3.3	4.7	3.8	4.7	7.8	2.9	0.9	2.9	2.9

Fuente: (Becker , 2007)

2.2.2 Carbohidratos

Generalmente los productos alimenticios o suplementos incluyen la biomasa total de microalgas, por consiguiente incluyen otros compuestos como almidón, celulosa, azúcares y otros polisacáridos; en un estudio realizado por (Templeton, Quinn, Van Wychen, Hyman, & Laurens, 2012) en el que evaluó el contenido de polisacáridos de dos productos comerciales a base de *Chlorella* y *Arthrospira* a través de varias técnicas cromatográficas identificaron 11 polisacáridos distintos; según (Becker , 2007) la digestibilidad total de las especies comúnmente comercializadas es buena de modo que no existe limitación en su uso total.

2.2.3 Lípidos

Esta fracción química tiene gran importancia en el cultivo de microalgas, debido a sus aplicaciones energéticas como biocombustibles y biogás, además de moléculas de alto valor para la industria alimenticia y médica; sin embargo los lípidos totales extraídos con solventes lipofílicos como cloroformo o metanol, se componen de varios grupos de compuestos con diferentes aptitudes (Becker , 2007).

De tal forma, se tienen en primer lugar lípidos no polares en su mayoría triglicéridos y ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) con aplicaciones orientadas a la producción de biodiesel; lípidos polares donde se pueden identificar fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos; entre éstos se han identificado ácidos grasos en el rango de C12–C22 donde podemos encontrar ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) utilizados en la formulación de suplementos nutritivos para bebés e infantes; finalmente tenemos pigmentos y esteroides como β -caroteno y luteína que funcionan como antioxidantes empleados en nutrición animal (Sharma, Singh, & Korstad, 2011).

Tabla 4
Principales ácidos grasos polinsaturados de importancia

PUFA	Aplicaciones	Especies
Ácido γ -linoleico (GLA)	Fórmulas para lactantes y suplementos nutricionales	<i>Arthrospira</i>
Ácido araquidónico (AA)	Fórmulas para lactantes, prematuros y suplementos nutricionales	<i>Porphyridium</i>
Ácido eicosapentanoico (EPA)	Suplementos nutritivos y acuicultura	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Nitzschia</i>
Ácido docosahexaenoico (DHA)	Fórmulas para lactantes, prematuros, suplementos nutricionales y acuicultura	<i>Cryptocodinium</i> , <i>Schizochytrium</i>

Fuente: (Spolaroe *et al.*, 2006).

2.2.4 Vitaminas

La mayoría de microalgas contienen vitaminas lipofílicas e hidrofílicas cuya presencia valoriza el contenido nutrimental de la biomasa en suplementos y alimentos, algunas de estas vitaminas como la vitamina C, B₁ y B₂ son propensas a degradarse si el secado de la biomasa se realiza a altas temperaturas (Becker, 2007).

Tabla 5
Contenido de vitaminas en mg/kg de materia seca de microalgas, ingesta diaria sugerida (IDR) y otras fuentes comunes

Fuente	Vit A	Vit B ₁	Vit B ₂	Vit B ₆	Vit B ₁₂	Vit C	Vit E	Nicotinato	Biotina	Ácido fólico	Ácido pantoténico
RDI(mg/d)	1,7	1,5	2	2,5	0,005	50	30	18	-	0,6	8
Hígado	60	3	29	70	0,65	310	10	136	1	2,9	73
Espinaca	130	0,9	1,8	1,8	-	470		5,5	0,007	0,7	2,8
Levadura de panadería	traza	7,1	16,5	21	-	traza		4	5	53	
<i>A. platensis</i>	840	44	37	3	7	80		-	0,3	0,4	13
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>		4,8	57,3	11,1	8	0,7		0,1	0,3	1	6,8
<i>C. pirenoidosa</i>	480	10	36	23	-	-		240	0,15	-	20
<i>S. cuadricauda</i>	554	11,5	27	-	1,1	396		108	-	-	46

Fuente: (Becker , 2007)

2.3 Spirulina (*Arthrospira platensis*)

2.3.1 Generalidades

Es una microalga multicelular perteneciente a la clase Cyanophyceae , tiene forma helicoidal y llega a medir hasta 200 milimicrones, su reproducción se da por fisión binaria transversal; se encuentra en zonas tropicales de todo el mundo en cuerpos de agua muy alcalinos (pH 11); *Arthrospira platensis* y *Arthrospira máxima* las especies utilizadas en nutrición animal y humana solían estar incluidas dentro del género *spirulina* hasta que en 1980 se las separó al encontrarse diferencias morfológicas y fisiológicas entre sí, sin embargo el término spirulina es comúnmente utilizado para referirse a estas o sus productos derivados (Vonshak, 1997).

En el contexto de la alimentación humana este microorganismo contiene gran variedad de nutrientes, como vitaminas, minerales, altos valores de proteína complementados con aminoácidos esenciales; su fracción lipídica almacena ácidos grasos omega, además de sus pigmentos antioxidantes como clorofila, β -caroteno y ficocianina (Ramírez & Olvera, 2006).

Esta especie de cianobacteria procarionta también ha denotado su posible uso dentro del sector de la salud; (Hernandez, Khandual, & López, 2016) encontraron que extractos de *Arthrospira sp.* tienen un efecto citotóxico sobre líneas celulares de leucemia en humanos; por otro lado existen estudios sobre un polisacárido sulfatado llamado (Ca-SP)

que posee actividad antiviral e inmunoreguladora (Hernández-Corona, Nieves, Meckes, Chamorro & Barron, 2002); Por estas cualidades *Arthrospira platensis* representa una interesante opción en el desarrollo y manufactura de alimentos funcionales y nutraceuticos, en respuesta a la situación de salud y nutrición mundial.

2.3.2 Posición taxonómica

Dominio	Bacteria
Filo	Cyanobacteria
Clase	Cyanophyceae
Subclase	Oscillatoriophycideae
Orden	Oscillatoriales
Familia	Phormidiaceae
Subfamilia	Phormidioideae
Genero	<i>Arthrospira</i>

(Vonshak, 1997)



Figura 1 *Arthrospira platensis*

Fuente: (RAAE, 2016)

Tabla 6
Composición típica de *Arthrospira platensis* de la empresa Andes-Spirulina c.a.

Nutrientes generales	%	Aminoácidos Esenciales	g/kg
Proteínas	50-68	Histidina	13
Carbohidratos	15-20	Isoleucina	34
Lípidos	5-7	Leucina	50
Minerales	7-9	Lisina	28
Humedad	5-7	Metionina	14
Vitaminas	mg/kg	Fenilalanina	27
Beta-caroteno (ProvitA)	1900	Treonina	30
Vitamina E (Tocoferol)	100	Triptofano	9
Vitamina B1 (Tiamina)	40	Valina	39
Vitamina B2 (Riboflavina)	38	Aminoácidos no Esenciales	g/kg
Vitamina B3 (Niacina)	155	Alanina	47
Vitamina B5 (Ácido pantoténico)	8	Arginina	45
Vitamina B6 (Piridoxina)	6	Ácido Aspártico	67
Vitamina B12 (Cobalamina)	2	Cistina	5
Ácido Fólico	0,4	Ácido Glutámico	88
Biotina	0,4	Glicina	32
Minerales	mg/kg	Prolina	26
Calcio	5000	Serina	29
Magnesio	4400	Tirosina	27
Potasio	12000	Pigmentos	mg/kg
Hierro	900	Carotenoides	4000
Fósforo	8000	Ficocianina	132500
Sodio	6500	Clorofila	10200
Zinc	33	Enzimas	mg/kg
Cobre	10	Superoxido dismutasa	40
Manganeso	40	Ácidos Grasos Esenciales	mg/kg
Cromo	2	Ácido Linoleico	10450
Selenio	1	Ácido Gamma-linolénico	10633

(Andes-Spirulina c.a., 2016)

2.4 Yogur

Su descubrimiento se atribuye a tribus del oeste asiático de la zona del Cáucaso, quienes al almacenar leche en bolsas fabricadas con estómagos de cabras consiguieron productos fermentados, pero fueron pastores búlgaros y nómadas quienes en el siglo XVII lo llevaron a Europa; sin embargo no fue hasta principios del siglo XX que se realizó el primer estudio científico sobre yogur (Vizcarra, 2015)

Específicamente en el Ecuador su comercialización se realiza por primera vez en los años 80 por la empresa Ecuatoriana Toni S.A. la cual comienza a diversificar el producto en presentaciones como bebible, con frutas y finalmente con una cepa de *Lactobacillus*; hoy en día el consumo de yogur en diferentes presentaciones aumenta en Ecuador con motivo de la tendencia mundial a la alimentación saludable (Vizcarra, 2015)

Actualmente y según la norma (NTE INEN 2395, 2011) para leches fermentadas se define al yogur como: “El producto coagulado obtenido por fermentación láctica de la leche o mezcla de esta con derivados lácteos, mediante la acción de bacterias *lácticas* *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus salivaris* subsp. *thermophilus*, pudiendo estar acompañadas de otras bacterias benéficas que por su actividad le confieren las características al producto terminado; estas bacterias deben ser viables y activas desde su inicio y durante toda la vida útil del producto. Puede ser adicionado o no de los ingredientes y aditivos indicados en esta norma.”

2.4.1 Fermentación láctica

Es el proceso principal en la elaboración del yogur y se da cuando la lactosa de la leche se transforma en moléculas más simples y digestibles como ácido láctico y pequeñas cantidades de productos secundarios como ácidos grasos volátiles, esto por medio de las enzimas producidas por bacterias ácido lácticas en este caso *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, a este proceso también se lo llama acidificación.

2.4.2 Yogur como alimento funcional

La primera vez que se hizo alusión a los alimentos funcionales fue en Japón en 1980, bajo una iniciativa nacional de reducir los altos costos médicos por medio del estudio y categorización de alimentos con efectos sobre la salud, así en 1991 se creó el

concepto de (FOSHU) Foods for Specific Health Use; a la vez que en Europa, el primer documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales fue elaborado por un grupo de expertos, según el cual "un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable" (Ashwell, 2002).

En este contexto el yogur presenta cualidades como alimento vehículo para probióticos y metabolitos producto de la fermentación láctica asociados con efectos positivos para la salud como el mantenimiento de la flora intestinal normal, estimulación del sistema inmune, reducción de la intolerancia a la lactosa, reducción del colesterol, actividad anticancerígena etc. (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Ubicación del lugar de investigación

El proyecto se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Acuicultura y Recursos Acuáticos y la planta de producción de Lácteos perteneciente a la carrera Ingeniería Agropecuaria IASA 1 Hacienda “El Prado”, ubicados políticamente en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando y localizado geográficamente a una longitud de $78^{\circ}24'51.79''\text{O}$ y una latitud de $0^{\circ}23'1.99''\text{S}$ y altitud de 2722 m.s.n.m.



Figura 2 Lugar de investigación (IASA I)
Fuente: Google Maps, (2017).

3.1.1 Ubicación ecológica

El laboratorio de Recursos Acuáticos se encuentra a 2748 m.s.n.m. y cuenta con los siguientes datos meteorológicos (Arce, 2017):

- Zona de vida: Bosque húmedo Montano
- Luminosidad: 12 horas luz
- Temperatura media: $13,89^{\circ}\text{C}$
- Precipitación anual: 1285 mm/año

3.2 Materiales

3.2.1 Biológicos

- Biomasa seca de *Arthrospira platensis*.
- Fermento láctico CHOOZIT™ 800 LYO (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*).

3.2.2 Insumos de laboratorio

- 12 jarras plásticas de 1 L con tapa
- Cooler
- 5 jeringas plásticas de 10 ml
- Tijeras
- Parafilm
- 500 cajas Petri plásticas
- 1 Pipeta pasteur de plástico
- Puntas de pipeta de 1000 μ l
- Puntas de pipeta de 5000 μ l
- 1 Vaso de presentación de 500 ml
- 10 matraces Erlenmeyer de 250 ml
- 1 Soporte
- 1 Bureta de 100 ml
- 6 frascos tapa rosca de 500 ml
- 1 Probeta de 100 ml
- 1 Probeta de 50 ml
- 4 probetas de 25 ml
- 40 tubos de ensayo de 15 ml

3.2.3 Equipos

- Autoclave
- Balanza electrónica (M – 220D)
- Refrigerador
- pH metro
- Computador

- Cámara digital
- Cocina industrial
- Equipo micro Kjeldahl
- 2 Hoyas de 5 L
- Termómetro
- Cámara de flujo

3.2.4 Reactivos

- Hidróxido de Sodio
- Fenoltaleína
- Pastillas de Kjeldahl
- Medio MRS
- Yoduro de potasio
- Ácido sulfúrico
- Tiosulfato de sodio
- Éter dietílico
- Reactivo de Luff

3.3 Métodos

3.3.1 Elaboración del yogur

Se utilizó leche cruda proveniente de la ganadería de La Hacienda “El Prado”, la cual fue previamente sometida a un proceso de pasteurización a 72 °C durante 1 min. Durante el periodo de enfriamiento, a una temperatura de 50°C, se añadió a biomasa de la microalga *Arthrospira platensis* (obtenida de la empresa AndesSpirulina C.A.), de acuerdo a los tratamientos detallados en el diseño experimental; adicionalmente a una temperatura de 45°C se agregaron (25 DCU/L) del producto CHOOZIT™ 800 LYO de DANISCO que contiene cepas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, bacterias que permitieron la fermentación. La preparación se mantuvo en incubación a 42°C hasta alcanzar un pH entre 4 y 5, finalmente se refrigeró a 5°C.

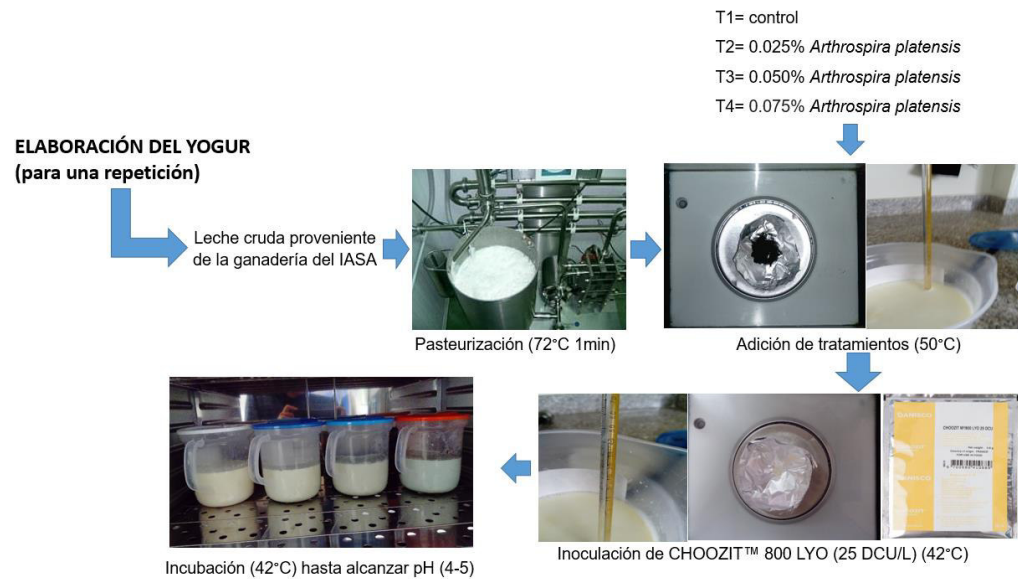


Figura 3 Elaboracion del yogur

3.3.2 Acidez titulable

La medición de la acidez titulable se realizó según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13, para lo cual se recolectaron cuatro alícuotas de yogur, en intervalos de 1 hora durante 5 h a fin de evaluar su comportamiento durante la fermentación, así como en almacenamiento cada 7 días durante un mes. En un matraz Erlenmeyer estéril, se colocó 20g de yogur por tratamiento, se incorporó el doble de su volumen de agua destilada y 2 mL de solución indicadora de fenolftaleína. Utilizando una bureta, se agregó lentamente por goteo y agitación constante una solución 0.1 N de Hidróxido de Sodio hasta visualizarse un cambio de color a rosado, el que permaneció persistente durante 30s. El volumen de solución empleada se registró para realizar los cálculos respectivos. El proceso se realizó por duplicado; Para calcular la acidez titulable en porcentaje en masa de ácido láctico se aplicó la siguiente formula:

$$A = 0.090 \frac{V * N}{m_1 - m} * 100$$

Donde:

A= Acidez titulable en porcentaje en masa de ácido láctico.

V = Volumen de la solución de Hidróxido de Sodio empleada en la titulación, en cm³.

N = Normalidad de la solución de Hidróxido de Sodio.

m = masa del matraz Erlenmeyer vacío, en g.

m_1 = masa del matraz Erlenmeyer con yogurt, en g.

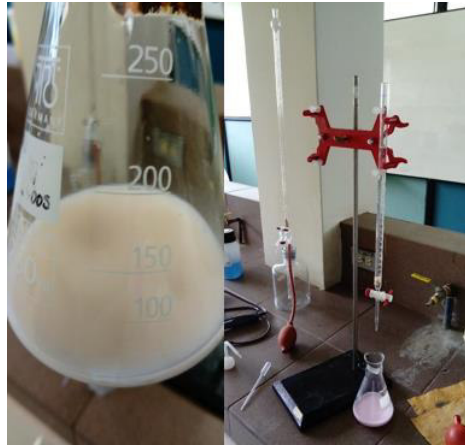


Figura 4 Titulación de las muestras

3.3.3 Conteo de bacterias ácido lácticas

Se dispensaron 12 envases correspondientes a los tratamientos y repeticiones, cada uno de estos con 500 ml de yogurt, los cuales se conservaron en refrigeración a una temperatura de 5°C durante 4 semanas.

De cada envase se extrajeron alícuotas de 25 g, a cada una de las cuales se añadió 225 ml de agua peptonada 0.1% (dilución 10^{-1}), esta fue homogenizada para posteriormente hacer diluciones sucesivas hasta alcanzar una concentración de 10^{-10} . Se tomó 1 ml de las soluciones 10^{-6} a 10^{-9} para realizar una siembra a profundidad en medio agar M.R.S., para procurar condiciones de cultivo anaeróbicas se adicionó una sobre-capa de 5ml de medio luego de solidificarse la primera. Se mantuvo en incubación a 36°C durante 18 horas, este procedimiento se llevó a cabo durante un mes en intervalos de 7 días a fin de evaluar la viabilidad de los microorganismos benéficos.



Figura 5 Diluciones y plating de las muestras de yogur

El conteo de unidades formadoras de colonia por ml de yogur se realizó mediante fotografías de alta resolución procesadas mediante el software ImageJ, utilizando para ello la opción multipoint en la barra de herramientas.

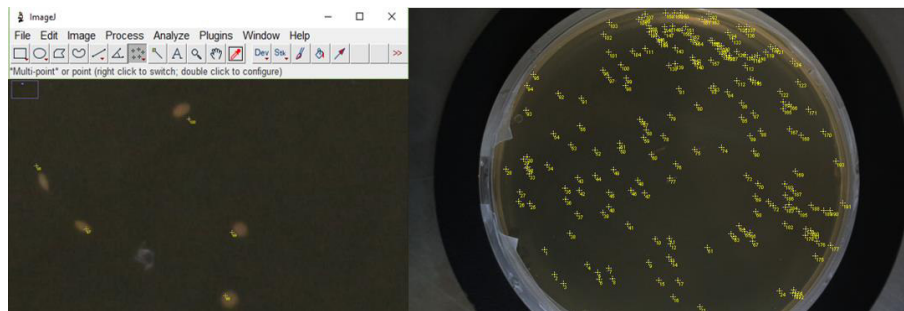


Figura 6 Conteo de (UFC/ml) de yogur

3.3.4 Análisis sensorial

Se efectuó una prueba sensorial sobre una muestra homogénea de 25 personas de 20 a 25 años de edad, en la cual debían dar una calificación en base a su preferencia mediante una escala hedónica (1,2,3,4,5) donde (1=menor, 5=mayor), se tomó en cuenta los atributos de sabor, olor, textura, acidez y color; durante esta prueba se facilitaron muestras codificadas y aleatorizadas para evitar especulación en los resultados, finalmente se realizó una prueba de análisis de varianza de Roy para analizar los datos obtenidos.

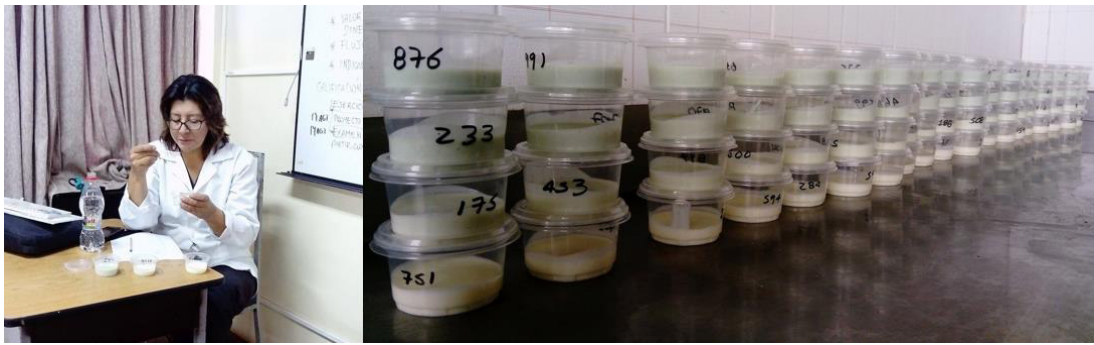


Figura 7 Prueba sensorial realizada en el IASA

3.3.5 Análisis bromatológico

Para este análisis se determinaron los parámetros de porcentaje de proteína, porcentaje de azúcares totales, porcentaje de cenizas, porcentaje de grasa y contenido de sodio mg/kg.

3.3.5.1 Proteína total

El contenido de proteína total se estimó mediante el protocolo de micro-Kjeldahl específico para productos derivados de leche.

- Preparación de la muestra: se colocó la muestra en baño maría hasta que tuvo una temperatura de 38°C a 40°C, se agito lenta y constantemente sin generar espuma, después de esto se tomaron 5ml de muestra y se colocaron en los tubos de prueba.
- Digestión: se colocaron los reactivos correspondientes para el tipo de muestra; pastillas catalizadoras, 20 ml de ácido sulfúrico al 98% y 5ml de peróxido de hidrógeno al 35%, luego de esto se realizó la digestión en tres fases 15 min a 150°C, 15 min a 250°C y 40 min a 420°C.
- Destilación: los tubos de prueba de enfriaron a 60°C, luego se añadieron los compuestos reactantes para el equipo de destilación UDK 129, 30 ml de ácido bórico y 70 ml de hidróxido de sodio, a continuación las muestras fueron tituladas con ácido clorhídrico 0.1 N hasta presentarse un cambio de color a un tono verde claro, finalmente el volumen registrado se utilizó para calcular el porcentaje de nitrógeno utilizando la siguiente fórmula.

$$\% \text{Nitrógeno} = \frac{0,014 (V1 - V0)N}{M} \mathbf{100}$$

Donde:

V1: Volumen de ácido clorhídrico utilizado en la titulación.

V2: Volumen de ácido clorhídrico utilizado en la titulación del blanco.

N: Normalidad del ácido clorhídrico.

M: muestra en gramos.



Figura 8 Determinación de proteína total

3.3.5.2 Grasa cruda

El contenido de grasa se determinó mediante extracción con éter dietílico utilizando el extractor velp científica SER 148 siguiendo los siguientes pasos.

- Preparación de la muestra: dentro de la Sorbona 15 g de muestra fueron sometidos a hidrólisis mediante la adición de 60 ml de ácido clorhídrico y 70 ml de agua y posterior calentamiento durante 30 min; luego de esto se procedió a filtrar el hidrolizado utilizando papel filtro previamente humedecido y un lavado con 500 ml de agua para finalmente retirar el papel filtro y secarlo en la estufa durante 15 min.
- Extracción: las muestras se colocaron en los vasos de extracción junto con 50 ml de éter dietílico, luego de esto se colocaron en el equipo de extracción durante hora y media, por último los extractos fueron retirados del equipo, se dejaron enfriar dentro de la sorbona a temperatura ambiente y se pesó los vasos con grasa para realizar los cálculos respectivos.

$$grasa, \% = \frac{(B - C) * 100}{A}$$

Donde:

A= peso en gramos de la muestra.

B= peso en gramos del vaso de extracción después del secado.

C= peso en gramos del vaso de extracción previo a la extracción.



Figura 9 Extracción de grasa cruda

3.3.5.3 Azúcares totales

El contenido de azúcares se determinó por el método de azúcares reductores luego de someter previamente la muestra a una hidrólisis ácida para el desdoblamiento de los disacáridos, el proceso se describe a continuación.

- Hidrólisis: Se disolvieron 5 ml de muestra en 40 ml de agua desionizada más 10 ml de ácido clorhídrico concentrado; esta solución se sometió a calentamiento en baño maría a 80 °C durante dos minutos, a continuación, se procedió a neutralizar la solución añadiendo 3 gotas de fenolftaleína y titulando con hidróxido de sodio 35% hasta que se tornó de un color rosado intenso; lo siguiente fu filtrar la solución y aforarla a 100 ml.
- Titulación: se pipeteó una alícuota de 20 ml de la solución a matraces Erlenmeyer de boca esmerilada de 250 ml a los que se incorporaron 25 ml de reactivo le Luff y agua destilada hasta completar 50 ml en total; las muestras se llevaron a reflujo hasta que hirvieron durante dos minutos, posteriormente se

incorporó 3 g de yoduro de potasio y 25 ml de ácido sulfúrico, se tituló con tiosulfato de sodio hasta que se presentó una coloración café, a continuación, se añadieron 2 ml de solución de almidón hasta tornarse a un color blanco lechoso finalmente se registró el volumen y se hicieron los cálculos respectivos.



Figura 10 proceso para determinación de azúcares totales

3.3.5.4. Cenizas

5 g de muestra se colocaron en crisoles y se sometieron a calor en una plancha metálica dentro de la sorbona hasta que dejaron de desprender humo, luego se trasladaron a una mufla a 600 °C durante 4 horas, se concluyó con determinación en base al peso inicial y final de las muestras.



DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CENIZAS

Figura 11 Determinación de cenizas mediante calcinación

3.3.5.5 Sodio

Para la determinación del contenido de sodio se preparó la muestra mediante una hidrólisis con ácido nítrico y calor durante 8 minutos; después de esto los hidrolizados de las muestras fueron enviadas al laboratorio de química ambiental de la Universidad Central del Ecuador para su análisis mediante absorción atómica.

3.3.6 Diseño experimental

3.3.6.1 Factores

Los factores a evaluarse fueron tres niveles de suplementación con biomasa seca de *Arthrospira platensis* y 5 tiempos de almacenamiento refrigerado.

3.3.6.2 Tratamientos a comparar

Los tratamientos a comparar fueron (0/control, 0.025%, 0.050% y 0.075%) suplementaciones de biomasa de *Arthrospira platensis* contrastados con 5 tiempos de almacenamiento (0, 7, 14, 21, 28 días).

3.3.6.3 Tipo de diseño

Para esta investigación se utilizó un diseño en bloques completamente al azar (DBCA) en parcela dividida con 3 repeticiones, cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + B_i + D_j + e_{IJ} + T_k + DT_{jk} + e_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable aleatoria

u = Media general.

B_i = Efecto del i-esimo bloque.

D_j = efecto de la j-esima dosis de *Arthrospira platensis*.

e_{ij} = Error de la parcela grande.

T_k = Efecto del j-esimo tiempo de almacenamiento.

DT_{jk} = Efecto de la interacción dosis*tiempo.

e_{ijk} = Error experimental

3.3.6.4 Características de las Unidades Experimentales

La unidad experimental estuvo compuesta de una jarra plástica con tapa de 1l que cumplió el rol de parcela grande, ya que en este se hicieron las mediciones a razón de un muestreo cada 7 días, durante 1 mes, teniendo un total de 12 unidades experimentales.

3.3.6.5 Croquis del diseño

Bloque I Unidades experimentales aleatorizadas				Bloque II Unidades experimentales aleatorizadas			
T1	T2	T3	T4	T3	T2	T1	T4
0dd	0dd	0dd	0dd	0dd	0dd	0dd	0dd
7dd	7dd	7dd	7dd	7dd	7dd	7dd	7dd
14dd	14dd	14dd	14dd	14dd	14dd	14dd	14dd
21dd	21dd	21dd	21dd	21dd	21dd	21dd	21dd
28dd	28dd	28dd	28dd	28dd	28dd	28dd	28dd

Bloque III Unidades experimentales aleatorizadas				Tratamientos a evaluar	
T2	T1	T4	T3	T1	T2
0dd	0dd	0dd	0dd	Control	<i>Arthrospira</i> 0.025%
7dd	7dd	7dd	7dd	<i>Arthrospira</i> 0.050%	<i>Arthrospira</i> 0.075%
14dd	14dd	14dd	14dd	Días	
21dd	21dd	21dd	21dd		
28dd	28dd	28dd	28dd		

Figura 12 Croquis del diseño experimental de la investigación

3.3.7 Variables del estudio

Las variables medidas en el presente estudio fueron:

- Viabilidad de bacterias ácido lácticas en (UFC/ml) durante 5 tiempos de almacenamiento refrigerado (0, 7, 14, 21, 28 días).
- Acidez titulable durante la fermentación durante 5 horas, cada hora, en porcentaje de ácido láctico en masa.
- pH durante la fermentación, durante 5 horas, cada hora.
- Acidez titulable en porcentaje de ácido láctico en masa durante 5 tiempos de almacenamiento refrigerado.

- Proteína total en porcentaje, contenido de azúcares en porcentaje, porcentaje de cenizas, grasa total en porcentaje, sodio en mg/kg.
- Preferencia en base a puntuación mediante escala hedónica.

3.3.8 Análisis estadístico

Los datos de la presente investigación fueron procesados y posteriormente analizados con estadística descriptiva utilizando para esto el software estadístico INFOSTAT; los datos de las variables que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homosedasticidad fueron transformados para su análisis.

3.3.8.1 Esquema de análisis de varianza

Fuentes de variación	Grados de libertad	
Bloque	r-1	2
Dosis	a-1	3
Error parcela grande	(r-1)*(a-1)	6
Tiempo	b-1	4
Dosis*tiempo	(a-1)*(b-1)	12
Error parcela pequeña	a(r-1)(b-1)	32
Total	abr -1	59

3.3.8.2 Coeficiente de variación

El coeficiente de variación se calculó con la fórmula que se expresa a continuación:

$$Cv = \frac{\sigma}{|\bar{x}|} \times 100$$

Dónde:

σ : Desviación estándar; \bar{x} : Media

3.3.8.3 Análisis funcional

La prueba de significación empleada para el análisis de medias de las variables por tratamiento en el presente estudio fue la prueba de LSD Fisher con un nivel de significancia del 0,05% para las variables de viabilidad de bacterias ácido lácticas, acidez titulable, pH y una prueba de Hotteling para la variable de preferencia.

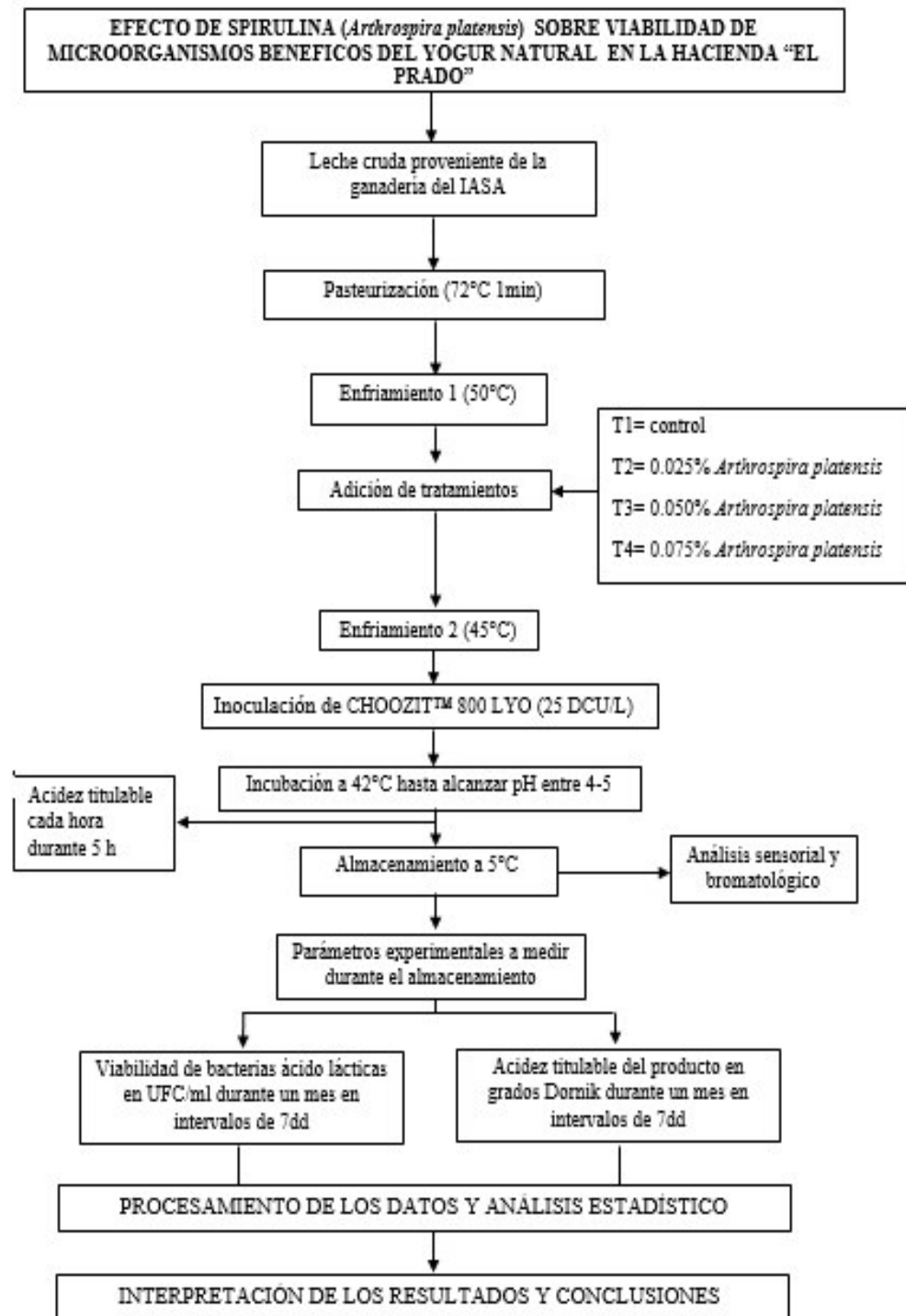


Figura 13 Esquema de procesos del proyecto de investigación

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Viabilidad de bacterias ácido lácticas

Los datos correspondientes a esta variable no cumplieron los supuestos de normalidad y homoscedasticidad, de modo que fueron transformados a log base 10 para su procesamiento mediante un análisis de varianza utilizando modelos generales y mixtos.

Tabla 7
ANAVA de yogur bajo tres niveles de *Arthorpira*
***platensis* y cinco tiempos de almacenamiento**
refrigerado

Fuente de variación	F	p
Dosis	0,34	0,7929
Tiempo	6,14	0,0007
Dosis-Tiempo	0,44	0,9348

En cuanto a esta variable no se encontró un efecto significativo para la interacción dosis de *Arthorpira platensis* y el tiempo de almacenamiento (Tabla 7); sin embargo el factor tiempo presentó un efecto significativo sobre la viabilidad ($F=6.14$; $p= 0.0007$), como se observa en la (Tabla 9) donde se presentó disminución de la viabilidad de estos microorganismos desde el día 14 en adelante, datos presentados en UFC/ml.

Tabla 8
Promedio \pm E.E de muestras de yogur bajo tres niveles de *Arthorpira platensis*
durante cinco tiempos de almacenamiento refrigerado

Tiempo (h)	D1	D2	D3	D4
0	5,43E+09 \pm 7,56E+08abc	1,06E+10 \pm 4,47E+09a	1,02E+10 \pm 5,63E+09ab	4,74E+09 \pm 1,35E+09abcd
7	7,39E+09 \pm 3,26E+09cd	6,82E+09 \pm 2,58E+09bcd	1,17E+10 \pm 9,97E+09bcd	5,11E+09 \pm 1,61E+09cd
14	2,34E+09 \pm 6,44E+08cd	3,08E+09 \pm 5,82E+08bcd	3,03E+09 \pm 5,90E+08bcd	2,69E+09 \pm 2,54E+08cd
21	2,49E+09 \pm 1,04E+09cd	2,79E+09 \pm 1,05E+09cd	2,95E+09 \pm 1,18E+09cd	4,17E+09 \pm 9,89E+08abcd
28	3,41E+09 \pm 1,78E+09cd	2,51E+09 \pm 8,33E+08cd	3,24E+09 \pm 3,06E+08bcd	1,87E+09 \pm 3,63E+08d

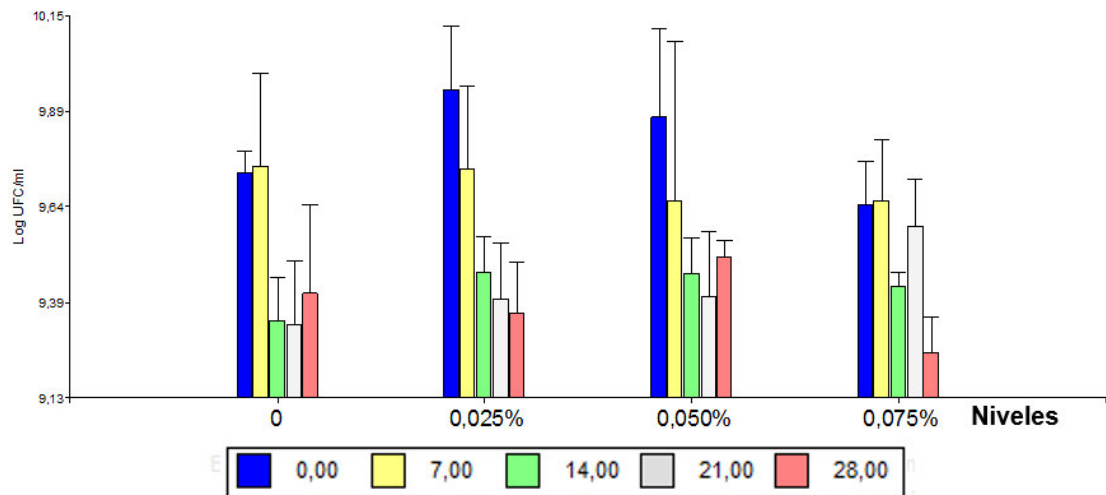


Figura 14 Promedio \pm error estándar de Log UFC/ml yogur bajo tres niveles de *Arthrospira platensis* durante 5 tiempos de almacenamiento refrigerado

Tabla 9
Promedio \pm error estándar de UFC/ml de bacterias ácido lácticas en 5 tiempos de almacenamiento refrigerado

Tiempo	UFC/ml	E.E	
0	6,31E+09	1,8620871	A
7	5,01E+09	2,630268	A
14	2,63E+09	1,3803843	B
21	2,69E+09	1,7782794	B
28	2,40E+09	1,6982437	B

4.1.2 Acidez titulable

4.1.2.1 pH durante la fermentación

Los datos generados por esta variable si cumplieron los supuestos de normalidad y homoscedasticidad de modo que se realizó un análisis de varianza y una prueba de diferencia de medias de Tukey. La interacción dosis de *A. platensis* – tiempo de almacenamiento no presentó un efecto significativo en el valor de pH.

Se encontró un efecto significativo para al factor tiempo de fermentación ($F=390,16$; $p<0,0001$) donde se presentó una reducción significativa de pH a partir de la tercera hora de fermentación para todos los tratamientos (Tabla 8) así como en la figura 13 donde la

tendencia indica una disminución de pH más marcada para el yogur suplementado con *Arthrospira platensis*.

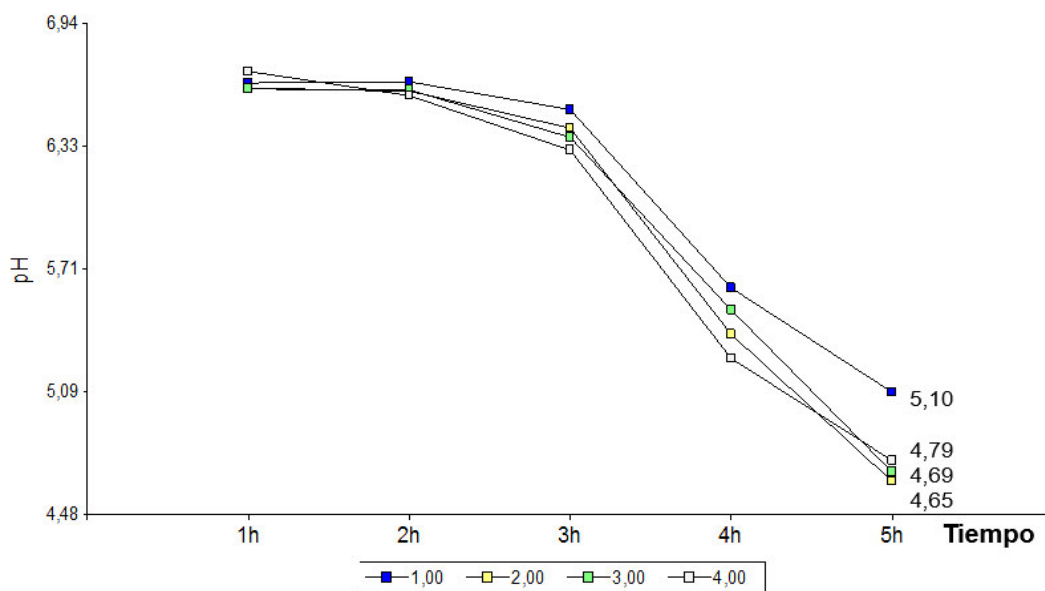


Figura 15 comportamiento pH de muestras de yogur bajo tres niveles de suplementación con *Arthrospira platensis* durante 5 horas de fermentación.

Tabla 10

Promedio \pm error estándar de pH de yogur durante 5 horas de fermentación

Tiempo(h)	pH	E.E.	
1	6,65	0,02	A
2	6,62	0,01	A
3	6,41	0,03	B
4	5,44	0,08	C
5	4,8	0,07	D

4.1.2.2 Acidez titulable durante la fermentación

En el estudio de esta variable se encontró un efecto significativo para la interacción dosis-tiempo ($F=3,20$; $p=0,0161$) lo que significa que la adición de biomasa de *Arthrospira platensis* a la fermentación láctica incremento el porcentaje de ácido láctico en masa hasta el orden de 0,8% a la quinta hora utilizando una dosis de 0.025% comparado con el control donde a la quinta hora presento un valor de 0,5% de ácido

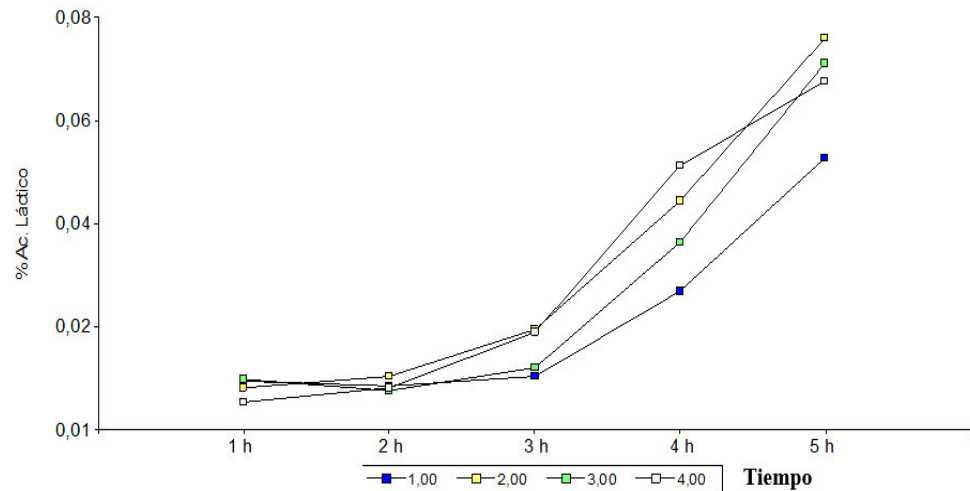


Figura 16 Comportamiento del % ac. Láctico en masa de yogur suplementado con tres niveles de *Arthrospira platensis* durante 5 horas de fermentación

4.1.2.3 Acidez titulable durante almacenamiento refrigerado

Tabla 12

ANAVA del % de ácido Láctico en masa de yogur natural bajo 3 niveles de *Arthrospira platensis* y 5 tiempos de almacenamiento

Fuente de variación	F	p
Dosis	2,10	0,1166
Tiempo	9,69	<0,0001
Dosis-Tiempo	0,21	0,9962

No se encontró efecto significativo para la interacción dosis-tiempo (Tabla 12), sin embargo el factor tiempo de almacenamiento presentó significancia ($F=9,69$ $p<0,0001$) para el porcentaje de ácido láctico en masa mostrando mayores valores en las dos últimas mediciones (21 y 28 días) comparado con lo obtenido al momento de la fabricación, esto se puede observar en la tabla 12 presentada a continuación.

Tabla 13
Promedio \pm error estándar del % ac. Láctico en masa
de yogur suplementado con tres niveles de *Arthrospira*
***platensis* durante 5 tiempos de almacenamiento**

Tiempo	% ac. Láctico en masa	E.E.	
21	0,86	0,02	A
28	0,85	0,03	A
14	0,83	0,03	A B
7	0,79	0,03	B
0	0,73	0,02	C

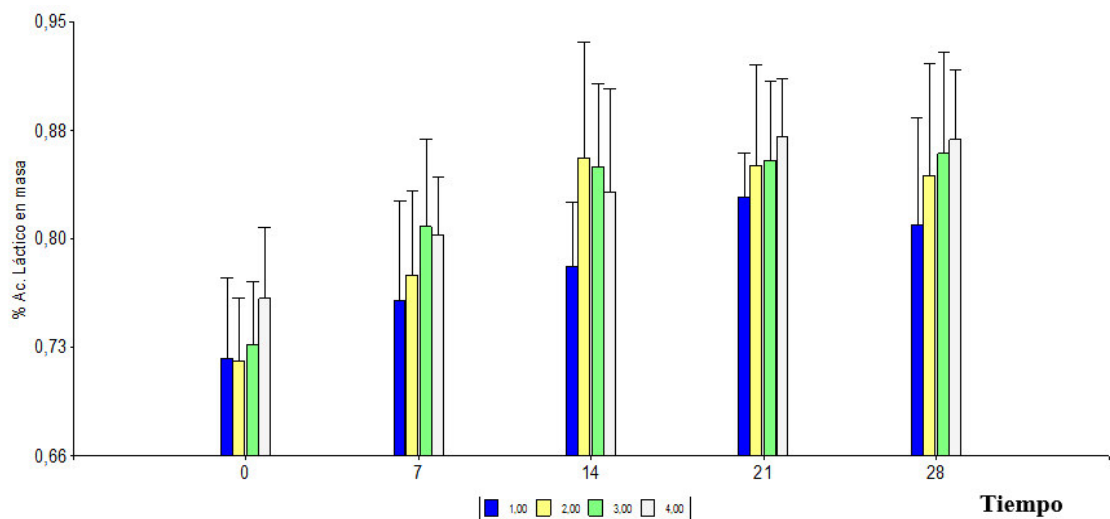


Figura 17 Promedio \pm error estándar del % ac. Láctico en masa de yogur
suplementado con tres niveles de *Arthrospira platensis* durante 5 tiempos de
almacenamiento

4.1.3 Análisis sensorial

Los datos obtenidos en el presente estudio se procesaron mediante modelos generales y mixtos donde se encontró efecto significativo en la suplementación de *Arthrospira platensis* en la preferencia de yogur ($F=3,37$; $p=0,0084$); el mayor valor en cuanto a la preferencia fue obtenido por el tratamiento 2 comparado con el tratamiento 4 (Tabla 14) y (Figura 18).

Tabla 14
Promedio \pm error estándar de preferencia de
yogur bajo tres niveles de *Arthrospira platensis*

Tratamiento	Preferencia	E.E.	
1	3,9	0,09	A B
3	4,02	0,2	A B
4	3,71	0,15	A
2	4,15	0,14	B

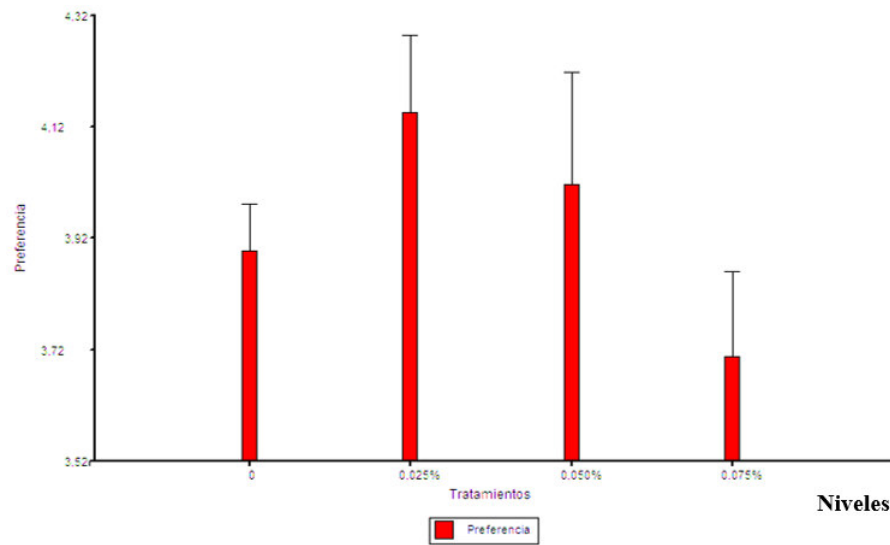


Figura 18 Promedio \pm error estándar de preferencia de yogur
bajo tres niveles de *Arthrospira platensis*

4.1.4 Análisis bromatológico

Para este estudio se tomó en cuenta al T1=control y el T2= 0.025% *Arthrospira platensis* debido a que tuvo mayor preferencia; de modo que a continuación se presentan los datos de los parámetros correspondientes a la semaforización de productos alimenticios donde se encontró que ambas muestras presentaron valores que las catalogaron como concentración media (amarillo) para grasa, alta (rojo) en azúcares, y baja (verde) en Sodio, esto según la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA, 2014); de forma complementaria también se presentan los datos de proteína y ceniza mostrando un ligero incremento para los 2 parámetros en el Tratamiento 2 (tabla 15).

Tabla 15
Análisis bromatológico de dos muestras de yogur

Parámetro	T1=control	T2=0,025% <i>A. platensis</i>
Proteína (%)	3,25	3,36
Grasa (%)	3,34	3,32
Azúcares totales (%)	8,07	8,64
Ceniza (%)	0,63	0,68
Sodio (mg/kg)	478,03	442,37

4.2 Discusión

4.2.1 pH durante la fermentación

El pH del yogur es un parámetro de importancia crítica al momento de su fabricación industrial y casera, fungiendo como indicador del proceso de fermentación, durante el presente estudio se encontró que mediante el uso de biomasa de *Arthrospira platensis* se alcanzó un pH promedio de 4,6 mientras que el control se mantuvo sobre 5 a la quinta hora de fermentación, en un estudio similar realizado por Varga et al (2002) donde durante el monitoreo de pH en la fabricación de una bebida fermentada con cepas de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium spp* encontraron un comportamiento similar al de la presente investigación, aduciendo que la biomasa de *Arthrospira platensis* contribuye al desarrollo de cultivos lácteos iniciadores.

Brabandere et al (1999) en su estudio sobre el comportamiento de pH en la fermentación bajo diferentes aditivos y condiciones ambientales, encontró que éste parámetro se ve afectado por factores como la temperatura de incubación, tipo de esterilización de la leche y microorganismo utilizado, A criterio del investigador la inclusión de biomasa de *A. platensis* puede representar una posible mejora para el proceso productivo del yogur ya que se pudo llegar a un pH apto para la coagulación de la caseína en menor tiempo de fermentación, lo que implicaría ahorro energético en su fabricación.

4.2.2 Acidez titulable durante la fermentación

Respecto a la acidez titulable durante la fermentación, se encontró que la biomasa de *A. platensis* incrementa el contenido de ácido láctico en niveles adecuados, ya que en este ensayo el control alcanzó un contenido aproximado de 0,5% comparado con el Tratamiento 2= 0,025% que tuvo un porcentaje del 0,8%, contrastando esto con lo

estipulado en el Codex Alimentarius para leches fermentadas donde se indica que el porcentaje mínimo de acidez valorable en ácido láctico debe ser superior al 0,6%; y máximo 1,15% según (Ruales, 2012).

Por otro lado Mólnar et al (2005) en su investigación para el desarrollo de productos lácteos suplementados con *A. platensis*, obtuvo un incremento significativo en la acidez a razón de 3g/l y utilizando 4 subespecies de *Lactococcus lactis* durante el proceso de fermentación.

4.2.3 Acidez titulable durante el almacenamiento refrigerado

Durante la presente investigación se registró un aumento moderado de la acidez del yogur suplementado con *A. platensis* a razón del paso del tiempo, sin embargo estadísticamente no hubo diferencia significativa con el control, esto difiere de lo reportado por Varga, Szigeti, Kovács, Földes, & Buti (2002) quienes en un estudio donde la suplementación con *A. platensis* se realizó después de la fermentación y las condiciones de almacenamiento fueron a 15 °C durante 18 días encontraron un incremento significativo en la acidez del producto.

Otro estudio realizado en leche desnatada reconstituida por Baheshtipour et al (2012), en el cual compararon el uso de biomasa de *Arthrospira platensis* y *Chlorella vulgaris* se encontró que al utilizar 1% de biomasa de *A. platensis* se podía incrementar significativamente el contenido de ácido láctico durante la fermentación así como durante el almacenamiento.

4.2.4 Viabilidad de bacterias ácido lácticas

En lo que respecta a esta variable si bien se observó una tendencia al aumento de bacterias ácido lácticas, esta no fue estadísticamente significativa, discrepando de lo reportado por Perez et al (2008), quienes obtuvieron un incremento en el porcentaje de viabilidad al utilizar 1% de biomasa de *A. platensis* después de la fermentación en 45 días de almacenamiento. Resultados similares se obtuvieron en un estudio afín en el que se evaluó la supervivencia de cultivos probióticos en soluciones de medio nutritivo MRS caldo con diferentes dosis de biomasa de *A. platensis* obteniendo mejores resultados con una dosis de 10 mg/ml (Bhowmik, Dubey, & Mehra, 2009). Sin embargo cabe recalcar que los conteos obtenidos en esta investigación se mantuvieron sobre las 10^7 UFC/g

requeridas por la Norma NTE-INEN 2395 (2011) para leches fermentadas durante todo el ensayo.

4.2.5 Análisis sensorial

Según lo obtenido en esta investigación se pudo aseverar que la adición de *A. platensis* cambia los atributos sensoriales de yogur de forma positiva a razón de 0,025%, sin embargo la preferencia tiende a decaer a medida que se incrementa la dosis, este fenómeno se replica en lo presentado por Baheshtipour et al (2012), quienes con una dosis del 1% obtuvieron resultados no deseables en cuanto a la aceptabilidad de las muestras; por otro lado, en lo concerniente a desarrollo de productos lácteos, Jeon (2006) elaboró quesos suplementados con *C. vulgaris* donde la dosis con mayor preferencia fue la 0,5% sobre la dosis máxima 1%.

4.2.6 Análisis bromatológico

En el caso de proteína se obtuvo un porcentaje ligeramente mayor al control con el tratamiento 2 en el orden del 3,36% valor que se encuentra en lo requerido por la norma NTE INEN para leches fermentadas; cabe recalcar que este porcentaje se puede incrementar aumentando la dosis de *A. platensis* como fue el caso de Priyanka et al (2013), quienes lograron aumentar este valor hasta el 4,17% con una dosis del 0,5%, este comportamiento también se reflejó en el porcentaje de ceniza y azúcares totales respectivamente, presentando ligeros aumentos durante la presente investigación.

Cabe recalcar que además de los parámetros mencionados anteriormente la biomasa de *A. platensis* aporta moléculas de alto valor nutricional y terapéutico como ácidos grasos polinsaturados, vitaminas, pigmentos como beta caroteno y clorofila que funcionan como antioxidantes así como minerales como calcio y hierro (Andes-Spirulina c.a., 2016).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La adición de biomasa de *Arthrospira platensis* a los procesos fermentativos del yogur mantuvo la viabilidad de microorganismos benéficos sin afectar de forma adversa el tiempo de vida útil del producto.
- Los datos de acidez titulable obtenidos durante la investigación denotan un incremento de la misma dentro del rango adecuado para yogur, mejorando sus cualidades organolépticas suplementando 0,025% de *Arthrospira platensis* previo a la fermentación.
- La suplementación a razón de 0,025% de biomasa de *Arthrospira platensis* tuvo un efecto positivo en la preferencia del yogur, además de mejorar la calidad nutritiva del mismo, incrementando el contenido de proteína hasta un 3,36% y aportando cantidades importantes ácidos grasos polinsaturados.

5.2 Recomendaciones

- Realizar un estudio del perfil de vitaminas A y B a fin de conocer el efecto de *Arthrospira platensis* en la producción de las mismas.
- Hacer pruebas complementarias tomando en cuenta factores como el método de esterilización y tipo de leche, además de ensayos específicos para cada especie probiótica.
- Llevar a cabo ensayos sobre la utilización de saborizantes y mejoradores de textura a fin de incrementar la dosis de biomasa y obtener un producto con buena palatabilidad.
- Desarrollar otros productos de naturaleza láctea suplementados con *A. platensis* como varios tipos de queso, kumis, kéfir entre otros.

5.3 Bibliografía

- Arce, M. (23 de 05 de 2017). Ubicación ecológica Hda el prado IASA 1. (M. Tipán, Entrevistador)
- ARCSA. (08 de 2014). *Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria*. Obtenido de <http://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/08/REGLAMENTO-SANITARIO-DE-ETIQUETADO-DE-ALIMENTOS-PROCESADOS-PARA-EL-CONSUMO-HUMANO-junio-2014.pdf>
- Ashwell, M. (2002). *Conceptos sobre los alimentos funcionales*. Whashington DC: ILSI Press.
- Baheshtipour, H., Mortazavian, A., Haratian, P., & Darani, K. (2012). Effects of chlorella vulgaris and Arthrospira platensis addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *European Food Research and Technology*, 719-728.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 207-210.
- Bhowmik, D., Dubey, J., & Mehra, S. (2009). Probiotic Efficiency of Spirulina platensis - Stimulating Growth of Lactic Acid Bacteria. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 160-163.
- Chacón-lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenges. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 655-675.
- De Brabandere, A. G., & De Baerdemaeker, J. G. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of food engineering*, 41(3), 221-227
- FAO. (10 de Febrero de 2003). *www.fao.org*. Obtenido de [file:///C:/Users/Antonio%20Parra/Downloads/CXS_243s%20\(7\).pdf](file:///C:/Users/Antonio%20Parra/Downloads/CXS_243s%20(7).pdf)
- FAO. (2010). *Norma codex para leches fermentadas*. Obtenido de www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243s.pdf

- Hernandez, F. Y., Khandual, S., & López, I. G. (2016). Cytotoxic effect of *Spirulina platensis* extracts on human acute leukemia Kasumi-1 and chronic myelogenous leukemia K-562 cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*.
- INEC. (2014). Obtenido de Encuesta de superficie y producción agropecuaria: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- Jeon, J. K. (2006). Effect of chlorella addition on the quality of processed cheese. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 35(3), 373-377.
- Kent, M., Welladsen, H., Mangott, A., & Li, Y. (2015). Kent, Nutritional evaluation of Australian microalgae as potential human health supplements. *PloS one*, 10(2).
- Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 1-17.
- Molnar, N., Gyenis, B., & Varga, L. (2005). Influence of a powdered *Spirulina platensis* biomass on acid production of lactococci in milk. *Milchwissenschaft*, 60(4), 380-382.
- NTE INEN 2395. (2011). *Leches Fermentadas. Requisitos*. Obtenido de http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/NORMAS_2014/ACO/17122014/nte-inen-2395-2r.pdf
- OECD/FAO. (2013). *OECDiLibrary*. Obtenido de http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/ocde-fao-perspectivas-agricolas-2013_agr_outlook-2013-es
- Perez, K. J., Guarienti, C., Bertolin, T. E., Costa, J. A. V., & Colla, L. M. (2008). Viabilidade de bactérias lácticas em iogurte adicionado de biomassa da microalga *Spirulina platensis* durante o armazenamento refrigerado. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 18(1), 77-82.
- Priyanka, M., Kempanna, C., & Narasimha, M. (2013). Quality characteristics of yoghurt enriched with *Spirulina* powder. *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 47(2), 354-359.

- Ramírez , L., & Olvera, R. (2006). Conocimiento acerca del alga Spirulina (Arthrospira). *Interciencia*, 1-5.
- Ruales, V. (Septiembre de 2012). *Biblioteca digital Universidad Nacional de Colombia*.
Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/7570/1/107437.2012.pdf>
- Schillinger. (1999). Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*.
- Sharma, Y. C., Singh, B., & Korstad, J. (2011). A critical review on recent methods used for economically viable and eco-friendly development of microalgae as a potential feedstock for synthesis of biodiesel. *Green chemistry*, 2993-3006.
- Siro , I., Kapolna, E., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 456-467.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan , C., Duran , E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87-97.
- Templeton, D. W., Quinn, M., Van Wychen, S., Hyman, D., & Laurens, L. M. (2012). Separation and quantification of microalgal carbohydrates. *Journal of Chromatography A*, 225-234.
- U, S. (1999). Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 79-87.
- Varga, L., Szigeti, J., Kovács, R., Földes, T., & Buti, S. (2002). Influence of a Spirulina platensis biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1031-1038
- Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P., & Reinheimer, J. (2010). Cambios en la funcionalidad de bacterias probióticas desde la producción al consumo. *Aspectos probióticos y tecnologicos de las bacterias lácticas*, 35-47.
- Vizcarra. (2015). La leche del Ecuador-Historia de la Lechería Ecuatoriana. Quito, Pichincha, Ecuador.

Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC Press. CRC Press.