

**Formulación de una bebida de agua de coco
(*Cocos nucifera*) fermentada por *Lactobacillus
plantarum* BG112 adicionada con inulina de
*Agave tequilana***

Yolanda Graciela Kiesling Altún

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Formulación de una bebida de agua de coco
(*Cocos nucifera*) fermentada por *Lactobacillus
plantarum* BG112 adicionada con inulina de
*Agave tequilana***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Yolanda Graciela Kiesling Altún

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Formulación de una bebida de agua de coco (*Cocos nucifera*) fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG112 adicionada con inulina de *Agave tequilana*

Yolanda Graciela Kiesling Altun

Resumen. Los alimentos funcionales aportan beneficios fisiológicos a la salud. Las bebidas de origen vegetal son la nueva tendencia en la industria, por lo que se han desarrollado bebidas a partir de frutos secos, cereales y semillas. Los objetivos de este estudio fueron: formular una bebida a base de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG112 adicionada con inulina de *Agave tequilana* y evaluar la viabilidad del probiótico, determinar las características físico-químicas y sensoriales de la bebida. Para el proceso de optimización se utilizó la metodología superficie de respuesta con arreglo factorial 2×2. Como variables independientes temperatura (°C) en niveles 25, 35 y 45 y concentración de inulina (g/100 mL) en niveles 0, 2.5 y 5. Se fermentó el mejor tratamiento a 35 °C por 16 horas con una concentración de inulina de *Agave tequilana* de 1.25 g, posteriormente se almacenó a 4 °C por 30 días. Los parámetros físico-químicos (pH, acidez titulable, °brix, color), microbiológicos (viabilidad) y sensoriales (color, sabor, aroma y aceptación general) de la bebida fermentada se determinaron por duplicado a los días (0, 7, 15 y 30). Los resultados se evaluaron usando un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Al día 30 la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* fue de 8.79 log UFC/mL cumpliendo con el número de células viables para ser considerado un producto probiótico. En la prueba sensorial recibió un valor de 9 puntos en la escala hedónica (me gusta extremadamente).

Palabras clave: Alimentos funcionales, fermentación, prebiótico, probiótico y viabilidad.

Abstract. Functional foods provide physiological benefits to health. Plant-based beverages are the new trend at food industry; therefore, beverages have been developed from nuts, cereals and seeds. The objectives of this study were: to formulate a drink based on pasteurized coconut water and fermented by *Lactobacillus plantarum* BG112 added with *Agave tequilana* inulin and to evaluate the probiotic viability, and determine the physical-chemical and sensory beverage characteristics. For the optimization process, a factorial arrangement 2×2 was established. The independent variables used were; temperature (25, 35 and 45 °C) and inulin concentration (0, 2.5 and 5 g/100 mL). The best treatment was fermented at 35 °C for 16 hours with *Agave* inulin (1.25g), then it was stored at 4 °C for 30 days. Physical-chemical beverage parameters (pH, titratable acidity, °brix, color), microbiological (viability) and sensory (color, flavor, aroma and general acceptance) were determined in duplicate during 0, 7, 15 and 30 days Results were evaluate using a completely randomized design with measures repeated in the time. At 30th day a *Lactobacillus plantarum* viability was 8.79 log CFU/mL, fulfilled the number of viable cells to be consider a probiotic product. In the sensory test, it received a value of 9 points in the hedonic scale (I extremely like it).

Key words: Functional food, fermentation, prebiotic, probiotic and viability.

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Portadilla..... | i |
| Página de firmas..... | ii |
| Resumen..... | iii |
| Contenido..... | iv |
| Índice de Cuadros, Figuras y Anexos | v |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 3 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 8 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 18 |
| 5. RECOMENDACIONES..... | 19 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 20 |
| 7. ANEXOS | 23 |

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

| Cuadros | Página |
|--|--------|
| 1. Variables originales, codificadas y niveles descodificados del diseño experimental. | 5 |
| 2. Decodificación del diseño experimental del proceso de fermentación de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112 en agua de coco pasteurizada. | 6 |
| 3. Codificación, valores reales y respuesta obtenida por la aplicación del diseño central compuesto durante la fermentación por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 en la formulación de una bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada. | 8 |
| 4. Análisis de varianza de los parámetros cuantitativos y estimaciones para la respuesta de viabilidad celular de bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112. | 9 |
| 5. Análisis microbiológico. Viabilidad <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112. | 11 |
| 6. Análisis químico de pH de agua de coco pasteurizada y fermentada por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112. | 12 |
| 7. Análisis químico de Acidez titulable de agua de coco pasteurizada y fermentada por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112. | 13 |
| 8. Análisis químico de Brix° de agua de coco pasteurizada y fermentada por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112. | 13 |
| 9. Análisis químico, cuantificación de Ácido láctico de agua de coco pasteurizada y fermentada por <i>Lactobacillus plantarum</i> BG 112. | 14 |
| 10. Análisis químico de Color en la escala L* a* b*. | 15 |
| 11. Análisis sensorial. Atributos de color, sabor aroma y aceptación general, con una escala hedónica de nueve puntos. | 16 |
| | |
| Figuras | Página |
| 1. Efecto de las variables independientes: Temperatura y concentración de inulina en la viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 en agua de coco pasteurizada. | 10 |
| 2. Gráficos de la deseabilidad de viabilidad de la bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada. | 10 |

| Anexos | Página |
|---|--------|
| 1. Prueba de escala hedónica | 23 |
| Incubación de placas Petri, para determinar la viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 después de 48 horas de fermentación. | 24 |
| 2. Conteo de UFC después de 48 horas de fermentación bajo anaerobiosis. | 24 |
| 3. Distribución de los tratamientos para ser almacenados 30 días. | 25 |
| 4. UFC de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 a los 0 días de almacenamiento. | 25 |
| 5. UFC de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 a los 7 días de almacenamiento. | 26 |
| 6. UFC de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 a los 15 días de almacenamiento. | 26 |
| 7. UFC de <i>Lactobacillus plantarum</i> BG112 a los 30 días de almacenamiento. | 27 |
| Correlación entre análisis fisicoquímicos y microbiológicos durante los días en almacenamiento. | 27 |

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una importante demanda de los consumidores por productos libres de lactosa incrementando el consumo de alimentos veganos. La intolerancia a la lactosa es una reacción adversa del intestino delgado al carbohidrato más común afectando a personas de todas las edades. Consecuencia a la deficiencia de la lactasa a nivel de intestino delgado, enzima encargada de digerir el azúcar de la leche, que al no ser hidrolizada en glucosa y galactosa permanece intacta en el intestino grueso, siendo fermentada por bacterias lácticas produciendo ácido láctico y gases (Hansen 2015). Las tendencias actuales acerca de la alimentación en los últimos años referencian un interés por ciertos alimentos, que no solamente aporten un beneficio nutritivo, sino que también aporten beneficio para el correcto funcionamiento fisiológico del organismo humano. Es por ello que se busca desarrollar nuevos productos o adicionar ingredientes que permitan incrementar la composición nutricional en productos que ya están en el mercado.

Brasil es el cuarto productor a nivel mundial de coco, con una producción de aproximadamente 2.8 millones de toneladas, en un área corrida de 257 mil hectáreas de plantaciones, colocándolo en el escenario mundial de producción en comparación con otros países de América del Sur. La producción brasileña es responsable de más del 80% de la producción de coco, destacándose también en el área de cultivo y productividad de Latinoamérica (EMBRAPA 2014). La cocoicultura incrementa el empleo y los ingresos en el proceso de producción, logrando en las últimas décadas un escenario nacional de interés creciente por parte de los productores, por la cultura del cocotero enano orientado al mercado de agua de coco. El aumento significativo de demanda de agua de coco, es atribuido en parte al crecimiento del ingreso per capita y a un estilo de vida más saludable (Gutiérrez 2016).

Los probióticos son microorganismos vivos capaces de aportar beneficios para la salud del huésped (Dharmasena 2015). Han sido declarados diversos usos para los probióticos, la mayor parte de ellos referidos a salud intestinal: alivio de intolerancia a la lactosa y síndrome de colon irritable, prevención y reducción de diarreas, reducción de riesgos de cáncer intestinal, reducción del colesterol sanguíneo, estimulación de respuesta inmune e inhibición de patógenos del tracto gastrointestinal, entre otros (Ibañez *et al.* 2015). *Lactobacillus plantarum* es una especie de bacteria Gram-positiva, no patógena, heterofermentativa que es naturalmente encontrada en productos lácteos, carnes, vegetales además de residir en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales. Su uso como probiótico está bien demostrado en la reducción del dolor, distensión abdominal, flatulencias y en el tratamiento contra colon irritable.

Así mismo, se ha demostrado que su administración mejora la integridad del intestino y la actividad metabólica de las células intestinales a través de respuestas inmunológicas, reduciendo los síntomas gastrointestinales consecuentes del tratamiento con ciertos antibióticos (Infinity Pharma 2017).

Se han identificado alrededor de 36000 especies vegetales que poseen cierto contenido de inulina, la mayor producción de inulina a nivel mundial es la raíz de Achicoria (Lara 2017). Sin embargo, la inulina de *Agave tequilana* es un producto que además de tener las propiedades clásicas de las fibras alimentarias para regular el tránsito intestinal, contribuye a la mejor absorción del calcio, estimula la síntesis de vitaminas de complejo B, incrementa las defensas naturales de la flora intestinal (efecto bífido), previene el cáncer de colon, reduce el colesterol y los niveles de azúcar en sangre aportando un bajo contenido calórico (Ibañez *et al.* 2015). La inulina de *Agave* ha demostrado ser un prebiótico natural de alta solubilidad con incremento de la temperatura, en condiciones ambientales las soluciones de inulina de hasta 7.5% son completamente claras. La inulina de *Agave* es capaz de mejorar el equilibrio de la flora intestinal y estimular el crecimiento de bífido bacterias beneficiosas (Beneo 2013). El prebiótico antes descritos cumple con el concepto de alimento funcional, que son detallados como alimentos que pueden ser naturales, alimentos a los que se les ha adicionado o retirado algún componente y también a los que se les ha modificado la biodisponibilidad de alguno de ellos (Ibañez *et al.* 2015).

Debido a la importancia en ofrecer productos diferenciados orientados a individuos con restricciones en el consumo de lactosa se propuso abordar la formulación de un producto de agua de coco fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG112 adicionado con inulina de *Agave tequilana*. Planteándose los siguientes objetivos:

- Formular una bebida a base de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* adicionada con inulina de *agave tequilana*.
- Evaluar la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* BG112 adicionado con inulina de *Agave tequilana* en agua de coco pasteurizada y fermentada.
- Determinar las características físico-químicas y sensoriales de la formulación de la bebida.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El presente estudio se llevó a cabo en dos etapas las cuales realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos número 758 ubicado en el departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Estatal de Londrina localizada en Rod. Celso Garcia Cid, s/n - Campus Universitario, Londrina - PR, 86057-970. Los análisis de pH, acidez total y conteos microbiológicos se llevaron a cabo en el mismo laboratorio.

Materia prima.

Se utilizó agua de coco pasteurizada, cultivo liofilizado de *Lactobacillus plantarum* BG112, inulina de *Agave tequilana*, glicerol como crioprotector, sabor artificial de agua de coco y sacarosa.

Cultura bacteriana.

Para la fermentación de agua de coco se utilizó cultivo comercial liofilizado compuesto de linaje probiótico BG112 (donada por Sacco- Brasil). El contenido del 0.01% (m/v) del polvo liofilizado que contiene el linaje BG112 se vertió en agua de coco, que contiene 25.14% (v/v) de glicerol estéril y congelado. En el momento del uso fueron obtenidos pre-inóculos a través de dos activaciones y adaptación en agua de coco a 37 °C de 48-72 horas bajo condiciones anaeróbicas.

Agua de coco y fermentación.

El agua de coco natural se adquirió en el mercado de Londrina, PR-Brasil. La fermentación con el cultivo probiótico se realizó en 100 mL de agua de coco en frascos estériles de 250 mL añadidos de 0, 2.5 y 5 g de inulina de *agave tequilana* por porción de 100 mL y 1% (v/v) de inóculo, con conteo celular aproximadamente 10^9 UFC/mL incubándolo a 25 °C, 35 °C y 45 °C hasta pH 4.5 después de ese periodo para mayor aceptación sensorial se añadió el 3% (m/v) de sacarosa y 0.05% (v/v) de esencia artificial de coco (Camargo *et al.* 2015). La bebida fermentada se almacenó en refrigeración y fue sometida a análisis microbiológicos y fisicoquímicos con el fin de evaluar la estabilidad y viabilidad del probiótico a lo largo de 30 días de almacenamiento.

Efecto del almacenamiento en la viabilidad y características físicas y químicas de la bebida.

Después de la fermentación a 25, 35 y 45 °C, la mejor bebida en términos de conteos de probióticos fue almacenada a 4°C durante 30 días. Las alícuotas se retiraron para los análisis en los intervalos de tiempo 0, 7, 15 y 30 días, para la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* BG112, pH, acidez titulable total, sólidos solubles, color y los ácidos orgánicos (ácido láctico).

Viabilidad *Lactobacillus plantarum* BG112.

El recuento de células viables se realizó mediante la dilución en agua peptona 0.1% (m/v) estéril y posterior en la profundidad de agar de Man Rogosa Sharpe (MRS) se evaluó por duplicado mediante la técnica de vaciado en placa, seguidamente las muestras se incubaron en una incubadora a 37 °C durante 48 horas, Bajo condiciones anaerobias.

Potencial de hidrógeno (pH).

La determinación se realizó con la ayuda de un potenciómetro según el método 981.12 (AOAC 2006).

Acidez total titulable (ATT).

La acidez total titulable se realizó según el método 942.15 (AOAC 2006). Y los resultados fueron expresados en % de ácido láctico.

Color.

En la determinación de color, se utilizó colorímetro (Chrommetro CR-400 Sensing, Konica Minolta, Japón) operando en el sistema CIELab, previamente calibrado en superficie blanca.

Sólidos solubles (Brix°).

El contenido de sólidos solubles se determinó por lectura directa en refractómetro digital (PAL-BX / RI, ATAGO, JAPÓN) de acuerdo con el método 932.12 (AOAC 2006).

Cuantificación de ácidos orgánicos.

El sistema instrumental utilizado consistió en un cromatógrafo de fase líquida Shimadzu (Shimadzu corp, Kyoto, Japón) y los análisis de cada muestra se identificaron por comparación de tiempos de retención con los compuestos auténticos (pureza > 99%, para HPLC, Sigma- Aldrich). La integración de los picos cromatográficos se realizó con la ayuda del software LC Solutions (Shimadzu. Copr, Kyoto, Japon).

Ácidos orgánicos. En la determinación de ácido láctico, se utilizó la columna cromatográfica Shiseido PacCell Pak (5µ C 18 MG 250 x 4.6 mm). La fase móvil consistió

en una solución tampón fosfato de sodio 25mM, con pH ajustado a 2.4 en el caudal de 1ml/min. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el volumen de inyección en 20 µl. La detección se realizó simultáneamente en los detectores de índice de refracción (RID-10 A) Y arreglo de Fotodiodos, programado en longitud de onda de 215 nm y en el modo de barrido de 200 a 400 nm (SPU-M20A) (Reuter 2015).

Análisis sensorial.

La investigación se sometió a la evaluación por el Comité de Ética en investigación- CEP-UEL, posterior a la verificación de ausencia de patógenos se realizó la prueba sensorial. Se evaluó sensiblemente por 100 panelistas no entrenados usando una escala hedónica de nueve puntos en los siguientes atributos: color, sabor, olor y aceptación general. Los panelistas llenaron los términos de consentimiento libre y esclarecido antes de realizar el análisis del producto.

Análisis estadístico.

El experimento se realizó en dos etapas. En la primera etapa el diseño experimental utilizado fue un diseño factorial 2×2 con puntos centrales ($\alpha=\pm 1$) teniendo dos repeticiones en los puntos centrales, obteniendo 12 tratamientos con tres repeticiones, haciendo un total de 36 unidades experimentales. Se desarrolló este diseño ya que los puntos axiales en el centro de cada fase-centrada del espacio factorial requieren solamente tres niveles por cada factor (Rezazadeh *et al.* 2013). Las repeticiones en el punto central tienen el propósito de proporcionar una medida del error puro y estabilizar la varianza de la respuesta prevista. (Barros *et al.* 2010). En el cuadro 1 se presenta un resumen de los niveles descodificados de las variables independientes, junto a los niveles de variación (-1, 0 y +1). Los valores de temperatura y concentración de inulina de *Agave tequilana* se determinaron de acuerdo con pruebas preliminares siendo la temperatura el rango de 25 a 45 °C y la concentración de inulina de 0 a 5 g/100mL esto en base al volumen de porción para bebidas fermentadas o jugo de frutas (ANVISA 2003). El valor de pH final para la fermentación debía ser entre 4.5 ± 0.1 .

Cuadro 1. Variables originales, codificadas y niveles descodificados del diseño experimental.

| Variables originales | Variables codificadas | Niveles | | |
|--------------------------------|-----------------------|---------|-----|----|
| | | -1 | 0 | +1 |
| Temperatura | X ₁ | 25 | 35 | 45 |
| Concentración de inulina (m/v) | X ₂ | 0 | 2.5 | 5 |

Los tratamientos con sus respectivos niveles fueron descodificados de la siguiente forma: los puntos uno, dos, tres y cuatro fueron factoriales positivos y negativos, como los valores mínimos representados con el signo negativo y valores máximos con signo positivo.

Dos repeticiones en el punto central para demostrar la confiabilidad del experimento las cuales se pueden apreciar en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Decodificación del diseño experimental del proceso de fermentación de *Lactobacillus plantarum* BG 112 en agua de coco pasteurizada.

| Tratamientos | Variable codificadas (x_1, x_2) | | Variables decodificadas | |
|--------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| | Temperatura (°C) | Concentración de inulina (g/100mL) | Temperatura (°C) | Concentración de inulina (g/100mL) |
| 1 | -1 | -1 | 25 | 0 |
| 2 | -1 | 1 | 25 | 5 |
| 3 | 1 | -1 | 45 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | 45 | 5 |
| 5 | -1 | 0 | 25 | 2.5 |
| 6 | 1 | 0 | 45 | 2.5 |
| 7 | 0 | -1 | 35 | 0 |
| 8 | 0 | 1 | 35 | 5 |
| 9 | 0 | 0 | 35 | 2.5 |
| 10 | 0 | 0 | 35 | 2.5 |
| 11 | 0 | 0 | 35 | 2.5 |
| 12 | 0 | 0 | 35 | 2.5 |

Los datos experimentales fueron diseñados usando el software Statistica 10.0. (Ecuación 1). Se utilizó un modelo de regresión polinomial cuadrático completo para correlacionar los datos experimentales usando la ecuación: Y (viabilidad) referente a viabilidad (log UFC/mL).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^i \beta_i x_i + \sum_{i=1}^i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^i \sum_{j=i+1}^i \beta_{ij} x_j \quad [1]$$

Dónde:

Y es la variable respuesta de la viabilidad de células (UFC/mL⁻¹).

X₁, temperatura de fermentación.

X₂, concentración de inulina.

β₀ es el coeficiente de compensación.

β_i son los coeficientes lineales

β_{ii} son los coeficientes cuadráticos.

β_{ij} son los coeficientes de interacción (Wang *et al.* 2013).

Las ecuaciones polinomiales son establecidas para trazar superficies tridimensionales (3D) y bidimensionales (2D) con el fin de visualizar los efectos individuales e interactivos del proceso, cuando uno de los parámetros se fija en su punto óptimo. El impacto y significado

de cada uno de los términos (lineales, cuadráticos e interacciones) en la ecuación de regresión fue evaluado mediante un análisis de varianza (ANOVA).

En la segunda etapa se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con medidas repetidas en el tiempo. Se evaluó un tratamiento el cual fue la bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada. Se hicieron dos repeticiones y cuatro medidas en el tiempo, los días 0, 7, 15 y 30. Se usó separación de medias DUNCAN, con un alfa de 0.05 usando el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4) para los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y conteo de la viabilidad del *Lactobacillus plantarum* BG112. También se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) para analizar los datos del análisis sensorial se realizó una separación de medias de mínimos cuadrados con un alfa igual a 0.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir de los datos experimentales para la viabilidad celular Y (viabilidad) durante la fermentación de *Lactobacillus plantarum* BG112 se muestran en el cuadro 3. Los datos experimentales se utilizaron para desarrollar una regresión polinomial cuadrática con términos lineales y cuadráticos. Los modelos estadísticos matemáticos representan la función de respuesta equivalente a la ecuación 2. Los términos significativos al 5% se identifican con un asterisco (*).

$$Y \text{ (viabilidad)} = 8.595 - 1.737*x_1 - 2.334*x_1^2 - 0.3667*x_2 + 1.227x_2^2 - 0.704*x_1x_2 \quad [2]$$

Cuadro 3. Codificación, valores reales y respuesta obtenida por la aplicación del diseño central compuesto durante la fermentación por *Lactobacillus plantarum* BG112 en la formulación de una bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada.

| Temperatura (°C) x_1 | Concentración de inulina (g/100mL) x_2 | Viabilidad/ Y (viabilidad) (log UFC/mL) |
|---------------------------|---|--|
| 25 (-1) | 0 (-1) | 8.312 |
| 25 (-1) | 5 (1) | 8.398 |
| 45 (1) | 0 (-1) | 7.322 |
| 45 (1) | 5 (1) | 6.000 |
| 25 (-1) | 2.5 (0) | 8.301 |
| 45 (1) | 2.5 (0) | 6.478 |
| 35 (0) | 0 (-1) | 8.550 |
| 35 (0) | 5 (1) | 8.686 |
| 35 (0) | 2.5 (0) | 8.613 |
| 35 (0) | 2.5 (0) | 8.695 |
| 35 (0) | 2.5 (0) | 8.484 |
| 35 (0) | 2.5 (0) | 8.663 |

La ecuación 2 mostró que los valores de temperatura lineales y cuadráticos (X_1) fueron los únicos valores significativos ($P \leq 0.05$). En el cuadro 4 se observa que el valor lineal X_1 presentó una $P = 0.000182$ y el valor cuadrático una $P = 0.000253$, esto significa que hubo una optimización y la temperatura optima de conteo de células puede ser alcanzada cuando se emplean niveles óptimos de temperatura. Las interacciones de inulina (X_2) y la temperatura (X_1) fueron estadísticamente significativas con una $P = 0.004759$, esto significa que los efectos principales entre (X_1 , X_2) no pueden evaluarse por separado.

Cuadro 4. Análisis de varianza de los parámetros cuantitativos y estimaciones para la respuesta de viabilidad celular de bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG 112.

| Coefficientes | Probabilidad |
|--------------------------------|---------------------|
| X ₁ (L) | 0.000182* |
| X ₁ (C) | 0.000253* |
| X ₂ (L) | 0.016856* |
| X ₂ (C) | 0.359440 n.s. |
| X ₁ *X ₂ | 0.004759* |
| Falta de ajuste | 0.061959 n.s. |
| R ² | 0.976 |
| F. Calculado > F. tabular | 4.54 > 3.20 |

X₁: Temperatura (°C), X₂: Inulina (g), L: Lineal, C: Cuadrático, n.s.: No significativo
 *: Significancia una probabilidad < 0.05.

Todos los términos significativos tuvieron coeficientes negativos, demostrando que a menor concentración de inulina y menor temperatura de incubación la producción de células de *Lactobacillus plantarum* BG112 se incrementó. La señal y el valor del efecto cuantitativo representan la tendencia y la magnitud de la influencia en la respuesta (Zhang *et al.* 2013). Los modelos de regresión fueron capaces de explicar los valores observados teniendo un R² de 97.6% para la producción de células de *Lactobacillus plantarum* BG112. Con una (P = 0.061959). De esta misma forma se observó que el modelo fue estadísticamente significativo (P < 0.05) según el valor de F calculado (4.546) el cual fue mayor al F tabular (3.20). La falta de ajuste estadísticamente no fue significativa (P = 0.061959), el modelo representado se ajusta con precisión a los datos, confirmando la validez del modelo de análisis.

En la figura 1 se observa el efecto de la interacción entre la temperatura y la concentración de inulina en la viabilidad celular Y (viabilidad) de *Lactobacillus plantarum* BG112 durante la fermentación de agua de coco pasteurizada. Las regiones con altas concentraciones de células estuvieron próximas de 1 y 5 g/100mL de inulina y una temperatura de 30 °C.

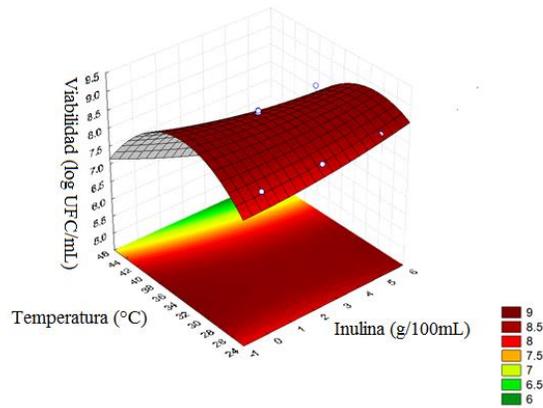


Figura 1. Efecto de las variables independientes: Temperatura y concentración de inulina en la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* BG112 en agua de coco pasteurizada.

La figura 2 muestra que la temperatura de 35 °C y una concentración de inulina de 1.25 g fueron primordiales para una mayor producción de células (log UFC/mL) de *Lactobacillus plantarum* BG112.

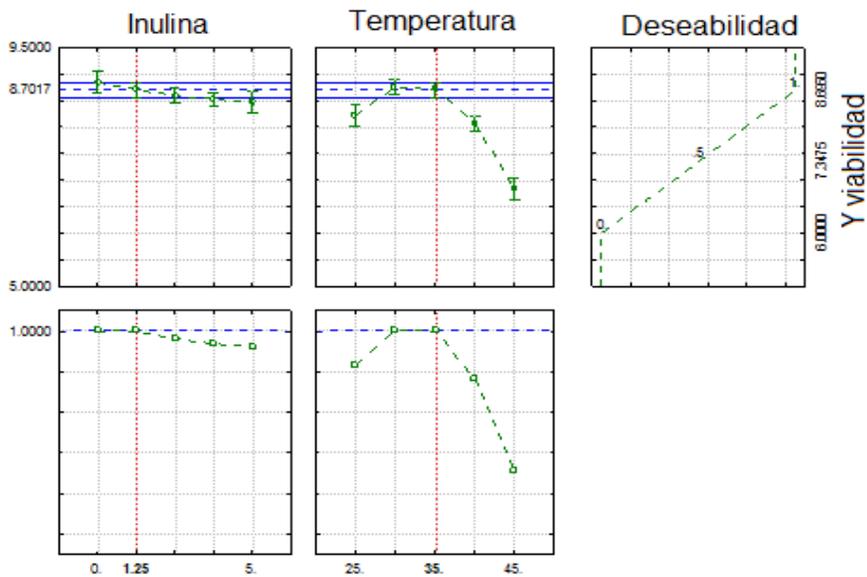


Figura 2. Gráficos de la deseabilidad de viabilidad de la bebida de agua de coco pasteurizada y fermentada.

La temperatura óptima de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* BG112, es dependiente de diversos factores tales como: el pH inicial, el sustrato y el linaje empleado (Morales *et al.* 2016). Por lo tanto, diferentes sustratos pueden mostrar resultados distintos en la temperatura optima de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* BG112.

En estudios realizados con *Lactobacillus plantarum* DW12, para la fermentación de agua de coco maduro, la bebida demostró tener una viabilidad de 8.4 log UFC/mL después de 48 horas de fermentación a una temperatura de 35 °C. Se observó que la bebida puede proporcionar no solo probióticos sino también otros compuestos inherentes del agua de coco que aportan beneficios a la salud (Kantochote *et al.* 2017). También se observó que la adición de 1.25% (p/v) de inulina de *Agave tequilana* al agua de coco promovió un incremento de *Lactobacillus plantarum* BG112.

Análisis microbiológicos.

En el cuadro 5 se observó que no hubo diferencia significativa en cuanto a la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* BG112 durante los días en almacenamiento. El conteo de la viabilidad de la bebida fermentada durante el almacenamiento osciló entre 8.81 y 8.79 Log UFC/mL del día cero al treinta las bacterias no tuvieron crecimiento representativo: (P = 0.92).

Cuadro 5. Análisis microbiológico. Viabilidad *Lactobacillus plantarum* BG 112.

| Días en almacenamiento | Media ± D.E. n.s. |
|-------------------------------|--------------------------|
| 0 | 8.81 ± 0.94 |
| 7 | 8.79 ± 0.20 |
| 15 | 8.77 ± 0.06 |
| 30 | 8.79 ± 0.03 |
| C.V% | 1.97 |

n.s.: No hay diferencias estadísticas entre los días de almacenamiento P > 0.05

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

En un estudio realizado por Dharmasena *et al.* (2015), sobre la vida útil en refrigeración de una mezcla de agua de coco y avena evaluando la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* Lp. 115-400B. mostró que la población de microorganismos probióticos incremento ~2 Log UFC/mL después de los primeros siete días del almacenamiento en refrigeración. La viabilidad se controló hasta que el recuento de células probióticas alcanzó 7 log UFC/mL. El análisis estadístico mostró, que el tiempo de almacenamiento en refrigeración y la adición de prebióticos tiene un efecto significativo (P < 0.05) sobre la viabilidad de los probióticos. El tiempo de almacenamiento en refrigeración produjo diferencias estadísticamente significativas en los conteos viables (P < 0.05). No obstante, la adición de inulina como prebiótico no mostró diferencia estadísticamente significativa en la viabilidad del microorganismo sobre la bebida hasta el día 21 de refrigeración. Dharmasena *et al.* (2015), consideran que el número de células viables requeridas para afectar el medio ambiente gastrointestinal en seres humanos es entre 6-8 log UFC/mL o UFC/g del alimento, también consideran que un producto probiótico se vuelve un alimento funcional, solo si contiene 7 log UFC/mL en el momento del consumo. Vuyst (2000), considera que el número mínimo sugerido de bacterias en el momento del consumo de un producto probiótico es de 7 log UFC/mL. la dosis terapéutica mínima por día sugiere que sea de 8 a 9 log UFC/mL.

El presente estudio según los resultados descritos en el cuadro 5, la bebida al día cero, inició con una población de 8.81 log UFC/mL hasta el día treinta la viabilidad fue de 8.79 log UFC/mL estadísticamente no teniendo un cambio significativo. Obteniendo resultados similares al estudio realizado por Dharmasena en donde la adición de inulina como prebiótico no mostro diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad del microorganismo durante los treinta días de almacenamientos no aumentó la población, denominado sin ser causa de muerte poblacional de UFC. Por lo tanto, la bebida cumple con el número de células viables descrito por Vuyst para ser considerado un producto probiótico funcional.

Resultados de análisis químicos.

Análisis de pH. En el cuadro 6 se observó que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los días cero y siete de almacenamiento en cuanto a pH, mostrando una acción fermentativa del microorganismo. Entre los días siete, quince y treinta existe una disminución del pH, pero estadísticamente no hay una diferencia significativa. Se observó una disminución sustancial entre el día cero y treinta la cual fue estadísticamente diferente ($P = 0.0067$).

Cuadro 6. Análisis químico de pH de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG 112.

| Días en almacenamiento | Media \pm D.E. |
|------------------------|-------------------------------|
| 0 | 4.64 \pm 0.14 ^A |
| 7 | 3.99 \pm 0.03 ^B |
| 15 | 3.89 \pm 0.03 ^{BC} |
| 30 | 3.66 \pm 0.01 ^C |
| C.V% | 2.04 |

A-B-C: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

Considerando que la bebida al día 30 obtuvo un pH bajo, los resultados durante almacenamiento fueron comparados con la norma salvadoreña, los parámetros establecidos de la bebida cumplen con los límites permitidos por la norma salvadoreña obligatoria (NSO 67.18.01:01) que indica que un pH para agua de coco debe estar entre un valor mínimo de 2.4 hasta un máximo de 4.4 (Murcia 2010). Los tratamientos no cumplieron con la normativa brasileña No. 27 para bebidas no alcohólicas que indica en el artículo No 6, en donde el pH para agua de coco pasteurizada debe estar entre 4.30 y 4.50 (Ministerio de agricultura, ganadería pecuaria y abastecimiento 2017).

Análisis de Acidez titulable. En el cuadro 7, se observó diferencias estadísticamente significativas con una ($P = 0.0045$). En los días cero y siete en acidez titulable durante los días en almacenamiento, mientras que entre el día siete y quince no hubo diferencias

estadísticamente significativas, se puede observar que la mayor diferencia se encuentra entre el día cero y treinta esto fue provocado por la fermentación y su producción de ácido láctico como se muestra en el cuadro 9 lo cual aumento la acidez titulable significativamente.

Cuadro 7. Análisis químico de Acidez titulable de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG 112.

| Días en almacenamiento | Media ± D.E. |
|------------------------|--------------------------|
| 0 | 0.55 ± 0.04 ^C |
| 7 | 1.32 ± 0.22 ^B |
| 15 | 1.51 ± 0.09 ^B |
| 30 | 2.80 ± 0.3 ^A |
| C.V% | 10.67 |

A-B-C: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05).

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

La relación pH y acidez se encontraron íntimamente relacionadas, a medida que la acidez incremento, el pH tiende a disminuir observándose en el cuadro 6. La acidez es un indicador sensorial, otorgándoles el sabor y aroma características del agua de coco (Freitas *et al.* 2015).

Análisis de Brix°. En el cuadro 8, se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en los días en almacenamiento en cuanto a la concentración de Brix°. Sin embargo, da igual almacenar a cero y siete días ya que la concentración de Brix° en dichos días es igual. Entre el día quince y treinta tampoco existe diferencia significativa. Lo contrario entre el día cero y quince ya que estadísticamente existe diferencia significativa (P = 0.0379). Ninguno de los tratamientos cumplió con lo establecido en la norma brasileña No. 27 sobre concentración de Brix° (Ministerio de agricultura, ganadería pecuaria y abastecimiento 2017).

Cuadro 8. Análisis químico de Brix° de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG 112.

| Días en almacenamiento | Media ± D.E. |
|------------------------|---------------------------|
| 0 | 10.55 ± 0.04 ^B |
| 7 | 10.60 ± 0.09 ^B |
| 15 | 11.25 ± 0.04 ^A |
| 30 | 11.10 ± 0.10 ^A |
| C.V% | 1.18 |

A-B: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P < 0.05).

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

Análisis de ácidos orgánicos (Ácido láctico). En el cuadro 9, se observó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de ácido láctico entre el día cero y el día siete. Así mismo entre el día siete y quince se observó un aumento en el ácido láctico, no siendo este significativo.

La mayor producción de ácido láctico es al día treinta de almacenamiento este tratamiento fue estadísticamente diferente a los tratamientos en los días anteriores. La producción de ácido láctico dentro de la bebida de agua de coco pasteurizada fue causada por la fermentación de *Lactobacillus plantarum* BG112 la cual es una bacteria ácido láctica las cuales metabolizan azúcares para producir principalmente ácido láctico.

Cuadro 9. Análisis químico, cuantificación de Ácido láctico de agua de coco pasteurizada y fermentada por *Lactobacillus plantarum* BG 112.

| Días de almacenamiento. | MEDIA (%) ± D.E. |
|-------------------------|---------------------------|
| 0 | 3.88 ± 0.61 ^C |
| 7 | 8.02 ± 1.70 ^B |
| 15 | 9.16 ± 1.37 ^B |
| 30 | 13.00 ± 1.48 ^A |
| C.V.% | 15.74 |

A-B-C: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

Según Waldir *et al.* (2007), mencionó que algunas especies del genero *Lactobacillus* son heterofermentativos facultativos, que en condiciones de anaerobiosis y microaerobiosis se comportan como homofermentativos, y en condiciones aeróbicas forman además de ácido láctico, ácido acético, acetoina y peróxido de hidrogeno. En este estudio los tratamientos se encontraron bajo condiciones microaerobias ya que estaban expuestos a bajas concentraciones de oxígeno por lo cual *Lactobacillus plantarum* BG112 pueden comportarse como una bacteria homofermentativa al producir ácido láctico.

Resultados de análisis físico.

Análisis de color. Se observó en el cuadro 10 el parámetro L* representa la luminosidad, siendo el 0 el color negro y el 100 el blanco, no obstante, hubo diferencias estadísticamente significativas entre los días cero y siete en almacenamiento, se observó que entre los días siete y quince no existió diferencia estadísticamente significativa, así mismo, al día treinta estadísticamente la apariencia volvió a ser la misma que en el día cero, ya que no hubo ninguna diferencia significativa ($P = 0.0114$).

El valor a* corresponde a las coordenadas +60 indica rojo, -60 indica verde. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el día cero y siete, por lo contrario, entre

los días siete y quince que no existió diferencias estadísticamente significativas, los días cero y treinta si presentaron diferencia significativa ($P = 0.0020$).

El valor b^* corresponde a las coordenadas +60 indica amarillo, -60 indica azul, en los días cero, siete y quince se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo contrario con el día treinta en el que se observó diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.0047$).

Cuadro 10. Análisis químico de Color en la escala L^* a^* b^* .

| Días en almacenamiento | L^* | a^* | b^* |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Media \pm D.E | Media \pm D.E | Media \pm D.E |
| 0 | 45.14 \pm 0.50 ^A | -0.26 \pm 0.03 ^B | 5.35 \pm 0.07 ^A |
| 7 | 35.11 \pm 1.33 ^B | 0.99 \pm 0.08 ^A | 4.88 \pm 0.01 ^A |
| 15 | 35.28 \pm 0.06 ^B | 1.08 \pm 0.14 ^A | 5.31 \pm 0.41 ^A |
| 30 | 41.90 \pm 0.35 ^A | -1.05 \pm 0 ^C | 1.63 \pm 0.02 ^B |
| C.V% | 3.03 | 71.41 | 7.37 |

A-B-C: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

Análisis sensorial. Se realizó a través de un análisis de aceptación donde se usó el producto después de fermentar en el día 0 a un pH de 4.6.

Color. Para la evaluación de color se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.0439$), entre la edad y el sexo de los panelistas cuadro 11, los panelistas jóvenes, adultos jóvenes femenino y adultos jóvenes masculino demostraron que no existió diferencia estadísticamente significativa en el atributo de color, los panelistas jóvenes masculino y adultos intermedio femenino percibieron de la misma manera el atributo de color.

Sabor. En el atributo de sabor cuadro 11, se observó que independientemente de la edad y el sexo de los panelistas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.4814$), los resultados coincidiendo con los hallados por Camargo *et al.* (2015), quienes hicieron un análisis sensorial de una bebida de agua de coco fermentada, agua de coco natural y de agua de coco fermentada, adicionada con sacarosa y sabor artificial de coco. Realizaron una prueba hedónica con 20 consumidores regulares de agua de coco no entrenados evaluando los atributos de color, sabor, aroma y aceptación general. En los resultados obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las tres muestras en los atributos de aroma, color y apariencia estas diferencias no afectaron la aceptación del sabor de la muestra de agua de coco fermentada adicionada con sacarosa y sabor artificial de coco obteniendo un 94% en el atributo de sabor siendo la más aceptada.

En el presente estudio se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y sexo de los panelistas no entrenados al momento de evaluar los atributos con

excepción del atributo de sabor, ya que como la bebida de agua de coco fermentada tenía un pH bajo y alto porcentaje de acidez fue necesario adicionar sacarosa permitiendo que la bebida fuera atractiva al paladar de los panelistas. Según Galego (2015), en su estudio el 97.3% de encuestados jóvenes tienen preferencia a sabores dulces y salados, observándose que solo entre un 4.5 a 4.3% de los encuestados adultos prefieren un sabor ácido.

Cuadro 11. Análisis sensorial. Atributos de color, sabor aroma y aceptación general, con una escala hedónica de nueve puntos.

| Edad | Sexo | Color | Sabor n.s | Aroma | A. G. |
|---------------|------|---------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|
| | | Media ± D.E. | Media ± D.E. | Media ± D.E. | Media ± D.E. |
| ADULTO I. | F | 8.40 ± 0.48 ^{AB} | 8.80 ± 0.40 | 8.80 ± 0.4 ^A | 8.80 ± 0.4 ^A |
| ADULTOS J. | F | 8.30 ± 0.90 ^{AB} | 8.60 ± 0.66 | 8.70 ± 0.64 ^B | 8.50 ± 0.67 ^{AB} |
| ADULTOS J. | M | 8.50 ± 1.00 ^A | 8.00 ± 1.65 | 8.75 ± 1.08 ^A | 7.87 ± 1.76 ^B |
| JOVEN | F | 7.90 ± 1.3 ^{AB} | 8.22 ± 0.91 | 8.25 ± 1.15 ^{AB} | 8.32 ± 0.75 ^{AB} |
| JOVEN | M | 7.61 ± 1.28 ^B | 8.00 ± 1.31 | 8.17 ± 1.04 ^{AB} | 8.02 ± 0.95 ^B |
| C.V. % | | 12.31 | 10.17 | 12.04 | 11.05 |

A-B-C: Letras iguales en la misma columna no tiene diferencias significativas entre tratamientos. ($P < 0.05$).

D.E.: Desviación estándar, C.V. %: Coeficiente de Variación.

n.s.: no hay diferencias estadísticas.

Adulto I: Adulto intermedio.

Adulto J: Adulto joven.

Aroma. En el cuadro 11, entre los panelistas adultos intermedios femenino, adultos jóvenes y jóvenes femenino no percibieron diferencias estadísticamente significativas en el aroma de la bebida, los panelistas jóvenes y adultos jóvenes masculino no percibieron diferencias estadísticamente significativas en el atributo de aroma de la bebida ($P = 0.2231$). Durante la fermentación y el tratamiento térmico la bebida mostró pérdida del aroma natural del agua de coco. Por lo tanto, fue necesario agregar un aroma artificial para mejorar este atributo y aumentar la aceptación de los panelistas.

Aceptación general. En Los resultados del cuadro 11, se observó que entre los panelistas adultos jóvenes femenino y adultos jóvenes masculino existió diferencias estadísticamente significativas en relación a la aceptación general de la bebida. En el resto de los panelistas no se observó diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.1073$). Estos resultados son contrarios a los hallados por Figueiredo *et al.* (2005), evaluando el perfil sensorial y aceptabilidad de muestras de agua de coco obtenidas de diferentes procesos de fabricación.

Durante el análisis sensorial se evaluaron tres muestras diferentes, (agua de coco fría, agua de coco esterilizada y agua de coco congelada). Aplicándose una prueba de aceptación general seleccionaron a 30 consumidores de agua de coco los panelistas utilizaron una escala hedónica de nueve puntos, los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba Tukey ($P = 0.05$). El agua de coco fría resulto ser más aceptada por los panelistas obteniendo un 73.3% de aceptación general.

Según Figueiredo *et al.*, estos resultados fueron acordes con el perfil sensorial del agua de coco fría ya que tenía mejores características en cuanto al aroma, color y sabor estos atributos tuvieron menos influencia negativa en la percepción del agua de coco verde por los consumidores a diferencia de las otras muestras, en el estudio se destacó que los panelistas eran provenientes del Norte y Noreste de Brasil por lo tanto, eran consumidores habituales de agua de coco verde además de ser panelistas ya entrenados. Según el estudio mencionado a los panelistas adultos intermedios les agrada extremadamente el producto, concluyendo que la edad y el sexo no influyo en la aceptación del agua de coco. A medida que los panelistas dan mayor valoración a los atributos mencionados tendrán una mejor aceptación general por el agua de coco. La evaluación de la aceptación general es considerada un resumen general de la percepción de atributos como: color, sabor y aroma de un alimento.

4. CONCLUSIONES

- Se formuló la bebida de agua de coco pasteurizada fermentada con *Lactobacillus plantarum* BG112, a 35 °C de temperatura y 1.25 g de inulina de *Agave tequilana*.
- *Lactobacillus plantarum* BG 112 puede mantenerse en una población de 8.71 log UFC/ml tomando en cuenta que la adición de inulina de *Agave tequilana* no mejoró los recuentos del probiótico como se esperaba.
- Respecto a las características fisicoquímicas, se observó que existió una disminución de pH con un aumento de la acidez titulable a los treinta días, con cambios de coloración y aumento en la concentración de Brix°, obteniendo una aceptación general de 8.80 en la escala hedónica de 9 puntos.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios adicionales para optimizar la concentración de otros prebióticos que puedan contribuir al crecimiento de células durante el periodo de almacenamiento, como por ejemplo inulina de alcachofa, achicoria etc.
- Llevar a cabo una cuantificación de azúcares presentes en agua de coco.
- Evaluar la preferencia de los consumidores en sustituciones de azúcares por edulcorantes no calóricos.

6. LITERATURA CITADA

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2006. Official methods of analysis. 15^aed. Washington.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria). 2003. Consulta pública N° 66. D.O.U. [internet]. [Consultado 2018 mar 18]. [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[5190-2-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[5190-2-0].PDF)

Barros N, Scarminio I, Bruns R. 2010. Como fazer experimentos. Brasil. Editora. Bookman. 4^{ed}. p. 135. ISBN: 8577807134.

Beneo G. 2013. Inulin from natural source [internet]. [Consultado 2018 mar 18]. https://www.beneo.com/Ingredients/Human_Nutrition/Functional_Fibres/Inulin

Camargo F, De Dea J, Inaba J, Thomaz V, Kaur S y Soccol. 2015. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits [internet]. Journal of functional foods. 12: (489-497) [Consultado 2018 jun 25]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.020>

Dharmasena M, Barron F, Fraser A y Jiang X. 2015. Vida útil del agua de coco, avena y *Lactobacillus plantarum* Lp 115-400B [internet]. Departamento de alimentos, nutrición y ciencia de embalaje en Estados Unidos. [Consultado 2018 jun 24]. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ffoods4030328>

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria). 2014. Producción y comercialización de coco en Brasil frente al comercio Internacional [internet]. [Consultado 2018 mar 20]. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/122994/1/Producao-e-comercializa-cao-Doc-184.pdf>

Freitas B, Silva V, Menezes I, Soares S, Costa G y Rocha J. 2015. Cualidades físico-químicas del agua de coco comercializada por ambulantes en el municipio de Mossoro. 5^a Encuentro regional de química y 4^a encuentro nacional de química [internet]. [Consultado 2018 jun 23]. <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemistry-proceedings/5erq4-enq/fq3.pdf>

Figueiredo L, Valenca A, Furtado E, Abbas A, Neumann D, Machado M y Azebedo M. 2005. Perfil sensorial y aceptación de muestras de agua de coco obtenidas por diferentes procesos de fabricación. Universidad de Campinas Sao Paulo, Brasil 2(23):397-412 [internet]. [Consultado 2018 jun 25]. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v23i2.4477>

Galego C. 2015. Jóvenes prefieren sabores dulces, personas mayores salados [internet]. [Consultado 2018 jun 25]. <http://www.campogalego.com/es/agroalimentacion-es/los-jovenes-prefierenel-sabor-dulce-los-mayores-el-salado/>.

Gutiérrez M. 2016. La cultura del coco. Sistema de producción EMBRAPA [internet]. [Consultado 2018 feb 06]. https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=contedoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1ga1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistema ProducaoId=7703&p_r_p_-996514994_topicoId=7829

Gutiérrez F, Ratering S, Juarez B, Godinez C, Geissler-plaum R, Prell F, Czemak P, Schnell P. 2017. Potential use of agave salmiana as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. LWT. Food science and technology. (84):151-159

Hansen C. 2015. Lactasa en la industria láctea. Food Ingredients Brasil, 32:20–22.

Ibañez G, Álvarez M y Doria F. 2015. Cadena de suministro: Inulina de *Agave*. Universidad Autónoma de Tamaulipas [internet]. [Consultado 2018 feb 06]. http://acacia.org.mx/busqueda/pdf/CADENA_DE_SUMINSTRO_INULINA_DE_AGAVE.pdf

Infinity Pharma. 2017. *Latobacillus plantarum* probiótico que beneficia el organismo para mejora del balance microbiano [internet]. [Consultado 2018 feb 15]. <https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/1/lactobacillus-plantarum.pdf>

Kantachote D, Ratanaburee A, Haysama-ae W, Sukhoom A y Nunkaew. 2017. The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. Journal of functional foods. (32):401–408.

Lara M. 2017. Avances en la producción de inulina. [internet]. Universidad Central del Ecuador, Quito. [Consultado 2018 feb 06]. <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v37n2/rtq16217.pdf>. p. 352-366

Ministerio de agricultura, pecuaria y abastecimiento. 2017. Legislación de bebidas no alcohólicas. Normativa No.27 [internet]. [Consultado 2018 jun 18]. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/ivegetal/bebidas>

Mizock B. 2015. Probiotics. Disease-a-Month. Mosby Inc. 7(61): 259-290.

Murcia E. 2010. Evaluación de la calidad microbiológica de agua de coco envasada en presentación de un litro, registrada y comercializada en el distrito No. 2 del área

metropolitana de San Salvador [Tesis]. Universidad de El Salvador Centro América. El Salvador. 236 p.

Morales M, Busanello M y Garcia S. 2016. Optimization of the fermentation parameters for the growth of *Lactobacillus* in soymilk with okara flour. LWT. Food science and technology. (74):456–464

Reuter W. 2015. Analysis of organic acids in fruit juices by HPLC and UV detection. [Consultado 2018 feb 25]. [https://www.perkinelmer.com /CMSResources/Images/44-75518APP_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299_01.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-75518APP_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299_01.pdf).

Rezazadeh M, Yamini Y, Seidi S y Esrafil A. 2013. One-way and two-way pulsed electromembrane extraction for trace analysis of amino acids in foods and biological simple. Analytica chimica acta. 773: 52–59.

De Vuyst L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. Food Technology and Biotechnology. 38(2):105-112.

Waldir E, Rychtera M, Melzoch K, Quillama E, Egoavil E. 2007. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. Facultad de ciencias biológicas UNMSM. Rev. Perú. Biol. 14(2):271-275

Wang I, Iuo Z, Shahbazi A. 2013. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. Industrial crops and products 42: 280–291.

Zhang W, Lin Y, Zhang Q, Wang X, Wu D, y Kong H. 2013. Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production. Fuel. 112:331-337.

7. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de escala hedónica.

Nombre: _____

Usted está recibiendo una muestra de agua de coco fermentada con la cultura probiótica *Lactobacillus plantarum* BG 112 añadida con inulina de *agave tequilana*. Por favor, evalúe la muestra con relación a los atributos color, sabor, aroma y aceptación global, según el grado de gusto o desagrado, utilizando la siguiente escala.

- (9) Me gustó extremadamente
- (8) Me gustó moderadamente
- (7) Me gustó regularmente
- (6) Me gustó ligeramente
- (5) No me gustó, ni me disgustó
- (4) Disgusto ligeramente
- (3) Disgusto regularmente
- (2) Disgusto moderadamente
- (1) Disgusto extremadamente

| No. MUESTRA | COLOR | SABOR | AROMA | ACEPTACIÓN GLOBAL |
|-------------|-------|-------|-------|-------------------|
| | | | | |

Comentarios:

Anexo 2. Incubación de placas Petri, para determinar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* BG112 después de 48 horas de fermentación.



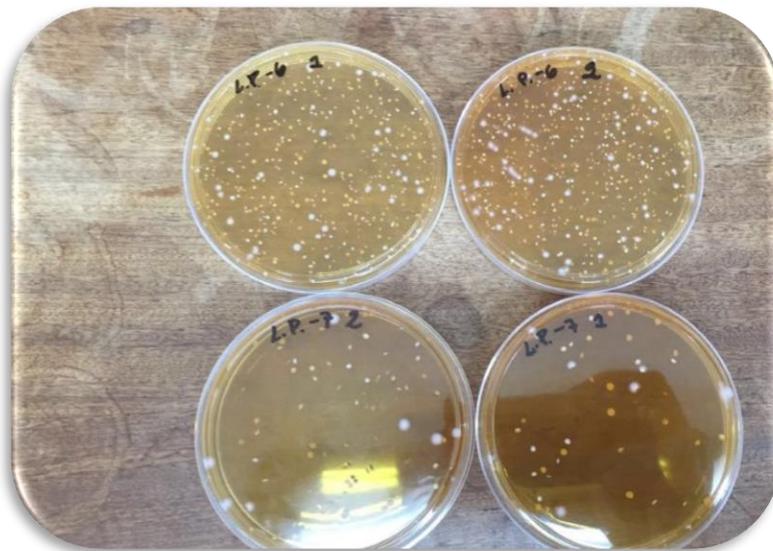
Anexo 3. Conteo de UFC después de 48 horas de fermentación bajo anaerobiosis.



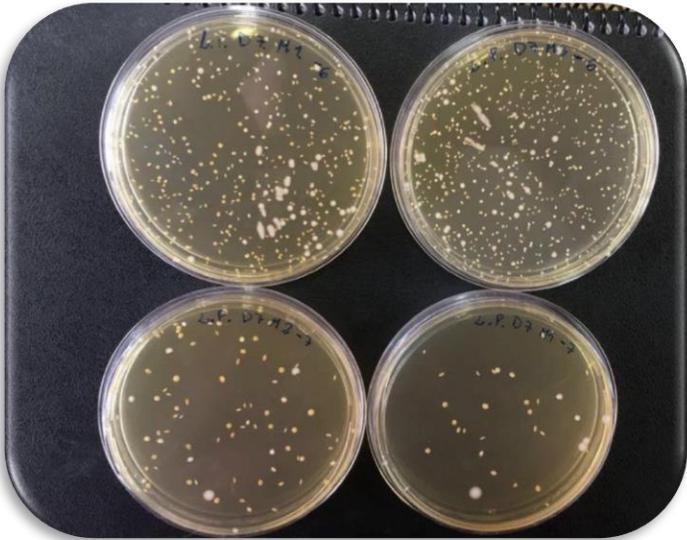
Anexo 4. Distribución de los tratamientos para ser almacenados 30 días.



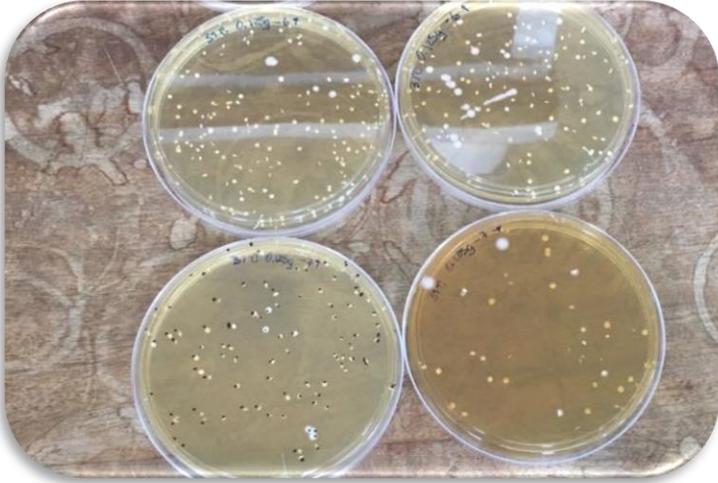
Anexo 5. UFC de *Lactobacillus plantarum* BG112 a los 0 días de almacenamiento.



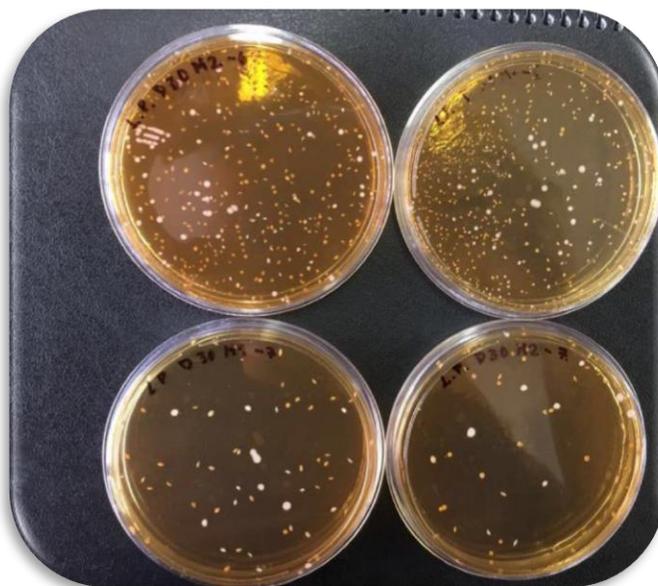
Anexo 6. UFC de *Lactobacillus plantarum* BG112 a los 7 días de almacenamiento.



Anexo 7. UFC de *Lactobacillus plantarum* BG112 a los 15 días de almacenamiento.



Anexo 8. UFC de *Lactobacillus plantarum* BG112 a los 30 días de almacenamiento.



Anexo 9. Correlación entre análisis fisicoquímicos y microbiológicos durante los días en almacenamiento.

| Pearson Correlation Coefficients, N = 8 | | | | | | | | |
|---|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | Día | pH | Brix | AcidezT | L | a | b | log |
| Día | | 0.005 | 0.0348 | 0.0002 | 0.86 | 0.2558 | 0.0055 | 0.891 |
| pH | 0.0054 | | 0.0593 | 0.0042 | 0.2003 | 0.9463 | 0.0924 | 0.9679 |
| Brix | 0.0348 | 0.0593 | | 0.1009 | 0.522 | 0.9703 | 0.3951 | 0.9953 |
| AcidezT | 0.0002 | 0.0042 | 0.1009 | | 0.8295 | 0.2762 | 0.005 | 0.9287 |
| L | 0.86 | 0.2003 | 0.522 | 0.8295 | | 0.015 | 0.5179 | 0.6008 |
| A | 0.2558 | 0.9463 | 0.9703 | 0.2762 | 0.015 | | 0.0344 | 0.985 |
| B | 0.0055 | 0.0924 | 0.3951 | 0.005 | 0.5179 | 0.0344 | | 0.9171 |
| Log | 0.891 | 0.9679 | 0.9953 | 0.9287 | 0.6008 | 0.985 | 0.9171 | |