



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE ALIMENTOS

Efecto de dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en la elaboración de una bebida fermentada a base de arroz (*Oryza sativa*).

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Eder Gustavo Yancha Villalba

Tutor: Mg. Andrea Verónica Delgado Ramos

Ambato – Ecuador

Febrero-2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. Andrea Verónica Delgado Ramos

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 15 de enero de 2024

.....

Mg. Andrea Verónica Delgado Ramos

CI: 0401305008

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Eder Gustavo Yancha Villalba, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Eder Gustavo Yancha Villalba

CI: 1804198479

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Eder Gustavo Yancha Villalba

CI: 1804198479

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos calificadores, aprueban el Informe Final del Trabajo de Titulación opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

.....

Presidente del tribunal

.....

Dr. Diego Manolo Salazar Garcés

1803124294

.....

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

0604079871

Ambato, 06 de febrero de 2024

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación académica.

A mis padres Martha Vilalba y Gustavo Yanca por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A cada uno de los miembros de mi familia que me han servido de inspiración para seguir adelante y poder alcanzar esta meta.

A los amigos que a lo largo de mi formación académica me han apoyado incondicionalmente de diversas maneras.

A mi abuelo Julio que desde el cielo me cuida y me guía.

AGRADECIMIENTO

A Dios por protegerme y ayudarme a superar todos los obstáculos para culminar con éxito este trabajo.

A mi madre por su esfuerzo, dedicación y brindarme su apoyo siempre en cada etapa de mi vida.

A mi tutora la Ing. Andrea Delgado, mi más sincero agradecimiento por su paciencia, guía y conocimiento impartido durante el desarrollo de este proyecto.

A todos los docentes que me han impartido su conocimiento a lo largo de estos años y en especial a la Ing. Alejandra Sánchez, Ing. Luis Tamayo, Ing. Geovanny Freire, a las Técnicas de Laboratorio Ing. Yolanda Pallo, Ing. Patricia Dávalos, Ing. Cynthia Pico, Ing. Isabel Guerrero e Ing. Anabel Mera por su paciencia y colaboración durante el desarrollo experimental de este proyecto.

A mis amigos de la Facultad que estuvieron siempre en los buenos y malos momentos, me llevo muy buenos recuerdos con ellos.

A la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por darme la oportunidad de formarme en sus aulas.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xiii
RESUMEN EJECUTIVO	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPITULO I.....	1
MARCO TEORICO.....	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Fermentación alcohólica	2
1.1.2 Levaduras	3
1.1.3 Historia de la chicha.....	5
1.1.4 Chicha de arroz	6
1.1.5 Materia prima	6
1.2 OBJETIVOS.....	12
1.2.1 Objetivo general	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
CAPITULO II	14
METODOLOGÍA	14
2.1 Materiales	14
2.1.1 Materia prima	14

2.1.3	Materiales y utensilios.....	14
2.1.4	Equipos.....	14
2.1.5	Reactivos	15
2.2	Métodos	15
2.2.1	Elaboración de la bebida fermentada a base de arroz (<i>Oryza sativa</i>) utilizando dos tipos de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces bayanus</i>	15
2.2.2	Evaluación del efecto de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Saccharomyces bayanus</i> en las características fisicoquímicas de la bebida durante el proceso de fermentación.	23
2.2.3	Determinación de las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto terminado.....	24
CAPITULO III		29
RESULTADOS Y DISCUSION		29
3.1	Elaboración de la bebida fermentada	29
3.2	Variables analizadas durante la fermentación	30
3.2.1	°Brix	30
3.2.2	pH.....	32
3.2.3	Acidez	34
3.3	Determinación de las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto terminado.	37
3.3.1	Grado alcohólico	37
3.3.2	Metanol	39
3.3.3	Análisis microbiológicos.....	39
3.3.4	Análisis sensorial	40
3.4	Verificación de hipótesis	42
CAPITULO IV.....		43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		43

3.5	Conclusiones	43
3.6	Recomendaciones	44
	MATERIALES DE REFERENCIA	45
	Referencias Bibliográficas	45
	Anexos	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valor nutricional del Arroz (<i>Oryza sativa</i>) (g/100 g).....	7
Tabla 2.	Valor nutricional de la Piña (<i>Ananas comosus</i>) (g/100 g).....	8
Tabla 3.	Valor nutricional de la Naranjilla (<i>Solanum quitoense</i>)(g/100g).....	9
Tabla 4.	Cantidad de materia prima a utilizar por litro.....	15
Tabla 5.	Diseño 2 ^k , para conocer la influencia de los factores en el pH, Brix, acidez total y grado alcohólico.....	16
Tabla 6.	Parámetros sensoriales.....	26
Tabla 7.	ANOVA para el diseño factorial 2 ^k con replicación.....	28
Tabla 8.	Formulación para cada uno de los tratamientos.....	29
Tabla 9.	Comportamiento de los grados Brix durante los días de fermentación ...	30
Tabla 10.	ANOVA de la variable °Brix al final de la fermentación	32
Tabla 11.	Comportamiento de los grados Brix durante los días de fermentación	33
Tabla 12.	ANOVA de la variable pH al final de la fermentación.....	34
Tabla 13.	Comportamiento de la acidez durante los días de fermentación.....	35
Tabla 14.	ANOVA de la variable acidez al final de la fermentación.....	36
Tabla 15.	Grado alcohólico (%) obtenido al final de la fermentación	37
Tabla 16.	ANOVA de la variable grado alcohólico al final de la fermentación ..	38
Tabla 17.	Resultados de la determinación cualitativa de metanol	39
Tabla 18.	Resultados del análisis microbiológico.....	40
Tabla 19.	Comportamiento de los grados Brix durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos.	50
Tabla 20.	Comportamiento del pH durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos.....	50
Tabla 21.	Comportamiento de Acidez en % de ácido láctico durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos.	51
Tabla 22.	Grado alcohólico (%) para cada uno de los tratamientos.....	51

Tabla 23.	Comparación de medias Tukey del efecto de los °Brix en los tratamientos.....	52
Tabla 24.	Comparación de medias Tukey del efecto del pH en los tratamientos	52
Tabla 25.	Comparación de medias Tukey del efecto de la acidez en los tratamientos.....	52
Tabla 26.	Comparación de medias Tukey del efecto del grado alcohólico en los tratamientos.....	53
Tabla 27.	ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto al color.....	53
Tabla 28.	ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto al olor.....	53
Tabla 29.	ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto al sabor.....	53
Tabla 30.	ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto a la acidez.....	54
Tabla 31.	ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto a la aceptabilidad.....	54
Tabla 32.	Ajuste de °Brix inicial.....	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del equipo de fermentación.	18
Figura 2.	Diagrama de proceso de elaboración de chicha de arroz	19
Figura 3.	Comportamiento de los °Brix durante el tiempo de fermentación.....	31
Figura 4.	Comportamiento del pH durante el tiempo de fermentación	33
Figura 5.	Comportamiento de la acidez durante el tiempo de fermentación.....	36
Figura 6.	Porcentaje de grado alcohólico para todos los tratamientos	38
Figura 7.	Perfil sensorial de los tratamientos fermentados con <i>S. Cerevisiae</i>	41
Figura 8.	Perfil sensorial de los tratamientos fermentados con <i>S. Bayanus</i>	41
Figura 9.	Obtención de las materias primas	56
Figura 10.	Preparación de los mostos	56
Figura 11.	Activación de levaduras	57
Figura 12.	Reposo de los mostos durante el tiempo de fermentación	57
Figura 13.	Análisis fisicoquímicos diarios	58
Figura 14.	Filtración al vacío y pasteurización de las muestras	58
Figura 15.	Embotellado y etiquetado de la bebida	59
Figura 16.	Análisis microbiológicos.....	59
Figura 17.	Determinación de grado alcohólico	60
Figura 18.	Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b0R1.....	60
Figura 19.	Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b0R2.....	61
Figura 20.	Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b1R1.....	61
Figura 21.	Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b1R2.....	62
Figura 22.	Análisis sensorial	62
Figura 23.	Hoja de cata.....	63

RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto busca evaluar el efecto de dos tipos de levaduras en una bebida fermentada a base de arroz, con el fin de contribuir al conocimiento sobre la producción, la conservación, y mejoramiento de una bebida tradicional y promover su consumo.

Se prepararon 4 tratamientos con dos réplicas cada uno, se ajustaron a 10 y 20 grados Brix para cada levadura y se dejaron fermentar durante 5 días. Durante la fermentación se evaluaron pH, acidez y grados Brix. Al finalizar la fermentación se evaluaron grado alcohólico y presencia de metanol, además de un análisis microbiológico en mohos, levaduras y *Salmonella*. Finalmente, se realizó un análisis sensorial del producto final.

Al evaluar las bebidas durante la fermentación, los grados Brix de todos los tratamientos se encontraron en un rango final de 4 a 6 grados Brix, el pH final se encontró en un rango de 3.87 a 4.08 y la acidez se ubicó en un rango final de 0.31 a 0.47 por ciento de ácido láctico. Al evaluar el producto final se evidenció que los tratamientos A1b0 (20 Brix, *S. cerevisiae*) y A1b1 (20 Brix, *S. bayanus*) poseen mayor contenido alcohólico con 9.1 y 9.5 por ciento respectivamente y la presencia de metanol fue negativa. En cuanto a los análisis microbiológicos, todos los tratamientos se encontraron dentro de lo establecido en la NTE INEN 2802 (Bebidas alcohólicas. Requisitos), finalmente en el análisis sensorial se registraron valores similares en todos los tratamientos, indicando que no existen diferencias significativas entre las muestras.

Palabras clave: Fermentación, chicha, arroz, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, bebidas fermentadas, levaduras.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of two types of yeast on a fermented rice-based beverage to contribute to knowledge about the production, conservation, and improvement of a traditional beverage and to promote its consumption.

Four treatments with two replicates each were prepared, adjusted to 10 and 20 degrees Brix for each yeast, and left to ferment for 5 days. During fermentation, pH, acidity, and Brix degrees were evaluated. At the end of fermentation, alcohol content and presence of methanol were evaluated, in addition to a microbiological analysis of molds, yeasts and Salmonella. Finally, a sensory analysis of the final product was performed.

When the beverages were evaluated during fermentation, the Brix degrees of all treatments were in a final range of 4 to 6 degrees Brix, the final pH range from 3.87 to 4.08, and the acidity was in a final range of 0.31 to 0.47 percent lactic acid. When evaluating the final product, it was found that treatments A1b0 (20 Brix, *S. cerevisiae*) and A1b1 (20 Brix, *S. bayanus*) had higher alcohol content of 9.1 and 9.5 percent, respectively, and the presence of methanol was negative. As for microbiological analysis, all treatments were found to be within the requirements of NTE INEN 2802 (Alcoholic beverages. Requirements), and finally, in the sensory analysis, similar values were recorded for all treatments, indicating that there were no significant differences between samples.

Keywords: Fermentation, chicha, rice, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, fermented beverages, yeasts.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes Investigativos

En Ecuador, la chicha es una bebida fermentada tradicional, producto de la fermentación alcohólica de mostos de frutas, vegetales o cereales, con características propias según su origen (**Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1992**). Existe una gran variedad de chichas, debido a la materia prima de origen que puede ser maíz, quínoa, arroz, cebada o harina, acompañados de panela o azúcar común (**Blanco, 2018**). El proceso de fermentación está influenciado por varios factores, incluyendo la temperatura, acidez, tipo de microorganismos fermentadores, contenido de azúcares y la composición química del mosto (**Grijalva-Vallejos, Aranda, & Matallana, 2020**).

La chicha de arroz forma parte de la gastronomía de la cultura afrodescendiente de las comunidades Chota y Salinas en Imbabura (**Naranjo, Galarza, & Falcón, 2016**). Este producto ancestral puede variar en su preparación, así como en los diversos ingredientes que se le pueden adicionar para regular el sabor. Esta bebida es producida por comunidades indígenas que habitan en los Andes y algunas regiones de tierras bajas de Brasil, Bolivia, Colombia, Perú y Argentina (**Da Silva Vale et al., 2023**).

Este proyecto de investigación busca evaluar el efecto de dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en la elaboración de una bebida fermentada a base de arroz, evaluando diferentes variables de fermentación, tales como pH, temperatura, acidez, sólidos solubles y tiempo de fermentación. Por último, se determinará las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales de la bebida en estudio. Los resultados de esta investigación podrán contribuir a aumentar el conocimiento sobre la producción, la conservación de una bebida tradicional, mejorar la calidad de la chicha de arroz y promover su consumo.

1.1.1 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es la transformación anaeróbica de azúcares, principalmente hexosas como la glucosa y la fructosa, en etanol y dióxido de carbono, así como la generación de un gran número de subproductos. La obtención de etanol por vía fermentativa constituye un paso intermedio, pero crítico en la producción de bebidas alcohólicas. Este es un proceso de largos tiempos de operación, pues debido a su naturaleza biológica inciden sobre su desarrollo una gran variedad de variables y parámetros operacionales tales como: concentración de azúcares, temperatura, pH, concentración de células vivas, cepa utilizada, entre otros (**López de la Maza, Zumalacárregui de Cárdenas, & Pérez Ones, 2019**).

Metabolismo de la fermentación

La fermentación alcohólica de los mostos dulces se produce mediante el metabolismo anaeróbico de las levaduras, que forma etanol y CO₂ como productos principales (**Shirai & Malpica, 2013**). La glucólisis es la primera etapa de la fermentación, a pesar de la complejidad de los procesos bioquímicos una forma esquemática de la reacción química de la fermentación alcohólica puede describirse como una glicólisis, en la denominada vía Embden-Meyerhof-Parnas, la cual explica los productos resultantes de la fermentación etílica de una hexosa, como se describe a continuación: (**Padín González & Díaz Fernández, 2015**).



1.1.2 Levaduras

“Las levaduras son cuerpos unicelulares (generalmente de forma esférica) de un tamaño que ronda los 2 a 4 μm y que están presentes de forma natural en algunos productos como las frutas, cereales y verduras. Son lo que se denominan: organismos anaeróbicos facultativos, es decir que pueden desarrollar sus funciones biológicas sin oxígeno” (Padín González & Díaz Fernández, 2015).

1.1.2.1 Condiciones óptimas para el desarrollo de levaduras

Las condiciones óptimas para el crecimiento y fermentación de levaduras pueden variar dependiendo del proceso y los resultados deseados, sin embargo, por lo general la mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5 (Suárez Machín, Garrido Carralero, & Guevara Rodríguez, 2016). Las levaduras tienen un régimen de funcionamiento en rangos de temperatura óptimos, si se expone cualquier levadura a una temperatura cercana o superior a 55 °C por 5 minutos se produce su muerte. En la mayoría la temperatura óptima de funcionamiento es de 30 °C (Padín González & Díaz Fernández, 2015).

1.1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Aunque en un principio no se tuviera conciencia plena de la participación de este en la elaboración de alimentos como el pan o las bebidas alcohólicas, la levadura *S. cerevisiae* es probablemente el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo. El uso más extendido está enmarcado en la panificación y en las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol en general. La levadura inactivada por temperatura también puede ser usada como fuente de nutrientes en la alimentación animal y humana, tanto como levadura entera como sus derivados. (Suárez Machín et al., 2016). Esta levadura tiene la capacidad de crecer tanto en

condiciones aeróbicas como anaeróbicas, sin embargo, se prefiere un ambiente anaeróbico para la fermentación alcohólica, el rango de temperatura óptima es de 25 a 30 °C y un pH de 5 (Ferreyra et al., 2014).

1.1.2.3 *Saccharomyces bayanus*

Es una levadura de gemación utilizada en la vinificación, es miembro del grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Está estrechamente relacionado con *Saccharomyces cerevisiae*; estas dos especies de levadura están separadas por un estimado de 20 millones de años de evolución (NCBI, 2020). Esta levadura favorece la producción de vinos con una fuerte intensidad aromática, principalmente de frutas exóticas. Libera cantidades importantes de polisacáridos, por lo que se recomienda especialmente para la elaboración de vinos blancos destinados a la crianza sobre lías finas, para aquellos enólogos que deseen aportar más cuerpo y volumen a sus vinos. La temperatura óptima de fermentación es de 14 a 20 °C, posee una resistencia al alcohol del 15.5% y el pH del medio en que se desarrolla debe ser ligeramente ácido en un rango de 4 a 6 (Fermivin, 2019).

Comparación entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*

A pesar de que pertenecen al género *Saccharomyces* y muestran similitud genética con otras especies pertenecientes a este taxón, pueden variar en cuanto a las propiedades enológicas y la capacidad de sintetizar compuestos volátiles. Una comparación realizada entre *S. bayanus* y *S. cerevisiae* mostró que los vinos fermentados por *S. bayanus* tienen una mayor intensidad de sabor, también produce mayores cantidades de 2-feniletanol, lactato de etilo, acetato de 2-feniletilo y otros ésteres de acetato, mientras que *S. cerevisiae* sintetiza más isobutanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico (Januszek, Satora, Wajda, & Tarko, 2020).

1.1.3 Historia de la chicha

Chicha es una bebida fermentada tradicional producida por las poblaciones nativas de América del Sur. Esta bebida posee una graduación alcohólica del 2% a 12% v/v y es elaborada principalmente a partir de maíz, pero también se pueden utilizar otras materias primas como arroz, yuca, maní, frutas o algarroba. Se consume durante festividades religiosas y agrícolas, así como durante eventos familiares y sociales **(Jimenez, O'Donovan, Ullivarri, & Cotter, 2022)**.

Esta es una bebida nativa de América Latina que apareció por primera vez durante el período aborigen/precolombino, alrededor de 5000 AC. Originalmente, se elaboraba a base de maíz y, en algunas regiones de Ecuador, se utilizaba quinua en lugar de maíz **(Arias, 2016)**. Sus primeros vestigios se encontraron en el período formativo de la cultura Valdivia (3500 y 1500 antes de nuestra era) originaria de la Península de Santa Elena, donde se evidenciaron los primeros hallazgos del maíz en vasijas de barro **(Ministerio de Cultura y Patrimonio, 2015)**.

Los Incas descubrieron que la saliva humana podía ayudar en el proceso de fermentación, ya que contiene enzimas que convierten el almidón en azúcar. Las mujeres masticaban el maíz y luego lo escupían para iniciar la fermentación **(Arias, 2016)**. Sin embargo, también se pueden utilizar otras estrategias para la degradación del almidón, como el proceso de malteado de los granos de maíz o una etapa de prefermentación que implica tratamiento con agua caliente **(Da Silva Vale et al., 2023)**.

En la actualidad, la mayoría de las recetas utilizan cebada malteada u otros agentes de fermentación. Existen diversas formas de preparar la chicha, ya que es producida en otras regiones de América del Sur variando un tanto su preparación e ingredientes adicionales. Así como, la tribu indígena Umutina de Barra do Bugres, en Brasil, prepara una chicha utilizando arroz en lugar de maíz, y específicamente utilizando

arroz masticado como inóculo. También los indios brasileños Javaé producen una bebida fermentada sin alcohol llamada calugi, que se elabora a partir de arroz, yuca y maíz (**Jimenez et al., 2022**). Diferentes comunidades en Ecuador tienen sus propias recetas. Algunos ejemplos incluyen la Chicha del "Yamor" hecha con siete tipos de maíz, la Chicha de Jora, la Chicha Huevona que incorpora huevo, la Chicha de Yuca que mezcla yuca con los ingredientes tradicionales, entre otras variedades (**Arias, 2016**).

1.1.4 Chicha de arroz

Esta bebida forma parte de la gastronomía de la cultura afrodescendiente de las comunidades Chota y Salinas en Imbabura, es elaborada con harina de arroz molido, agua aromática elaborada con: ishpingo, menta, cedrón, hoja de naranja, hierba luisa, canela, clavo de olor y pimienta dulce, además, a la bebida se le añaden frutas como piña, naranjilla y guanábana (**Naranjo et al., 2016**). Es usualmente fermentada con los microorganismos propios de la cáscara de la piña, las cuales incluyen: *Bacilo Subtilis*, *Torulopsis inconspicna*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida queretana*, siendo la *Saccharomyces cerevisiae* la que destaca al momento de la fermentación (**Blanco, 2018**).

1.1.5 Materia prima

1.1.5.1 Arroz (*Oryza sativa*)

El arroz, *Oryza sativa*, es el alimento primordial en muchas culturas, constituyendo la base alimentaria de más de un tercio de la población mundial. Y por su importancia, además de cultivarse y consumirse en los cinco continentes, ocupa el segundo lugar, detrás del maíz, en la producción mundial de granos (**De Bernardi, 2020**).

Valor nutricional

Tabla 1.

Valor nutricional del Arroz (Oryza sativa) (g/100 g)

Nombre	Cantidad promedio	Unidad
Agua	11.2	g
Energía	359	calorías
Proteína	7.04	g
Lípidos totales (grasas)	1.03	g
Cenizas	0,42	g
Carbohidratos:		
Carbohidratos, por diferencia.	80.3	g
Fibra dietética total (AOAC 2011.25)	2.77	g
Almidón	74,4	g
Minerales:		
Calcio	4	mg
Hierro	0,14	mg
Magnesio	26,5	mg
Fósforo	108	mg
Potasio	82	mg
Vitaminas y otros componentes:		
Tiamina	0.065	mg
Riboflavina	0,08	mg
Niacina	1.43	mg
Vitamina B-6	0,058	mg

Fuente: (USDA Agricultural Research Service, 2022)

1.1.5.2 Piña (*Ananas comosus*)

El origen de la piña se encuentra en Brasil y Paraguay, en la cuenca del Amazonas, donde se cultivó por primera vez. La producción mundial comenzó en el siglo XV. La piña se distribuye en Europa y regiones tropicales del mundo. Se cultiva en más de 82 países, en una superficie cultivada de más de 2,1 millones de hectáreas (**Hossain, 2016**). Ocupa el tercer lugar en la producción de frutas tropicales después del plátano y los cítricos. El mercado de la piña ha crecido significativamente debido a sus atractivos sabores y valores nutricionales junto con una alta demanda y precios minoristas competitivos (**Mohd Ali, Hashim, Abd Aziz, & Lasekan, 2020**).

Valor nutricional

La piña contiene principalmente carbohidratos y agua, que son fuentes vitales de fibra dietética, azúcares, ácidos orgánicos, vitaminas (ácido ascórbico, niacina y tiamina) y minerales (magnesio, manganeso y cobre) (Mohd Ali et al., 2020).

Tabla 2.

Valor nutricional de la Piña (Ananas comosus) (g/100 g)

Nombre	Cantidad	Unidad
Agua	86	g
Energía	50	kcal
Proteína	0.54	g
Carbohidratos, por diferencia.	13.1	g
Fibra dietética total	1.4	g
Azúcares, total incluyendo NLEA	9.85	g
Sacarosa	5.99	g
Glucosa	1.73	g
Fructosa	2.12	g
Calcio	13	mg
Magnesio, Mg	12	mg
Fósforo, P	8	mg
Potasio, K	109	mg
Sodio Na	1	mg
zinc, zinc	0.12	mg
Cobre	0.11	mg
Manganeso	0.927	mg
Vitamina C, ácido ascórbico total.	47.8	mg
Tiamina	0.079	mg
Niacina	0.5	mg

Fuente: (United States Department of Agriculture, 2019)

1.1.5.3 Naranjilla (*Solanum quitoense*)

Es un árbol frutal perteneciente a la familia de las solanáceas. Esta es originaria de los bosques subtropicales de los Andes en Ecuador y crece principalmente en estribaciones de la cordillera de los Andes en lugares con buena humedad y zonas frescas y sombreadas entre 800 y 1400 metros sobre el nivel del mar. Es una fruta climatérica con un maravilloso sabor y aroma. (Castro, 2019). Este fruto tiene un

papel histórico importante en Colombia y Ecuador. Ha sido descrito como “el fruto dorado de los Andes” y “el néctar de los dioses”. Se le conoce localmente en Ecuador como “naranjilla de Quito”, “lulo” en Colombia, “nuqui” en Perú y los incas se referían a él como *lulum* (Ramírez, Kallarackal, & Davenport, 2018).

Valor nutricional

Tabla 3.

Valor nutricional de la Naranjilla (Solanum quitoense)(g/100g)

Nombre	Cantidad	Unidad
Agua	93	g
Energía	25	calorías
Energía	103	kJ
Proteína	0,44	g
Lípidos totales (grasas)	0,22	g
Ceniza	0,39	g
Carbohidratos, por diferencia.	5.9	g
Fibra dietética total	1.1	g
Azúcares, total incluyendo NLEA	3.74	g
Sacarosa	1,72	g
Glucosa	0,99	g
Fructosa	1.04	g
Calcio	8	mg
Hierro, Fe	0,35	mg
Magnesio, Mg	11	mg
Fósforo, P	12	mg
Potasio, K	200	mg
Sodio Na	4	mg
Zinc	0.1	mg
Cobre	0,028	mg
Manganeso	0.067	mg
Vitamina C, ácido ascórbico total.	3.2	mg
Tiamina	0,045	mg
Niacina	1,45	mg
Vitamina B-6	0.107	mg

Fuente: (United States Department of Agriculture, 2019)

1.1.1.1 Especias

Canela (*Cinnamomum verum*)

Cinnamomum verum es una planta especial conocida por sus cualidades medicinales y farmacológicas. Desde la antigüedad, se ha utilizado frecuentemente como condimento medicinal. Es originaria de Sri Lanka y de los estados del sur de la India, pertenece a la familia Lauraceae. Es una corteza seca que ha utilizado durante mucho tiempo para dar sabor a los alimentos y en preparaciones farmacéuticas para tratar una variedad de dolencias. Con fines comerciales, en la actualidad se utiliza comúnmente en caramelos, chicles, enjuagues bucales y pasta de dientes (**Pathak & Sharma, 2021**).

Clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

Syzygium aromaticum comúnmente conocido como clavo, calvo de olor o claverero es un árbol de tamaño mediano (8-12 m) de la familia Mirtaceae originario de las islas Maluku en el este de Indonesia. Durante siglos, el comercio del clavo y la búsqueda de esta valiosa especia estimularon el desarrollo económico de esta región asiática. El clavo de olor representa una planta muy interesante con un enorme potencial como conservante de alimentos y como fuente rica en compuestos antioxidantes. Sus actividades biológicas comprobadas sugieren el desarrollo de productos medicinales para uso humano y animal (**Ramírez et al., 2018**).

Pimienta dulce (*Pimenta dioica*)

Pimenta dioica comúnmente conocida como pimienta de Jamaica, es un árbol que produce frutos que se secan y se utilizan como especia en la cocina. La pimienta de Jamaica pertenece a la familia Myrtaceae. El nombre común pimienta de Jamaica fue

propuesto por John Ray, un botánico inglés, quien identificó su sabor como una combinación de clavo, canela y nuez moscada. Es originaria de las Indias Occidentales, sin embargo, también se encuentra en Centroamérica (México, Guatemala, Cuba, Honduras y Costa Rica) y las islas vecinas del Caribe (**Jarquín-Enríquez, Ibarra-Torres, Jiménez-Islas, & Flores-Martínez, 2021**).

Anís estrellado (*Illicium verum*)

El anís estrellado (*Illicium verum*), es un árbol de hoja perenne, de tamaño mediano y fruto en forma de estrella, con una amplia distribución en el suroeste del continente asiático. Además de su uso como especia en la cocina, el anís estrellado es uno de los ingredientes vitales de las plantas medicinales chinas y es ampliamente conocido por sus efectos antivirales. También, posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antihelmínticas, insecticidas, , antinociceptivas, antiinflamatorias, gastroprotectoras, sedantes, expectorantes, espasmolíticas y estrogénicas (**Patra et al., 2020**).

1.1.1.2 Hierbas aromáticas

Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*)

Cymbopogon citratus es una planta aromática de la familia Gramineae conocida como hierba limón. La hierba es una gramínea perenne, nativa y distribuida en Asia, África, América del Sur y del Norte. Contiene un grupo considerable de flavonoides, aceites esenciales, compuestos fenólicos y otros componentes fitoquímicos que poseen actividades farmacológicas como propiedades antiobesidad, antibacterianas, antifúngicas, antinociceptivas, antioxidantes, antidiarreicas y antiinflamatorias (**Oladeji, Adelowo, Ayodele, & Odelade, 2019**).

Cedrón (*Aloysia citrodora*)

Aloysia citrodora es una especie originaria de las áreas áridas del noroeste de la Argentina, Bolivia y Paraguay. Las hojas se utilizan para impartir sabor a limón en aderezos para ensaladas, bebidas frías, ensaladas, frutas, jaleas, platos de verduras y tortillas. Por su aroma particular se utiliza para perfumar diferentes preparaciones como lo son cremas, helados y mermeladas (**Moroni, Ais, & O’Leary, 2022**).

Hoja de naranja (*Citrus aurantium*)

En medicina tradicional se emplean las hojas, flores y cáscara del fruto en una infusión que se utiliza popularmente para el tratamiento de afecciones digestivas y respiratorias, por otro lado, las flores, en jarabe o infusión, así como las otras partes de la planta se usan como tranquilizante nervioso y antidepresivo (**Benshlomo, 2023**).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en la elaboración de una bebida fermentada a base de arroz (*Oryza sativa*).

1.2.2 Objetivos específicos

- Elaborar la bebida fermentada a base de arroz (*Oryza sativa*) utilizando dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*.

- Evaluar el efecto de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en las características fisicoquímicas de la bebida durante el proceso de fermentación.
- Determinar las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto terminado.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Materia prima

Para la realización del proyecto se utilizó como materia prima: Levadura (Panificación: *S. Cerevisiae* / Vinificación: *S. Bayanus*), piña, naranjilla, azúcar, arroz, cedrón, hoja de naranja, hierba luisa, anís estrellado, pimienta dulce, clavo de olor y canela.

2.1.3 Materiales y utensilios

Se utilizaron: envases plásticos de 5 – 6 litros con tapa, vasos de precipitación 250 ml, manguera de grado alimentario, jeringuilla, airlock, pipetas, gotero, bureta 25 – 50 ml, matraz Erlenmeyer 500 ml, matraz de fondo plano 250 ml, matraz de fondo redondo 1000 ,ml, probeta 500 ml, tubo de vidrio, tubo refrigerante, tubos de ensayo, cajas Petri, asa de Digralsky, mechero de alcohol, micropipeta, alcoholímetro de vidrio, densímetro, tamiz/tela filtro, cuchara de acero inoxidable, embudos, ollas, cuchillo.

2.1.4 Equipos

Licuada, refrigeradora, balanza analítica, termómetro, baño de agua, rotavapor, incubadora, bomba de vacío, potenciómetro, refractómetro, cocina.

2.1.5 Reactivos

Hidróxido de sodio 0,1 N, fenolftaleína al 1%, agua destilada, alcohol 20%, ácido fosfórico 88%, disolución de permanganato de potasio 1:20 mol/L, disolución acuosa de bisulfito de sodio 1:20 mol/L, disolución de ácido cromotrópico 1:20 mol/L, ácido sulfúrico 75%, agua peptonada, caldo rappaport, agar PDA, agar XLD.

2.2 Métodos

2.2.1 Elaboración de la bebida fermentada a base de arroz (*Oryza sativa*) utilizando dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*.

2.2.1.1 Formulación base

Tabla 4.

Cantidad de materia prima a utilizar por litro

Ingredientes	Cantidad	Unidades
Agua	1000	ml
Arroz Blanco	75	g
Hojas de Hierbaluisa	10	g
Hojas de Cedrón	10	g
Hojas de Naranja	10	g
Pimienta de Dulce	5	g
Canela	5	g
Anís estrellado	5	g
Clavos de Olor	5	g
Piña	200	g
Naranja	200	g
Azúcar	50	g
Levadura	0.2	g

Fuente: (Jácome, 2016)

2.2.1.2 Diseño experimental

Los tratamientos se prepararon mediante el diseño factorial 2^k con dos réplicas cada uno para el posterior análisis estadístico. En la tabla 5 se detallan los factores y niveles con un total de 4 tratamientos, con dos replicas cada uno, más un blanco de control.

Se estudió la influencia de los siguientes factores:

- **Factor A: Contenido de sólidos solubles en el mosto (1: alta, 0:baja)**

A₀ 10 °Brix

A₁ 20 °Brix

- **Factor b: Tipo de Levadura (1: *S. bayanus*, 0: *S. cerevisiae*)**

b₀ *Saccharomyces cerevisiae* comercial para panificación (Levapan) [liofilizada]

b₁ *Saccharomyces bayanus* para vinificación (Fermivin 4F9) [liofilizada]

Tabla 5.

Diseño 2^k , para conocer la influencia de los factores en el pH, Brix, acidez total y grado alcohólico.

		FACTOR A	
		A0	A1
FACTOR b	b0	R ₁	R ₁
		R ₂	R ₂
	b1	R ₁	R ₁
		R ₂	R ₂

Fuente: Elaboración propia

Tratamientos y sus replicas

A₀b₀R₁: Mosto con 10 °Brix y con *Saccharomyces cerevisiae* réplica 1.

A₀b₀R₂: Mosto con 10 °Brix y con *Saccharomyces cerevisiae* réplica 2

A1b0R1: Mosto con 20 °Brix y con *Saccharomyces cerevisiae* réplica 1

A1b0R2: Mosto con 20 °Brix y con *Saccharomyces cerevisiae* réplica 2

A0b1R1: Mosto con 10 °Brix y con *Saccharomyces bayanus* réplica 1

A0b1R2: Mosto con 10 °Brix y con *Saccharomyces bayanus* réplica 2

A1b1R1: Mosto con 20 °Brix y con *Saccharomyces bayanus* réplica 1

A1b1R2: Mosto con 20 °Brix y con *Saccharomyces bayanus* réplica 2

Blanco: Mosto con °Brix propios de la bebida y sin levadura.

2.2.1.3 Hipótesis

Hipótesis nula (H₀)

El contenido de sólidos solubles y el tipo de levadura no influirá en las características fisicoquímicas y sensoriales de la bebida fermentada.

Hipótesis alterna (H_a)

El contenido de sólidos solubles y el tipo de levadura influirá en las características fisicoquímicas y sensoriales de la bebida fermentada.

2.2.1.4 Elaboración del equipo de fermentación

Para la fermentación de los mostos se construyeron nueve fermentadores con botellas plásticas de capacidad de 6L, este estuvo cerrado herméticamente con un tapón en la parte superior, unido a la trampa de aire (Airlock) y a una maguera que nos ayudó para la recolección de muestras, siguiendo el esquema de la Figura 1. En el Airlock se

añadió alcohol al 20% con el fin de evitar que exista contaminación cruzada en caso de fallar el sistema.

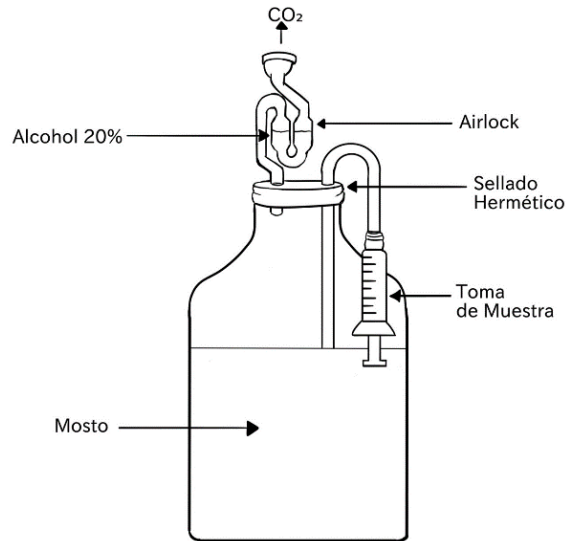


Figura 1. Esquema del equipo de fermentación.
Fuente: Elaboración propia

2.2.1.5 Elaboración de la bebida fermentada

La elaboración de la bebida fermentada se realizó en la Planta piloto y los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Se siguieron los procesos descritos en el diagrama de la Figura 2 y se detallan posteriormente.

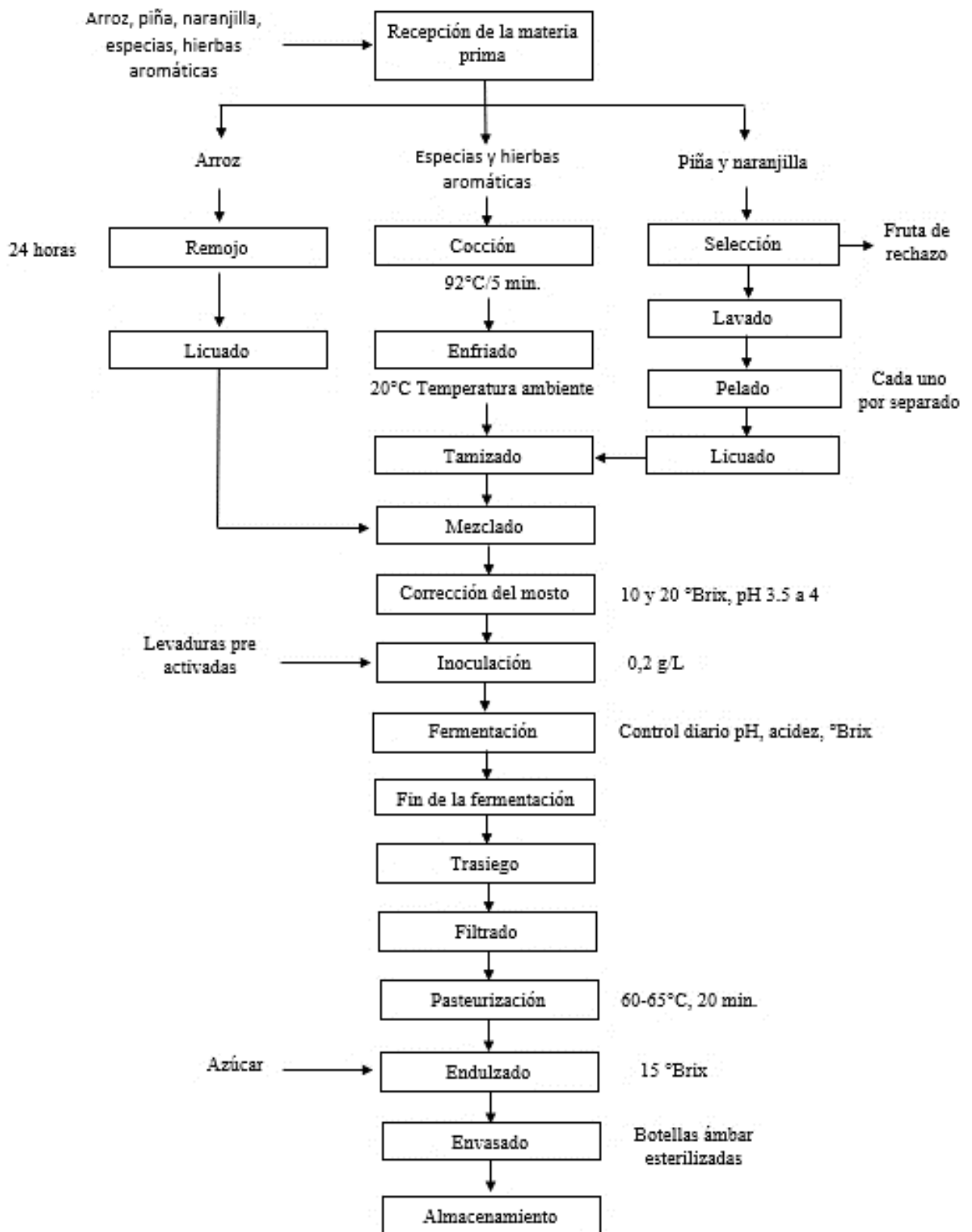


Figura 2. Diagrama de proceso de elaboración de chicha de arroz

Fuente: Elaboración propia

2.2.1.5.1 Recepción y procesado de la materia prima

Se recibió la materia prima y se dividió en tres grupos para su procesamiento:

Remojo y licuado del arroz

Se tomaron 75 g de arroz por cada litro de agua a usar en la elaboración de la chicha, posteriormente se remojó por 24 horas, después se licuó y se mezcló en el mosto (**Jácome, 2016**).

Cocción de especias y hierbas aromáticas

Las especias y hierbas aromáticas se cocieron en aproximadamente 3L de agua a 92°C por 5 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, posteriormente el agua resultante de la cocción se tamizó y se mezcló para formar parte del mosto (**Jácome, 2016**).

Selección, lavado, pelado y licuado de la piña y la naranjilla

La piña y la naranjilla fueron seleccionadas de acuerdo a su nivel de madurez, presencia de daño y uniformidad, fueron lavadas, peladas y licuadas por separado hasta obtener aproximadamente 1L de zumo de cada fruta, este se tamizó para eliminar impurezas, y finalmente se mezcló para formar parte del mosto (**Jácome, 2016**).

2.2.1.5.2 Preparación y corrección del mosto

En cada equipo de fermentación se añadió cinco litros de mosto según las proporciones propuestas en el diseño experimental, la mezcla se homogenizó y posteriormente se

midieron los °Brix, en los tratamientos en estudio se ajustaron de 10 y 20 °Brix con adición de azúcar blanca, siguiendo la siguiente fórmula:

$$(m_1 * °\text{Brix}_1) + (m_2 * °\text{Brix}_2) = m_f * °\text{Brix}_f$$

Donde:

m_1 = Masa de la solución 1

$°\text{Brix}_1$ = °Brix de la solución 1

m_2 = Masa de la solución 2

$°\text{Brix}_2$ = °Brix de la solución 2

m_f = Masa de la solución final

$°\text{Brix}_f$ = °Brix de la solución final

También con la ayuda del potenciómetro, se determinó el pH inicial y se obtuvo una lectura de 4 a 4.5.

2.2.1.5.3 Activación de la levadura e inoculación

Para la fermentación se utilizaron dos tipos de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* para panificación marca “Levapan” y *Saccharomyces bayanus* 4F9 para vinificación de la marca “Fermivin” ambas liofilizadas; las cuales fueron activadas por separado, se usó 0.2 g/l, se activó en 25 ml de mosto, a una temperatura de 35°C por 10 minutos, finalmente se inocularon las levaduras activas en cada tratamiento(Jácome, 2016).

2.2.1.5.4 Fermentación

La fermentación de cada uno de los mostos se realizó a temperatura ambiente de 20-23 °C en un entorno oscuro, donde se controlaron diariamente: pH, acidez y °Brix hasta que dichos parámetros se estabilizaron al quinto día de fermentación.

2.2.1.5.5 Trasego y filtrado

Una vez terminado el proceso de fermentación, se procedió al trasego de la bebida, para este proceso se separó la bebida de los sedimentos con la ayuda de un colador. El líquido recuperado fue posteriormente filtrado al vacío.

2.2.1.5.6 Pasteurizado

Se realizó una pasteurización lenta en un intervalo de 60 – 65 °C por 20 minutos para cada tratamiento, con el fin de conservar el contenido alcohólico producido durante la fermentación (Jácome, 2016).

2.2.1.5.7 Endulzado

La chicha de arroz fue endulzada para que sea agradable al consumidor o catador, para ello se agregó azúcar al producto final hasta obtener 15 °Brix utilizando la fórmula detallada anteriormente en la sección 2.2.1.5.2. (Jácome, 2016).

2.2.1.5.8 Envasado y almacenamiento

Para el envasado se utilizaron envases plásticos de cuatro litros, estos fueron esterilizados con sus respectivas tapas, además con el fin de evitar cambios fisicoquímicos y sensoriales en la bebida, dichos envases son oscuros impidiendo el paso de luz directa. Posterior a su esterilización se procedió a embotellar la bebida, sellar y etiquetar con la fecha de elaboración y nombre de la muestra correspondiente. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración (4°C).

2.2.2 Evaluación del efecto de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* en las características fisicoquímicas de la bebida durante el proceso de fermentación.

Los análisis descritos a continuación fueron realizados en los Laboratorio Académicos y la planta piloto de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.2.1 Sólidos solubles (Grados Brix)

Los sólidos solubles (°Brix), se determinaron mediante el método **AOAC -Official Method 932.12 (1990)**, procedimiento detallado en la **NTE INEN-ISO 2173, (2013)**; con un refractómetro portátil, se tomó una gota de la muestra con ayuda de un gotero y se colocó en el refractómetro, este proceso se realizó a diario hasta que los °Brix en el mosto se estabilizaron y se trabajó por triplicado.

2.2.2.2 pH

La determinación del pH se llevó a cabo según la **NTE INEN-ISO 1842, (2013)** para ello, la muestra fue previamente homogenizada, se colocó en un vaso de precipitación alrededor de 25 ml de muestra, se procedió a introducir los electrodos del potenciómetro previamente calibrado, cuidando que solo tengan contacto con la muestra y no con las paredes y el fondo del vaso se determinó el pH por triplicado diariamente hasta que se establezca en el mosto.

2.2.2.3 Acidez total

Se determinó la acidez en base a la normativa **NTE INEN 2323, (2002)**, donde se describe el método de titulación, para ello se utilizó agua destilada, muestra,

fenolftaleína e hidróxido de sodio 0,1N, esto se realizó por triplicado, posteriormente se realizó el respectivo cálculo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez total(ácido láctico)} = \frac{\text{volumen de NaOH } 0,1 \text{ N X } 0,9}{(\text{volumen de bebida x gravedad específica de la bebida})}$$

Donde:

0.9 = ml equivalentes de una solución de ácido láctico 1.0 N

2.2.3 Determinación de las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto terminado.

Los análisis descritos a continuación fueron realizados en los Laboratorios Académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.3.1 Análisis microbiológicos

Para el análisis microbiológico de las bebidas fermentadas se realizaron dos ensayos por triplicado: mohos y levaduras, y *Salmonella* según la norma NTE INEN 2802, (2015).

Mohos y levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras en las diferentes muestras de bebida se realizó una dilución hasta 10^{-1} , se tomó 10 gramos de muestra por cada tratamiento y se mezclaron en 90 ml de agua peptonada, en bolsas ziploc, se homogenizó y se dejó reposar por 10 min. Posteriormente se sembró en cajas Petri con medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), previamente esterilizado. Todos los pasos se realizaron por triplicado y en condiciones estériles, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas. Luego del tiempo respectivo de incubación se procedió al conteo de las colonias crecidas, y el resultado fue expresado en UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias

por ml) **NTE-INEN-1529-10, (2013)**. Además, se realizó una tinción de Gram y una prueba de catalasa en caso de encontrarse UFC en la muestras.

Salmonella

Para el análisis de *Salmonella* se realizó un pre-enriquecimiento no selectivo. De una dilución de 10^{-1} , se tomó 25 gramos de muestra por cada tratamiento y se mezclaron en 225 ml de agua peptonada, en bolsas ziploc, se homogenizaron y se incubaron las muestras a 37°C durante 24 horas. Posteriormente luego del tiempo de incubación respectivo se procedió a realizar un pre-enriquecimiento selectivo, se tomó 1 ml de las diluciones realizadas anteriormente y se mezclaron con 9 ml de caldo Rappaport en tubos de ensayo, se homogenizaron las muestras y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Luego del tiempo de incubación se procedió a sembrar en cajas Petri con medio de cultivo XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) previamente esterilizado. Todos los pasos se realizaron por triplicado y en condiciones estériles, las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Luego del tiempo respectivo de incubación se procedió al conteo de las colonias, y el resultado fue expresado como ausencia o presencia. Se empleó metodología basada en la normativa **NTE INEN 1529-15, (2013)**.

2.2.3.2 Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial para determinar las características organolépticas propias de la bebida fermentada, como son: olor, color, sabor, acidez, y aceptabilidad a través de la participación de 15 catadores semi-entrenados, se utilizó una ficha de catación con una escala hedónica de 0 a 5 correspondiente a la percepción del catador **NTE INEN-ISO 13301, (2014)**.

Tabla 6.

Parámetros sensoriales

CARACTERÍSTICA	ESCALA
COLOR	1. No tiene 2. Amarillento 3. Crema pálido 4. Crema 5. Crema intenso
OLOR	1. No tiene 2. Ligero 3. Agradable 4. Intenso 5. Muy Intenso
SABOR	1. Desagradable 2. Insípido 3. Débil 4. Bueno 5. Muy bueno
ACIDEZ	1. Nada ácida 2. Poco ácida 3. Ácida 4. Muy ácida 5. Extremadamente ácida
ACEPTABILIDAD	1. Desagradable 2. No me gusta mucho 3. Ni me gusta ni me disgusta 4. Me gusta 5. Me gusta mucho

Fuente: Elaboración propia

2.2.3.3 Análisis fisicoquímicos

Grado alcohólico

Para la determinación del grado alcohólico de la chicha se consideró el método detallado en la normativa **NTE INEN 340, (2016)**. El equipo utilizado en este caso fue el rotavapor, a este se le realizó un lavado previo con agua destilada, después se tomaron 250 ml de muestra, se colocó en el matraz de fondo redondo y se acoplo al rotavapor para su destilación, se establecieron condiciones específicas en el equipo para una destilación óptima y comenzó el proceso, el condensado se recogió en el matraz de fondo redondo, se colocó en una probeta, se añadió agua destilada hasta el volumen de partida (250 ml) y se homogenizó. Para medir el grado alcohólico de la

bebida, se procedió a medir la temperatura del destilado y se colocó el alcoholímetro de vidrio previamente lavado y secado, se soltó dicho instrumento y se esperó hasta que flote y se procedió a la lectura. Finalmente, se observó si la temperatura de calibración del alcoholímetro correspondía a la misma de la muestra destilada, y el contenido de alcohol etílico fue determinado, usando de las tablas del anexo A de **NTE INEN 340, (2016)**. Con los datos de grado alcohólico se determinaron los mejores tratamientos y posteriormente se evaluó la presencia de metanol de los tratamientos elegidos.

Metanol

Para la determinación cualitativa de metanol se tomó en cuenta la metodología propuesta por **López, Alcántara, & Gavilán, (2020)** en un tubo de ensayo se colocaron dos gotas de la muestra, posteriormente se agregó una gota de disolución de ácido fosfórico (1:20) mol/L y una o dos gotas de disolución de permanganato de potasio (1:20) mol/L, se mezcló cuidadosamente y se dejó reposar la mezcla durante un minuto. A continuación, se agregó la disolución acuosa de bisulfito de sodio (1:20) mol/L, gota a gota y agitando, hasta que el color violeta del permanganato de potasio desaparezca. A la disolución incolora resultante, se le agregaron 5 ml de la disolución de ácido cromotrópico ($C_{10}H_6O_8S_2Na_2 \cdot 2H_2O$), este ácido se preparó con 10 mg de reactivo en 20 ml de H_2SO_4 al 75%, y se calentó la mezcla en baño maría aproximadamente a 60°C durante diez minutos. En presencia de metanol se observa una coloración violeta/café, esto es considerado como positivo (+) y en caso de ausencia se identifica como negativo (-).

2.2.3.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se trataron los datos con la ayuda del ANOVA que permitieron conocer la interacción entre los factores A y B (detallados en la sección 2.2.1.2) en el desarrollo de las variables grado alcohólico, acidez, °Brix y pH, y la

prueba de comparación Tukey que indica con mayor detalle dichas interacciones. Para este tratamiento de datos se utilizaron los softwares Exel e InfoStat.

El modelo matemático para este arreglo factorial se definió por la siguiente ecuación:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + \beta_j + (a\beta)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

Tabla 7.

ANOVA para el diseño factorial 2^k con replicación

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	F_{exp}
Factor A	<i>SCA</i>	<i>1</i>	<i>CMA</i>	<i>SCA/CMR</i>
Factor B	<i>SCB</i>	<i>1</i>	<i>CMB</i>	<i>SCB/CMR</i>
Interacción	<i>SC(AB)</i>	<i>1</i>	<i>CM(AB)</i>	<i>SC(AB)/CMR</i>
Residual	<i>SCR</i>	<i>a(n-1)</i>	<i>CMR</i>	
TOTAL	<i>SCT</i>	<i>4n-1</i>	<i>CMT</i>	

Fuente: (Marin, 2014)

Donde:

SCT: Suma total de cuadrados

SCA: S.C. entre niveles de A

SCB: S.C. entre niveles de B

SC(AB): S. C. de la interacción AxB

SCR: S. C. del error

CMT: Cuadrado medio total

CMA: Cuadrado medio de A

CMB: Cuadrado medio de B

CM(AB): Cuadrado medio de la interacción

CMR: Cuadrado medio residual

GL: Grados de libertad

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Elaboración de la bebida fermentada

Se elaboraron los mostos de acuerdo con la formulación detallada en la tabla 8, dichos mostos están formados por la mezcla de los zumos de naranjilla y piña y el agua aromática. Además, la adición de azúcar en cada mosto se realizó con el fin de ajustar los sólidos solubles a 10 y 20 °Brix de acuerdo con el diseño experimental, además en la Tabla 32 se observa la cantidad de azúcar necesaria para llegar a los °Brix deseados. Se utilizó levaduras liofilizadas: *S. cerevisiae* de marca Levapan y *S. bayanus* de marca Fermivin 4F9. Las bebidas se dejaron fermentar a temperatura ambiente en ausencia de luz hasta que los °Brix no varíen, esta estabilización se dio después de 5 días de fermentación.

Tabla 8.

Formulación para cada uno de los tratamientos

Materia prima	Unidades	Tratamientos								Blanco
		A0b0		A1b0		A0b1		A1b1		
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	
Piña	L	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Naranjilla	L	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arroz	g	375	375	375	375	375	375	375	375	375
Agua aromática	L	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
<i>S. Cerevisiae</i>	g	1.1	1.1	1.1	1.1	-	-	-	-	-
<i>S. Bayanus</i>	g	-	-	-	-	1.1	1.1	1.1	1.1	-
Azúcar	g	320.22	317.17	-	-	311.36	311.06	-	-	-

Materia prima	Unidades	Tratamientos								Blanco
		A0b0		A1b0		A0b1		A1b1		
		R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	
(10 °Brix) Azúcar (20 °Brix)	g	-	-	1049. 81	1049. 81	-	-	1039 .5	1049. 81	-

Fuente: Elaboración propia

3.2 Variables analizadas durante la fermentación

Durante la etapa de fermentación de los mostos se evaluaron diariamente los siguientes parámetros:

3.2.1 °Brix

Los sólidos solubles fueron ajustados a 10 y 20 °Brix antes de comenzar la fermentación, de esta manera se aseguró que las levaduras tengan una fuente de carbono suficiente para realizar la fermentación. Además, se realizó un tratamiento control con los °Brix iniciales sin ningún ajuste. En la tabla 9 se refleja el decrecimiento en los °Brix durante el tiempo de fermentación. Se observó que las levaduras tienen buena actividad fermentativa en presencia de azúcares simples dando paso a la formación de producto y generación de biomasa. **Shirai & Malpica, (2013)** menciona que aproximadamente de un 24-26 °Brix es un valor adecuado para obtener un 12% (v/v) de alcohol.

Tabla 9.

Comportamiento de los grados Brix durante los días de fermentación

Tratamientos	Días					
	0	1	2	3	4	5
<i>A0b0</i>	10±0	10±0	8±2.82	5.5±0.7	5±0	4.5±0.7

<i>Tratamientos</i>	<i>Días</i>					
	0	1	2	3	4	5
A1b0	20±0	18.5±0.7	16±1.41	10±2.82	5.5±0.7	5±0
A0b1	10±0	10±0	6±1.41	5±0	3.5±0.7	3.5±0.7
A1b1	20±0	16.5±0.7	12.5±2.12	9±1.41	5.5±0.7	5.5±0.7
Blanco	5	4	4	3	3	3

Fuente: Elaboración propia

En la figura 3 se observa el comportamiento decreciente de los °Brix en función del tiempo, esto debido a que las levaduras consumen los azúcares de una manera constante. Desde el día 0 se observó una mayor actividad en los tratamientos con *S. bayanus*, notable a simple vista por el burbujeo en los airlocks de los fermentadores. Sin embargo, en cuanto a consumo de azúcares, a pesar de que todos tienen un comportamiento similar, en los tratamientos iniciados en 20 °Brix se observa un consumo de azúcares más rápido en comparación a los tratamientos ajustados con 10 °Brix. Por otro lado, el tratamiento de control tuvo una variación poco perceptible de 5 a 3 °Brix. Finalmente, en el día 5 al término de la fermentación los tratamientos se posicionaron en un rango de 4 a 6°Brix.

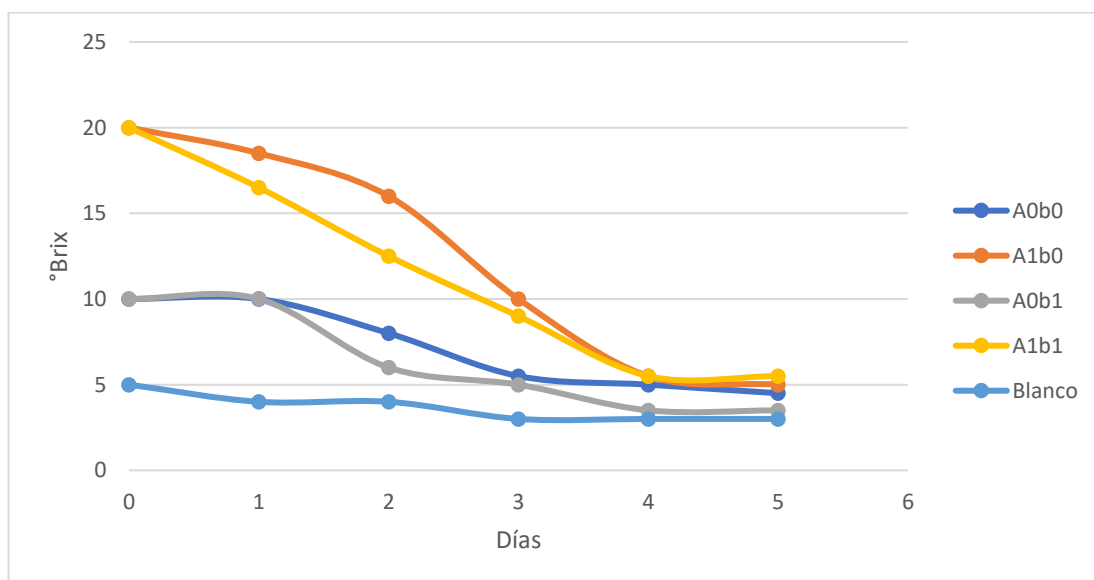


Figura 3. Comportamiento de los °Brix durante el tiempo de fermentación

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 10, el análisis de varianza para los tratamientos, indica que a un nivel de confianza del 95% no existen diferencias significativas para el factor B (tipo de levadura), ni para la interacción A x B (°Brix con respecto al tipo de levaduras), sin embargo, para el factor A (°Brix) se encontraron diferencias significativas, indicando que la concentración de ° Brix iniciales tiene influencia en los °Brix finales de la bebida. Con respecto a la comparación de medias de Tukey en la tabla 23 se observa que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, si existen diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control.

Tabla 10.

ANOVA de la variable °Brix al final de la fermentación

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	F _{exp}	Valor-P
A:brix	3.125	1	3.125	8.33	0.0447
B:levadura	0.125	1	0.125	0.33	0.5946
AB	1.125	1	1.125	3.00	0.1583
Error total	1.5	4	0.375		
Total (corr.)	5.875	7			

Fuente: Elaboración propia

3.2.2 pH

Al inicio de la fermentación el pH de los tratamientos se encontró en un rango de 4.15 a 4.75, no fue necesario realizar corrección de pH debido a que, según **Suárez Machín et al., (2016)** la mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH de 4.0 a 6.5. En la figura 4 y tabla 11, se observa el comportamiento del pH durante el tiempo de fermentación, en el cual, se evidencia ligeras variaciones crecientes y decrecientes en el pH hasta su estabilización al último día de fermentación, donde el pH se encontró en un rango de 3.87 a 4.08. **Puerari, Magalhães-Guedes, & Schwan, (2015)** mencionan que estas variaciones en el pH pueden ocurrir debido la producción de ácidos orgánicos como el ácido láctico formado por la presencia de las bacterias ácido lácticas, que pueden estar

presentes en los alimentos fermentados y comúnmente reducen el pH a valores por debajo de 4,0.

Tabla 11.

Comportamiento del pH durante los días de fermentación

Tratamiento	Días					
	0	1	2	3	4	5
A0b0	4.67±0.1	4.47±0.09	3.91±0.04	3.95±0.07	3.95±0.07	4±0.02
A1b0	4.46±0.09	3.99±0.2	4.03±0.007	3.79±0.15	3.66±0.04	4.05±0.03
A0b1	4.50±0.04	4.31±0.13	3.91±0.05	3.7±0.28	4.005±0.007	4.00±0.03
A1b1	4.26±0.15	4.35±0.06	3.63±0.3	3.87±0.1	3.94±0.12	4±0.05
Blanco	4.67	3.91	4.05	3.9	3.88	3.87

Fuente: Elaboración propia

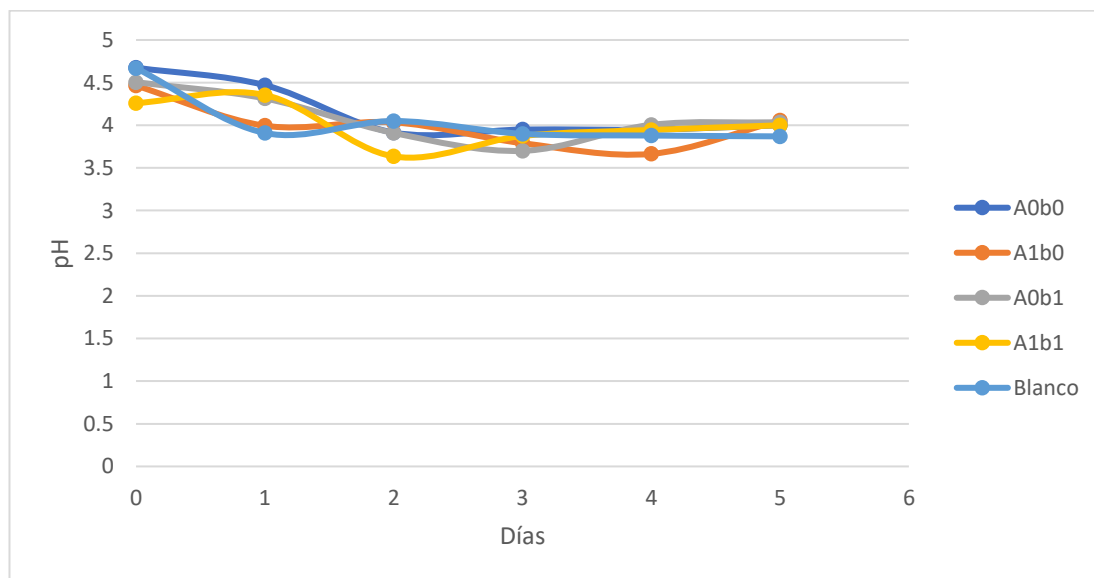


Figura 4. Comportamiento del pH durante el tiempo de fermentación

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza de los tratamientos con respecto a este parámetro se encuentra detallado en la tabla 12, e indica que a un nivel de confianza del 95% no se encontraron diferencias significativas para los factores A (°Brix), B (tipo de levadura) y la interacción A x B (°Brix con respecto al tipo de levaduras), indicando que la variable

de respuesta (pH) no se ve afectada por ninguno de los factores ni por la interacción de estos. En la Tabla 24 se observa la comparación de medias de Tukey donde no existen diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, si existen diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control.

Tabla 12.

ANOVA de la variable pH al final de la fermentación

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	Fexp	Valor-P
A:Brix	0.0002	1	0.0002	0.12	0.7434
B:Levadura	0.0002	1	0.0002	0.12	0.7434
AB	0.00405	1	0.00405	2.49	0.1895
Error total	0.0065	4	0.001625		
Total (corr.)	0.01095	7			

Fuente: Elaboración propia

3.2.3 Acidez

Al igual que en el pH en la acidez como se puede notar en la tabla 13 al inicio de la fermentación una ligera variación de los valores de acidez con un promedio de 0.2 ± 0.06 % de ácido láctico para cada uno de los tratamientos. Como se observa en la figura 5, al llegar al segundo día de fermentación se observó un aumento en la acidez de todos los tratamientos, a partir de este día se encontró una variación de acidez en los días 3 y 4 de la fermentación y finalmente al día 5 la acidez se estableció en valores con un promedio de 0.31 ± 0.08 , teniendo una acidez final en un rango de 0.31 a 0.47 % de ácido láctico.

Según **Pazmiño et al., (2014)** el aumento de la acidez podría atribuirse a la actividad de las bacterias ácido lácticas que pueden estar presentes en el ambiente o en los equipos utilizados, estas descomponen los azúcares para transformarlos en ácido láctico, además como se detalló anteriormente en el efecto del pH, **Puerari, Magalhães-Guedes, & Schwan, (2015)** mencionan que la producción de ácidos

orgánicos en los alimentos fermentados comúnmente reduce el pH produciendo un aumento directo en la acidez en el producto. Además **Costa et al., (2017)** menciona que una mayor acidez del producto puede protegerlo del desarrollo de microorganismos de deterioro, lo que aumenta la vida útil, siempre que no cambie las características sensoriales o tecnológicas del producto. La normativa **NTE INEN 2262, (2013)** (Bebidas alcohólicas. Cerveza. Requisitos) establece un valor máximo de 0.3 % de ácido láctico, se hace la comparación con esta normativa por que no existe una específica para este tipo de productos, los tratamientos elaborados no cumplen con esta normativa, debido a que todos superan el límite permisible. En una investigación realizada por **Pazmiño et al., (2014)** en una chicha de arroz, se reporta un 0.33 % de ácido láctico, evidenciando que se encuentran dentro del rango de característico de este tipo de bebidas tradicionales.

Tabla 13.

Comportamiento de la acidez (% ácido láctico) durante los días de fermentación

Tratamiento	Días					
	0	1	2	3	4	5
A0b0	0.21±0.05	0.21±0.05	0.34±0.12	0.51±0.003	0.56±0.05	0.47±0.06
A1b0	0.17±0	0.22±0.06	0.39±0.18	0.35±0.12	0.31±0.06	0.35±0.06
A0b1	0.22±0.06	0.17±0	0.31±0.06	0.39±0.06	0.22±0.06	0.31±0.06
A1b1	0.15±0.03	0.22±0.06	0.22±0.06	0.22±0.06	0.35±0.12	0.35±0.12
Blanco	0.34	0.26	0.35	0.43	0.52	0.35

Fuente: Elaboración propia

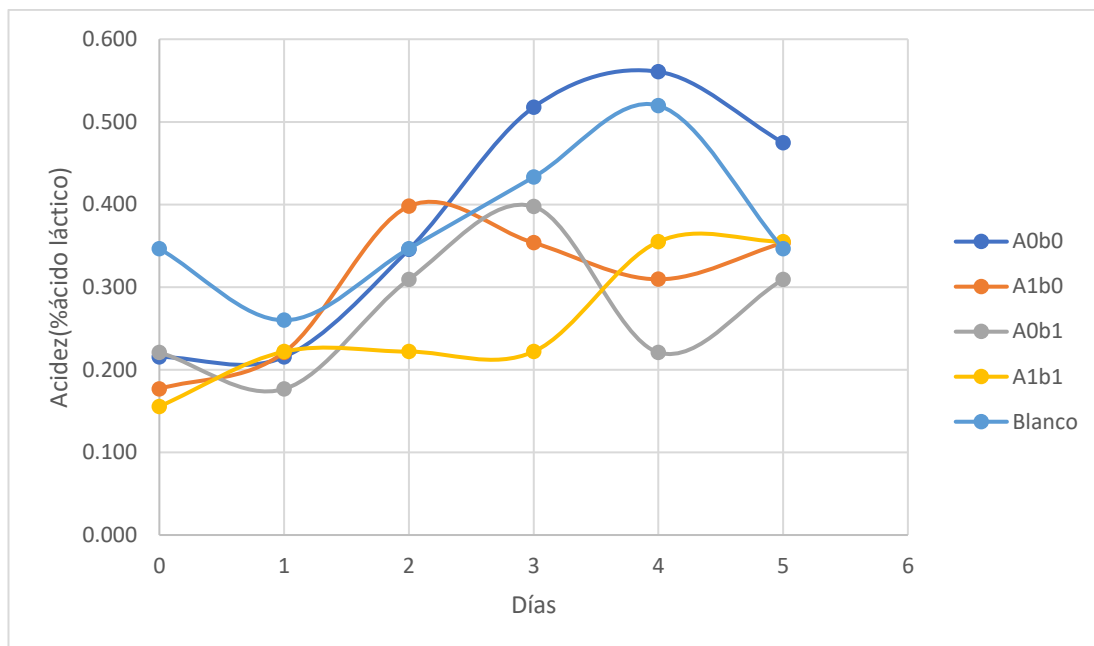


Figura 5. Comportamiento de la acidez durante el tiempo de fermentación
Fuente: Elaboración propia

En la tabla 14, el análisis de varianza para los tratamientos con respecto a este parámetro indica que a un nivel de confianza del 95% no se encontraron diferencias significativas para los factores A (°Brix), B (tipo de levadura) y la interacción A x B (°Brix con respecto al tipo de levaduras), indicando que la variable de respuesta (acidez) no se ve afectada por ninguno de los factores ni por la interacción de estos. En la tabla 25 se refleja la comparación de medias de Tukey donde no existen medias significativamente diferentes entre los tratamientos ni con respecto al testigo.

Tabla 14.

ANOVA de la variable acidez al final de la fermentación

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	Fexp	Valor-P
A:Brix	0.00285012	1	0.00285012	0.42	0.5526
B:Levadura	0.0133661	1	0.0133661	1.97	0.2335
AB	0.0138611	1	0.0138611	2.04	0.2265
Error total	0.0271995	4	0.00679987		
Total (corr.)	0.0572769	7			

Fuente: Elaboración propia

3.3 Determinación de las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del producto terminado.

3.3.1 Grado alcohólico

En la tabla 15 se muestra el porcentaje de grado alcohólico obtenido de cada uno de los tratamientos, estos se encuentran en un rango de 4.3 a 9.5% de alcohol etílico, se observa en la figura 6 que los tratamientos A1b0 y A1b1 poseen un mayor contenido alcohólico teniendo un porcentaje de alcohol en un promedio de 9.1 ± 0.42 y 9.5 ± 0.14 respectivamente, en comparación a los tratamientos A0b0, A0b1, que tienen un promedio de 4.3 ± 0.56 y 7.05 ± 0.63 respectivamente. Los tratamientos que iniciaron su fermentación con 20 °Brix presentan mayor grado alcohólico con respecto a los que empezaron con 10 °Brix, por lo que se estableció que se necesita una cantidad considerable de sólidos solubles para producir la presencia de etanol deseada. En investigaciones realizadas por **Ghosh et al., (2015)** en una bebida fermentada a base de arroz de origen indio se informó que dicha bebida tenía un contenido alcohólico moderado de 2 a 3% mientras que **Chaves-López et al., (2014)** menciona que las chichas poseen un contenido de alcohol del 2 al 12%, es así que todos los tratamientos se encuentran dentro del rango de porcentaje de alcohol característico de este tipo de bebidas tradicionales.

Tabla 15.

Grado alcohólico (%) obtenido al final de la fermentación

Tratamiento	Días	
	0	5
A0b0	0	4.3 ± 0.56
A1b0	0	9.1 ± 0.42
A0b1	0	7.05 ± 0.63
A1b1	0	9.5 ± 0.14

Fuente: Elaboración propia



Figura 6. Porcentaje de grado alcohólico para todos los tratamientos
Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza de los tratamientos con respecto a este parámetro se presenta detallado en la tabla 16, e indica que a un nivel de confianza del 95% si existen diferencias significativas tanto para los factores A ($^{\circ}$ Brix), B (tipo de levadura) así como la interacción A x B ($^{\circ}$ Brix con respecto al tipo de levaduras), indicando que la variable de respuesta (grado alcohólico) se ve afectada por ambos factores y la interacción de estos. Además, en la tabla 26 se observan medias significativamente diferentes entre los tratamientos ajustados inicialmente con 10° Brix en comparación a los ajustados con 20° Brix.

Tabla 16. ANOVA de la variable grado alcohólico al final de la fermentación

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	F _{exp}	Valor-P
A:Brix	26.2813	1	26.2813	113.65	0.0004
B:Levadura	4.96125	1	4.96125	21.45	0.0098
AB	2.76125	1	2.76125	11.94	0.0259
Error total	0.925	4	0.23125		
Total (corr.)	34.9287	7			

Fuente: Elaboración propia

3.3.2 Metanol

Se tomaron en cuenta los mejores tratamientos en cuanto al mayor porcentaje de alcohol etílico generado, estos fueron evaluados cualitativamente para conocer la presencia o ausencia de metanol en el producto final. Es así que se observa en la tabla 17 que los tratamientos evaluados tienen un resultado negativo, es decir que no existe presencia de metanol en las muestras. La **NTE INEN 2802, (2015)** (Bebidas alcohólicas. Requisitos) indica que el límite máximo es de 10mg/100ml por lo cual los tratamientos se encuentran dentro de la normativa vigente.

Tabla 17.

Resultados de la determinación cualitativa de metanol

Tratamientos	Resultado
A1b0	Negativo
A1b1	Negativo

Fuente: Elaboración propia

3.3.3 Análisis microbiológicos

En la tabla 18 se reportan los resultados de los análisis microbiológicos realizados en los tratamientos, en cuanto a mohos y levaduras todos los tratamientos se encuentran dentro del límite establecido según la **NTE INEN 2802, (2015)**, (Bebidas alcohólicas. Requisitos), la cual establece un límite máximo permisible de 10 UFC/ml, por otra parte, en cuanto al análisis de *Salmonella* se establece que esta debe presentar ausencia lo cual también se cumple según lo establecido en la norma. Además, al encontrar UFC en distintas muestras, después de realizar una tinción de Gram se observaron levaduras y bacilos Gram negativos, lo cual supondría bacterias ácido lácticas, también la prueba de catalasa se reportó negativa, por ende, las bacterias presentes en los cultivos no son patógenas. **Pazmiño et al., (2014)** mencionan que entre los microorganismos

encontrados en la chicha de arroz existen bacterias ácido lácticas como *Bacilos*, *Lactobacilos* y *Esporolactobacilos*.

Tabla 18.

Resultados del análisis microbiológico

Parámetros	Tratamientos				
	A ₀ b ₀	A ₁ b ₀	A ₀ b ₁	A ₁ b ₁	Blanco
Mohos y levaduras (UFC/ml)	3.5±2.12	1±1.41	0	1.5±2.12	0
Salmonella	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Elaboración propia

3.3.4 Análisis sensorial

El análisis sensorial se realizó en todos los tratamientos y como se observa en las figuras 7 y 8, la mayoría de las muestras tuvieron resultados similares en los parámetros evaluados, destacando la aceptabilidad general y sabor ya que la mayoría de las muestras tienen un puntaje elevado en estos parámetros. Además, se observa que independientemente de la levadura utilizada estos resultados se mantienen en valores similares. Con respecto al análisis de varianza de los parámetros sensoriales color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad, en las tablas 27, 28, 29, 30 y 31, están detallados los ANOVA de cada uno donde se indica que a un nivel de confianza del 95% no existen diferencias significativas entre las muestras en los atributos evaluados.

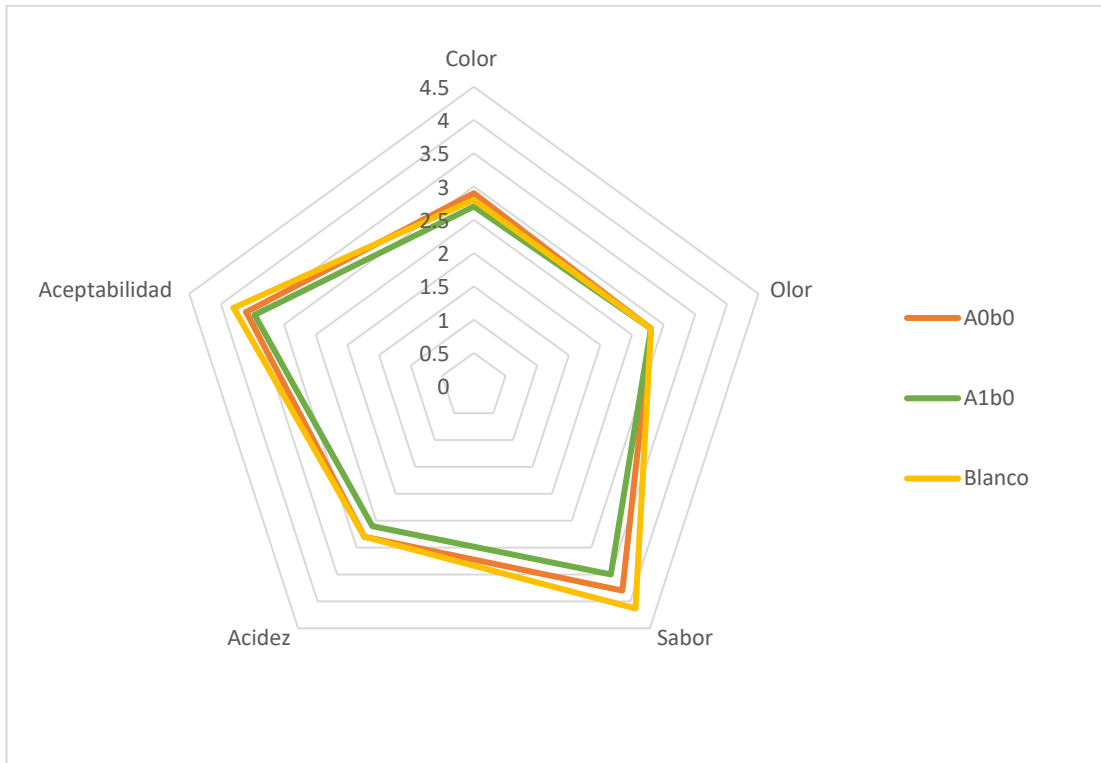


Figura 7. Perfil sensorial de los tratamientos fermentados con *S. Cerevisiae*
Fuente: Elaboración propia

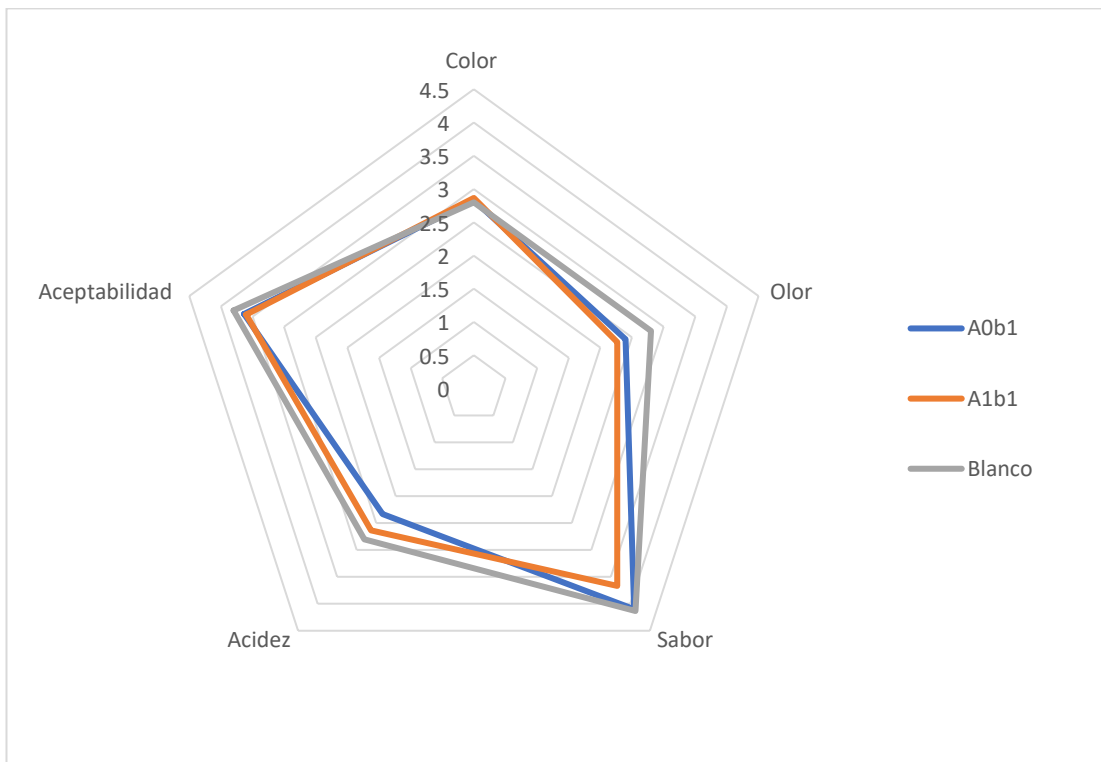


Figura 8. Perfil sensorial de los tratamientos fermentados con *S. Bayanus*
Fuente: Elaboración propia

3.4 Verificación de hipótesis

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede decir que se acepta la Hipótesis alternativa, pero no por completo, ya que el contenido de sólidos solubles y el tipo de levadura influye en algunas características fisicoquímicas, pero no influye en las características sensoriales de la bebida fermentada. Ya que existieron variables evaluadas durante la fermentación que se comportaron de manera similar en todos los tratamientos, existiendo diferencias significativas por parte de los tratamientos con respecto al control. La variación más notable se evidenció en el grado alcohólico de manera que los tratamientos que estaban condicionados a 20 °Brix tuvieron una mayor producción de etanol al finalizar la fermentación.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

3.5 Conclusiones

- Se desarrolló una bebida fermentada a base de arroz (*Oryza sativa*) empleando dos tipos de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*, controlando los parámetros de fermentación como °Brix, pH y acidez consiguiendo así una bebida de características físico químicas, microbiológicas y sensorialmente aceptables para su consumo.
- Tras elaborar la bebida fermentada se notó que tanto *S. cerevisiae* como *S. bayanus* son viables para la fermentación óptima de la bebida a base de arroz, durante este proceso se identificaron algunas diferencias significativas entre los factores, principalmente con respecto a la producción de grado alcohólico. Al inicio de la fermentación, los tratamientos inoculados con *S. bayanus* tuvieron más actividad fermentativa evidenciada en la generación de CO₂ y en la variación temprana de los parámetros evaluados, sin embargo, al pasar el tiempo de fermentación, las levaduras mantienen la variación de los parámetros evaluados, °Brix, acidez y pH mantienen un comportamiento similar.
- Independientemente del tipo de levadura utilizado, los Brix de todos los tratamientos se encontraron en un rango final de 4 a 6 °Brix, por otra parte, el pH final se encontró en un rango de 3.87 a 4.08 y la acidez a pesar de tener variaciones muy notables a lo largo de la fermentación se obtuvo un rango final de 0.31 a 0.47 % de ácido láctico, donde se evidencia que los tratamientos superan el límite permisible dentro de lo establecido en la NTE INEN 2262, (2013).
- Los parámetros evaluados al finalizar la fermentación indicaron tener diferencias significativas, con respecto al grado alcohólico los tratamientos A1b0 y A1b1 poseen un mayor contenido alcohólico estableciendo un promedio de 9.1 ± 0.42 y 9.5 ± 0.14 respectivamente, en cuanto a presencia de metanol se determinó que no existe presencia en ninguno de los tratamientos

evaluados, por parte de los análisis microbiológicos todos los tratamientos se encontraron dentro de lo establecido en la NTE INEN 2802, (2015), además al finalizar el análisis sensorial de los tratamientos no se notaron diferencias significativas en los parámetros color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad.

3.6 Recomendaciones

- Realizar un análisis de la composición nutricional de la bebida, considerando que esta pueda tener algún beneficio para la salud.
- Evaluar la vida útil de las bebidas fermentadas a base de arroz a diferentes temperaturas de almacenamiento.
- Explorar materias primas alternativas en la elaboración de la bebida fermentada para brindar diferentes perfiles de sabor en la calidad sensorial.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- AOAC -Official Method 932.12. (1990). Fruits and fruit products. Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Product: Refractometer . *AOAC International*, 384(1932), 1.
- Arias. (2016). CHICHA: CERVEZA ANTIGUA DEL ECUADOR. Retrieved May 18, 2023, from <https://soleq.travel/es/cultura-ecuatoriana/chicha-cerveza-antigua-del-ecuador>
- Benshlomo, O. (2023). *Citrus aurantium L.* 4(1), 88–100. Retrieved from <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:59600-2>
- Blanco, G. (2018). Proceso de elaboración de chicha andina a partir de la cáscara de piña. *Trilogía*, 30(41), 43–46.
- Castro, W. (2019). La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam .) en Ecuador. *Samuel Feijóo*, 1, 1–31. Retrieved from <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/12219/Naranjilla.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031–1048. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- Costa, K. K. F. D., Soares Júnior, M. S., Rosa, S. I. R., Caliarí, M., & Pimentel, T. C. (2017). Changes of probiotic fermented drink obtained from soy and rice byproducts during cold storage. *Lwt*, 78, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.017>
- Da Silva Vale, A., Venturim, B. C., da Silva Rocha, A. R. F., Martin, J. G. P., Maske, B. L., Balla, G., ... de Melo Pereira, G. V. (2023). Exploring Microbial Diversity of Non-Dairy Fermented Beverages with a Focus on Functional Probiotic Microorganisms. *Fermentation*, Vol. 9.

<https://doi.org/10.3390/fermentation9060496>

De Bernardi, L. (2020). *Desarrollo Productivo Y Comercial Del Arroz* (pp. 1–7). pp. 1–7.

Fermivin. (2019). *4F9 Para vinos blancos y Rosados Aromáticos con largo final en boca* (p. 34603). p. 34603.

Ferreira, M. M., Del, M., Schwab, C., Gerard, L. M., Davies, C. V., Cristina, M., ... Leal, A. S. (2014). Requerimientos nutricionales de un cultivo iniciador de *Saccharomyces cerevisiae* utilizado en la elaboración de vino de naranja. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(1), 38–42. Retrieved from http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562014000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Ghosh, K., Ray, M., Adak, A., Dey, P., Halder, S. K., Das, A., ... Mondal, K. C. (2015). Microbial, saccharifying and antioxidant properties of an Indian rice based fermented beverage. *Food Chemistry*, 168, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.042>

Grijalva-Vallejos, N., Aranda, A., & Matallana, E. (2020). Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 317. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108462>

Hossain, M. F. (2016). World pineapple production: An overview. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 16(4), 11443–11456. <https://doi.org/10.18697/ajfand.76.15620>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1992). *Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria. Bebidas Alcohólicas. Definiciones. INEN 338 Cuarta Revisión 1992-07*.

Jácome, A. (2016). *Estandarización de la elaboración de chicha de arroz con fines comerciales*. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL.

Januszek, M., Satora, P., Wajda, L., & Tarko, T. (2020). *Saccharomyces bayanus* enhances volatile profile of apple brandies. *Molecules*, 25(14), 3127.

<https://doi.org/10.3390/molecules25143127>

- Jarquín-Enríquez, L., Ibarra-Torres, P., Jiménez-Islas, H., & Flores-Martínez, N. L. (2021). Pimenta dioica: a review on its composition, phytochemistry, and applications in food technology. *International Food Research Journal*, 28(5), 893–904. <https://doi.org/10.47836/ifrj.28.5.02>
- Jimenez, M. E., O'Donovan, C. M., Ullivarri, M. F. de, & Cotter, P. D. (2022). Microorganisms present in artisanal fermented food from South America. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.941866>
- López de la Maza, L. E., Zumalacárregui de Cárdenas, L., & Pérez Ones, O. (2019). Application of principal component analysis to alcoholic fermentation. *Revista Científica de La UCSA*, 6(2), 11–19. <https://doi.org/10.18004/ucsa/2409-8752/2019.006.02.011-019>
- López, N., Alcántara, L., & Gavilán, I. (2020). Validación de la determinación cualitativa y cuantitativa de metanol en bebidas alcohólicas: un enfoque docente. *Universidad Autónoma Metropolitana Revista Tediq*, 6(6), 12–18.
- Marin, M. (2014). Modelo de diseños factoriales y diseños 2k. *Universidad Carlos III de Madrid*, 45. Retrieved from <http://halweb.uc3m.es/esp/Personal/personas/jmmarin/esp/Disenno/tema3DE.pdf>
- Ministerio de Cultura y Patrimonio. (2015). Chicha, bebida ceremonial y milenaria – Ministerio de Cultura y Patrimonio. Retrieved May 18, 2023, from <https://www.culturaypatrimonio.gob.ec/chicha-bebida-ceremonial-y-milenaria/>
- Mohd Ali, M., Hashim, N., Abd Aziz, S., & Lasekan, O. (2020). Pineapple (*Ananas comosus*): A comprehensive review of nutritional values, volatile compounds, health benefits, and potential food products. *Food Research International*, Vol. 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109675>
- Moroni, P., Ais, J., & O'Leary, N. (2022). Las Verbenáceas comestibles de América: Una revisión bibliográfica. *Darwiniana, Nueva Serie*, 10(1), 307–323. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2022.101.1023>

- Naranjo, M., Galarza, I., & Falcón, S. (2016). Gastronomía, historia y cultura afrodescendiente de las comunidades Chota y Salinas en Imbabura, Ecuador. *Ecos de La Academia*, 2(04), 43–51. Retrieved from <http://revistasoj.s.utn.edu.ec/index.php/ecosacademia/article/view/84/80>
- NCBI. (2020). *Saccharomyces bayanus*. Retrieved May 19, 2023, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=txid4931%5Borgn%5D>
- NTE-INEN-1529-10. (2013). CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOSY LEVADURAS VIABLES. RECUENTOS EN PLACA PORSIEMBRA EN PROFUNDIDAD. Retrieved July 8, 2023, from Norma técnica Ecuatoriana website: <https://es.scribd.com/document/488093112/1529-10-1R-MOHOS-Y-LEVADURAS-VIABLES-pdf>
- NTE INEN-ISO 13301. (2014). ANÁLISIS SENSORIAL. METODOLOGÍA. GUÍA GENERAL PARA LA MEDICIÓN DEL OLOR, DE LA SENSACIÓN OLFATO-GUSTATIVA Y DEL GUSTO MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO DE ELECCIÓN FORZOSA DE UNA ENTRE TRES ALTERNATIVAS (EFA-3). (ISO 13301:2002, IDT). *Norma Técnica Ecuatoriana*. Retrieved from https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas23/nte_inen_iso_13301extracto.pdf
- NTE INEN-ISO 1842. (2013). PRODUCTOS VEGETALES Y DE FRUTAS – DETERMINACIÓN DE pH (IDT). In *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. Retrieved from <https://docplayer.es/49005374-Quito-ecuador-norma-tecnica-ecuatoriana-nte-inen-iso-1842-2013-extracto-productos-vegetales-y-de-frutas-determinacion-de-ph-idt.html>
- NTE INEN-ISO 2173. (2013). PRODUCTOS VEGETALES Y DE FRUTAS – DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES –MÉTODO REFRACTOMÉTRICO (IDT). In *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. Retrieved from <https://docplayer.es/10151566-Quito-ecuador-norma-tecnica-ecuatoriana-nte-inen-iso-2173-2013-extracto.html>
- NTE INEN 1529-15. (2013). CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. SALMONELLA. MÉTODO DE DETECCIÓN. Retrieved July

5, 2023, from Norma técnica Ecuatoriana website:
<https://es.scribd.com/document/422765462/1529-15-1R>

NTE INEN 2262. (2013). *BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. REQUISITOS.* 2262.

NTE INEN 2323. (2002). *BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL.* Retrieved July 5, 2023, from Instituto Ecuatoriano de Normalización website:
<https://www.studocu.com/bo/document/universidad-mayor-de-san-simon/quimica-analitica/2323-acidez-de-la-cerveza/30261287>

NTE INEN 2802. (2015). *BEBIDAS ALCOHÓLICAS. COCTELES O BEBIDAS ALCOHÓLICAS MIXTAS Y LOS APERITIVOS. REQUISITOS.* Retrieved from <https://docplayer.es/230206901-Nte-inen.html>

NTE INEN 340. (2016). *BEBIDAS ALCOHÓLICAS. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOL ETÍLICO. MÉTODO DEL ALCOHOLÍMETRO DE VIDRIO.* In *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. Retrieved from https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_1996-1.pdf

Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., Ayodele, D. T., & Odelade, K. A. (2019). Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. *Scientific African*, 6, e00137. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00137>

Padín González, C., & Díaz Fernández, M. (2015). Fermentación alcohólica. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29, 110–116. Retrieved from https://www.quimica.es/enciclopedia/Fermentación_alcohólica.html

Pathak, R., & Sharma, H. (2021). A Review on Medicinal Uses of *Cinnamomum verum* (Cinnamon). *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(6-S), 161–166. <https://doi.org/10.22270/jddt.v11i6-s.5145>

Patra, J. K., Das, G., Bose, S., Banerjee, S., Vishnuprasad, C. N., del Pilar Rodriguez-Torres, M., & Shin, H. S. (2020). Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance.

Anexos

Anexo A. Datos experimentales

Tabla 19.

Comportamiento de los grados Brix durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos y sus réplicas.

Tratamientos	Días					
	0	1	2	3	4	5
A₀b₀R₁	10	10	6	5	5	4
A₀b₀R₂	10	10	10	6	5	5
A₁b₀R₁	20	19	17	12	6	5
A₁b₀R₂	20	18	15	8	5	5
A₀b₁R₁	10	10	5	5	3	3
A₀b₁R₂	10	10	7	5	4	4
A₁b₁R₁	20	16	11	8	5	5
A₁b₁R₂	20	17	14	10	6	6
Blanco	5	4	4	3	3	3

Tabla 20.

Comportamiento del pH durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos y sus réplicas.

Tratamientos	Días					
	0	1	2	3	4	5
A₀b₀R₁	4.75	4.54	3.95	4	4	4.02
A₀b₀R₂	4.6	4.4	3.88	3.9	3.9	3.98
A₁b₀R₁	4.53	4.2	4.04	3.9	3.63	4.03
A₁b₀R₂	4.4	3.79	4.03	3.68	3.7	4.08
A₀b₁R₁	4.54	4.22	3.87	3.9	4	4.06
A₀b₁R₂	4.47	4.41	3.95	3.5	4.01	4.01
A₁b₁R₁	4.15	4.31	3.37	3.95	4.03	4.04
A₁b₁R₂	4.37	4.4	3.9	3.8	3.86	3.96
Blanco	4.67	3.91	4.05	3.9	3.88	3.87

Tabla 21.

Comportamiento de Acidez en % de ácido láctico durante los días de fermentación para cada uno de los tratamientos y sus réplicas.

Tratamientos	Días					
	0	1	2	3	4	5
A₀b₀R₁	0.258	0.258	0.258	0.515	0.601	0.429
A₀b₀R₂	0.173	0.173	0.434	0.520	0.520	0.520
A₁b₀R₁	0.177	0.265	0.530	0.265	0.354	0.398
A₁b₀R₂	0.177	0.177	0.265	0.442	0.265	0.309
A₀b₁R₁	0.177	0.177	0.265	0.442	0.177	0.265
A₀b₁R₂	0.265	0.177	0.354	0.354	0.265	0.354
A₁b₁R₁	0.179	0.179	0.179	0.179	0.268	0.268
A₁b₁R₂	0.133	0.265	0.265	0.265	0.442	0.442
Blanco	0.346	0.260	0.346	0.433	0.520	0.346

Tabla 22.

Grado alcohólico (%) para cada uno de los tratamientos y sus réplicas.

Tratamiento	Días	
	0	5
A₀b₀R₁	0	4.7
A₀b₀R₂	0	3.9
A₁b₀R₁	0	8.8
A₁b₀R₂	0	9.4
A₀b₁R₁	0	7.5
A₀b₁R₂	0	6.6
A₁b₁R₁	0	9.6
A₁b₁R₂	0	9.4

Anexo B. Resultados estadísticos

Tabla 23.

Comparación de medias Tukey del efecto de los °Brix en los tratamientos

Tratamiento	Medias	n	EE	
A0b1	3.50	2	0.43	A
A0b0	4.50	2	0.43	A
A1b0	5.0	2	0.43	A
A1b1	5.5	2	0.43	A
Blanco	3.0	2	0.61	B

Tabla 24.

Comparación de medias Tukey del efecto del pH en los tratamientos

Tratamiento	Medias	n	EE	
A0b0	4.00	2	0.03	A
A1b1	4.00	2	0.03	A
A0b1	4.04	2	0.03	A
A1b0	4.04	2	0.03	A
Blanco	3.87	2	0.04	B

Tabla 25.

Comparación de medias Tukey del efecto de la acidez en los tratamientos

Tratamiento	Medias	n	EE	
A0b1	0.31	2	0.03	A
A1b0	0.36	2	0.03	A
A1b1	0.36	2	0.03	A
A0b0	0.48	2	0.03	A
Blanco	0.35	2	0.04	A

Tabla 26.*Comparación de medias Tukey del efecto del grado alcohólico en los tratamientos*

Tratamiento	Medias	n	EE		
A0b0	4.30	2	0.34	A	
A0b1	7.05	2	0.34		B
A1b0	9.10	2	0.34		C
A1b1	9.50	2	0.34		C

Tabla 27.*ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto al color*

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	Fexp	Valor-P
Tratamiento	2.13333333	8	0.26666667	0.44444444	0.89216856
Error	75.6	126	0.6		
Total	77.7333333	134	0.5800995		

Tabla 28.*ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto al olor.*

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	Fexp	Valor-P
Tratamiento	7.881481481	8	0.985185185	1.66547406	0.113148275
Error	74.53333333	126	0.591534392		
Total	82.41481481	134	0.615035931		

Tabla 29.*ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto al sabor*

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	Fexp	Valor-P
Tratamiento	11.3925926	8	1.42407407	1.66759603	0.11260346
Error	107.6	126	0.85396825		
Total	118.992593	134	0.88800442		

Tabla 30.*ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto a la acidez*

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	F_{exp}	Valor-P
Tratamiento	4.37037037	8	0.5462963	0.5660636	0.8040104
Error	121.6	126	0.96507937		
Total	125.97037	134	0.94007739		

Tabla 31.*ANOVA del análisis sensorial de los tratamientos con respecto a la aceptabilidad*

F.V.	S. C.	G. L.	C. M.	F_{exp}	Valor-P
Tratamiento	1.73333333	8	0.21666667	0.32244094	0.95621391
Error	84.6666667	126	0.67195767		
Total	86.4	134	0.64477612		

Anexo C. cálculos.**Ajuste de brix inicial**

$$(m_1 * \text{Brix}) + (m_2 * \text{Brix}) = m_f * \text{Brix}$$

$$(5.76\text{Kg} * 5^\circ\text{Brix}) + (X\text{Kg} * 100^\circ\text{Brix}) = (5.76\text{Kg} + X) (10^\circ\text{Brix})$$

$$28.8 + 100X = 57.6 + 10 X$$

$$90X = 28,8$$

$$X = 0,32 \text{ Kg}$$

$$X = 320.22 \text{ g}$$

$$(m_1 * \text{Brix}) + (m_2 * \text{Brix}) = m_f * \text{Brix}$$

$$(5.59\text{Kg} * 5^\circ\text{Brix}) + (X\text{Kg} * 100^\circ\text{Brix}) = (5.59\text{Kg} + X) (20^\circ\text{Brix})$$

$$27.95 + 100X = 111.98 + 20 X$$

$$80X = 84.03$$

$$X = 1.049 \text{ Kg}$$

$$X = 1049.81 \text{ g}$$

Tabla 32.

Ajuste de °Brix inicial

Tratamiento	Ajuste de azúcar en los mostos (g)
A0b0R1	320.22
A0b0R2	317.17
A1b0R1	1049.81
A1b0R2	1049.81
A0b1R1	311.36
A0b1R2	311.06
A1b1R1	1039.50
A1b1R2	1049.81

Anexo D. Figuras.



Figura 9. Obtención de las materias primas



Figura 10. Preparación de los mostos



Figura 11. Activación de levaduras



Figura 12. Reposo de los mostos durante el tiempo de fermentación



Figura 13. Análisis fisicoquímicos diarios



Figura 14. Filtración al vacío y pasteurización de las muestras



Figura 15. Embotellado y etiquetado de la bebida



Figura 16. Análisis microbiológicos



Figura 17. Determinación de grado alcohólico



Figura 18. Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b0R1

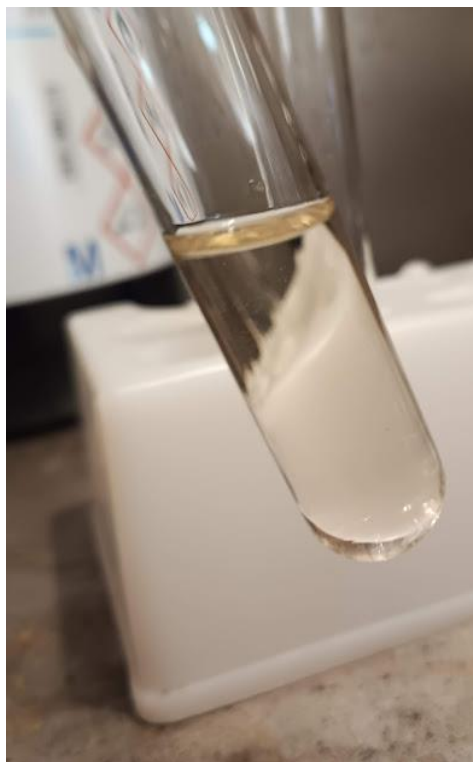


Figura 19. Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b0R2

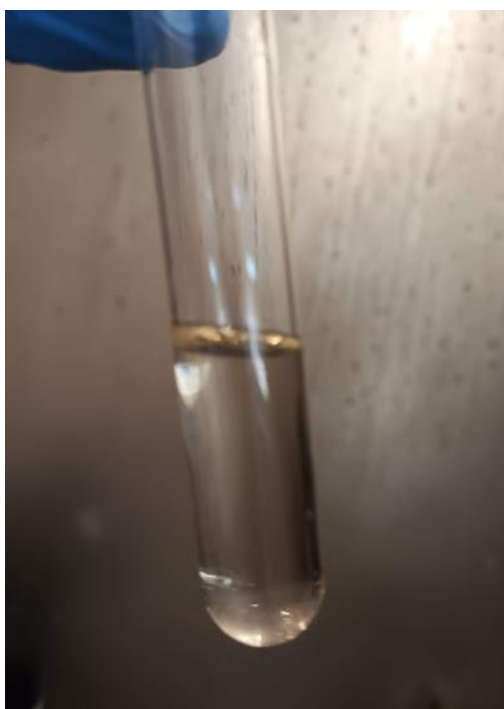


Figura 20. Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b1R1



Figura 21. Prueba negativa de presencia de metanol para el tratamiento A1b1R2



Figura 22. Análisis sensorial

UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

Nombre: **Fecha:**

A continuación, usted será participe de una cata para evaluar parámetros sensoriales de una chicha a base de arroz. La presente prueba es una escala hedónica donde se evaluarán atributos sensoriales de color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad.

Característica	Escala	Muestra									
		SC14	BT13	MX29	CS21	BS17	XB14	SB21	MB20	MB21	
COLOR	1. No tiene										
	2. Amarillento										
	3. Crema pálido										
	4. Crema										
	5. Crema intenso										
OLOR	1. No tiene										
	2. Ligero										
	3. Agradable										
	4. Intenso										
	5. Muy Intenso										
SABOR	1. Desagradable										
	2. Insípido										
	3. Débil										
	4. Bueno										
	5. Muy bueno										
ACIDEZ	1. Nada ácida										
	2. Poco ácida										
	3. Ácida										
	4. Muy ácida										
	5. Extremadamente ácida										
ACEPTABILIDAD	1. Desagradable										
	2. No me gusta										
	3. Ni me gusta ni me disgusta										
	4. Me gusta										
	5. Me gusta mucho										

OBSERVACIONES:

.....

¡Gracias por su participación!

Figura 23. Hoja de cata