



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



CARRERA DE ALIMENTOS

Elaboración de una bebida a base de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con fermentación sólida y sumergida

Trabajo Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previa 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: Adela Carolina Estrada Orozco

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final De Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe final de Integración Curricular bajo la Modalidad 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, 10 de febrero de 2023

PhD. Mario Daniel García Solís
C.I. 1103605471
TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Adela Carolina Estrada Orozco, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



Adela Carolina Estrada Orozco

C.I 0603865270

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular 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:

Presidente del Tribunal

Dr. Irvin Ricardo Tubón Usca
C.I: 0604250357

Dr. Diego Manolo Salazar Garcés
C.I. 180312429-4

Ambato, 08 de marzo de 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final de Integración Curricular 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 de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las reglamentaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Adela Carolina Estrada Orozco

0603865270

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi fuerza, mi constancia y esperanza diaria, por haber sido el principal pilar de amor y bendición.

A mi madre Carmen Orozco por ser el amor más grande en mi vida, por enseñarme la humildad, el respeto y el valor de las cosas. Por ser el mejor padre y madre que Dios me pudo dar, por todo su sacrificio paciencia y apoyo incondicional.

A la memoria de mi padre Clemente Estrada García.

A mis hermanos, Luis, Gilbert y Jesenia por todo su amor, confianza y compañía, a mis sobrinas amadas Samantha y Lía por ser esa alegría más bonita en la vida.

A mi tía Gloria y primo David que incondicionalmente ha estado.

Adela Carolina Estrada O.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme salud, sabiduría y fortaleza para poder culminar este objetivo en mi vida, por colocar a las personas adecuadas en el lugar y momento preciso.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor por la paciencia, por su conocimiento impartido y su talento en la docencia el Dr. Mario García.

Un Dios le pague a la estimada Doctora Liliana Cerda por ser parte de este trabajo y además de haber sido mi querida docente por años, gracias por sus enseñanzas, sus palabras y su aporte incondicional.

A mi familia y hogar por creer en mí, por ser mi motivación diaria y siempre desearme el bien a través de sus actos y consejos, a mis amigos por estar en las buenas y en las malas, y sobre todo a todas aquellas personas que conocí en la vida universitaria.

A la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por recibirme durante mi recorrido académico, un Dios les pague a todos mis estimados docentes, aquellos que a diario nos motivaban hacer los mejores, hacer lo que nos gusta hacer, hacer la motivación de los demás y hacer las cosas con todo el corazón y alma, ¡GRACIAS!

“Podrán desfallecer mi cuerpo y mi espíritu, pero Dios fortalece mi corazón; él es mi herencia eterna”

(Salmo 73:26)

Adela Carolina Estrada O.

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.1.1 Introducción	1
1.1.2 Historia de la chicha.....	2
1.1.3 Chicha de yuca	2
1.1.4 Materia Prima.....	3
1.1.5 Producción de yuca en el Ecuador	4
1.1.6 Hongo <i>Aspergillus oryzae</i>	4
1.1.7 Cepas de <i>Aspergillus oryzae</i>	5
1.1.8 Fermentación solida	6

1.1.9	Fermentación alcohólica	6
1.2	OBJETIVOS.....	7
1.2.1	Objetivo General	7
1.2.2	Objetivos específicos	7
CAPÍTULO II		8
METODOLOGÍA		8
2.1	Materiales	8
2.1.1	Equipos de laboratorio	8
2.1.2	Reactivos	8
2.1.3	Materiales	9
2.2	Métodos	9
2.2.1	Activación del microorganismo	9
2.2.2	Evaluación del crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> e hidrólisis del almidón	9
2.2.3	Fermentación en estado sólido (FES) y Fermentación en estado líquido (FEL)	10
2.2.4	Diagrama de proceso de elaboración de una bebida a base de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) con fermentación sólida y sumergida.....	11
2.2.5	Determinación de las características fisicoquímicas de la fermentación en estado líquido.....	12
2.2.6	Análisis microbiológicos de la chicha de yuca	12
2.2.7	Evaluación Sensorial	13

2.2.8	Análisis estadístico.....	14
CAPÍTULO III.....		15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		15
3.1	Hidrólisis del almidón con fermentación sólida de la yuca.....	15
3.2	Análisis fisicoquímicos de la bebida a base de yuca fermentación sólida y sumergida	16
3.2.1	pH y acidez.....	16
3.2.2	Contenido de Sólidos Solubles (°Brix)	17
3.2.3	Grado alcohólico	17
3.3	Análisis microbiológicos de la bebida a base de yuca	18
3.4	Evaluación sensorial de la bebida a base de yuca	18
3.5	Verificación de hipótesis	19
CAPITULO IV.....		20
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		20
4.1.1	Conclusiones	20
4.1.2	Recomendaciones.....	21
MATERIALES DE REFERENCIA		22
4.2	Referencias Bibliográficas.....	22
4.3	Anexos.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición nutricional de la yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) por 100g de alimento parte comestible.	3
Tabla 3 Parámetros sensoriales	14
Tabla 4 Exhalación de olores de la fermentación Sólida (FES).....	16
Tabla 5 pH y acidez.....	16
Tabla 6 Contenido de Sólidos Solubles medidos en °Brix	17
Tabla 7 Grados de alcohol de cada tratamiento	18
Tabla 8 Resultados microbiológicos	18
Tabla 9 Análisis de la Varianza del efecto de la hidrólisis enzimática del almidón de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca.....	28
Tabla 10 Comparación de medias de Tukey del efecto de la hidrólisis enzimática del almidón de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca	28
Tabla 11 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de <i>Aspergillus oryzae</i> respecto al color.....	32
Tabla 12 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca respecto al color	32
Tabla 13 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de <i>Aspergillus oryzae</i> respecto al olor	32
Tabla 14 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca respecto al olor	33

Tabla 15 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de <i>Aspergillus oryzae</i> respecto al sabor	33
Tabla 16 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca respecto al sabor	33
Tabla 17 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de <i>Aspergillus oryzae</i> respecto a la acidez.....	34
Tabla 18 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca respecto a la acidez	34
Tabla 19 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de <i>Aspergillus oryzae</i> respecto a la aceptabilidad.....	34
Tabla 20 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> en medio de cultivo de yuca respecto a la aceptabilidad	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Hidrolisis enzimática del almidón con de <i>Aspergillus oryzae</i>	15
Figura 2 Parámetros sensoriales de la bebida a base de yuca	19
Figura 3 Curva estándar del almidón soluble.....	29
Figura 4 Curva estándar de glucosa	29
Figura 5 Determinación de almidón.....	30
Figura 6 Determinación de azúcares reductores mediante el método DNS.....	30
Figura 7 (A) desarrollo de medio a partir de yuca para el crecimiento de <i>Aspergillus oryzae</i> . (B) toma de muestras diarias para la evaluación de almidón y DNS.	31
Figura 8 (A) Fermentación sólida en medio de cultivo a base de yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) con diferentes cepas de <i>Aspergillus oryzae</i> . (B) Fermentación sumergida.	31

RESUMEN

El presente proyecto de investigación se desarrolla con el propósito de elaborar una bebida a base de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con fermentación sólida y sumergida.

Para la elaboración de la bebida a base de yuca se realizó ensayos de fermentación sólida con cuatro cepas, las cuales son: Barley Koji, Soybean Koji, Red Rice Koji y Light Rice koji, donde se obtuvo un mejor desdoblamiento del almidón en azúcares reductores por las cepas Red y Light. La fermentación sólida se efectuó en un tiempo de nueve días a 30 grados centígrados, mientras que la fermentación sumergida en 15 días a temperatura ambiente dando como resultado que las cepas Red y Light son los mejores tratamientos a diferencia de Barley y Soybean. Además, en función a la normativa ecuatoriana vigente NTE INEN 0973, 1983; NTE INEN 341, 1978; NTE INEN 340, 2016; NTE INEN 2802, 2015; INEN 1529-10, 2013 y NTE INEN-ISO 13301, 2014 se establecieron las características fisicoquímicas de la bebida a base de yuca en el cual se determina que el pH, la acidez, grados brix que se encuentran valores entre 8,03 a 9,1 y grados alcohólicos en un rango de 2,5 a 3,5.

El análisis microbiológico de la chicha de yuca está en los rangos permitidos de 10 unidades formadoras de coloneas en un mili litro cumpliendo con el límite máximo de un recuento microbiano de mohos y levaduras, finalmente la evaluación sensorial que fue realizada a 15 catadores semi-entrenados se obtiene que en cuanto al sabor la mejor es Red.

Palabras clave: Bebida a base de yuca, yuca (*Manihot esculenta* Crantz, fermentación sólida, fermentación sumergida, alcohol, cepas *aspergillus oryzae*, levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).

ABSTRACT

This research project is developed with the purpose of developing a drink based on cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with solid and submerged fermentation.

For the elaboration of the cassava-based drink, solid fermentation tests were carried out with four strains, which are: Barley Koji, Soybean Koji, Red Rice Koji and Light Rice koji, where a better breakdown of starch into reducing sugars was obtained by the Red and Light strains. The solid fermentation was carried out in a period of nine days at 30 degrees Celsius, while the submerged fermentation took place in 15 days at room temperature, resulting in the Red and Light strains being the best treatments, unlike Barley and Soybean. In addition, according to the current Ecuadorian regulations NTE INEN 0973, 1983; NTE INEN 341, 1978; NTE INEN 340, 2016; NTE INEN 2802, 2015; INEN 1529-10, 2013 and NTE INEN-ISO 13301, 2014 established the physicochemical characteristics of the cassava-based drink in which it is determined that the pH, acidity, brix degrees that are values between 8.03 to 9 ,1 and alcoholic degrees in a range of 2.5 to 3.5.

The microbiological analysis of the cassava chicha is within the permitted ranges of 10, complying with the maximum limit of a microbial count of molds and yeasts. Finally, the sensory evaluation that was carried out on 15 semi-trained tasters shows that in as for the flavor, the best is Red.

Keywords: Cassava-based beverage, cassava (*Manihot esculenta* Crantz, solid fermentation, submerged fermentation, alcohol, *aspergillus oryzae* strains, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Introducción

El Ecuador es un país multicultural lleno de costumbres y tradiciones, a lo largo de la historia, esta cultura también se ha reflejado en su riqueza gastronómica. En particular, la chicha de yuca es una bebida tradicional y ancestral de las comunidades de la Amazonia Ecuatoriana. La yuca es el principal ingrediente de esta bebida, la cual se obtiene tras un proceso de fermentación (Arias D, 2016).

El **Ministerio de Cultura y Patrimonio, (2016)** menciona que para la preparación de la chicha, se debe cocinar la yuca en agua sin sal hasta una consistencia suave y degradable, una vez cocida las mujeres se encargan de machucar y masticarla, con el objetivo de que las glándulas salivales generen enzimas que degradan el almidón en azúcares, con el fin de evitar la adición de edulcorantes a la preparación, se añade camote o plátanos maduros a fin de acelerar el proceso fermentativo en ollas de barro.

Esta bebida posee un bajo contenido de alcohol, el mismo que es directamente proporcional a la cantidad de azúcares y el tiempo de fermentación. La chicha posee características organolépticas como: color blanco o amarillento, es ligeramente ácida y un poco espesa (Guanoluisa Ataballo & Lanchimba Aigaje, 2021).

Para la elaboración de esta bebida, se pretende proponer la sustitución del proceso de masticación en la elaboración de chicha por un nuevo método tecnológico, por lo que se propone el uso de otras alternativas como el uso de microorganismos, para obtener un producto similar y que el mismo pueda ser industrializado y comercializado.

El uso de microorganismo como *Bacillus o Aspergillus*, para degradar o hidrolizar el almidón en azúcares simples por la presencia de enzimas extracelulares (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

1.1.2 Historia de la chicha

Según la **RAE, (2019)** la palabra chicha significa “bebida alcohólica que resulta de la fermentación del maíz en agua azucarada usada en varios países de América”. Según **Collazos, (2019)** menciona que es un tipo de bebida alcohólica ancestral, de textura espesa y de sabor fuerte, que es elaborada a partir del cereales o tubérculos molidos con la dentadura y sometidos a un proceso de fermentación, es consumida por ciertos grupos étnicos.

En varias investigaciones evidenciaron que esta bebida proviene desde hace muchos años atrás, debido a que se han descubierto varias vasijas de barro con restos de estas bebidas. Esta bebida era consumida en celebraciones, rituales y ocasiones de relevancia ceremonial y espiritual. Se menciona que los ancestros para poder consumir este tipo de bebidas, se realizaban pagos con dinero y con largas jornadas laborales. En la actualidad esta bebida en Ecuador es tradicional de los pueblos amazónicos, siendo las chichas que más se consumen y elaboran las que son a base de jora, arroz, y de yuca (**El Comercio, 2015**).

1.1.3 Chicha de yuca

En Ecuador la chicha de yuca es servida en un pilche, es una bebida que es fuente de energía para los pobladores de amazonia. (**Pacheco, 2016**).

La preparación de la chicha puede llegar a tardar varios días y es realizado por mujeres de la comunidad. La yuca es pelada, cocida y machacada hasta la formación de una masa, después de 24 horas de este proceso se fermenta durante 5 días y estará lista para consumirla (**Pacheco, 2016**).

Cabe mencionar que también poseen otro tipo de preparación de la chicha en donde la yuca es sometida a dos tipos de fermentaciones. Primero la yuca entra a un proceso de cocción a una temperatura de 80 a 82 °C durante 30 minutos en agua sin sal hasta que este suave, para la primera fermentación se coloca las yucas junto al camote en un recipiente cubierto con hojas de bijao o achira y se recubre por completo hasta la completa colonización de la *Monilia sitophila* que es un hongo que tiene el micelio de color rojo, este proceso puede tardarse de 4 a 5 días; la segunda fermentación se dará en vasijas de barro, en las que se coloca el preparado anterior y son cubiertas

durante tres días con hojas de bijao o achira, luego se mezcla con agua y se tamiza para su consumo (Mayuri & Santamaria, 2019).

1.1.4 Materia Prima

1.1.4.1 Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

La yuca es un cultivo procedente del trópico americano extendido en el mundo, pertenece al género *Manihot* de la familia *Euforbiaceae*, este género posee más de 100 especies, sin embargo, solamente la *Manihot esculenta* tiene importancia económica **Brenes et al., (2017)**; este cultivo crece hasta los 1620 metros sobre el nivel del mar; la yuca es un tubérculo rico en carbohidratos, proteínas, minerales y vitaminas (Tabla 1) **(Dahua, 2016)**.

La yuca posee una gran importancia para los indígenas de la Amazonía Ecuatoriana, ya que es un alimento cotidiano debido al valor energético, el contenido de calcio y vitamina K, los mismos que ayudan a mantener los huesos sanos y podría ser coadyuvante para la prevención de enfermedades como la osteoporosis. Además la yuca se utiliza con fines medicinales, ya que en esta región se acostumbra a provocar daños en el tubérculo para obtener el almidón, luego se expone al sol hasta obtener un polvo de color blanco que es usado para curar el sarpullido en los niños **(Ministerio de Cultura y Patrimonio., 2013)**

Tabla 1 Composición nutricional de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) por 100g de alimento parte comestible.

Composición nutritiva	
Caloría (Kcal)	132
Humedad (g)	65.2
Proteínas (g)	1.0
Grasas (g)	0.4
Carbohidratos (g)	32.8
Fibras (g)	1.0
Cenizas (g)	0.6
Calcio (g)	40
Fósforo (mg)	34
Hierro (mg)	1.4
Tiamina (mg)	0.05
Riboflavina (mg)	0.04
Niacina (mg)	0.60

Ácido ascórbico (mg)	19.00
Porción no comestible (%)	32

Fuente: Tomado de **Cumari.G., (2019)**

1.1.5 Producción de yuca en el Ecuador

El cultivo de yuca tiende a darse en cualquier época del año en lugares, en los que las temperaturas máximas son 30°C y mínimas de 17°C; para la siembra es recomendable dejar de 1m a 1.2m entre plantas. Es un cultivo que tiene altos requerimientos de nitrógeno por lo que en el proceso de fertilización se utiliza por lo general 40 kg/ha de nitrógeno. El tratamiento post cosecha de este tubérculo es el consumo y la producción de harinas, almidón, chicha, bebidas alcohólicas, etc, **(Hinostroza, 2014)**.

En la provincia Manabí se cultiva la variedad de yuca denominada “La rendidora”, se puede presentar un rendimiento promedio de 21.3 toneladas por hectárea, además en el año 2017 en 20.000 hectáreas se recolectó 66.147 toneladas de yuca **(Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2020)**.

La yuca para ser cultivada no necesita de suelos fértiles sino de húmedos y que sean preparados para la brotación y enraizamiento, para la siembra se hace en épocas lluviosas, en la Costa los meses de diciembre y febrero, en la Amazonía febrero y marzo **(Hinostroza, 2014)**.

1.1.6 Hongo *Aspergillus oryzae*

Aspergillus es un hongo filamentoso o moho, proviene del reino fungí su división es *Ascomycota* de la clase *Eurotiomycetes* de la familia *Aspergillaceae*; el género *Aspergillus oryzae* este compuesto por hifas y su conjunto es conocido como micelio, son heterótrofos es decir que son incapaces de crear su materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas alimentándose de otros seres vivos **(Cubides Yarardin, 2019)**.

El género *Aspergillus* poseen un sistema metabólico que se clasifica en primario y secundario, el mismo que dependerá del número de ácidos carboxílicos con la finalidad de descomponer en cadenas de ácidos grasos, formando complejos de ácido graso sintasa, esto permite que se desarrollen de mejor forma la membrana celular y el almacenamiento de enzimas **(Cubides Yarardin, 2019)**.

En cuanto al metabolismo primario se desarrolla en base al contacto directo con fuentes de energía estas pueden ser cereales, almidones, etc., una vez que se alimentan secretan enzimas que tienen la capacidad de degradar proteínas o enlaces peptídicos dentro del almidón para convertirlos en aminoácidos y azúcares para el consumo, el metabolismo secundario evoluciona a partir de ácidos con el fin de suprimir las vías metabólicas y se produzca metabolitos secundarios, estos generan que el *A. oryzae* tenga la capacidad de transformar su nivel de eficiencia dependiendo en el medio que se encuentre (**Cubides Yarardin, 2019**).

El *Aspergillus oryzae* es un hongo utilizado en Asia oriental como Japón y china, generalmente lo emplean en la producción de alimentos, en particular en la fermentación de soja, sake, vinagre, etc. (**Campins Antoni, 2016**), este hongo por lo general se usa en medio sólido, es esencial en procesos de fermentación sólida, debido a su gran capacidad de segregar gran cantidad de enzimas degradantes con el fin de descomponer proteínas y varios almidones en aminoácidos y azúcares (**Cubides Yarardin, 2019**).

1.1.7 Cepas de *Aspergillus oryzae*

Red yeast rice (arroz de levadura roja): es un arroz fermentado de color púrpura rojizo brillante que obtiene su color al ser fermentado con el hongo *Monascus purpureus*, es utilizado para dar coloración a varios productos, entre ellos el tofu en escabeche, vinagre de arroz rojo, salchicha seca china, y pasteles chinos, además le da un sabor agradable y sutil (**GEM Cultures, 2022**).

Ligh rice koji starter: Esta es una fermentación en dos partes, la primera, mezclar granos cocidos y/o soja con diferentes cepas de *Aspergillus oryzae*, un moho, llamado "tane koji" o iniciador de koji, cocinar el grano, añadir el iniciador e incubar el cultivo de koji durante unas 48 horas. La segunda fermentación está orientada para hacer amazake, miso, shoyu o tamari, mezclar el koji con otros ingredientes de acuerdo con las instrucciones proporcionadas (**GEM Cultures, 2022**).

Barley (Mugy) Koji starter: Este koji de cebada integral es un inoculante natural para hacer miso (pasta fermentada realizada a base de soja y sal marina), shoyu y muchos otros alimentos fermentados especiales japoneses. El Koji de cebada tradicional está hecho a mano a partir de cebada integral natural, luego se inocula con esporas de

Aspergillus oryzae y se incubaba bajo condiciones estrictamente controladas. Luego, el koji resultante se deja desarrollar durante 48 horas antes de secarse rápidamente para conservarlo y usarlo para hacer los mejores encurtidos de amazake, miso o koji (**GEM Cultures, 2022**).

Soybean (Hatcho) Koji starter: Esta cepa ha sido específicamente para crecer bien en soja. Tiene buena fragancia, cantidad media de amilasa, pero fuerte poder proteolítico, lo cual es perfecto para el hatcho miso (variedad antigua del miso elaborada con soja y sal). El cultivo de Koji en soja es un poco avanzado y no se recomienda intentarlo como tu primer koji, es mejor comenzar con arroz para tener una buena idea del proceso, lo mejor es remojar la soja durante al menos 12 horas, escurrirlos y cocinarlos al vapor en una olla a presión durante 1 hora (si no tiene una olla a presión, cocine los frijoles al vapor en una olla de vapor normal durante 3 horas), después de cocinar al vapor, asegurarse de que los frijoles no estén demasiado húmedos, en caso de que estén demasiado húmedos, *Bacillus Subtilis* se hará cargo (bacteria *Natto*), lo que dará como resultado frijoles viscosos que huelen a amoníaco (**GEM Cultures, 2022**).

1.1.8 Fermentación sólida

La fermentación sólida (FES) es un proceso de fermentación en un medio sólido el cual posee características como un contenido de humedad bajo inferior o igual al 12% el mismo que puede ocurrir en estado no aséptico y natural, posee varias ventajas como simplicidad en el diseño y uso de pequeños fermentadores, buen rendimiento además de bajos requerimientos energéticos e incluso se obtiene un producto más estable y a bajo costo (**Robinson et al., 2002**).

1.1.9 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica se realiza mediante una fermentación líquida en la cual facilita la degradación de azúcares en alcohol y dióxido de carbono, donde existe una solución de nutrientes, para dicha fermentación es necesario de las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, la misma que obtiene energía a partir de glucosa y tiene alta capacidad fermentativa (**Matsumoto & Malpica , 2013**).

Una de las ventajas de este tipo de fermentación, es que permite tener un mayor control sobre las variables y se obtiene como producto principal al etanol, además permite la elaboración del pan, vino, cerveza, etc. (**Matsumoto & Malpica , 2013**).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

- Desarrollar una bebida a base de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) mediante fermentación sólida y sumergida.

1.2.2 Objetivos específicos

- Establecer el tiempo adecuado de fermentación solida de la yuca (*Manihot esculenta Crantz*) con diferentes cepas de *Aspergillus oryzae*.
- Demostrar la segunda fermentación en estado sumergido a base de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) empleando *Saccharomyces cerevisiae*.
- Determinar las características fisicoquímicas de la bebida a base de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) durante la fermentación líquida
- Determinar la calidad sensorial de la bebida a base de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) con fermentación sólida y sumergida.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

Los materiales utilizados en el desarrollo de la bebida de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) se presentan a continuación.

2.1.1 Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Autoclave
- Estufa
- Cámara de flujo laminar ESCO
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro Fisher Scientific
- Brixometro
- pH metro
- centrifuga
- Vortex Labnet
- Termobloque
- Centrífuga (para microtubos de 1.5 mL)
- Micropipetas (2 – 20 μ L; 20 – 200 μ L; 100 – 1000 μ L)

2.1.2 Reactivos

- Medio de cultivo PDA
- Medio de cultivo PDB
- Medio de cultivo SS
- Lugol
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
- Hidróxido de sodio 0,1N
- Almidón soluble
- Agua Milli-Q

- Agua destilada

2.1.3 Materiales

- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon
- Pyrex
- Vasos de precipitación
- Puntas
- Microtubos Eppendorf (1.5 mL)
- Lámpara de alcohol
- Gradilla para microtubos
- Placas Petri
- Placa de 96 pocillos
- Celdas

2.2 Métodos

2.2.1 Activación del microorganismo

En la activación del *Aspergillus oryzae* en los diferentes ensayos de fermentación sólida. Se utilizó muestras liofilizadas de cuatro cepas de *A. oryzae* (Barley Koji, Soybean Koji, Red Rice Koji y Light Rice koji), adquiridas en GEM Cultures USA, las mismas que fueron proporcionadas por la Dra. Liliana Cerda, docente – investigadora de la FCIAB. Cada una de las cuatro cepas fueron activadas mediante la inoculación de 1 g de cepa liofilizada en tubos de ensayo que contiene 10 mL de caldo de papa dextrosa (PDB) encubadas a 30 °C. Además, las cepas fueron también inoculadas en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 30 °C durante 15 días **(Escobar Razo, 2019)**

2.2.2 Evaluación del crecimiento de *Aspergillus oryzae* e hidrólisis del almidón

Para la evaluación del crecimiento de cada una de las diferentes cepas de *A. oryzae* sobre yuca, se cocinó en agua por 90 min. Para ello, la yuca cocinada se prensó hasta conseguir un puré uniforme, se colocó 65g de yuca en cajas Petri en una cabina de flujo laminar, posteriormente se colectó las esporas producidas en cultivos de 15 días

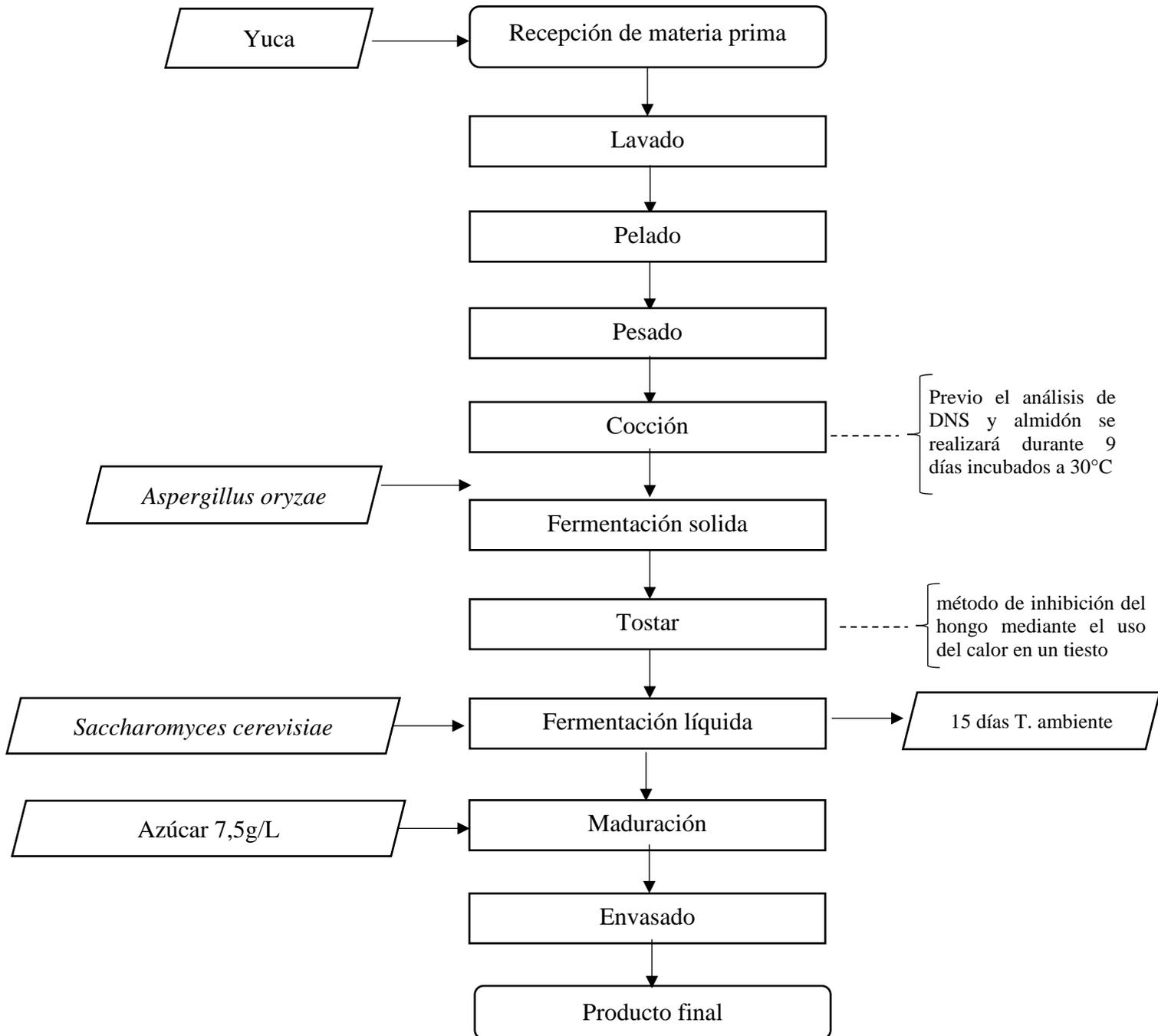
en PDA y se las re suspendió en 5mL de agua Milli-Q estéril posterior a ello se tomó 1 mL de la solución de esporas y se inoculó sobre la yuca cocida y se incubó durante 10 días a 30 °C. En caso de ser necesario se añadió agua Milli-Q estéril sobre los cultivos para mantener una humedad superior al 60%.

Se recolecto muestras diarias de aproximadamente 1 g, las cuales se secaron en una estufa a 70 °C por 48 h. Las muestras secas se re suspendieron en agua Milli-Q estéril hasta llegar a una concentración de 100 mg/mL y la fracción soluble se evaluó con respecto a la conversión del almidón en azúcares reductores y almidón residual, mediante los métodos DNS y la prueba del Lugol, respectivamente, de acuerdo con la metodología descrita por **Miller, (1959)**. Además, durante este proceso se evaluó la presencia de aromas en la yuca fermentada mediante un proceso de análisis sensoria. Este procedimiento se repitió para cada cepa de *A. oryzae*, cada ensayo se realizó por triplicado.

2.2.3 Fermentación en estado sólido (FES) y Fermentación en estado líquido (FEL)

El ensayo de fermentación en medio sólido (FES) se realizó con las cepas de *A. oryzae* (Barley Koji, Soybean Koji, Red Rice Koji y Light Rice Koji) que posean una mayor capacidad de conversión del almidón en azúcares reductores y que produzcan aromas agradables durante la fermentación. Se inoculó la yuca y se incubó de acuerdo con lo descrito en la sección anterior, con la diferencia de que la yuca cocida se colocará en bandejas de cristal (Pyrex®) estériles con una capacidad de aproximadamente 4L. El líquido obtenido de la cocción de la yuca se reservó para la fermentación sumergida (**Escobar Razo, 2019**). Posterior a la FES, se llevó a cabo la fermentación en estado líquido (FEL). Se transfirió la yuca cocida y fermentada por *A. oryzae* a un tiesto para inactivar al microorganismo mediante calor. Posteriormente, la yuca se transfirió a botellas de plástico de 4L a las cuales se les añadirá el líquido de cocción de la yuca y agua Milli-Q estéril hasta conseguir una concentración de azúcares equivalentes a un porcentaje de alcohol etílico de aproximadamente 3.5 %. Finalmente, la preparación se inoculó con *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada 5g por cada 10L y se fermento durante un periodo de 15 días a temperatura ambiente y en oscuridad (**Mena & Santamaria, 2019**)

2.2.4 Diagrama de proceso de elaboración de una bebida a base de yuca
(Manihot esculenta Crantz) con fermentación sólida y sumergida



2.2.5 Determinación de las características fisicoquímicas de la fermentación en estado líquido.

2.2.5.1 Determinación de pH

Se determinó el pH mediante el uso de un potenciómetro previamente calibrado, basados en la metodología de la Normativa ecuatoriana (NTE INEN 0973, 1983).

2.2.5.2 Determinación de °Brix

Se determinó los °Brix utilizando un refractómetro digital previamente calibrado, basados en la metodología de (Hervas Paredes, 2011). Para lo cual se tomó aproximadamente 1-2 gotas y se colocó en el lector del área del sensor posteriormente se leyó el resultado y se trabajó por triplicado.

2.2.5.3 Determinación de acidez

Se determinó la acidez en base a la normativa (NTE INEN 2323, 2002), en la cual describe el método de titulación en el cual se utilizó agua destilada, muestra, fenolftaleína e Hidróxido de sodio 0,1N, posterior a ello se realizó el respectivo calculo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez total (ácido láctico)} = \frac{(cm^3 \text{ de NaOH } 0,1 \text{ N} \times 0.9)}{(cm^3 \text{ cerveza} \times \text{ gravedad específica de la cerveza})}$$

(NTE INEN 2323, 2002)

2.2.5.4 Determinación de grado alcohólico

Para la determinación del grado alcohólico de la chicha se trabajó en dos fases según la normativa NTE INEN 340:2016, la primera fase consistió en un proceso de destilación de alcohol de la chicha de yuca y la segunda fase con la ayuda de un alcoholímetro se midió el grado de alcohol de la muestra (NTE INEN 340, 2016).

2.2.6 Análisis microbiológicos de la chicha de yuca

Para el análisis microbiológico de las chichas de yuca se realizaron tres ensayos: mohos, levaduras y *salmonella* según la norma (NTE INEN 2802, 2015).

2.2.6.1 Determinación de mohos y levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras en las diferentes muestras de chicha se utilizó el método de las diluciones seriadas, se tomó 1ml de muestra, por cada tratamiento, y se mezcló con 9mL de agua estéril en un tubo de ensayo. A partir de esta solución se desarrolló diferentes diluciones hasta llegar de 10^{-3} . Posteriormente se sembró en cajas Petri con 20 mL de medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), previamente esterilizado, Todos los pasos se realizaron por triplicado y en condiciones estériles, a continuación, fueron incubadas a 27 °C durante 5 días. Luego del tiempo respectivo de incubación se procedió al conteo de las colonias crecidas, y el resultado fue expresado en UPC/mL (Unidades Propagadoras de Colonias por mL) (**INEN 1529-10, 2013**)

2.2.6.2 Determinación de *Salmonella*

Para el análisis de *Salmonella* se empleó la metodología basada en la normativa NTE INEN 1529-15:2013 la cual se fundamenta en un pre - enriquecimiento luego se procedió a sembrar en estría sobre la superficie de la placa en agar *Salmonella-Shigella* (SS), cabe mencionar que la mayoría de colonias típicas de salmonelas pueden ser translúcidas, opacas, incoloras o incluso de color crema con o sin centro negro, una vez realizado la siembra se procede a invertir las placas e incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h (**NTE INEN 1529, 2013**)

2.2.7 Evaluación Sensorial

Se realizó un análisis sensorial para determinar las características organolépticas propias de la bebida fermentada, como son: olor, color, sabor, acidez, turbidez y por último aceptabilidad a través de la participación de 15 catadores semi-entrenados, se utilizará una ficha de catación con una escala hedónica donde 0 (no me gusta) a 5 (me gusta mucho) correspondiente a la intensidad de gusto del catador (**NTE INEN-ISO 13301, 2014**).

Los parámetros sensoriales evaluados fueron plasmados en la siguiente forma:

Tabla 2 *Parámetros sensoriales*

CARACTERÍSTICA	ESCALA
COLOR	1. No tiene
	2. Amarillento
	3. Cremoso pálido
	4. Cremoso
	5. Cremoso 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

2.2.8 Análisis estadístico

Se menciona como una estadística experimental donde se desarrollan aspectos innovadores, mejorando procesos donde las fuentes de información y métodos estadísticos es una forma de difundir resultados, mediante los datos obtenidos se plantea un análisis de variancia ANOVA y un análisis de comparación Tukey, las diferencias significativas se consideraron al 95% de confianza. Para el análisis estadístico se emplearon softwares como EXCEL y INFOSTAD.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Hidrólisis del almidón con fermentación sólida de la yuca

Se utilizó *Aspergillus oryzae* en la fermentación sólida, este hongo asexual utilizado durante varias décadas en las grandes industrias de fermentaciones tradicionales específicamente japonesas, es conocido como un moho koji derivado del material de fermentación, estos son productores de enzimas industriales como: amilasa, proteasa, β - galactosidasa, lipasa y celulasa (Gómez Rojas et al., 2021).

Según Morales (2019) el proceso de hidrólisis enzimática consiste en el rompimiento de las moléculas de almidón hasta obtener glucosa. La hidrólisis enzimática del almidón se midió en base a la concentración de azúcares reductores obtenidos por la acción de las enzimas de las cepas utilizadas, en la Figura 1 se detalla la concentración de azúcares reductores en función del tiempo observándose un incremento de este.

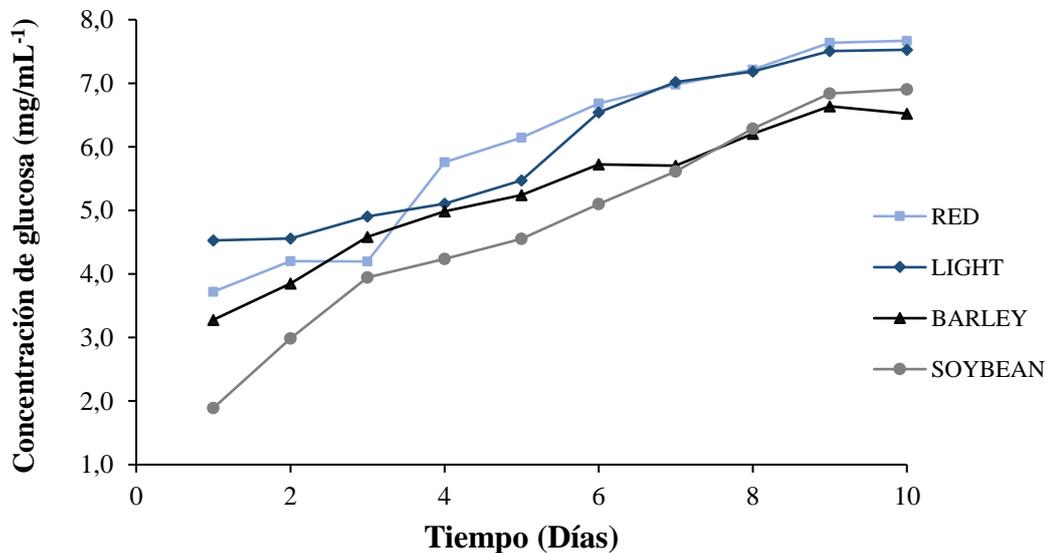


Figura 1 Hidrolisis enzimática del almidón con de *Aspergillus oryzae*

Mediante un análisis de varianza ANOVA se evidenció que existe diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$), por lo tanto, se establece que existe un efecto de la hidrólisis enzimática del almidón con las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae*, no obstante, la prueba de comparación de medias Tukey confirmó que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Anexo A. Tablas 4 y 5).

El análisis sensorial realizado a cada tratamiento mostró que la fermentación sólida favoreció al desarrollo de olores. En la Tabla 4, se detalla cada uno de los olores obtenidos en cada una de las cepas.

Según Pierre, (1995) menciona que el desarrollo de los aromas en medios sólidos depende de varios factores, por ejemplo la actividad del agua, el estado fisiológico del cultivo, la fuente de carbono y de hidrógeno y por su puesto de la misma cepa, a causa de lo antes mencionado cabe recalcar que olor de cada tratamiento al transcurso de la fermentación se fue intensificando.

Tabla 3 *Exhalación de olores de la fermentación Sólida (FES)*

Cepas de <i>A. oryzae</i>	Olor característico
Light	Manzana verde
Red	Panificación
Barley	Panificación
Soybean	Proceso de putrefacción de frutas

3.2 Análisis fisicoquímicos de la bebida a base de yuca fermentación sólida y sumergida

En la bebida a base de yuca se determinaron ciertos parámetros fisicoquímicos como el pH, °Brix, acidez y grados alcohólicos.

3.2.1 pH y acidez

En la Tabla 5 se detalla en pH de cada una de las chichas obtenidas durante la fermentación. El pH de las chichas se encuentra en un rango de 3,3 a 3,7; mientras que la acidez de los tratamientos fue variable y estuvo en un rango de 4,69 a 6,62 % de ácido láctico.

Tabla 4 *pH y acidez*

Tratamiento	pH	Acidez total
Red	3,790 ± 0,02	4,69 ± 0,14
Light	3,713 ± 0,02	5,81 ± 0,14
Barley	3,403 ± 0,02	6,09 ± 0,15
Soybean	3,370 ± 0,02	6,62 ± 0,15

El pH de la chicha de yuca depende del proceso de fermentación de manera natural por acción de las levaduras, en condiciones de temperatura y tiempo ideal, al transcurso que pasa el tiempo el pH desciende y la acidez aumenta, debido a que el pH es inversamente proporcional a la acidez (Tabla 5) en los diferentes tratamientos los mismo que se verán influenciados en la parte sensorial (**Amagua & Chancusig, 2020**).

Según, **Andrade, (2022)** menciona que el pH y acidez se verán influenciados por las características propias del medio donde se realice su proceso de fermentación, además de los diferentes factores como la temperatura, medio, tiempo, y otros factores externos que sean propios de dicho medio, no obstante los resultados obtenidos se alían a la normativa (**NTE INEN 1101, 2017**).

3.2.2 Contenido de Sólidos Solubles (°Brix)

El contenido de sólidos solubles se muestra en la Tabla 6, el contenido de sólidos está entre 8,03 a 9,1 °Brix, estos parámetros fisicoquímicos ayudan a controlar el proceso de fermentación en cuanto al grado alcohólico, mientras presenten valores ascendientes estos ayudaran a la transformación de azúcares en alcohol.

Tabla 5 *Contenido de Sólidos Solubles medidos en °Brix*

Tratamiento	°Brix
Red	9,100 ± 0,15
Light	8,567 ± 0,15
Barley	8,033± 0,06
Soybean	8,167 ± 0,10

3.2.3 Grado alcohólico

En la Tabla 7, se muestran los grados alcohólicos obtenidos de cada uno de los tratamientos, se encuentran en el rango de 2,5 a 3,5, de acuerdo a otros estudios se han registrado valores similares en la chicha de yuca de 2-5% (**Colehour, y otros, 2014**).

Tabla 6 Grados de alcohol de cada tratamiento

Tratamiento	Grados de Alcohol
Red	3,5 ± 0,15
Light	3,5 ± 0,15
Barley	2,5 ± 0,12
Soybean	2,5 ± 0,15

3.3 Análisis microbiológicos de la bebida a base de yuca

En la Tabla 8 se reportan los datos del recuento de mohos y levaduras (UFC/mL) para los diferentes tratamientos todos se encuentran dentro del límite establecido, según la norma técnica ecuatoriana NTE INEN 2802 2015-10, que establece el límite máximo permisible de mohos y levaduras para bebidas alcohólicas un rango máximo a 10 UFC/mL, en cuanto a *Salmonella* se puede observar que el requisito microbiológico de la normativa es ausencia por lo cual cumplen todos los tratamientos mencionados.

Tabla 7 Resultados microbiológicos

Parámetros Microbiológicos	Requisitos microbiológicos	Tratamientos			
		Red	Light	Barley	Soybean
Mohos y levaduras (UFC/mL)	10	5	1	6	5
Salmonella	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia	ausencia

3.4 Evaluación sensorial de la bebida a base de yuca

El análisis sensorial se realizó a los 4 tratamientos Red, light, Barley y Soybean, como se detalla en la (figura 3), en el cual se obtuvo mayores puntuaciones para el tratamiento Red.

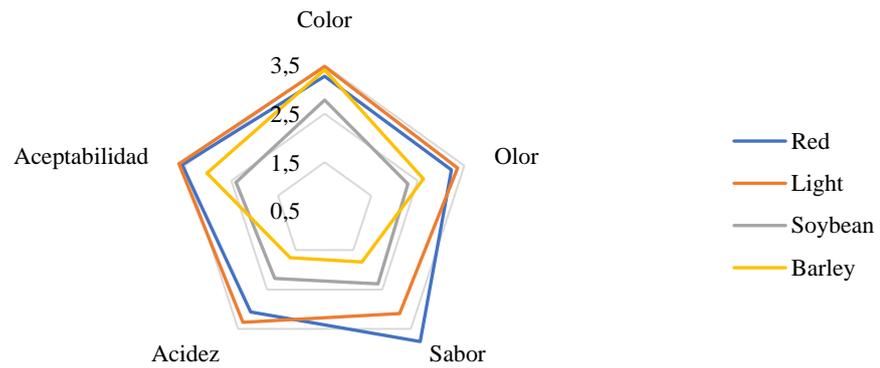


Figura 2 *Parámetros sensoriales de la bebida a base de yuca*

En las diferentes Tablas 11, 13, 15, 17 y 19 (Anexo G) se observa el análisis de varianza en el que se muestra que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$), en los diferentes atributos evaluados. Sin embargo en cuanto a las tablas de comparación de medias Tukey, se observa que en cuanto al color y olor que el mejor tratamiento fue Light (Anexo G, Tablas 12 y 14), mientras que el sabor, acidez y aceptabilidad los mejores tratamientos fueron Light y Red (Anexo G, Tablas 16, 18 y 20); con respecto a los parámetros evaluados se puede mencionar que cada característica obtenida es directamente proporcional a la cepa empleada en cada medio, según Pacheco & Herrera, (2021) menciona que los diferentes preparados enzimáticos poseen características sensoriales propias a cada enzima empleada y a la generación de ácidos orgánicos en el medio.

3.5 Verificación de hipótesis

De acuerdo con los resultados obtenidos se acepta la Hipótesis alternativa dado que es factible obtener una bebida a base de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) mediante fermentación sólida y sumergida. En la fermentación sólida mediante la implementación de *A. Oryzae* se comprobó que este hongo posee la capacidad de hidrolizar el almidón en azúcar mediante un análisis de varianza; además de brindar olores característicos de cada cepa, sin embargo este proceso tiene como objetivo incrementar azúcares para el desarrollo de la segunda fermentación, al finalizar el desarrollo de la bebida mediante diferentes análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales se puede afirmar que es una bebida apta para el consumo.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1.1 Conclusiones

- Se desarrolló una bebida a base de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) a través de fermentación sólida y sumergida, empleando cepas de *A. oryzae* a una temperatura de 30°C por nueve días y *Sacharomyces cerevisiae* a temperatura ambiente por quince días, respectivamente.
- Se estableció que el tiempo adecuado para la fermentación sólida de la yuca con cepas de *A. oryzae* es de nueve días. En este periodo de tiempo se logró la mayor capacidad de conversión del almidón en azúcares reductores y se dio la producción de un aroma a manzana verde para el tratamiento Ligth y aromas de fermentación para los tratamientos Red y Barley; mientras que el tratamiento Soybean mostró un aroma típico del proceso de putrefacción de frutas.
- La fermentación en estado sumergido empleando *Saccharomyces cerevisiae* demostró que una fermentación sumergida posterior a una fermentación sólida ayuda en la intensificación del olor y sabor, al aumentar el grado alcohólico de la bebida ya que la levadura posee una cantidad mayor de azúcares para su consumo.
- Se determinaron las características fisicoquímicas de las bebidas tras la fermentación líquida. Las bebidas Red, Ligth, Barley, Soybean poseen un pH en un rango de 3,790 a 3,370, una acidez entre 5,36 a 9,56. Por otro lado, los °Brix se encuentran en un rango de 9,100 a 8,167 y los grados alcohólicos se encuentran entre 3,5 a 2,5.
- Se determinó que la calidad de la bebida a base de yuca elaborada con fermentación sólida y sumergida influyó directamente en los atributos de color, olor, sabor, acidez y aceptabilidad, existiendo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los atributos de los diferentes tratamientos y observándose que los mejores tratamientos son el Red y Light.

4.1.2 Recomendaciones

- Caracterizar los ácidos orgánicos presentes en las 4 bebidas elaboradas con fermentación sólida y sumergida.
- Evaluar el tiempo de vida útil de las bebidas fermentadas con *A. oryzae* y *Sacharomyces cerevisiae* a diferentes temperaturas de almacenamiento.
- Realizar análisis de viscosidad de los diferentes tratamientos y evaluar cómo influye en la aceptación general de la bebida.

MATERIALES DE REFERENCIA

4.2 Referencias Bibliográficas

- Arias D. (2016). *CHICHA: CERVEZA ANTIGUA DEL ECUADOR*.
<https://soleq.travel/es/cultura-ecuatoriana/chicha-cerveza-antigua-del-ecuador>
- Andrade Marcela. (2022). *Universidad técnica de cotopaxi*. 65.
<http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/9067/1/MUTC-001315.pdf>
- Amagua, G., & Chancusig, A. (2020). ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UN PREPARADO ENZIMÁTICO (α -AMILASA, β - AMILASA Y AMILOGLUCOSIDASA) SOBRE MASATO SEMI-SÓLIDO DE YUCA (Manihot esculenta CRANTZ) PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA. In *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad* (Vol. 1).
<http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Brenes, E. A., Segreda, A., Daniel, R., Argüello, S., Morales González, J., Chacón, M., Ligia, L., Rojas, R., Chinchilla, P. A., Torres, S., Yannery, P., & Bonilla, G. (2017). *Innovación para la seguridad alimentaria y nutricional en Centroamérica y Panamá MANUAL DEL CULTIVO DE YUCA Manihot esculenta Crantz*. 96. www.altdigital.co
- Caiza María. (2022). “*La chicha de yuca como Manifestación Cultural, en la comunidad de Panduyaku, Cantón Gonzalo Pizarro, Provincia de Sucumbíos.*”
- Campins Antoni. (2016). *El sake, la desconocida bebida que nos llega del sol naciente*.
<https://www.vilaviniteca.es/blog/es/el-sake-la-desconocida-bebida-que-nos-llega-del-sol-naciente/>
- Collazos, D. (2019). ¿Larga vida a la chicha? *Revista Neuronum*, 5(1), 151–155.
<https://eduneuro.com/revista/index.php/revistaneuronum/article/view/175>
- Colehour, A., Meadow, J., Liebert, M., Cepon-Robins, T., Gildner, T., Urlacher, S., . . . Sugiyama, L. (2014). Local domestication of lactic acid bacteria via cassava beer fermentation. *Peerj*, DOI 10.7717/peerj.479.

- Cubides Yarardin. (2019). *COMPARACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ALFA-AMILASA DE Aspergillus oryzae EN CULTIVARES DE ARROZ (Oryza sativa L.) Nishiki, vs FEDEARROZ 68 Y 67 POR MEDIO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA TIPO SAKE.*
- Cumari.G. (2019). *OBTENCIÓN DE ALIMENTOS FUNCIONALES DE Manihot esculenta (YUCA).*
https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12737/6463/Grace_Informe_T%c3%adtulo_2019.pdf.pdf?sequence=4&isAllowed=y
- Dahua, R., (2016). “*COMPARACIÓN BROMATOLÓGICA Y MICROBIOLÓGICA DE CHICHAS ELABORADAS CON DOS VARIEDADES DE YUCA (Manihot esculenta Crantz)*”.
- Escobar Razo, A. V. (2019). “*Desarrollo de una bebida a base de harina de amaranto (Amaranthus hypochondriacus) y salvado de arroz (Oryza sativa) con fermentación sólida y sumergida.*”
- Farinango Capelo, E. A. (2015). Evaluación Nutricional y diseño del etiquetado de las chichas (jora y morada), elaboradas en la Fundación Andinamarca, Calpi-Riobamba. *Facultad de Ciencias, Bachelor*, 99.
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4010>
- Gómez Rojas, M. P., Arboleda Valencia, J. W., & Mosquera Martínez, O. M. (2021). Género *Aspergillus*: fuente potencial de péptidos bioactivos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 17(1), 73–89. <https://doi.org/10.18359/rfcb.5610>
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mechanisms and regulation of enzymatic hydrolysis of cellulose in filamentous fungi: Classical cases and new models. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Guanoluisa Ataballo, T. M., & Lanchimba Aigaje, L. A. (2021). *ESTUDIO REOLÓGICO DE LAS CHICHAS DE YUCA (Manihot esculenta crantz) Y CHONTA (Bactris gasipaes) CON PREPARADOS ENZIMÁTICOS.*

- Hervas Paredes, P. M. (2011). *Estudio de la influencia de los grados brix del chaguar mishque para la obtención de una bebida carbonatada tipo champagne.*
- Hinostroza. (2014). Cultivo de yuca en el Ecuador. *La Yuca En El Tercer Milenio Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización.*, 436, 1–28. <http://www.agricultura.gob.ec/sinagap/>
- INEN 1529-10. (2013). Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. *Inen Isso 1529-10, primera ed*(Quito-Ecuador), 1–8.
- INEN 1529-10. (2013). Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. *Inen Isso 1529-10, primera ed*(Quito-Ecuador), 1–8.
- Mena, M., & Santamaria, J. (2019). *Evaluación de la Fermentación de Yuca (Manihot esculenta) sometida a tres procesos con Kéfir y Levadura para la Obtención de Bebidas Fermentadas.*
- Miller. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Ministerio de Cultura y Patrimonio. (2016). *Chicha de yuca - Patrimonio Alimentario.* Ministerio de Cultura y Patrimonio. https://pwiki.usfq.edu.ec/mw36/index.php?title=Chicha_de_yuca
- Ministerio de Salud Pública. (2021). CASOS DE ETAS REPORTADOS A NIVEL NACIONAL ECUADOR 2017-2021. *SUBSISTEMA DE VIGILANCIA SIVE-ALERTA ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR AGUA Y ALIMENTOS ECUADOR, SE 18, 2021, 2, 1-6.*
- Ministerio de Cultura y Patrimonio. (2013). *Comer sano, sabroso y con identidad.* 12 de Marzoarzo. <https://www.culturaypatrimonio.gob.ec/comer-sano-sabroso-y-con-identidad/>
- Morales, M. (2019). *Vista de EVALUACIÓN DE FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN-FERMENTACIÓN*

SIMULTÁNEAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MATERIALES AMILÁCEOS / *Ingeniería*. 1–8.

<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/14665/19682> Amagua, G., & Chancusig, A. (2020). ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UN PREPARADO ENZIMÁTICO (α -AMILASA, β - AMILASA Y AMILOGLUCOSIDASA) SOBRE MASATO SEMI-SÓLIDO DE YUCA (*Manihot esculenta* CRANTZ) PARA LA OBTENCIÓN DE UNA BEBIDA. In *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad* (Vol. 1). <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>

Andrade Marcela. (2022). *Universidad técnica de cotopaxi*. 65. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/9067/1/MUTC-001315.pdf>

Collazos, D. (2019). ¿Larga vida a la chicha? *Revista Neuronum*, 5(1), 151–155. <https://eduneuro.com/revista/index.php/revistanuronum/article/view/175>

El Comercio. (2015). *El ritual de la chicha conecta a Sarayaku*. 2.

Escobar Razo, A. V. (2019). “Desarrollo de una bebida a base de harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con fermentación sólida y sumergida.”

Gómez Rojas, M. P., Arboleda Valencia, J. W., & Mosquera Martínez, O. M. (2021). Género *Aspergillus*: fuente potencial de péptidos bioactivos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 17(1), 73–89. <https://doi.org/10.18359/rfcb.5610>

Guanoluisa Ataballo, T. M., & Lanchimba Aigaje, L. A. (2021). *ESTUDIO REOLÓGICO DE LAS CHICHAS DE YUCA (Manihot esculenta crantz) Y CHONTA (Bactris gasipaes) CON PREPARADOS ENZIMÁTICOS*.

Hinostroza. (2014). Cultivo de yuca en el Ecuador. *La Yuca En El Tercer Milenio Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización.*, 436, 1–28. <http://www.agricultura.gob.ec/sinagap/>

INEN 1529-10. (2013). Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. *Inen Isso 1529-10, primera ed*(Quito-Ecuador), 1–8.

- Ministerio de Cultura y Patrimonio. (2013). *Comer sano, sabroso y con identidad*. 12 de Marzoarzo. <https://www.culturaypatrimonio.gob.ec/comer-sano-sabroso-y-con-identidad/>
- Ministerio de Cultura y Patrimonio. (2016). *Chicha de yuca - Patrimonio Alimentario*. Ministerio de Cultura y Patrimonio. https://pwiki.usfq.edu.ec/mw36/index.php?title=Chicha_de_yuca
- Morales, M. (2019). *Vista de EVALUACIÓN DE FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN EL PROCESO DE SACARIFICACIÓN-FERMENTACIÓN SIMULTÁNEAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE MATERIALES AMILÁCEOS* / *Ingeniería*. 1–8. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/ingenieria/article/view/14665/19682>
- NTE INEN 1101. (2017). Bebidas Gaseosas o Carbonatadas. Requisitos. *Norma Técnica Ecuatoriana*, 1(4), 1–6. https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1975-
- NTE INEN 1529. (2013). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529:2013. Control microbiológico de los alimentos. Salmonella. Método de detección. *Nte Inen 1529*, 1–18.
- NTE INEN 2802. (2015). Ecuatoriana Nte Inen 2802. *Annual Book of INEN, BEBIDAS ALCOHÓLICAS. COCTELES O BEBIDAS ALCOHÓLICAS MIXTAS Y LOS APERITIVOS. REQUISITOS ALCOHOLICS*, 34.
- NTE INEN 340. (2016). NTE INEN 340. Bebidas Alcohólicas. Determinación Del Contenido De Alcohol Etílico. Método del alcoholímetro de vidrio. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 13. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_340-2.pdf
- NTE INEN 2323. (2002). *Norma Técnica, Ecuatorina de Bebidas Alcoholicas et al.*
- Pacheco, C., & Herrera, R. (2021). Universidad técnica de cotopaxi. *Universidad Técnica de Cotopaxi*, 1, 101. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>

Pierre, C. (1995). Producción de aromas por fermentación en medio sólido. *Tópicos de Investigación y Posgrado*, 102–109.

RAE. (2019). *chicha* / *Definición* / *Diccionario de la lengua española* / RAE - ASALE. <https://dle.rae.es/chicha>

Robinson, T., Singh, D., & Nigam, P. (2002). Fermentación en medio solido: una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 9(2), 27–36. <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169818107003.pdf>

4.3 Anexos

Anexo A. Análisis de varianza y comparación de medias del efecto de la hidrolisis enzimática del almidón de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca

Tabla 8 *Análisis de la Varianza del efecto de la hidrolisis enzimática del almidón de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca*

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	10,44	3	3,48	26,54	<0,0001
Error	3,54	27	0,13		
Total	80,06	39			

Tabla 9 *Comparación de medias de Tukey del efecto de la hidrolisis enzimática del almidón de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca*

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
Light	6,03	10	0,11	A
Red	6,02	10	0,11	A
Barley	5,27	10	0,11	B
Soybean	4,84	10	0,11	B

Anexo B. Curvas de calibración

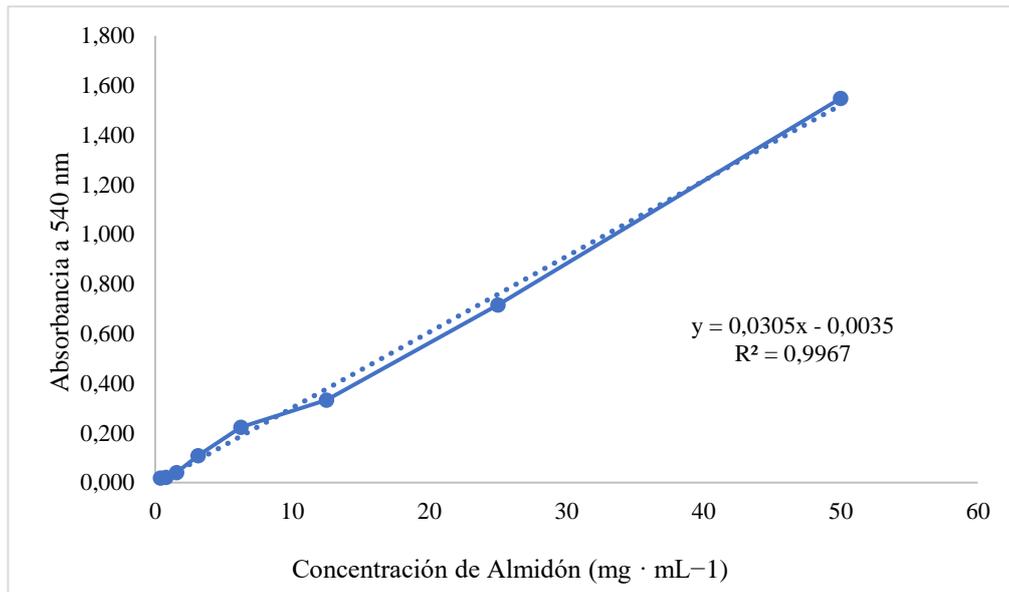


Figura 3 Curva estándar del almidón soluble

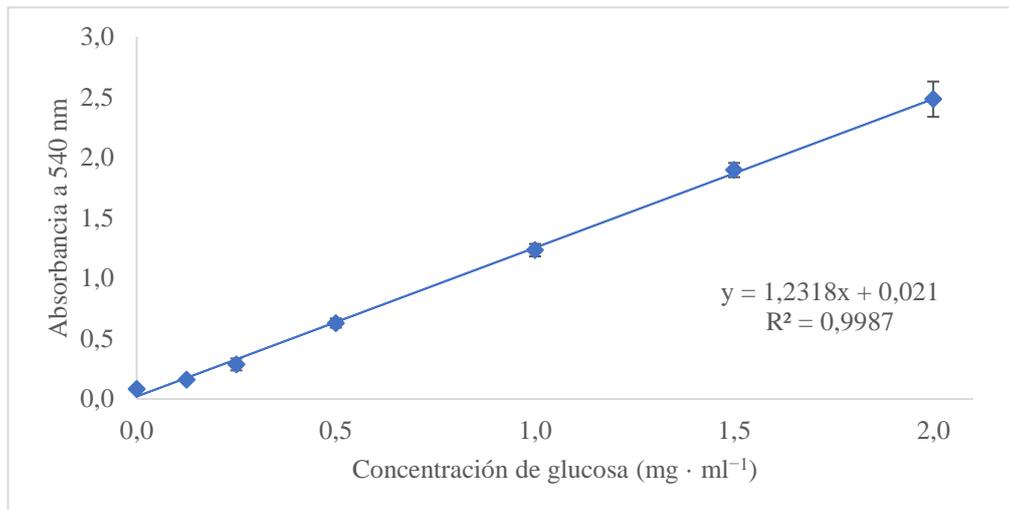


Figura 4 Curva estándar de glucosa

Anexo C. Análisis de consumo del almidón

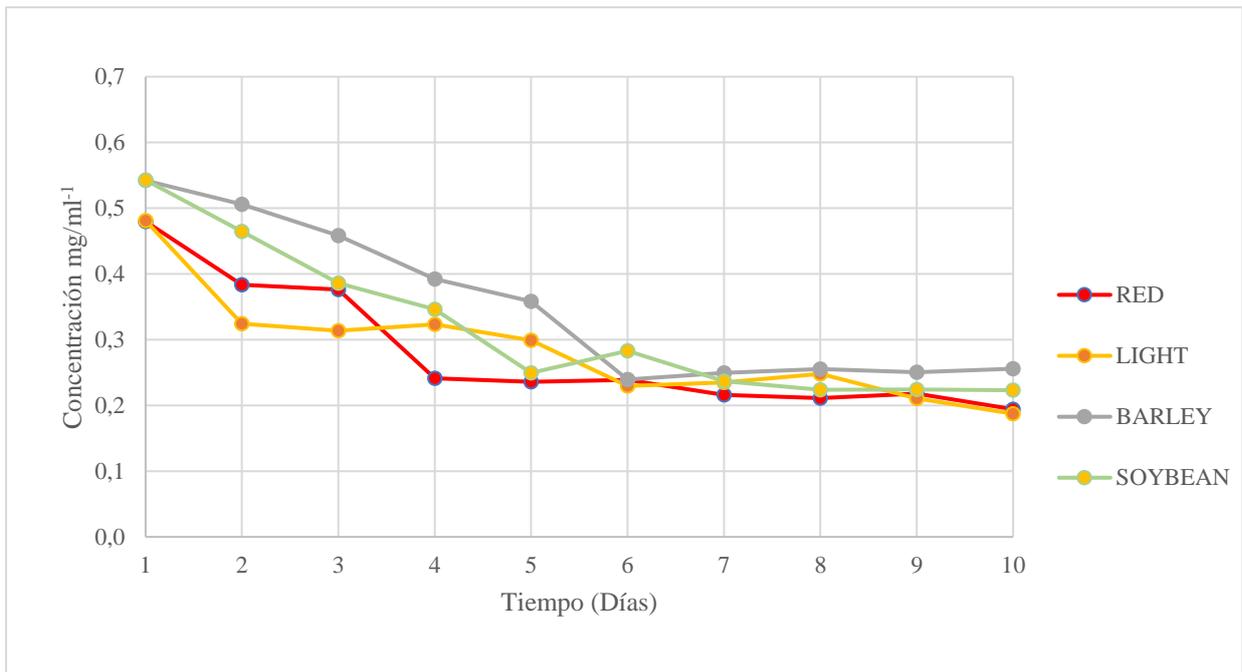


Figura 5 Determinación de almidón

Anexo D. Determinación de la concentración de azúcares reductores mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

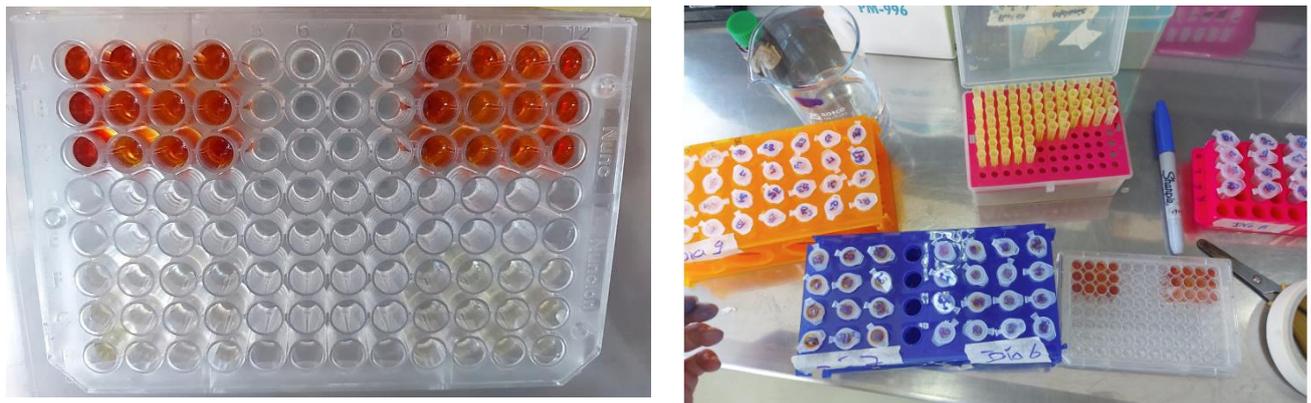


Figura 6 Determinación de azúcares reductores mediante el método DNS

Anexo E. Evaluación del crecimiento de *Aspergillus oryzae* en almidón de yuca

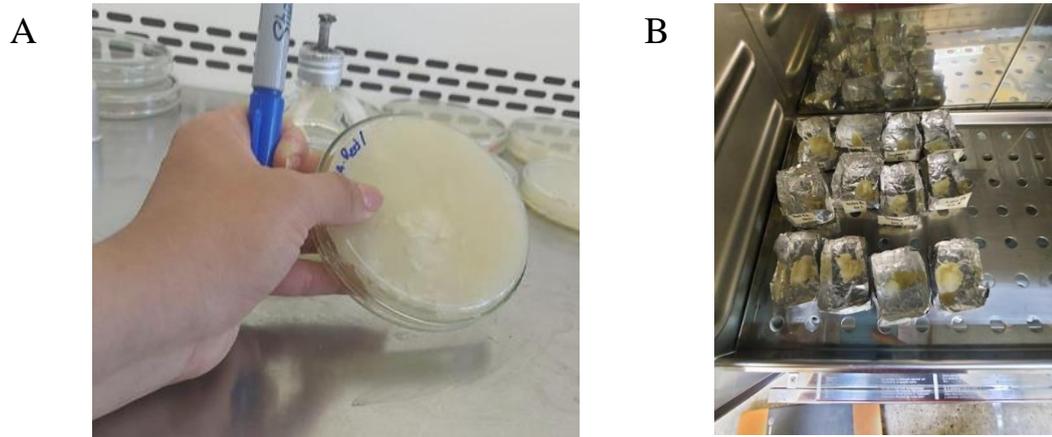


Figura 7 (A) desarrollo de medio a partir de yuca para el crecimiento de *Aspergillus oryzae*. (B) toma de muestras diarias para la evaluación de almidón y DNS.

Anexo F. Obtención de la bebida a base de yuca con doble fermentación

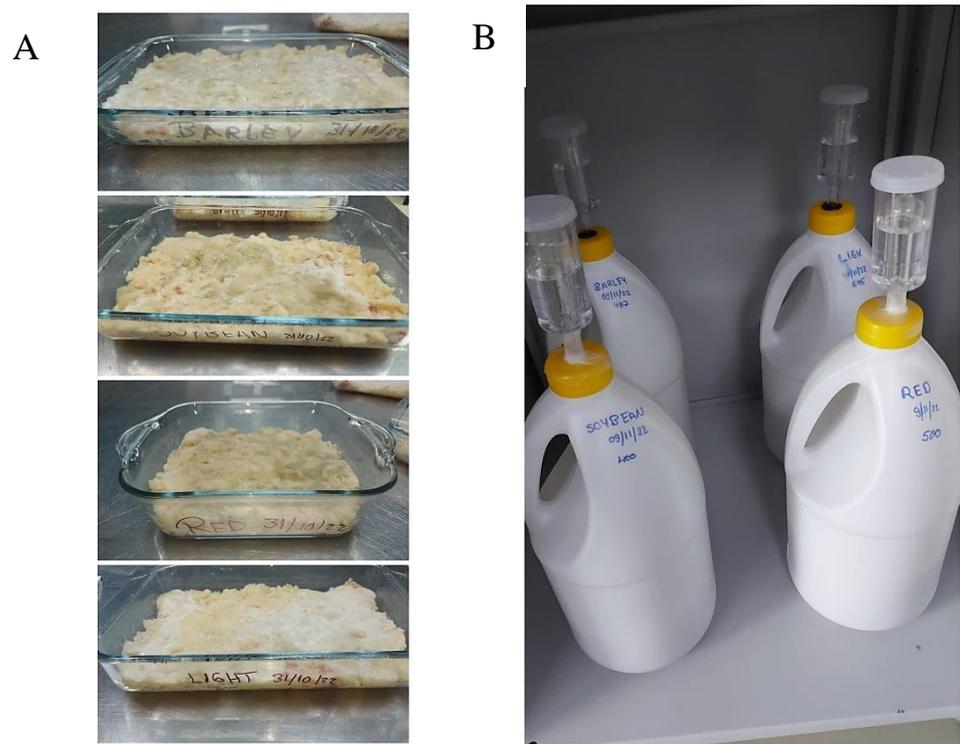


Figura 8 (A) Fermentación sólida en medio de cultivo a base de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con diferentes cepas de *Aspergillus oryzae*. (B) Fermentación sumergida.

Anexo G Tablas estadísticas respectivas al análisis sensorial de la bebida de yuca (*Manihot esculenta* Crantz)

Tabla 10 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de *Aspergillus oryzae* respecto al color

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	4,19	3	1,40	3,07	<0,0351
Error	25,47	56	0,45		
Total	29,66	59			

Tabla 11 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca respecto al color

Tratamiento	Medias	N	E.E.		
Light	3,46	15	0,17	A	
Red	3,40	15	0,17	A	B
Barley	3,26	15	0,17	A	B
Soybean	2,79	15	0,17		B

Tabla 12 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de *Aspergillus oryzae* respecto al olor

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	11,55	3	3,85	8,06	<0,0001
Error	26,73	56	0,48		
Total	38,28	59			

Tabla 13 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca respecto al olor

Tratamiento	Medias	N	E.E.			
Light	3,26	15	0,18	A		
Red	3,22	15	0,18	A	B	
Barley	2,63	15	0,18	A	B	C
Soybean	2,28	15	0,18		B	C

Tabla 14 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de *Aspergillus oryzae* respecto al sabor

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	37,30	3	12,43	22,41	<0,0001
Error	31,07	56	0,55		
Total	68,37	59			

Tabla 15 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca respecto al sabor

Tratamiento	Medias	N	E.E.		
Light	3,82	15	0,19	A	
Red	3,11	15	0,19	A	
Barley	2,35	15	0,19		B
Soybean	1,73	15	0,19		B

Tabla 16 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de *Aspergillus oryzae* respecto a la acidez

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	25,98	3	8,66	34,72	<0,0001
Error	13,97	56	0,25		
Total	39,95	59			

Tabla 17 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca respecto a la acidez

Tratamiento	Medias	N	E.E.		
Light	3,33	15	0,13	A	
Red	3,07	15	0,13	A	
Barley	2,22	15	0,13		B
Soybean	1,69	15	0,13		C

Tabla 18 ANOVA del análisis sensorial de los diferentes tratamientos de *Aspergillus oryzae* respecto a la aceptabilidad

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamiento	14,43	3	4,82	9,92	<0,0001
Error	27,16	56	0,48		
Total	41,59	59			

Tabla 19 Comparación de medias de Tukey del efecto del análisis sensorial de las diferentes cepas de *Aspergillus oryzae* en medio de cultivo de yuca respecto a la aceptabilidad

Tratamiento	Medias	N	E.E.		
Light	3,61	15	0,18	A	
Red	3,56	15	0,18	A	
Barley	3,02	15	0,18		B
Soybean	2,40	15	0,18		B