

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA A PARTIR DE LA
FERMENTACIÓN LÁCTICA DEL ALMIDÓN HIDROLIZADO DE HARINA
DE QUINUA *Chenopodium quinoa*

Presentado por:
CAROLINA STEFANY HUAPAYA CASTILLO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO

LIMA, PERÚ

2014

"Agradezco a Dios, quien lo es todo para mí, y cuya voluntad es perfecta,

A mis padres, Pablo y Enriqueta, por su constante apoyo.

A mi hermano Christian, por sus sabias críticas.

A mis amigos en general, por su apoyo y comprensión"

ÍNDICE

I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	3
2.1 Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>).....	3
2.1.1 Historia.....	3
2.1.2 Importancia.....	4
2.1.3 Descripción botánica.....	5
2.1.3.1 Raíz.....	5
2.1.3.2 Tallo.....	6
2.1.3.3 Hábito.....	7
2.1.3.4 Hojas.....	7
2.1.3.5 Inflorescencia.....	8
2.1.3.6 Flores.....	10
2.1.3.7 Fruto y semilla.....	10
2.1.3.8 Saponinas de la quinoa.....	11
2.1.4 Valor nutritivo y composición química.....	11
2.1.5 Uso medicinal.....	19
2.2 Almidón de quinoa.....	20
2.2.1 Contenido de amilosa y amilopectina.....	21
2.3 Hidrólisis enzimática del almidón.....	21
2.3.1 Enzimas.....	21
2.3.2 Hidrólisis enzimática.....	22
2.3.3 Metodología de la hidrólisis del almidón.....	22
2.3.4 α -amilasa (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa).....	24
2.3.5 α -amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i> , Type XIIA, Sigma Aldrich.....	24
2.3.6 Aplicaciones de los hidrolizados de almidón.....	26
2.3.7 Bebidas elaboradas a partir de almidón hidrolizado de quinoa.....	26
2.4 Fermentación láctica.....	27
2.4.1 Formación de ácido láctico.....	27
2.4.2 Ácido láctico.....	28
2.5 Microorganismos probióticos.....	28
2.5.1 Probióticos.....	28

2.5.2 Efectos de los probióticos sobre el organismo y mecanismos de acción.....	31
2.5.3 Interacciones de los probióticos con el sistema inmunológico: Inmunomodulación.....	38
2.5.3.1 Sistema inmunológico intestinal.....	38
2.5.3.2 Probióticos. Estimulación de la inmunidad innata.....	40
2.5.3.3 Probióticos. Estimulación de la inmunidad adquirida.....	41
2.5.3.4 Probióticos y tolerancia oral a los antígenos.....	41
2.5.3.5 Probióticos y efecto antiinflamatorio.....	42
2.5.4 Estabilidad de los probióticos.....	43
2.5.5 Cultivos probióticos comerciales.....	43
2.5.6 Bebidas probióticas comerciales.....	44
2.6 Parámetros microbiológicos exigidos por DIGESA para bebidas.....	45
III. Materiales y métodos.....	47
3.1 Materiales.....	47
3.1.1 Material biológico.....	47
3.1.2 Medios de cultivo y esencias.....	47
3.1.3 Instrumentos y equipos.....	47
3.1.4 Soluciones y reactivos.....	48
3.2 Métodos.....	48
3.2.1 Medición del pH.....	48
3.2.2 Determinación de la acidez total.....	48
3.2.3 Determinación de azúcares reductores.....	48
3.2.4 Determinación de sólidos solubles.....	49
3.2.5 Hidrólisis del almidón de harina de quinua.....	49
3.2.6 Fermentación láctica.....	50
3.2.7 Formulación.....	52
3.2.8 Prueba de preferencia.....	52
3.2.5 Análisis proximal.....	53
3.2.6 Análisis microbiológico.....	53
3.3 Procedimiento experimental.....	54
IV. Resultados y discusión.....	56
4.1 Hidrólisis enzimática del almidón de harina de quinua.....	56
4.2 Fermentación láctica.....	59

4.3 Análisis estadístico.....	68
4.4 Formulación.....	71
4.5 Prueba de preferencia.....	72
4.6 Análisis proximal.....	72
4.7 Análisis microbiológico.....	75
4.8 Flujograma final.....	78
V. Conclusiones.....	79
VI. Recomendaciones.....	80
VII. Referencias Bibliográficas.....	81
VII. Anexos.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1.- Comparación entre la composición química de la quinua versus otros cereales.....	12
Tabla N°2.- Comparación de los aminoácidos del grano de quinua con otros alimentos.....	14
Tabla N°3.- Comparación del porcentaje de ácidos grasos de quinua versus otros alimentos.....	15
Tabla N°4.- Comparación del contenido de minerales en el grano de quinua versus otros alimentos.....	16
Tabla N°5.- Comparación del contenido de vitaminas del grano de quinua versus otros alimentos.....	18
Tabla N°6.- Características de las amilasas utilizadas en la hidrólisis del almidón.....	23
Tabla N°7.- Parámetros microbiológicos exigidos por DIGESA para bebidas.....	45
Tabla N°8.- Sólidos solubles en la solución de quinua antes y después de la hidrólisis.....	58
Tabla N°9.- Variación del pH para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación.	60
Tabla N° 10.- Variación de los azúcares reductores para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación.....	62
Tabla N° 11.- Variación de la acidez total, para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación.....	63
Tabla N° 12.- Variación de los sólidos solubles (°Brix) para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación.....	66
Tabla N° 13.- Variación de la acidez total, expresada en porcentaje de ácido láctico.....	68
Tabla N° 14.- Análisis de varianza.....	69
Tabla N° 15.- Análisis de varianza para efectos simples.....	70
Tabla N°16.- Puntaje obtenido para los tres sabores de la bebida.....	72
Tabla N°17.- Composición proximal de la bebida probiótica de quinua.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1.- Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i>).....	3
Figura N°2.- Raíz de la quinua.....	6
Figura N°3.- Tallo de la quinua.....	6
Figura N°4.- Diferentes hábitos de la quinua.....	7
Figura N°5.- Variación del número de dientes en las hojas de quinua.....	8
Figura N°6.- Formas de inflorescencia.....	9
Figura N°7.- Inflorescencia de la quinua.....	9
Figura N°8.- Flor hermafrodita y flor femenina.....	10
Figura N°9.- Partes del fruto de la quinua.....	11
Figura N°10.- Enzima α-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i>.....	25
Figura N°11.- Respuesta inmunitaria frente a los antígenos bacterianos.....	39
Figura N°12.- Variación de la acidez total para todos los tratamientos.....	64
Figura N°13.- Variación de la acidez total en el tiempo.....	65
Figura N°14.- Resultados de los análisis microbiológicos.....	76
Figura N°15.- Imágenes tomadas en el microscopio (100X).....	77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I: α-amilasa de <i>Bacillus licheniformis</i>.....	90
Anexo II: Certificado de calidad “Vivolac” Microorganismos probióticos.....	98
Anexo III: Cartilla de preferencia para la prueba de degustación.....	100
Anexo IV-A: Análisis estadístico para la cuantificación de la acidez.....	101
Anexo IV-B: Análisis estadístico para la cuantificación de los azúcares reductores.....	108
Anexo V: Resultado del Análisis proximal.....	111
Anexo VI: Resultados de los Análisis Microbiológicos.....	114
Anexo VII-A: Método de Miller.....	117
Anexo VII-B: Determinación de acidez total expresada en ácido láctico.....	119
Anexo VIII: Mediciones previas para estimar el tiempo de fermentación.....	120
Anexo IX: Ensayos previos para determinar el edulcorante a utilizar en la formulación de la bebida de quinua.....	121
Anexo X: Fotos.....	122

I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un grano alimenticio que se cultiva ampliamente en la región andina, desde Colombia hasta el norte de la Argentina para las condiciones de montañas de altura, aunque en Chile se produce un ecotipo a nivel del mar (Tapia, 2007). Domesticada por las culturas prehispánicas, es utilizada en la alimentación desde por lo menos unos tres mil años (Tapia, 2007). Es una planta, que sin poseer una cantidad excepcional de proteínas, se caracteriza por la elevada combinación de aminoácidos esenciales que presenta (Romo *et al.*, 2006)

El grano de quinua, además, contiene una elevada cantidad de carbohidratos (60-70%) (Tapia, 1979). Es posible, entonces, elaborar una bebida de quinua en la que estos almidones sean hidrolizados, liberando azúcares libres. Si se añaden microorganismos probióticos a dicha bebida, y se propician condiciones anaeróbicas o microaerófilas, estos azúcares podrían ser fermentados lácticamente. Se obtendría finalmente una bebida probiótica de quinua que combinaría dos grandes beneficios: el nutricional, proveniente de la composición de la quinua, y el beneficio sobre la salud, producto de los efectos de los microorganismos probióticos sobre el organismo humano.

En la presente investigación se elaboró una bebida probiótica de quinua, obtenida por la fermentación láctica del almidón hidrolizado de harina de quinua (*Chenopodium quinoa*).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Elaborar una bebida probiótica de quinua, obtenida por un proceso de fermentación láctica del almidón hidrolizado de harina de quinua *Chenopodium quinoa*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar si es posible conducir una fermentación láctica de una suspensión de almidón hidrolizado de harina de quinua
- b) Determinar la mejor concentración de microorganismos probióticos y el mejor tiempo de fermentación para obtener una bebida probiótica de quinua.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Quinoa (*Chenopodium quinoa*)-

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una planta alimenticia muy antigua del área andina. Su centro de origen va desde el sur del nudo de Pasco hasta el altiplano boliviano. (Tapia, 1979)

Es un grano alimenticio (Tapia, 2007) perteneciente a la familia Chenopodiaceae (FAO, 2011). Antiguamente fue denominado “pseudocereal” (Tapia, 1979) debido a su alto contenido de carbohidratos, principalmente de almidón (50- 60%) que hace que se emplee como un cereal; sin embargo, normalmente su grasa es más alta que la de estos y su proteína mayor (Romo *et al.*, 2006). Ver figura 1.



Figura 1.- Quinoa (*Chenopodium quinoa*)

Debido a su amplia distribución por la zona andina, la quinoa es conocida con diferentes nombres, según la región y el idioma de la cultura. Tenemos, por ejemplo: kinua, quinoa, parca, quiuna (idioma quechua); supha, jopa, jupha, jiura, aara, ccallapi y vocali (aymara); suba y pasca (chibcha); quingua (mapuche); quinoa, quinoa dulce, dacha, dawé (araucana); jupa, jara, jupa lukhi, candonga, licsa, quiñoa (Mujica & Jacobsen, 2006).

2.1.1 Historia.-

La quinoa constituyó un importante componente de la alimentación de los pueblos prehispánicos en las tierras altas de los Andes. El inicio de su domesticación data desde 5000 a.C., habiendo sido utilizada por culturas preincas e incas (Tapia, 1979; Repo-Carrasco, 2003).

Sin embargo, su cultivo no progresó porque la cultura española que penetró las tierras americanas, impuso principalmente el trigo y la cebada en el grupo de los cereales (Tapia, 1979).

Tapia (1979) en su libro “La quinua y la kañiwa: cultivos andinos” menciona varios hallazgos arqueológicos de quinua. Por ejemplo, algunas ramas fructíferas terminales y granos sueltos, encontrados en diferentes regiones del Perú y en la zona costera de Arica, Chile. Asimismo, las semillas de quinua encontradas en las antiguas tumbas indígenas en Tarapacá y en Calama (Chile) y en la región Colchaqui-Diaguaita.

En el norte del Perú el cultivo de la quinua fue común, pero en asociación con maíz. Más al sur, ésta alcanzó importancia tanto en el "Callejón de Huaylas" como en el valle del Mantaro, donde fue ampliamente cultivada por la tribu de los Huancas.

Ya en la época de la colonia, fue muy poca la importancia que se le dio a este cultivo, y las pocas referencias que se tienen de esta época son mayormente de investigadores europeos (Tapia, 1979).

2.1.2 Importancia.-

Inicialmente, los beneficios de la quinua no eran mundialmente conocidos. Para que la quinua fuera reivindicada en cuanto a su importancia alimenticia tuvieron que pasar más de 500 años. Siendo originaria de la zona Andina, ahora es Europa uno de los continentes más interesados en investigar las propiedades de tal grano (García, 2011)

Hay que destacar que la NASA en los EEUU eligió a la quinua como alimento nutritivo por excelencia para los viajes espaciales. Por su parte, la FAO, organismo perteneciente a las Naciones Unidas, no se ha cansado de divulgar que la quinua es lo más cercano que existe como alimento ideal para el ser humano. Es considerada por muchos investigadores como el “super grano del futuro” (García, 2011)

Otra característica es el valor biológico de sus proteínas. El referido índice es de 75, es decir que de 100g de proteínas ingeridas por el ser humano, 75 son asimiladas sin problemas. Es una cantidad alta si se compara con la carne (60), la leche (72), el trigo (60), el maíz (44) y el huevo (95) (García, 2011)

El elevado valor biológico se debe a la equilibrada composición de aminoácidos esenciales que posee. Presenta lisina, metionina y cisteína. Además es rica en hierro, calcio, fósforo, fibra y vitamina E. Por tanto, se aconseja el consumo de este alimento por parte de diabéticos, niños, adolescentes, ancianos y convalecientes (García, 2011)

Además, la quinua es una planta que se adapta muy fácilmente a climas y terrenos hostiles. Estudios realizados por la FAO han demostrado que los cultivos de quinua tienen una gran adaptabilidad a climas áridos y que se pueden realizar plantaciones tanto a alturas elevadas como al nivel del mar (García, 2011)

Anualmente, se producen alrededor de 48000 toneladas a nivel mundial repartidas en un 45% en Bolivia, 42% en Perú, 6% en EEUU, 3% en Canadá, 2% en Ecuador y una mínima fracción en Europa (García, 2011)

2.1.3 Descripción botánica.-

Según la FAO (2011), la clasificación botánica es:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-clase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodiaceae

Género: *Chenopodium*

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd.

2.1.3.1 Raíz.-

La germinación de la quinua se inicia a las pocas horas de tener humedad, alargándose primero la radícula que continua creciendo y da lugar a una raíz pivotante vigorosa que puede llegar hasta 30 cm de profundidad. A partir de unos pocos centímetros del cuello, empieza a ramificarse en raíces secundarias, terciarias, etc., de las cuales salen las raicillas que también se ramifican en varias partes (Tapia, 1979).

La raíz de la quinua es fuerte, puede sostener plantas de hasta 2 y más metros de altura (Tapia, 1979). (Figura 2)



Figura 2.- Raíz de la quinua

2.1.3.2 Tallo.-

El tallo es cilíndrico a la altura del cuello y después anguloso debido a que las hojas son alternas a lo largo de cada una de las cuatro caras. Tiene una hendidura de poca profundidad, que abarca casi toda la cara, la cual se extiende de una rama a otra. A medida que la planta va creciendo, nacen primero las hojas y de las axilas de éstas, las ramas (Tapia, 1979).

El color del tallo puede ser verde; verde con axilas coloreadas; verde con listas coloreadas de, púrpura o rojo desde la base, y finalmente coloreado de rojo en toda su longitud. La corteza es firme y compacta, formada por tejidos fuertes (Tapia, 1979). Ver Figura 3. De acuerdo a la variedad, el tallo alcanza diferente altura y termina en la inflorescencia. Así como existen en otras especies variedades altas y bajas, en la quinua también se observan ambos extremos, pudiendo variar la altura entre 50 cm y 2 metros (Tapia, 1979).



Figura 3.- Tallo de la quinua (*Chenopodium quinoa*)

2.1.3.3 Hábito.-

El hábito puede ser sencillo o ramificado. Las plantas de hábito sencillo poseen ramas poco desarrolladas que alcanzan unos pocos centímetros de longitud. En estas plantas, se destaca nítidamente la inflorescencia. Por otro lado, las plantas de hábito ramificado tienen ramas largas que llegan casi hasta la altura de la panoja principal, terminando en otras panojas (Tapia, 1979). Ver Figura 4.

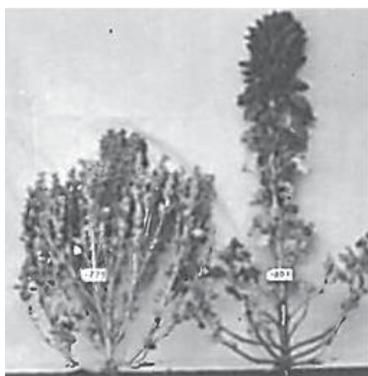


Figura 4.- Diferentes hábitos de la quinua. La planta ubicada a la izquierda es de hábito ramificado, mientras que la de la derecha es de hábito sencillo.

2.1.3.4 Hojas.-

La hoja, como la de todas las dicotiledóneas, está formada por el peciolo y la lámina. Los peciolos son largos, finos, acanalados en su lado superior y de un largo variable dentro de la misma planta. Los que nacen directamente del tallo son más largos, y los de las ramas primarias más cortos (Tapia, 1979).

La lámina es polimorfa en la misma planta, siendo las láminas de las hojas inferiores de forma romboidal o triangular y de las superiores lanceoladas o triangulares (Tapia, 1979).

Por lo general la lámina es plana, pero en ciertas razas de valles puede ser ondulada, dando a la planta un aspecto peculiar. La lámina de las hojas jóvenes normalmente está cubierta de papilas, que cubren también los tallos jóvenes y las inflorescencias. Las papilas son esferoidales o globosas de 1,4 mm de diámetro, blancas, púrpuras o rojas, tanto en la cara como en el anverso. Algunas veces las hojas son brillantes y carentes de papilas (Tapia, 1979).

El número de dientes de la hoja es uno de los caracteres más constantes y varía, según la raza, de 3 a 20 dientes en el último caso siendo hojas aserradas. Las razas con hojas más aserradas se encuentran entre el centro-norte del Perú y el Ecuador. En cambio, las cultivadas en Bolivia tienen muy pocos dientes y en algunos casos carecen de ellos o tienen solo uno o dos (Tapia, 1979). (Ver Figura 5).

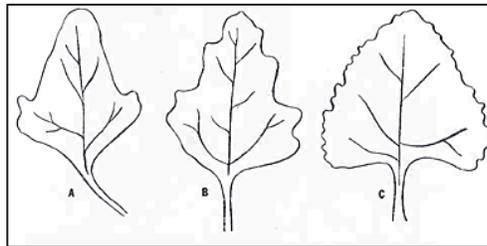


Figura 5.- Variación del número de dientes en las hojas de quinua. A) Raza del sur de Perú y Bolivia de pocos dientes; B) Raza del Centro del Perú de 3 a 12 dientes; C) Raza del norte del Perú y Ecuador con más de 12 dientes.

2.1.3.5 Inflorescencia.-

La inflorescencia de la quinua es racimosa y por la disposición de las flores en el racimo se considera como una panoja. Algunas veces está claramente diferenciada del resto de la planta, siendo terminal y sin ramificaciones, pero en otras no existe una diferenciación clara debido a que el eje principal tiene ramificaciones que le dan una forma cónica peculiar (Tapia, 1979).

La longitud de las panojas es muy variable, se pueden agrupar en pequeñas de 15 cm, y medianas y grandes de hasta 70 cm, siendo muy características las que tienen la panoja diferenciada del tallo (Tapia, 1979).

El eje principal de la inflorescencia es anguloso como el tallo y tiene dos surcos paralelos en cada cara. Las flores que se agrupan a lo largo del eje principal o los ejes secundarios dan lugar a las formas de inflorescencia amarantiforme y glomerulada respectivamente (Figuras 6 y 7) (Tapia, 1979).

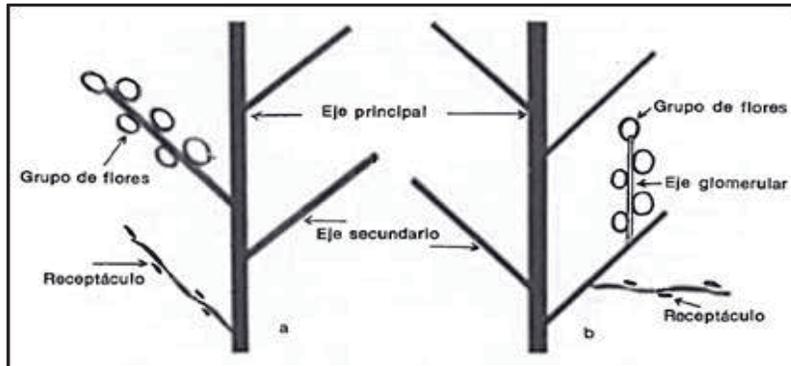


Figura 6.- Formas de Inflorescencia A) Amaranitifforme; B) Glomerulada

En la inflorescencia glomerulada se observa que del eje principal nacen los ejes secundarios y de éstos, los ejes glomerulados que pueden tener de 0,5 a 3 cm de longitud. A lo largo de estos últimos se agrupan las flores en número de 20 o más, sobre un receptáculo. El tamaño del glomérulo, que es esférico, depende de la longitud del eje glomerular y la disposición de los grupos de flores (Tapia, 1979).



Figura 7.- Inflorescencia de la quinua (*Chenopodium quinoa*)

En el tipo de inflorescencia amarantiforme, el eje glomerular nace directamente del eje principal, dependiendo el tamaño del glomérulo de la longitud del eje principal. En muchas razas de quinua se puede observar que los glomérulos amarantiformes se ramifican debido a que los grupos de flores nacen a lo largo de ejes terciarios y cuaternarios, dando a la panoja un aspecto más compacto (Tapia, 1979).

2.1.3.6 Flores.-

Igual que las flores de todas las quenopodiáceas, las de la quinua son incompletas, dado que carecen de pétalos. Las flores en el glomérulo pueden ser hermafroditas o pistiladas, y el porcentaje de cada una de ellas depende de la variedad (Tapia, 1979).

La flor hermafrodita está constituida por un perigonio sepaloide de cinco partes, el gineceo con un ovario elipsoidal con dos o tres ramificaciones estigmáticas rodeadas por el androceo formado por cinco estambres curvos y cortos y un filamento también corto (Tapia, 1979).

La flor femenina consta solamente del perigonio y el gineceo. El tamaño del primero varía de 2 a 5 mm y el del segundo de 1 a 3 mm. Igual que el resto de la planta, el perigonio está cubierto de papilas en el lado externo. Las flores son sésiles o pediceladas, pudiendo en algunos casos tener los pedicelos más de 5 mm. (Tapia, 1979). Ver Figura 8.

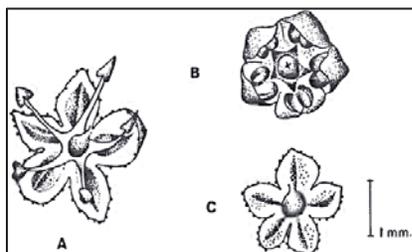


Figura 8. A) Flor hermafrodita en antesis; B) Flor hermafrodita antes de la antesis C) Flor femenina

2.1.3.7 Fruto y semilla.-

El grano de quinua, de tamaño menor que el de los cereales (1,8 - 2,6mm), se clasifica en *grande* (2.2-2.6 mm), *medio* (1.8-2.1 mm) y *pequeño* (menor de 1.8 mm) (Tapia, 1979).

El fruto es un aquenio cubierto por el perigonio, del que se desprende con facilidad al frotarlo cuando está seco. El color del fruto está dado por el del perigonio y puede ser verde, púrpura o rojo. En la madurez, el púrpura puede secarse del mismo color o amarillo, teniendo en este último caso la semilla amarilla (Tapia, 1979).

El pericarpio del fruto que está pegado a la semilla, presenta alvéolos y en algunas variedades se puede separar fácilmente. Para consumirla, algunas poblaciones de los Andes separan el pericarpio tostado primeramente el grano y frotándolo después con los pies en un mortero de

piedra. (Tapia, 1979). El pericarpio almacena un esteroide (saponina) que fluctúa entre el 0.06% y 5.1%, que le da sabor amargo, presenta cierta toxicidad (Romo *et al.*, 2006)

La semilla está envuelta por el episperma en forma de una membrana delgada. El embrión está formado por los cotiledones y la radícula, y constituye la mayor parte de la semilla que envuelve al perisperma como un anillo (Figura 9). El perisperma es almidonoso y normalmente de color blanco (Tapia, 1979).

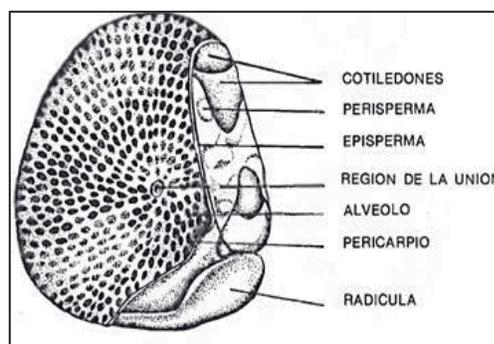


Figura 9.- Partes del fruto de la quinua

2.1.3.8 Saponinas de la quinua.-

Las saponinas son sustancias orgánicas de origen mixto, ya que provienen tanto de glucósidos triterpenoides (de reacción ligeramente ácida), como de esteroides derivados de perhidro-1,2-ciclopentano fenantreno. Estas moléculas se hallan concentradas en la cáscara de los granos de la quinua (Fontúrbel, 2003)

En las formas silvestres y las variedades amargas de la quinua, el contenido máximo es de un 2.8% (aunque el rango es variable de acuerdo a la especie y al ecotipo), que, comparado con las exigencias actuales del mercado, es extremadamente alto (el valor límite es de 0.05%) (Fontúrbel, 2003)

2.1.4 Valor nutritivo y composición química.-

La quinua ha sido utilizada en la alimentación de las poblaciones andinas desde tiempos protohistóricos. La razón para ello es su valor nutricional, principalmente correctivo y terapéutico, reconocido a través de una experiencia milenaria. En la dieta de los pueblos antiguos de América, la quinua fue el reemplazo prioritario, o a veces exclusivo, de las proteínas animales. En efecto, el consumo de leche, carne y huevos no ha sido tradicional ni

común en las poblaciones campesinas. En muchas áreas, la quinua es aún el principal componente proteico de la dieta (Tapia, 1979).

El grano de quinua no es un alimento excepcionalmente alto en proteínas, aunque supera en este nutriente a los cereales más importantes (Tapia, 1979). En la tabla 1 podemos observar una comparación entre la composición química en base seca del grano de quinua versus la de otros cereales.

Tabla 1.- Comparación entre la composición química en base seca** del grano de quinua versus otros cereales.

Elemento	Quinua**	Arroz	Cebada	Maíz	Trigo
Proteína %	16,3	7,6	10,8	10,2	14,2
Grasa %	4,7	2,2	1,9	4,7	2,3
Carbohidratos totales %	76,2	80,4	80,7	81,1	78,4
Fibra cruda %	4,5	6,4	4,4	2,3	2,8
Cenizas %	2,8	3,4	2,2	1,7	2,2
Energía (kcal/100g)	399	372	383	408	392

Fuente: Romo *et al.*, 2006

A pesar de que los granos de quinua poseen mayor cantidad de proteína que otros cereales, el verdadero valor de la quinua radica en la calidad de su proteína, la cual es evaluada según los siguientes parámetros: (Romo *et al.*, 2006)

- *Cantidad de aminoácidos esenciales:* La quinua presenta una combinación de una mayor proporción de aminoácidos esenciales para la alimentación humana, lo que le otorga un alto valor biológico (Tapia, 1979). La proteína de la quinua es rica en histidina y lisina, aminoácidos limitantes en granos como los cereales y se aproxima al patrón dado por la FAO para los requerimientos nutricionales de humanos (Romo *et al.*, 2006).
- *Puntaje:* Es la relación entre los miligramos de aminoácidos recomendados para cada grupo de edad y los miligramos de aminoácidos que aporta el grano de quinua. Ver tabla 2 (Romo *et al.*, 2006)

Prácticamente la mitad (48 %) de la proteína de quinua está formada por aminoácidos esenciales. Con excepción de fenilalanina y leucina, la concentración de otros aminoácidos es realmente satisfactoria (Bravo, 1997). La quinua supera al trigo, maíz, cebada y avena en

cuanto al contenido de lisina, metionina, histidina, isoleucina, y treonina; mientras que el contenido de triptófano es aproximadamente igual al de éstos cereales (Bravo, 1997)

La excepcional riqueza en aminoácidos que tiene la quinua le confiere propiedades terapéuticas muy interesantes. Y ello porque la biodisponibilidad de la *lisina* de la quinua –el aminoácido esencial más abundante en sus semillas-, es muy alta mientras en el trigo, el arroz, la avena, el mijo o el sésamo es notablemente más baja. Este aminoácido que mejora la función inmunitaria al colaborar en la formación de anticuerpos, favorece la función gástrica, colabora en la reparación celular, participa en el metabolismo de los ácidos grasos, ayuda al transporte y absorción del calcio e, incluso, parece retardar o impedir -junto con la vitamina C- las metástasis cancerosas, por mencionar sólo algunas de sus numerosas actividades terapéuticas (FAO, 2011)

En cuanto a la *isoleucina*, la *leucina* y la *valina*, éstos participan juntos, en la producción de energía muscular, mejoran los trastornos neuromusculares, previenen el daño hepático y permiten mantener en equilibrio los niveles de azúcar en sangre, entre otras funciones. Por lo que respecta a la *metionina* se sabe que el hígado la utiliza para producir *s-adenosin-metionina*, una sustancia especialmente eficaz para tratar enfermedades hepáticas, depresión, osteoartritis, trastornos cerebrales, fibromialgia y fatiga crónica, entre otras dolencias. Además actúa como potente agente detoxificador que disminuye de forma considerable los niveles de metales pesados en el organismo y ejerce una importante protección frente a los radicales libres (FAO, 2011)

La quinua también contiene cantidades interesantes de *fenilalanina* (un estimulante cerebral y elemento principal de los neurotransmisores que promueven el estado de alerta y el alivio del dolor y de la depresión, entre otras funciones), de *treonina* (que interviene en las labores de desintoxicación del hígado, participa en la formación de colágeno y elastina, y facilita la absorción de otros nutrientes) y *triptófano* (precursor inmediato del neurotransmisor *serotonina* por lo que se utiliza con éxito en casos de depresión, estrés, ansiedad, insomnio y conducta compulsiva) (FAO, 2011)

Por lo que respecta a los aminoácidos “no esenciales” la quinua contiene más del triple de *histidina* que el trigo, sustancia que sí es esencial en el caso de los bebés ya que el organismo no la puede sintetizar hasta ser adultos por lo que es muy recomendable que los

niños la adquieran mediante la alimentación, especialmente en épocas de crecimiento. Además tiene una acción ligeramente antiinflamatoria y participa en el sistema de respuesta inmunitaria. La *arginina*, por su parte, también es considerada un aminoácido casi esencial en la infancia, niñez y adolescencia ya que estimula la producción y liberación de la hormona de crecimiento, además de mejorar la actividad del timo y de los linfocitos T, participar en el crecimiento y reparación muscular, y ser un protector y detoxificador hepático (FAO, 2011)

En cuanto a la *alanina* es fuente de energía para músculos, cerebro y sistema nervioso y la *glicina* actúa como un neurotransmisor tranquilizante en el cerebro y como regulador de la función motora. Además, la *prolina* – aminoácido que no contienen otros cereales como el trigo- participa en la reparación de las articulaciones, es necesaria para la cicatrización de lesiones y úlceras, parece ser eficaz para tratar los casos de impotencia y frigidez, es protector cardiovascular y se utiliza junto a la *lisina* y la vitamina C para impedir o limitar las metástasis cancerosas (FAO, 2011)

La quinua se considera libre de gluten porque su proteína está conformada principalmente por albúminas y globulinas solubles en agua o soluciones salinas débiles, que –aunque dificulta su uso en la panificación- puede ser útil para alérgicos al gluten (enfermedades Sprue y Zólikali) (Romo *et al.*, 2006).

En la tabla 2 podemos observar una comparación entre los aminoácidos de la quinua y los de otros cereales.

Tabla 2.- Comparación de los aminoácidos del grano de quinua con otros alimentos.

Aminoácido	Quinua*	Arroz	Maíz	Trigo	Frijol	Carne	Pescado	Leche	Patrón FAO
	g aminoácidos/100 g de proteína								
Arginina	6,8	6,9	4,2	4,5	6,2	6,4	5,1	3,7	5,0
Fenilalanina	4,0	5	4,7	4,8	5,4	4,1	37	1,4	6,0
Histidina	2,8	2,1	2,6	2	3,1	3,5		2,7	3,0
Isoleucina	7,1	4,1	4	4,2	4,5	5,2	5,1	10	4,0
Leucina	6,8	8,2	12,5	6,8	8,1	8,2	7,5	6,5	7,0
Lisina	7,4	3,8	2,9	2,6	7	8,7	8,8	7,9	5,5
Metionina	2,2	2,2	2	1,4	1,2	2,5	2,9	2,5	3,5
Treonina	4,5	3,8	3,8	2,8	3,9	4,4	4,3	4,7	4,0
Triftófano	1,3	1,1	0,7	1,2	1,1	1,2	1	1,4	1,0
Valina	3,4	6,1	5	4,4	5	5,5	5	7	5,0

Fuente: Romo *et al.*, 2006

La mayor parte de los lípidos de la quinua se encuentra en el embrión; la composición de sus ácidos grasos se asemeja a la de la soya, con alta proporción de linoleico y linolénico. Según Repo-Carrasco *et al.* (2003) la quinua posee 6.0 g de grasa/100 g de materia seca. El aceite del grano de la quinua demuestra gran estabilidad frente a la rancidez, la cual se atribuye a las altas concentraciones de tocoferol (vitamina E) que actúa como un antioxidante natural (Romo *et al.*, 2006). Ver tabla 3.

Tabla 3.- Comparación del porcentaje de ácidos grasos en el grano de quinua versus otros alimentos

Ácidos grasos	Quinua	Soya	Maní	Palma
	%			
Mirístico	0,2	-	-	15,6
Palmítico	9,9	9,4	9,3	8,7
Estearico	0,8	4,4	2	2,9
Oleico	24,5	21,6	44,7	18,1
Linoleico	50,2	55,2	35,8	2,9
Linolénico	5,4	9,4	-	-
Laúrico	-	-	-	43,9
Eicosanoico	2,7	-	4,2	-
Docosanoico	2,7	-	3,4	-
Tetracosanoico	0,7	-	1,9	-

Fuente: Romo *et al.*, 2006

Estudios realizados en el Perú al determinar el contenido de ácidos grasos encontraron que el mayor porcentaje de ácidos grasos presentes en este aceite es el Omega 6 (ácido linoleico), siendo de 50,24% para quinua, valores muy similares a los encontrados en el aceite de germen de maíz, que tiene un rango de 45 a 65% (FAO, 2011)

El Omega 9 (ácido oleico) se encuentra en segundo lugar, siendo 26,04% para aceite de quinua. Los valores encontrados para el Omega 3 (ácido linolénico) son de 4,77%, seguido del ácido palmítico con 9,59%. Encontramos también ácidos grasos en pequeña proporción, como el ácido esteárico y el eicosapentaenoico. La composición de estos ácidos grasos es muy similar al aceite de germen de maíz (FAO, 2011)

Además, otros estudios encontraron que el 11% de los ácidos grasos totales de la quinua eran saturados, siendo el ácido palmítico el predominante. Los ácidos linoleico, oleico y alfa-linolénico eran los ácidos insaturados predominantes con concentraciones de 52,3, 23,0 y 8,1% de ácidos grasos totales, respectivamente. Ellos encontraron también aproximadamente 2% de ácido erúrico (FAO, 2011)

La quinua ayuda a reducir el colesterol LDL (o colesterol malo) del organismo y elevar el colesterol HDL (o colesterol bueno) gracias a su contenido en ácidos grasos omega 3 y omega 6 (FAO, 2011)

El grano de la quinua tiene casi todos los minerales en un nivel superior a los cereales, su contenido de hierro, que es dos veces más alto que el del trigo, tres veces más alto que el del arroz y llega casi al nivel del frijol (Romo et al., 2006). Ver tabla 4.

Tabla 4.- Comparación del contenido de minerales en el grano de quinua versus otros alimentos (mg de mineral por cada 100g de alimento)

Mineral	Quinua	Trigo	Arroz	Frijol
	mg/100 g alimento			
Calcio	148,7	50,0	27,6	119,1
Fósforo	383,7	380,0	284,5	367,4
Hierro	13,2	5,0	3,7	8,6
Potasio	926,7	500,0	212,0	1098,2
Magnesio	246,9	120,0	118,0	200,0
Sodio	12,2	10,0	12,0	10,3
Cobre	5,1	0,5	0,4	1,0
Manganeso	10,0	2,9	0,0	0,0
Zinc	4,4	3,1	5,1	0,0
Cloro	153,3			
Azufre	193,3			
Aluminio	11,0			
Boro	1,0			
Cobalto	0,005			
Molibdeno	0,001			
Selenio	0,003			

Fuente: Romo *et al.*, 2006

Si se hace una comparación entre trigo, maíz, arroz, cebada, avena, centeno, triticale y quinua, en la quinua resalta el alto contenido de calcio, magnesio y zinc (FAO, 2011)

La quinua es un alimento muy rico en:

- Calcio: Fácilmente absorbible por el organismo. Su ingesta ayuda a evitar la descalcificación y la osteoporosis. El calcio es responsable de muchas funciones estructurales de los tejidos duros y blandos del organismo, así como de la regulación de la transmisión neuromuscular de estímulos químicos y eléctricos, la secreción celular y la coagulación sanguínea. Por esta razón el calcio es un componente esencial de la alimentación. El aporte diario recomendado de calcio es de 400 mg/día para niños de 6 a 12 meses; 1300 mg/día para adultos y se cubre con un consumo medio en alimentos de 800 a 1000 mg/día.. La quinua aporta de 114 a 228 mg/día, con un promedio ponderado de 104 mg/100 g de porción comestible. Algunos autores indican que el contenido de calcio en la quinua se encuentra entre 46 a 340 mg/100 g de materia seca (FAO, 2011)

- Hierro: contiene el triple que el trigo y el quintuple que el arroz, careciendo el maíz de este mineral) (FAO, 2011)
- Potasio: Contiene el doble que el trigo, el cuádruple que el maíz y ocho veces más que el arroz (FAO, 2011)
- Magnesio, en cantidades bastante superiores también al de los otros tres cereales. Un hombre adulto de 70 kg de peso contiene aproximadamente 20 a 28 g de magnesio y el aporte recomendado es del orden 300 a 350 mg/día en el adulto. La quinua contiene 270 mg/100 g de materia seca. Algunas investigaciones, incluso, presentan cifras que van de 170 a 230 mg/100 g de materia seca. El magnesio es un componente y activador de muchas enzimas, especialmente aquellas que transforman fosfatos ricos en energía, además, es un estabilizador de los ácidos nucleicos y de las membranas (FAO, 2011)
- Fósforo: los niveles son parecidos a los del trigo pero muy superiores a los del arroz y, sobre todo, a los del maíz (FAO, 2011)
- Zinc: casi dobla la cantidad contenida en el trigo y cuadruplica la del maíz). El contenido de zinc en el hombre adulto de 70 kg de peso es de 2 a 4 g. El zinc actúa en la síntesis y degradación de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Si el aporte de zinc proveniente de los alimentos es aprovechable en un 20%, se recomienda un consumo de 8.3 mg/día (niños menores de 1 año), 8.4 y 11.3 mg/día (preescolares y escolares), 15.5 y 19.5 mg/día (adolescentes) y 14 mg/día (adultos). Por lo tanto, es suficiente un aporte en la alimentación de 6 a 20 mg/día y en este sentido, la quinua aporta 4.8 mg/100 g de materia seca. Sin embargo, estas cifras pueden variar entre 2.1 a 6.1 mg/100 g de materia seca (FAO, 2011)
- Pequeñas cantidades de cobre y de litio (FAO, 2011)

La quinua supera a los cereales en el contenido de las vitaminas B2, E y A, mientras el contenido de B3 es menor (Romo et al., 2006). Ver tabla 5.

La vitamina A, que es importante para la visión, la diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la respuesta inmunitaria, el gusto, la audición, el apetito y el desarrollo, está presente en la quinua en rango de 0,12 a 0,53 mg/100 g de materia seca (FAO, 2011)

Tabla 5.- Comparación del contenido de vitaminas del grano de quinua versus otros alimentos. (mg de vitamina por cada 100g de alimento)

Vitamina		Quinua	Arroz	Trigo	Frijol	Papa
		mg/ 100 g alimento				
Niacina	B3	10,7	57,3	47,5	25,7	51,8
Tiamina	B1	3,1	3,5	6,0	5,3	4,4
Riboflavina	B2	3,9	0,6	1,4	2,1	1,7
Ácido Ascórbico	C	49,0	0,0	1,2	22,5	69,4
α-Tocoferol	E	52,63	0,0	0,0	0,1	0,3
β-carotenos	A	5,3				

Fuente: Romo *et al.*, 2006

La vitamina E tiene propiedades antioxidantes e impide la peroxidación de los lípidos, contribuyendo de esta forma a mantener estable la estructura de las membranas celulares y proteger al sistema nervioso, el músculo y la retina de la oxidación. Las necesidades diarias son del orden de 2,7 mg/día y para niños de 7 a 12 meses es de 10 mg/día de alfa-tocoferol o equivalentes. La quinua reporta un rango de 4,60 a 5,90 mg de vitamina E/100 g de materia seca (FAO, 2011)

Cabe destacar que la quinua contiene fibra dietaria, es libre de gluten y además contiene dos fitoestrógenos, daidzeína y cenisteína, que ayudan a prevenir la osteoporosis y muchas de las alteraciones orgánicas y funcionales ocasionadas por la falta de estrógenos durante la menopausia, además de favorecer la adecuada actividad metabólica del organismo y la correcta circulación de la sangre (FAO, 2011)

Por lo que respecta a la fibra, es la que hace que la ingesta de quinua favorezca el tránsito intestinal, regule los niveles de colesterol, estimule el desarrollo de flora bacteriana beneficiosa y ayude a prevenir el cáncer de colon. Posee un alto porcentaje de fibra dietética total (FDT), lo cual la convierte en un alimento ideal para lograr eliminar toxinas y residuos que puedan dañar el organismo. Por lo tanto actúa como un depurador del cuerpo (FAO, 2011) Produce sensación de saciedad. El cereal en general, y la quinua en particular, tienen la propiedad de absorber agua y permanecer más tiempo en el estómago por lo que de esta forma se logra plenitud con poco volumen de cereal (FAO, 2011)

El equipo de investigadores del King's College Londres ha descubierto que la quinua ayuda a que los celíacos puedan regenerar la tolerancia al gluten. Comprobaron que si un celíaco lleva una dieta sin gluten pero rica en quinua, pueden recuperar la función del intestino en mucho menos tiempo (FAO, 2011)

2.1.5 Uso medicinal.-

Las aplicaciones de la quinua en la medicina tradicional son conocidas desde tiempos remotos. En las comunidades del altiplano y los valles se menciona que los curanderos Kallawayas (en Aymara significa portadores de yerbas medicinales) hacen múltiples usos de la quinua para fines curativos e inclusive mágicos, utilizando por ejemplo el grano, los tallos, y las hojas para este fin. Los modos de preparación y de aplicación varían para el uso interno como externo. Entre sus usos más frecuentes se pueden mencionar el tratamiento de abscesos, hemorragias y luxaciones (FAO, 2011)

Según la medicina tradicional, el tallo y las hojas de la quinua cocidas con aceite, vinagre y pimienta proporcionan beneficios a la sangre, de igual manera si se hacen cocer las hojas sólo con vinagre y se hacen gárgaras, o se coloca una cataplasma, se desinflama la garganta y se curan las anginas. Si las hojas se hacen cocer con azúcar y canela, este cocimiento purifica el estómago, desaloja la flema y la bilis y quita las náuseas y el ardor del estómago. La infusión de las hojas se usa para tratar infecciones de las vías urinarias o como laxante (FAO, 2011)

Las hojas frescas de la quinua ‘chiwa’, consumidas ya sea en forma de sopas o de segundo, es el remedio indicado contra el escorbuto y otros males o enfermedades causadas por una avitaminosis o falta de alguna vitamina en el organismo. Es un remedio probado contra el ántrax, herpes, urticaria, ‘llejti’ y otras afecciones de la piel. El grano de quinua tiene diversas formas de uso para combatir las afecciones hepáticas, las anginas y la cistitis. Es un analgésico dental y tiene la cualidad de ser antiinflamatorio y cicatrizante, por lo que se aplican emplastos de quinua negra, combinada con algunas otras plantas, para curar las fracturas de huesos. Su fruto contiene bastante cantidad de sustancias alcalinas y se usa como remedio en las torceduras, fracturas y luxaciones, haciendo una pasta mezclada con alcohol o aguardiente (FAO, 2011)

También se recomienda como refrigerante, diurético y preservativo para cólicos. Con especialidad emplean la quinua como remedio antiblenorrágico y en la tuberculosis (FAO, 2011)

La decocción de los frutos es usada medicinalmente para aplicarla sobre heridas y golpes, y también se hacen cataplasmas de los mismos. Por ello el agua del grano cocido cura abscesos del hígado y supuraciones internas, afecciones catarrales, es un laxante suave, es bueno para el

insomnio, combate la caspa y es buen tónico para el cabello, según los curanderos Kallawayas (FAO, 2011)

De igual forma el agua de grano cocido con leche y aceite de almendras sirve para lavar los oídos ante el dolor, los ruidos y la sordera (FAO, 2011)

El cocimiento de 5 cucharadas de semillas de quinua en dos botellas de agua es un buen sudorífico. Este mismo cocimiento, endulzado con miel de abejas o chancaca, es un remedio probado contra las afecciones bronquiales, catarro, tos e inflamación de las amígdalas (FAO, 2011)

El caldo, sopa, o graneado caliente de quinua es un tónico nutritivo, aumenta la leche materna, es reparador de fuerzas, y preserva de la tuberculosis. La sopa de quinua con ullucu o papalisa picada o la chicha de quinua aumentan en forma inmediata la leche de las mujeres que dan de lactar. Contra la neumonía y los dolores de espalda y de cintura, se aplica a las partes afectadas, parches o emplastos preparados con el cocimiento de malva y harina de los granos de quinua (FAO, 2011)

2.2 Almidón de quinua.-

El contenido de almidón en la quinua puede variar entre 42 y 68% del total del grano (Bravo, 1997), siendo menor que en otros granos como el maíz o el trigo, donde se tienen porcentajes de 60 y 70% respectivamente (Scarpatti y Briceño, 1980).

El almidón se presenta en gránulos pequeños, localizados en el perisperma, con cerca del 20% de amilosa, y gelatiniza entre 55 y 65°C (Romo et al., 2006).

Tapia (1990) indica que el almidón de quinua tiene un promedio de 2µm de diámetro por gránulo, comparado con 30 y 140µm para el almidón de maíz y de papa, respectivamente.

La microscopía electrónica de barrido revela que el almidón de quinua presenta unas especies ovales grandes de alrededor de 20µm de largo, compuestos de cientos de gránulos individuales, donde varios de estos compuestos agregados existen dentro de cada célula del endospermo (Atwell et al., 1983).

En cuanto a los azúcares libres, éstos llegan al 6,2%. La fibra insoluble se ha cuantificado en 5,31%; la soluble en 2,49% y la dietética total en 7,8% (Romo et al., 2006).

2.2.1 Contenido de amilosa y amilopectina.-

La quinua tiene bajo contenido de amilosa en comparación a diversos cereales (Atwell et al., 1983). Scarpatti y Briceño (1980) encontraron que ésta tiene contenidos de amilosa que varían entre 9% (Cheweca blanca) y 19% (Variedad Sajama) del total del grano.

El contenido de amilosa es bajo comparado con el del maíz (22-28%), trigo (7-27%) y arroz (23.7%) respecto al grano (Bravo, 1997)

La amilosa está compuesta de aproximadamente 4000 unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4. En los gránulos de almidón este polímero está presente bajo la forma cristalizada, debido principalmente, al gran número de enlaces tipo puente de hidrógeno entre los grupos hidrofílicos. Por su naturaleza cristalina, la amilosa sólo se hincha a temperatura elevada (Bravo, 1997).

Por otro lado, la amilopectina está muy ramificada. Los enlaces glucosídicos del esqueleto son α -1,4 pero los de los puntos de ramificación son enlaces α -1,6. Las moléculas de amilopectina no tienen tendencia a la recristalización y por lo tanto poseen un elevado poder de retención de agua. La amilopectina presenta un grado de recristalización muy inferior al de la amilosa (Bravo, 1997). Según Egas et al. (2010), para la variedad Tunkahuan, el contenido de amilopectina es de 95.46%.

2.3 Hidrólisis enzimática del almidón.-

2.3.1 Enzimas.-

Todas las actividades y funciones del cuerpo que constituyen la vida dependen por entero de las enzimas. Ellas controlan todos los cambios químicos, o sea, el metabolismo, que tienen lugar en las células vivas (Bravo, 1997)

Son catalizadores orgánicos que operan acelerando un proceso y aparecen sin ningún cambio al final de la reacción. Son moléculas proteicas capaces de aumentar la velocidad de reacciones químicas específicas. Y son elaboradas por las células a partir de aminoácidos sencillos (Bravo, 1997)

Cada enzima puede catalizar solamente un tipo específico de reacción química, de tal modo que el centro activo de la molécula de la enzima se adaptará al sustrato con una complementariedad casi perfecta, como el de una llave y su cerradura (Nelson, 2004).

2.3.2 Hidrólisis enzimática.-

Las reacciones de hidrólisis son las responsables de la despolimerización enzimática de proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos ingeridos en la dieta. Las enzimas hidrolíticas (hidrolasas) catalizan la adición de los elementos del agua a los enlaces que conectan subunidades monoméricas en estas macromoléculas. Las reacciones de hidrólisis son, casi invariablemente, exergónicas (Nelson, 2004).

La hidrólisis enzimática del almidón es ampliamente preferida sobre los métodos estrictamente químicos, debido a su alta especificidad y porque es predecible y controlable (Bravo, 1997)

La hidrólisis enzimática resulta ventajosa debido a los efectos fisicoquímicos y organolépticos que produce, como por ejemplo: disminución de la viscosidad, mejora de la filtrabilidad, disminución de la tendencia a la cristalización, clarificación y estabilización de líquidos con vistas a su conservación, mejora de la fermentabilidad, mejora de la estabilidad bacteriológica, mejora de la digestibilidad, entre otros (Bravo, 1997)

2.3.3 Metodología de la hidrólisis del almidón.-

La hidrólisis del almidón consta básicamente de dos pasos: pre-tratamiento del almidón y luego la hidrólisis enzimática. Esto, además de utilizar las condiciones adecuadas de pH, T°, relación enzima/sustrato, etc. (Bravo, 1997).

1) Pre-tratamiento.-

Dada la composición y estructura del almidón, es necesario realizar un pre-tratamiento para que los enlaces α -1,4 y α -1,6 sean más accesibles a las enzimas (Camacho et al., 1992).

Durante esta etapa se busca destruir la organización granular del almidón de la quinua, de manera que se obtenga una mayor superficie específica y menor cristalinidad. Esto permitirá que el almidón sea más fácilmente atacado por la enzima (Camacho et al., 1992).

Los pre-tratamientos pueden ser físicos (molienda, compresión) o fisicoquímicos (calentamiento en presencia de agua y presiones elevadas). Dentro de este tipo de tratamiento se prefiere la técnica del calentamiento rápido seguido de una descompresión súbita, después de un tiempo de contado pequeño, que se conoce como HTST (High temperatura, short time) (Bravo, 1997).

2) Hidrólisis enzimática.-

En esta etapa se pretende que las enzimas rompan los enlaces α -1,4 y α -1,6 del almidón, para liberar cadenas más cortas: dextrinas, maltosa y glucosa. Por tanto, es necesario emplear enzimas específicas para cada tipo de enlace: (Bravo, 1997).

α -1,4 \rightarrow α -amilasa y β -amilasa

α -1,6 \rightarrow pululanasa e isoamilasa

α -1,4 y α -1,6 \rightarrow amiloglucosidasa (glucoamilasas)

En la tabla 6 podemos observar algunas características de las amilasas utilizadas en la hidrólisis del almidón.

Tabla 6: Características de las amilasas utilizadas en la hidrólisis del almidón

ENZIMA	ORIGEN	pH	TIPO ENLACE	TIPO ATAQUE	PRODUCTOS TERMINALES A PARTIR DE	
					AMILOSA	AMILOPECTINA
α -amilasa	<i>A. oryzae</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	6 – 6.5	α -1,4	Endo	Glucosa Maltosa	Dextrinas
β -amilasa	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Streptomyces sp.</i> **	5 – 7.5	α -1,4	Exo	Maltosa Glucosa	Maltosa Dextrinas
Pululanasa	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia intermedia</i> y <i>Streptococcus mitis</i> *	6	α -1,6	Endo	Ninguno	Maltosa*
Isoamilasa	<i>Bacillus cereus</i> ***	3.5	α -1,6	Endo	Ninguno	Cadenas lineales
Amiloglucosidasa	<i>Rhizopus</i> <i>Aspergillus</i>	4.5	α -1,4 α -1,6	Exo	glucosa	Glucosa

Fuente: Bravo, 1997. *(Carrera, 2003); ** (Espitia, 2009); *** (Martínez, 2005)

2.3.4 α -Amilasa (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa) EC 3.2.1.1.-

Es una enzima hidrolítica específica del enlace glucosídico α -1,4 de la amilosa y de la amilopectina (Bravo, 1997).

Aguilar (1995), citado por Bravo (1997) refiere que la acción de la α -amilasa sucede en dos etapas. Inicialmente toma lugar una rápida y completa degradación de amilosa en maltosa y maltotriosa. Este paso de α -amilólisis es esencialmente resultado de un ataque al azar en el sustrato por la enzima. La 2° etapa es mucho más lenta que la primera, produciendo una hidrólisis lenta de oligosacáridos, con la formación de glucosa y maltosa como productos finales. La 2° etapa no es semejante al modelo de acción inicial al azar.

La acción prolongada de la α -amilasa sobre la amilosa da por resultado la formación de glucosa, maltosa y una pequeña cantidad de una mezcla de polisacáridos de cadena corta (también denominada dextrina límite).

La presencia de ramificaciones, residuos de hexosas o uniones que no sean enlaces glucosídicos α -1,4 explican la incapacidad de la enzima para hidrolizar dicha dextrina límite (Bravo, 1997).

Por otro lado, la α -amilólisis de la amilopectina rinde glucosa, maltosa y una serie de α -dextrinas límites, oligosacáridos de 4 o más residuos de glucosa. Todas ellas contienen cadenas glucosídicas α -1,6. La α -amilasa no puede hidrolizar enlaces α -1,6 y requiere un estabilizador como el Ca^{+2} (Bravo, 1997).

Las α -amilasas comerciales pueden ser de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliqueasciens*) o de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*, *A.níger*, etc). Las enzimas de origen microbiano suelen ser más termoestables que las de origen fúngico (Bravo, 1997).

2.3.5 α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, Type XII A, Sigma Aldrich.-

Esta es una alfa-amilasa termoestable producida por una cepa de *Bacillus licheniformis*. (Sigma-Aldrich, 2012). Ver Certificado de Calidad en el Anexo I.

Esta enzima es usada en diferentes industrias:

- Alcohol: Es usada para el adelgazamiento del almidón en la destilación de mostos.

- Almidón: En la industria del almidón, es usada para la licuefacción continua del almidón a temperaturas entre 105°C y 110°C. Se aprovecha la estabilidad de esta enzima a altas temperaturas.
- Cervezas: Se utiliza para licuar el almidón que se agrega al mosto utilizado en la industria cervecera.
- Azúcar: Se usa para degradar el almidón presente en la caña de azúcar. De esta manera, el contenido de almidón se reduce, y la filtración en la refinería se facilita.
- Textiles: Se usa para el desengomado de los textiles a altas velocidades y altas temperaturas, antes de su teñido.

Actividad enzimática:

Esta enzima tiene un rango de actividad entre pH 5 y 9, con un rango óptimo entre 7 y 9. Es estable entre pH 7-10 y es estable desde 40°C hasta 60°C a pH 7. La actividad máxima es a 90°C y a 100°C se mantiene el 60% de la actividad.

Hidroliza los enlaces α -(1,4) de polisacáridos de tres o más unidades de glucosa unidas por enlace glucosídico α -(1,4). El enlace α -(1,6) no es hidrolizado.

Almacenamiento:

Esta enzima mantiene aproximadamente 98% de actividad después de 60 minutos a pH 6.2 a 85°C y mantiene 100% de actividad después de ser almacenada por 1 hora a 91°C. Debe ser guardada a temperaturas entre 2 y 8°C. En este rango, la actividad declarada se mantendrá durante al menos 1 año. En la figura 10 se observa la presentación comercial de esta enzima.



Figura 10.- Enzima α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, marca Sigma-Aldrich

2.3.6 Aplicaciones de los hidrolizados de almidón.-

Los productos de la hidrólisis enzimática del almidón (dextrinas, maltodextrinas, maltosa y glucosa) aparte de servir como edulcorantes, se utilizan en las industrias de panificación, confitería, bebidas refrescantes y en la preparación de algunos productos lácteos (Bravo, 1997).

En pan y galletas, la α -amilasa suplementa la deficiencia de esta enzima en la harina de trigo; su acción mejora las propiedades reológicas y la fermentación de la masa, aumenta el volumen de la miga y la coloración de la corteza (Bravo, 1997)

La aplicación más importante de los hidrolizados del almidón de los cereales es la obtención de jarabes de glucosa y/o fructosa y la preparación de cereales hidrolizados para alimentación infantil (Gonzalez et al., 1989).

2.3.7 Bebidas elaboradas a partir de almidón hidrolizado de quinua.-

En la actualidad se han realizado algunas investigaciones para obtener bebidas a partir a quinua. Sin embargo, estas bebidas son sólo hidrolizados de quinua, más ninguna es una bebida fermentada.

Se tiene, por ejemplo, la tesis de maestría, de nombre “Obtención de una bebida de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) hidrolizada”, realizada por Sonia Zanabria en el 2003 (UNALM). En esta tesis, se realizó una hidrólisis enzimática de una suspensión de quinua al 12.5%, luego se formuló la bebida y finalmente se determinó la composición del producto final. En este estudio, las hidrólisis comprendieron, hidrólisis de los almidones, proteínas y pectinas, para luego centrifugar, lixiviar, y concentrar el producto. Luego de esto, el producto fue formulado (se añadió saborizante de naranja), pasó por un tratamiento térmico y finalmente fue envasado.

Existe otra tesis de pre-grado “Estudio de la hidrólisis enzimática de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)”, realizada por Betty Bravo en 1997 (UNALM). En dicha investigación el objetivo principal fue estudiar la hidrólisis de la harina de quinua insuflada utilizando amilasas, celulasas, amiloglicosidasas, un complejo proteasa-peptidasa y endoproteasas, en diferentes combinaciones. Se seleccionó el mejor tratamiento y a partir de ello se elaboró una bebida pero sin formulación.

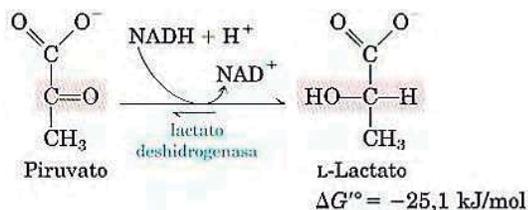
2.4 Fermentación láctica.-

2.4.1 Formación de ácido láctico.-

El piruvato ocupa un lugar importante en el metabolismo de los glúcidos. En condiciones aeróbicas, el piruvato se oxida a acetato, el cual entra en el ciclo del ácido cítrico y es oxidado a CO_2 y H_2O , y el NADH formado por la deshidrogenación del gliceraldehido-3-fosfato se reoxida a NAD^+ mediante el paso final de sus electrones al O_2 en el proceso de respiración mitocondrial (Nelson, 2004)

Sin embargo, en condiciones de anaeróbicas el NADH generado en la glucólisis no puede ser reoxidado por el oxígeno. La incapacidad para regenerar NAD^+ dejaría a la célula sin aceptor de electrones para la oxidación del gliceraldehido-3-fosfato, con lo que se detendrían las reacciones de la glucólisis que producen energía. Por tanto, se ha de regenerar el NAD^+ por otra reacción. La mayoría de microorganismos modernos, como las bacterias ácido lácticas, regeneran continuamente el NAD^+ durante la glucólisis anaeróbica por medio de la transferencia de los electrones desde el NADH para formar un producto final reducido como el lactato o el etanol. Esta vía se conoce como fermentación láctica (en el caso de que el producto final sea el lactato) y fermentación alcohólica (en el caso de que el producto final sea el etanol) (Nelson, 2004)

La reacción está catalizada por la lactato deshidrogenasa, que forma el isómero L del lactato a pH 7:



Las fermentaciones son llevadas a cabo por una variedad muy elevada de organismos, y forman una gran variedad de productos, algunos de los cuales pueden ser utilizados comercialmente. (Nelson, 2004)

Existen además, diversos tipos de fermentaciones: homoláctica, heteroláctica, del ácido propiónico, ácido-mixta y butanodiólica.

La fermentación homoláctica se llama así porque su único producto final es el ácido láctico. La obtención del piruvato es por la vía Embden-Meyerhof. Es llevada a cabo por bacterias de

los géneros: *Streptococcus*, *Pediococcus* y varios grupos de *Lactobacillus* (*L. caucasicus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *S. thermophilus*) (Mateos, 2005)

La fermentación heteroláctica se llama así porque su producto final no es exclusivamente ácido láctico, sino que también incluye etanol y CO₂. La obtención del piruvato es por la vía de las pentosas. Este proceso es llevado a cabo por *Leuconostoc* y *Bifidobacterium* (Mateos, 2005)

2.4.2 Ácido láctico.-

El ácido láctico es un ácido orgánico natural de importancia industrial en las aplicaciones farmacéuticas como electrolito y fuente de minerales; en la industria cosmética como pH buffer, antimicrobiano y rejuvenecedor de la piel, como neutralizante, solvente y agente limpiador en la industria química, y en la industria alimentaria como acidulante, preservante y antimicrobiano. Y se utiliza en una gran variedad de alimentos procesados como caramelos, productos de panadería, sopas, lácteos, cerveza, jaleas, mermeladas, mayonesa y huevos procesados (García, 2010)

El ácido láctico es responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor ácido característicos del yogurt. Esta acidez también inhibe el crecimiento de otras bacterias, por ejemplo las patogénicas *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, y algunos microorganismos que deterioran el producto (García, 2004)

2.5 Microorganismos probióticos.-

2.5.1 Probióticos.-

“Probiótico” de las palabras griegas que significan “pro-vida”. (Ogueke et al., 2010)

En 1965, Lilly y Stillwell fueron los primeros en citar el término “probiótico” para describir cualquier sustancia u organismo que contribuyera a mantener el equilibrio intestinal en los animales. Según estos autores, serían sustancias segregadas por un microorganismo las que estimulan el crecimiento de otro. (Tormo, 2006)

En 1989, Roy Fuller definió los probióticos como un suplemento microbiano vivo que afecta benéficamente al animal hospedero, mejorando el balance intestinal microbiano. También se puede definir como “una preparación o producto que contiene ciertos microorganismo viables

en suficiente número, que altera la microflora del intestino hospedero y brindan efectos benéficos en la salud (Schrezenmier y De Vrese, 2001)

Según la actual definición de la FAO/WHO, los probióticos son microorganismos vivos, que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud del hospedero (FAO/WHO, 2001)

La definición del Teitelbaum y Walker (Tormo, 2006) considera a los probióticos como una preparación o producto que contiene microorganismos viables definidos en cantidad suficiente para alterar la microflora en el intestino (por implantación o colonización) ejerciendo efectos benéficos en el huésped.

Siguiendo a Teitelbaum y Walker, los criterios para que los microorganismos sean considerados como probióticos son:

- Ser de origen humano
- No ser patogénicos por naturaleza
- Ser resistentes a la destrucción por procedimientos tecnológicos
- Ser resistentes a la destrucción por las secreciones gástricas y por la bilis.
- Poder adherirse al epitelio intestinal
- Ser capaces de colonizar el tracto gastrointestinal, incluso por cortos períodos
- Producir sustancias antimicrobianas
- Modular las respuestas inmunitarias
- Ejercer una influencia en algunas actividades metabólicas humanas, como la asimilación de colesterol, producción de vitaminas, etc.

Las cepas más comúnmente usadas como probióticos son: (Tormo, 2006)

1) *L. casei* GG, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. reuterii*, *L. plantarum*,

- *Lactobacillus casei* GG (LGG): Posee resistencia a los jugos gástricos y a la digestión biliar, y tiene capacidad para colonizar el colon humano. No posee plásmidos, así que tiene una resistencia estable ante los antibióticos. Produce solamente ácido láctico (no en el isómero D). En su membrana expresa factores adhesivos que permiten su interacción con los enterocitos humanos

- *L. acidophilus*: También se puede unir a enterocitos de una forma independiente del calcio. Se cree que la adhesión tiene lugar mediante un componente proteínico extracelular. Además, inhibe otras bacterias anaeróbicas *in vitro* como Clostridium, bacteroides, pseudomonas, estafilococos y enterobacterias. También inhibe bacterias patogénicas como *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*. Estos efectos duran tan sólo mientras se consumen; en un estudio se demostró que en un 67% de voluntarios, desaparecieron de las heces en 7 días.

2) *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*

Constituyen el grupo más importante de bacterias sacarolíticas del intestino grueso, hasta un 25% en el colon del adulto, y hasta un 95% del recién nacido con leche materna. No forman aminas alifáticas, derivados sulfurosos ni nitritos, producen vitaminas, sobretodo del grupo B, así como enzimas digestivas; su metabolismo produce ácidos grasos de cadena corta (AGCC), como acetato y lactato, que disminuyen el pH intestinal con efectos antibacterianos. Además, estos AGCC son un combustible excelente para el colonocito, e intervienen en el metabolismo hepático.

3) *Streptococcus salivarius spp*, *S.thermophilus*, usados normalmente en la obtención, junto con *L. bulgaricus* de los yogures de consumo diario. También se usan *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*.

4) La levadura *Saccharomyces boulardii*, con efectos probióticos probados y muy usada en España (Ultralevura®). Inhibe el crecimiento de bacterias patógenas tanto *in vitro* como *in vivo*; la temperatura óptima para su desarrollo es de 37°C, y se ha demostrado que es resistente a la digestión por los jugos gástricos y biliares, alcanzando indemne el colon. Por tratarse de un hongo y no de una bacteria, no se ve afectado por el uso concomitante de antibióticos. Una vez retirada su administración, es rápidamente eliminado.

5) Otro probiótico sería el kéfir, que no ha encontrado padrino que estudie y demuestre sus efectos beneficiosos. Considerado como un regalo que hizo Mahoma a los primeros

conversos del Cáucaso, sólo se ha podido demostrar que inhibe el crecimiento de *Salmonella*.

2.5.2 Efectos de los probióticos sobre el organismo y mecanismos de acción.-

Según Tormo (2006) los efectos son diversos:

1) Inducción de un pH ácido por debajo de 4:

- Esto se debe en parte a la producción de AGCC como acetatos, butiratos, etc. Estos AGCC pueden llegar a unas concentraciones que impidan el crecimiento de gérmenes. El pH ácido favorece el crecimiento de las bacterias tolerantes al ácido.

- Algunos probióticos como los lactobacilos, generan peróxido de hidrógeno que reduce el pH luminal y el potencial redox y produce bacteriocinas que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, y, en ocasiones, mediante la presión baja de oxígeno, favorecen el crecimiento de anaerobios.

- Otros actúan produciendo gran cantidad de ácido láctico, como *L. salivarius*, que ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, y en la reducción de la inflamación de la mucosa gástrica.

2) Restablecimiento de la flora normal tras una gastroenteritis aguda, que disminuye la permeabilidad intestinal y potencia el efecto barrera inmunológico.

3) Los lactobacilos y bifidobacterias promueven la maduración del intestino y su integridad, y son antagónicos de patógenos y contribuyen a la modulación de la inmunidad intestinal. La administración continuada de *L. casei* induce a una menor proliferación de bacterias aeróbicas gramnegativas, con mayor recuperación de *Lactobacillus* en heces.

4) Disminuyen la intolerancia a la lactosa e incrementan la actividad lactásica intestinal, con la mejora del trofismo del intestino.

5) Ejercen influencia en la transferencia de plásmidos y en el establecimiento de transconjugados en el intestino. Según Maisonneuve (2000), citado por Tormo (2006), el

consumo de yogurt disminuye la transferencia del plásmido autotransmisible R388 de *Escherichia coli K12* en al menos 10 veces.

6) Poseen la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos y afectan a la composición del ecosistema intestinal, incrementando el efecto barrera no dependiente del sistema inmunológico. En ocasiones compiten con diversos patógenos en su adhesión al epitelio por medio de ciertos determinantes adhesivos.

7) Ejercen un efecto competitivo con otras bacterias, ocupando sus lugares de anidación e inhibiendo el crecimiento de especies enteropatógenas.

8) Acortan el tiempo de excreción de rotavirus, según demostró en una investigación en 100 niños afectados por rotavirus.

9) Poseen capacidad de aumentar la expresión de mucinas ileocolónicas MUC 2 y MUC3, coadyuvando al recubrimiento del intestino de una capa de moco, mecanismo inespecífico, pero muy eficaz de la lucha antimicrobiana.

10) Los *Lactobacillus* y las Bifidobacterias pueden segregar antibióticos naturales con amplio espectro de actividad, como las lactocinas, las helveticinas, las curvacinas, las nicinas y las bifidocinas. De esta forma acortan la duración de la diarrea, pero en estudios recientes se ha demostrado que para ser realmente efectivas primero han de haber colonizado, por lo que sus efectos no se notarán hasta 2-3 días después de su administración.

11) Pueden competir por nutrientes con la flora intestinal patógena.

12) Dificultan la traslocación bacteriana, por lo que podrían ser útiles en pacientes que reciben alimentación parenteral.

13) El mecanismo de acción de los probióticos también se ha estudiado en niños afectados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que aquejan de frecuentes episodios de diarrea y mala absorción. Con la administración de *Lactobacillus plantarum* 299V se consiguió colonizar el intestino de niños con VIH y desencadenar una respuesta sistémica inmunitaria.

14) También se ha demostrado su acción en la protección contra candidiasis orales sujetas a inmunodeficiencias graves, pero usando *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei* inactivados mediante tratamiento térmico. Esto induce a pensar que el mecanismo de acción está en parte vinculado a componentes antigénicos no desnaturalizados por el calor.

15) Efectos en la Diabetes mellitus.-

La administración oral de *L. casei* a un modelo de diabetes mellitus inducida en ratones inhibió el desarrollo de diabetes mellitus y reguló la respuesta inmune. En trabajos posteriores, en los que se administró este lactobacilo a ratones afectados de una diabetes no dependiente de insulina, se consiguió reducir los niveles de glucosa en sangre, además de modificar la respuesta inmunológica.

16) Mecanismos de acción sobre la prevención del cáncer.-

- Hay estudios que han demostrado una relación inversa entre la aparición del cáncer de mama en Francia por el consumo de probióticos.

- El cáncer de colon se presenta como etapa final de una serie de episodios en parte dirigidos genéticamente. Morfológicamente, los cambios tempranos se inician como una hiperproliferación de células en el interior de las criptas del colon llamadas “criptas aberrantes”, consideradas como estructuras pre neoplásicas. Un pequeño número de ellas evolucionarán a pólipos y, posteriormente a tumores. Se ha podido demostrar que con la administración de leche fermentada se ha conseguido una reducción de hasta el 50% del número de criptas aberrantes en ratones tratados con sustancias oncogénicas.

- Por otra parte, en estudios realizados en 1998, describieron la disminución de marcadores tumorales de proliferación celular en ratas (el índice de etiquetaje colónico, la

actividad de la ornitín descarboxilasa y la actividad oncogénica del ras-p21) a las que se administró *B. longum*.

- Los mecanismos por los que se ejerce esta acción antioncogénica no están claros. Se ha especulado con que los lactobacilos se pueden unir a compuestos mutagénicos. Otra teoría sería la de que las “malas bacterias” pueden convertir los procarcinógenos en carcinógenos mediante varias enzimas, acción que por competición, las “buenas bacterias” inhibirían, y se formarían menos subproductos nocivos. Se ha demostrado que el LGG disminuye la β -glucoronidasa fecal, la nitrorreductasa y la colilglicina hidrolasa, todos ellos agentes procancerígenos.

- *L. casei*, cepa *shirota*, tiene efectos poderosos antitumorales y antimetastásicos en células tumorales transplantables de roedores por un mecanismo vinculado a la supresión de la carcinogénesis inducida químicamente.

- Igualmente, *L. casei* es un poderoso estimulante de la granulopoyesis en el bazo y la médula ósea, según los trabajos realizados en ratones irradiados.

- Esa misma cepa por un mecanismo de modificación de las respuestas inmunitarias humorales y celulares, impide el desarrollo de la artritis colágena de tipo II.

- También se ha especulado con que los probióticos desactivan los carcinógenos impidiendo las modificaciones que ejercen en el ADN.

- Otra teoría sería la de que los thiol, subproductos del metabolismo de las proteínas, originados por las proteasas bacterianas, desactivan varios mutágenos colónicos.

- Muchos de estos trabajos se han realizado en animales, y se debería comprobar si algo semejante sucede en humanos.

17) Mecanismos de acción en el metabolismo del colesterol.-

- Estudios en ratas y humanos han demostrado que cuando se toma grandes cantidades de yogurt o leche con probióticos (bifidobacterias), los niveles de colesterol y de las lipoproteínas de baja densidad descienden hasta un 31 %. Uno de los mecanismos propuestos es la disminución de la actividad de la β -hidroximetil glutaril-coA hepática.

- También propician el aumento de ácidos biliares en heces, lo que indica que inducen una conversión inmediata de colesterol a ácidos biliares, segundo mecanismo que justifica el descenso del colesterol.

- Un tercer mecanismo estaría mediado por el estímulo en la formación de AGCC, propionatos y butiratos que inducen en el intestino grueso. Estos ácidos grasos se absorben y pasan a la sangre. El acetato aumenta los niveles de colesterol en sangre y disminuye la respuesta hipercolesterolémica del acetato.

18) Estreñimiento.-

- Numerosos estudios demuestran que la adición de probióticos a bebidas lácteas puede contribuir a disminuir el estreñimiento, afección en la que el número de deposiciones es menor a tres veces por semana, asociado a heces duras o difíciles de evacuar, dolor y distensión abdominal (Manzano et al., 2012)

- Las investigaciones muestran que el beneficio sobre el estreñimiento puede ser provisto por distintas cepas, sin embargo, se observan diferencias en la población en la cual logran el efecto (favorable para niños y/o adultos), así como, en el indicador del cambio a nivel digestivo (número de deposiciones, consistencia de heces, dolor, entre otras) (Manzano et al., 2012)

- A continuación, se mencionan algunas de las cepas probióticas para las cuales se han evidenciado resultados favorables sobre el estreñimiento: (Manzano et al., 2012)

* La administración de *L. reuteri* (DSM 17938) en niños con estreñimiento crónico muestra efectos positivos en la frecuencia de la evacuación intestinal, aun cuando no se han observado efectos favorables en la consistencia de las heces.

* También se ha comprobado que el *L. casei rhamnosus* Lcr35 y el *Bifidobacterium lactis* DN-173010 o *Lactobacillus casei shirota* o *Escherichia coli* Nissle 1917 favorecen la frecuencia de las evacuaciones intestinales y la consistencia de las heces.

* Asimismo, se ha observado el efecto simbiótico del *Lactobacillus acidophilus* 145 y *Bifidobacterium spp* 420 para prevenir la recurrencia de la enfermedad sintomática no complicada diverticular de colon, especialmente en aquellos pacientes con predominio de estreñimiento.

* La mezcla de probióticos se considera una alternativa en el tratamiento del estreñimiento: en niños se ha demostrado que la combinación de los probióticos *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, y *L. rhamnosus* genera una reducción significativa en los síntomas de esta patología,

especialmente en relación al dolor abdominal y a la consistencia de heces. En adultos, el consumo de yogurt con una mezcla de probióticos *Bifidobacterium breve*, *B. bifidum*, y *Lactobacillus acidophilus* ha demostrado un significativo aumento en la frecuencia de la evacuaciones.

* El *Bifidobacterium lactis* Bb-12 es otra de las cepas probióticas cuyo consumo en bebidas lácteas fermentadas ha demostrado efectos benéficos a nivel intestinal. Específicamente, se relaciona con el aumento en el volumen de las heces y en la frecuencia de evacuación, así como en una reducción significativa del hedor y la aparición de formas más blandas de las mismas.

* Los lácteos fermentados que contienen fibra dietaria tienen un efecto aditivo en el estreñimiento comparado con aquellos que sólo contienen el probiótico, especialmente en personas donde el estreñimiento se relaciona a síndrome de colon irritable.

* En consecuencia, la evidencia científica actual muestra el beneficio de utilizar cepas probióticas en el manejo del estreñimiento, más aún si se adiciona fibra dietaria. Estas cepas pueden utilizarse a manera de suplementos o adicionadas en alimentos, esencialmente lácteos fermentados. No obstante, se considera importante realizar más investigaciones que permitan obtener una evidencia más sólida sobre el efecto en el estreñimiento. Estas investigaciones deben dirigirse a establecer asuntos como especificidad de cepas, dosis asociada al efecto, población en la cual pueden ser recomendados

19) Síndrome de intestino irritable.-

El síndrome de intestino irritable (SII) es una de las patologías gastrointestinales más comunes; se caracteriza por dolor abdominal, frecuencia de defecación alterada, consistencia de heces modificada, meteorismo e hinchazón. Diferentes estudios clínicos randomizados tanto en niños como en adultos han mostrado efectos significativos del consumo de probióticos sobre la frecuencia y severidad del dolor en el SII. Entre los probióticos que han sido estudiados se encuentran: *Lactobacillus* Lp299v, *L. casei* GG, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *B. lactis* DN-173010, *B. infantis* 35624, y el grupo de probióticos VSL#3.

Existe la hipótesis que relaciona la alteración de la composición bacteriana como base del SII, especialmente en aquellos pacientes cuya etiopatogenia provoca una alteración del equilibrio normal de la microbiota, como en la gastroenteritis bacteriana aguda. El manejo con probióticos podría contribuir a restablecer este balance y a mejorar los síntomas especialmente la producción de gases.

Revisiones sistemáticas y meta-análisis han concluido que existe un potencial efecto benéfico de los probióticos en la disminución de la sintomatología general del SII, especialmente del dolor abdominal. No obstante, los estudios presentan heterogeneidad clínica y estadística, con limitantes en el tipo y tamaño de población, dosis y tipo de probiótico utilizado, variación en la definición de los síntomas, corto tiempo de intervención, y limitaciones metodológicas, por lo que se ha recomendado realizar estudios clínicos randomizados aleatorizados de mayor duración y con un mayor rigor metodológico que demuestren el gran potencial de algunas cepas de probióticos.

Se realizó un estudio en humanos para evaluar la cepa *Bifidobacterium lactis* HN019 y su potencial efecto sobre el tiempo de tránsito intestinal y síntomas digestivos frecuentes. El estudio encontró que el *B. lactis* HN019 disminuye el tiempo de tránsito intestinal y la severidad de los síntomas digestivos (estreñimiento, movimientos intestinales irregulares y flatulencia), de manera dosis dependiente, es decir, mayor efecto con la dosis más alta.

En resumen, los probióticos han mostrado un efecto benéfico en el SII sobre todo para controlar el dolor abdominal, pero son necesarios estudios con mayor rigor metodológico, para que los probióticos sean reconocidos como efectivos en el manejo del SII.

20) Intolerancia a la lactosa.-

La lactosa ingerida en los alimentos y no digerida en el intestino delgado pasa directamente al colon, produciendo los síntomas que caracterizan este síndrome: dolor abdominal, diarrea, náuseas, flatulencia y/o distensión abdominal. Estos síntomas se pueden presentar en proporciones diferentes en cada persona ya que existe una variabilidad en la habilidad de la microbiota colónica para fermentar la lactosa; esta variabilidad explica los diferentes niveles de tolerancia en las personas.

El uso de probióticos en personas con intolerancia a la lactosa reduce los síntomas de inflamación o hinchazón, posiblemente como consecuencia de la presencia de la lactasa

microbial presente en las bacterias ácido lácticas, mejorando así la digestión de la lactosa. Sin embargo, existe una amplia variedad en la actividad de lactasa de los diferentes probióticos, lo cual, finalmente influye en su efecto.

La revisión de la literatura concluye que la evidencia permite llegar al consenso científico sobre los efectos benéficos de algunos probióticos para dos aplicaciones en particular: la intolerancia a la lactosa y la diarrea. Sin embargo, en otras revisiones se concluye que la suplementación con probióticos no alivia los síntomas y signos de intolerancia a la lactosa en adultos, excepto para controlar la flatulencia, sugiriendo que pueden ser efectivos para este síntoma.

Por tanto, aunque existe evidencia en relación a que algunas cepas de probióticos pueden ser efectivas, se necesita mayor investigación, especialmente estudios clínicos con cepas específicas y metodologías objetivas.

2.5.3 Interacciones de los probióticos con el sistema inmunológico: Inmunomodulación.-

2.5.3.1 Sistema inmunológico intestinal.-

La función más estudiada del tracto gastrointestinal es la digestión y absorción de nutrientes para satisfacer las necesidades metabólicas que requieren el normal crecimiento y desarrollo del organismo. Además, la mucosa intestinal constituye una barrera protectora contra la presencia constante de antígenos alimentarios y microorganismos de la luz intestinal. (Borrue, 2003)

El tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) representa la mayor masa de tejido linfoide en el organismo, y, por tanto, constituye un elemento de gran importancia en la capacidad inmunológica total del huésped (Borrue, 2003)

Todas las evidencias disponibles hasta el momento sugieren que el sistema inmunológico intestinal responde activamente a los antígenos alimentarios y de la flora normal sin inducir enfermedad, lo que se ha denominado inflamación fisiológica, proceso mediado en parte por el mecanismo de tolerancia oral a los antígenos. (La tolerancia oral es la respuesta fisiológica a los antígenos alimentarios y a la flora comensal mediante la inducción de un estado específico de ausencia de respuesta inmunológica) (Borrue, 2003)

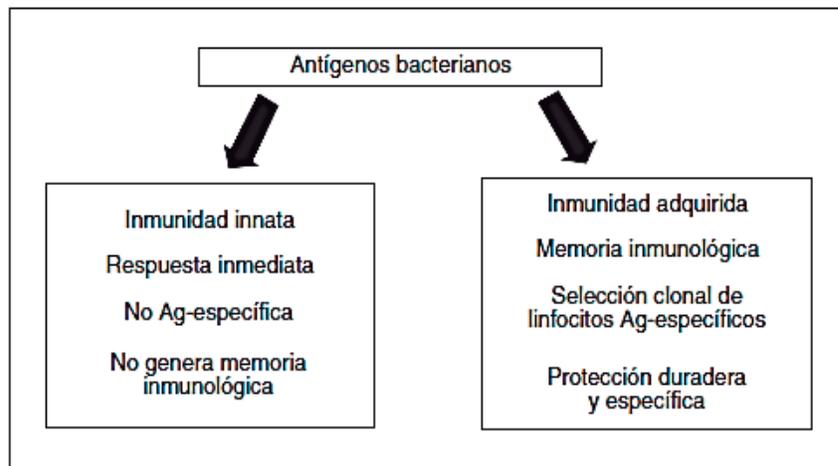
Por el contrario, los antígenos de microorganismos patógenos inducen potentes respuestas inmunitarias en el intestino, lo que indica que el sistema inmunológico intestinal es capaz de procesar y distinguir entre los antígenos inocuos y los potencialmente lesivos. (Borruel, 2003)

La respuesta defensiva del huésped contra los microorganismos patógenos se basa en dos componentes bien diferenciados: la respuesta inmunológica innata y la respuesta adaptativa o adquirida (Borruel, 2003)

La respuesta adaptativa se caracteriza por una selección clonal de linfocitos antígeno-específicos que, a largo plazo, originan una protección duradera y específica. Por el contrario, la respuesta inmunitaria innata no es específica del patógeno que invade y no genera memoria inmunológica. Su función esencial es provocar una respuesta rápida contra el microorganismo patógeno sin necesidad de inducción o maduración de linfocitos, por lo que constituye la primera línea de defensa contra las enfermedades infecciosas.

La inmunidad innata está mediada fundamentalmente por leucocitos (granulocitos y macrófagos), células que fagocitan y destruyen a los patógenos y que, al mismo tiempo, coordinan respuestas adicionales mediante la liberación de mediadores inflamatorios y citocinas. (Ver Figura 11) (Borruel, 2003)

Figura 11.- Respuesta inmunitaria frente a los antígenos bacterianos (Inmunidad innata y adquirida)



2.5.3.2 Probióticos: Estimulación de la inmunidad innata.-

Estudios *in vitro*, fundamentalmente con células de procedencia murina, demostraron que el cultivo de macrófagos o leucocitos con distintas cepas de probióticos inducía un aumento en la respuesta inmunológica innata, estimulándose la liberación de diferentes mediadores como el TNF- α , IL-6, óxido nítrico (NO), IL-12, IFN- γ . Sin embargo, los resultados de los estudios cuando las bacterias son administradas por vía oral, son más contradictorios. Tejada-Simon et al. (1999) no encontraron ningún cambio en la síntesis de citocinas e inmunoglobulinas por las células inmunológicas del bazo, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos cuando los ratones eran alimentados con distintos probióticos durante dos semanas. Sin embargo, cuando el efecto era analizado *ex-vivo* en leucocitos extraídos de los animales, algunos probióticos inducían una estimulación de la síntesis de citocinas, y otros, una atenuación de la misma (Borrue, 2003)

Por el contrario, Ha et al (1999) demostraron que en animales alimentados con yogurt durante 2-4 semanas, se producía una disminución de la expresión de ARN para distintas citocinas, siendo este efecto más prominente sobre el TNF- α (Borrue, 2003)

Diferentes estudios *in vitro* efectuados en humanos con células mononucleares de sangre periférica demostraron que la exposición a bacterias gram(+) de la propia flora o a diferentes especies de *Lactobacillus* eran capaces de estimular la inmunidad innata mediante la inducción de la liberación de TNF- α , IL-10, IL-12, IL-18, o IFN- γ (Borrue, 2003)

Por otro lado, se han llevado a cabo múltiples estudios con diferentes bacterias: *Bifidobacterium lactis* HN019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus johnsonii* La1 o *Lactobacillus* GG, y en algunos de ellos se ha comprobado su efecto positivo con el placebo (Borrue, 2003)

En todos los estudios, en general, se observan hallazgos similares en su efecto sobre la respuesta inmunitaria innata: aumento de linfocitos totales, CD4, CD25 y células NK, de la capacidad fagocítica de mononucleares y polimorfonucleares, de la actividad antitumoral NK y de la actividad bactericida.

La mayoría de los estudios anteriormente reseñados se han realizado en voluntarios sanos de edad avanzada, ya que el tratamiento con probióticos podría constituir una alternativa efectiva y segura para estimular un sistema inmunitario funcionalmente en declive (inmunosenescencia) (Borrue, 2003)

2.5.3.3 Probióticos: Estimulación de la inmunidad adquirida.-

El uso de probióticos para estimular la inmunidad adquirida tiene como objetivo mejorar la respuesta del huésped ante antígenos patógenos, es decir, prevenir o tratar las enfermedades infecciosas (Borruel, 2003)

En ratones, la ingestión de un yogurt con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* produce un aumento en la respuesta inmunitaria específica (IgA) local y sistémica cuando son inmunizados con toxina de cólera por vía oral (Borruel, 2003)

En humanos, voluntarios sanos, la administración conjunta de *Salmonella typhi* atenuada por vía oral y leche fermentada por *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias inducía un aumento 4 veces mayor de la IgA específica que en el grupo control (Borruel, 2003)

Existen estudios dirigidos al tratamiento de enfermedades infecciosas, fundamentalmente gastrointestinales. El tema mejor estudiado es el de la diarrea infecciosa en niños, sobre todo la diarrea por rotavirus. Desde hace más de 10 años existen estudios con distintas cepas de probióticos que demuestran que su administración desde el inicio de los síntomas reduce la duración y la frecuencia de la diarrea y disminuye el tiempo de hospitalización (Borruel, 2003)

El beneficio terapéutico obtenido con los probióticos en la diarrea aguda infecciosa se relaciona directamente con una estimulación de la inmunidad humoral inespecífica y específica. Este hecho se refleja en un aumento del número total de células secretoras de inmunoglobulinas, del número de células secretoras de inmunoglobulinas específicas contra el rotavirus y de IgA en suero (Borruel, 2003)

2.5.3.4 Probióticos y tolerancia oral a los antígenos.-

Existen diversos estudios que sugieren que los probióticos pueden ejercer un efecto regulador sobre los mecanismos inmunológicos responsable de la tolerancia oral a los antígenos, por lo que podrían ser beneficiosos en el campo de las enfermedades atópicas o alérgicas. Por ejemplo, en un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, se estudió el efecto de la suplementación dietética con probióticos (*Bifidobacterium lactis* Bb12 y *Lactobacillus casei* GG) en 27 niños con eccema atópico en los primeros meses de vida. Los niños cuya dieta se suplementó con probióticos, presentaron una mejoría significativa en la escala utilizada para valorar el eccema atópico, con la práctica desaparición del mismo a los dos meses. Además, estos resultados clínicos se relacionan con una misma disminución de los

marcadores inflamatorios relacionados con la alergia, como la proteína eosinofílica χ . En un estudio similar del mismo grupo, también en niños con dermatitis atópica, la ingestión de *Lactobacillus* GG inducía un aumento en suero de la citocina antiinflamatoria IL-10. Este hecho sugiere que los probióticos son capaces de inhibir respuestas inflamatorias más allá del ambiente intestinal, a través de la modulación de la liberación de mediadores (Borrueal, 2003). Si los resultados del tratamiento con probióticos en las enfermedades atópicas son esperanzadores, lo son aún más en la prevención primaria de las mismas (Borrueal, 2003).

2.5.3.5 Probióticos y efecto antiinflamatorio.-

Aunque los probióticos son capaces de estimular la inmunidad innata y específica, en determinadas situaciones patológicas o determinadas cepas bacterianas pueden ejercer efectos intestinales claramente antiinflamatorios. Las implicaciones que puede tener este aspecto en enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal son de gran relevancia, ya que en la etiopatogenia de la misma convergen probablemente una falta de tolerancia a la flora y una respuesta inflamatoria exagerada (Borrueal, 2003).

Distintos modelos experimentales animales, fundamentalmente de colitis han demostrado la utilidad de los probióticos en el control de la inflamación intestinal. En el modelo de colitis en la rata inducido por ácido acético, la administración de *Lactobacillus reuterii* R2LC inmediatamente tras la inducción prevenía la instauración de la colitis (Borrueal, 2003).

En un intento de valorar realmente el efecto antiinflamatorio de ciertos probióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal humana, se investigó el efecto de ciertas bacterias sobre la liberación de TNF- α por la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn. Se obtuvieron piezas quirúrgicas de íleon de pacientes que no habían respondido al tratamiento convencional. La mucosa inflamada se cultivó durante 24 horas con diferentes bacterias con propiedades probióticas conocidas. La mucosa se cultivó con *Lactobacillus casei*, induciéndose significativamente la liberación de TNF- α . Además, la incubación con *L.casei* redujo el número de células CD4 y la expresión de TNF- α en los linfocitos intraepiteliales (Borrueal, 2003).

Sin embargo, todos estos resultados deben ser tomados con cautela, pues los estudios son aún escasos (Borrueal, 2003).

2.5.4 Estabilidad de los probióticos.-

La mayoría de los probióticos son estables durante períodos limitados almacenados en frío y seco (polvos congelados secos) (Tormo, 2006)

Cuando los probióticos experimentan la acción de la humedad, el oxígeno o el calor, las células microbianas se dañan irremediablemente. Los productos probióticos en forma líquida son de reducida estabilidad, en cambio, en polvo, ya sean servidas como tabletas o como cápsulas, pueden disolverse en alimentos o líquidos previamente a su ingesta, así se consigue una estabilidad muy superior (Tormo, 2006)

2.5.5 Cultivos probióticos comerciales.-

Vivolac Dri-Set Bioflora Aby 424 es un producto que contiene cultivos mixtos concentrados de bacterias ácido-lácticas: *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subs *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Bifidobacterium spp* Estos cultivos son obtenidos por secado frío, y no son genéticamente modificados. Este producto es para inoculación directa en leche, para producción de yogurt, helado u otros (Vivolac Cultures Corporation, 2012). Ver certificado de calidad en el Anexo II.

Estos cultivos, además son capaces de fermentar lácticamente la galactosa y la glucosa, ya sea en condiciones anaeróbicas o microaerófilas. De estos géneros, sólo *Bifidobacterium* es heteroláctica, mientras que los demás géneros son homolácticos (Mateos, 2005).

Respecto al género *Streptococcus*, se sabe que son cocos, que se disponen característicamente en pares o cadenas largas o cortas, pero nunca en paquetes o en masas. Todos son homofermentativos. Son productores de ácido láctico. La mayoría de las especies son aerotolerantes y unas pocas cepas son anaerobias estrictas (Hernandez et al., 2002)

Streptococcus thermophilus puede fermentar glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa. Además, fermenta la lactosa preferencialmente a la glucosa y es incapaz de metabolizar la galactosa, la cual es excretada al medio (García et al., 1993)

Respecto al género *Lactobacillus*, son bacilos, generalmente largos y delgados, que en la mayoría de las especies forman cadena. Son aerotolerantes, aunque existen algunos anaerobios estrictos; son catalasa-negativos y gram-positivos (Hernandez et al., 2002).

Lactobacillus delbrueckii subs *bulgaricus* puede fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa, pero no maltosa y sacarosa. Esta especie fosforila la galactosa y así la metaboliza a

través de la vía de Leloir. (García *et al.*, 1993). Es el organismo que tolera la más alta temperatura durante la fermentación. La temperatura óptima de crecimiento es de 45°C y son microaerófilos (Hernandez et al., 2002)

Respecto al género *Bifidobacterium*, son células Gram-positivas, no móviles, catalasa negativos presentes generalmente en microcolonias lisas. Son anaerobios. Producen ácido láctico dextrorrotatorio (García *et al.*, 1993)

2.5.6 Bebidas Probióticas comerciales.-

Por bebida probiótica se entiende toda bebida no gaseosa que en su composición incluya cultivos probióticos, ya sean mixtos o puros. Estos cultivos estarán vivos de preferencia.

Actualmente en el mercado existen diversas bebidas que contienen probióticos. Entre ellas tenemos, por ejemplo:

a) BioLaive: Yogurt con cultivos probióticos. Incluye las cepas: *Lactobacillus paracasei*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *L. bulgaricus*. Según la información nutricional, cada 200ml de producto contiene: 182cal, 4g de proteína, 4g de grasa total, 31g de carbohidrato total, 31g de azúcares, 0g de fibra dietaria. (Información obtenida del envase)

b) Vita Bios: Bebida herbal orgánica probiótica, producida por Biosa Colombia. Contiene 7 especies de bacterias probióticas y 19 hierbas medicinales (entre ellas: anís, orégano, sauco, jengibre, menta y perejil). Se añade a un jugo natural de frutas. Cada 100ml de bebida contiene: 6Kcal de energía, 0g de proteína, 1.5g de carbohidratos, 0g de grasas y 0.02g de sodio. (Fuente: biosacolombia.com)

c) Kevita: Bebida probiótica chispeante. Contiene extracto orgánico de planta entera de limón, vinagre de sidra, minerales de océano azul, extracto de pimienta orgánico, cultivos probióticos, entre otros. Cada 240ml de bebida contiene: 15cal de energía, 0g de grasas, 3g de carbohidratos, 0g de fibra dietaria y 0g de proteína. (Fuente: kevida.com)

2.6 Parámetros microbiológicos exigidos por DIGESA para bebidas.-

DIGESA, Dirección General de Salud Ambiental, es el órgano técnico normativo en los aspectos relacionados al saneamiento básico, salud ocupacional, higiene alimentaria, zoonosis y protección del ambiente, en la República del Perú.

La Norma Técnica Sanitaria N°071-V01 (2008), Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, establece los siguientes parámetros microbiológicos para las bebidas (Ver Tabla 7):

Tabla 7.- Parámetros microbiológicos exigidos por DIGESA para bebidas.

XVI. BEBIDAS.						
XVI.1 Bebidas carbonatadas.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por 100 mL	
					m	M
Aerobios mesófilos (*)	2	3	5	2	10	50
Mohos	2	3	5	2	5	10
Levaduras	2	3	5	2	10	30
(*) Para aquellas bebidas con menos de 3 atmósferas de CO ₂ . En caso de no poder determinarse se realizara el análisis.						
XVI.2 Bebidas no carbonatadas.						
Agente microbiano	Categoría	Clases	n	c	Limite por mL	
					m	M
Aerobios mesófilos	2	3	5	2	10	10 ²
Mohos	2	3	5	2	1	10
Levaduras	2	3	5	2	1	10
Coliformes	5	2	5	0	< 3	-----
I.6 Leches fermentadas y acidificadas (yogurt, leche cultivada, cuajada, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	10	10 ²
Mohos	2	3	5	2	10	10 ²
Levaduras	2	3	5	2	10	10 ²

Fuente: DIGESA, 2008

Donde:

n= Número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote, que se analizan para satisfacer los requerimientos de un determinado plan de muestreo.

"c": Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o número máximo de unidades de muestra que puede contener un

número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M” en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a “c” se rechaza el lote.

"m" (minúscula): Límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable. En general, un valor igual o menor a “m”, representa un producto aceptable y los valores superiores a "m" indican lotes aceptables o inaceptables.

"M" (mayúscula): Los valores de recuentos microbianos superiores a "M" son inaceptables, el alimento representa un riesgo para la salud.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico

- α -amilasa de *Bacillus licheniformis* Sigma Aldrich®
- Cultivos probióticos Vivolac Dri-Set Bioflora Aby 424
- Harina de Quinoa (Variedad “Blanca”, Marca Nutrimix)
- Miel de Abeja (Marca La Molina)
- Algarrobina (Marca Hoja Verde)

3.1.2 Medios de cultivo y esencias

- Agar Sabouraud (Merck)
- Agar Plate Count (Merck)
- Agar MRS (Bio Pro Premium)
- Agar VRB (Merck)
- Aceite de Inmersión (Merck)
- Saborizante de Naranja 66509 (Callizo and Sons S.A.C)
- Saborizante de Mango Turbio (Marca Fratello. Importaciones Goicochea E.I.R.L)

3.1.3 Instrumentos y equipos

- Baño de agua (Mettler)
- Autoclave (Ecoshel Modelo CVQ-B50L)
- Refractómetro (Modelo RHB-55. Rango: 0-80 %Brix)
- Balanza (Kern 440-35N) Rango: 0.00g-1000g
- Espectrofotómetro (Genesys 10UV Thermo Spectronic), calibrado a 540nm
- Centrífuga (Hettich II)
- Incubadora regulada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (Mettler 854 Schwbach)
- Estufa (Drying cabinet)
- Microscopio (Micros Austria. Modelo MC200A)
- Potenciómetro HANNA (Modelo HI 8424)
- Cocina eléctrica

3.1.4 Soluciones y reactivos

- Alcohol 96°
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma Aldrich)
- Hidróxido de sodio en perlas (Merck)
- Glucosa anhidra (Merck)
- Acetato de sodio anhidro (Merck)
- Ácido acético glacial (Merck)
- Bisulfito de sodio (Merck)
- Tartrato de sodio y potasio (Merck)
- Fenol (Merck)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 MEDICIÓN DEL pH

El pH fue medido mediante lectura en potenciómetro marca Hannah. El electrodo del potenciómetro fue sumergido en la suspensión de harina de quinua y se esperó hasta que el valor mostrado en pantalla se estabilizara.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL

La acidez total fue medida según el procedimiento descrito por Chacón (2006). Se tomó una muestra de 5 ml de la suspensión de almidón hidrolizado de harina de quinua (previamente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos) y se tituló con solución de NaOH 0.1N, utilizando fenolftaleína como indicador. Los resultados fueron luego convertidos a porcentaje de ácido láctico según la fórmula mostrada en el Anexo VII-B.

3.2.3 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Se determinó la concentración de azúcares reductores según el procedimiento descrito por Miller, y modificado por Gutiérrez-Correa (2010).

Se realizó la curva de calibración utilizando glucosa como estándar, a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml. Se determinó la ecuación lineal, la cual fue posteriormente utilizada para la conversión de la absorbancia en concentración de glucosa.

Luego, se tomó una muestra de 1 ml de la suspensión de almidón hidrolizado de harina de quinua (previamente centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos), se diluyó hasta 10^{-2} , se agregó 1.0 ml de tampón acetato 50mM (pH 4.8), 3 ml de DNS, se llevó a baño de agua hirviente durante 5 minutos. Luego se dejó enfriar y se agregó 5 ml de agua destilada. Finalmente se midió la muestra en espectrofotómetro marca Genesys 10UV Thermo Spectronic, calibrado a 540nm.

La curva de calibración se muestra en el Anexo VII-A.

3.2.4 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES

Los sólidos solubles fueron medidos en refractómetro modelo RHB-55, cuyo rango va de 0-80 %Brix. Se tomó una muestra (gotas) de la suspensión de almidón hidrolizado de harina de quinua, las cuales se pusieron en el lente del refractómetro. Se observó a contraluz. Las mediciones se anotaron como grados Brix (°Brix).

3.2.5 HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN DE HARINA DE QUINUA

La hidrólisis fue llevada a cabo según el procedimiento descrito por Zanabria (2003).

Se realizó una suspensión de harina de quinua (marca “Nutrimix”) al 12.5% p/p. Se acondicionó a pH 7.8 y se adicionó la enzima termoestable α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich®) a una concentración de 0.01% p/p de almidón. Se consideró una concentración de 70% de almidón. (Ver cálculos en Anexo I)

Después de ajustar el pH, se midieron los sólidos solubles (estos datos corresponden a los grados Brix iniciales). Esta operación se realizó una sola vez, y por duplicado

Luego, se llevó a una temperatura de 100°C durante 40 minutos y agitación constante (Esta etapa se denominó “Cocción-hidrólisis”).

Luego, se redujo la temperatura a 90°C y se prosiguió la hidrólisis durante 60 minutos, también con agitación constante (Esta etapa se denominó “Hidrólisis”).

Posteriormente, se disminuyó la temperatura hasta 25°C aproximadamente.

Terminado el tratamiento térmico, se midieron los sólidos solubles (expresado en grados Brix). Estos datos corresponden a los sólidos solubles finales.

3.2.6 FERMENTACIÓN LÁCTICA

Se añadieron cultivos probióticos a la suspensión hidrolizada de harina de quinua. Previamente, se realizó una suspensión de los cultivos probióticos según el procedimiento:

1) Se adquirió cultivos probióticos Marca “Vivolac”. Estos cultivos incluyen los géneros: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium spp.* (Vivolac Cultures Corporation, 2012).

2) Se disolvió 1 sobre (2.78gramos) con cultivos probióticos “Vivolac” en 1 litro de suero fisiológico estéril. La suspensión obtenida se denominó “INÓCULO”.

3) Se almacenó dicha suspensión inóculo en botellas estériles de vidrio, para uso posterior

Luego, en condiciones estériles, los cultivos probióticos (“INÓCULO”) fueron añadidos a la suspensión de almidón de harina quinua hidrolizado en tres diferentes concentraciones: 10%, 5%, 1%. Adicionalmente, se consideraron tratamientos control (C1, C2 y C3) a los que no se añadió inóculo.

Después de añadir los probióticos, se tomó una muestra de 10 ml de la suspensión hidrolizada de harina de quinua. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. Luego, se realizaron las siguientes mediciones: (Condiciones iniciales, antes de la fermentación)

- pH
- Acidez total expresada en porcentaje de ácido láctico
- Determinación de azúcares reductores
- Sólidos solubles

Luego, la suspensión hidrolizada de harina de quinua con los probióticos incorporados se llevó a una temperatura de $42^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, en condiciones microaerófilas.

El proceso fermentativo se llevó a cabo durante tres diferentes tiempos: 8 horas, 10 horas y 12 horas. La elección de estos tiempos de fermentación se basó en ensayos previos para 2, 4, 6 y 7 horas (Ver Anexo VIII).

Por tanto, combinando las concentraciones de los cultivos probióticos, con los tiempos de fermentación, se tuvieron 12 tratamientos:

- T1: Probióticos al 10%, 8 horas de fermentación
- T2: Probióticos al 10%, 10 horas de fermentación
- T3: Probióticos al 10%, 12 horas de fermentación
- T4: Probióticos al 5%, 8 horas de fermentación
- T5: Probióticos al 5%, 10 horas de fermentación
- T6: Probióticos al 5%, 12 horas de fermentación
- T7: Probióticos al 1%, 8 horas de fermentación
- T8: Probióticos al 1%, 10 horas de fermentación
- T9: Probióticos al 1%, 12 horas de fermentación
- C1: Sin probióticos, 8 horas de fermentación
- C2: Sin probióticos, 10 horas de fermentación
- C3: Sin probióticos, 12 horas de fermentación

Donde, C1, C2 y C3 fueron los tratamientos control, por no llevar microorganismos probióticos.

Las fermentaciones fueron detenidas reduciendo la temperatura hasta 4°C.

Una vez concluido cada proceso, se tomó una muestra de 10 ml de la suspensión hidrolizada de quinua ya fermentada de cada tratamiento. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. Luego, se realizaron las siguientes mediciones: (Condiciones finales, después de la fermentación)

- pH
- Acidez total expresada en porcentaje de ácido láctico
- Determinación de azúcares reductores
- Sólidos solubles

Una vez determinados todos los parámetros mencionados, se eligió al mejor tratamiento, basándose en el parámetro “acidez total expresada en porcentaje de ácido láctico”, siendo el mejor tratamiento aquel que produjera mayor cantidad de ácido láctico. Los demás parámetros (pH, azúcares reductores y sólidos solubles), son sólo referenciales.

El modelo estadístico fue un experimento factorial 4x3, con tres repeticiones, adecuado a un DCA. Luego, se realizó el análisis de varianza conducido en DCA y se aplicó una prueba de comparación de medias (Prueba de Tukey) para efectos principales y simples.

3.2.7 FORMULACIÓN

Basándose en la información presentada por Zanabria (2003), y en ensayos previos (Ver Anexo VII), la bebida fue formulada en tres diferentes sabores: natural, mango y naranja.

La composición fue la siguiente:

a) Natural: Bebida probiótica (400 ml) + miel de abeja (4.375% p/v) + algarrobina (2.5% p/v), sin saborizante + sorbato de potasio (0.01% p/v)

b) Mango: Bebida probiótica (400 ml) + miel de abeja (4.375% p/v) + algarrobina (2.5% p/v) + saborizante de mango turbio de marca Fratello- Importaciones Goicochea E.I.R.L (7 gotas/400ml) + sorbato de potasio (0.01% p/v)

c) Naranja: Bebida probiótica (400 ml) + miel de abeja (4.375% p/v) + algarrobina (2.5% p/v) + Saborizante de Naranja 66509 (Callizo and Sons S.A.C; 7 gotas/400ml) + sorbato de potasio (0.01% p/v)

3.2.8 PRUEBA DE PREFERENCIA

Basándose en las pruebas de preferencia realizadas por Zanabria (2003), la bebida formulada, en sus tres diferentes sabores, se dio a probar a un panel de 48 personas, de edad 17-45 años, a fin de determinar cuál era la más agradable.

Las fórmulas fueron presentadas a los panelistas a temperatura fría (10°C), en vasos de plástico etiquetados con tres letras (A, B y C). Cada persona probó los tres diferentes sabores, tomando agua entre degustaciones. Eligió la que más le agradaba y anotó sus resultados en una encuesta (Ver modelo en el Anexo III). Adicionalmente, cada uno anotó comentarios sobre su grado de satisfacción respecto al producto.

La bebida con mayor puntaje, fue seleccionada como “la más agradable”.

3.2.9 ANÁLISIS PROXIMAL

La bebida calificada como “la más agradable” fue enviada al laboratorio certificado “La Molina Calidad Total”, donde se realizó un análisis proximal para los siguientes parámetros principales:

- Calorías totales (Por cálculo MS-IN, Collazos 1993)
- Carbohidratos (Por diferencia MS-IN, Collazos 1993)
- Grasa (AOAC 986.35 (B). Cap 50, Ed.18, Pag.18, Revisión 4. 2011-2005)
- Proteína (AOAC 986.13 Cap 32, Ed.18, Pag.14, Revisión 4. 2011-2005)
- Fibra cruda (NTP.205.003, revisado el 2011. 1980)

3.2.10 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

La bebida calificada como “la más agradable” fue analizada microbiológicamente inmediatamente después de terminada su preparación.

Luego de dos semanas, fue nuevamente analizada. Durante estas dos semanas, el producto fue almacenado en condiciones asépticas a una temperatura de 4°C. Con este análisis se intentó determinar el tiempo de vida aproximado de los microorganismos probióticos en la bebida.

Los parámetros evaluados fueron:

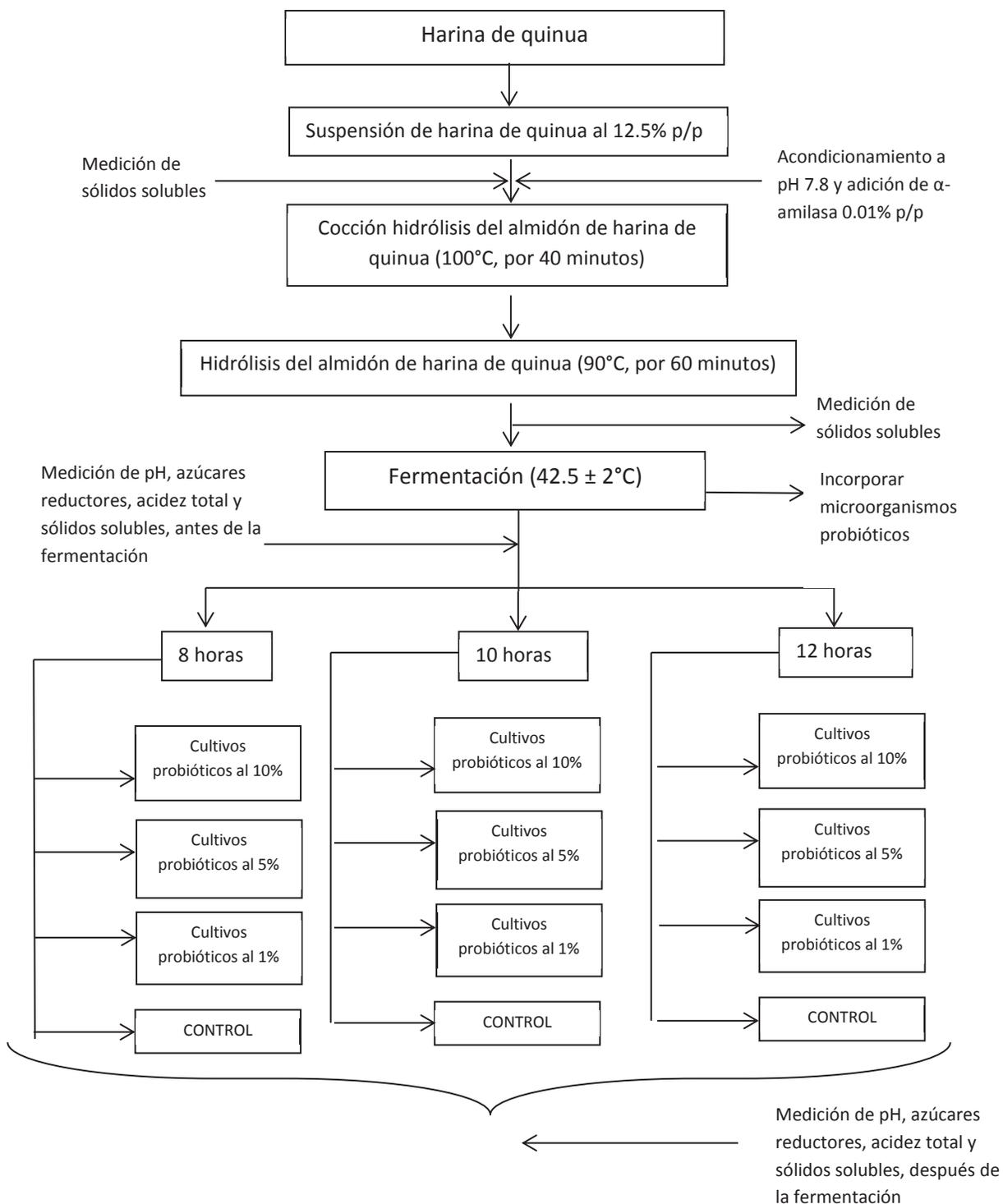
- Recuento de aerobios mesófilos totales (Análisis en Agar Plate Count. DIGESA, 2001)
- Recuento de hongos y levaduras (Análisis en Agar Sabouraud. DIGESA, 2001)
- Recuento de coliformes totales (Análisis en Agar VRB. DIGESA, 2001)
- Recuento de *Lactobacillus* (Análisis en Agar MRS. DIGESA, 2001)

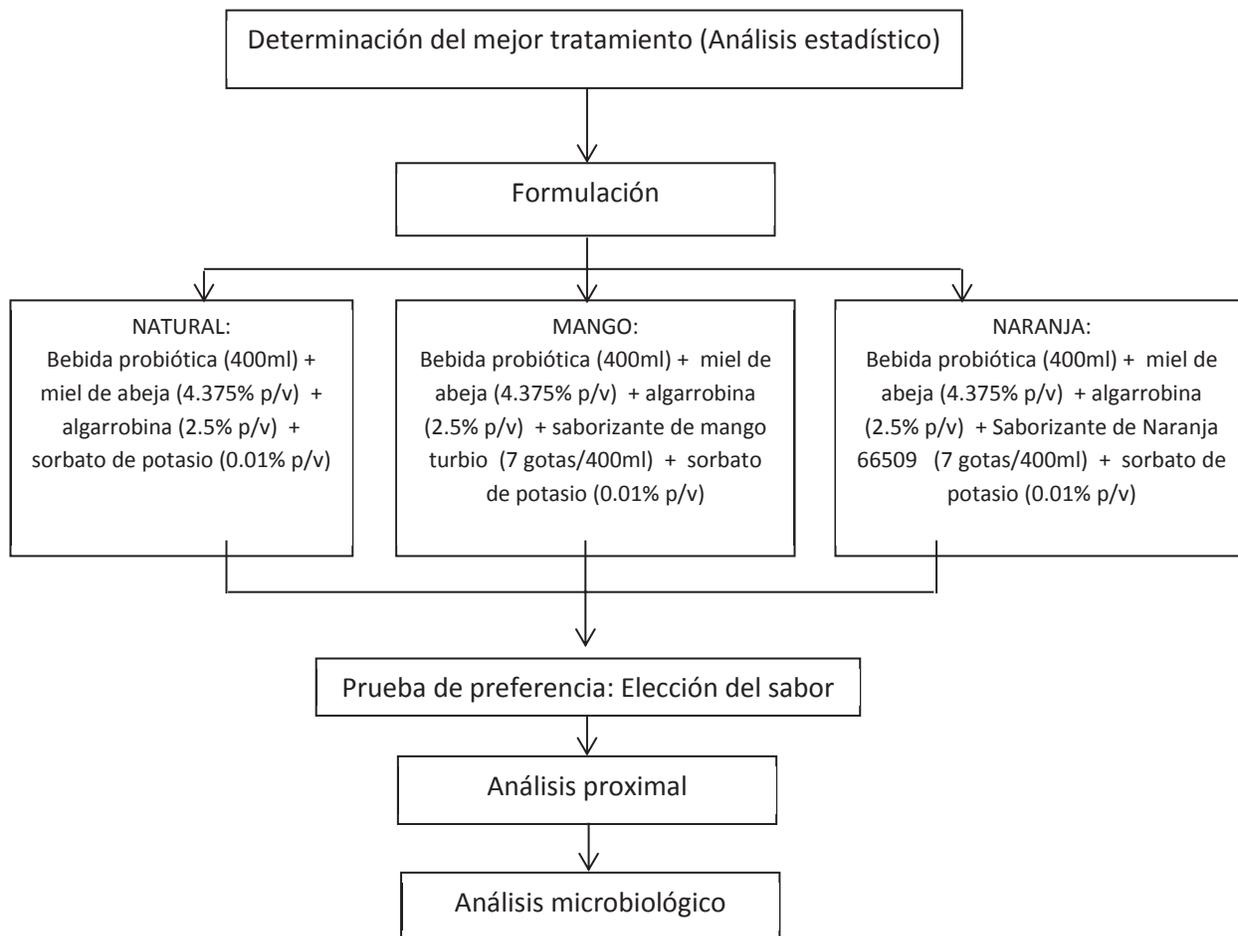
Estos son los parámetros exigidos por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) de la República del Perú para bebidas no carbonatadas, según el Manual de Análisis Microbiológico de alimentos, publicado en el 2001.

Adicionalmente, se realizó una tinción gram simple de las colonias que crecieron en agar MRS.

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se procedió a elaborar la bebida según el siguiente flujo:





IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DE HARINA DE QUINUA

En la tabla 8 se observa la medición de sólidos solubles, antes y después de la hidrólisis:

Tabla 8.- Sólidos solubles en la suspensión de quinua, antes y después de la hidrólisis.

	Sólidos solubles (°Brix)			Promedio (Variación)
	Inicial	Final	Variación	
Con enzima (R1)	2	9	7	7.5
Con enzima (R2)	2	10	8	
CONTROL R1	2	2	0	0
CONTROL R2	2	2	0	

Fuente: Elaboración propia

Según estos resultados, por efecto de la enzima, el almidón de la harina de quinua fue hidrolizado y se liberaron, en promedio, 7.5 g de sólidos solubles por cada 100 g de bebida. Al final de la hidrólisis se tienen entre 9 y 10° Brix. Estos resultados son similares a lo reportado por Zanabria (2003), quien, después de seguir el mismo procedimiento para la hidrólisis de la suspensión de harina de quinua, obtuvo 9°Brix finales.

Además, por tratarse de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma-Aldrich®), estos sólidos solubles liberados consistirían en dextrinas, maltodextrinas, maltosa y glucosa (Bravo, 1997). Estos azúcares, al encontrarse ya en forma libre, son susceptibles de ser fermentados por los microorganismos probióticos en la siguiente etapa.

Respecto al procedimiento seguido para la hidrólisis enzimática, debe mencionarse que:

- Se aplicó una hidrólisis enzimática con la enzima α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. En primer lugar, se utilizó una hidrólisis enzimática porque este tipo de hidrólisis contribuye a la mejora de la fermentabilidad de los productos (Bravo, 1997). Según esta autora, la hidrólisis enzimática es preferida sobre los métodos químicos debido a la alta especificidad y porque es predecible y controlable. Además, la hidrólisis enzimática es importante en la industria alimentaria por los efectos fisicoquímicos y sensoriales que produce, como son: disminución de la viscosidad, mejora de la filtrabilidad, disminución de la tendencia a la cristalización, mejora de la fermentación,

mejora de la estabilidad bacteriológica, mejora de la textura y mejora de la digestibilidad (Bravo, 1997).

En segundo lugar, debe mencionarse que se utilizó solamente la enzima α -amilasa debido a que la acción combinada de amilasas y amiloglucosidasas no rendiría mejores resultados que la utilización de amilasa sola. Según Bravo (1997), las enzimas utilizadas para la hidrólisis consisten en α -amilasas, β -amilasas, pululanasa, isoamilasas y amiloglucosidasas. La utilización combinada de estas enzimas, hidrolizaría por tanto, los enlaces α -1,4 y α -1,6 del almidón. Sin embargo, la autora encontró que no hay diferencias significativas entre el uso de α -amilasa sola y el de α -amilasa con amiloglucosidasa.

- Por otro lado, se utilizó harina de quinua, en vez del grano entero. Esta elección encuentra su base en lo reportado por Zanabria (2003). La autora confrontó la hidrólisis de harina de quinua versus la hidrólisis del grano entero de quinua, a fin de determinar cuál daba mejores resultados de hidrólisis. Observó que la harina de quinua presenta mejores resultados que el grano entero, al evaluar el equivalente de dextrosa (ED), valor que fue utilizado como un indicador del grado de hidrólisis del almidón. Además, se prefirió utilizar harina de quinua porque la molienda por la que pasan los granos de quinua destruye la organización granular del almidón, permitiendo así que los enlaces glucosídicos sean más accesibles a la enzima α -amilasa. Esta elección encuentra su base en lo reportado por Bravo (1997), quien indica que las metodologías para la hidrólisis del almidón sugieren un pre-tratamiento previo que destruya la organización granular y que haga que los almidones sean más fácilmente hidrolizables. Estos pre-tratamientos pueden ser físicos (molienda, compresión) o fisicoquímicos (calentamiento en presencia de agua, presiones elevadas). Asimismo, en la presente investigación se sigue una etapa de “cocción-hidrólisis” (basada en la investigación de Zanabria), en la que se somete a la harina de quinua a un tratamiento térmico. Esta etapa es también un pre-tratamiento de tipo fisicoquímico, que coadyuvaría, junto con la molienda de los granos de quinua, a que los enlaces glucosídicos sean más accesibles a la enzima α -amilasa.

- En la presente investigación se utilizó una suspensión de harina de quinua al 12.5% p/p. Esta elección se basa en los estudios de Zanabria (2003), quien probó dos diferentes concentraciones de suspensión de harina de quinua: 12.5% y 17.5%, obteniendo los mejores resultados a la concentración de 12.5% p/p. Según esta autora, cuando la concentración es mayor, los monosacáridos y disacáridos (principalmente glucosa y maltosa) ejercerían una acción de retroinhibición a la actividad de la α -amilasa (Zanabria, 2003). Es por ello que obtuvo mejores resultados al 12.5% p/p.

- Respecto al tiempo de “Cocción-hidrólisis”, éste fue de 40 minutos. La elección de este tiempo se basó en el estudio desarrollado por Zanabria (2003), quien probó 3 diferentes tiempos de cocción: 20, 30 y 40 minutos, obteniendo mejores resultados a los 40 minutos (Para este tiempo, se obtuvo que los sólidos solubles es igual a 9). Posterior a la etapa de “Cocción-hidrólisis”, corresponde la etapa de “Hidrólisis” propiamente dicha, la cual se desarrolló durante 60 minutos. En este aspecto, Zanabria (2003) probó 4 diferentes tiempos: 30, 60, 90 y 120 minutos, de los cuales, se obtuvo los mejores resultados a los 60 minutos, y a 90 y 120 minutos no se obtuvieron incrementos importantes. Para un tiempo de 60 minutos, obtuvo un valor de sólidos solubles igual a 9.
Cabe resaltar además que estos tratamientos térmicos permiten también eliminar microorganismos patógenos presentes en la suspensión de harina de quinua, con lo que se lograría una eliminación parcial de dichos microorganismos

- Respecto a la concentración de la enzima α -amilasa, se utilizó la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, Type XII-A (Sigma Aldrich®) a una concentración de 0.01% p/p. Esta concentración se basó en lo reportado por Zanabria (2003) quien recomienda el uso de la α -amilasa termoestable de *Bacillus licheniformis* a una concentración de 0.01% p/p. Además, tomando en cuenta que esta es una enzima termoestable, que mantiene el 60% de su actividad después de exponerse a temperaturas de 100°C (Sigma Aldrich, 2012), su uso resulta ventajoso, pues, podrá resistir las temperaturas de la “Cocción-hidrólisis” (100°C) y la de “Hidrólisis” propiamente dicha (90°C).

- En la presente investigación se realizó sólo hidrólisis del almidón, y no de otros componentes como proteínas y pectinas. Esto debido a que las proteínas y pectinas no forman parte de las rutas metabólicas de la fermentación láctica, y el objetivo principal de la investigación es la fermentación láctica. Sin embargo, Zanabria (2003), realiza también hidrólisis de las proteínas y pectinas. Es posible, por tanto, complementar este estudio ensayando la hidrólisis de otros componentes y su influencia en la mejora de la fermentabilidad.

Como observación complementaria, se comprobó que de no agregar la enzima, sucede el efecto de gelatinización del almidón, mencionado por Romo *et al.* (2006). Esto se comprobó mediante observación visual. Se muestran las imágenes del almidón gelatinizado en el Anexo X.

4.2 FERMENTACIÓN LÁCTICA

Se estudiaron tres diferentes tiempos de fermentación (8 horas, 10 horas y 12 horas), y tres diferentes concentraciones de microorganismos probióticos (10, 5 y 1%). Adicionalmente se consideraron tratamientos control.

La elección de los distintos tiempos de fermentación se basó en lo reportado por Vivolac Cultures (2012) y en ensayos previos. Según Vivolac Cultures (2012), el tiempo de fermentación en leche en polvo es de 6.75 horas. Los ensayos previos para 2, 4, 6 y 7 horas (cuyos resultados se muestran en el Anexo VIII) muestran que el pH empieza a disminuir recién a partir de las 6 horas. Considerando además que estos cultivos son para inoculación en leche (Vivolac Cultures, 2012) y no para quinua, se tomó en cuenta el tiempo de adaptación que le tomaría a los microorganismos, al ser transferidos a un nuevo medio (Hernández et al., 2002). Por estas razones, se eligieron los tiempos 8, 10 y 12 horas.

Para todos los tratamientos, se midieron 4 parámetros: pH, azúcares reductores, acidez total expresada en ácido láctico, y sólidos solubles. Estos parámetros se utilizaron como indicadores de la ocurrencia de la fermentación.

A continuación se muestran los resultados de los parámetros evaluados:

a) Medición del pH:

En la tabla 9 se presentan los datos de la variación del pH para todos los tratamientos. Estos datos corresponden al valor promedio de las tres repeticiones.

Tabla 9.- Variación del pH para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación.

% INÓCULO	TIEMPO DE FERMENTACIÓN					
	8 HORAS		10 HORAS		12 HORAS	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
CONTROL	6.68	6.57	6.85	6.66	6.80	6.74
10%	6.57	4.02	6.79	3.84	6.64	3.88
5%	6.65	4.14	6.81	3.86	6.74	3.90
1%	6.66	4.29	6.83	4.18	6.74	3.96

Fuente: Elaboración propia

Para todos los tratamientos se observa una disminución del pH después de la fermentación, inclusive para los controles, aunque en estos últimos la variación es mínima.

Para los controles, la variación del pH sería la suma de varios factores:

Uno de ellos sería la adición del suero fisiológico estéril, puesto que tiene un pH de 5.5 (Medifarma, 2013) y al ser añadido a la suspensión de quinua, disminuiría el pH.

Otro factor, sería la presencia de esporas de microorganismos, como *Bacillus sp.*, pues según un documento emitido por la República de Colombia en el 2011, las esporas de *B. cereus* pueden sobrevivir a procedimientos de cocción normales, y a condiciones de humedad por debajo de 12%. Además, sobreviven especialmente en alimentos que contienen cereales y leche. Por tanto, estas esporas, al ser expuestas a altas temperaturas que luego disminuyen gradualmente, germinan y empiezan a multiplicarse, acidificando el medio. Esta condición se daría sólo en los tratamientos control, ya que los demás tratamientos llegan a un pH menor a 4, por lo que estos patógenos no crecerían.

Respecto a los demás tratamientos, se observa que las mayores variaciones de pH se dan en los tratamientos de 10 horas, para 10 y 5% de inóculo. Estos corresponden a los tratamientos T2 y T5 respectivamente. La disminución del pH por debajo de 4 indicaría la producción de ácidos durante la fermentación. Por las condiciones dadas a la fermentación, y por las cepas utilizadas (bacterias homolácticas, en su mayoría), el ácido generado sería, principalmente, ácido láctico.

Los tratamientos con mayor concentración de inóculo tenderán a acidificar el medio más rápidamente que los de menor concentración, puesto que, al tener una mayor población inicial, la fase exponencial del crecimiento tiene una mayor pendiente, y por tanto, le toma menos tiempo alcanzar una determinada población final. Así, para 8 horas de fermentación, los tratamientos al 10 y 5% de inóculo han alcanzado valores de pH más bajos que los tratamientos al 1%. Pero a medida que se incrementa el tiempo de fermentación (12 horas), los valores de pH tienden a hacerse similares, indicando que se va llegando a la fase estacionaria.

Haciendo una comparación entre el pH de la bebida probiótica de quinua con otras bebidas fermentadas, se observa que estos últimos presentan valores más altos de pH aún cuando la concentración de ácido láctico es mayor. Por ejemplo, el pH de la bebida probiótica de quinua varía entre 3.7 y 3.9, mientras que el pH del yogurt BioLaive es de 4.68, y el de una bebida fermentada de soya es de 4.5 (Quicazán, 2004). La razón se atribuye a la cantidad de proteínas de dichos alimentos. Si bien la quinua es rica en proteínas y supera a muchos cereales en este nutriente, el contenido de proteínas es menor al de la leche. Los aminoácidos de las proteínas, debido a sus extremos carboxilo y amino, pueden actuar como sistemas buffer que regulan las variaciones de pH. Así, ante un aumento en la concentración de protones H^+ , el grupo amino de la proteína acepta dichos protones (Karp, 2009). Es por esto que un yogurt de leche puede contener entre 0.8 y 1.4% de ácido láctico y tener un pH de 4.5. (García *et al.*, 1993) La bebida probiótica de quinua, en cambio, contiene alrededor de 0.2% de ácido láctico y tiene un pH de 3.8 aproximadamente.

b) Determinación de azúcares reductores:

En la tabla 10 se presentan los datos de la variación en la concentración de azúcares reductores para todos los tratamientos. Estos datos corresponden al valor promedio de las tres repeticiones. Las lecturas del espectrofotómetro fueron transformadas en concentración de azúcares reductores (mg/ml) utilizando la ecuación presentada en el anexo VII.

Tabla 10.- Variación de los azúcares reductores para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación (mg/ml)

% INÓCULO	TIEMPO DE FERMENTACIÓN					
	8 HORAS		10 HORAS		12 HORAS	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
CONTROL	14.75	14.18	15.46	15.18	14.34	15.45
10%	11.78	12.10	14.38	14.20	13.03	12.99
5%	12.83	13.20	13.96	13.10	13.90	13.62
1%	13.31	13.63	15.07	14.97	14.65	14.90

Fuente: Elaboración propia

Para la fermentación de 8 horas, se observa que los tratamientos al 10, 5 y 1% de probióticos presentan un incremento en la concentración de azúcares reductores. Según las pruebas estadísticas, estos incrementos no resultan significativos ($\alpha=0.05$). Sin embargo, estos incrementos podrían explicarse por los azúcares libres de la quinua. Según Repo Carrasco et al (2003), los azúcares libres de la quinua consisten en: glucosa 1.7 g; fructosa 0.2 g; sacarosa 2.9 g; maltosa 1.4 g (g/100g materia seca). Una vez consumidos los azúcares libres de la quinua y los liberados por la hidrólisis enzimática, los probióticos comenzarían a consumir otras fuentes de carbono, en este caso, la sacarosa. Tomando en cuenta que la sacarosa es un azúcar no reductor, y es metabolizado por *S. thermophilus* (García et al., 1993), es probable que esta molécula esté siendo hidrolizada y generando glucosa y fructosa como productos. Éstos últimos, incrementarían la concentración de azúcares reductores, afectando su correcta determinación.

Para la fermentación de 10 y 12 horas, se observa una leve disminución en la concentración de los azúcares reductores. Si bien estos incrementos tampoco son significativamente diferentes usando $\alpha=0.05$ (Ver Anexo IV-B), se puede explicar porque los probióticos están consumiendo dichos azúcares para producir ácido láctico. Haciendo una correlación entre las moles de glucosa consumidas y las moles de ácido láctico producido, se tiene que: para la

fermentación de 10 horas y 10% de probióticos, la disminución es de 0.18 mg glucosa/ml, lo que corresponde a $5.57 \cdot 10^{-7}$ mol glucosa /ml. Este valor corresponde a la formación de $1.1 \cdot 10^{-6}$ moles de ácido láctico /ml, pero según los valores de acidez total expresada en ácido láctico (ver numeral "c"), se han producido $2.55 \cdot 10^{-5}$ moles de ácido láctico /ml. Esto lleva a suponer que existe una fuente de carbono que no está siendo detectada por el método de Miller y que contribuye a la formación de ácido láctico. Probablemente, la sacarosa está siendo hidrolizada por *S. thermophilus* y generando glucosa y fructosa libres, lo que afectaría a la determinación de los azúcares reductores.

Sin embargo, aunque los resultados no muestran una variación en la concentración de azúcares reductores, las mediciones de sólidos solubles, las variaciones de pH y de acidez total, confirman la ocurrencia de la fermentación láctica.

c) Acidez total expresada como porcentaje de ácido láctico:

Los resultados se muestran en la tabla 11. La acidez total se midió antes y después de la fermentación, para un volumen de 5 ml de bebida centrifugada (sobrenadante). La cantidad de ácido láctico producido fue expresada como porcentaje de ácido láctico (v/v). La ecuación utilizada se muestra en el anexo VII-B.

Tabla 11.- Variación de la acidez total, expresada en porcentaje de ácido láctico (v/v), para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación (Valores expresados en gramos de ácido láctico/100 ml de bebida)

% INÓCULO	TIEMPO DE FERMENTACIÓN					
	8 HORAS		10 HORAS		12 HORAS	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
CONTROL	0.08	0.07	0.07	0.08	0.08	0.10
10%	0.10	0.25	0.07	0.30	0.07	0.29
5%	0.08	0.25	0.07	0.28	0.07	0.30
1%	0.10	0.22	0.08	0.23	0.07	0.30

Fuente: Elaboración propia

Se observa que las mayores variaciones se presentan para los tratamientos de 10 horas de fermentación y 10% de inóculo (T2); 10 horas de fermentación y 5% de inóculo (T5); y todos los tratamientos de 12 horas (10, 5 y 1%). Estos resultados se corroboran con los encontrados para medición de pH, en los que los tratamientos de 10 horas también presentaron las mayores variaciones.

Se observa además, que no existen grandes diferencias -en la concentración final de acidez total- entre los tratamientos al 10 y al 5%, considerando todos los tiempos de fermentación. Por el contrario, las diferencias son mayores -en la concentración final de acidez total- entre los tratamientos al 1% y los demás tratamientos, considerando los tiempos de 8 y 10 horas de fermentación. Sin embargo, para la fermentación de 12 horas -en la concentración final de acidez total- las diferencias entre 10, 5 y 1% son mínimas.

En la figura 12 muestra la variación de acidez total entre “Final” e “Inicial”, esto es, la acidez total producida expresada en porcentaje de ácido láctico. Se observa claramente que las mayores variaciones de acidez total se dan en los tratamientos de 10 horas y 10% de inóculo (T2), y los tratamientos de 12 horas para 5% y 1% de inóculo. Se observa además, que existen leves diferencias entre los tratamientos de 10 horas y los de 12 horas.

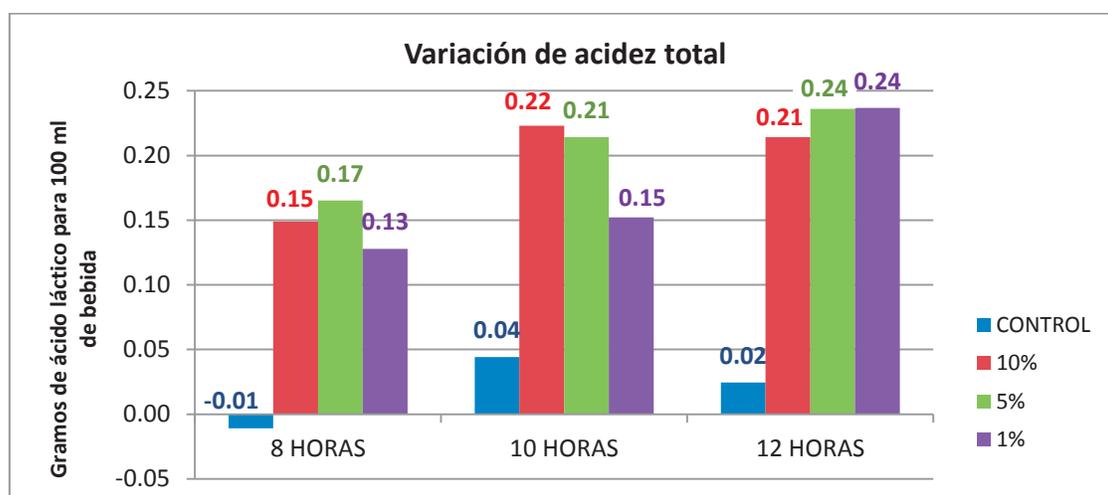


Figura 12.- Variación de acidez total para los diferentes tratamientos

Además, para los tratamientos de 8 y 10 horas, se observa que las mayores producciones de acidez se dan en los tratamientos al 10 y 5% de inóculo, mientras que el tratamiento al 1% presenta menor producción de ácido. Esto se debe a que los tratamientos con mayor concentración de inóculo tenderán a acidificar el medio más rápidamente que los de menor concentración, puesto que, al tener una mayor población inicial, la fase exponencial del crecimiento tiene una mayor pendiente, y por tanto, le toma menos tiempo alcanzar una determinada población final. Así, para 8 horas de fermentación, los tratamientos al 10 y 5% de

inóculo han producido mayor cantidad de ácidos que los tratamientos al 1%. Pero a medida que se incrementa el tiempo de fermentación (12 horas), los valores de acidez tienden a hacerse similares, indicando que se va llegando a la fase estacionaria.

Por otro lado, para el tratamiento a las 12 horas, no existen diferencias entre el tratamiento al 5% y el de 1% de inóculo, incluso éstos superan al tratamiento con 10% de inóculo. Esto indica que se habría llegado a un límite en la producción de ácido láctico, y que el crecimiento microbiano habría llegado a su máximo. Los microorganismos se encontrarían, entonces, en la fase estacionaria. Según García *et al.* (1993), para leche acidófila (un tipo de leche fermentada sólo por *L. acidophilus*), se recomienda una acidez menor a 0.65% de ácido láctico para que la población sea viable. En este sentido, la bebida probiótica de quinua, que presenta un máximo de 0.23% de ácido láctico, se encuentra debajo del límite sugerido por García *et al.* (1993), y la población microbiana no se encontraría inhibida.

En el gráfico 13 se muestra la variación de acidez total en el tiempo, a fin de observar el límite que alcanza la producción de ácido láctico. Para los tratamientos de 10 y 5% de inóculo, se observa que la producción de ácido láctico alcanza una estabilidad a las 10 horas de fermentación. Por el contrario, para los tratamientos de 1% de inóculo, la máxima producción se alcanza a las 12 horas de fermentación.

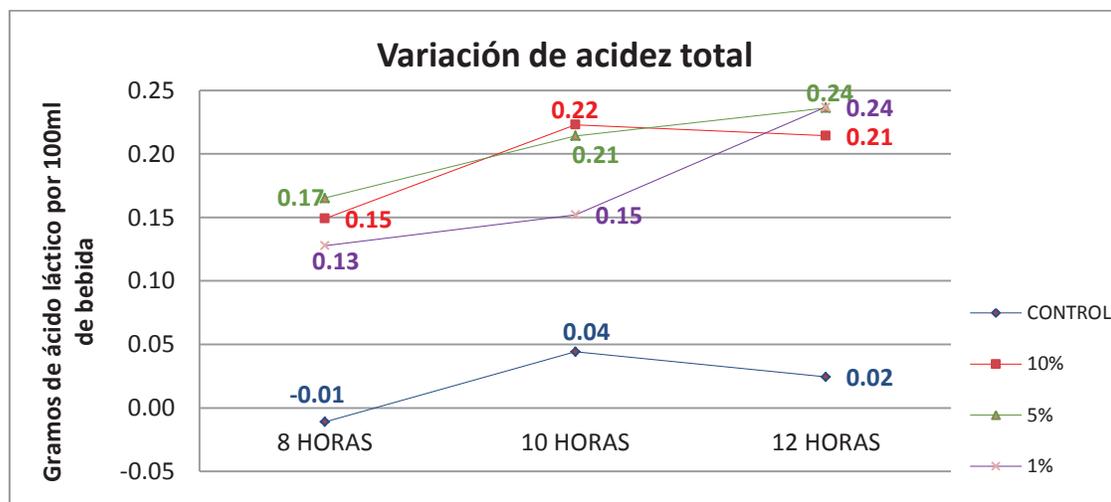


Figura 13.- Variación de acidez total en el tiempo.

Todos estos resultados indican que se estaría produciendo una fermentación láctica, cuyo principal producto es el ácido láctico. Esto se deduce a partir de las cepas de probióticos usadas, las cuales, en su mayoría, son homolácticas. A pesar de que la bebida de quinua no contiene lactosa, los cultivos se adaptan y acidifican el medio. (Mateos, 2005).

Según García *et al.* (1993), el porcentaje de ácido láctico de un yogurt natural bajo en grasa varía entre 0.8% y 1.4%. El porcentaje de ácido láctico para el yogurt BioLaive es de 0.86%). La bebida probiótica de quinua contiene entre 0.02-0.23% ácido láctico. Se observa, por tanto, que la cantidad de ácido láctico producida en la bebida probiótica de quinua es menor a la producida en un yogurt. Esto se explicaría porque las necesidades nutricionales de los cultivos probióticos son muy exigentes, y la leche es el medio perfecto para su crecimiento por los cofactores y nutrientes que posee (García *et al.*, 1993). En cambio, la quinua -si bien es una fuente rica de nutrientes- posee una composición diferente a la leche. Cabe mencionar también, que estos resultados son similares a los encontrados por Quicazán en el 2004, que muestran que el porcentaje de ácido láctico es mayor en una bebida fermentada a partir de leche (yogurt) que en otra a partir de soya.

Adicionalmente, se debe tomar en cuenta el enantiómero de ácido láctico producido (L o D), ya que esto también influye en la determinación de la acidez total. Según García *et al.* (1993), cada especie de microorganismo probiótico produce un enantiómero diferente, siendo que el isómero L normalmente es un 55% del total del ácido láctico producido.

Por otro lado, ha de notarse que, aún cuando el porcentaje de ácido láctico es menor, el pH alcanza valores inclusive más bajos que los del yogurt. Este resultado es similar al de Quicazán (2004): aún cuando la producción de ácido láctico en una bebida fermentada a partir de soya es menor al de una bebida fermentada a partir de leche (yogurt), el pH alcanza los mismos valores para ambas bebidas.

Como observación final, ha de resaltarse las propiedades antimicrobianas del ácido láctico. Este ácido inhibe el crecimiento de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y es ampliamente utilizado en la industria alimentaria (García, 2010). La presencia de este ácido, por tanto, contribuiría a la conservación del producto.

d) Sólidos solubles:

En la tabla 12 se presentan los datos de la variación de los sólidos solubles para todos los tratamientos. Estos datos corresponden al valor promedio de las tres repeticiones.

Tabla 12.- Variación de los sólidos solubles (°Brix) para todos los tratamientos, antes y después de la fermentación

% INOCULO	TIEMPO DE FERMENTACIÓN					
	8 HORAS		10 HORAS		12 HORAS	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
CONTROL	10.00	10.00	10.00	9.00	9.33	9.67
10%	9.00	8.50	9.17	7.17	8.00	8.17
5%	9.00	8.50	8.50	7.50	8.17	8.67
1%	10.00	9.17	9.67	8.83	9.00	9.50

Fuente: Elaboración propia

Se observa que los sólidos solubles no varían en grandes cantidades. Para los tratamientos de 8 y 10 horas, los sólidos solubles disminuyen; mientras que para los tratamientos de 12 horas, los sólidos solubles se incrementan. Incluso algunos controles muestran variaciones.

Los resultados de 8 y 10 horas encuentran explicación a la luz de los resultados de la acidez total. La producción de ácido láctico varía entre 0.02 y 0.23%, lo cual es casi la cuarta parte del ácido láctico producido en un yogurt natural (0.8-1.4%) (García *et al.*, 1993). En este sentido, se entiende que los azúcares hayan sido consumidos por los microorganismos probióticos en menor cantidad que si hubieran estado en un sustrato tipo leche. Debe considerarse que, si bien la quinua es una fuente rica de nutrientes, no posee las mismas condiciones que la leche, debido a los cofactores y otros nutrientes que ésta posee (García *et al.*, 1993). Sin embargo, a pesar de que las variaciones son mínimas, las mayores variaciones se presentan, al igual que para el pH, en los tratamientos de 10 horas (T2, T5 y T8), indicando un consumo de los azúcares libres por parte de los microorganismos probióticos.

En el caso del tratamiento CONTROL, a las 10 horas, se deduce que una de las repeticiones sufrió un proceso de contaminación, lo cual afectó a los resultados. (República de Colombia, 2011). Esto se corrobora con los datos de pH, en los que también se observa una leve disminución.

Por otro lado, los resultados de 12 horas en vez de disminuir, se incrementan. Esto se explica por la disolución de las sustancias en el agua. Según, Puerta (2012), en una fermentación de café, el valor de los grados Brix al inicio es de 2,8% en promedio, y después de 18 horas, cambia a valores de 4,7%; y esto es debido a la disolución de las sustancias en el agua.

Adicionalmente a esto, debe tomarse en cuenta que el refractómetro mide el total de sólidos solubles, y no sólo los azúcares, por lo que las variaciones de los azúcares se hacen menos detectables. Según Hanna Instruments (2008), los refractómetros convierten el índice de refracción de una muestra en concentración de sacarosa en unidades de porcentaje (por peso) Brix. Por tanto, los resultados obtenidos no muestran la cantidad de azúcares presentes, sino la cantidad de sólidos solubles y lo expresan como porcentaje de sacarosa.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar el mejor tratamiento, se realizó un análisis estadístico. Dicho análisis se realizó en base al parámetro “Acidez total expresada en porcentaje de ácido láctico”. Se tomaron los valores registrados en la tabla 12 y se determinó la diferencia entre “Inicial” y “Final”. Este valor es la diferencia en la concentración de ácido antes y después de la fermentación; en otras palabras, es la cantidad de ácido láctico (en porcentaje) producido por los microorganismos probióticos.

Con los datos mencionados se construyó la tabla 13:

Tabla 13.- Variación de la acidez total, expresado en porcentaje de ácido láctico (Después de la fermentación – Antes de la fermentación), para todos los tratamientos

	Tiempo de fermentación											
	8 horas de fermentación				10 horas de fermentación				12 horas de fermentación			
	10% (T1)	5% (T4)	1% (T7)	0% (C1)	10% (T2)	5% (T5)	1% (T8)	0% (C2)	10% (T3)	5% (T6)	1% (T9)	0% (C3)
R1	0.15998	0.17121	0.13075	0.00000	0.22500	0.22589	0.15708	0.00150	0.20618	0.22223	0.22255	0.00000
R2	0.14875	0.16420	0.12974	-0.01571	0.19970	0.20399	0.14303	0.02143	0.22108	0.22941	0.24706	-0.00300
R3	0.13831	0.16000	0.12273	-0.01731	0.24424	0.21275	0.15617	0.10986	0.21541	0.25691	0.24095	0.07623
Promedio	0.14901	0.16513	0.12774	-0.01101	0.22298	0.21421	0.15209	0.04426	0.21422	0.23618	0.23685	0.02441
Suma de tratamientos	0.44704	0.49540	0.38322	-0.03302	0.66894	0.64262	0.45627	0.13279	0.64267	0.70855	0.71055	0.07323

Fuente: Elaboración propia

Se observa en la tabla 13 que los valores más altos de producción de ácido corresponden a las fermentaciones T2 (10 horas de fermentación y 10% de probióticos), y T6 (12 horas de fermentación y 5% de probióticos).

El Análisis de Varianza se muestra en la tabla 14. Donde A: Tiempo de fermentación, B: Concentración de microorganismos probióticos.

Tabla 14: Análisis de Varianza

F.V	G.L	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F.cal	F. tab	Significancia
A	2	0.0315042	0.015752	27.63392	3.4	*
B	3	0.2041821	0.068061	119.3991	3.01	**
A*B	6	0.0106208	0.00177	3.105352	2.51	*
Error	24	0.0136806	0.00057			
Total	35	0.2599877				

Fuente: Elaboración propia

Se observa que para todos los casos, $F_{cal} > F_{tab}$, por lo tanto, se demuestra que tanto el factor A, el factor B, y ambos combinados (A*B) ejercen efectos significativos sobre las muestras. Se observa que es el factor B (Concentración de microorganismos probióticos) es el que más influye.

Como la interacción de ambos factores resultó significativa, se hizo una prueba de comparación para efectos principales, y luego se probaron los efectos simples: Se realizaron pruebas de comparación entre los tratamientos de 8 y 10 horas, y entre los de 10 y 12 horas. Los resultados indicaron que existen diferencias significativas en la producción de ácido entre la fermentación de 8 horas y la de 10 horas, siendo la de 10 horas, la que más ácido produce. Por otro lado, no existen diferencias significativas en la producción de ácido entre la fermentación de 10 horas y la de 12 horas. Al no existir diferencias significativas entre éstas, se prefiere utilizar la fermentación de 10 horas, ya que resulta menos costosa económicamente hablando. (Revisar Anexo IV para ver el análisis estadístico completo).

Luego, se realizaron otras pruebas de comparación para efectos simples entre los tratamientos de 10, 5 y 1% para la fermentación de 10 horas. En la tabla 15 se presentan los resultados del Análisis de Varianza para efectos simples:

Tabla 15.- Análisis de Varianza para efectos simples

FV	GL	SC	C.MEDIO	F.CAL	F.TAB	SIGNIFICANCIA
Ab1	2	0.009799827	0.0049	8.595934	3.4	*
Ab2	2	0.007939009	0.00397	6.963714	3.4	*
Ab3	2	0.019682885	0.009841	17.26487	3.4	*
Ab4	2	0.004703241	0.002352	4.125455	3.4	*
Ba1	3	0.058495525	0.019499	34.2063	3.01	**
Ba2	3	0.061056438	0.020352	35.70384	3.01	**
Ba3	3	0.095250954	0.03175	55.69969	3.01	**
ERROR	24	0.013680645	0.00057			

Fuente: Elaboración propia

Las pruebas para efectos simples concluyeron que, para una fermentación de 10 horas, no existen diferencias significativas entre la concentración de probióticos al 10 y al 5%, pero sí entre la de 5% y 1%.

Estadísticamente hablando, esto significa que se obtienen cantidades similares de ácido si se inoculan microorganismos probióticos en una concentración de 5% o de 10%. Si bien resultaría menos costoso utilizar un inóculo al 5%, se prefiere utilizar la concentración de 10%, porque una población inicial de 10% tendrá un crecimiento más acelerado que una de 5%. De esta manera, los patógenos serán inhibidos por el ácido láctico generado, más rápidamente que si se usara el inóculo de 5%. Como medida preventiva para asegurar la inocuidad del producto, la elección del inóculo de 10% es crucial. El ácido láctico, presente en la bebida de quinua, además de brindar un sabor ácido a la bebida, también actúa como agente antimicrobiano, inhibiendo el crecimiento de bacterias patogénicas como *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (García *et al.*, 2010). Así pues, en conjunto con el sorbato de potasio, extiende el tiempo de vida del producto.

El mejor tratamiento resultó ser el de 10 horas de fermentación a una concentración de probióticos del 10%.

4.4 FORMULACIÓN

La bebida calificada como la mejor -en base a la producción de ácido láctico-, fue formulada en tres diferentes sabores, basándose en la información presentada por Zanabria (2003) y en ensayos previos (cuya información se muestra en el Anexo IX).

La formulación incluyó miel de abeja y algarrobina. Esto se hizo con la finalidad de darle a la bebida un sabor más natural. Las propiedades medicinales y antimicrobianas de la miel de abeja se sumarían a los beneficios de la quinua y de los cultivos probióticos. Respecto a estas propiedades, Ulloa et al. (2010), indica que los antiguos egipcios, asirios, chinos y romanos utilizaron la miel en combinación con otras hierbas para tratar enfermedades del intestino. Por tanto, la acción combinada de cultivos probióticos y miel de abeja daría mejores resultados en el tratamiento de enfermedades intestinales. Asimismo, Ulloa et al. (2010) declara que la miel de abeja es una fuente natural de antioxidantes, los cuales son efectivos para reducir el riesgo de enfermedades del corazón, sistema inmune y diferentes procesos inflamatorios. Finalmente, las propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella enterica* (Sanz et al., 2011), coadyuvarían junto al ácido láctico y el sorbato de potasio, a la preservación de la bebida probiótica de quinua.

Respecto al sorbato de potasio (E202), el procedimiento descrito por Zanabria (2003) sugiere utilizarlo en cantidades de 0.01% p/p. Este conservante, es utilizado en la producción de yogures y vinos, ya que no presenta toxicidad. No ejerce acción sobre las bacterias lácticas. Este conservante es añadido con la finalidad de asegurar la inocuidad del producto y extender su tiempo de vida útil.

Por otro lado, los sabores ensayados por Zanabria (2003) fueron: mango, banana y naranja. Para la presente investigación se consideró los sabores “Natural”, “Mango” y “Naranja”. La formulación de sabor “Natural”, no llevó saborizante. Este sabor se eligió con la finalidad de determinar el agrado de la bebida probiótica de quinua sin saborizante. Las concentraciones utilizadas fueron las recomendadas por el proveedor.

4.5 PRUEBA DE PREFERENCIA:

Se entrevistó a un panel de 48 personas, de edad entre 17-45 años. El puntaje obtenido por la bebida, en sus tres respectivos sabores, se muestra en la tabla 16:

Tabla 16.- Puntaje obtenido para los tres sabores de la bebida.
Donde: A (Natural); B (Mango); C (Naranja)

	Frecuencia	Frecuencia relativa	Frecuencia Porcentual
A	15	0.31250	31.2500
B	19	0.3958	39.5833
C	14	0.2917	29.1667
Total	48	1.0000	100.0000

Fuente: Elaboración propia

Se observa que la bebida preferida por los panelistas fue la de sabor a mango, con un 39.5% de preferencia. Los sabores “Natural” y “Naranja”, ocuparon el 2° y 3° lugar, con un porcentaje de 31.25% y 29,17% respectivamente. Con esto se concluye que los tres sabores ensayados fueron del agrado del público, pues presentan valores cercanos. Sin embargo, la de sabor a mango fue la más agradable.

Sin embargo, Zanabria (2003) obtuvo un 73.33% de preferencia para la bebida sabor naranja, y 13.33% para la bebida sabor mango. Ante estas diferencias, se debe tomar en cuenta que la bebida formulada por Zanabria (2003) es un hidrolizado de almidones, proteínas y pectinas, pero no es una bebida fermentada. El sabor ácido propio del ácido láctico, la miel de abeja y la algarrobina, serían los responsables de estas diferencias.

Adicionalmente, los comentarios indican que la bebida es agradable al paladar, que tiene un sabor natural, que se siente la quinua, y que se siente un sabor ácido.

4.6 ANÁLISIS PROXIMAL:

En la tabla 17 se observa la composición proximal de la bebida probiótica. En el Anexo V se muestran los resultados completos del análisis proximal.

Según la FDA (2009), los valores diarios de referencia para adultos y niños de 4 años de edad a más, son: 300 g de carbohidratos totales, 65 g de grasas totales, 50 g de proteínas y 25 g de fibras alimenticias. Esto indica que cada 100 g de la bebida probiótica de quinua contiene 6.4% de los carbohidratos, el 0.3% de grasas y el 2.8% de proteínas de lo establecido por la FDA.

Tabla 17.- Composición proximal de la bebida probiótica de quinua

Calorías (Kcal/100g de muestra)	84.6
Carbohidratos (g/100g de muestra)	19.3
Grasa (g/100g de muestra)	0.2
Humedad (g/100g de muestra)	78.8
Cenizas (g/100g de muestra)	0.3
Proteína (g/100g de muestra; factor 6.25)	1.4
Fibra cruda (g/100g de muestra)	0.1

Fuente: Elaboración propia

En comparación con otras bebidas probióticas, la bebida probiótica de quinua difiere en la cantidad de calorías, según la información presentada en la revisión bibliográfica en el numeral 2.5.6. La bebida probiótica de quinua contiene más calorías que el yogurt BioLaive, la bebida VitaBiosa y la bebida Kevita. En este sentido, la bebida probiótica de quinua resulta 12 veces más energética que VitaBiosa, y alrededor de 500 veces más energético que el yogurt BioLaive y la bebida Kevita. Dicha energía se atribuye a la presencia de algarrobina y miel de abeja, los mismos que aportan azúcares a la bebida.

En cuanto a la proteína, se observa que el valor es de 1.4 g/100 g de bebida. Aparentemente es más bajo que el contenido inicial en el grano de quinua (16 g/100 g, según Romo, 2006). Pero este resultado se debe a la dilución realizada cuando se preparó la suspensión de quinua al 12.5%. Tomando esto en cuenta, se entiende que el valor de la proteína está en relación a la dilución realizada (es aproximadamente la décima parte del contenido de proteína en el grano de quinua).

En comparación con otras bebidas probióticas, la bebida probiótica de quinua contiene más proteínas que las bebidas VitaBiosa y Kevita, pero menos proteínas que el yogurt BioLaive.

Mientras que cada 100 ml de yogurt BioLaive contienen 2 g de proteína, la bebida probiótica de quinua contiene 1.4 g, los cuales son valores bastante cercanos. Sin embargo, debe recordarse que las proteínas de la quinua tienen un alto valor biológico, debido a la composición aminoacídica (Romo et al., 2006). Esto le otorgaría a la bebida probiótica de quinua un valor agregado por encima del yogurt probiótico BioLaive.

En comparación con las bebidas hidrolizadas preparadas por Zanabria (2003) y Bravo (1997), la bebida probiótica de quinua tiene valores similares. La bebida de Bravo (1997) posee 1.48 g de proteína/100 g de bebida; y la de Zanabria (2003) 1.70 g/100 g. Esto se debería a que el procedimiento seguido es similar y las materias primas utilizadas también.

En cuanto a la grasa, la bebida probiótica de quinua contiene 0.2 g/100 g. Según Repo-Carrasco et al. (2003), el contenido de grasa en quinua es de 6 g/100 g de materia seca. Tomando en cuenta la dilución realizada (12.5%), se esperaba que el contenido de grasa fuera de 0.75 g/100 g. Sin embargo, el valor obtenido es menor. Esto podría deberse a la variedad de quinua utilizada, que no necesariamente contiene alrededor de 6 g grasa/100 g. Según Tapia (1979), el contenido de grasa puede variar entre 1.8% y 9.30% según la variedad de que se trate.

En comparación con otras bebidas probióticas, la bebida probiótica de quinua presenta menos grasa que el yogurt BioLaive, pero mayor grasa que las bebidas VitaBiosa y Kevita. Mientras BioLaive contiene 2g de grasa por cada 100ml de bebida, VitaBiosa y Kevita no contienen grasa y la bebida probiótica contiene 0.2g. En este sentido, la bebida probiótica de quinua es baja en grasas, en comparación con las bebidas existentes en el mercado.

En comparación con las bebidas hidrolizadas preparadas por Zanabria (2003) y Bravo (1997), la bebida probiótica de quinua tiene menos grasa. Bravo (1997) reporta valores de 0.96g/100g, y Zanabria (2003) 0.5g/100g. Incluso en comparación con estas bebidas hidrolizadas, la bebida probiótica de quinua sigue siendo baja en grasas.

En cuanto a los carbohidratos, la bebida probiótica de quinua contiene 19.3 g por cada 100 g, mientras que el yogurt BioLaive 15.5 g, VitaBiosa 1.5 g y Kevita 3 g. En este sentido, la bebida tiene similar concentración de carbohidratos que la ofrecida por un yogurt probiótico pero más carbohidratos que las bebidas VitaBiosa y Kevita. Este contenido de carbohidratos resulta ventajoso si se pretende consumir como bebida energizante.

En comparación con las bebidas hidrolizadas preparadas por Zanabria (2003) y Bravo (1997), la bebida probiótica de quinua tiene valores superiores. Zanabria (2003) reporta valores de 11.7 g/100 g, y Bravo (1997) 12.63 g/100 g. Este valor se debería a que la bebida probiótica de quinua incorpora miel de abeja y algarrobina, los cuales son ricos en azúcares.

4.7 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.-

En el Anexo VI se muestran los resultados completos del análisis microbiológico. En el Anexo X se muestran más imágenes de los análisis microbiológicos.

El primer análisis microbiológico (realizado inmediatamente después de terminada la fermentación) demuestra que la bebida contiene: (Ver figura 14)

- * Bacterias aerobias mesófilas totales: 1.15×10^8 UFC/ml
- * Coliformes totales: < 3 UFC/ml
- * Mohos y levaduras: < 3 UFC/ml
- * *Lactobacillus* spp: 6.25×10^7 UFC/ml

Este primer análisis confirma que los microorganismos probióticos se han multiplicado en la bebida de quinua. Inicialmente se añadió 2.53×10^6 UFC/ml, y después de la fermentación se tiene 1.15×10^8 UFC/ml, es decir se han incrementado en 100 veces.

En un estudio realizado por Arenas-Suescun *et al.*, en el 2012, en el que se realizó una fermentación láctica a partir de leche con quinua, se encontró que el conteo final después de 3.7 horas era de 5.61×10^6 UFC/ml. El mismo autor, reporta que los conteos exigidos para un yogurt comercial son del orden 10^7 UFC/ml. Para ambos casos, la bebida probiótica de quinua supera –por lo menos en 10 veces- a los conteos de estas bebidas.

Según Bourlioux (2003) citado por Cocio (2006), el número mínimo de microorganismos probióticos que es necesario para surtir efecto sobre la salud es del orden de 10^7 UFC/ml. Además, según Vinderola *et al* (2000), citado por Cocio (2006) la ingesta diaria debe ser mayor a 100 g de producto que contenga 10^6 células viables /g. En la bebida elaborada en la presente investigación, los microorganismos probióticos se encuentran en el orden de 10^8 . Esto asegura que, al consumirla, brindará los efectos benéficos esperados sobre la salud.

El segundo análisis microbiológico (realizado dos semanas después del primer análisis microbiológico) demuestra que:

- * Bacterias aerobias mesófilas totales: 7.95×10^6 UFC/ml
- * Coliformes totales: < 3 UFC/ml
- * Mohos y levaduras: < 3 UFC/ml
- * *Lactobacillus* spp: 3.9×10^6 UFC/ml

El segundo análisis microbiológico demuestra que aún dos semanas después de realizada la fermentación, los microorganismos probióticos siguen presentes en la bebida, aunque en menor cantidad. Por lo que, aún después de dos semanas de preparada, la bebida seguirá surtiendo el efecto deseado en el organismo que la consuma.

En la figura 14 se observa: **a**: Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales, en Agar Plate Count, dilución 10^{-6} . Los puntos observados corresponden a unidades formadoras de colonias (UFC); **b**: Recuento de coliformes totales en agar VRB; se observan unos gránulos, que son los gránulos de la harina de quinua, pues es la dilución 10^{-1} . No se observa crecimiento de coliformes; **c**: Recuento de mohos y levaduras totales en agar Sabouraud; se observan unos gránulos, que son los gránulos de la harina de quinua, pues es la dilución 10^{-1} . No se observa crecimiento de mohos ni levaduras; **d**: Recuento de *Lactobacillus* en agar MRS, dilución 10^{-5} , las marcas con plumón azul corresponden a las UFC ya contadas.

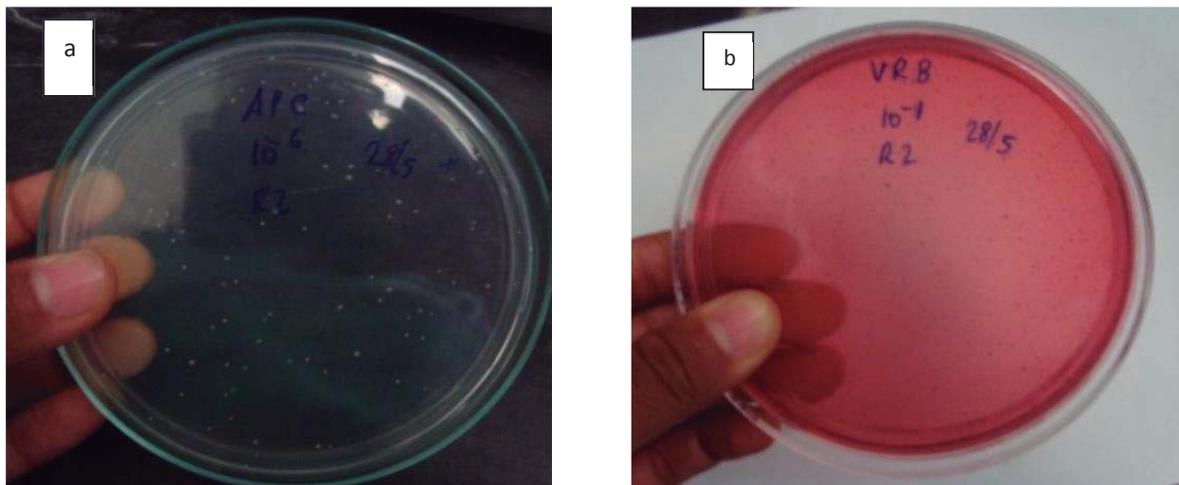


Figura 14.- Resultados de los análisis microbiológicos.

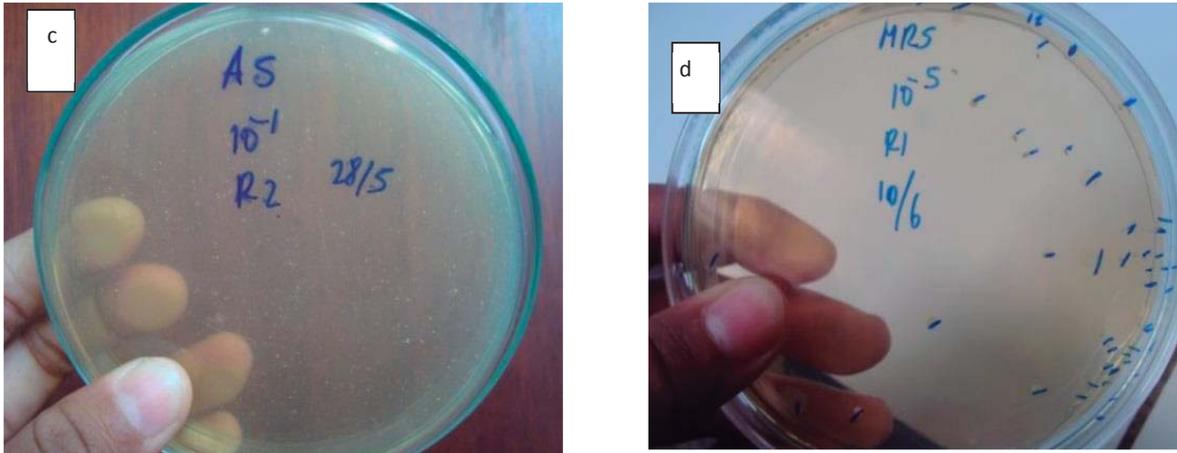


Figura 14.- Resultados de los análisis microbiológicos.

Los resultados de la tinción gram de una colonia crecida en agar MRS revelan la presencia de bacilos en cadenas (Streptobacilos), que parecen un enmarañado de hilos. Las imágenes, se muestran en la figura 15, a un aumento de 1000X.

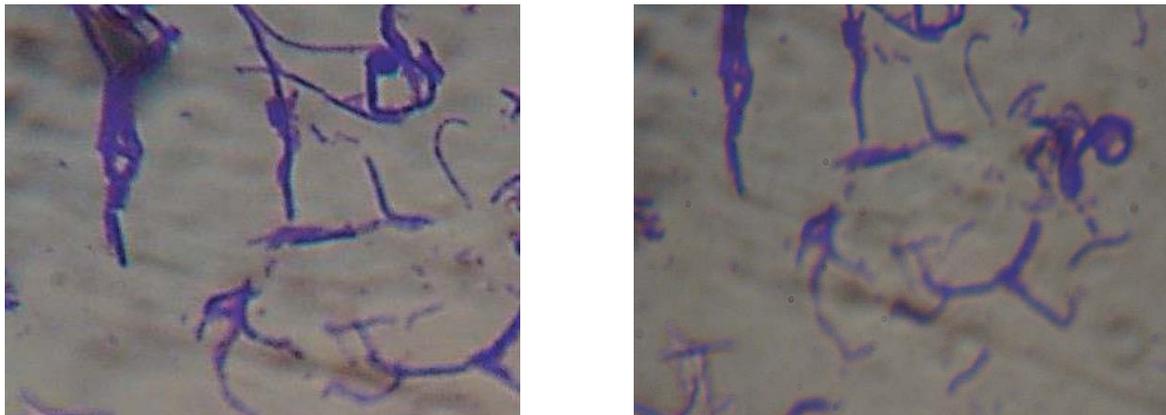


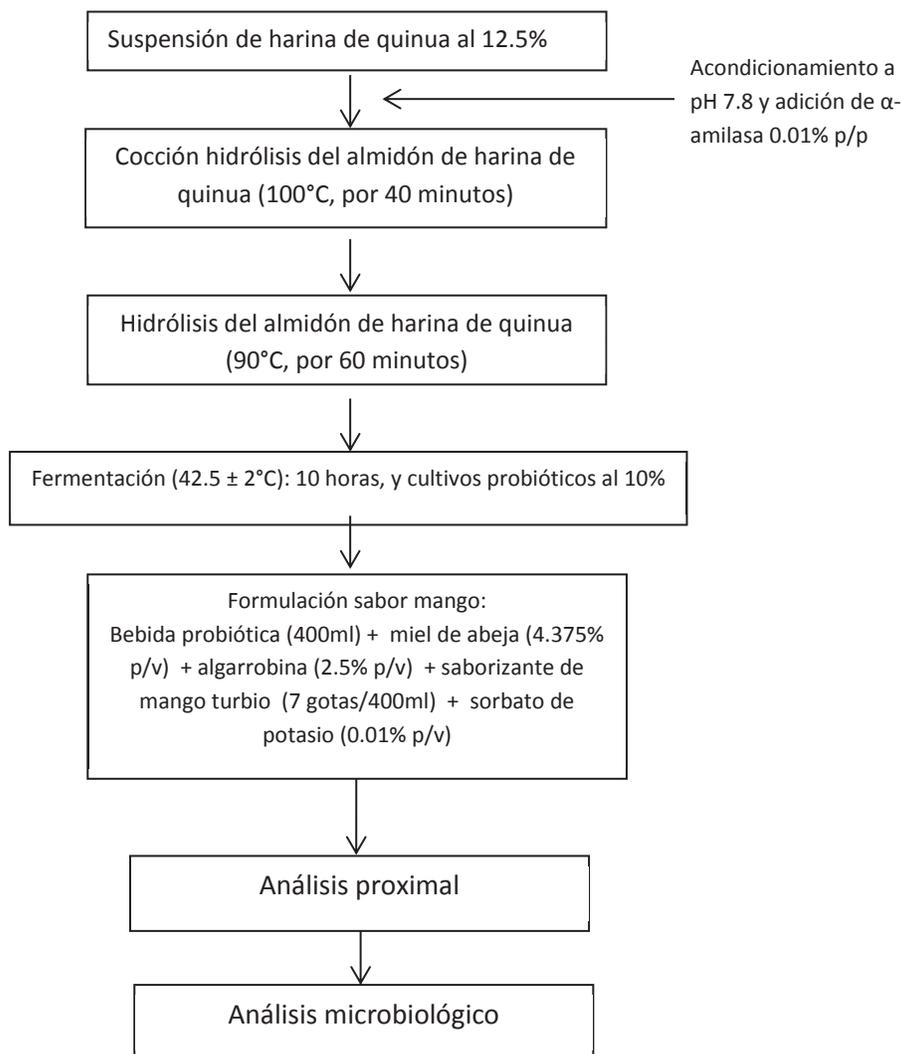
Figura 15.- Imágenes tomadas en el microscopio (1000X), a las colonias que crecieron en agar MRS. Son bacilos en cadenas, que parecen un enmarañado de hilos.

Estas imágenes sugieren que se trataría de las especies *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*, pues estos géneros son bacilos gram-positivos. Además, la información proporcionada por Vivolac Cultures Corporation (2012) indica que los microorganismos probióticos usados para la fermentación incluyen dichos géneros.

El consumo de la bebida probiótica de quinua, en las dosis recomendadas, permitiría disfrutar de los beneficios nutricionales de a quinua y los efectos de los microorganismos probióticos. Los beneficios del consumo de microorganismos probióticos, son, entre muchos otros: disminución de la intolerancia a la lactosa, inhibición del crecimiento de especies enteropatógenas, restablecimiento de la flora intestinal, inhibición del desarrollo de diabetes mellitus, prevención del cáncer de colon, disminución de los niveles del colesterol en sangre, disminución del estreñimiento y de los síntomas asociados al Síndrome de Intestino irritable, modulación del sistema inmunológico (Tormo, 2006).

4.8 FLUJOGRAMA FINAL

A continuación se presenta el flujograma final del proceso:



V. CONCLUSIONES

1. Es posible conducir una fermentación láctica a partir de una suspensión de almidón hidrolizado de harina de quinua.
2. La mejor concentración de microorganismos probióticos y el mejor tiempo de fermentación son los ensayados en el tratamiento T2, que incluye 10% de microorganismos probióticos (2.5×10^6 UFC/ml) y 10 horas de fermentación.
3. Se logró elaborar de una bebida probiótica de quinua, obtenida por la fermentación láctica del almidón hidrolizado de harina de quinua (*Chenopodium quinoa*). El proceso implica los siguientes pasos:
 - Generación de una suspensión de harina de quinua al 12.5% (p/p)
 - Hidrólisis de los almidones con la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich ®) durante 40 minutos a 100°C y, posteriormente durante 60 minutos a 90°C.
 - Adición de microorganismos probióticos “Vivolac”, a una concentración de 10% (v/v)
 - Fermentación láctica, durante 10 horas, en estufa a 42.5°C \pm 2°C, en condiciones microaerófilas.
 - Interrupción de la fermentación (disminución de la temperatura hasta 4°C)
 - Formulación del producto (Bebida probiótica (400ml) + miel de abeja (4.375% p/v) + algarrobina (2.5% p/v) + saborizante de mango turbio (7 gotas/400ml) + sorbato de potasio (0.01% p/v).

VI. RECOMENDACIONES

- Para reducir los costos de la hidrólisis enzimática, sería recomendable inmovilizar las enzimas en un medio lo suficientemente resistente a las altas temperaturas usadas en este proceso. De esta manera, sería posible reutilizar la enzima una y otra vez. Asimismo, se podría utilizar granos germinados de quinua, puesto que en el proceso de germinación, los almidones son hidrolizados, y los azúcares, liberados. De esta manera no se necesitaría enzimas.
- Realizar estudios de bebidas fermentadas con otro tipo de materia prima, por ejemplo, maca, soya, y otros que contengan almidón.
- Si este producto aspira a ser ampliamente comercializado en el mercado local y nacional, entonces se hace fundamental determinar la dosis diaria adecuada para que surja el efecto deseado en los consumidores.
- Probar el efecto que tendría añadir prebióticos durante la fermentación. Se sabe que los prebióticos potencian el crecimiento de los probióticos, pero es necesario determinar en qué medida, y si tiene efectos benéficos adicionales sobre el consumidor.
- Asimismo, se sugiere el uso de una solución amortiguadora, que regule el descenso del pH y permita una mayor concentración de ácido láctico.
- Realizar estudios para determinar el tiempo de sobrevivencia de los microorganismos probióticos en la bebida de quinua (tiempo de vida en anaquel), de manera que no pasen de límite mínimo exigible para que surtan efecto en el individuo.
- Realizar estudios con la hidrólisis no sólo del almidón, sino también de proteínas y pectinas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, A.C. 1995. Estudio de cuatro métodos para la obtención de glucosa a partir de almidón de camote. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
2. Álvarez, P. P.; Jurado T., B.; Calixto C.; M.; Incio V., N.; Silva A., J.. 2008. Prebiótico Inulina/oligofructosa en la raíz del yacón (*Smallanthus sonchifolius*), fitoquímica y estandarización como base de estudios preclínicos y clínicos. Revista de Gastroenterología. Perú. 28: 22-27.
3. Arango Bedoya, O.; Paola Cuarán, G.; Camilo Fajardo, J. 2008. Extracción, cristalización y caracterización de inulina a partir de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Vol6, N°2. Universidad de Nariño. Pasto
4. Arenas-Suescún, C.; Zapata-Fernandez, R.; Gutiérrez-Cortéz, C. 2012. Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de quinua (*Chenopodium quinoa*). Vitae. Vol. 119, N°1, pags: S279-S278
5. Atwell, W.A; Patrick, B. M.; Johnson, L. A.; Glass, R. W. 1983. Characterization of quinoa starch. Cereal Chemistry. Vol 60, N° 1. Pags 9-11
6. Borrueal, N. 2003. Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. Gastroenterology and Hepatology. 26 (Suplement 1): 13-22
7. Bourlioux, P., Koletzko, B., Gaurner, F. Y Braesco, V. 2003. The intestine and its microflora are partner for the protection of the host: report on the donone symposium “The intelligent intestine”. American Journal Clinical Nutrition. 78 (4): 675 – 683

8. Bravo Puente, B. 1997. Estudio de la hidrólisis enzimática de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de grado para optar el título de Ingeniero en Industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
9. Camacho, F.; González, P.; Marquez, M. C.; Guadix, E. M. 1992. Hidrolizados enzimáticos de interés en la I.A.A. (II). Hidrolizados enzimáticos de proteínas. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Granada, España. Alimentación, equipos y tecnología. Diciembre. 174-80.
10. Carrera, J. E. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Volumen 1, N°1. Universidad del Cauca, Colombia.
11. Chacón Villalobos, A. 2006. Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana* 17 (1): 55-61.
12. Cocio Olmos, J. A. 2006. Elaboración de Quesillo de Leche de Soya (*Glycine max*) con adición de Bacterias Probióticas (*Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* Bb12). Universidad Austral de Chile.
13. Delzenne, N. M.; Roberfroid, M. B. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 27:1-6
14. DIGESA, 2008. Norma técnica sanitaria 071-V0: Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.
15. Egas L; Villacrés E.; Salazar D.; Peralta E.; Ruilova M. 2010. Elaboración de un cereal para desayuno con base a quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) expandida. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*. Vol 23, N°2, págs.: 9-15

16. Espitia Rocha, L. C. 2009. Determinación de la concentración de α y β amilasas comerciales en la producción de etanol a partir de almidón de cebada empleando *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia
17. FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.
18. FDA, 2009. Guía de etiquetado para alimentos. Orientación para la industria. Food and drug administration. Centro de inocuidad de alimentos y nutrición aplicada. Versión web: www.fda.gov/FoodLabelingGuide (Revisado el 05/09/2013, 5:24pm)
19. Fontúrbel R., F.. 2003. Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinua* W. (Chenopodiaceae), debida a la presencia de saponinas. Ciencia Abierta 21:1-10. Versión web: andesrunaaae.blogspot.com/p/problemática-de-la-produccion-y.html
20. García, C. A.; Arrázola, G. S; Durango, A. M. 2010. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. Tema agrarios Vol 15 (2): 9-26
21. García Garibay, M.; Quintero Ramírez, R.; López-Munguía Canales, A. 2004. Biotecnología alimentaria. Limusa Noriega Editores. Versión web: books.google.com.pe/books?id=2ctdvBnTa18C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false Revisado:03/08/2013, 11:53am
22. García Garibay, M.; Quintero Ramírez, R.; López-Munguía Canales, A. 1993. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. Versión web: <http://books.google.com.pe/books?id=2ctdvBnTa18C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false> Revisado: 05/12/2013, 09:25am

23. García García, D. P. 2011. Desarrollo de un producto de panadería con harina de quinua. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá
24. González, P.; Camacho, F.; Robles, A. 1989. Hidrolizados enzimáticos de interés en I.A.A. I. Hidrolizados de cereales. Alimentación, equipos y tecnología. Mayo-Junio: 201-207.
25. Gutiérrez-Correa, M.; Villena Chávez, G. 2010. Microbiología industrial: Guía de prácticas. Laboratorio de Micología y Biotecnología. Universidad Nacional Agraria La Molina.
26. FAO. 2011. La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. FAO. Oficina regional para América Latina y el Caribe.
27. Ha C.L.; Lee JC; Zhou HR; Ustunol Z; Pestka JJ. 1999. Effects of yogurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse. Journal of Food Protection. 62: 181-8. Citado por Borrueal, 2003.
28. Hanna Instruments. 2008. Manual de Instrucciones. Refractómetro para mediciones de sacarosa HI 96801.
29. Hernández Plata, C. G.; Pantoja Avila, L. K.; Turriago Mojica, S. C.; 2002. Evaluación de la presencia de bacteriocinas en cultivos de bacterias ácido lácticas. Universidad de La Sabana, Bogotá, Colombia.
30. Iza Yugcha, A. E. 2011. Aprovechamiento de la zanahoria amarilla (*Daucus carota*) tratada enzimáticamente en la obtención de una bebida tipo vino. Universidad técnica de Ambato, Ecuador.
31. Karp, G. 2009. Biología celular y molecular. Mac Graw Hill. Pág 40

32. Manzano, C. A.; Estupiñán G, D.; Poveda E; E.. 2012. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición*, Vol 9, N°1, 98-11
33. Martínez Rodríguez, S. 2005. Obtención de D-aminoácidos ópticamente puros a partir de un sistema recombinante. Caracterización de las amilasas involucradas en el proceso. Tesis doctoral. Universidad de Almería, España.
34. Mateos, J. A. 2005. Tecnología de las leches fermentadas. Sabadell Universitat. Versión web revisada el 03/12/2013, 6:23am
35. Medifarma. 2013. Ficha técnica del suero fisiológico al 0.9%
36. Mujica A. y Jacobsen Sven-E. 2006. La quinua (*Chenopodium quinoa*) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. 449-457
37. Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4° Edición, Freeman & Company.
38. Ogueke, C.C; Owuamanam, C. I.; Ihediohanma and Iwouo, J. O. 2010. Probiotics and prebiotics: Unfolding prospects for better human health. *Pakistan Journal of Nutrition* 9(9):833-843
39. Pedreschi, R; Campos, D.; Noralto, G. *et al.* 2003. Andean Yacon root (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. Endl.) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. S1 (18).S278-84
40. Puerta Quintero, G. I. 2012. Factores, procesos y controles en la fermentación del café. *Avances técnicos Cenicafé*. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Colombia. N° 422, págs: 1-12.

41. Quicazán, M. C.; Cuenca, M. M. 2004. Comparación de la fermentación de bebida de soya y leche de vaca utilizando un cultivo láctico comercial. Ingeniería y competitividad. Vol 5, N°2; pags: 16-22
42. Ramírez Ramírez, J. C.; Rosas Ulloa, P.; Velázquez González, M. Y.; Ulloa, J. A.; Arce Romero, F. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente, Año 2, N°7, Abril-Junio. Universidad Autónoma de Nayarit.
43. Repo-Carrasco, R; Espinoza C.; Jacobsen S.-E. 2003. Nutritional Value and use of andean crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International. Vol 19, N° 1 & 2, pp179-189.
44. República de Colombia, Ministerio de la protección social. Instituto Nacional de Salud UERIA. 2011. Perfil de riesgo *Bacillus cereus* en alimentos listos para consumo no industrializados.
45. Romo, S.; Rosero, A.; Forero, C. L.; Cerón, E. 2006. Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) variedad Piartal en los Andes Colombianos. Primera parte. Facultad de Ciencias agropecuarias. Universidad del Cauca. Vol4, N°1, Marzo.
46. Sanz Gómez, J; Salgado, C.R; García Fernández, C; Valencia-Barrera, R.M; Silva, M. 2011. Actividad antimicrobiana de mieles de abeja de Argentina y España frente a patógenos transmitidos por alimentos. Apimondia.
47. Sarria Ruiz, B. 1998. Efectos del tratamiento térmico de fórmulas infantiles y leche de vaca sobre la biodisponibilidad mineral y proteica. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
48. Scarpatti, Z.; Briceño, O. 1980. Evaluación de la composición química y nutricional de algunas entradas de quinua del banco de germoplasma de la Universidad Nacional Técnica del Altiplano. Anales Científicos UNA. Vol 18 (1-4): 125-134.

49. Schrezenmei, J. and De Vrese, M. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition. 73 (supplement): 361S-364S
50. Sigma-Aldrich. 2012. Certificate of Analysis. A-amilasa from *Bacillus licheniformis* Type XII-A
51. Tapia M; Gandarillas H.; Alandia S.; Cardozo, A.; Mujica A. 1979. Quinoa y kañiwa, cultivos andinos. Oficina Regional para la América Latina, 228p.
52. Tapia, M. E.; Fries, A. M.. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Asociación Nacional de Productores Ecológicos del Perú.
53. Tejada-Simon, MV; Pestka JJ. 1999. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell Wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. Journal of Food Protection. 62: 1435-44. Citado por Borrueal, 2003.
54. Tormo Carnicé, R. 2006. Probióticos, concepto y mecanismos de acción. Anales de Pediatría, Monografía. 4 (1): 30-41
55. Ulloa, J. A.; Mondragón Cortez, P. M.; Rodríguez Rodríguez, R.; Reséndiz Vázquez, J. A.; Rosas Ulloa, P. 2010. La miel de abeja y su importancia. Revista Fuente, Año 2, N° 4.
56. Vinderola, C., Prosello, W., Ghiberto, D. y Reinheimer, J. 2000. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. Journal of Dairy Science. 83 (9): 1905-1911.
57. Vivolac Cultures Corporation. 2012. Certificate of analysis. Vivolac Dri-set Bioflora Aby 424

58. Zanabria Galvez, S. J. 2003. Obtención de una bebida a partir de quinua hidrolizada. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Escuela de post-Grado. Especialidad de Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú
59. Sitio Web: <http://agraria.pe/noticias/minag-forma-comision-para-alentar-produccion-de-quinua> (Revisado 30/11/2012, 8:30pm)
60. Sitio Web: biosacolombia.com/productos/vita-biosa-probiotico/ (Revisado 05/09/2013 5:30pm)
61. Sitio web: kevida.com (Revisado 05/09/2013 5:30pm)
62. Sitio web: www.fatsecret.com/Diary.aspx?pa=fjrd&rid=1877069 (Revisado 05/09/2013 5:30pm)

ANEXOS

ANEXO I

α -Amilasa de *Bacillus licheniformis*

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

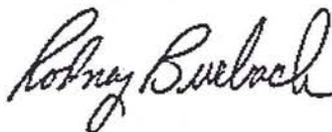
Certificate of Analysis

Product Name:

α -Amylase from Bacillus licheniformis - Type XII-A, saline solution, ≥ 500 units/mg protein (biuret)

Product Number: A3403
 Batch Number: SLBC5509V
 Brand: SIGMA
 MDL Number: MFCD00081319
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 30 AUG 2012
 Recommended Retest Date: APR 2016

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Yellow to Dark Brown	faint yellow
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
mg protein/ml (Biuret)	≥ 10.0 mg/ml	19.8 mg/ml
with TCA precipitation		
units/mg protein	≥ 500	1186
One unit will liberate 1.0 mg of maltose from starch in 3 minutes at pH 6.9 at 20 deg C		



Rodney Burbach, Manager
 Analytical Services
 St. Louis, Missouri US

21,3ml - 19.8 mg/ml - 1186 units/mg

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

α -Amylase from *Bacillus globigii* (*Bacillus licheniformis*)

Product Number **A 3403**
Storage Temperature 2-8 °C

Product Description

Enzyme Commission (EC) Number: 3.2.1.1
CAS Number: 9000-85-5
Molecular Weight: 62 kDa (SDS-PAGE).¹

This product has a pH range for activity of 5-9 with the optimal pH range of 7-9. It is stable between pH 7 and 10 and is stable from 40 to 60 °C at pH 7. Maximal activity was displayed at 90 °C and 60% of activity remained at 100 °C.¹

α -Amylase hydrolyzes the α -(1,4) glucan linkages in polysaccharides of three or more α -(1,4) linked D-glucose units. The α -(1,6) bond is not hydrolyzed. Starch or glycogen, the "natural" substrates, can be replaced to a limited extent by low molecular weight compounds.²

The product is supplied as a saline sucrose solution containing 10-50 mg/ml protein (Biuret).

Precautions and Disclaimer

For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

Storage/Stability

This enzyme maintains over 98% of activity after 60 minutes at pH 6.2 at 85 °C,¹ and maintained 100% of activity after storage for 1 hour at 91 °C.⁴

References

1. Morgan, F.J., and Priest, F.G., Characterization of a Thermostable α -Amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346, J. Appl. Bacteriol., **50**, 107-114 (1981).
2. Enzyme Handbook, Barman, T.E., Springer-Verlag (New York: 1969) Vol. II, EC 3.2.1.1, p. 560.
3. The Enzyme Handbook, Schomburg, D., and Salzmann, M., Springer-Verlag (Berlin Heidelberg: 1991) Vol. 4, EC 3.2.1.1, p. 7.
4. Medda, S., and Chandra, A., New Strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase active at alkaline pH. J. Appl. Bacteriol., **48**, 47-58 (1980).

MES/AJH 1/03

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.



SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE

Product Information

Enzymatic Assay of α -AMYLASE¹ (EC 3.2.1.1)

PRINCIPLE:

Starch + H₂O $\xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}}$ Reducing Groups (Maltose)

CONDITIONS: T = 20°C, pH = 6.9, A_{540nm}, Light path = 1 cm

METHOD: Colorimetric

REAGENTS:

- A. 20 mM Sodium Phosphate Buffer with 6.7 mM Sodium Chloride, pH 6.9 at 20°C
(Prepare 100 ml in deionized water using Sodium Phosphate, Monobasic, Anhydrous, Sigma Prod. No. S-0751, and Sodium Chloride, Sigma Prod. No. S-9625. Adjust to pH 6.9 at 20°C with 1 M NaOH.)
- B. 1.0% (w/v) Soluble Starch Solution (Starch)
(Prepare 25 ml in Reagent A using Starch Potato Soluble, Sigma Prod. No. S-2630. Facilitate solubilization by heating the starch solution in a glass beaker directly on a heating/stir plate using constant stirring. Bring to boil and maintain the solution at this temperature for 15 minutes. Allow the starch solution to cool to room temperature with stirring. Return the starch solution to its original volume (25 ml) by the addition of water and dispense samples for assay while stirring.)
- C. Sodium Potassium Tartrate Solution
(Dissolve 12.0 grams of Sodium Potassium Tartrate, Tetrahydrate, Sigma Prod. No. S-2377, in 8.0 ml of 2 M NaOH. Heat directly on a heating/stir plate using constant stirring to dissolve. **DO NOT BOIL.**)
- D. 96 mM 3,5-Dinitrosalicylic Acid Solution
(Prepare 20 ml in deionized water using 3,5-Dinitrosalicylic Acid, Sigma Prod. No. D-0550. Heat directly on a heating/stir plate using constant stirring to dissolve. **DO NOT BOIL.**)

Enzymatic Assay of α -AMYLASE¹ (EC 3.2.1.1)

REAGENTS: (continued)

- E. Color Reagent Solution (Clr Rgt Soln)
(With stirring, slowly add Reagent C to Reagent D. Dilute to 40 ml with deionized water. If not completely dissolved, the reagents should dissolve when mixed. The solution should be stored in an amber bottle at room temperature. The Color Reagent Solution is stable for 6 months.)
- F. 0.2% (w/v) Maltose Standard Solution
(Prepare 10 ml in deionized water using Maltose, Monohydrate, Sigma Prod. No. M-5885.)
- G. α -Amylase Solution
(Immediately before use, prepare a solution containing 1 unit/ml of α -Amylase in cold deionized water.)²

PROCEDURE:

Pipette (in milliliters) the following reagents into suitable containers:

	<u>Test</u>	<u>Blank</u>
Reagent B (Starch)	1.00	1.00

Mix by swirling and equilibrate to 20°C. Then add:

Reagent G (Enzyme Solution)	1.00	-----
-----------------------------	------	-------

Mix by swirling and incubate for exactly 3.0 minutes at 20°C. Then add:

Reagent E (Clr Rgt Soln)	1.00	1.00
Reagent G (Enzyme Solution)	-----	1.00

Cap and place in a boiling water bath for exactly 15 minutes, then cool on ice to room temperature and add:

Deionized water	9.00	9.00
-----------------	------	------

Mix by inversion and record the $A_{540\text{nm}}$ for both the Test and Blank using a suitable spectrophotometer.

Enzymatic Assay of α -AMYLASE¹ (EC 3.2.1.1)

PROCEDURE: (continued)

Standard Curve:

A standard curve is made by pipetting (in milliliters) the following reagents into suitable containers:

	<u>Std 1</u>	<u>Std 2</u>	<u>Std 3</u>	<u>Std 4</u>	<u>Std 5</u>	<u>Std Blank</u>
Reagent F (Std Soln)	0.20	0.40	0.60	0.80	1.00	----
Deionized Water	1.80	1.60	1.40	1.20	1.00	2.00
Reagent E (Clr Rgt Soln)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Cap and place in a boiling water bath for exactly 15 minutes, then cool on ice to room temperature and add:

Deionized Water	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00
-----------------	------	------	------	------	------	------

Mix by inversion and record the $A_{540\text{nm}}$ for the Standards and Standard Blank using a suitable spectrophotometer.

CALCULATIONS:

Standard Curve:

$$\Delta A_{540\text{nm}} \text{ Standard} = A_{540\text{nm}} \text{ Std} - A_{540\text{nm}} \text{ Std Blank}$$

Plot the $\Delta A_{540\text{nm}}$ of the Standards vs milligrams of Maltose.

Sample Determination:

$$\Delta A_{540\text{nm}} \text{ Sample} = A_{540\text{nm}} \text{ Test} - A_{540\text{nm}} \text{ Blank}$$

Determine the milligrams of Maltose liberated using the Standard Curve.

$$\text{Units/ml enzyme} = \frac{(\text{mg of Maltose released}) (\text{df})}{(1)}$$

df = dilution factor

1 = Volume (in milliliter) of enzyme used

$$\text{Units/mg solid} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg solid/ml enzyme}}$$

Enzymatic Assay of α -AMYLASE¹ (EC 3.2.1.1)

CALCULATIONS: (continued)

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{units/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

UNIT DEFINITION:

One unit will liberate 1.0 mg of maltose from starch in 3 minutes at pH 6.9 at 20°C.

FINAL ASSAY CONCENTRATIONS:

In a 2.00 ml reaction mix, the final concentrations are 10 mM sodium phosphate, 0.50% (w/v) starch, 3.4 mM sodium chloride and 1 unit α -amylase.

REFERENCE:

Bernfeld, P. (1955) *Methods in Enzymology* **1**, 149-158

NOTES:

1. This enzyme assay is not to be used to assay α -Amylase, Insoluble, Sigma Prod. Nos. A-0909 and A-5386.
2. α -Amylase, Sigma Prod. No. A-4551 is diluted in Reagent A at 20°C rather than in water.
3. This assay is based on the cited reference.
4. Where Sigma Product or Stock numbers are specified, equivalent reagents may be substituted.

Sigma warrants that the above procedure information is currently utilized at Sigma and that Sigma products conform to the information in Sigma publications. Purchaser must determine the suitability of the information and products for its particular use. Upon purchase of Sigma products, see reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

CÁLCULOS PARA LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMA

Considerando que:

- * Se trabaja con 12.5g de harina de quinua por cada 100ml de bebida.
- * La enzima se agregará en una concentración de 0.01% p/p almidón.
- * La harina de quinua contiene 70% de almidón

$$0.7 * 12.5g = 8.75g$$

$$0.01\% * 8.75g = 0.0875mg$$

Luego, según información del proveedor (Sigma-Aldrich ®): La enzima contiene 19.8 mg de proteína por cada ml de líquido.

Entonces:

$$\begin{array}{l} 19.8mg \text{ --- --- --- } 1ml \\ 0.0875mg \text{ --- --- --- } 0.04ml \end{array}$$

Por tanto, por cada 12.5g de almidón se necesitarán 0.04ml de líquido conteniendo la enzima.

Según la información proporcionada por Sigma-Aldrich, esto liberaría 1037.75mg de maltosa.

ANEXO II

**Certificado de calidad “Vivolac”
Microorganismos probióticos**



Vivolac Cultures Corporation
6108 W. Stoner Dr.
Greenfield, IN 46140

Phone: (317) 359-9528
Fax: (317) 866-8450
Web: www.vivolac.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

IDENTIFYING NAME: VIVOLAC DRI-SET BIOFLORA ABY 424
CODE: 2891252

EXPIRATION DATE: October, 2013 (EXP. DATE 10/2013)
MANUFACTURE DATE: October, 2012 (MANUF. DATE 10/2012)

MANUFACTURER: VIVOLAC CULTURES CORPORATION
COUNTRY OF ORIGIN: United States of America

PRODUCT DESCRIPTION: Vivolac DRI-SET BIOFLORA ABY 424 cultures are for direct-vat inoculation of milk for production of yogurt, ice cream, or cultured milk. These cultures are freeze-dried concentrated mixtures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium ssp.* lactic acid bacteria. The bacteria and the contents of this culture are not genetically modified (GMO free).

INGREDIENTS: Lactic Acid Bacteria in the following proportions:

<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10%
<i>Streptococcus thermophilus</i>	70%
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10%
<i>Bifidobacterium ssp.</i>	10%
Total	100%

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS:

Total Lactic Count	>1.0 x 10 ¹⁰ CFU/gm
Coliform:	<1 / gram
E. coli:	NEGATIVE
Salmonella:	NEGATIVE
Staphylococcus (Coagulase +):	NEGATIVE
Yeast and Mold:	<10 / gram

OTHER REQUIREMENTS: Culture Activity Test (In steamed 10% NFDM)
6.75 hours to pH 4.5±0.1 at 40.5°C.

STORAGE TEMPERATURE AND SHELF LIFE UNDER OPTIMAL CONDITIONS:

Shelf life:	12 months at -18 °C
	6 months at 0 °C

SHIPPING/STORAGE CONSIDERATIONS:

Shipping:	Cultures shipped in styrofoam containers.
Culture Container:	Approved FDA foil laminate pouches.

Analysis certified by: _____ Date October 18, 2012

This information, results, reports, and/or interpretation is/are believed to be accurate and offered toward a better understanding of products or services for the benefit and knowledge to other entities. Vivolac/Lyoferm does not assume any liability or risk involved in the use of its products since the conditions of use are beyond our control. Nothing contained herein shall constitute an expressed or implied guarantee or warranty with respect to Vivolac/Lyoferm products or their use. Statements concerning possible use of Vivolac/Lyoferm products are not to be construed as a recommendation for any use which would violate any patent rights, regulations or statutory restrictions. This information, results, reports, and/or interpretation is a general description or guideline of processes and procedures for application of products and are not intended to suggest, recommend or guarantee a procedure or result of processing which may vary considerably.

ANEXO III

Cartilla para la prueba de preferencia

Ud. Es parte de un panel sensorial que evaluará el sabor de una nueva bebida elaborada a partir de quinua. Por favor complete sus datos y responda la pregunta.

Nombre: Fecha:

¿Cuál de las muestras prefiere usted?

A	B	C
---	---	---

Comentarios:

Marque con una "X" su respuesta.

Gracias por su participación.

ANEXO IV-A: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CUANTIFICACION DE LA ACIDEZ

Con los datos de acidez expresada en ácido láctico, obtenidos de la tabla 12 se construyó la siguiente tabla:

Tabla.- Variación en la concentración de ácido láctico, expresado en porcentaje de ácido láctico. (Después de la fermentación- Antes de la fermentación), para todos los tratamientos.

	Tiempo de fermentación											
	8 horas de fermentación				10 horas de fermentación				12 horas de fermentación			
Concen - tración de probióticos	10%	5%	1%	0%	10%	5%	1%	0%	10%	5%	1%	0%
R1	0.1599801 4	0.1712093	0.1307547	0	0.22500	0.22589	0.15708	0.00150	0.20618	0.22223	0.22255	0.00000
R2	0.14875	0.16419512	0.1297358	-0.015713	0.19970	0.20399	0.14303	0.02143	0.22108	0.22941	0.24706	-0.00300
R3	0.1383116 9	0.16	0.1227273	-0.017308	0.24424	0.21275	0.15617	0.10986	0.21541	0.25691	0.24095	0.07623
Promedio	0.14901	0.16513	0.12774	-0.01101	0.22298	0.21421	0.15209	0.04426	0.21422	0.23618	0.23685	0.02441
Suma de trata - mientos	0.44704	0.49540	0.38322	-0.03302	0.66894	0.64262	0.45627	0.13279	0.64267	0.70855	0.71055	0.07323

$$Promedio\ total = \frac{5.32827}{36} = 0.148007$$

$$Suma\ de\ Cuadrados = 1.04861$$

El modelo estadístico es un experimento factorial 3Ax4B, conducido en Diseño Completo al Azar (DCA)

Donde:

A: Tiempo de fermentación

B: Concentración de microorganismos probióticos

El modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Producción de ácido láctico en porcentaje de ácido láctico, sujeto al i-ésimo tiempo de fermentación y la j-ésima concentración de probióticos.

μ = Efecto de la media general

α_i = Efecto del i-ésimo tiempo de fermentación

β_j = Efecto de la j-ésima concentración de probióticos

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el tiempo de fermentación y la concentración de probióticos.

E_{ijk} = Efecto del error experimental del i-ésimo tiempo de fermentación y la j-ésima concentración de probióticos, con "k" repeticiones.

$i = 1,2,3$

$j = 1,2,3,4$

$k = 1,2,3$

Se construyó el cuadro de totales:

	A1	A2	A3	TOTALES
B1	0.44704 (3)	0.66894(3)	0.64267 (3)	1.75865
B2	0.49540 (3)	0.64262 (3)	0.70855 (3)	1.84658
B3	0.38322 (3)	0.45627 (3)	0.71055 (3)	1.55004
B4	-0.03302 (3)	0.13279 (3)	0.07323 (3)	0.17300
TOTALES	1.2926	1.9006	2.1350	5.32827

Y a continuación, las sumas de cuadrados para el Análisis de Varianza (ANVA):

$$\begin{aligned} \text{Suma de cuadrados "A"} &= \frac{(1.2926)^2}{12} + \frac{(1.9006)^2}{12} + \frac{(2.1350)^2}{12} - \frac{(5.32827)^2}{36} \\ &= 0.031504599 \end{aligned}$$

Suma de cuadrados "B"

$$\begin{aligned} &= \frac{(1.75865)^2}{9} + \frac{(1.84658)^2}{9} + \frac{(1.55004)^2}{9} + \frac{(0.17300)^2}{9} - \frac{(5.32827)^2}{36} \\ &= 0.2041821 \end{aligned}$$

Suma combinada de cuadrados A * B

$$= \frac{(0.447041)^2}{3} + \frac{(0.49540)^2}{3} + \frac{(0.38322)^2}{3} + \frac{(-0.03302)^2}{3} + \frac{(0.66894)^2}{3} \\ + \frac{(0.64262)^2}{3} + \frac{(0.45627)^2}{3} + \frac{(0.13279)^2}{3} + \frac{(0.64267)^2}{3} + \frac{(0.70855)^2}{3} \\ + \frac{(0.71055)^2}{3} + \frac{(0.07323)^2}{3} - \frac{(5.32827)^2}{36} = 0.246307$$

Suma de cuadrados A * B = 0.246307 – 0.031504599 – 0.204182 = 0.0106208

$$\text{Suma de cuadrados total} = 1.04861 - \frac{(5.32827)^2}{36} = 0.259988$$

Asumiendo $\alpha=0.05$, se construyó el cuadro ANVA:

F.V	G.L	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F.cal	F. tab	Significancia
A	2	0.0315042	0.015752	27.63392	3.4	*
B	3	0.2041821	0.068061	119.3991	3.01	**
A*B	6	0.0106208	0.00177	3.105352	2.51	*
Error	24	0.0136806	0.00057			
Total	35	0.2599877				

Se observa que para todos los casos, $F_{cal} > F_{tab}$, por lo tanto, se demuestra que tanto el factor A, el factor B, y ambos combinados (A*B) ejercen efectos significativos sobre las muestras. Se observa que es el factor B el que más influye.

Como la interacción de ambos factores resultó significativa, se hizo una prueba de comparación para efectos principales. Posteriormente se realizó la prueba para efectos simples.

a) Se probó si la producción de ácido láctico para 10 horas de fermentación es diferente que la de 8 horas de fermentación:

i) $H_0: \mu_{2j} = \mu_{1j}$

$H_1: \mu_{2j} \neq \mu_{1j}$

ii) $\alpha = 0.05$

$$iii) ALS(T) = AES(0.05; 12; 24) * \sqrt{\frac{cme}{q * r}} = 5.1 * \sqrt{\frac{0.00057}{4 * 3}} = 0.035149324$$

$$iv) |\overline{Y_{2j}} - \overline{Y_{1j}}| = 0.18052 - 0.10772 = 0.0728$$

$$v) 0.0728 > 0.03514$$

Por tanto, se rechaza H_0 . Se concluye que la fermentación de 10 horas es diferente a la de 8 horas. Además, observando el cuadro de totales se concluye que la fermentación de 10 horas es mayor a la de 8 horas.

b) Se probó si la producción de ácido láctico para 12 horas de fermentación es mayor que la de 10 horas de fermentación.

$$i) H_0: \mu_{3j} = \mu_{2j}$$

$$H_1: \mu_{3j} \neq \mu_{2j}$$

$$ii) \alpha = 0.05$$

$$iii) ALS(T) = AES(0.05; 12; 24) * \sqrt{\frac{cme}{q * r}} = 5.1 * \sqrt{\frac{0.00057}{4 * 3}} = 0.0351493$$

$$iv) |\overline{Y_{3j}} - \overline{Y_{2j}}| = 0.17792 - 0.18052 = 0.0026$$

$$v) 0.0026 < 0.03514$$

Por tanto, se acepta H_0 . Se concluye que no existen diferencias significativas en la producción de ácido láctico entre la fermentación de 10 horas y la de 12 horas.

Al no existir diferencias significativas entre la fermentación de 10 horas y la de 12 horas, se prefiere utilizar la fermentación de 10 horas, ya que resulta menos costoso económicamente hablando.

Las siguientes pruebas de comparación para efectos simples se hicieron basadas en la fermentación de 10 horas.

Antes de realizar las pruebas de comparación para efectos simples se construye el cuadro de promedios:

	A1	A2	A3	Promedio
B1	0.14901	0.22298	0.21422	0.19541
B2	0.16513	0.21421	0.23618	0.20518
B3	0.12774	0.15209	0.23685	0.17223
B4	-0.01101	0.04426	0.02441	0.01922
Promedio	0.10772	0.15838	0.17792	

c) Se probó si la producción de ácido láctico para el tratamiento al 10% de probióticos es mayor que la de 5%, para una fermentación de 10 horas:

Primero se debe realizar el ANVA de efectos simples:

$$SC(Ab1) = \frac{0.44704^2}{3} + \frac{0.66894^2}{3} + \frac{0.64267^2}{3} - \frac{1.75865^2}{9} = 0.0098$$

$$SC(Ab2) = \frac{0.4954^2}{3} + \frac{0.64262^2}{3} + \frac{0.70855^2}{3} - \frac{1.84658^2}{9} = 0.007939$$

$$SC(Ab3) = \frac{0.38322^2}{3} + \frac{0.45627^2}{3} + \frac{0.71055^2}{3} - \frac{1.55004^2}{9} = 0.019683$$

$$SC(Ab4) = \frac{(-0.03302)^2}{3} + \frac{0.13279^2}{3} + \frac{0.07323^2}{3} - \frac{0.17300^2}{9} = 0.004703$$

$$SC(Ba1) = \frac{0.44704^2}{3} + \frac{0.49540^2}{3} + \frac{0.38322^2}{3} + \frac{(0.03302)^2}{3} - \frac{1.2926^2}{12} = 0.58496$$

$$SC(Ba2) = \frac{0.66894^2}{3} + \frac{0.64262^2}{3} + \frac{0.45627^2}{3} + \frac{0.13279^2}{3} - \frac{1.9006^2}{12} = 0.061056$$

$$SC(Ba3) = \frac{0.64267^2}{3} + \frac{0.70855^2}{3} + \frac{0.71055^2}{3} + \frac{0.07323^2}{3} - \frac{2.1350^2}{12} = 0.095251$$

Luego, se arma el ANVA para efectos simples:

FV	GL	SC	C.MEDIO	F.CAL	F.TAB	SIGNIFICANCIA
Ab1	2	0.009799827	0.0049	8.595934	3.4	*
Ab2	2	0.007939009	0.00397	6.963714	3.4	*
Ab3	2	0.019682885	0.009841	17.26487	3.4	*
Ab4	2	0.004703241	0.002352	4.125455	3.4	*
Ba1	3	0.058495525	0.019499	34.2063	3.01	**
Ba2	3	0.061056438	0.020352	35.70384	3.01	**
Ba3	3	0.095250954	0.03175	55.69969	3.01	**
ERROR	24	0.013680645	0.00057			

Como todas las interacciones resultaron significativas, se realizó la prueba de Tukey para comparar la concentración de microorganismos probióticos, considerando un tiempo de fermentación de 10 horas.

$$i) \quad \begin{array}{lll} H_0: \mu_{21} = \mu_{22} & H_0: \mu_{21} = \mu_{23} & H_0: \mu_{21} = \mu_{24} \\ H_1: \mu_{21} \neq \mu_{22} & H_1: \mu_{21} \neq \mu_{23} & H_1: \mu_{21} \neq 4 \end{array}$$

$$\begin{array}{lll} H_0: \mu_{22} = \mu_{23} & H_0: \mu_{22} = \mu_{24} & H_0: \mu_{23} = \mu_{24} \\ H_1: \mu_{22} \neq \mu_{23} & H_1: \mu_{22} \neq \mu_{24} & H_1: \mu_{23} \neq \mu_{24} \end{array}$$

$$ii) \quad \alpha = 0.05$$

$$iii) \quad ALS(T) = AES(0.05; 4; 24) * \sqrt{\frac{cme}{q * r}} = 3.9 * \sqrt{\frac{0.00057}{3}} = 0.05375779$$

$$iv) \quad |\bar{Y}_{21} - \bar{Y}_{22}| = 0.22298 - 0.21421 = 0.00877 < 0.05375779 \quad \text{NS}$$

$$|\bar{Y}_{21} - \bar{Y}_{23}| = 0.22298 - 0.15209 = 0.07089 > 0.05375779 \quad *$$

$$|\bar{Y}_{21} - \bar{Y}_{24}| = 0.22298 - 0.04426 = 0.17872 > 0.05375779 \quad *$$

$$|\overline{Y}_{22} - \overline{Y}_{23}| = 0.21421 - 0.15209 = 0.06212 > 0.05375779 *$$

$$|\overline{Y}_{22} - \overline{Y}_{24}| = 0.21421 - 0.04426 = 0.16995 > 0.05375779 *$$

$$|\overline{Y}_{23} - \overline{Y}_{24}| = 0.15209 - 0.04426 = 0.10783 > 0.05375779 *$$

$$v) 0.00877 < 0.05375779$$

Se concluye que no existen diferencias significativas entre la concentración de probióticos al 5% y al 10%, para un tiempo de fermentación de 10 horas. Además, sí existen diferencias significativas entre todas las demás concentraciones de probióticos, para 10 horas de fermentación.

Esto significa que se produce la misma cantidad de ácido láctico si se inoculan microorganismos probióticos en una concentración de 5% o de 10%. Observando los promedios de los demás tratamientos, es posible determinar que los tratamientos de 10% y 5% son los que más ácido láctico producen.

En este sentido, se prefiere utilizar la concentración de 10%, porque una población inicial de 10% tendrá un crecimiento más acelerado que una de 5%. De esta manera, los patógenos serán inhibidos por el ácido láctico generado, más rápidamente que si se usara el inóculo de 5%. Como medida preventiva para asegurar la inocuidad del producto, la elección del inóculo de 10% es crucial.

En conclusión, el mejor tratamiento es el de 10 horas de fermentación y una concentración de probióticos del 10%.

ANEXO IV-B: ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CUANTIFICACION DE LOS AZÚCARES REDUCTORES

Con los datos de concentración de azúcares reductores se construyó la siguiente tabla:

Fermentación de 8 horas								
	Inicial				Final			
	10%	5%	1%	0%	10%	5%	1%	0%
R1	10.11	12.84	12.46	14.78	10.61	13.50	13.04	13.85
R2	12.12	13.00	13.68	14.93	13.24	13.45	14.06	14.23
R3	13.10	12.65	13.77	14.53	12.42	12.63	13.76	14.44

$$\text{Promedio total} = \frac{334.62}{24} = 13.9425$$

$$\text{Suma de Cuadrados} = 4223.773$$

El modelo estadístico es un experimento factorial 2Ax4B, conducido en Diseño Completo al Azar (DCA)

Donde:

A: Tiempo de fermentación

B: Concentración de microorganismos probióticos

El modelo aditivo lineal es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Concentración de azúcares reductores, sujeto al i-ésimo tiempo de fermentación y la j-ésima concentración de probióticos.

μ = Efecto de la media general

α_i = Efecto del i-ésimo tiempo de fermentación

β_j = Efecto de la j-ésima concentración de probióticos

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el tiempo de fermentación y la concentración de probióticos.

ε_{ijk} = Efecto del error experimental del i-ésimo tiempo de fermentación y la j-ésima concentración de probióticos, con “k” repeticiones.

$$i = 1,2$$

$$j = 1,2,3,4$$

$$k = 1,2,3$$

Se construyó el cuadro de totales:

	A1	A2	TOTALES
B1	35.34 (3)	36.30(3)	71.64 (6)
B2	38.49 (3)	39.60 (3)	78.09 (6)
B3	39.93 (3)	40.89 (3)	80.82 (6)
B4	44.25 (3)	42.54 (3)	86.79 (6)
TOTALES	158.01 (12)	152.33 (12)	317.34 (24)

Y a continuación, las sumas de cuadrados para el Análisis de Varianza (ANVA):

$$\text{Suma de cuadrados "A"} = \frac{(158.01)^2}{12} + \frac{(152.33)^2}{12} - \frac{(317.34)^2}{24} = 0.0726$$

$$\begin{aligned} \text{Suma de cuadrados "B"} &= \frac{(71.64)^2}{6} + \frac{(78.09)^2}{6} + \frac{(80.82)^2}{6} + \frac{(86.79)^2}{6} - \frac{(317.34)^2}{24} \\ &= 19.75755 \end{aligned}$$

*Suma combinada de cuadrados A * B*

$$\begin{aligned} &= \frac{(35.34)^2}{3} + \frac{(38.49)^2}{3} + \frac{(39.93)^2}{3} + \frac{(44.25)^2}{3} + \frac{(36.304)^2}{3} + \frac{(39.60)^2}{3} \\ &+ \frac{(40.89)^2}{3} + \frac{(42.54)^2}{3} - \frac{(317.34)^2}{24} = 20.75745 \end{aligned}$$

$$\text{Suma de cuadrados A * B} = 20.75745 - 0.0726 - 19.75755 = 0.9273$$

$$\text{Suma de cuadrados total} = 4223.773 - \frac{(317.34)^2}{24} = 27.74485$$

Asumiendo $\alpha=0.05$, se construyó el cuadro ANVA:

F.V	G.L	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F.cal	F. tab	Significancia
A	1	0.0726	0.0726	0.166	4.49	NS
B	3	19.75755	6.58585	15.0805	3.239	**
A*B	3	0.9273	0.3091	0.7077	3.239	NS
Error	16	6.9874	0.4367125			
Total	23	27.74485	---			

El factor A no resultó significativo, lo que significa que no existen diferencias significativas en la concentración de azúcares reductores entre la fermentación a las 0 horas y a las 8 horas.

$$i) H_0: \mu_{1j} = \mu_{2j}$$

$$H_1: \mu_{2j} \neq \mu_{1j}$$

$$ii) \alpha = 0.05$$

$$iii) ALS(T) = AES(0.05; 12; 16) * \sqrt{\frac{cme}{q * r}} = 4.90 * \sqrt{\frac{0.4367125}{4 * 3}} = 0.934766$$

$$iv) |\overline{Y_{1j}} - \overline{Y_{2j}}| = 13.1675 - 13.2775 = 0.11$$

$$v) 0.11 < 0.934766$$

Por tanto, se acepta H_0 . Se concluye que la concentración de azúcares reductores es igual a las 0 horas de fermentación como a las 8 horas de fermentación

ANEXO V

Resultados del Análisis Proximal



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos

INFORME DE ENSAYOS

N° 004087 - 2013

SOLICITANTE : CAROLINA HUAPAYA CASTILLO
 DIRECCIÓN LEGAL : MZ. 19C LT. 21 COMITE 16 SEGUNDA ZONA NICOLAS DE PIEROLA - CHOSICA
 RUC: --- Teléfono: 995546252
 PRODUCTO : BEBIDA PROBIOTICA DE QUINUA
 NÚMERO DE MUESTRAS : Uno
 IDENTIFICACIÓN/MTRA. : FP: 28/05
 CANTIDAD RECIBIDA : 1,4 kg (+ envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
 MARCA(S) : S.M.
 FORMA DE PRESENTACIÓN : Envasado, la muestra ingresa en 2 botellas de vidrio selladas con 400 ml aprox.
 SOLICITUD DE SERVICIO : S/S N°EN-002334 -2013
 REFERENCIA : PERSONAL
 FECHA DE RECEPCIÓN : 28/05/2013
 ENSAYOS SOLICITADOS : FÍSICO/QUÍMICO
 PERÍODO DE CUSTODIA : No aplica

RESULTADOS :

ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :

ENSAYO	RESULTADOS
1.- Calorías (Kcal / 100 g de muestra original)	84,6
2.- Carbohidratos (g / 100 g de muestra original)	19,3
3.- Grasa(g / 100 g de muestra original)	0,2
4.- Humedad(g / 100 g de muestra original)	78,8
5.- Cenizas(g / 100 g de muestra original)	0,3
6.- Proteína(g / 100 g de muestra original) (Factor: 6,25)	1,4
7.- Fibra Cruda(g / 100 g de muestra original)	0,1
8.- % Kcal. proveniente de Grasa	2,1
9.- % Kcal. proveniente de Proteínas	6,6
10.- % Kcal. proveniente de Carbohidratos	91,3

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

- 1.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 2.- Por Diferencia MS-INN Collazos 1993
- 3.- AOAC 986.25 (B) Cap. 50 Ed. 18 Pág. 18 Revisión 4, 2011 2005
- 4.- AOAC 950.27 Cap. 29 Ed. 18 Pág. 6 Revisión 4, 2011 2005
- 5.- AOAC 923.03 Cap. 32 Ed. 18 Pág. 2 Revisión 4, 2011 2005
- 6.- AOAC 984.13 Cap. 32 Ed. 18 Pág. 14 Revisión 4, 2011 2005
- 7.- NTP 205.003 (Revisada el 2011) 1980
- 8.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 9.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993
- 10.- Por Cálculo MS-INN Collazos 1993

FECHA DE EJECUCIÓN DE ENSAYOS: Del 28/05/2013 Al 31/05/2013.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

CONTINÚA INFORME DE ENSAYOS N° 004087 - 2013

Pág 1/2



Av. La Universidad 595 La Molina Lima - Perú
 Telefaxes: (511) 3495640 - 3492507 - 3495794 - 3491066 - 3492191
 E-mail: calitot@infonegocio.net.pe / mktg@lamolina.edu.pe
 Página Web: www.lamolina.edu.pe/calidadtotal



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos

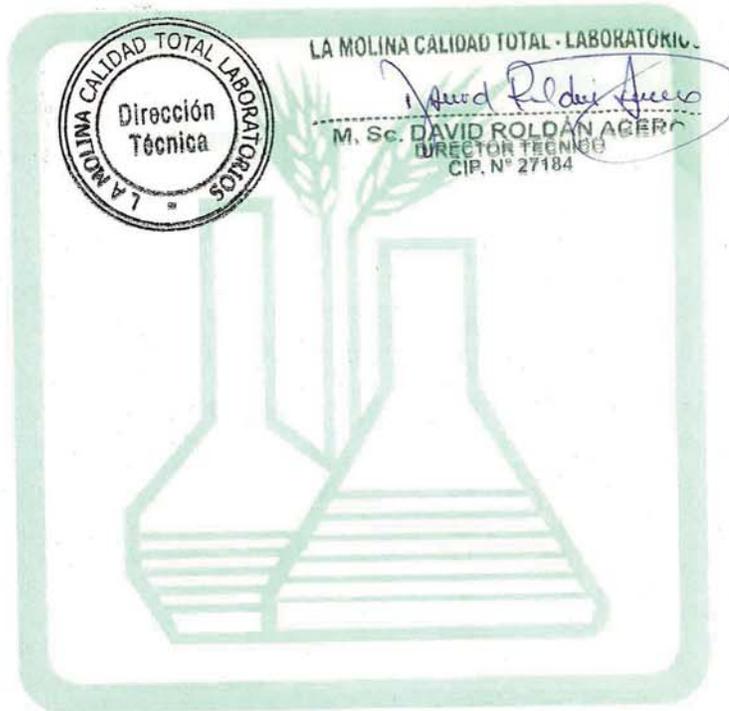
INFORME DE ENSAYOS

N° 004087 - 2013

ADVERTENCIA :

- 1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.
- 2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente Informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.
- 3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.
- 4.- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA

La Molina, 31 de Mayo de 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA



Av. La Universidad 595 La Molina Lima - Perú
Telefaxes: (511) 3495640 - 3492507 - 3495794 - 3491066 - 3492191
E-mail: calitot@infonegocio.net.pe / mktg@lamolina.edu.pe
Página Web: www.lamolina.edu.pe/calidadtotal

ANEXO VI

Resultados de los Análisis Microbiológicos



RESULTADO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Muestra: Bebida probiótica de Quinua

Fecha de análisis: 28/05/13

Responsable de análisis: Carolina Huapaya Castillo

Análisis	Dilución						Recuento total
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Bacterias aerobias mesófilas totales	>300 UFC	115 UFC	1.15* 10 ⁸ UFC/ml				
Coliformes totales	0 UFC						< 3 UFC/ml
Mohos y levaduras	0 UFC						< 3 UFC/ml
Lactobacillus spp	>300 UFC	62.5 UFC	6.25* 10 ⁷ UFC/ml				

* Determinación de bacterias aerobias mesófilas totales por recuento directo en Agar Plate Count

* Determinación de Coliformes totales por Recuento directo en placa en Agar VRB

* Determinación de mohos y levaduras por recuento directo en placa en Agar Sabouraud

* Determinación de Lactobacillus spp. Por recuento directo en placa en Agar MRS

Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos (DIGESA,2001).



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
LABORATORIO DE BIORREMEDIACIÓN B-2

RESULTADO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Muestra: Bebida probiótica de Quinua

Fecha de análisis: 10/06/13

Responsable de análisis: Carolina Huapaya Castillo

Análisis	Dilución						Recuento total
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	
Bacterias aerobias mesófilas totales	>300 UFC	>300 UFC	>300 UFC	>300 UFC	79.5 UFC	8 UFC	7.95* 10 ⁶ UFC/ml
Coliformes totales	0 UFC						< 3 UFC/ml
Mohos y levaduras	0 UFC						< 3 UFC/ml
Lactobacillus spp	>300 UFC	>300 UFC	>300 UFC	>300 UFC	39 UFC	-----	3.9* 10 ⁶ UFC/ml

* Determinación de bacterias aerobias mesófilas totales por recuento directo en Agar Plate Count

* Determinación de Coliformes totales por Recuento directo en placa en Agar VRB

* Determinación de mohos y levaduras por recuento directo en placa en Agar Sabouraud

* Determinación de Lactobacillus spp. Por recuento directo en placa en Agar MRS

Manual de Análisis Microbiológico de Alimentos (DIGESA,2001).

ANEXO VII-A: MÉTODO DE MILLER (Gutiérrez-Correa, 2010)

Preparación Reactivo de Miller: (100ml)

1) Mezclar:

Ácido 3,5-dinitrosalicílico 0.7175g

NaOH 1.3983g

Agua destilada csp. 100ml

2) Disolver la mezcla anterior y agregar:

Tartrato de sodio y potasio 21.6101g

Metabisulfito de sodio 0.5861g

Fenol (disuelto a 50°C) 0.5367ml

Preparación Tampón acetato 50mM, pH 4.8

1) Mezclar:

Acetato de sodio anhidro 2.1453

Ácido acético glacial 1.4323ml

Agua destilada 900ml

Ajustar con NaOH 4M.

Preparación Estándar de Glucosa (1mg/ml):

1) Mezclar:

Glucosa anhidra 50 mg

Tampón acetato 50mM pH 4.8 50ml

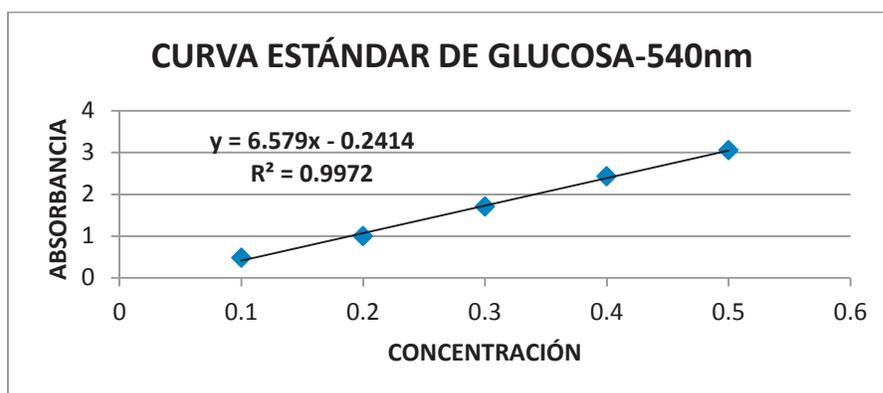
REACTIVOS	BR	1	2	3	4	5
Solución Estándar de glucosa (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Tampón acetato pH 4.8 50mM (ml)	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1
Concentración final de glucosa mg/ml	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Reactivo DNS (ml)	3	3	3	3	3	3
Colocar en baño de agua hirviente durante 5 minutos e inmediatamente enfriar los tubos en baño de agua corriente						
Agua destilada	5	5	5	5	5	5
- Mezclar bien los tubos y leer en el espectrofotómetro a 540nm contra el blanco de reactivo						
- Graficar absorbancia (Y) vs [glucosa] (X). Hacer también regresión lineal ($Y=a+bX$), la cual se utilizará para los cálculos de concentración de azúcares.						

Curva estándar de glucosa:

Los resultados de la curva estándar de glucosa son los siguientes:

Concentración	R1	R2	Absorbancia
0.1	0.559	0.399	0.479
0.2	0.99	1.009	0.9995
0.3	1.693	1.708	1.7005
0.4	2.391	2.466	2.4285
0.5	3.077	3.031	3.054

El gráfico y la ecuación de regresión lineal:



Para la determinación de azúcares reductores en los diferentes tratamientos, se siguió en siguiente protocolo:

REACTIVOS	BR	Muestra
Tampón acetato pH 4.8 50mM (ml)	1.5	1
Muestra	-	0.5
Reactivo DNS (ml)	3	3
Colocar en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente enfriar los tubos en baño de agua corriente.		
Agua destilada	5	5

La lectura registrada por el espectrofotómetro, fue reemplazada en la ecuación:

$$Y = 6.579X - 0.2414$$

Donde : Y= Absorbancia
X= concentración de azúcares reductores

Luego, el resultado fue multiplicado por 100 (Puesto que se midieron las diluciones 10^{-2}). El resultado final expresa la concentración de azúcares en mg/ml.

ANEXO VII-B: DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TOTAL EXPRESADA EN ÁCIDO LÁCTICO (Chacón, 2006)

La cuantificación del ácido láctico se hace posible por titulación simple con NaOH 0.1M. (Chacón, 2006). La ecuación es:

$$\% \text{ Ác. Láctico} = \frac{\text{ml NaOH } 0.1M * 0.009 * 100}{\text{gramos de muestra}}$$

Esta ecuación está diseñada para expresar el ácido láctico como una fracción porcentual del total de una muestra en gramos. Para esta investigación en particular, se reemplazará “gramos de muestra” por “ml de muestra”, de manera que el porcentaje de ácido láctico será en volumen/volumen (v/v). Por tanto, la ecuación sería:

$$\% \text{ Ác. Láctico} = \frac{\text{ml NaOH } 0.1M * 0.009 * 100}{\text{ml de muestra}}$$

ANEXO VIII: MEDICIONES PREVIAS PARA ESTIMAR EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN

a) Prueba para un tiempo de fermentación de 2 horas:

Tratamiento	pH antes de la fermentación	pH después de la fermentación
Control R1	5.55	5.50
Control R2	5.53	5.49
Control R3	5.55	5.49
Probióticos al 10% (R1)	5.54	5.44
Probióticos al 10% (R2)	5.51	5.38
Probióticos al 10% (R3)	5.52	5.41

b) Prueba para un tiempo de fermentación de 4 horas:

Tratamiento	pH antes de la fermentación	pH después de la fermentación
Control R1	5.49	5.45
Control R2	5.46	5.38
Control R3	5.46	5.40
Probióticos al 10% (R1)	5.35	5.19
Probióticos al 10% (R2)	5.54	5.29
Probióticos al 10% (R3)	5.39	5.17

c) Prueba para un tiempo de fermentación de 6 horas:

Tratamiento	pH antes de la fermentación	pH después de la fermentación
Control R1	5.80	5.86
Control R2	5.78	5.96
Control R3	5.82	5.93
Probióticos al 10% (R1)	5.70	5.12
Probióticos al 10% (R2)	5.68	4.86
Probióticos al 10% (R3)	5.75	4.93

d) Prueba para un tiempo de fermentación de 7 horas:

Tratamiento	pH antes de la fermentación	pH después de la fermentación
Control R1	6.59	6.52
Control R2	6.52	6.46
Control R3	6.46	6.48
Probióticos al 10% (R1)	6.44	4.28
Probióticos al 10% (R2)	6.42	4.27
Probióticos al 10% (R3)	6.47	4.47

A partir de estos resultados se determinó que el pH empieza a disminuir recién a partir de las 6 horas. Por tanto, se decidió probar tres tiempos de fermentación: 8, 10 y 12 horas.

ANEXO IX: ENSAYOS PREVIOS PARA DETERMINAR EL EDULCORANTE A UTILIZAR EN LA FORMULACIÓN DE LA BEBIDA DE QUINUA

La bebida probiótica de quinua fue formulada con dos edulcorantes: Stevia y miel de abeja. La bebida así formulada, se dio a probar a un panel de 6 personas, a fin de determinar cuál de los edulcorantes era de mayor agrado. Cada panelista emitió su opinión respecto a cuál prefería.

Los resultados indican que la miel de abeja es preferida sobre el edulcorante Stevia. Adicionalmente, los panelistas comentaron que el edulcorante Stevia confería un sabor artificial no agradable a la bebida probiótica de quinua.

Panel de degustación	Bebida endulzada con Stevia	Bebida endulzada con miel de abeja y algarrobina
Panelista 1		X
Panelista 2		X
Panelista 3		X
Panelista 4		X
Panelista 5		X
Panelista 6		X

ANEXO X: FOTOS

Figura 1.- Pesaje de la harina de quinua. 12.5g por botella



Figura 2.- a) Gelatinización de la harina de quinua cuando no se agrega la enzima α -amilasa. b) Se observa que la masa formada es compacta. c) Harina de quinua gelatinizada, aparentemente no hay diferencia, pero la masa formada es compacta.



Figura 3.- Observación de la muestra en el brixómetro. Marca 10°Brix.

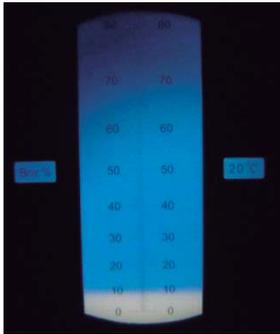


Figura 4.- Reactivo de Miller guardado en frasco oscuro



Figura 5.- Material preparado para ser autoclavado.



Figura 6.- Tesista realizando las diluciones de la muestra para el posterior análisis de azúcares reductores



Figura 7.- A: Tubos de ensayo conteniendo la muestra y el reactivo de Miller, llevados a ebullición durante 5 minutos. B: Las canicas se utilizan para evitar la evaporación. Obsérvese la diferencia del Blanco de Reactivo (amarillo más claro) y los demás tubos.

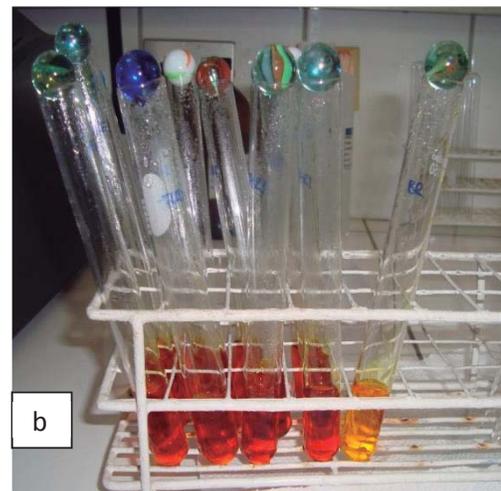
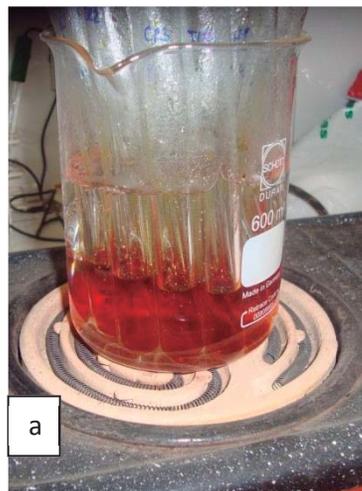


Figura 8.- Medición del pH con el potenciómetro.



Figura 9.- A: Bebida de quinua en tres diferentes sabores.
B: Degustación de la bebida de quinua por dos personas.



Figura 10.- Separación de la muestra (bebida de quinua) en dos fases, después de la centrifugación

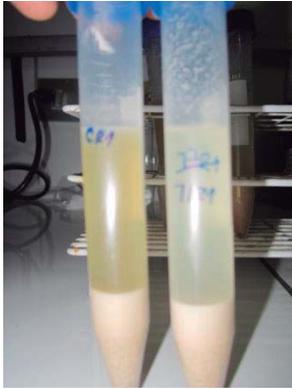


Figura 11.- Preparación de la muestra antes de ser incubada en la estufa a 42°C. Cierre hermético y con una bolsa encima que proteja del contacto con el ambiente.



Figura 12.- Muestras siendo incubadas en la estufa, a 42.5°C, por 8, 10 y 12 horas.



Figura 13.- Crecimiento de bacterias aerobias provenientes de las bebida de quinua, en agar Plate Count

Figura 14.- Crecimiento de *Lactobacillus*, provenientes de la bebida de quinua, en agar MRS.



Figura 15.- Crecimiento de *Lactobacillus*, provenientes de la bebida de quinua, en agar MRS. Obsérvense las colonias.



Figura 16.- Observación al microscopio de las colonias crecidas en agar MRS, de la figura 15. Previa tinción con cristal violeta. Son cadenas de bacilos.

