



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



---

**Tema: Desarrollo de una bebida a base de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con doble fermentación.**

---

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autora:** Paola Gissela Goyes Tituaña  
**Tutora:** PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

**AMBATO – ECUADOR**  
**Enero - 2020**

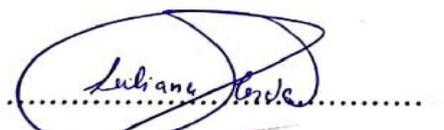
## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía**

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que corresponde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 11 de Diciembre del 2019



**Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía**

**C.I. 1804148086**

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Paola Gissela Goyes Tituaña, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad 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.



Srta. Paola Gissela Goyes Tituaña

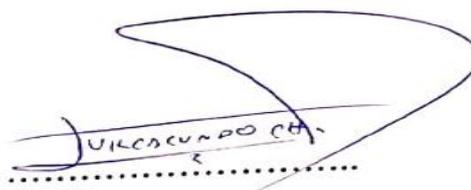
C.I. 1804668679

**AUTORA**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad 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:**

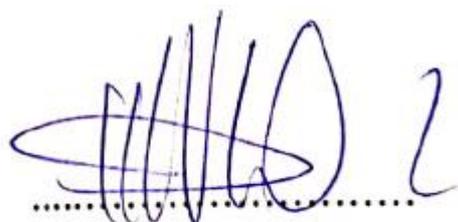
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'JULIO CUNDO', is written over a horizontal dotted line. The signature is enclosed within a large, stylized blue loop.

Presidente del Tribunal de Grado

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dotted line. The signature is highly stylized and cursive.

Dr. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal dotted line. The signature consists of several vertical strokes followed by a large loop and a final flourish.

Lic. MSc. Paulo Santiago Baquero Icaza

C.I. 1803233541

Ambato, 07 de Enero del 2020

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación 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 proyecto de investigación, con fines de difusión pública; además, apruebo la reproducción de este proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Srta. Paola Gissela Goyes Tituaña

C.I. 1804668679

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

*A Dios por ser mi guía, mi luz y mi fortaleza cada día en momentos difíciles.*

*A mi madre y mi hermana quienes son mi razón e inspiración de alcanzar el éxito.*

*A mis ángeles que me cuidan y estoy segura que estarían muy orgullosos de este logro.*

*“El Señor es mi pastor; nada me faltará”*

*(Salmos 23:1)*

## **AGRADECIMIENTO**

*A Dios, por todas sus bendiciones derramadas sobre mi familia, porque donde acabaron mis fuerzas estaban las de él sacándome adelante.*

*A ti madre, mi máspreciado tesoro, porque me consolaste en los momentos más difíciles, apoyaste mis buenas y malas decisiones, además, de aguantar mis malos genios, gracias por ser mi inspiración, mi pilar mi parte fundamental para seguir adelante, aquella mujer valiente que nunca me dejó caer mucho menos permitió rendirme ante cualquier adversidad, porque a más de ser mi madre eres mi amiga, mi confidente y acompañante de mis locuras. ¡¡Te amo mami!!*

*A mi princesa Wendy mi pequeña hermosa mi hermana chiquita, que hace de mis días los más hermosos, porque con su inocencia me saca una sonrisa, alegra mis días, haciéndome olvidar todos mis problemas.*

*A una persona muy especial en mi vida Jaime Cuzco, gracias por aconsejarme y comprenderme, por sus enseñanzas y apoyo para poder culminar con éxito mi carrera.*

*A mi tutora Ing. Lily por su apoyo incondicional, por sus consejos, su seguimiento y enseñanzas para la realización de este trabajo. Muchas gracias por su amistad por sus palabras de aliento nunca la olvidaré.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACION DEL AUTOR .....	ii
DECLARACION DE AUTENTICIDAD.....	ii
APROBACION DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO .....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
INDICE DE TABLAS .....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xi

### CAPÍTULO I

#### MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS .....	3
1.2 OBJETIVOS .....	5
1.2.1 General.....	5
1.2.2. Específicos .....	5
1.3 HIPÓTESIS.....	5
1.3.1 Hipótesis nula.....	5
1.3.2 Hipótesis alternativa.....	6
1.4 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS .....	6
1.4.1 Variable Independiente .....	6

1.4.2	Variable dependiente.....	6
-------	---------------------------	---

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

2.1.	MATERIALES .....	7
2.1.1	Materia Prima.....	7
2.2.	MÉTODOS .....	7
2.2.1	Elaboración de la bebida.....	7
2.2.1.1	Activación del microorganismo .....	7
2.2.1.2	Crecimiento del microorganismo en el sustrato.....	8
2.2.1.3	Fermentación en medio solido (FMS).....	8
2.2.1.4	Fermentación en medio líquido (FML).....	8
2.2.2	Análisis Sensorial.....	9
2.2.3	Estimación del tiempo de vida útil.....	10
2.2.3.1	Determinación de pH .....	10
2.2.3.2	Determinación de acidez titulable.....	10
2.2.3.3	Análisis microbiológico .....	11
2.2.4	Análisis Proximal.....	11
2.2.4.1	Determinación de humedad .....	11
2.2.4.2	Determinación de proteína.....	12
2.2.4.3	Determinación de grasa.....	12
2.2.4.4	Determinación de fibra.....	13

2.2.6 Determinación de perfil de ácidos grasos .....	15
2.2.7 Diseño Experimental.....	16
2.2.8 Análisis estadístico.....	17

### **CAPÍTULO III**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

3.1 Análisis y discusión de resultados .....	18
3.1.1 Crecimiento del microorganismo en el sustrato.....	18
3.1.2 Análisis Sensorial.....	19
3.1.3 Vida útil del mejor tratamiento .....	20
3.1.3.1 pH y acidez .....	20
3.1.3.2 Análisis microbiológico .....	23
3.1.4 Análisis Proximal.....	25
3.1.5 Análisis de Perfil de ácidos grasos.....	26
3.2 VERIFICACION DE LA HIPOTESIS.....	28

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1 CONCLUSIONES .....	29
MATERIAL DE REFERENCIA .....	31
ANEXOS .....	36

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Porcentajes del sustrato utilizado.....	8
<b>Tabla 2:</b> Parámetros sensoriales.....	9
<b>Tabla 3:</b> Factores y niveles del diseño experimental .....	16
<b>Tabla 4:</b> Combinaciones experimentales .....	16
<b>Tabla 5:</b> Selección del mejor tratamiento mediante análisis sensorial de los diferentes tratamientos	19
<b>Tabla 6:</b> Tiempo de vida útil para el parámetro pH.....	21
<b>Tabla 7:</b> Tiempo de vida útil para el parámetro de acidez .....	23
<b>Tabla 8:</b> Resultados de los análisis microbiológicos para la bebida fermentada .....	24
<b>Tabla 9:</b> Resultados del análisis proximal para la bebida fermentada T1 .....	25
<b>Tabla 10:</b> Descripción cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 replica 1 ....	37
<b>Tabla 11:</b> Descripción cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 réplica 2 ....	38

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Prueba de tukey al 95% de confianza para la variación de proporciones de sustrato, ( 20% de harina de cáscara de cacao -80% de salvado de arroz, 30% de harina de cáscara de cacao -70% de salvado de arroz, 40% de harina de cáscara de cacao -60% de salvado de arroz, 50% de harina de cáscara de cacao -50% de salvado de arroz, 60% de harina de cáscara de cacao -40% de salvado de arroz, 70% de harina de cáscara de cacao -30% de salvado de arroz, 80% de harina de cáscara de cacao -20% de salvado de arroz.).....	18
<b>Figura 2:</b> Perfil sensorial del control, T1 (proporción 50% harina cáscara de cacao-50% harina salvado de arroz) y T3 (proporción 20% harina cáscara de cacao-80% harina salvado de arroz). ....	20
<b>Figura 3:</b> Evolución del pH para determinación de vida útil a temperatura ambiente y de refrigeración .....	21

<b>Figura 4:</b> Evolución de la acidez para determinación de vida útil a temperatura ambiente y refrigeración.....	22
<b>Figura 5:</b> Recuento de aerobios mesófilos para el tratamiento T1.....	25
<b>Figura 6:</b> Perfil de ácidos grasos saturados para la bebida fermentada T1.....	27
<b>Figura 7:</b> Perfil de ácidos grasos monoinsaturados para la bebida fermentada T1.....	27
<b>Figura 8:</b> Perfil cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 replica 1.....	37
<b>Figura 9:</b> Perfil cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 réplica 2.....	38

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue la elaboración de una bebida fermentada a base de harina de cáscara de cacao y harina de salvado de arroz con fermentación en medio sólido (FMS), en el cual se determinó la mejor proporción y características del sustrato seguido de una fermentación en medio líquido (FML), se utilizó suero de leche liofilizado con una combinación de especies bacterianas como: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

Las proporciones para cada uno de los tratamientos tuvieron influencia sobre el análisis sensorial, con un 34.9% de aceptabilidad el mejor tratamiento fue el tratamiento 1 (T1), con una proporción de 50% harina de cáscara de cacao y 50% de harina de salvado de arroz fermentado *Aspergillus oryzae red*.

Las determinaciones analíticas realizadas fueron: parámetros físico químicos como pH y acidez, con respecto a la parte microbiológica se realizó un recuento de aerobios mesófilos, coliformes totales, *E. coli* y *Listeria monocytogenes* como lo indica NTE INEN 2564, a temperatura ambiente y refrigeración durante 11 días de almacenamiento.

Con respecto al tiempo de vida útil se realizó en base a pH obteniendo 16 días a temperatura ambiente y 32 días en refrigeración, con respecto a la acidez el tiempo de vida útil fue de 8 días a temperatura ambiente y 15 días en refrigeración, mediante el análisis proximal, la bebida fermentada obtuvo un 90.2 % de humedad, 0.873 % de proteína, 0.629 % de cenizas, 1.13 % de lípidos, 1.79 % fibra total, y 5,38 % de carbohidratos.

**Palabras claves:** bebida fermentada, análisis sensorial, harina de cáscara de cacao, salvado de arroz, suero de leche liofilizado.

## ABSTRACT

The objective of this study was the elaboration of a fermented beverage based on cocoa husk flour and rice bran flour with fermentation in FMS solid medium, in which the best proportion and characteristics of the substrate was determined followed by fermentation in Liquid medium (FML), lyophilized whey was used with a combination of bacterial species such as: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

The proportions for each of the treatments had an influence on the sensory analysis, which with 34.9% acceptability, the best treatment was treatment 1 (T1), with a proportion of 50% cocoa shell flour and 50% flour of rice bran with microorganism *Aspergillus orizae* red.

The analytical determinations were: physical chemical parameters such as pH and acidity, with respect to the microbiological part, a count of mesophilic aerobes, total coliforms, *E.coli* and *Listeria monocytogenes* was performed as indicated by NTE INEN 2564, at room temperature and temperature of refrigeration for 11 days of storage.

With respect to the shelf life, it was based on pH, obtaining 16 days at room temperature and 32 days in refrigeration, with respect to acidity, the shelf life was 8 days at room temperature and 15 days in refrigeration, by means of Proximal analysis, the fermented beverage obtained 90.2% moisture, 0.873% protein, 0.629% ash, 1.13% lipids, 1.79% total fiber, and 5.38% carbohydrates.

**Keywords:** fermented beverage, sensory analysis, cocoa husk, rice bran, lyophilized whey.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En la actualidad la competencia en la industria de bebidas exige ser eficiente y demostrar una calidad tecnológica en la búsqueda de nuevos e innovadores procesos industriales, así también mejorar la calidad de los productos sin elevar costos de producción (**Salamanca G., Osorio T., & Montoya, 2010**).

En el país se observa una creciente demanda de nuevos productos enfocados a un estilo de vida más saludable, por tal razón se aprovechará las propiedades de la cascará de cacao y el salvado de arroz para desarrollar una bebida con propiedades nutritivas y organolépticas que beneficien la salud del consumidor (**Villarroel & Ortiz, 2011**).

Según **Castillo, (2014)**, las bebidas que se encuentran en el mercado ecuatoriano son bebidas carbonatadas, jugos, refrescos, bebidas alcohólicas, bebidas lácteas entre otras y se diferencian en su formulación y presentación ante el consumidor; dichas bebidas promueven el aumento de enfermedades como diabetes, obesidad, hipertensión, entre otras en la población debido a su elevado consumo en la actualidad (**Aguayo, 2017**).

Se denomina alimento funcional a cualquier alimento ya sea en su forma natural o procesada, que contengan algún componente adicional aparte de sus componentes nutritivos que favorezcan a la salud física y mental o tenga alguna función benéfica específica en el cuerpo (**Chuquiyauri, 2019**).

El suero de leche que por muchos años ha sido considerado como un desecho, sin embargo en la actualidad se lo utiliza dentro de la industria por sus múltiples nutrientes y por tener propiedades funcionales (**Santillán & Ramos, 2015**). El suero de leche se obtiene después de la coagulación en la elaboración de quesos, está compuesto por agua, proteínas, lactosa, grasa y minerales como calcio, magnesio y fósforo dicha composición varía dependiendo de la calidad de leche utilizada para la elaboración del queso (**Endara, 2002**).

El salvado de arroz denominado como subproducto resultante de la etapa de pulido del grano, que representa entre el 8 y 11% del peso total del grano entero (**Rural &**

**Lozano, 2010**). Es una buena fuente de proteínas, aceites y minerales de alto valor funcional, aporta un contenido significativo de vitaminas como el complejo B y E. Al contener en su composición tocoferoles y tocotrienoles muestra una alta actividad antioxidante, ya que estos compuestos protegen los tejidos animales del envejecimiento y daños provocados por los radicales libres en el medio (**Pestana, Zambiasi, Mendonça, Bruscatto, & Ramosc, 2009**). Cabe mencionar que este subproducto es importante, ya que está lleno de propiedades funcionales con compuestos de muy alto valor, con usos potenciales dentro de la gama de alimentos funcionales, nutraceúticos enriquecidos y fortificados (**Prada & Cortés, 2010**).

El consumo de cascara de cacao en la población podría tener efectos beneficiosos para la salud, debido a que es una excelente fuente de antioxidantes naturales y puede tener la capacidad de prevenir enfermedades cardiovasculares, cancerígenas entre otras (**Ramadhani Khija, ludovick Uttoh, 2015**). Este residuo orgánico aporta nutricionalmente con macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) y micronutrientes (minerales y vitaminas), además de ser una fuente de potasio (**Sánchez, 2013**).

La fermentación en medio solido (FMS) se ha aplicado desde la antigüedad para la preparación de alimentos fermentados; esta fermentación se da por el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre sobre medio sólido o semisólido (**Roussos & Perraud-Gaime, 1996**). La fermentación en medio solido (FMS) en la actualidad es una tecnología de bajo costo utilizada para la producción de alimentos, sabores, biopesticidas y enzimas hidrolíticas. Generalmente se utilizan subproductos de la agroindustria a fin de potenciar su tratamiento y generar un valor agregado a dichos subproductos (**Iztapalapa, Para, & El, 2003**).

Los sustratos a utilizar en la fermentación en medio solido (FMS) no deben ser crudos, ya que no es adecuado para su uso directo en dicha fermentación, por lo tanto se requiere de un pretratamiento en el sustrato como reducción de partícula, contenido de humedad, variación de pH, entre otros (**Araújo et al., 2000**).

A estos sustratos se les añade una solución de sales y hongos como inoculante. Durante varios años los hongos han sido utilizados para fermentaciones biológicas hasta aplicaciones biotecnológicas, uno de los microorganismos responsables en estas

fermentaciones es el *Aspergillus oryzae*, que es un hongo filamentoso capaz de excretar grandes cantidades de enzimas hidrolíticas (Mendoza, Ochoa, Herman, Membrillo, & Aguirre, 2016).

En el lactosuero se encuentran las de la mitad de los sólidos presentes en la leche, por tal razón es un fuente importante de nutrientes (Vela, Castro, Caballero, & Ballinas, 2012), el 73% de los sólidos presentes en el lactosuero es lactosa, las proteínas que se encuentran tienen propiedades funcionales y alto valor nutritivo, ya que contienen triptófano, lisina y aminoácidos azufrados (Morales, Gonzalez, & Jimenez, 2002).

El lactosuero es un producto de alta calidad nutricional, ya que es una fuente rica de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales; el uso de este producto en la elaboración de bebidas de alto valor nutricional es de gran aceptación por parte del consumidor debido a su bajo costo de producción y un excelente grado de calidad alimenticia (Castillo, 2014).

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo General

Desarrollar una bebida a base de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con doble fermentación.

### 1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar los porcentajes apropiados de los diferentes componentes para la elaboración de la bebida.
- Evaluar la aceptabilidad del producto terminado mediante un análisis sensorial.
- Evaluar las características físico químicas, análisis proximal y tiempo de vida útil de anaquel de la bebida obtenida.

## 1.3 HIPÓTESIS

### 1.3.1 Hipótesis nula

H<sub>0</sub>: La harina de cáscara de cacao y el salvado de arroz como ingredientes no influyen en la calidad de la bebida láctea fermentada.

### **1.3.2 Hipótesis alternativa**

H<sub>1</sub>: La harina de cáscara de cacao y el salvado de arroz como ingredientes influyen en la calidad de la bebida láctea fermentada.

## **1.4 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS**

### **1.4.1 Variable Independiente**

- Harina de cáscara de cacao
- Salvado de arroz

### **1.4.2 Variable dependiente**

- Parámetros sensoriales
- Análisis proximal

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **2.1. MATERIALES**

##### **2.1.1 Materia Prima**

El cacao proveniente de la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas, cultivado de forma artesanal, después de haber realizado la selección y limpieza, se procedió a la extracción de la pulpa de la cáscara, a la que posteriormente se secó a temperatura de 60°C en una estufa de convección (Lab Incubator Model: IN-0.10 ) por 24 horas, después se procedió a molerlo en un molinillo de café (DAEWOO, modelo DCG-362), la harina obtenida se introdujo en fundas de papel celofán llevando a esterilizar en un autoclave (HIRAYAM, modelo HV-85) por 2 horas y finalmente se conserva en un lugar fresco y seco para su posterior utilización.

El salvado de arroz proveniente provincia de Santo Domingo, cultivado de manera artesanal, después de ser seleccionado y limpiado de impurezas, se procedió a molerlo en una tritadora de café (DAEWOO, modelo DCG-362), la harina obtenida se introdujo en fundas de papel celofán llevando a esterilizar en una autoclave (HIRAYAM, modelo HV-85) por 2 horas y finalmente se conserva en un lugar fresco y seco para su posterior utilización.

#### **2.2. MÉTODOS**

##### **2.2.1 Elaboración de la bebida**

###### **2.2.1.1 Activación del microorganismo**

Se utilizó *Aspergillus oryzae* cepa comercial adquirida liofilizada en Gemcultures USA, del tipo red. Los liofilizados se activaron en tubos de ensayo con 9 mL de caldo de papa dextrosa y 1 g de microorganismo con lo cual se inoculó 200 µl en agar PDA (Agar papa dextrosa), a 30°C por 5 días.

### 2.2.1.2 Crecimiento del microorganismo en el sustrato

En la Tabla 1, se detalla la proporción de sustratos utilizados en la fase de fermentación en medio sólido.

**Tabla 1:** Porcentajes del sustrato utilizado.

<b>Tratamiento</b>	<b>Harina cascara de cacao (%HCC)</b>	<b>Harina de salvado de arroz (%HS)</b>
T1	50	50
T2	40	60
T3	20	80
T4	80	20
T5	60	40
T6	30	70
T7	70	30

### 2.2.1.3 Fermentación en medio sólido (FMS)

Se realizó en cajas petri con alrededor de 10 g de sustrato para cada tratamiento hasta alcanzar una humedad del 80%, se inoculó el hongo y se incubó a 30°C por 72 horas.

### 2.2.1.4 Fermentación en medio líquido (FML)

Después de realizada la FMS y seleccionada la mejor proporción, se llevó a cabo esta fermentación por 24 horas en frascos de vidrios de 300 mL previamente esterilizados. Se realizó una relación entre el sustrato y el suero de leche en donde se adicionó 100 ufc/mL de la combinación de especies bacterianas como: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subesp. Bulgaricus* que fueron adquiridos liofilizados de una colección alemana DSMZ de cepas puras de cultivo, estas cepas bacterianas son consideradas como probióticos, las mismas que fueron propagadas en agar MRS a 37 °C durante 48 horas.

### 2.2.2 Análisis Sensorial

En la Tabla 2 se observan los parámetros que fueron evaluados.

**Tabla 2:** Parámetros sensoriales

Atributos	Parámetros
Color	Muy intenso
	Intenso
	Ni intenso ni pálido.
	Pálido
	Muy pálido
Sabor	Muy desagradable
	Desagradable
	Ni desagradable ni agradable
	Agradable
	Muy agradable
Olor	Muy intenso
	Intenso
	Agradable
	Ligero
	No tiene
Acidez	Extremadamente ácido
	Muy ácido
	Ácido
	Poco ácido
	Nada ácido
Aceptabilidad	Muy desagradable
	Desagradable
	Ni desagradable ni agradable
	Agradable
	Muy agradable

Se realizó una primera prueba de aceptación, utilizando escalas hedónicas de cinco puntos. A cada uno de los calificativos empleados en la escala, se le asignó un valor de 1 a 5 con respecto al color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad. Para la evaluación,

se empleó un panel de 15 catadores semientrenados. Cada una de las muestras, se presentó aleatoriamente a cada evaluador, se evaluaron 2 tratamientos con sus respectivos blancos sin fermentación, las muestras se colocaron en recipientes idénticos y codificados con números aleatorios y por triplicado (**Watts, Ylimaki, Jeffery, & Elías, 1992**).

### **2.2.3 Estimación del tiempo de vida útil**

Para la estimación del tiempo de vida útil, se realizó en el mejor tratamiento que fue obtenido por el análisis sensorial, dicha estimación se obtuvo mediante un análisis fisicoquímico realizado por 11 días, determinando frecuentemente pH y acidez a dos diferentes temperaturas (refrigeración (4°C); ambiente (20°C)) (**Nuñez, 2013**), en frascos de vidrio con tapa metálica y cierre twist off, con capacidad de 300 mL.

#### **2.2.3.1 Determinación de pH**

El pH se determinó bajo el método de la Normativa ecuatoriana (**NTE INEN 1087, 1984**), utilizando un potenciómetro pHmetro (Mettler Toledo SevenCompact) previamente calibrado con soluciones buffer 4.0 y buffer 7.0. Para la mediación se utilizó 20 mL de cada muestra y se midió por triplicado.

#### **2.2.3.2 Determinación de acidez titulable**

La acidez titulable se determinó mediante la técnica oficial de la (**NTE INEN 1091, 1984**), homogenizando 9mL de muestra en 1mL de agua destilada y 3 gotas de fenolftaleína como indicador, y una solución valorada de NaOH 0.1N. Para el cálculo de la acidez se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ácido láctico} = \frac{V(\text{NaOH}) * N(\text{NaOH}) * \text{Meq}(\text{ac. láctico})}{\text{peso de la muestra}} * 100$$

Ecuación 1

**Donde:**

V (NaOH) = volumen gastado de la muestra

N (NaOH) = normalidad del NaOH

Meq (ac. láctico) = mili equivalentes del ácido láctico = 0.09

### 2.2.3.3 Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se basó en la normativa (**NTE INEN 2564, 2019**), donde se tomó 10mL de las bebidas y se llevó a bolsas totalmente estériles (Sterilin, Stone, Staffordshire, Reino Unido) con 90mL de agua peptonada (400C, Seward, Londres, Reino Unido).

Posteriormente se preparó diluciones correspondientes para la determinación de los diferentes microorganismos tales como: (i) recuento de coliformes totales y *E. coli*, para ello se utilizó agar VRG (Agar Bilis Rojo Violeta Glucosa) y se inoculó 100µL de las bebidas y se incubaron a 37°C por 24 horas, (ii) *Listeria monocytogenes* se empleó BD Listeria Agar (Agar para Listeria) con la técnica vertido en placa se incubaron a 37°C por 24 horas, (iii) recuento de aerobios mesófilos se utilizó agar Nutritivo, y con la técnica de vertido en placa se incubaron a 37°C por 24 horas.

Todos los recuentos se representaron como logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (log UFC/mL). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El ensayo se llevó a cabo durante 11 días a temperatura ambiente (25°C) y de refrigeración (4°C).

### 2.2.4 Análisis Proximal

#### 2.2.4.1 Determinación de humedad

La humedad se determinó de acuerdo con la norma (**NTE INEN ISO 5537, 2014**). Se pesaron 3g de muestra en una cápsula vacía y tarada, y se introdujo en una estufa secadora a una temperatura de 105°C ± 1°C por 24 horas, hasta obtener un peso constante. Finalmente, se enfrió en un desecador y se pesó. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. El contenido de materia seca se obtuvo utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\%materia\ seca = \frac{(m3-m1)}{(m2-m1)} * 100$$

Ecuación 2

**Donde:**

m1= peso de la cápsula (g)

m2= peso de la muestra + cápsula (g)

m3= peso de la muestra seca + cápsula (g)

$$\%humedad = 100 - \%materia\ seca$$

Ecuación 3

#### 2.2.4.2 Determinación de proteína

La cantidad de proteína se determinó basándose en la norma (**AOAC 2001.11. 2001**) para bebidas fermentadas. Para esto se pesó 3g de la muestra y se añadió dos pastillas Kjeldahl y 15mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La muestra preparada se llevó a ebullición por el lapso de 1 hora, hasta que ocurra un cambio de coloración que va desde marrón a verde esmeralda. Después la muestra se enfrió y se añadió 70mL de agua destilada, luego de enfriar se añadió 50mL de NaOH 40% (p/v), esta solución se introdujo en un destilador de proteína Vapodest Gerhardt (TT625, España) junto con 30mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1N contenido en un matraz para ser filtrado, este filtrado se tituló con HCl 0.1M hasta llegar a un color rosa. El contenido de proteína se calculó con la siguiente ecuación:

$$Kjeldahl\ nitrógeno\ \% = \frac{(VS * VB) * M * 14.01}{W * 10}$$

Ecuación 4

$$\% \text{ proteína cruda} = \%Kjeldahl\ N * F$$

Ecuación 5

#### Donde:

VS = volumen (mL) de ácido estandarizado usado para valorar una prueba

VB = volumen (mL) de ácido estandarizado usado para valorar el blanco del reactivo

M = molaridad de HCl estándar

14.01 = peso atómico del nitrógeno N

W = peso (g) del estándar de prueba

10 = factor para convertir mg/g en porcentaje

#### 2.2.4.3 Determinación de grasa

La grasa se determinó en base a la norma (**NTE INEN 2446, 2013**). Se pesó 5g de la bebida deshidratada en un tipo capuchón, el cual se lo tapó con algodón, conectándolo después al extractor de grasa (SER 148 Velp® Scientific), en un vaso de vidrio se

agregó 9mL de éter dietílico, posteriormente la muestra preparada se colocó en el equipo. La extracción de grasa se la realizó en un lapso de 4 horas por medio de ebullición y lavado. Finalmente se recuperó el solvente quedando la grasa en el vaso. Los ensayos se realizaron por duplicado, y se utilizó las siguiente ecuación para obtener le porcentaje de grasa:

$$\%grasacruda = \frac{m2 - m1}{m} * 100$$

Ecuación 6

**Donde:**

m = peso de la muestra

m1 = peso del vaso

m2= peso del vaso con grasa

#### **2.2.4.4 Determinación de fibra**

La determinación de la fibra dietética total se realizó por medio del método enzimático – gravimétrico de acuerdo a la (FAO, 1993). En un vaso de precipitación se añadió 1g de la muestra, con 50mL de tampón fosfato pH 6.0. Luego se adicionó 0.1mL de amilasa.

Esta solución se colocó en un baño María, dejandolo hervir por unos 15 minutos con agitación continua con intervalos de 5 minutos. El pH se ajustó a  $7,5 \pm 0.2$  con NaOH 0.275 N, 10mL aproximadamente. Luego se añadió 5mg de proteasa y se incubó por 30 minutos a 60°C agitandolo continuamente.

Se dejó enfriar añadiendo 10mL de HCl 0.325 N. El pH se debe de ajustar entre 4.0 – 4.6. A esto se añadió 0.3mL de amiloglucosidasa y se incubó a 60°C por 30 minutos, agitándolo continuamente, luego se adicionó 280mL de etanol al 95% precalentando a 60°C.

La muestra de dejó precipitar por unos 60 minutos. El crisol que contuvo el celite se humedeció y se distribuyó el celite por todo el crisol, para esto se utilizó etanol al 78% aplicando succión . El residuo se lavó con etanol al 78%, dos partes de 10mL de etanol

al 95% y dos porciones de 10mL de acetona. El tiempo de filtración y lavado se tardó aproximadamente de 1 a 6 horas.

El crisol que contenía el residuo se dejó secando toda la noche en una estufa (Lab Incubator Model: IN-0.10) a 70°C, dejándolo enfriar y registrando su peso. El residuo de la segunda muestra se calcinó a 525°C por 5 horas, se enfrió y se registró el peso para determinar las cenizas. Finalmente se determinó la proteína usando  $N \times 6.25$  como factor de conversión en el residuo de una de las muestras de los duplicados.

Se efectuó la determinación del blanco mediante la siguiente ecuación:

$$B = \text{Blanco, mg} = \text{masa del residuo}$$

Ecuación 7

**Donde:**

Masa del residuo = promedio de masa del residuo (mg) para la determinación del blanco

PB y CB = masa (mg) de proteína y cenizas, respectivamente en los residuos de los blancos

El cálculo del porcentaje de fibra dietética total se determina mediante la siguiente ecuación:

$$\%FDT = \frac{(m1 - P - C - B)}{m} * 100$$

Ecuación 8

**Donde:**

m = masa de la muestra = promedio de la masa de 2 muestras (mg)

m1 = masa del residuo = promedio de las masas de las muestras determinadas duplicado (mg)

P y C = masa (mg) de proteína y cenizas, respectivamente en los residuos de las muestras

B = blanco

### 2.2.6 Determinación de perfil de ácidos grasos

Después de la determinación y cuantificación de la grasa por medio del método (**NTE INEN ISO 2446, 2013**), se debe de obtener ésteres metílicos de las muestras a determinar, se pesó aproximadamente 0.020 a 0.025g de grasa extraída de la bebida en un tubo de tapa rosca de 20mL. Se añadió 2mL de solución metanólica de KOH 0.5 M, llevando a ebullición por un lapso de 10 minutos y dejando enfriar a temperatura ambiente. En un tubo se colocó la cantidad de 1mL de solución metanólica de HCl llevando a un baño María a 50°C por 25 minutos, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió 3mL de agua destilada pura y se colocó 10mL de hexano y se agitó por 10 segundos, dejando reposar por 24 horas. Se extrajo 1.5mL del extracto de hexano el cual se colocó en un vial cromatográfico de gases (**AOAC 996.06, 1996**).

Las condiciones para la determinación del perfil de ácidos grasos en la bebida son las siguientes: Cromatógrafo de Agilent Technologies 7890<sup>a</sup> GC System, el cual consta de un inyector Split-splitles Intet, con una columna de sílica fundida Omegawax Supelco 320 (60m - 250 $\mu$ m – 0.2 $\mu$ m) y un detector de ionización. El volumen utilizado para la inyección fue de 0.2 $\mu$ L por triplicado. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura inicial del horno 250°C por 3 minutos aumentados hasta 240°C (10°C/min), temperatura de puesto de inyección 80°C, temperatura del detector 260°C. Se utilizó nitrógeno como gas transportador a un flujo lineal de aproximadamente 25cm/seg. Las áreas de los picos y los tiempos de retención se obtuvieron por medio del software NIST MS 2.2 2.014. Para identificar los ácidos grasos se comparó la mezcla de los estándares de referencia con los tiempos de retención y áreas de las muestras. La cantidad de ácidos grasos se cuantificaron por medio de la relación porcentual del área total y area de los picos.

### 2.2.7 Diseño Experimental

**Tabla 3:** Factores y niveles del diseño experimental

Factores	Niveles
a=Harina de cáscara de cacao b=Harina de salvado de arroz	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>
	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>
	a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>
	a <sub>4</sub> b <sub>4</sub>
	a <sub>5</sub> b <sub>5</sub>
	a <sub>6</sub> b <sub>6</sub>
	a <sub>7</sub> b <sub>7</sub>

**Tabla 4:** Combinaciones experimentales

Tratamientos	Proporciones (%)	Combinaciones
T1	50:50	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>
T2	40:60	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub>
T3	20:80	a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>
T4	80:20	a <sub>4</sub> b <sub>4</sub>
T5	60:40	a <sub>5</sub> b <sub>5</sub>
T6	30:70	a <sub>6</sub> b <sub>6</sub>
T7	70:30	a <sub>7</sub> b <sub>7</sub>

El presente trabajo estaba comprendido de dos secciones experimentales, en la primera sección se utilizó un diseño de dos factores evaluando los diferentes tratamientos y los porcentajes de cada sustrato, con dos réplicas para de esta manera obtener una interpretación eficaz de los resultados obtenidos con los factores de estudio. La segunda sección fue el análisis sensorial en cuanto a color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad, por medio de la primera sección se procedió a seleccionar 2 tratamientos de 7, en esta sección se utilizó un diseño factorial de bloques con b(bloques)=5, c (catadores) = 15, según lo descrito por **Cordero et al, (2017)**.

En la Tabla 3, se detalla los diferentes factores y niveles que se evaluaron en la primera sección y en Tabla 4, se detallan las condiciones experimentales utilizadas.

### **2.2.8 Análisis estadístico**

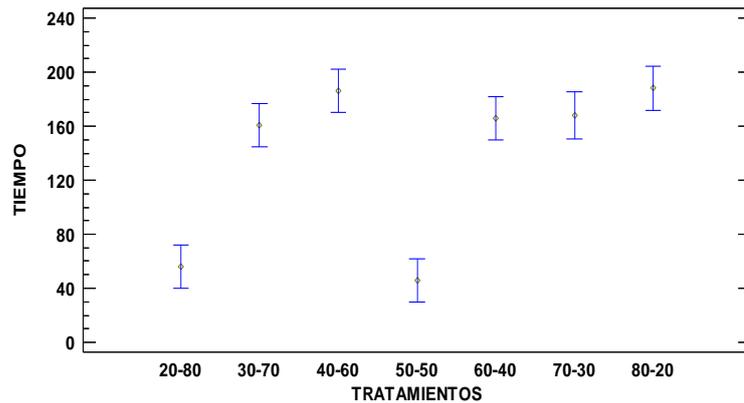
Los datos obtenidos se indican con la media  $\pm$  desviación estándar y análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de acuerdo con los experimentos. Cuando se detectaron diferencias significativas en los resultados se realizó un análisis de comparación múltiple mediante la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas al 95% de confianza. Para el análisis estadístico se emplearon los programas EXCEL® y Statgraphics Centurion®.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Análisis y discusión de resultados

##### 3.1.1 Crecimiento del microorganismo en el sustrato



**Figura 1:** Prueba de tukey al 95% de confianza para la variación de proporciones de sustrato, ( 20% de harina de cáscara de cacao -80% de salvado de arroz, 30% de harina de cáscara de cacao -70% de salvado de arroz, 40% de harina de cáscara de cacao -60% de salvado de arroz, 50% de harina de cáscara de cacao -50% de salvado de arroz, 60% de harina de cáscara de cacao -40% de salvado de arroz, 70% de harina de cáscara de cacao -30% de salvado de arroz, 80% de harina de cáscara de cacao -20% de salvado de arroz.)

En la Figura 1 se presenta la relación entre los porcentajes de las proporciones de los sustratos utilizados (harina de cáscara de cacao, el salvado de arroz) y el tiempo (h), obteniendo de este análisis como mejores tratamientos las proporciones de 50:50 (harina de cáscara de cacao, salvado de arroz) y 20:80 (harina de cáscara de cacao, salvado de arroz) consideradas como las mejores, basándose en la efectividad en el tiempo de colonización del microorganismo (*Aspergillus orizae red*), ya que fueron los tiempos más cortos en comparación a los demás tratamientos, este comportamiento se debe principalmente a que la harina de cáscara de cacao contiene entre un 60-70% de carbohidratos (Sangronis, Soto, Valero, & Buscema, 2014), siendo un sustrato indicado para el desarrollo y generación de conidióforos y conidios (esporas) y de igual manera la harina de salvado de arroz es rica en carbohidratos y proteínas, que tiene como objetivo la producción de amilasas y proteasas para el crecimiento adecuado del hongo (Vanessa & Aguilar, 2017).

### 3.1.2 Análisis Sensorial

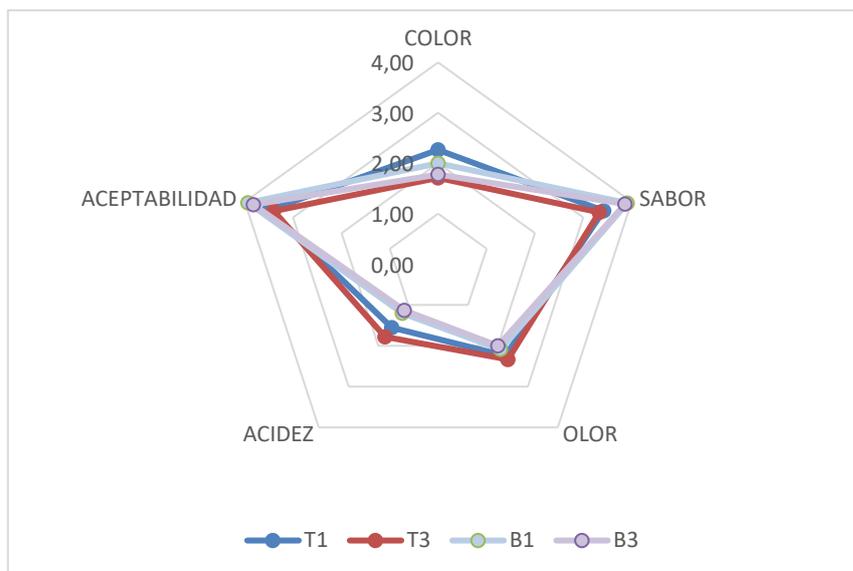
El análisis sensorial se llevó a cabo con dos tratamientos T1 (proporción 50:50) y T3 (proporción 20:80) con sus respectivos blancos sin ningún tipo de fermentación.

**Tabla 5:** Selección del mejor tratamiento mediante análisis sensorial de los diferentes tratamientos

Tratamientos	Atributos				
	Color	Sabor	Olor	Acidez	Aceptabilidad
T1	2,267±0,758 <sup>a</sup>	3,422±0,707 <sup>a</sup>	2,244±0,511 <sup>a</sup>	1,778±0,371 <sup>a</sup>	3,489±0,602 <sup>a</sup>
T3	1,711±0,434 <sup>b</sup>	3,333±0,787 <sup>a</sup>	2,333±0,577 <sup>a</sup>	1,556±0,448 <sup>b</sup>	3,400±0,681 <sup>a</sup>

a, b Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias significativas al 95% de confianza.

En la Tabla 5, se observa el análisis de varianza en el cual se muestra una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), en el parámetro de color y acidez. Sin embargo, para los parámetros de sabor, olor y aceptabilidad, el valor P indicó que no existe diferencia significativa entre tratamientos. La diferencia en el parámetro color podría deberse a las proporciones del sustrato correspondiente que cada formulación tenía, con respecto a la acidez de la bebida aumento ligeramente debido a una fermentación láctica única a una producción de aroma, esta fermentación se realizó por especies de bacterias ácido lácticas que tienen como objetivo la producción de ácido láctico como principal producto final del metabolismo, además de producir otros ácidos orgánicos y sustancias aromáticas como el diacetilo y acetaldehído provocando así un sabor agradable al paladar (Vélez, 2002).



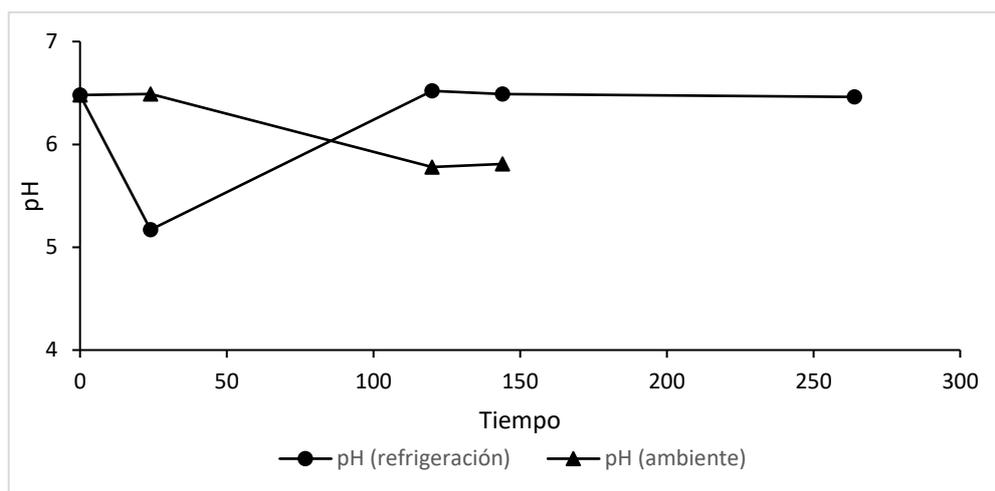
**Figura 2:** Perfil sensorial del control, T1 (proporción 50% harina cáscara de cacao-50% harina salvado de arroz) y T3 (proporción 20% harina cáscara de cacao-80% harina salvado de arroz). En la Figura 2, se observa el perfil sensorial, en el cual indica mayores puntuaciones para el T1, obteniendo los parámetros más puntuados el sabor 34.2% y aceptabilidad con 34.9%, estos resultados se dan principalmente por unos de los componentes del sustrato como es la harina de cáscara de cacao, ya que al tener un sabor característico al chocolate lo hace más apetecible al catador, seguido que contiene un alto contenido de carbohidratos y proteínas junto a la fibra lo que le permite al microorganismo crecer de manera adecuada y rápida obteniendo una bebida con buenas características organolépticas (Franco Agurto & Suárez Quirumbay, 2014), esta diferencia se ve en el porcentaje de sustrato para cada tratamiento, para el tratamiento T1 se utilizó 50%-50% de harina de cáscara de cacao y salvado de arroz y para el T3 se utilizó 20%-80% de harina de cáscara de cacao y salvado de arroz. Los siguientes análisis se realizaron al mejor tratamiento que en este estudio fue el tratamiento 1 (T1).

### 3.1.3 Vida útil del mejor tratamiento

#### 3.1.3.1 pH y acidez

Se hicieron controles fisicoquímicos de pH y acidez durante 11 días de almacenamiento en refrigeración y ambiente, conforme pasa el tiempo la acidez aumentó y el pH disminuyó. En la Figura 3 se observa que el pH inicial para el mejor tratamiento T1 a temperatura ambiente y de refrigeración es de 6.48, transcurridos los

días el pH a temperatura ambiente comienza a disminuir hasta alcanzar un pH de 5.81, la norma menciona que, el pH para bebidas fermentadas debe hasta 4.55 (**Agencia de Seguridad Alimentaria, 2010**); en comparación para el pH a temperatura de refrigeración alcanzo un pH de 6.46, dichos valores se encuentran dentro de la norma establecida, lo que indica que este parámetro se cumple en las condiciones de almacenamiento previstas.



**Figura 3:** Evolución del pH para determinación de vida útil a temperatura ambiente y de refrigeración

Durante 11 días se realizó la medición de pH presentando una tendencia descendente conforme pasan los días de almacenamiento a las temperaturas de estudio (4°C y 20°C), para determinar la vida útil a temperatura ambiente se ajustó a un orden de reacción cinética 0.

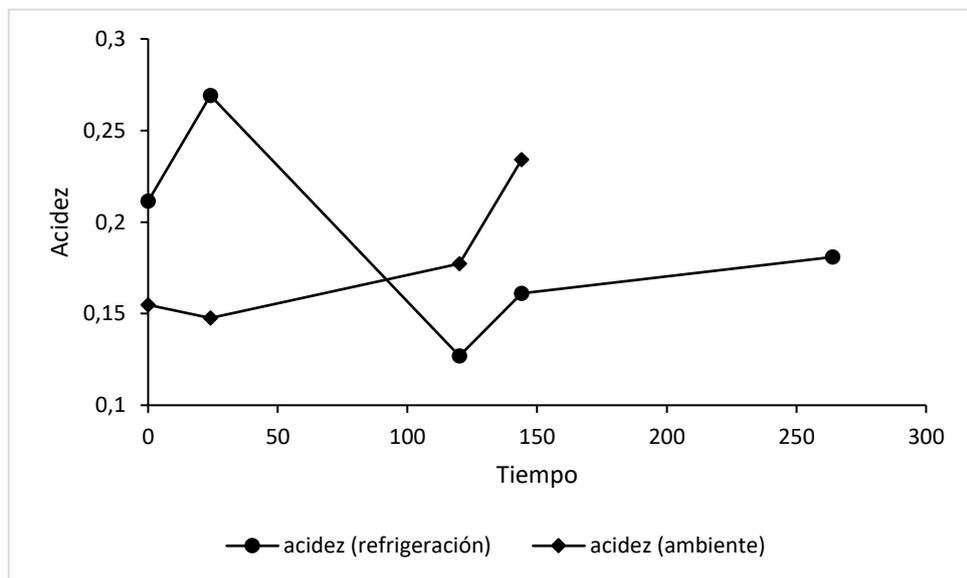
**Tabla 6:** Tiempo de vida útil para el parámetro pH

Temperatura (°C)	Orden de reacción (n)	Tiempo (días)
Ambiente (25 ± 1)	0	16
Refrigeración (4 ± 1)	2	32

En la tabla 6, se detallan los valores obtenidos durante el tiempo, el pH disminuye llegando a determinar que la vida útil se encuentra en 16 días, al comparar este dato con bebidas fermentadas presentes en el mercado es similar al experimentado (10 días). A temperatura de refrigeración se ajustó a un orden de reacción cinética 2, determinando un tiempo de vida útil hasta 32 días, debido a que la temperatura forma

una barrera evitando así el descenso del pH, de esta manera se observa que a una temperatura menor el tiempo de vital útil se prolonga. El pH de igual manera tiene importancia en relación con la apariencia visual de la bebida durante su conservación a bajas temperatura, ya que puede ocurrir una separación de fases debido a la alta acidificación influido directamente por el tiempo de fermentación, estos cambios pueden afectar las características sensoriales obteniendo un producto no deseable (Thamer & Penna, 2006).

Con lo que respecta a acidez el punto de inicio fue de 0.21% de ácido láctico para temperatura de refrigeración y 0.15% de ácido láctico para temperatura ambiente, transcurridos los días la acidez aumentó hasta llegar a un 0.22% de ácido láctico para temperatura de refrigeración y 0.23% de ácido láctico para temperatura ambiente, según la normativa del Codex Alimentarius las bebidas fermentadas deben encontrarse hasta un 0,3% de ácido láctico (CODEX STAN 243, 2003); encontrándose los datos experimentales dentro de la normativa para bebidas fermentadas (Figura 4).



**Figura 4:** Evolución de la acidez para determinación de vida útil a temperatura ambiente y refrigeración.

Durante 11 días se realizó la medición de acidez presentando una tendencia ascendente conforme pasan los días de almacenamiento a las temperaturas de estudio (4°C y

20°C), para determinar la vida útil a temperatura ambiente se ajustó a un orden de reacción cinética 2.

**Tabla 7:** Tiempo de vida útil para el parámetro de acidez

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Orden de reacción (n)</b>	<b>Tiempo (días)</b>
Ambiente (25 ± 1)	2	8
Refrigeración (4 ± 1)	0	15

En la tabla 7, se detalla los valores obtenidos durante el tiempo, la acidez aumenta llegando a determinar que la vida útil se encuentra en 8 días, al comparar este dato con bebidas fermentadas presentes en el mercado es similar al experimentado (10 días). A temperatura de refrigeración se ajustó a un orden de reacción cinética 0, determinando un tiempo de vida útil hasta 15 días. La acidez tiene una gran influencia sobre los parámetros de calidad de las bebidas lácteas fermentadas y es uno de los parámetros que limita su aceptación, así una baja acidez favorece la aceptabilidad de esta bebida. Por otro lado, la producción de ácido láctico, sustancia característica de las bebidas fermentadas actúa como un conservante natural, esta producción de ácido láctico contribuye a la desestabilización de las mezclas de caseína, forma un gel y proporciona su sabor ácido característico ayudando a mejorar el sabor de la bebida (Kempka et al., 2008).

### 3.1.3.2 Análisis microbiológico

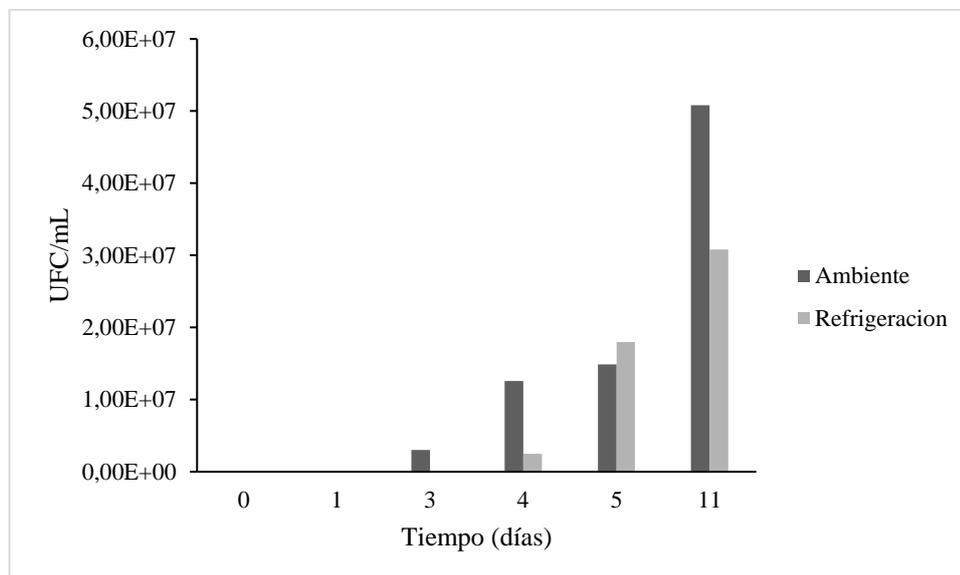
Los resultados obtenidos para el mejor tratamiento T1 se reportan por duplicado y a diferentes temperaturas de almacenamiento. En la Tabla 8 se observa que la bebida fermentada a base de harina de cáscara de cacao y harina de salvado de arroz cumple con los parámetros microbiológicos de acuerdo con la NTE INEN 2564, (2011), indicando ausencia en el recuento de microorganismos. La ausencia de microorganismos coliformes puede deberse a que este tipo de microorganismos no son resistentes a pH bajos y a valores altos de acidez, las bacterias presentes en la bebida fermentada se comportan como inhibidoras de otros microorganismos (Zambrano & Romero, 2016).

**Tabla 8:** Resultados de los análisis microbiológicos para la bebida fermentada

Parámetros microbiológicos	Requisitos de la Norma INEN 2564		Días	Resultados T1 (50% harina de cáscara de cacao-50% harina salvado de arroz)
	N	M		
Recuentos de coliformes totales (UFC/mL)	<1	10	0	Ausencia
			1	Ausencia
			3	Ausencia
			4	Ausencia
			5	Ausencia
			11	Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> (UFC/mL)	Ausencia	-	0	Ausencia
			1	Ausencia
			3	Ausencia
			4	Ausencia
			5	Ausencia
			11	Ausencia
Recuento de <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	<1	-	0	Ausencia
			1	Ausencia
			3	Ausencia
			4	Ausencia
			5	Ausencia
			11	Ausencia

Con respecto al recuento de aerobios mesófilos para la bebida fermentada a base de harina de cáscara de cacao y harina de salvado de arroz se evidencia desde el tercer día a temperatura ambiente y al cuarto día a temperatura de refrigeración (Figura 5), los mesófilos son bacterias que crecen en un rango óptimo de 30 a 37 °C, el recuento de mesófilos es útil como indicador para determinar la calidad microbiológica de la bebida, sin embargo este recuento no es tan útil en productos fermentados, ya que en

ellos es deseable una proliferación microbiana y al realizar el análisis este no diferencia entre la flora deseable de la indeseable, de tal manera el grado de contaminación de la bebida se realiza por el recuento de coliformes totales (Charris & Rois, 2001).



**Figura 5:** Recuento de aerobios mesófilos para el tratamiento T1

### 3.1.4 Análisis Proximal

En la Tabla 9 se muestra los resultados obtenidos para la bebida fermentada T1:

**Tabla 9:** Resultados del análisis proximal para la bebida fermentada T1

Análisis	Resultados T1 (%)	Datos bibliográficos (%)
Humedad	90.2	84.80
Proteína	0.873	1.6
Lípidos	1.13	3.0
Carbohidratos	5.368	8.8
Fibra	1.80	2.28
Cenizas	0.629	0.73

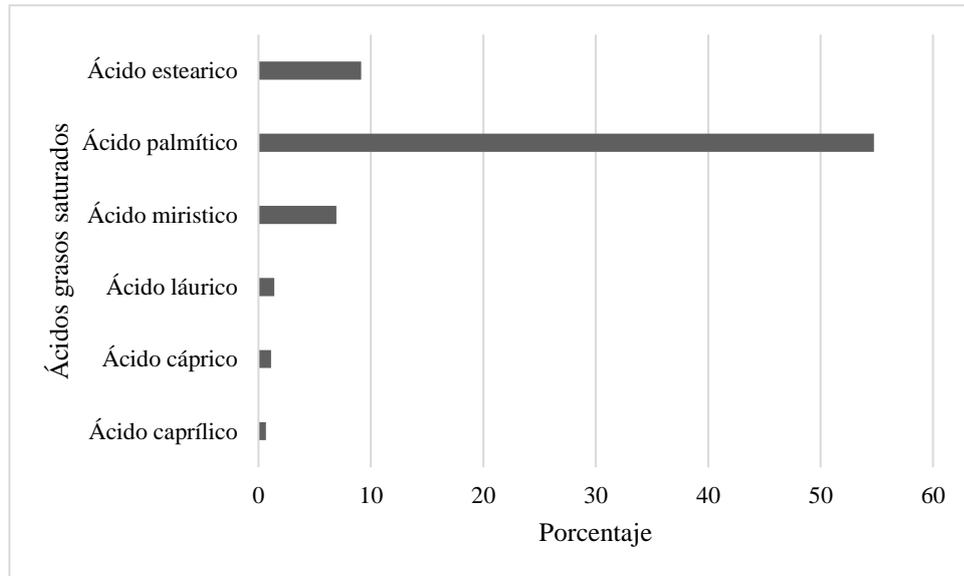
Se observa ciertas diferencias con datos bibliográficos, estas diferencias encontradas se deben a la utilización de diferentes matrices para la elaboración de la bebida en esta investigación. Como es una bebida, el porcentaje de humedad es alto, la cantidad de sólidos aumenta de acuerdo a la cantidad de suero que contenga la bebida. La bebida fermentada T1 posee un contenido bajo de proteína 0.873% y carbohidratos 5.368%

en comparación con datos bibliográficos según la norma para leches fermentadas (**NTE INEN 2608, 2012**), el contenido de proteína debe ser el 1,6% para este tipo de bebidas, el bajo contenido de proteína y carbohidratos puede deberse a que el microorganismo *Aspergillus orizae red* utilizo los sustratos como fuente de energía para su crecimiento y metabolismo celular, además que tiene la capacidad de hidrolizar macromoléculas como el almidón, dextrinas y proteínas, convirtiéndolas en carbohidratos más simples, péptidos o aminoácidos (**Bautista, 1997**).

La norma (**NTE INEN 2564, 2019**) para bebidas lácteas, establece un valor máximo de 3% de materia grasa, lo cual al observar en la Tabla 9 se encuentra dentro del límite establecido con un 1.13% de materia grasa de la bebida elaborada, según (**Vega, 2012**) señala que la presencia de las bacterias ácido lácticas cuya población se incrementó durante la etapa de incubación, puede ser considerada como una fuente importante de grasa en la bebida. el porcentaje de cenizas concuerda con un estudio realizado a diferencia del porcentaje de fibra que se obtuvo 1.80% de fibra que está por debajo de dicho estudio el cual llega a obtener un valor de 2.28% en bebidas fermentadas. Según (**Escobar, 2019**) la disminución del porcentaje de fibra en la bebida puede deberse a que el hongo utilizado *Aspergillus orizae red* en la fermentación sólida lo utiliza para la biosíntesis y el desarrollo del mismo.

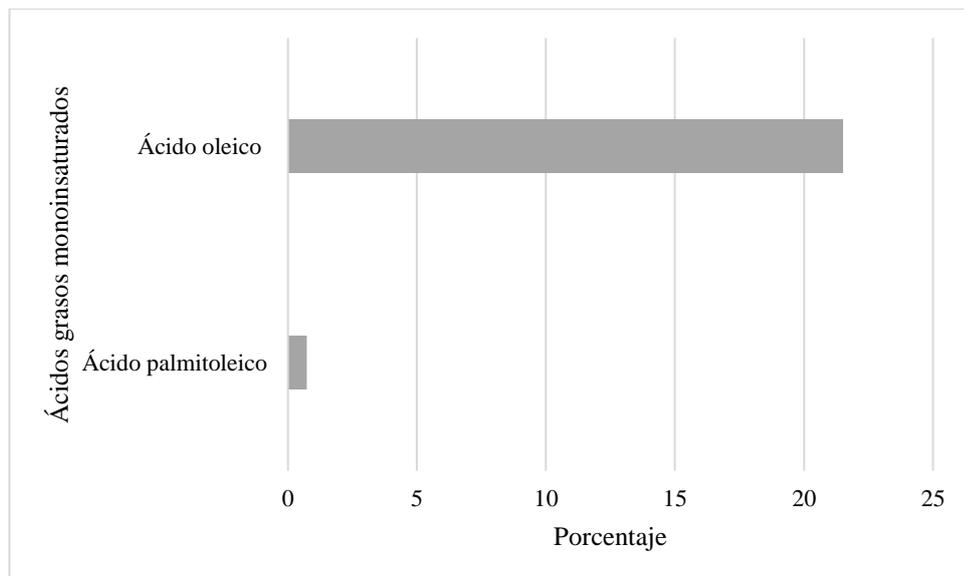
### **3.1.5 Análisis de Perfil de ácidos grasos**

En la Figura 7, se detallan los el perfil de ácidos grasos saturados en la bebida fermentada T1, en la cual existe ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0), con altos contenidos que representan la mayor concentración de la fracción con valores de 54.75% y 9.14% respectivamente. El valor obtenido está fuera del rango encontrado en una bebida fermentada similar (24.59%) de ácido palmítico, sin embargo, al contener la bebida un alto contenido de ácido palmítico es una desventaja, ya que aumenta los niveles de colesterol en la sangre produciendo enfermedades cardiovasculares. El ácido esteárico se encuentra dentro del rango establecido en una bebida similar (11.67%) (**Chicango, 2016**). Otros ácidos grasos se encontraron en la bebida fermentada en menor proporción como el ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0) y ácido mirístico (C14:0).



**Figura 6:** Perfil de ácidos grasos saturados para la bebida fermentada T1.

Para los ácidos grasos monoinsaturados (Figura 7) el ácido oleico (C18:1) representa el 21.52% predominante en la matriz alimentaria y en un bajo porcentaje el ácido palmitoleico (C16:1 n-7) con el 0.73% para la bebida fermentada. Según (**Chicango, 2016**), indica que en bebidas fermentadas existe ácido oleico en un 21.32% - 22.02%, por lo tanto la bebida se encuentra dentro del rango establecido bibliográficamente, además menciona que este ácido mejora la consistencia de la bebida fermentada y lo hace más compacto.



**Figura 7:** Perfil de ácidos grasos monoinsaturados para la bebida fermentada T1.

Finalmente, el ácido graso poliinsaturado linoleico (C18:2 n-6) representa solo el 3.73% de la fracción de la bebida fermentada, este ácido graso resulta muy favorable en la bebida, ya que es un ácido graso esencial (omega 6) que fortalece el sistema inmunológico, previene las enfermedades cardíacas, favorece la pérdida de grasa, puede ayudar a promover niveles saludables de glucosa mejorando el metabolismo de la insulina (Torrejón & Uauy, 2011), sin embargo estudios realizados por Kishino, Ogawa, Omura, Matsumura, & Shimizu, (2002), mencionan que la incorporación de bacterias probióticas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, pueden causar un aumento ligero en la concentración de ácido linoleico en leches fermentadas.

### **3.2 VERIFICACION DE LA HIPOTESIS**

Mediante el análisis de datos ANOVA de cada ensayo realizado con un nivel de confianza del 95%, se rechaza ya hipótesis nula ya que existe diferencias significativas con cada una de las proporciones de las harinas utilizadas en cada tratamiento, concluyendo que realizado todos los estudios con respecto al mejor tratamiento T1 de la bebida fermentada a basa de harina de cáscara de arroz y salvado de arroz, se acepta la hipótesis alternativa, debido a que en los experimentos realizados con los dos tipos de harinas utilizados en diferentes proporciones inciden directamente en el análisis sensorial y proximal, específicamente en valores de proteína, grasa y fibra.

## CAPITULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1 CONCLUSIONES

- Se desarrolló una bebida a base de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con doble fermentación por un tiempo de 48 horas y fermentación líquida a base de suero de leche liofilizado por 4 horas.
- Se determinó los porcentajes apropiados de los diferentes componentes para la elaboración de la bebida, obteniendo la proporción de 50% harina de cáscara de cacao y 50% harina de salvado de arroz ya que tuvo un menor tiempo de colonización del microorganismo.
- Se evaluó la aceptabilidad del producto terminado mediante un análisis sensorial el cual obtuvo una mayor puntuación para el tratamiento T1 (50:50) de harina de cáscara de cacao y harina de salvado de arroz con 34,9% de aceptabilidad.
- Se evaluó las características físico químicas, análisis proximal y tiempo de vida útil de anaquel del mejor tratamiento mediante el análisis proximal el cual contiene un 90.2 % de humedad, 0.873 % de proteína, 0.629 % de cenizas, 1.13 % de lípidos, 1.79 % fibra total, y 5,38 % de carbohidratos.
- Para el perfil de ácidos grasos saturados contiene ácido palmítico y el ácido esteárico, con altos contenidos que representan la mayor concentración de la fracción con valores de 54.75% y 9.14% respectivamente, monoinsaturados contiene ácido oleico 21.52% en mayor proporción y poliinsaturados con un 3.73% de ácido linoleico.

- Con base a los resultados obtenidos el tiempo de vida de anaquel fue en base a pH fue de 16 días a temperatura ambiente y 32 días en refrigeración, con respecto a acidez el tiempo de vida útil fue de 8 días a temperatura ambiente y 15 días en refrigeración.

## **MATERIAL DE REFERENCIA**

- Agencia de Seguridad Alimentaria. (2010). *LECHES FERMENTADAS: ASPECTOS NUTRITIVOS, TECNOLÓGICOS Y PROBIÓTICOS MÁS RELEVANTES*.
- Aguayo, K. (2017). *Uso de la harina de arroz (Oryza sativaL.) para el desarrollo de una bebida láctea sabor a chocolate*. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.
- AOAC 2001.11. (2001). Protein Crude in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds. from <https://edoc.site/4211-aoac-official-method-200111-proteincrudein-animal-feed-pdf-free.html>
- AOAC 996.06. (2001). Hydrolytic Extraction Gas Chromatographic Method. from <https://www.coursehero.com/file/31058243/AOAC-99606-fatpdf/>
- Araújo, Á. A. D. E., Costa, L. M., Muniz, E. C., Nascimento, A. J., Lourenço, L. F. H., & Bergamasco, R. (2000). *Fermentación de residuos de cangrejo y camarón para la obtención de quitinasas en medio sólido*. 1–4.
- Bautista, L. (1997). Aspergillus oryzae POR ADSORCIÓN Que para optar al Grado de. *Universidad Complutense De Madrid. Facultad De Ciencias Químicas. Departamento De Ingeniería Química*, 281. Retrieved from <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19972000/X/0/X0036601.pdf>
- Castillo, Y. (2014). *Evaluación de la inclusión del asai (Euterpe precatoria Mart) en el desarrollo de una bebida funcional*. 181. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/46581/>
- Charris, M., & Rois, R. (2001). ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA Y SABORIZADA A PARTIR DEL SUERO OBTENIDO COMO SUBPRODUCTO DE LA FABRICACIÓN DE MANTEQUILLA MARÍA.
- Chicango, M. (2016). *TEXTURA Y PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LECHE FERMENTADA CON QUINUA COCIDA (Chenopodium quinoa Willd) VARIEDAD INIAP TUNKAHUAN*.

- Chuquiyauro, B. (2019). Universidad nacional José Faustino Sánchez Carrión escuela de posgrado. *Formulación de Una Bebida Funcional a Partir de Extracto de Equisetum Arvense “Cola de Caballo” y Zea Mays L. “Maíz Morado” Edulcorado Con Stevia Rebaudiana Bertoni “Estevia.”*
- CODEX STAN 243. NORMA DEL CODEX PARA LECHE FERMENTADAS.
- Cordero, G. (2017). Análisis Sensorial de los Alimentos. Madrid. *Salamanca, España. AMV Ediciones.*
- Endara, F. (2002). *Elaboración de una bebida a partir del suero de queso y leche descremada con sabor a mango.* 38.
- Escobar, A. (2019). “Desarrollo de una bebida a base de harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con fermentación sólida y sumergida” (Vol. 4). <https://doi.org/10.37704/0033-2909.I26.1.78>
- FAO. (1993). MANUAL DE TÉCNICAS PARA LABORATORIO DE NUTRICIÓN.
- Franco Agurto, G. L., & Suárez Quirumbay, K. B. (2014). *Determinación del Contenido de Polifenoles y Actividad Antioxidante de una Bebida Láctea Elaborada a Base de Residuos Agroindustriales de Cacao, Café y Naranja.*
- Iztapalapa, U., Para, Q. U. E., & El, O. (2003). *Penicillium commune A NIVEL LABORATORIO.*
- Kempka, A. P., Krüger, R. L., Valduga, E., di Luccio, M., Treichel, H., Cansian, R., & de Oliveira, D. (2008). *Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 28(SUPPL.), 170–177.* <https://doi.org/10.1590/s0101-20612008000500027>
- Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K., & Shimizu, S. (2002). *Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria.* 159–160.
- Mendoza, A., Ochoa, Herman, Membrillo, & Aguirre. (2016). *EFEECTO DE LA PURIFICACIÓN QUÍMICA, BIOLÓGICA Y FÍSICA EN LA RECUPERACIÓN*

*CIÓN DE QUITINA DE EXOESQUELETOS DE CAMAR CÓN (Penaeus sp) Y CHAPULÍN (Sphenarium purpurascens).*

Morales, A., Gonzalez, B., & Jimenez, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3(3).

NTE INEN 1087. (1984). *Bebidas gaseosas. Determinación del pH. 1087.*

NTE INEN 1091. (1984). *Norma Técnica Ecuatoriana: Bebidas gaseosas, determinación de la acidez titulable. 1091.*

NTE INEN 2564. (2019). *Bebidas lácteas. Requisitos. 2564, 5.*  
<https://doi.org/https://ia801906.us.archive.org/29/items/ec.nte.2564.2011/ec.nte.2564.2011.pdf>

NTE INEN 2608. (2007). *Leches fermentadas. requisitos.*

NTE INEN 2608. (2012). *Bebida de leche fermentada. Requisitos. Requisitos, 2608.*  
Retrieved from  
<https://ia801901.us.archive.org/8/items/ec.nte.2608.2012/ec.nte.2608.2012.pdf>

NTE INEN ISO 2446. (2013). *LECHE-DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA (IDT).*

NTE INEN ISO 5537. (2014). *LECHE EN POLVO. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD (MÉTODO DE REFERENCIA) (ISO 5537:2004, IDT).*

Núñez, M. (2013). Métodos de Estimación de la vida útil en los alimentos. *Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia*, 31.

Pestana, V., Zambiazzi, R., Mendonça, C., Bruscatto, M., & Ramosc, G. (2009). Influencia del procesado industrial sobre las características químico-físicas y contenido en lípidos y antioxidantes del salvado de arroz. *Grasas y Aceites*, 60(2), 184–193. <https://doi.org/10.3989/gya.075108>

Prada, A., & Cortés, C. E. (2010). LA DESCOMPOSICIÓN TÉRMICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ: UNA ALTERNATIVA DE

APROVECHAMIENTO INTEGRAL Thermal decomposition of rice husk : an alternative integral use. *Revista ORINOQUIA*, 14(1), 155–170.

Ramadhani Khija, ludovick Uttoh, M. K. T. (2015). Extracción de fibra soluble a partir de cascara de cacao (*Thebroma cacao* L.) y su utilización en la elaboración de queso fundido y yogurt. *Ekp*, 13(3), 1576–1580.

Roussos, S., & Perraud-Gaime, I. (1996). Fisiología y Bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. *Fronteras En Biotecnología y Bioingeniería*, (January), 341–348. Retrieved from [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/pleins\\_textes\\_6/b\\_fdi\\_45-46/010006834.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_45-46/010006834.pdf)

Rural, D., & Lozano, J. T. (2010). *Industrial Sin Afectar Su Calidad Nutricional Y*.

Salamanca G., G., Osorio T., M. P., & Montoya, L. M. (2010). Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de Borojo (*Borojoa patinoi* Cuatrec). *Revista Chilena de Nutrición*, 37(1), 87–96.

Sánchez, J. (2013). Evaluación energética de cáscaras de Cacao Nacional y CCN-51. *El Escorial*, 34,56.

Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao Venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(2), 123–130.

Santillán, A., & Ramos, E. (2015). Aprovechamiento Del Suero De Leche Como Bebida Energizante Para Minimizar El Impacto Ambiental. *European Scientific Journal*, (26).

Thamer, K. G., & Penna, A. L. B. (2006). Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 26(3), 589–595. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000300017>

Torrejón, C., & Uauy, R. (2011). Calidad de grasa, arterioesclerosis y enfermedad coronaria: Efectos de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans. *Revista Médica de Chile*, 139(7), 924–931. <https://doi.org/10.4067/S0034->

98872011000700016

Vanessa, C., & Aguilar, G. (2017). *Optimización de parámetros de fermentación de Aspergillus niger para la producción de glucoamilasas con aplicación en la clarificación de jugo de manzana*. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/cdc3/7c54a112cfd56b6b328f6bc9d10338c495ba.pdf>

Vega, G. (2012). *Tesis de grado*.

Vela, G., Castro, M., Caballero, A., & Ballinas, E. (2012). Bebida probiótica de lactosuero adicionada con pulpa de mango y almendras sensorialmente aceptable por adultos mayores. *Reciteia*, 11(2), 7–20. Retrieved from [http://revistarecihttps://www.researchgate.net/profile/Maricruz\\_Castro-Mundo/publication/258519582\\_Bebida\\_probiotica\\_de\\_lactosuero\\_adicionada\\_con\\_pulpa\\_de\\_mango\\_y\\_almendras\\_sensorialmente\\_aceptable\\_por\\_adultos\\_mayores/links/54ebbbc10cf2082851beteia.es.tl/](http://revistarecihttps://www.researchgate.net/profile/Maricruz_Castro-Mundo/publication/258519582_Bebida_probiotica_de_lactosuero_adicionada_con_pulpa_de_mango_y_almendras_sensorialmente_aceptable_por_adultos_mayores/links/54ebbbc10cf2082851beteia.es.tl/)

Vélez, L. (2002). *DESARROLLO DE BEBIDA LÁCTEA TIPO YOGUR CON EDULCORANTE NO CALÓRICO*.

Villarroel, A., & Ortiz, J. (2011). Universidad Técnica De Ambato (Vol. 593). Retrieved from <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>

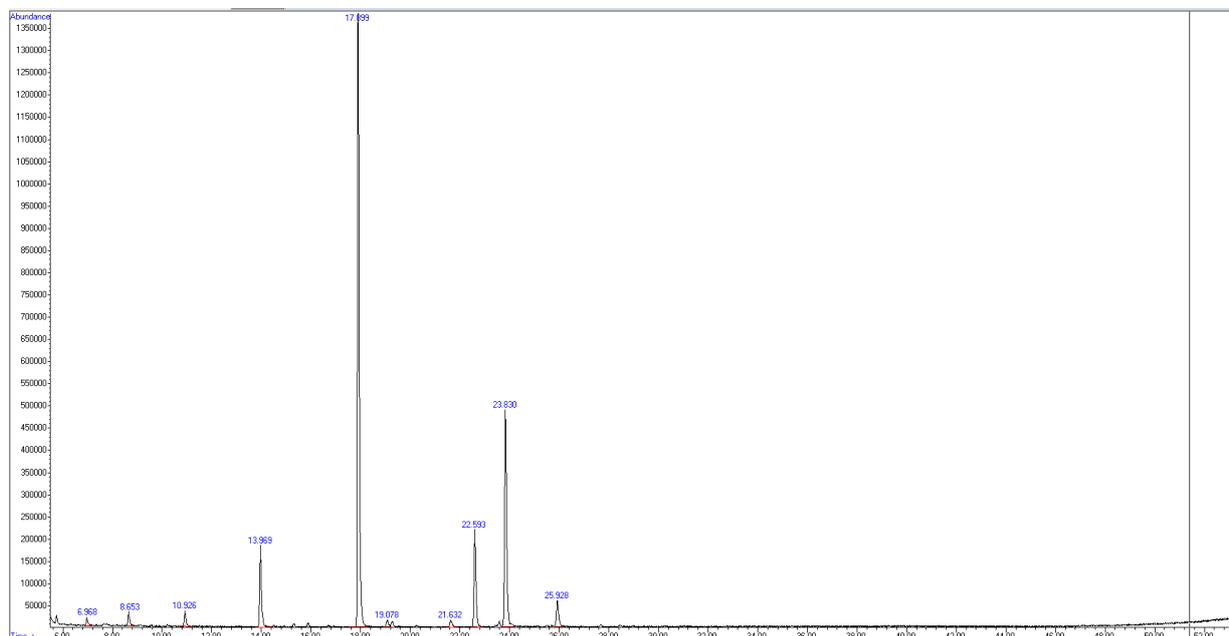
Zambrano, A., & Romero, C. (2016). *INFLUENCIA DEL LACTOSUERO DULCE Y HARINA DE CAMOTE ( Ipomoea batatas ) EN LA CALIDAD FISICOQUÍMICA Y SENSORIAL DE UNA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA*.

Watts, B. M., Ylimaki, G., Jeffery, L., & Elías, L. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*: CIID, Ottawa, ON, CA.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Cromatógrafo de perfil de ácidos grasos



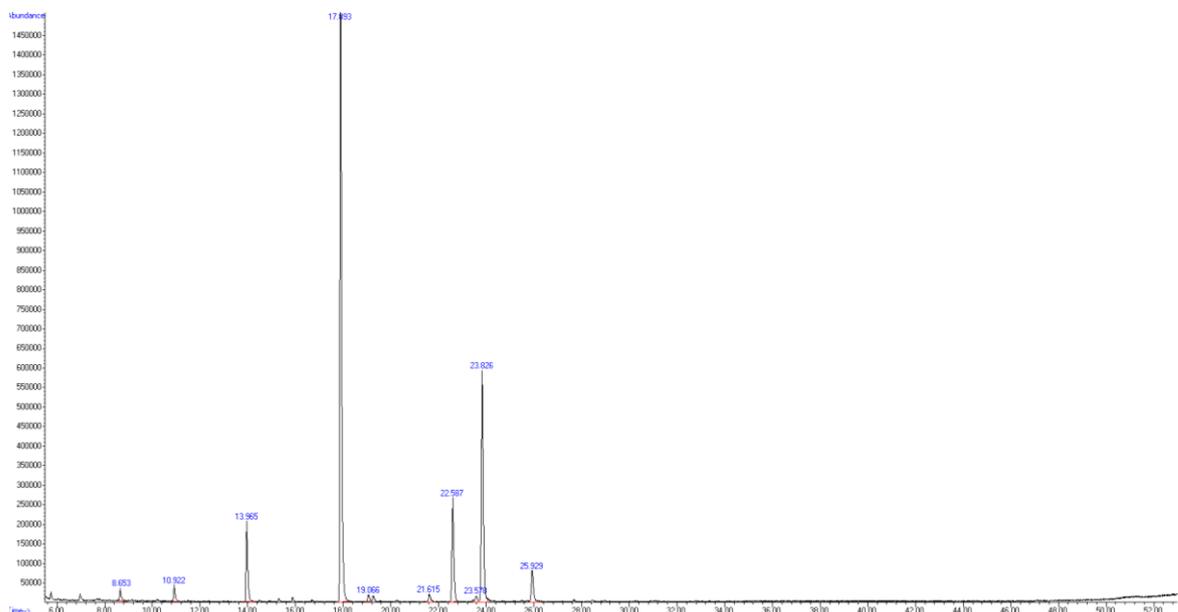
**Figura 8:** Perfil cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 replica 1

**Tabla 10:** Descripción cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 replica 1

Pico	Tiempo de Retención	Nombre IUPAC Ácido graso	Nombre trivial	CAS	Número lipídico	%Area
1	6,968	Ácido octanoico	Ácido caprílico	111-11-5	C8:0	0,67
2	8,653	Ácido decanoico	Ácido cáprico	110-42-9	C10:0	1,13
3	10,926	Ácido dodecanoico	Ácido láurico	111-82-0	C12:0	1,4
4	13,969	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	124-10-7	C14:0	6,94
5	17,899	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	112-39-0	C16:0	54,75
6	19,078		Ácido palmitoleico	112-39-0	C16:1 n-7	0,73
7	21,632	Ácido cis-10-heptadecenoico	-	75190-82-8	C17:1	0,86
8	22,593	Ácido octadecanoico	Ácido estearico	112-61-8	C18:0	9,14
9	23,83	Ácido cis-9-octadecenoico	Ácido oleico cis	112-62-9	C18:1 n-9	21,52
10	25,928	Ácido 9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico cis,cis- $\Delta^9,\Delta^{12}$	112-63-0	C18:2 n-6	2,87

## ANEXO B

### Cromatógrafo de perfil de ácidos grasos



**Figura 9:** Perfil cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 réplica 2

**Tabla 11:** Descripción cromatográfico de ácidos grasos para la bebida fermentada T1 réplica 2

Pico	Tiempo de Retención	Nombre IUPAC Ácido graso	Nombre trivial	CAS	Número lipídico	%Area
1	6,968	Ácido octanoico	Ácido caprílico	111-11-5	C8:0	0,67
2	8,653	Ácido decanoico	Ácido cáprico	110-42-9	C10:0	1,13
3	10,926	Ácido dodecanoico	Ácido láurico	111-82-0	C12:0	1,4
4	13,969	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	124-10-7	C14:0	6,94
5	17,899	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	112-39-0	C16:0	54,75
6	19,078		Ácido palmitoleico	112-39-0	C16:1 n-7	0,73
7	21,632	Ácido cis-10-heptadecenoico	-	75190-82-8	C17:1	0,86
8	22,593	Ácido octadecanoico	Ácido estearico	112-61-8	C18:0	9,14
9	23,83	Ácido cis-9-octadecenoico	Ácido oleico cis	112-62-9	C18:1 n-9	21,52
10	25,928	Ácido 9,12-octadecadienoico	Ácido linoleico cis,cis- $\Delta^9,\Delta^{12}$	112-63-0	C18:2 n-6	2,87