



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE
ZUMO DE *Psidium guajava* (GUAYABA) Y CARACTERIZACIÓN
DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

CRISTHIAN ROBERTO CAMPOVERDE COSTA

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE
ZUMO DE *Psidium guajava* (GUAYABA) Y CARACTERIZACIÓN
DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: CRISTHIAN ROBERTO CAMPOVERDE COSTA

DIRECTORA: BQF. ADRIANA ISABEL RODRIGUEZ BASANTES MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Cristhian Roberto Campoverde Costa

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Cristhian Roberto Campoverde Costa, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados de este son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 30 de noviembre del 2023



Cristhian Roberto Campoverde Costa
220035499-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE ZUMO DE *Psidium guajava* (GUAYABA) Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**, realizado por el señor: **CRISTHIAN ROBERTO CAMPOVERDE COSTA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Violeta Maricela Dalgo Flores MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-11-30
BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-11-30
Dra. Janeth María Gallegos Núñez PhD. ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-11-30

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y salud, por guiarme siempre por el mejor camino, por ser mi luz en mis días de oscuridad, por ayudarme a levantar a pesar de las derrotas. A mis abuelos por el apoyo incondicional que me han dado durante todo el transcurso de mi formación académica, por sus consejos, por sus valores, a mis hermanos por estar conmigo en las buenas y malas, a mi prima por sus palabras de aliento y ayuda en todo momento, a mi tía que hoy está conmigo siempre aconsejándome y dándome todo su amor para seguir adelante, a todos mis amigos en especial a Doménica, Alessandro, Majo, Belís, Cristina. Corina y Karen que han estado incondicionalmente a mi lado apoyándome en mis mejores y peores momentos. Finalmente, a mi mejor amigo e hijo perruno Jasson que nació en pandemia el cual que me apoya desde el cielo y aparece en mis sueños cuando estoy triste.

Cristhian

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento especial a Dios por todas las bendiciones derramada, por su bondad y amor incondicional, y a todas aquellas personas que han estado junto a mi apoyándome y brindándome su apoyo para seguir luchando y alcanzando mis sueños como son mis abuelos, mis hermanos, mis primas, mis tías, mis tíos y amigos, gracias a todos ustedes por todo su amor, confianza, dedicación, gracias por ser el soporte y compañía durante toda mi vida. Un agradecimiento especial a la Bqf. Adriana Rodríguez, a la Dra. Janneth Gallegos por su dirección y asesoría en el trabajo de tesis y a todas esas personas que de una u otra forma, colaboraron y participaron en la realización de esta tesis.

Cristhian

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPITULO I

1.	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	2
1.1.	Antecedentes.....	2
1.2.	Planteamiento del problema.....	2
1.3.	Justificación.....	3
1.4.	Objetivos.....	4
1.4.1.	<i>Objetivo general</i>	4
1.4.2.	<i>Objetivos específicos</i>	4

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.	Bebida fermentada.....	5
2.2.	Tipos de fermentaciones.....	5
2.2.1.	<i>Fermentación láctica</i>	5
2.2.2.	<i>Fermentación alcohólica</i>	5
2.3.	Guayaba (<i>Psidium guajava</i>).....	6
2.3.1.	<i>Clasificación taxonómica de la guayaba</i>	6
2.3.2.	<i>Descripción botánica</i>	7
2.3.3.	<i>Composición química</i>	7
2.3.4.	<i>Valor nutricional de Psidium guajava</i>	7
2.3.5.	Productos a base del fruto de <i>Psidium guajava</i>	8
2.4.	<i>Prebióticos</i>	8
2.4.1.	<i>Efecto de los prebióticos</i>	8
2.4.2.	<i>Rasgo de los prebióticos</i>	8

2.5.	Probióticos	9
2.5.1.	<i>Funciones de los probióticos</i>	10
2.5.2.	<i>Mecanismo de acción de los probióticos</i>	11
2.6.	Bacterias ácido lácticas	11
2.6.1.	<i>Características de las bacterias ácido lácticas</i>	11
2.6.2.	<i>Clasificación de las bacterias ácido lácticas</i>	11
2.6.2.1.	<i>Homofermentativas obligadas</i>	12
2.6.2.2.	<i>Heterofermentativas facultativas</i>	12
2.6.2.3.	<i>Obligatoriamente heterofermentativas</i>	13
2.7.	Principales géneros de bacterias ácido lácticas	13
2.8.	Enfermedades en las que se aplica bacterias ácidos lácticas	14
2.8.1.	<i>Problemas digestivos</i>	14
2.8.2.	<i>Reducción de cáncer de colon</i>	14
2.8.3.	<i>Disminución de colesterol sérico</i>	15
2.8.4.	<i>Uso en la hipertensión</i>	15
2.9.	Alimentos con probióticos	15
2.9.1.	<i>Yogur</i>	15
2.9.2.	<i>Kéfir</i>	16
2.9.3.	<i>Chucrut</i>	16
2.9.4.	<i>Cerveza</i>	16
2.10.	Screening microbiológico de bacterias ácido lácticas	17
2.10.1.	<i>Pruebas bioquímicas</i>	17
2.10.1.1.	<i>Tinción Gram</i>	17
2.10.1.2.	<i>Prueba de la catalasa</i>	17
2.10.1.3.	<i>Prueba de la oxidasa</i>	17
2.10.1.4.	<i>Prueba de la movilidad</i>	18
2.10.1.5.	<i>Producción de CO₂ a partir de glucosa</i>	18
2.10.1.6.	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	18
2.10.1.7.	<i>Tolerancia de diferentes pH</i>	18
2.11.	Análisis proximal	19
2.11.1.	<i>Humedad</i>	19
2.11.2.	<i>Cenizas</i>	19
2.11.3.	<i>Proteína</i>	19
2.11.4.	<i>Fibra</i>	20
2.11.5.	<i>Grasa total o extracto etéreo</i>	20
2.12.	Análisis microbiológico	20

2.12.1.	<i>Indicadores de calidad</i>	20
2.12.1.1.	<i>Aerobios mesófilos</i>	21
2.12.1.2.	<i>Coliformes</i>	21
2.12.1.3.	<i>Escherichia coli</i>	21
2.12.1.4.	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.13.	Análisis sensorial	22
2.13.1.	<i>Pruebas hedónicas</i>	23
2.14.	Pasteurización	23
2.14.1.	<i>Tipos de pasteurización</i>	23
2.14.1.1.	<i>Pasteurización VAT o discontinua</i>	23
2.14.1.2.	<i>Pasteurización a altas temperaturas durante un breve periodo de tiempo</i>	24
2.14.1.3.	<i>El proceso a ultra-altas temperaturas (UHT - Ultra-High Temperature)</i>	24

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	25
3.1.	Lugar de investigación	25
3.2.	Población de estudio	25
3.3.	Tamaño de la muestra	25
3.4.	Materia prima, materiales, equipos y reactivos	26
3.4.1.	<i>Materia prima</i>	26
3.4.2.	<i>Materiales</i>	26
3.4.3.	<i>Equipos</i>	27
3.4.4.	<i>Reactivos</i>	27
3.4.5.	<i>Medios de cultivo</i>	28
3.5.	Técnicas de estudio	28
3.5.1.	<i>Caracterización de la materia prima</i>	28
3.5.1.1.	<i>Determinación de humedad</i>	28
3.5.1.2.	<i>Determinación de ceniza</i>	29
3.5.1.3.	<i>Determinación de grasa</i>	30
3.5.1.4.	<i>Determinación de fibra</i>	31
3.5.1.5.	<i>Determinación de proteína</i>	32
3.5.2.	<i>Elaboración de la bebida a base de zumo de Psidium guajava</i>	34
3.5.3.	<i>Formulación de las bebidas</i>	35
3.5.4.	<i>Análisis microbiológico de las bebidas posterior a su pasteurización</i>	35
3.5.4.1.	<i>Determinación de mohos y levaduras mediante la NTE INEN 1529-10</i>	35

3.5.4.2.	<i>Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast</i>	36
3.5.4.3.	<i>Determinación de coliformes mediante técnica de microfast</i>	37
3.5.5.	<i>Técnica para el proceso de fermentación</i>	37
3.5.5.1.	<i>Determinación de pH</i>	38
3.5.5.2.	<i>Determinación del índice de acidez</i>	38
3.5.5.3.	<i>Determinación de solidos solubles</i>	39
3.5.5.4.	<i>Determinación de coliformes y coliformes totales mediante técnica de microfast</i> ...	39
3.5.5.5.	<i>Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast</i>	40
3.5.5.6.	<i>Determinación de Staphylococcus aureus mediante la técnica de microfast</i>	41
3.5.6.	<i>Técnica de aislamiento y recuento por sistema de diluciones</i>	41
3.5.7.	<i>Preparación de medios de cultivo</i>	42
3.5.7.1.	<i>Preparación de agar MRS</i>	42
3.5.7.2.	<i>Preparación de agar M17</i>	42
3.5.8.	<i>Diluciones</i>	42
3.5.8.1.	<i>Preparación de diluciones</i>	42
3.5.9.	<i>Siembra y aislamiento de BAL</i>	43
3.5.10.	<i>Pruebas bioquímicas para el aislamiento</i>	43
3.5.10.1.	<i>Tinción Gram</i>	43
3.5.10.2.	<i>Catalasa</i>	44
3.5.10.3.	<i>Oxidasa</i>	44
3.5.11.	<i>Pruebas de caracterización</i>	44
3.5.11.1.	<i>Prueba de movilidad</i>	44
3.5.11.2.	<i>Producción de CO₂ a partir de glucosa</i>	45
3.5.11.3.	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	45
3.5.11.4.	<i>Tolerancia a distintos pH</i>	46

CAPÍTULO IV

4.	MARCO de análisis e interpretación de resultados	47
4.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	47
4.1.1.	<i>Análisis proximal de la materia prima</i>	47
4.1.1.1.	<i>Humedad</i>	47
4.1.1.2.	<i>Cenizas</i>	47
4.1.1.3.	<i>Fibra</i>	48
4.1.1.4.	<i>Grasa</i>	48
4.1.1.5.	<i>Proteína</i>	48

4.1.2.	<i>Análisis físico- químico y microbiológico de las formulaciones</i>	49
4.1.2.1.	<i>Análisis físico-químico</i>	49
4.1.2.2.	<i>Análisis microbiológico</i>	49
4.1.3.	<i>Análisis físico-químico y microbiológico de las formulaciones</i>	50
4.1.3.1.	<i>Determinación de pH</i>	50
4.1.3.2.	<i>Determinación del índice de acidez</i>	51
4.1.3.3.	<i>Determinación de sólidos solubles</i>	52
4.1.4.	<i>Análisis físico- químico y microbiológico de formulaciones post-fermentación</i> ...	52
4.1.4.1.	<i>Análisis físico-químico</i>	52
4.1.4.2.	<i>Determinación de indicadores de calidad</i>	53
4.1.5.	<i>Aceptabilidad de las formulaciones</i>	54
4.1.5.1.	<i>Resultado de aceptabilidad</i>	54
4.1.6.	<i>Aislamiento y selección de cepas bacterianas</i>	55
4.1.7.	<i>Pruebas de caracterización de BAL</i>	57
	CONCLUSIONES	61
	RECOMENDACIONES	62
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Taxonomía <i>Psidium guajava</i>	6
Tabla 2-2:	Composición nutricional de la guayaba.....	8
Tabla 2-3:	Principales probióticos usados en la terapéutica humana.....	9
Tabla 2-4:	Beneficios de los probiótico	10
Tabla 3-1:	Porcentaje de fruta y agua	35
Tabla 3-2:	Ingredientes utilizados en la formulación para la elaboración de la bebida	35
Tabla 4-1:	Análisis proximal de la materia prima.....	47
Tabla 4-2:	Requisito físico-químicos de las formulaciones	49
Tabla 4-3:	Análisis microbiológico de las formulaciones.....	49
Tabla 4-4:	Características Fisicoquímicos de bebidas fermentadas.....	52
Tabla 4-5:	Determinación de indicadores de calidad microbiológica.....	53
Tabla 4-6:	Resultado de las encuestas de aceptabilidad mediante la escala hedónica	54
Tabla 4-7:	Pruebas bioquímicas para identificación bacterias ácido lácticas en agar M17	55
Tabla 4-8:	Pruebas bioquímicas para identificación bacterias ácido lácticas en agar MRS ...	56
Tabla 4-9:	Pruebas de caracterización en agar M17	57
Tabla 4-10:	Pruebas de caracterización en agar MRS	59

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Frutos de <i>Psidium guajava</i>	6
Ilustración 2-2:	Fermentación homoláctica.....	12
Ilustración 2-3:	Ruta de la galactosa	13
Ilustración 2-4:	Producción y bioactividad multifuncional del kéfir.....	16
Ilustración 2-5:	Clasificación de las pruebas sensoriales	22
Ilustración 2-6:	Escala hedónica gráfica.....	23
Ilustración 4-1:	Evaluación de pH.....	50
Ilustración 4-2:	Evaluación de índice de acidez	51
Ilustración 4-3:	Evaluación de sólidos solubles	52
Ilustración 4-4:	Elección según la aceptación de formulaciones a base zumo de guayaba ..	544

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA
- ANEXO B:** ANÁLISIS PROXIMAL DEL FRUTO
- ANEXO C:** ELABORACIÓN DE LAS BEBIDAS
- ANEXO D:** DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS
- ANEXO E:** DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS
- ANEXO F:** PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS FORMULACIONES
- ANEXO G:** DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD
- ANEXO H:** PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS
- ANEXO I:** TÉCNICA DE PLAQUEO EN PLACA PETRI DE VIDRIO
- ANEXO J:** SELECCIÓN DE COLONIAS
- ANEXO K:** ENRIQUECIMIENTO EN CALDO MRS
- ANEXO L:** TINCIÓN GRAM
- ANEXO M:** PRUEBA DE CATALASA
- ANEXO N:** PRUEBA DE OXIDASA
- ANEXO O:** PRUEBA DE MOVILIDAD
- ANEXO P:** PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO A PARTIR DE GLUCOSA
- ANEXO Q:** CRECIMIENTO A DISTINTAS TEMPERATURAS
- ANEXO R:** CRECIMIENTO A DISTINTOS PH

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo elaborar un bebida fermentada a base de zumo de guayaba (*Psidium guajava*) y caracterización de bacterias ácidos lácticas para lo cual se elaboraron tres formulaciones que son: F1 (30% pulpa de guayaba, 70 % de agua), F2 (40% pulpa de guayaba, 60 % de agua) y F3 (50% pulpa de guayaba, 50 % de agua) las cuales fueron sometidas a una fermentación espontanea. Se realizó una prueba de degustación con un grupo de 50 estudiantes de la carrera de Bioquímica, empleando una escala hedónica, en donde se obtuvo como resultado que la formulación F2 fue la de mejor aceptabilidad. Además, se realizó un análisis microbiológico de indicadores de calidad como: coliformes, aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus*, observándose la ausencia de coliformes y *Staphylococcus aureus* y en el caso de aerobios mesófilos no mostro crecimiento microbiano fuera del rango establecido por la normativa empleada para la determinación de dicho microorganismo, debido a que se lo conservó un espacio de esterilidad e inocuidad durante su preparación. La formulación de mayor aceptabilidad fue sometida a análisis microbiológicos para el aislamiento de colonias de bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica empleando pruebas bioquímicas para su identificación como: tinción Gram, catalasa y oxidasa. Finalmente se realizó pruebas de caracterización como: Movilidad, Producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento a distintas temperaturas y tolerancia a distintos pH. Se concluyó que la bebida fermentada a base de *Psidium guajava* contenía bacterias ácido lácticas que cumplían con los ensayos de caracterización e identificación que las convertían como posibles candidatas a probióticos de origen vegetal. Por ello se recomienda que las cepas bacterianas obtenidas de este producto sean evaluadas con técnicas moleculares logrando darle un valor agregado a las mismas en la industria alimentaria.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS>, <BEBIDA FERMENTADA>, <GUAYABA (*Psidium guajava*)>, <CATALASA>, <OXIDASA>, <FERMENTACIÓN >, <ANÁLISIS PROXIMAL>.

0067-DBRA-UPT-2024



ABSTRACT

The objective of this research was to elaborate a fermented beverage based on guava juice (*Psidium guajava*) and characterization of lactic acid bacteria for which three formulas were elaborated: F1 (30% guava pulp, 70% water), F2 (40% guava pulp, 60% water) and F3 (50% guava pulp, 50% water). These were subjected to spontaneous fermentation. A taste test was carried out with a group of 50 Biochemistry students, using a hedonic scale, where it was found that the F2 formulation was the most acceptable. In addition, microbiological analysis of quality indicators such as coliforms, mesophilic aerobes, and *Staphylococcus aureus* was performed. It showed the absence of coliforms and *Staphylococcus aureus*, and in the case of mesophilic aerobes, it did not show microbial growth outside the range established by the standards used for the determination of this microorganism. This is because it was kept in a sterile and innocuous environment during its preparation. The most acceptable formulas were subjected to microbiological analysis for the isolation of lactic acid bacteria colonies with possible probiotic activity using biochemical tests for their identification such as Gram staining, catalase, and oxidase. Finally, characterization tests were carried out, such as Mobility, CO₂ production from glucose, growth at different temperatures, and tolerance to different pH. It was concluded that the fermented beverage based on *Psidium guajava* contained lactic acid bacteria that complied with the characterization and identification tests that made them possible candidates for probiotics of vegetable origin. Therefore, it is recommended that the bacterial strains obtained from this product be evaluated with molecular techniques to give them added value in the food industry.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <LACTIC ACID BACTERIA>, <FERMENTED DRINK>, <GUAVA (*Psidium guajava*)>, <CATALASE>, <OXIDASE>, <FERMENTATION>, <PROXIMAL ANALYSIS>.



Ing. Romel Francisco Calles Jiménez
C.I 0603877713

INTRODUCCIÓN

Una bebida fermentada es aquella que, por acción de levaduras o fermentación espontánea, convierte el azúcar que contienen las frutas o cereales en alcohol; estos productos han logrado generar un gran auge en la calidad nutricional la cual es atribuida a procesos químicos que proporcionan el apareamiento de bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas son un tipo de bacterias reconocidas a nivel mundial como seguras ya que tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas y son muy codiciadas en la elaboración de alimentos fermentados.

Esta investigación se enfoca en la seguridad alimentaria debido al uso de frutas como fuentes principales para la elaboración de bebidas que por sus componentes presentan microorganismos benéficos para la salud de las personas como una forma de prevenir, eliminar y contrarrestar enfermedades gastrointestinales las cuales afectan el sistema inmunológico.

La presente investigación posee un enfoque cuantitativo, con diseño de investigación experimental aleatorio, basado en la elaboración de una bebida fermentada a base de zumo de guayaba y caracterización de bacterias ácido lácticas obteniendo la mejor formulación mediante tratamientos con réplicas utilizando un método analítico, cuyos resultados serán expresados de manera cuantitativa.

Finalmente, el estudio se realiza con frutos de *Psidium guajava* recolectados en el Cantón Sacha, Provincia de Orellana. Los ensayos pertinentes de la investigación se llevan a cabo en el Laboratorio de Bromatología e Investigación de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mediante pruebas de degustación, pruebas fisicoquímicas y microbiológicas.

CAPITULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Antecedentes

En la Universidad Tecnológica Equinoccial se realiza el “Empleo De Pulpa De Acerola Y Guayaba En Una Leche Fermentada Probiótica”. En donde la relación de pulpa de acerola-guayaba en la elaboración de una leche fermentada probiótica fue en relación m/m 1:1 al 12 % m/m empleando únicamente leche entera en polvo estandarizada con un contenido de sólidos no grasos (SNG) de leche al 9,5 % m/m, contenido de proteína y grasa de 2,73 y 3,21%, 3 % m/m de cultivo probiótico Bioyogur, respectivamente, y 13,1 % m/m de hidratos de carbono totales. La calidad higiénica sanitaria del producto y viabilidad celular del probiótico fue factible gracias al cumplimiento de las especificaciones de los indicadores microbiológicos (Valdés et al, 2020, p. 10-14)

El estudio “Producción de Yogurt Probiótico Bajo en Grasa Suplementado con Polvo de Semillas de Guayaba” publicado en la Revista de Ciencias Alimentarias y Lácteas demostró que el polvo de la semillas de guayaba (GSP) podría utilizarse como fuente de fibra cruda y fenoles en el yogur bajo mejorando su valor nutricional y sus propiedades reológicas y sensoriales. El polvo de las semillas de la fruta por su alto contenido en fibra se ha sugerido que cumple con el concepto de prebiótico, proporcionando un aumento en los recuentos de bacterias con actividad probiótica en los tratamientos para superar aproximadamente 10^6 CFU/g, actuando, así como prebióticos (Abd et al, 2020, p 95).

En la Escuela Agrícola Panamericana se realiza el estudio de “Evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus casei* libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba”. El *Lactobacillus casei* tiene potencial para usarse como probiótico libre en el jugo de guayaba debido al corto periodo de tiempo durante el cual se sirve. Es importante mencionar que agregar una suspensión de bacteria libre al jugo implica reformular el producto, para no modificar la relación que se usa agua: concentrado (De La Cruz y Terán, 2013, p. 1-33).

1.2. Planteamiento del problema

La ausencia de una dieta equilibrada en combinación de factores fisiológicos, ambientales, genéticos y de comportamiento han logrado incrementar la presencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), las cuales conforman el 74% de muertes a nivel mundial. El

77% de estas corresponde a países de bajo y medianos ingresos (OMS, 2022, p. 1). La relación entre microbiota y salud es el motivo de grandes investigaciones en la industria alimentaria. Una de las maneras de recuperar el equilibrio de la microbiota es contar con una buena alimentación como; la ingesta de alimentos de origen vegetal, alimentos con alto contenido en fibra y los alimentos de característica probiótica aportando beneficios en la salud al consumidor y garantizando un equilibrio en la microbiota.

Entre las principales funciones de la microbiota intestinal encontramos el procesamiento de los alimentos, prevenir la colonización de microorganismos patógenos y producir vitaminas B y K las cuales no pueden ser sintetizadas por el organismo humano. Finalmente, y no menos importante, estimular al sistema inmune. La base de las enfermedades autoinmunes es el desequilibrio del carácter mutualista del sistema inmune y la microbiota intestinal lo cual desencadena un efecto patológico (Del Campo et al., 2018, p. 242).

Desde el punto de vista del desarrollo tecnológico, se ha identificado diversas fuentes vegetales con presencia de microorganismos con actividad probiótica como son los *Bacillus* obtenido de maíz mohoso, miel de abeja sin aguijón, levaduras de cierto cereales, bifidobacterias y bacterias ácido lácticas extraídas de vegetales fermentados como el pepino, poci y repollo. En conclusión, uno de los desafíos de la industria alimentaria en la inclusión de fuentes frutales que presenten actividad probiótica es considerar criterios de fermentación y la relación ecológica. (Castro et al, 2022, p. 8).

1.3. Justificación

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS), constituyen una problemática de la salud pública a nivel mundial afectando a personas de cualquier edad o condición social las cuales se caracterizan por la aparición de síntomas gastrointestinales, pero estas enfermedades también pueden dar lugar a síntomas inmunológicos, ginecológicos y neurológicos. Las ETAS pueden originarse por la ingestión de agua o alimentos que contengan agentes no biológico o biológicos cuyas cantidades afectan la salud del consumidor a nivel individual o de un grupo de personas llegando a ser de carácter agudo a crónico (MSP, 2021, p.1).

En la actualidad en Ecuador el excesivo consumo de productos con bajo nivel nutritivo y con un contenido elevado de azúcar, sal, grasas saturadas en combinación con el sedentarismo y el estrés laboral. Son uno de la múltiples factores que conllevan al aumento de patologías digestivas con un alto índice de mortalidad.

La industria de alimentos se caracteriza por la difusión y la excesiva comercialización de probióticos de origen lácteo. Si embargo, en los últimos años el incremento de la demanda de productos con actividad probiótica de origen no lácteo ante la creciente de la población no consumidora de alimentos de origen animal por diversos motivos personales (vegetarianismo) o requeridos por patologías (dislipidemias, intolerancia a la lactosa entre otras) buscan consumir productos de origen vegetal (Jardo et al. 2021, p. 227).

Los avances en la industria alimentaria han permitido alterar estructuralmente las matrices vegetales modificando de una forma controlada y segura los componentes de ciertos productos dándoles un valor agregado. Estas condiciones han permitido el lanzamiento de nuevos productos que contienen cepas probióticas, particularmente bebidas de verduras, frutas y cereales. Por lo descrito anteriormente y tomando en cuenta que es una problemática de importancia a nivel mundial y nacional este proyecto de investigación toma como propuesta elaborar de una bebida fermentada a base de zumo de *Psidium guajava* (guayaba) y la respectiva caracterización de bacterias ácido-lácticas con posible actividad probiótica.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Elaborar una bebida fermentada a base de zumo de *Psidium guajava* (guayaba) y la respectiva caracterización de bacterias ácido-lácticas.

1.4.2. Objetivos específicos

- Realizar el análisis proximal del fruto de *Psidium guajava* (guayaba)
- Elaborar y ensayar tres formulaciones de la bebida a base de zumo de *Psidium guajava* (guayaba)
- Determinar las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de la formulación óptima
- Identificar la presencia de bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica mediante la técnica de screening

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Bebida fermentada

Una bebida fermentada es aquella que se obtiene de frutas o cereales mediante la biotransformación anaeróbica de carbohidratos monosacárido, principalmente hexosas como la glucosa y la fructosa, en dióxido de carbono (CO₂) y etanol (C₂H₆O), así como la generación de un sinnúmero de productos (López et al. 2019, p. 12).

2.2. Tipos de fermentaciones

La fermentación espontanea de frutas puede ocurrir debido a la microbiota láctica autóctona que contiene en la materia prima como por ejemplo *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Para esta acción es importante considerar condiciones favorables de actividad de agua, anaerobiosis, temperatura y concentración de sal. Sin embargo, el uso de cultivos iniciadores confiere consistencia, fiabilidad, control y reproducibilidad en el proceso proporcionando productos seguros y de calidad constante (Rodríguez et al. 2020, p. 279).

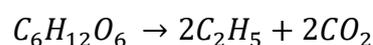
En el proceso fermentativo se puede dar dos tipos de fermentaciones, misma que se detallan a continuación.

2.2.1. Fermentación láctica

Es un tipo de fermentación que se lleva a cabo en el citoplasma celular. Mediante la glucólisis a partir de una molécula de glucosa se obtienen dos moléculas de piruvato. Las vías utilizadas para la asimilación de hexosas y pentosas en ácido láctico son la de Embden-Meyerhof (EMP) y la de pentosa fosfocetolasa (PK) (Orozco 2011, p. 10).

2.2.2. Fermentación alcohólica

Es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Los principales microorganismos responsables de esta transformación son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, esta comprende la especie empleada con mayor frecuencia. Sin embargo, existe un supuesto que existen estudios para la producción de alcohol con bacterias y hongos, como la *Zymomonas mobilis*, aunque su explotación a nivel industrial es mínima. (Vásquez y Dacosta 2007, p. 252).

2.3. Guayaba (*Psidium guajava*).

La guayaba (*Psidium guajava*) es un fruto tropical importante en aspectos económicos y en aspectos nutricionales. La producción mundial de guayaba es de aproximadamente 1.2 millones de toneladas, la India y Pakistán son los mayores productores (50 %), seguidos de México (25 %) y otros países como Colombia, Egipto y Brasil. En Ecuador la guayaba (Ilustración 2-1) es una fruta muy apreciada por sus valores nutritivos y su alto contenido en diversas vitaminas. Es antiescorbútica por su alto contenido en vitamina C. En forma natural tiene muchas propiedades nutritivas y preventivas de enfermedades como la anemia (Fajardo et al., 2019, p. 290).



Ilustración 2-1: Frutos de *Psidium guajava*

Fuente: (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, 2017, p. 1).

2.3.1. Clasificación taxonómica de la guayaba

En la siguientes tabla (Tabla 2-1) se aprecia la clasificación taxonómica de la especie *Psidium guajava*.

Tabla 2-1: Taxonomía *Psidium guajava*

Clasificación Taxonómica	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Filo	Traqueofita
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Tribu	Myteae
Género	Psidium
Especie	<i>Psidium guajava</i> L

Fuente: Guallichico, 2022, p. 11

Realizado por: Campoverde C., 2023

2.3.2. Descripción botánica

La guayaba es un arbusto de aproximadamente 3 cm hasta 10 cm de altura con un diámetro de hasta 60 cm, cuenta con raíces superficiales, un tronco generalmente torcido, leñoso de 20 cm de ancho con ramificaciones verdes, amarillas, rojizas o rojas que dan origen a hojas perenes, opuestas con prominentes laterales y venas en la parte inferior, el color de estas varía entre verde a marrón y cuando estas maduran se vuelven aromáticas. Su forma varía de elíptica a oblongo-lanceolada, rara vez redondeada, de 4 cm a 10 cm de largo y de 2,5 cm a 6 cm de ancho, ápice atenuado, apiculado, redondeado, pero principalmente obtuso o agudo, ampliamente cuneado en la base y con pecíolos cortos 2 mm -7 mm de largo, con venas ramificadas que pueden medir entre 5 cm y 15 cm de largo (Guallichico, 2022, p. 11).

2.3.3. Composición química

Este fruto es muy rico en vitaminas A, B y C entre otros nutrientes. En el mesocarpio, pericarpio y epicarpio del frutos de guayaba existe un mayor contenido de polifenoles totales (base húmeda) (Pérez et al, 2019, p. 239).

2.3.4. Valor nutricional de *Psidium guajava*

A continuación, se presenta el valor nutricional:

Tabla 2-2: Composición nutricional de la guayaba

Parámetros	Valor (en 100 g de guayaba)	Unidad
Agua	80,8	g
Cenizas	0,026	g
Proteína	2,55	g
Lípidos	0,5	g
Carbohidratos	14,32	g
Fibra	5,4	g

Fuente: Samaniego, 2019, p. 29

Realizado por: Campoverde C., 2023

2.3.5. Productos a base del fruto de *Psidium guajava*

La mayoría de las empresas expendedoras de guayaba la convierten en productos derivados como dulces, mermeladas o jugos. por lo general la pulpa de frutos de guayaba es utilizada en el procesamiento de jugos, néctares y rellenos para dulces sin considerar su verdadero valor nutricional y antioxidante (Pérez et al, 2019, p. 239).

2.4. Prebióticos

Se define como prebióticos a sustratos de las dietas especialmente oligosacáridos y polisacáridos no amiláceos no digeribles por las enzimas de los humanos con el objetivo de nutrir a grupos seleccionados de microorganismos que residen en el intestino, garantizando el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas (Mariño et al. 2021, p. 298).

2.4.1. Efecto de los prebióticos

Entre los beneficios que aportan los prebióticos encontramos la producción de metabolitos bacterianos y la regulación inmune. En el humano, la administración de prebióticos conduce al mayor desarrollo de la microbiota intestinal, la modulación inmune y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), estos últimos participan en la integridad de la mucosa intestinal (Castañedo 2018, p. 5).

2.4.2. Rasgo de los prebióticos

Para que un ingrediente alimentario sea establecido como una sustancia prebiótica se consideran tres rasgos importantes

- Ser un producto natural no hidrolizado, no ser absorbible por las enzimas del tracto digestivo superior (resistente al ácido clorhídrico)
- Tener la capacidad de modificar la microbiota intestinal del colon después fermentado por una o varias bacterias
- Estimular selectivamente bacterias intestinales e inducir efectos benéficos para la salud del consumidor (Castañedo 2018, p. 5).

2.5. Probióticos

Según la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), los probióticos son microorganismos vivos que, al administrarse en cantidades adecuadas, aportan un beneficio en la salud del huésped. Es decir, estos microorganismos se administran constantemente para mantener la salud intestinal humana (Mariño et al. 2018, p. 6).

En general, cualquier integrante de la microflora intestinal puede convertirse en un candidato probiótico. Sin embargo, en la industria alimentaria los más empleados corresponden a dos grupos microbianos como: Bifidobacterias y *Lactobacillus* consideradas como seguras. Similarmente, se han utilizado con el mismo fin bacterias del género. *E. coli* y *Bacillus cereus*, así como levaduras, principalmente las *Saccharomyces cerevisiae* (Mariño et al. 2018, p. 6).

Tabla 2-3: Principales probióticos usados en la terapéutica humana

Género	Probióticos
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus bulgaris</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus sakei</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Bifidobacterim</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
	<i>Bifidobacterium infantis</i>
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Bifidobacterium lactis</i>
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium breve</i>	

	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>cremoris</i> , <i>diacetylatis</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
Otros	<i>Leuconostos</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>

Fuente: Mariño et al. 2018, p. 17

Realizado por: Campoverde C., 2023

2.5.1. Funciones de los probióticos

Los probióticos cumplen diferentes funciones aportando beneficios tanto a nivel inmunológico y no inmunológico

Tabla 2-4: Beneficios de los probiótico

Beneficios inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Activan los macrófagos locales y las células dendríticas desencadenando la producción de la IgA secretora, tanto local como sistémica • Modulan los perfiles de citoquina • Inducen la disminución de la respuesta a los antígenos de los alimentos
Beneficios no inmunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Compiten con patógenos por los nutrientes • Modifican la actividad de enzimas intraluminares • Aumentan la actividad lactásica y la glucosidasa • Alteran el pH local para crear un ambiente desfavorable para los patógenos • Fagocitan radicales superóxido • Estimulan la producción epitelial del moco • Mejoran el tropismo epitelial

Fuente: Mariño et al., 2018, p. 6

Realizado por: Campoverde C., 2023

2.5.2. Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos actúan a través de la estimulación de los mecanismos inmunitarios en la mucosa y los no inmunitarios a nivel del tracto intestinal, generando una acción antagónica con bacterias patógenas. Se incluyen los siguientes mecanismos de acción (Rappaccioli et al. 2021, p. 2).

- Disminuir el pH intraluminal
- Actúan como barrera intestinal ocasionando la inhibición competitiva
- Incrementan la producción de IgA
- Activan la proteína-cinasa C para fortalecer los sitios de unión

2.6. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismo que se encuentran distribuida ampliamente en el ecosistema y se utilizan a gran escala a nivel de las industrias alimentarias. Se localizan en materias primas animales, vegetales y en productos fermentados incluidos los del entorno de plantas lácteas, cárnicas, vegetales y cereales, donde puede producirse la fermentación (Vargas 2018, p. 29).

2.6.1. Características de las bacterias ácido lácticas

Son bacterias Gram-positivas con un bajo contenido de guanina + citosina (G+C), no formadoras de esporas, tolerantes a los ácidos, no móviles, catalasa negativa y forma bacilos o cocos con un grosor de 0.5 -0.8 μm y longitud variable. Además, son un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, anaerobias facultativas y carecen de actividad respiratoria porque la ausencia de la enzima citocromo catalasa. Los factores que alteran su crecimiento en el medio de fermentación son la temperatura (mesófilos y termófilos), los requerimientos nutricionales y las condiciones ambientales al crecer en medios complejos. Sus colonias son de tono blanco lechoso y forma circular convexa (López 2021, p. 29).

2.6.2. Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Las BAL al ser microorganismo que poseen requerimientos nutricionales complejos como vitaminas, minerales; algunas especies inclusive requieren factores de crecimiento como el jugo de tomate, suero de leche. Estas poseen la capacidad de metabolizar pentosas como la ribosa, arabinosa y xilosa; las cuales son transportadas al interior de la célula por permeasas por difusión facilitada y metabolizadas a través de la vía de la fosfocetolasa. Teniendo en cuenta las vías

bioquímicas utilizadas para metabolizar los hidratos de carbono las BAL se dividen en tres grupos: heterofermentativas facultativas, homofermentativas obligadas y obligatoriamente fermentativas (Sánchez 2019, p. 10).

2.6.2.1. Homofermentativas obligadas

Este grupo de BAL fermentan la glucosa a ácido láctico exclusivamente a través de la vía de EMP, pero no pueden fermentar pentosas ni compuestos relacionados. Las cepas que cumplen estas características están clasificadas como *Lactobacillus* spp. Grupo I (Sánchez 2019, p. 11).

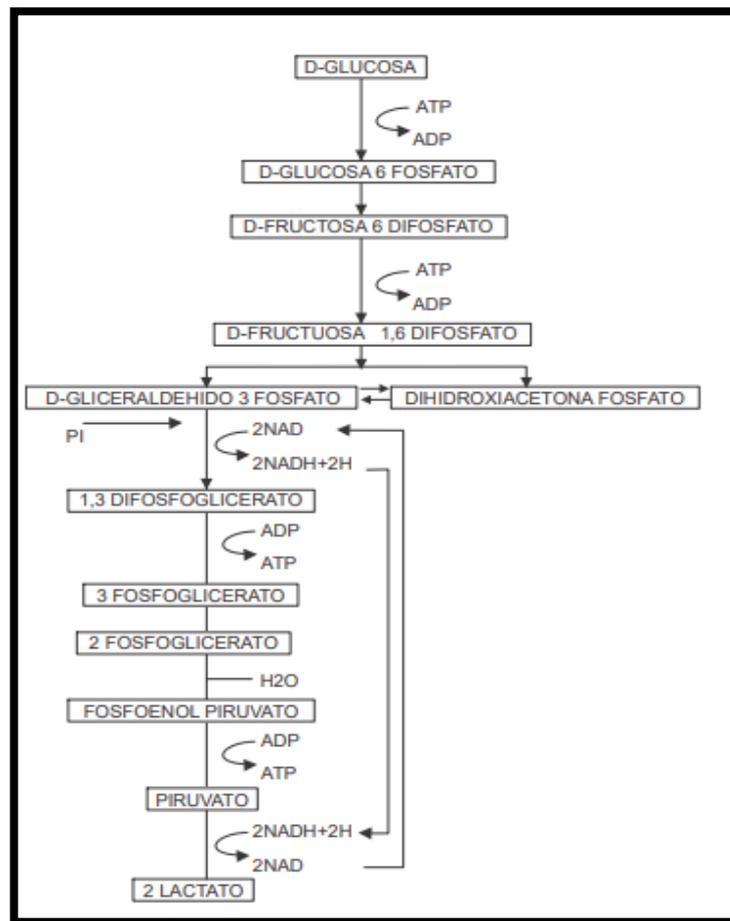


Ilustración 1-2: Fermentación homoláctica

Fuente: Parra, 2010, p. 96

2.6.2.2. Heterofermentativas facultativas

Fermentan los hidratos de carbono como la glucosa exclusivamente a ácido láctico vía la glicólisis y las pentosas por la vía de la fosfoctolasa. En este grupo están incluidos los *Lactobacillus* spp.

Grupo II y los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Paralactobacillus*. (Sánchez 2019, p. 11).

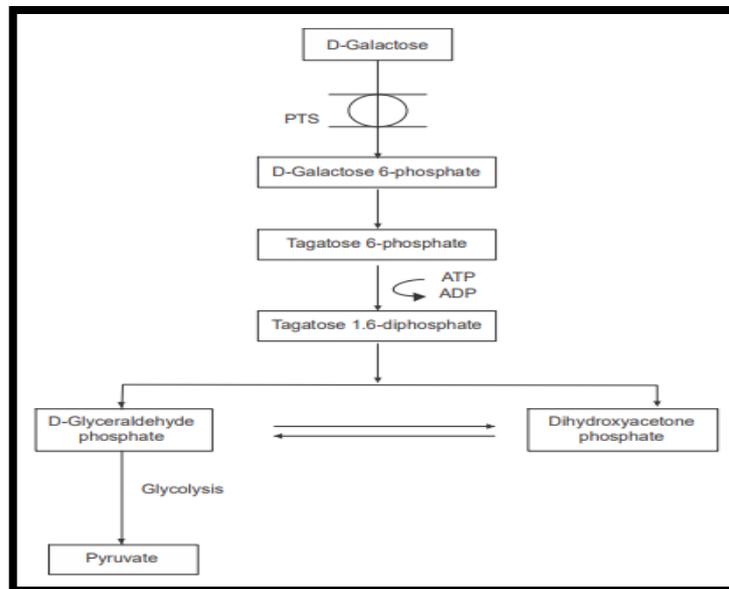


Ilustración 2-3: Ruta de la galactosa

Fuente: Parra, 2010, p. 95

2.6.2.3. Obligatoriamente heterofermentativas

Fermentan la glucosa, pentosas y compuestos relacionados a través de la vía de la fosfoacetolasa. Están incluidos en este grupo: *Lactobacillus spp.* Grupo III, *Leuconostoc*, *Weissella* y *Oenococcus* (Sánchez 2019, p. 10).

2.7. Principales géneros de bacterias ácido lácticas

Lactobacillus: Bacterias Gram positivas, no productoras de esporas, pueden ser anaerobias facultativas o microaerófilas. Algunas especies se caracterizan por ser homofermentativas y otras heterofermentativas. Son autoresistentes por lo que son importante en la industria alimentarias en la elaboración de productos como queso o yogurt. Dentro de este género destacan las siguientes bacterias *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus ácidophilus*, *Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus gasseri* (Cabezas, 2019, p. 7).

Lactococcus: Bacterias anaerobias facultativas, tiene morfología esférica agrupadas en cadenas cortas o pares, no son formadoras de esporas, no poseen movilidad y tiene tolerancia a distintos

pH, temperatura y salinidad para su crecimiento. En este género encontramos a bacterias como: *Lactococcus piscium*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus changangensis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* y *Lactococcus fujiensis* (Rebello et al., 2016, p.22)

Streptococcus: Son bacterias de forma esférica, gram positivas, anaerobias facultativas, no tiene movilidad y se encuentran agrupadas formando cadenas de dos. Estas bacterias producen toxinas como hemolisinas o proteasas que facilitan su proliferación y colonización en el huésped. Dentro de este género destacan bacterias como *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae* (Santos, 2019, p. 39)

2.8. Enfermedades en las que se aplica bacterias ácidos lácticas

2.8.1. Problemas digestivos

La enfermedad inflamatoria intestinal es un trastorno crónico entre los cuales encontramos la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn las cuales pueden presentar manifestaciones clínicas como: dolor abdominal, diarrea y sangrado. Su tratamiento farmacológico incluye antiinflamatorios inmunomoduladores y agentes biológicos. El empleo de probióticos en pacientes con colitis ulcerosa en combinación de terapia farmacológica ha permitido establecer mejoría en los parámetros histológicos, la disminución de la frecuencia de diarrea y la presencia de sangre en heces. Como un beneficio adicional, el uso de los probióticos mejora la tolerancia de los alimentos que aportan macro y micronutrientes (Sánchez et al. 2018, p. 12).

2.8.2. Reducción de cáncer de colon

El consumo de probióticos puede tener un efecto anticancerígeno y/o profiláctico con relación al desarrollo de cáncer de colon. La actividad anticancerígena ha sido demostrada gracias a un efecto en la modulación de la actividad enzimática de las poblaciones bacterianas del colon, las cuales podrían estar asociadas con ciertas enfermedades o promoción de tumores (Gallardo 2018, p. 22).

2.8.3. Disminución de colesterol sérico

Los elevados niveles de colesterol sanguíneo y en la dieta son los principales factores de riesgo que conllevan al apareamiento de enfermedades coronarias. En diversos estudios se han realizado ensayos donde el consumo de productos lácteos fermentados ayuda a la disminución de colesterol en el suero sanguíneo. Además, estudios *in vitro* han demostrado que cepas probióticas como *Lactobacillus acidophilus* disminuye el nivel de lipoproteínas de baja densidad y colesterol (Ramírez et al. 2011, p. 11).

2.8.4. Uso en la hipertensión

La presencia de péptidos producidos durante la fermentación de productos lácteos ayuda a disminuir moderadamente la presión sanguínea en paciente con presión elevada (hipertensos). Esto se debe a que estos péptidos participan como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) (Ramírez et al. 2011, p. 11).

2.9. Alimentos con probióticos

Se conoce como productos con probióticos a aquellos alimentos que han atravesado un proceso de fermentación mediante el desarrollo controlado de microorganismos (hongos, bacterias o levaduras) los cuales generan una acción enzimática sobre el sustrato alimentario, transformando un producto diferente al material de origen (Vinderola y Pérez, 2021, p. 57).

Durante el proceso de fermentación se observan cambios en las propiedades sensoriales (olor, sabor) y reológicas (viscosidad) del producto, mejora la biodisponibilidad y la digestión de algunos nutrientes, prolonga la vida útil y otorga propiedades beneficiosas para la salud. Algunos alimentos fermentados pueden resultar de la fermentación de leche (kéfir, yogur), cereales (avena fermentada, cerveza), frutas o legumbres (bebidas alcohólicas) y verduras (kimchi, chucrut) (Vinderola y Pérez, 2021, p. 57).

2.9.1. Yogur

Producto obtenido de la fermentación de la leche con microorganismo específicos como *Lactobacillus delbrueckii* y *Streptococcus thermophilus*. Estos se encargan de acidificar la leche al fermentar parcialmente la lactosa. En general, se ha evidenciado que en los sujetos con malabsorción o intolerancia a la lactosa los yogures son mejor tolerados que la leche porque parte de la lactosa se consume durante la fermentación (Vinderola y Pérez, 2021, p. 57).

2.9.2. Kéfir

Es una bebida láctea fermentada con bioactividad multifuncional. Se obtiene inoculando granos de granos de kéfir en leche la cual funciona como fuente de compuestos con actividad biológica. El consumo de kéfir está asociado con una amplia gama de beneficios nutracéuticos, que incluyen efectos antimicrobianos, anticancerígenos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antioxidantes, anticancerígenos y antihipercolesterolémicos (Rodríguez et al. 2017, p. 347)

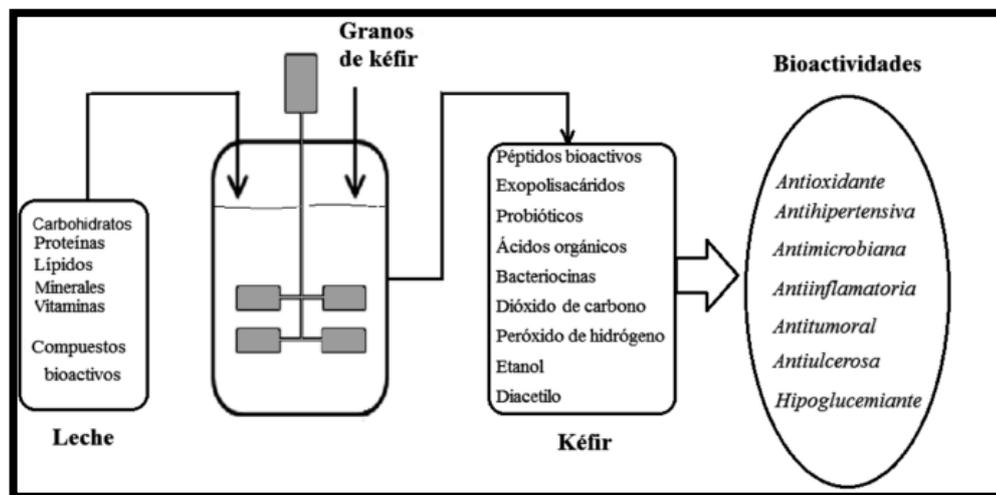


Ilustración 2-4: Producción y bioactividad multifuncional del kéfir

Fuente: Rodríguez et al., 2017 p. 349

2.9.3. Chucrut

Alimento obtenido a través de la fermentación de la *Brassica oleracea* (col) originado en China y exportado a Europa. Posee una conservación por largos periodos de tiempo al igual que otros productos fermentados, su consumo facilita el acceso a nutrientes en temporadas donde es difícil acceder a alimentos frescos por las bajas temperaturas (Rodríguez y Zumba, 2021, p. 100).

2.9.4. Cerveza

Bebida alcohólica cuya elaboración consiste en la fermentación de granos de cebada malteados al que se le incorpora lúpulo mediada por levaduras. Es una bebida de mayor consumo a nivel mundial, uno de los principales criterios para su clasificación de las cervezas existentes se basa prácticamente en el tipo de fermentación y el tipo de levadura involucrada. Entre las levaduras cerveceras encontramos a aquellas de fermentación baja y alta (Burini et al. 2021, p. 360).

2.10. Screening microbiológico de bacterias ácido lácticas

El aislamiento y la caracterización de cepas de bacterias ácidos lácticas busca mejorar y optimizar los procesos fermentativos ayudando al desarrollo de productos con actividad probiótica definidas y constantes. La caracterización después del aislamiento de bacterias ácidos lácticas (BAL) provenientes de productos artesanales tiene relevancia en el campo científico ya que permite incrementar el conocimientos tanto en la aplicación como el potencial de cepas autóctonas para ser utilizadas como cultivos iniciadores (Ramírez y Vélez, 2018, p. 116).

2.10.1. Pruebas bioquímicas

2.10.1.1. Tinción Gram

La tinción Gram es una de las pruebas bioquímicas más importantes en el campo de la microbiología este tipo de tinción diferencia a las bacterias en dos grandes grupos. Las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las primera se caracterizan por presentar un tinción azul o violeta debido a que están compuestas por una pared celular gruesa compuesta por polímeros y peptidoglucanos e impermeables los cuales resisten a la decoloración. Por otro lado, las bacterias Gram negativas presentas una coloración rosa ya que pueden sufrir decoloración debido a que su pared es más delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración. Además, también permite determinar si el microorganismos pertenece al grupo de las bacterias o levaduras, la morfología como bacilo o coco y la forma de agrupación (Rodríguez y Arenas, 2018, p. 166).

2.10.1.2. Prueba de la catalasa

Esta prueba es de utilidad para identificar los microorganismos que expresan la enzima catalasa, esta enzima se encuentra en la mayoría de los microorganismos que disponen citocromo. La enzima se encarga de hidrolizar el peróxido de hidrógeno presente en la biotransformación de organismos vivos mediante el empleo de la vía oxidativa en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbuja (Espín 2021, p. 18). La mayor parte de las bacterias aerotolerantes dan catalasa positiva a excepción de las bacterias ácido-lácticas (Latorre 2018, p. 25).

2.10.1.3. Prueba de la oxidasa

Esta prueba es de utilidad para identificar bacterias que poseen enzimas oxidasas ya que estos microorganismos disponen del sistema citocromo oxidasa, este sistema puede estar presente en bacterias anaerobias o aerobias. Sin embargo, en bacterias que carece del sistema citocromo oxidasa se considera que la producción de la enzima oxidasa está asociada con la producción de la enzima catalasa y puede ser determinada por método directo en placa o indirecto en papel. (ULPGC 2019, p. 6).

2.10.1.4. Prueba de la movilidad

Es una prueba es de utilidad para determinar si la bacteria carece o no de movilidad, para determinar la movilidad se emplea la siembra de la bacteria en el medio manitol-movilidad donde las bacterias que sean móviles generarán una especie de enturbiamiento homogéneo a causa de la distribución de los microorganismos, en cambio las bacterias que carezcan de movilidad permanecerán únicamente en la línea de la siembra realizada (ULPGC 2019, p. 4).

2.10.1.5. Producción de CO₂ a partir de glucosa

Esta prueba es de utilidad ya que permite identificar si las bacterias son heterofermentativas, debido a que estos microorganismos emplean la ruta de la fosfoctolasa que metaboliza los hidratos de carbono, produciendo además de ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono (Parra 2010, p. 98).

2.10.1.6. Crecimiento a diferentes temperaturas

Es una prueba que permite identificar la temperatura ideal de incubación categorizándolas como termófilas o mesófilas tomando en cuenta los siguientes parámetros (Parra 2010, p. 9):

- Mesófilas: volumen de cultivo entre 1-2%, temperatura de incubación 22-34°C con un tiempo de incubación de 18-20 horas, con una acidez final de ácido láctico del 0,8%.
- Termófilas: volumen de cultivo entre 2-3%, temperatura de incubación 37-45°C con un tiempo de incubación de 2-4 horas, con una acidez final de ácido láctico del 0,9%.

2.10.1.7. Tolerancia de diferentes pH

Es una prueba en la cual las bacterias son sometidas a diferentes rangos de pH, pero es importante considerar que, la mayoría de las bacterias ácido lácticas pueden tolerar un pH alcalino o ácido, sin embargo, a medida que disminuye el pH del medio disminuye el número de especies que son capaces de subsistir (Vanegas 2014, p. 9).

Se entiende que, el pH es un factor importante en el proceso de fermentación, se obtiene una producción óptima de ácido láctico a pH de 7-5, por lo cual, es de vital importancia seleccionar las bacterias ácido lácticas que tengan la facultad de tolerar ese rango de acidez (Vanegas 2014, p. 9).

2.11. Análisis proximal

Este tipo de análisis comprende métodos que se realizan con mayor frecuencia para conocer la composición de los componentes que se encuentran presentes en los alimentos. Incluye determinaciones como humedad, ceniza, grasa cruda, fibra dietética, carbohidratos asimilables y proteína total (Fay y Zumbado, 2020, p. 7).

2.11.1. Humedad

La humedad hace referencia a la cantidad de agua que posee un alimento. Se utiliza el término “materia seca” dentro de este parámetro mismo que se obtiene de la diferencia del peso total menos el contenido de agua (humedad). Entre las principales razones para conocer el contenido de humedad en alimentos tenemos: impedir afectaciones en la textura del alimento, evitar el desarrollo de microorganismos y para la adecuada conservación de los alimentos por el mayor tiempo posible (Ortega 2020, p. 16).

2.11.2. Cenizas

Las cenizas hacen referencia al residuo mineral (inorgánico) que permanece después de la combustión completa de la materia orgánica en los alimentos. En este tipo de análisis se emplean dos tipos principales de cenizas: cenizas húmedas y cenizas secas. La ceniza húmeda se emplea como preparación para el análisis de minerales que pueden volatilizarse y perderse en la ceniza seca. La ceniza seca se emplea principalmente para la composición proximal y para algunos análisis minerales específicos (Ortega 2020, p. 16).

2.11.3. Proteína

La evaluación de estos nutrientes permite reconocer la calidad de los insumos proteicos que están presentes en una muestra. Se emplea el método de Kjeldahl para su análisis, el cual permite evaluar el contenido de nitrógeno total en la muestra, después de ser digerida con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador de selenio o mercurio. Próxima a su destilación se obtiene el

resultado de la cantidad de nitrógeno inorgánico y orgánico y para saber el valor de nitrógeno orgánico el cual nos indica el valor correspondiente al de los aminoácidos se debe multiplicar por un factor (Naula 2016, p. 22).

2.11.4. Fibra

Denominada como fibra cruda, su análisis se realiza por medio de hidrólisis con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, la fibra corresponde a la parte orgánica no nitrogenada ya que esta contiene un 15% de lignina (compuestos insolubles) y 90% de celulosa. El objetivo principal de este método es calcular la cantidad de hidratos de carbono utilizando distintas técnicas colorimétricas obteniendo cantidad de fibra presente en alimentos vegetales (Naula 2016, p. 22)

2.11.5. Grasa total o extracto etéreo

El extracto etéreo o también denominado grasa bruta o total hace referencia al conjunto de sustancias extraídas como esteres de ácidos grasos con glicerol, lecitinas, ceras, ácidos grasos libres, fosfolípidos y algunos pigmentos como carotenoides, clorofila. Su determinación se la realiza por método Soxhlet a partir de extracción con disolventes orgánicos. En este método el disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra quedando inmersa en el disolvente. La cantidad de grasa se cuantifica por discrepancia de peso (Ortega 2020, p. 16).

2.12. Análisis microbiológico

La mayoría de industrias, comprende el uso de métodos químicos, bioquímicos o biológicos para la identificación de microorganismos, la detección o la enumeración de puntos críticos de microorganismos presentes en un material como: alimentos, bebidas, muestras ambientales o clínicas (Infinitia 2021, p. 1). Este análisis no garantiza la en la calidad del producto, pero nos permite evitar riesgos de contaminación o proliferación microbiana.

2.12.1. Indicadores de calidad

Son microorganismos o productos metabólicos generados por los mismo, su presencia en los alimento es empleada para examinar el proceso de fabricación y determinar la vida media o útil del mismo.

La presencia de microorganismo patógenos en los alimentos es una de las causas por la cual se emplean microorganismo indicadores ya que advierten la contaminación o un manejo inadecuado

durante el proceso de fabricación. La calidad microbiana es muy importante en la industria alimentaria ya que influye en la conservación, vida útil y sobre todo garantiza que la población evite sufrir enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's). Entre los indicadores de calidad encontramos: aerobios mesófilos, hongos y levaduras, coliformes totales, *Staphylococcus aureus* e Indicadores de “contaminación fecal”: coliformes fecales, *E. coli*, enterococos, clostridios sulfito reductores (Fuentes et al. 2014, p. 1).

2.12.1.1. Aerobios mesófilos

Microorganismos que emplean el oxígeno para sobrevivir al ser mesófilos su temperatura óptima para la proliferación oscila entre los 30 a 37°C. Su empleo es indispensable para determinar la situación higiénica y la situación sanitaria de un producto. No es un indicador específico, es decir un recuento bajo de aerobios mesófilos no garantiza que el producto se encuentre exento de gérmenes patógeno o sus toxinas. El recuento elevado de aerobios mesófilos no garantiza que en el producto exista microflora patógena ya que esto puede deberse a incorrecta aplicación de las técnicas de manipulación Los producto que sobrepasan tasas mayores a $10^6 - 10^7$ UFC/g suele alerta a un inicio de descomposición (Contero 2017, p. 26).

2.12.1.2. Coliformes

Son microorganismo Gram negativos, en forma de bacilos, aerobios facultativos, no esporulados, su temperatura de proliferación oscila entre 10 a 46°C y fermentan la lactosa liberando gas. Los métodos normalizados se emplean para el recuento de coliformes fecales, coliformes totales y *Escherichia coli*, ya que son indicativos de contaminación del producto con material fecal por lo que su presencia en los productos no es admitida ya que son agentes etiológicos de enteritis. Estos microorganismos generan mucosidad y sabores desagradables amargos (Contero 2017, p. 26).

2.12.1.3. *Escherichia coli*

Es un microorganismo Gram negativo, anaerobio facultativo, de tipo bacilo correspondiente a la familia Enterobacteriaceae, es un agente comensal, aunque existen cepas que algunos casos se comportante como patógenos causando cuadros de disentería. Actualmente se conocen seis grupos de microorganismo los cuales son: enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteroagregativa, enteropatógena y productoras de toxina Vero (Guevara 2021, p. 11).

2.12.1.4. *Staphylococcus aureus*

Es un microorganismo con morfología de cocos agrupados a modo de racimo de uva. Gram + el cual se encuentra distribuido por todo el ambiente, forma parte normal de la microbiota normal de las fosas nasales, piel y garganta. Este microorganismo es el que provoca shock tóxico, enfermedades de la piel e intoxicaciones alimentarias (Guevara 2021, p. 11).

2.13. Análisis sensorial

Se define al análisis sensorial como al conjunto de técnicas medibles y evaluación de determinadas propiedades de los alimentos por los sentidos humanos. La evaluación sensorial es tiene como propósito medir las propiedades sensoriales y establecer la importancia de estas, con la finalidad de predecir la aceptabilidad del consumidor, con lo cual aporta a la industria, la ocasión de aprovechar y aplicar dichas mediciones. Por otro lado, la calidad sensorial, es el resultado de interacción del ser humano con el alimento y la cual se puede definir como la sensación humana ocasionada por los estímulos procedentes del alimento (Trujillo 2022, p. 28).

Prueba	Clases	Características	Cuándo utilizar	Tipo y número de jueces
Afectiva	1. Preferencia 2. Aceptación 3. Escala Hedónica: Verbal o gráfica	<ul style="list-style-type: none"> • Es subjetiva. • Presenta mayor variabilidad. • Los resultados son más difíciles de interpretar. • Las apreciaciones cambian con: el tiempo, práctica, instrucciones, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se desea conocer si la muestra o producto gusta o disgusta. • Es aceptado o rechazado. • Se prefiere a otro. • Desea adquirirla o no. • Grado de satisfacción producida. 	Se requiere un mínimo de 30 jueces. Consumidores habituales o potenciales sin entrenamiento en técnicas sensoriales y sin ninguna relación con el proceso o investigación.
Discriminativa	1. Apareada simple 2. Dúo - Trío 3. Triangular 4. Comparación múltiple 5. Ordenamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Es objetiva - analítica. • No se requiere conocer la sensación subjetiva. • La posibilidad de desarrollar nuevos métodos han sido agotados. 	Para establecer: <ul style="list-style-type: none"> • Uniformidad de la calidad. • El efecto de cambios en materias primas, procesos, empaques. • Diferencias entre dos muestras. • Magnitud e importancia de las diferencias. • Aptitud de jueces, selección entrenamiento y seguimiento. 	Se requieren: <ul style="list-style-type: none"> • De 12 a 20 jueces semi-entrenados para pruebas sencillas. • De 7 a 12 jueces entrenados para pruebas complicadas.
Descriptivas	1. Escala no estructurada 2. Escala estructurada 3. Escala estándar 4. Estimación de magnitud 5. Perfiles sensoriales 6. Relaciones psico-físicas	<ul style="list-style-type: none"> • Es objetiva - analítica. • Son más difíciles de realizar. • Proporciona mucha mayor información. • Tiene un mayor potencial de desarrollar nuevos métodos. • La interpretación de los resultados es más laborioso. 	Permite: <ul style="list-style-type: none"> • Definir y medir propiedades de los alimentos. • Conocer la magnitud o intensidad de los atributos. • Describir el producto. • Establecer la dirección de las diferencias. 	Se requieren: <ul style="list-style-type: none"> • Jueces que han recibido entrenamiento más intenso. • Jueces con experiencia en productos específicos. • Jueces con habilidad para comunicar t describir atributos.

Ilustración 2-5: Clasificación de las pruebas sensoriales

Fuente: (UPAEP, 2014, p. 26)

2.13.1. Pruebas hedónicas

También denominadas pruebas afectivas. Son aquellas en las que interviene un juez catador y revela su reacción subjetiva ante un producto presentado, indicando su aceptabilidad o rechazo, si le gusta o le disgusta, si prefiere algo diferente o no. Este tipo de pruebas es de carácter complejo de interpretar ya que se trata de valoraciones personales, con la variabilidad que ello supone. Los estudios hedónicos son fundamentales para saber la ponderación de un producto para determinar si es o no agradable al consumidor. Las pruebas hedónicas se pueden aplicar para conocer las primeras impresiones de un nuevo producto obteniendo más información sobre su grado de aceptación o rechazo del consumidor (Obando y Valera 2020, p. 52).



Ilustración 2-6: Escala hedónica gráfica

Fuente: (Da Cunha et al, 2013, p. 359)

2.14. Pasteurización

Proceso térmico que tiene como principio primordial elevar la temperatura hasta el punto de ebullición e inmediatamente disminuir la temperatura con la finalidad de que los microorganismos mueran. Generalmente, todos los líquidos que se someten a este tratamiento térmico reducen la presencia de agentes patógenos, tales como protozoos, levaduras, mohos, bacterias y a su vez inactiva enzimas que pueden modificar el sabor de los productos (Guamán 2021, p. 7).

2.14.1. Tipos de pasteurización

2.14.1.1. Pasteurización VAT o discontinua

Es el primer método de pasteurización, este método consiste en calentar volúmenes del producto en un recipiente estanco a una temperatura de 63°C por un tiempo de 30 minutos, posteriormente se deja enfriar lentamente hasta que obtenga una temperatura de 4 y 6° C según la conveniencia. El proceso de enfriamiento puede ser demorado para continuar con el proceso de envasado del producto, inclusive puede tardar hasta más de 24 horas (Tipán y Flores, 2018, p. 7).

2.14.1.2. Pasteurización a altas temperaturas durante un breve periodo de tiempo (HTST-High Temperature/Short Time)

Es el método más conveniente, ya que expone al alimento a altas temperaturas durante un breve periodo y emplea poco equipamiento industrial. Bajo la categoría de pasteurización HTST existen dos métodos tanto en lotes y en flujo continuo. Si embargo, para ambos la temperatura y el tiempo empleado es el mismo 72°C durante 15 (Tipán y Flores, 2018, p. 8).

2.14.1.3. El proceso a ultra-altas temperaturas (UHT - Ultra-High Temperature)

La pasteurización a ultra altas temperaturas (UHT) es de flujo continuo y mantiene al producto a una temperatura superior o más alta que la empleada en la pasteurización HTST, la temperatura puede rondar hasta 138 °C durante al menos dos segundos. La ventaja de este proceso es que al ser un tiempo de exposición breve existe mínima degradación del alimento (Tipán y Flores, 2018, p. 8).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de integración curricular se ejecutó en los Laboratorios de Microbiología, Bromatología, Procesos industriales e Investigación de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.2. Población de estudio

La población de estudio fueron los frutos de *Psidium guajava* recolectados del Cantón Sacha, Provincia de Orellana. Para la obtención del zumo se toman en cuenta los siguientes criterios

Criterio de inclusión:

Los frutos que se encuentren en buen estado, identificando sus características organolépticas.

Criterio de exclusión:

Aquellos frutos que presente mohos, mal olor, dañadas.

3.3. Tamaño de la muestra

La recolección del fruto se realizó en el cantón Joya de los Sachas perteneciente a la provincia de Orellana mediante un muestreo aleatorio simple para obtener aproximadamente 6 Kg de la especie frutal de *Psidium guajava*.

El tamaño de la muestra para determinar la mejor formulación se la obtuvo de un grupo de 56 estudiantes de la carrera de bioquímica y farmacia quienes fueron sometidos a un prueba hedónica en las cuales se proporcionó a degustar las tres formulaciones para poder seleccionar la de mejor aceptabilidad. Mediante el cálculo del tamaño al tratarse de una población finita a partir de la siguiente ecuación se obtuvo una tamaño de muestra de 50.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{e^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra buscado

N = Tamaño de la población o el Universo

Z = factor estadístico que depende del nivel de confianza

e = error de estimación máximo aceptado

p = probabilidad de que ocurra el evento estimado (éxito)

q = probabilidad que no ocurra el evento estimado

3.4. Materia prima, materiales, equipos y reactivos

3.4.1. Materia prima

- Frutos de *Psidium guajava*

3.4.2. Materiales

- Crisoles
- Vidrio reloj
- Espátula
- Crisoles porosos
- Frascos Kitasato
- Espátula
- Tubos de digestión Kjeldahl
- Bureta
- Vaso de precipitación
- Refrigerante
- Balones de aforo
- Olla
- Envases de vidrio 250 mL
- Cuchillo
- Colador
- Bandeja de acero inoxidable
- Matraz de 500 mL
- Pipeta automáticas de 1000 uL
- Pipeta automáticas de 100 uL
- Puntas azules

- Puntas amarillas
- Pipeta Pasteur
- Algodón
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Balón de destilación
- Boecos
- Papel aluminio
- Cajas Petri
- Asa microbiológica
- Asa de drigalsky
- Jarras de plástico
- Bolsa de anaerobiosis
- Cinta

3.4.3. Equipos

- Balanza analítica
- Desecador
- Mufla
- Refractómetro
- Estufa
- Sistema Kjeldahl (Digestor-Scrubber-Destilador)
- Sistema de Pasteurización
- Licuadora
- Rota evaporador
- Despulpadora
- Cocina industrial
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar

3.4.4. Reactivos

- Ácido sulfúrico al 0.128 M
- Hidróxido de sodio al 0.223 M
- Hidróxido de sodio al 40%

- Fenolftaleína
- Ácido Bórico
- Ácido Clorhídrico
- Sulfato de Potasio
- Sulfato de Cobre
- Indicador mixto (rojo de metilo y verde bromocresol)
- Agua purificada
- Azúcar
- Agua destilada
- Hexano
- Peptona 0,1%
- Ácido Acético 6 M
- Cicloheximida

3.4.5. Medios de cultivo

- Petrifilm *E. coli*
- Petrifilm *Staphylococcus aureus*
- Petrifilm Aerobios mesófilos
- Agar PDA
- Agar MRS
- Agar M17
- Caldo MRS

3.5. Técnicas de estudio

3.5.1. Caracterización de la materia prima

3.5.1.1. Determinación de humedad

Se determinó mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 518.

Procedimiento:

- Tarar los crisoles en la estufa a $130\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, luego trasladar al desecador y repetir hasta peso constante.
- Pesar 2 g de muestra en la cápsula previamente tarada y distribuirla uniformemente.

- Se ubica la muestra con la cápsula en la estufa a la temperatura y tiempo establecido que es de $130\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta el día siguiente o un máximo de 3-5 horas.
- Se retira de la estufa la capsula con la muestra con ayuda de las pinzas y se deja enfriar en el desecador durante 30 min.
- Repetir las operaciones de calentamiento, enfriamiento y pesaje, hasta que la diferencia de la masa entre los resultados de dos operaciones de pesaje sucesivas no exceda los 0,1 mg.

Cálculos:

$$\% \textit{Humedad} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100$$

Ecuación 1: Determinación de humedad

En donde:

% Humedad = contenido de humedad en porcentaje de masa.

m_1 = masa de la cápsula vacía, en gramos.

m_2 = masa de la cápsula con la muestra antes del secado, en gramos.

m_3 = masa de la cápsula con la muestra desecada, en gramos.

3.5.1.2. Determinación de ceniza

Se determinó mediante técnicas establecidas en la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 520.

Procedimiento:

- Tarar los crisoles en la estufa a $550\pm 15^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, luego trasladar al desecador y repetir hasta peso constante.
- Pesar 5 g de muestra y colocar en el crisol.
- Incinerar la muestra en un reverbero hasta que no exista presencia de humo.
- Se coloca en la mufla la cápsula con la muestra a la temperatura y tiempo recomendado $550\pm 15^{\circ}\text{C}$ hasta el día siguiente hasta obtener cenizas de un color blanco.
- Sacar de la mufla la cápsula con la muestra, con ayuda de las pinzas y dejar enfriar en el desecador durante 1 hora.
- Repetir la incineración por lapsos de 30 min, enfriando y pesando nuevamente hasta que no exista una disminución en la masa

Cálculos:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \times 100$$

Ecuación 2: Determinación de ceniza

En donde:

%Ceniza= Contenido de cenizas en porcentaje de masa.

m = Masa de la cápsula vacía en g.

m₁ = Masa de la cápsula con la muestra seca en g.

m₂ = Masa de la cápsula con la muestra incinerada en g.

3.5.1.3. Determinación de grasa

Se determinó mediante el *Método con Soxhlet*. (LUCERO, O. Técnicas de Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos - Resumen de la cátedra de Bromatología, ESPOCH)

Procedimiento:

- Pesar 5 g de muestra seca y colocar en el dedal de papel filtro previamente tarado y se registra su peso, se coloca sobre el dedal algodón para evitar que se produzca evaporación, se pierda la muestra o se separe del dedal, luego introducirlo en la cámara de sifonación.
- En el balón previamente tarado (se debe registrar su peso), adicionar 250 mL de hexano.
- Embonar la cámara de sifonación al balón
- Colocar el condensador con las mangueras sobre la cámara de sifonación
- Encender la parrilla, controlar la entrada y salida de agua y extraer por 2 a 4h
- Al terminar el tiempo, retirar el balón con el solvente más el extracto graso y destilara el solvente (rota vapor)
- El balón con la grasa bruta o cruda colocar en la estufa por media hora, enfriar en desecador y pesar

Cálculos:

$$\% \text{ Grasa} = \frac{P_1 - P}{m} \times 100$$

Ecuación 3: Determinación de grasa

En donde:

% Grasa = grasa cruda o bruta en muestra seca expresado en porcentaje en masa

P1 = masa del balón más la grasa cruda o bruta extraída en gramos

P = masa del balón de extracción vacío en gramos

m = masa de la muestra seca tomada para la determinación g

3.5.1.4. *Determinación de fibra*

Se determinó mediante el *Método de Weende*. (LUCERO, O., Técnicas de Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos - Resumen de la cátedra de Bromatología, ESPOCH)

Procedimiento:

- Pesar 1,5 g de muestra seca y colocar la muestra en los crisoles previamente tarados
- Introducir los crisoles en el equipo Dosi-Fiber
- Precalentar los reactivos

- *Hidrolisis ácida en caliente*

- Asegurarse que las válvulas se encuentren en la posición “cerrado”
- Poner en marcha la calefacción. Añadir 120 ml de ácido sulfúrico en cada columna. Esperar la ebullición. Añadir unas gotas de antiespumante.
- Abrir el circuito de refrigeración y activar las resistencias calefactoras. (Potencia al 90%)
- Esperar a que hierva, reducir la potencia al 30% y dejar hervir durante el tiempo de extracción 30 minutos. Para una hidrólisis más efectiva, accionar en la posición “Soplar”
- Parar la calefacción. Abrir el circuito de vacío y poner los mandos de las válvulas en posición “Absorción”. Lavar con agua destilada y filtrar. Repetir este proceso 3 veces

- *Hidrolisis básica en caliente*

- Asegurarse que las válvulas se encuentren en la posición “cerrado”
- Poner en marcha la calefacción. Añadir 120 ml de hidróxido de potasio en cada columna. Esperar la ebullición. Añadir unas gotas de antiespumante.
- Abrir el circuito de refrigeración y activar las resistencias calefactoras. (Potencia al 90%)
- Esperar a que hierva, reducir la potencia al 30% y dejar hervir durante el tiempo de extracción 30 minutos. Para una hidrólisis más efectiva, accionar en la posición “Soplar”
- Parar la calefacción. Abrir el circuito de vacío y poner los mandos de las válvulas en posición “Absorción”. Lavar con agua destilada y filtrar. Repetir este proceso 3 veces

- *Hidrolisis básica en caliente*
- Preparar el frasco “Kitasatos” con las trompa de vacío. Situar el crisol en la entrada del Kitasatos y añadir acetona a la vez que el circuito de vacío está absorbiendo hacia el frasco. Repetir esta operación 3 veces
- Poner las muestras a secar en la estufa a 150°C durante 1h
- Dejar enfriar en desecador
- Pesar con un precisión de ±0.1mg. La cantidad pesada es W1
- Incinerar las muestras de los crisoles en el Horno de mufla a 500°C durante mínimo 3h.
- Dejar enfriar en desecador. Tener en cuenta las recomendaciones dadas para la manipulación de los crisoles.
- Pesar los crisoles con una precisión de ±0.1mg. La cantidad pesada es W2
- Realizar el siguiente calculo:

Cálculos:

$$\% \text{ Fibra} = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100$$

Ecuación 4: Determinación de fibra

Dónde:

% Fibra = fibra bruta en muestra seca expresado en porcentaje en masa

W₁ = peso del crisol poroso con la muestra después del secado en la estufa

W₂ = peso del crisol poroso con la muestra después de la incineración en la mufla

W₀ = masa del crisol poroso con la muestra

3.5.1.5. Determinación de proteína

Se determinó mediante el *Método de Kjeldahl*. (LUCERO, O., Técnicas de Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos - Resumen de la cátedra de Bromatología, ESPOCH)

Procedimiento:

- Pesar aproximadamente 2 g de la muestra seca y tamizada y depositarla en el tubo Kjeldahl registrar el peso para el cálculo posterior
- Pesar 4 g de sulfato de potasio (K₂SO₄) y 0,2 g de sulfato de cobre (CuSO₄), y colocarlo en el tubo Kjeldahl

- Con ayuda de una probeta, pipeta o dispensador agregar 25 ml de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄)
- Colocar los tubos Kjeldahl en el Digestor
- Verificar que la cabina de extracción este encendida y que el Digestor esté conectado con el Scrubber (lavador de gases)
- Encender el Digestor y con ayuda de los botones seleccionar el calentamiento con rampas de temperatura, una vez seleccionado el programa, presionar OK para iniciar la digestión, esperar que culmine la digestión, sacar los tubos y esperar que alcancen la temperatura ambiente. Para continuar la destilación.
- Encender la unidad de destilación, abrir la válvula de paso de agua, para el condensador, colocar un tubo en el compartimento asegúrese de que todo esté completamente insertado y cierre la puerta
- Colocar un Erlenmeyer de 500 mL
- Proceder a la destilación presionando OK en la unidad de destilación.
- El equipo automáticamente dosificara 50 mL de una solución de ácido bórico al 2% (Verificar que los contenedores estén completamente cerrados y contengan la cantidad necesaria de reactivos)
- Añadir 10 gotas del indicador mixto rojo de metilo y verde de bromocresol agite para mezclar el contenido completamente. Sumerja la punta del condensador de la unidad de destilación en el Erlenmeyer
- Sacudir la punta de la manguera del condensador y quitar el Erlenmeyer con el destilado
- Titular el destilado hasta el cambio de color con HCl 0,1 N estandarizado. Registrar el volumen consumido
- Correr el blanco cada set de muestras o cada día para las respectivas correcciones de resultados
- Calcular el porcentaje de nitrógeno con los datos recopilados mediante cálculos estequiométricos

Cálculos:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{14 \times N \times V \times \text{factor}}{m \times 1000} \times 100$$

Ecuación 5: Determinación de proteína

Donde:

% Proteína = Contenido de proteína en porcentaje de masa.

V = Mililitros de ácido clorhídrico gastados en la titulación.

N = Normalidad del ácido clorhídrico.

m = Masa de la muestra, en gramos.

3.5.2. *Elaboración de la bebida a base de zumo de Psidium guajava*

La metodología empleada para la elaboración del zumo de guayaba se la obtuvo del Trabajo de Titulación *Modelo de negocio para la elaboración de jugos de fruta listos para el consumo en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua* (Pillajo 2022, p. 44).

Recepción de la materia prima: Se reciben las guayabas (*Psidium guajava*) en el Laboratorio de Procesos Industriales

Selección: En esta etapa se eliminan aquellos frutos en estado de putrefacción. El fruto recolectado es sometido a un proceso de selección, ya que de esta dependerá la calidad de zumo.

Lavado: Se realiza con el fin de eliminar cualquier tipo de suciedad, partículas extrañas y restos de tierra adheridas a la fruta. Esta operación la realizamos por inmersión.

Pelado: Se lo realiza de forma manual empleando cuchillos. Se la realiza con la finalidad de no contaminar el zumo por algún residuo que haya quedado en la cáscara de la guayaba y facilitar la extracción del zumo de la guayaba.

Despulpado: Consiste en obtener 1 pulpa libre de pepas, cáscaras. Se lo realizó mediante una despulpadora industrial para que salgan la pulpa de la fruta y evitar su desperdicio.

Estandarización: Durante esta etapa se añaden endulzantes naturales o artificiales y otros aditivos en diferentes proporciones, según la clase de jugo que se requiera.

Homogenizado: En esta etapa el jugo de fruta pasa al homogeneizador en donde se aumenta la viscosidad, se reduce la tasa de sedimentación, mejora el sabor y obtiene una apariencia homogénea

Tratamiento térmico: En esta etapa se somete al jugo directamente a diferentes temperaturas por un determinado tiempo, las bebidas pueden ser pasteurizadas a temperaturas de 110°C por 25 segundos y bajar hasta los 4°C bruscamente para la destrucción total de microorganismos.

Envasado: El jugo se envasa para su consumo final con su respectiva etiqueta que describa las propiedades de este

3.5.3. *Formulación de las bebidas*

En el estudio se elaboran bebidas fermentadas a base de zumo de guayaba en tres formulaciones con diferentes porcentajes de fruta y agua

Tabla 3-1: Porcentaje de fruta y agua

Formulación	Cantidad de Fruta (%)	Cantidad de Agua (%)
F1	30	70
F2	40	60
F3	50	50

Realizado por: Campoverde C., 2023

Tabla 3-2: Ingredientes utilizados en la formulación para la elaboración de la bebida

INGREDIENTES	F1	F2	F3
Fruta	75 g	100 g	125 g
Azúcar	5 g	5 g	5 g
Agua	175 mL	150 mL	125 mL

Realizado por: Campoverde C., 2023

3.5.4. *Análisis microbiológico de las bebidas posterior a su pasteurización*

3.5.4.1. *Determinación de mohos y levaduras mediante la NTE INEN 1529-10*

- Añadir a cada caja Petri 20 ml de agar papa dextrosa (PDA) modificado, fundido y enfriado a una temperatura de 45 – 50°C, al que se le ha adicionado anticipadamente el volumen necesario de una solución de cloranfenicol.
- La solución de cloranfenicol se prepara disolviendo un 1 gramo de succinato de cloranfenicol en 100 ml. de agua destilada estéril y se filtra a través de una membrana.
- Se coloca una pequeña cantidad del alimento de 5 o 10 gramos en un matraz al cual se ha añadido agua de peptona al 0.1% previamente esterilizado.

- Marcar dos placas por dilución, tomar las correspondientes a la más alta y sembrar en cada una 0.1 mL. de la dilución del respectivo tubo.
- Repetir esta operación con cada dilución hasta llegar a la más concentrada, usar siempre la misma pipeta, pero homogenizando 3 veces la dilución antes de sembrar en cada placa.
- Extender las alícuotas de 0.1 mL. sobre la superficie del medio, tan pronto como sea posible. Dejar secar las superficies de las cajas 15 minutos.
- Incubar las cajas Petri a temperatura de 20 – 24°C durante 3 a 5 días a temperatura ambiente durante 5 a 7 días. Para determinar el número de mohos y levaduras mediante la siguiente ecuación:

$$C = 10 \times n \times f$$

Ecuación 6: Determinación de número de mohos y levaduras

Donde

C = unidades formadoras de colonias de microorganismos. v= volumen de la solución de tiosulfato de sodio empleado en la titulación de la muestra en cm³

n = Número de Unidades Formadoras de Colonia contadas en la placa de Petri.

10 = Factor para convertir el inóculo sembrado a 1 ml.

f = Factor de dilución.

3.5.4.2. *Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast*

- Preparar el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente
- Colocar en un Erlenmeyer con 90 ml de agua de peptona
- Esterilizar en el autoclave por 15 min a 121 °C
- Colocar 10 ml de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar (10⁻¹)
- Transferir con una pipeta 1 mL de la dilución 10⁻¹ en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de peptona (10⁻²)
- Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida (10⁻³ / 10⁻⁷)
- Rotular las placas petrifilm respectivamente.
- Colocar el Petrifilm en una superficie plana y levantar el film superior.
- Con la pipeta automática, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, colocar 1000 µL de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire, por lo que no hay que dejarlo caer.

- Con la ayuda del aplicador y con la cara plana hacia abajo, ejercer suavemente presión para distribuir el inóculo sobre la superficie circular antes de la formación del gel. No se debe girar ni desplazar el aplicador.
- Incubar las placas Petrifilm con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.
- Aerobios mesófilos: Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Proceder a la lectura de las placas de acuerdo con la guía de interpretación

3.5.4.3. *Determinación de coliformes mediante técnica de microfast*

- Preparar el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente
- Colocar en un Erlenmeyer con 90 mL de agua de peptona
- Esterilizar en el autoclave por 15 min a 121°C
- Colocar 10 mL de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar (10^{-1})
- Transferir con una pipeta 1 mL de la dilución 10^{-1} en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona (10^{-2})
- Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida ($10^{-3} / 10^{-7}$)
- Rotular las placas microfast respectivamente.
- Colocar el microfast en una superficie plana y levantar el film superior.
- Con la pipeta automática, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, colocar 1000 μL de muestra en el centro
- Bajar el film superior cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire, por lo que no hay que dejarlo caer.
- Con la ayuda del aplicador y con la cara plana hacia abajo, ejercer suavemente presión para distribuir el inóculo sobre la superficie circular antes de la formación del gel. No se debe girar ni desplazar el aplicador.
- Incubar las placas microfast con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.
- *E. coli* / Coliformes: En el caso de Coliformes, incubar por 24 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para *E. coli*, incubar durante 48 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. 7)
- Proceder a la lectura de las placas de acuerdo con la guía de interpretación

3.5.5. *Técnica para el proceso de fermentación*

- Incubar la formulaciones elaboradas de la tabla 3-2 previamente pasteurizadas a 35 ± 1 durante 7 días

- Determinar el pH, índice de acidez y la sacarosa cada 24 horas hasta llegar al pH ideal (pH 4 – 4,2)
- Determinar el análisis microbiológico de las formulaciones (Indicadores de calidad)

3.5.5.1. Determinación de pH

Se determinó mediante la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2325

Procedimiento:

- Colocar en el vaso de precipitación aproximadamente 100 cm³ de muestra desgasificada a temperatura de ensayo
- Introducir los electrodos del medidor de pH en el vaso de precipitación con la muestra, evitando de toquen las paredes del recipiente
- Agitar y medir el pH obtenido a 0,01

3.5.5.2. Determinación del índice de acidez

Se determinó mediante el método potenciométrico de la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 341

Procedimiento:

- Lavar y secar el matraz Erlenmeyer en la estufa a 103° ± 2°C durante un lapso de 30 min.
- Dejar enfriar en el desecador y luego pesar con aproximación al 0,1 mg.
- Homogenizar la muestra preparada e inmediatamente transferir al matraz Erlenmeyer y pesar aproximadamente 20 g de muestra con proximidad al 0,1 mg.
- Diluir la cantidad contenida en el matraz con agua destilada en un volumen dos veces mayor y agregar 2 mL del indicador fenolftaleína.
- Lentamente y con agitación continua, agregar la solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener un color rosado persistente que desaparece lentamente.
- Seguir agregando la solución hasta que la coloración rosada perdure durante 30 segundos.
- Leer en la bureta el volumen de solución utilizada, con aproximación a 0,05 mL

Cálculos:

$$A = 0.009 \frac{V \times N}{m_1 - m} \times 100$$

Ecuación 7: Determinación de índice de acidez

Dónde:

A = acidez titulable de la bebida

V = volumen en mL de la solución de NaOH empleado en la titulación,

N = normalidad de la solución de NaOH,

m = masa en gramos del matraz Erlenmeyer vacío,

m₁ = masa en gramos del matraz Erlenmeyer con la muestra

3.5.5.3. *Determinación de sólidos solubles*

Se determinó mediante el método refractométrico de la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 380

Procedimiento:

- La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra de laboratorio
- Ajustar la circulación de agua del refractómetro para operar a la temperatura requerida (15 – 25 °C)
- Colocar 2 o 3 gotas de la muestra preparada en el prisma del refractómetro y ajustar inmediatamente el prisma móvil. Continuar la circulación de agua durante el tiempo necesario para que tanto los prismas como la solución de ensayo alcancen la temperatura requerida, que debe permanecer constante, dentro del rango de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante toda la determinación
- Leer el índice de refracción o el porcentaje en masa de sacarosa

3.5.5.4. *Determinación de coliformes y coliformes totales mediante la técnica de microfast*

- *Técnica de siembra*
- Preparar el agua de peptona 1 g en 1000 ml, respectivamente
- Colocar en un Erlenmeyer con 90 ml de agua de peptona
- Esterilizar en el autoclave por 15 min a 121 °C
- Colocar 10 ml de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar (10^{-1})
- Transferir con una pipeta 1 ml de la dilución 10^{-1} en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona (10^{-2})
- Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida ($10^{-3} / 10^{-7}$)
- Rotular las placas microfast respectivamente.
- Colocar el microfast en una superficie plana y levantar el film superior.

- Con la pipeta automática, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, colocar 1000 μ L de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire, por lo que no hay que dejarlo caer.
- Con la ayuda del aplicador y con la cara plana hacia abajo, ejercer suavemente presión para distribuir el inóculo sobre la superficie circular antes de la formación del gel. No se debe girar ni desplazar el aplicador.
- Incubar las placas microfast con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.
- *E. coli* / Coliformes: En el caso de Coliformes, incubar por 24 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Para *E. coli*, incubar durante 48 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. 7) Proceder a la lectura de las placas de acuerdo con la guía de interpretación

- *Lectura e interpretación*

Las colonias rojas y azules con gas se cuentan como Coliformes durante las primeras 24 horas, y cualquier colonia de azul a rojo-azul, indica la presencia de *E. coli*, mismas que se cuentan a las 48 horas de incubación. Para mejor interpretación consultar las guías de microfast

3.5.5.5. Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast

- Preparar el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente
- Colocar en un Erlenmeyer con 90 mL de agua de peptona
- Esterilizar en el autoclave por 15 min a 121°C
- Colocar 10 mL de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar (10^{-1})
- Transferir con una pipeta 1 mL de la dilución 10^{-1} en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona (10^{-2})
- Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida ($10^{-3} / 10^{-7}$)
- Rotular las placas microfast respectivamente.
- Colocar el microfast en una superficie plana y levantar el film superior.
- Con la pipeta automática, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, colocar 1000 μ L de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire, por lo que no hay que dejarlo caer.

- Con la ayuda del aplicador y con la cara plana hacia abajo, ejercer suavemente presión para distribuir el inóculo sobre la superficie circular antes de la formación del gel. No se debe girar ni desplazar el aplicador.
- Incubar las placas microfast con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.
- Aerobios mesófilos: Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Proceder a la lectura de las placas de acuerdo con la guía de interpretación

3.5.5.6. Determinación de Staphylococcus aureus mediante la técnica de microfast a partir de la NTE INEN 1529-14

- Preparar el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente
- Colocar en un Erlenmeyer con 90 mL de agua de peptona
- Esterilizar en el autoclave por 15 min a 121°C
- Colocar 10 ml de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar (10^{-1})
- Transferir con una pipeta 1 mL de la dilución 10^{-1} en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de peptona (10^{-2})
- Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida ($10^{-3} / 10^{-7}$)
- Rotular las placas microfast respectivamente.
- Colocar el microfast en una superficie plana y levantar el film superior.
- Con la pipeta automática, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, colocar 1000 μL de muestra en el centro del film inferior.
- Bajar el film superior cuidadosamente evitando la formación de burbujas de aire, por lo que no hay que dejarlo caer.
- Con la ayuda del aplicador y con la cara plana hacia abajo, ejercer suavemente presión para distribuir el inóculo sobre la superficie circular antes de la formación del gel. No se debe girar ni desplazar el aplicador.
- Incubar las placas microfast con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.

3.5.6. Técnica de aislamiento y recuento por sistema de diluciones

Para realizar el recuento de bacterias ácido lácticas se prepara medios de cultivo selectivo MRS y M17 respectivamente

3.5.7. Preparación de medios de cultivo

3.5.7.1. Preparación de agar MRS

La preparación de medios de cultivo se realiza mediante la NTE INEN 1529-1

Procedimiento:

- Pesar 65,13 g en 1000 mL de AGAR MRS (Man, Rogosa y Sharpe)
- Añadir la cantidad calculada en un Erlenmeyer de 500 mL
- Agregar el agua destilada calculados para las cajas Petri
- Esterilizar por 15 minutos en el Autoclave a 121 °C
- Dejar que se enfríe hasta que la palma tolere al calor
- Finalmente, plaquear y conservar

3.5.7.2. Preparación de agar M17

La preparación de medios de cultivo se realiza mediante la NTE INEN 1529-1

Procedimiento

- Pesar 33,25 g en 1000 mL de AGAR M17
- Añadir la cantidad calculada en un Erlenmeyer de 500 mL
- Agregar los mL de agua destilada calculados para las cajas Petri
- Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos
- Enfriar a 45-50°C
- Finalmente, plaquear y conservar

3.5.8. Diluciones

3.5.8.1. Preparación de diluciones

La preparación de diluciones se realiza mediante la NTE INEN 1529-1

Procedimiento:

- Preparar el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente
- Colocar en un Erlenmeyer con 90 mL de agua de peptona
- Esterilizar en el autoclave por 15 min a 121 °C

- Colocar 10 ml de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar (10^{-1})
- Transferir con una pipeta 1 mL de la dilución 10^{-1} en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de peptona (10^{-2})
- Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida ($10^{-3} / 10^{-7}$)

3.5.9. *Siembra y aislamiento de BAL*

La siembra y el aislamiento se realizó mediante la NTE INEN 1529-1

Procedimiento:

- De la muestra de la formulación tomar 10 mL y colocar en un Erlenmeyer, luego homogenizar en 90 mL de solución de peptona
- Preparar diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6})
- Seleccionar las cajas Petri con Agar MRS y M17, sembrar mediante la técnica de superficie con la ayuda de un asa de drigalsky
- Incubar las cajas en posición invertida a 32°C por 48 a 72 horas en condiciones microaerofílicas utilizando el sistema de jarras Gas-Pack

3.5.10. *Pruebas bioquímicas para el aislamiento*

3.5.10.1. *Tinción Gram*

La metodología empleada para la realización de la tinción Gram se la obtuvo del Trabajo de Titulación “Caracterización De Microorganismos Con Actividad Antimicrobiana Provenientes De Suelos De Los Cantones Quito Y Rumiñahui” (Bastidas y Vaca, 2018, p. 31).

Procedimiento:

- Colocar una gota de agua estéril sobre un portaobjetos
- Con ayuda de una asa de siembra recoger una colonia con crecimiento puro y extender en el portaobjeto
- Secar y fijar la colonia con ayuda de un mechero de alcohol
- Colocar cristal violeta sobre la placa durante 1 minutos y enjuagar
- De igual manera aplicar Lugol durante un minuto y enjuagar
- Después, colocar alcohol cetona sobre la placa durante 30 segundos y enjuagar
- Finalmente aplicar safranina por 1 minuto y enjuagar
- Secar al ambiente, colocar una gota de aceite de inmersión y observar con el lente de 100x

3.5.10.2. *Catalasa*

La metodología empleada para la realizar la prueba de catalasa se la obtuvo del Trabajo de Titulación “Agentes contaminantes en superficies de equipos, instrumental y ambiente en la Clínica Odontológica de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja” (Viñan, 2019, p. 75).

Procedimiento:

- Rotular un portaobjetos.
- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Con una pipeta Pasteur colocar una gota de peróxido de hidrogeno sobre la colonia.
- Detectar la formación de burbujas (resultado positivo).
- Anotar el resultado

3.5.10.3. *Oxidasa*

La metodología empleada para la realizar la prueba de oxidasa se la obtuvo del Trabajo de Titulación “Identificación De Microorganismos De Suelos De La Provincia De Pichincha, Con Capacidad De Producir Antibióticos De Amplio Espectro” (Núñez y Sierra, 2018, p. 29).

Procedimiento:

- Colocar el papel con reactivo oxidasa sobre una caja Petri
- Humedecer con unas gotas de agua destilada
- Con ayuda de una asa de siembra tomar la colonia de interés, colocarla sobre el papel y esperar un minuto
- Si el papel se torna purpura el resultado es positivo (+)

3.5.11. *Pruebas de caracterización*

3.5.11.1. *Prueba de movilidad*

La metodología empleada para la realizar la prueba de movilidad se la obtuvo del siguiente Trabajo de Titulación “Evaluación Microbiológica Comparativa Del Queso De Hoja Tradicional Elaborado En Una Planta Industrial Y En Una Artesanal De La Ciudad De Latacunga” (Vargas, 2018, p. 30).

Procedimiento:

- Preparar con anterioridad tubos de ensayo con agar semisólido SIM
- Con ayuda de una aguja de inoculación tomar una colonia pura
- Sembrar en línea recta por punción profunda en el tubo correspondiente abarcando 2 tercios de profundidad
- Incubar a 37°C por 24 horas en condiciones anaeróbicas

3.5.11.2. Producción de CO₂ a partir de glucosa

La metodología empleada para la realizar la prueba de producción de CO₂ a partir de glucosa se la obtuvo del Trabajo de Titulación “Evaluación Microbiológica Comparativa Del Queso De Hoja Tradicional Elaborado En Una Planta Industrial Y En Una Artesanal De La Ciudad De Latacunga” (Vargas, 2018, p. 30).

Procedimiento:

- Suspender 54.8 g de agar Kigler en 1 litro de agua purificada.
- Dejar reposar 5 minutos.
- Calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total.
- Distribuir en tubos, en volumen que ocupe hasta la tercera parte de estos.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar en posición inclinada (pico de flauta profundo)

3.5.11.3. Crecimiento a diferentes temperaturas

La metodología empleada para determinar el crecimiento de cepas de bacterias ácido lácticas a distintas temperaturas se la obtuvo del Trabajo de Titulación “Evaluación Microbiológica Comparativa Del Queso De Hoja Tradicional Elaborado En Una Planta Industrial Y En Una Artesanal De La Ciudad De Latacunga” (Vargas 2018, p. 31).

Procedimiento:

- Colocar 15 mL del Agar MRS o M17 en cajas Petri previamente esterilizadas
- Con ayuda de un asa de inoculación sembrar mediante siembra en estrías
- Incubar a 30°C y 37°C durante 24 horas
- Reportar los resultados

3.5.11.4. Tolerancia a distintos pH

La metodología empleada para determinar el crecimiento de cepas de bacterias ácido lácticas a distintos pH se la obtuvo del Trabajo de Titulación “Evaluación Microbiológica Comparativa Del Queso De Hoja Tradicional Elaborado En Una Planta Industrial Y En Una Artesanal De La Ciudad De Latacunga” (Vargas, 2018, p. 30).

Procedimiento:

- Colocar 15 mL del Agar MRS o M17 en cajas Petri previamente esterilizadas
- Con ayuda de un asa de inoculación sembrar mediante siembra en estrías
- Incubar a pH de 4.4 y 9.6 durante 24 horas
- Reportar los resultados

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

En la investigación se han realizado determinaciones cualitativas y cuantitativas dirigidas a determinar si existe la presencia de bacterias ácido lácticas en la bebida fermentada a base del zumo de guayaba. Para lo cual se efectuaron dos reproducciones para obtener datos representativos.

4.1.1. Análisis proximal de la materia prima

Tabla 4-1: Análisis proximal de la materia prima

DETERMINACIÓN	UNIDAD	CANTIDAD
Humedad	%	82.52 ± 0.8
Ceniza	%	0.79 ± 0.02
Fibra	%	2.16 ± 0.18
Grasa	%	0.66 ± 0.05
Proteína	%	4,33 ± 0.16

Realizado por: Campoverde C., 2023

4.1.1.1. Humedad

La determinación de la humedad es un parámetro de relevancia en la industria alimentaria debido a que la mayoría de los alimentos se encuentran compuestos por una gran cantidad de agua lo cual puede afectar a la vida media del mismo. Según un estudio, la guayaba se categoriza como una fruta con alto contenido de humedad, mediante la caracterizaron de la pulpa de guayaba rosada se obtuvo un valor de humedad de 84,7 %. En base a lo expuesto anteriormente, y demostrando que el valor de humedad obtenido mediante el método por desecación fue de 82,52 %. Por lo que se puede determinar que el contenido de humedad se encuentra acorde al realizado en el estudio anterior (Rojas 2019, p.5).

4.1.1.2. Cenizas

La determinación de las cenizas nos permite conocer la cantidad materia inorgánica de producto (guayaba). Aunque por otro lado también nos pueden ayudar a detectar posibles contaminaciones

metálicas de los alimentos que pueden ocurrir durante el proceso de producción o durante el almacenamiento de productos enlatados (Marqués, 2014, p. 3). Según un estudio, en la determinación de cenizas en diferentes variedades de guayaba se evidenció valores muy relacionados, en lo que corresponde a la guayaba de pulpa rosada se registra un contenido de ceniza del 0.84 %. Por lo expuesto anteriormente, y demostrando que el valor de ceniza obtenido mediante el método de incineración en mufla fue 0,79 %. Se puede determinar que el contenido de ceniza se encuentra relacionado con el del estudio

4.1.1.3. *Fibra*

La ausencia de fibra dietética en la dieta diaria es el factor fundamental de las enfermedades de la civilización como: obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes, diverticulosis entre otra (Paz 2015, p. 3). Según una investigación la composición nutricional de la guayaba se identificó que la guayaba de pulpa rosada contiene un 5.4 % de fibra con lo cual se puede determinar que la guayaba es una excelente fuente de fibra y ayuda a un correcto funcionamiento del metabolismo digestivo. Por lo descrito anteriormente, y demostrando que el valor de fibra obtenido mediante el método de Weende fue de 2,16 %. Por lo que se puede concluir que el contenido de fibra se encuentra en un porcentaje menor a comparación con del estudio, esto puede influenciar debido al método empleado para la determinación

4.1.1.4. *Grasa*

Las frutas y vegetales son alimentos generalmente bajos en grasas en comparaciones a productos de origen animal. En la composición química de la guayaba se identifica que por cada 100 gramos de muestra existe un 0.50 % de grasa. A partir de lo detallado anteriormente, y demostrando que el valor de grasa obtenido mediante el método de *Soxhlet* se obtuvo un valor de 0.66 %. El contenido de grasa se encuentra relacionado al del estudio (Singh 2016, p. 273).

4.1.1.5. *Proteína*

Las principales fuentes de proteínas se encuentran en productos de origen animal. Sin embargo, es muy probable encontrar en frutas proteínas vegetales debido a la tendencia de dietas veganas que hacen lo necesario para encontrar fuentes alternativas de proteínas. En la composición química de la guayaba se identifica que por cada 100 gramos de muestra existe un 4,33 % de proteína. El valor de proteína obtenido mediante el método de *Kjeldahl* se obtuvo un valor de 4,33 %. Por lo que se puede concluir que el contenido de proteína es similar al del estudio (Singh 2016, p. 273).

4.1.2. Análisis físico- químico y microbiológico de las formulaciones

4.1.2.1. Análisis físico-químico

Tabla 4-2: Requisito físico-químicos de las formulaciones

Requisito	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Color	Rosa turbio	Rosa turbio	Rosa turbio
Consistencia	Líquido	Líquido	Espeso
Porcentaje de fruta	30%	40%	50%
pH	4,7	4,75	4,68
Grados Brix	4,65	5,80	6,74

Realizado por: Campoverde C., 2023

Los resultados para los requisitos físico-químicos de las tres formulaciones a base de guayaba presentes en la tabla 8-4 fueron comparados con la NTE INEN 2337: 2008 Jugos, pulpas, concentrados, nectares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos. En los cuales se tomó en cuenta que el porcentaje de frutas en las tres formulaciones no debía ser inferior a 10% de fruta obtenido formulaciones con 30, 40 y 50% de pulpa, debido al empleo de la guayaba de pulpa rosa las tres formulación tuvieron el color característico de la fruta, su consistencia fue aumentado de acuerdo con el porcentaje de fruta que contenía cada formulación y las características sensoriales fueron propias de la fruta de la que provenían.

En cuanto al pH de la bebida se logró percatar que tanto la formulación 1 y 2 tenían un pH similar de 4,7 y 4,75 a diferencia de la formulación 3 con pH 4,68 según la normativa el pH debe ser inferior a 4,5 pero esto se debe a que la pulpa perteneciente a la guayaba es acida y como no contiene un acidificante no va a estabilizarse. Finalmente, la normativa manifiesta que los grados brix de la bebida serán proporcionales al contenido de fruta misma acción que se cumplía como se puede evidenciar en la tabla ya que a medida que aumenta el porcentaje de fruta aumentan los grados brix.

4.1.2.2. Análisis microbiológico

Tabla 4-3: Análisis microbiológico de las formulaciones

Determinación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Nivel de Aceptación	NTE INEN
Coliformes NMP/cm ³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 3	NTE INEN 1529-6

Coliformes fecales NMP/cm³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 3	NTE INEN 1529-8
Recuento estándar en placa REP UFC/cm³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 10	NTE INEN 1529-5
Recuento de mohos y levaduras UPC/cm³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 10	NTE INEN 1529-10

Realizado por: Campoverde C., 2023

Los resultados para el análisis microbiológico se muestran en la tabla 9-4, los cuales fueron comparados con la NTE INEN 2337: 2008 Jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos. Los resultados obtenidos para coliformes, coliformes fecales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras presentaron un ausencia en las tres formulaciones. Por lo que se concluye que el producto fue preparado de la mejor manera higiénica lo cual garantiza que puede ser consumido de una forma segura.

4.1.3. Análisis físico-químico y microbiológico de las formulaciones durante de la fermentación

4.1.3.1. Determinación de pH

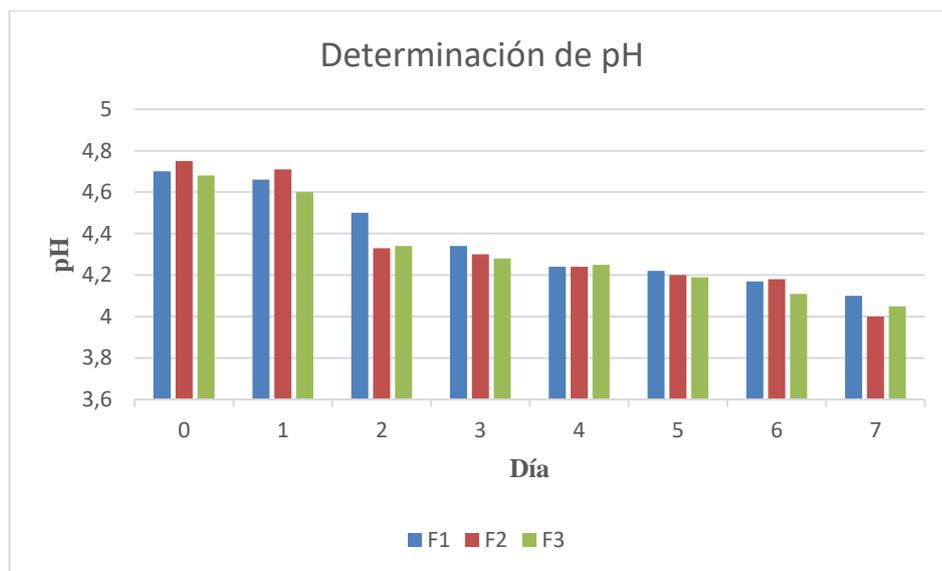


Ilustración 4-1: Evaluación de pH

Realizado por: Campoverde C., 2023

El valor del pH es la medida más significativas que se utilizan para indicar el progreso del proceso de fermentación. Este parámetro detecta la presencia de factores químicos específicos que afectan al metabolismo, crecimiento y el producto final. El control del pH es importante en la fermentación, ya que influye no únicamente en el crecimiento de microorganismos, sino también en su actividad metabólica. El pH de una bebida al transcurrir 24 horas de fermentación a una temperatura determinada debería estar entre 4.0 - 4.5. Si es más alta, hay que dejarla fermentar otras 12 horas. La importancia de que el pH sea inferior a 4.6 es la poca posibilidad de proliferación de microorganismos patógenos, una vez que el valor del pH se encuentre por debajo se puede culminar la fermentación antes o después dependiendo del sabor del producto (Prieto 2022, p.1).

En base a lo expuesto anteriormente y demostrando que el pH obtenido al final del proceso de fermentación fue de 4.10 (formulación 1), 4.00 (formulación 2) y 4.05 (formulación 3) se garantiza que el proceso de fermentación ácida ha culminado y el pH se encuentra óptimo para la proliferación de microorganismos benéficos.

4.1.3.2. Determinación del índice de acidez

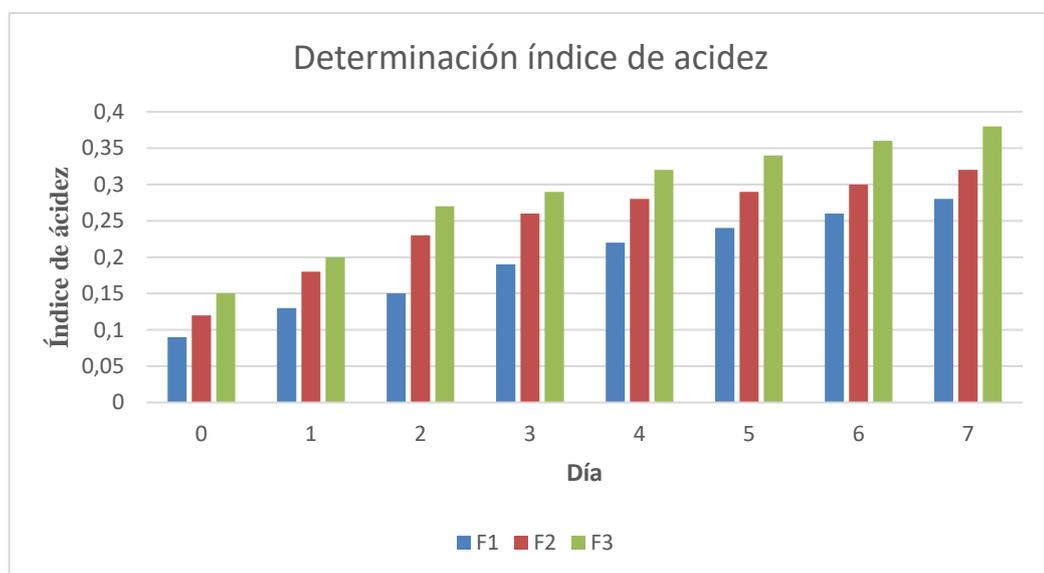


Ilustración 4-2: Evaluación de índice de acidez

Realizado por: Campoverde C., 2023

La determinación del índice de acidez permite conocer el volumen de hidróxido de sodio (NaOH) necesario para que el ácido contenido en una alícuota analizada sea neutralizado. Por lo manifestado con anterioridad se puede concluir que en el proceso de fermentación a medida que

disminuye el pH el volumen de la base hidróxido de sodio necesario para neutralizar será mayor en las tres formulaciones (Plaza y Sung 2011, p. 28).

4.1.3.3. Determinación de sólidos solubles

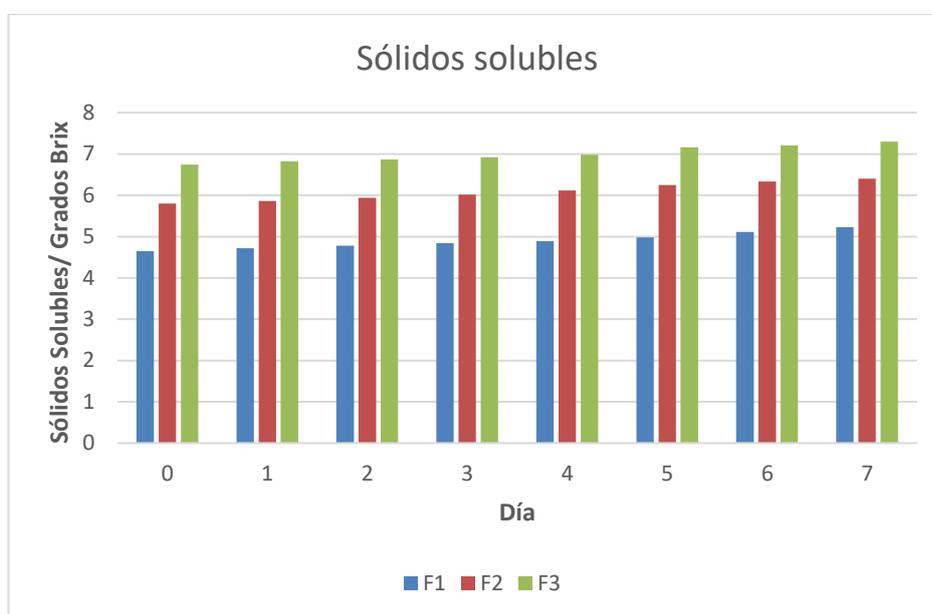


Ilustración 4-3: Evaluación de sólidos solubles

Realizado por: Campoverde C., 2023

4.1.4. Análisis físico- químico y microbiológico de las formulaciones post-fermentación

4.1.4.1. Análisis físico-químico

Tabla 4-4: Características Fisicoquímicos de bebidas fermentadas

Requisito	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Color	Rosa turbio	Rosa turbio	Rosa turbio
Sabor	Fermentado	Fermentado	Fermentado
Índice de acidez	0,28	0,32	0,38
pH	4,1	4	4,05
Grados Brix	5,23	6,4	7,3

Realizado por: Campoverde C., 2023

En la tabla 10-4 se puede apreciar las características físico químicas y organolépticas de las tres formulaciones sometidas a la fermentación. En una investigación de propiedades fisicoquímicas y parámetros microbiológicos de una bebida fermentada a base de *Annona cherimola* se determinaron parámetros fisicoquímicos como acidez titulable, pH y grados brix los cuales fueron

comparados con los parámetros obtenidos del análisis de las formulaciones a base de *Psidium guajava* mismo que se encuentran relacionados con los del estudio mencionado (Enríquez 2021, p. 9).

4.1.4.2. Determinación de indicadores de calidad

Tabla 4-5: Determinación de indicadores de calidad microbiológica

Determinación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Nivel de Aceptación	NTE INEN
Coliformes NMP/cm³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/cm³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NTE INEN 1529-8
Aerobios mesófilos	6	5	6	< 10	NTE INEN 1529-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	NTE INEN 1529-14

Realizado por: Campoverde C., 2023

En la tabla 11-4 se puede evidenciar el análisis microbiológico de la bebidas posterior al proceso de fermentación. Debido a que no existe una normativa específica para poder realizar un análisis de los requisitos físicos, químicos y microbiológicos en bebidas fermentadas a base de frutas, se realiza la determinación de indicadores de calidad como son las bacterias: *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, fecales y aerobios mesófilos empleando normativas técnicas ecuatorianas (NTE INEN) que son específicas para el análisis de dichos indicadores de calidad.

Los indicadores de calidad alimentaria son microorganismos que advierten de contaminación o un manejo inadecuado durante el proceso de fabricación. Por lo detallado anteriormente estos indicadores son de vital importancia ya influyen en la conservación, vida útil y sobre todo garantiza que la población evite sufrir enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) al consumir productos que cuenten con un excelente control de calidad microbiológico (Fuentes et al. 2014, p. 1).

4.1.5. Aceptabilidad de las formulaciones

4.1.5.1. Resultado de aceptabilidad

Las tres formulaciones empleadas para la elaboración de las bebidas fermentadas a base de zumo de *Psidium guajava* F1 (30% Pulpa y 70 Agua), F2 (40% Pulpa y 60% Agua) y F3 (50% Pulpa y 50% Agua), fueron evaluadas mediante prueba hedónica, con la finalidad de determinar cuál de ellas tendría mejor aceptabilidad, para ello participaron 50 estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia. Los resultados se observan en la tabla 12-4.

Tabla 4-6: Resultado obtenido de las encuestas de aceptabilidad mediante la escala hedónica

Puntuación	F1	F2	F3
Odie			
No me gusto	20	5	9
Indiferente	18	10	15
Me gusto	10	30	20
Me Encanto	2	5	6

Realizado por: Campoverde C., 2023

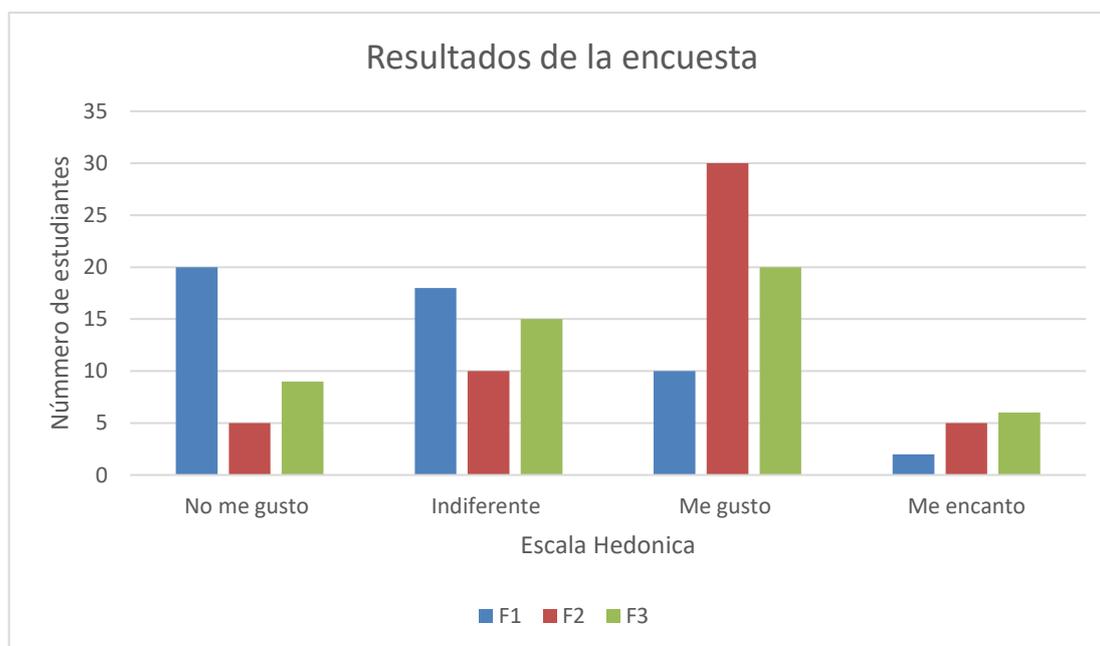


Ilustración 4-4: Elección según la aceptación de las formulaciones a base zumo de guayaba

Realizado por: Campoverde C., 2023

De la tabla 12-4 se extrae los datos finales de las encuestas realizadas a los estudiantes de la Facultad de Ciencias. Estos datos se tabularon mediante el uso del paquete informativo Excel y obtuvo la Ilustración 10-4. Siendo así la barra más representativa la formulación 2 compuesta de 40% de pulpa de guayaba y 60% de agua con una puntuación de aceptabilidad de 30 puntos del total de personas encuestadas. Seguidamente de la formulación 3 compuestas por 50% de pulpa de guayaba y 50% de agua con una puntuación de aceptabilidad de 20 puntos del total de encuestados.

Finalmente se aprecia a la formulación 1 compuesta por 30% de pulpa de guaya y 70% de agua con 10 puntos de aceptabilidad del total de encuestados. Gráficamente se puede evidenciar que la F2 es aquella con mayor aceptabilidad por las personas encuestadas. Por lo cual es la bebida seleccionada para realizar los análisis microbiológicos y bioquímicos para identificar la presencia de bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica planteada en la investigación.

4.1.6. Aislamiento y selección de cepas bacterianas

Una vez ejecutada la primera selección de cepas bacterianas se procedió a la purificación y posterior aislamiento y selección de las colonias de bacterias ácido lácticas presentes en los medios de cultivo MRS y M17 a partir de pruebas bioquímicas de identificación. Los resultados se encuentran en las tablas 12-4 y 13-4.

Tabla 4-7: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido lácticas en agar M17

N°	Código	Morfología Microscópica	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
1	Col 1	Cocos	Pos	Pos	Neg
2	Col 2	Cocos	Pos	Neg	Neg
3	Col 3	Cocos	Pos	Neg	Neg
4	Col 4	Cocos	Pos	Neg	Neg
5	Col 5	Cocos	Pos	Neg	Neg
6	Col 6	Cocos	Pos	Neg	Neg
7	Col 7	Cocos	Pos	Pos	Neg
8	Col 8	Cocos	Pos	Neg	Neg
9	Col 9	Cocos	Pos	Neg	Neg
10	Col 10	Cocos	Pos	Neg	Neg
11	Col 11	Cocos	Pos	Neg	Neg
12	Col 12	Cocos	Pos	Neg	Neg
13	Col 13	Cocos	Pos	Neg	Neg
14	Col 14	Cocos	Pos	Neg	Neg
15	Col 15	Cocos	Pos	Pos	Neg

Col: Codificación empleada para delimitar seguido del número de colonia analizada

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Campoverde C., 2023

Tabla 4-8: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido lácticas en agar MRS

N°	Código	Morfología Microscópica	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
1	Col 1	Bacilos	Pos	Neg	Neg
2	Col 2	Bacilos	Pos	Neg	Neg
3	Col 3	Bacilos	Pos	Neg	Neg
4	Col 4	Bacilos	Pos	Neg	Neg
5	Col 5	Bacilos	Pos	Neg	Neg
6	Col 6	Bacilos	Pos	Neg	Neg
7	Col 7	Bacilos	Pos	Neg	Pos
8	Col 8	Bacilos	Pos	Pos	Neg
9	Col 9	Bacilos	Pos	Pos	Neg
10	Col 10	Bacilos	Pos	Neg	Neg
11	Col 11	Bacilos	Pos	Pos	Neg
12	Col 12	Bacilos	Pos	Pos	Neg
13	Col 13	Bacilos	Pos	Neg	Neg
14	Col 14	Bacilos	Pos	Neg	Pos
15	Col 15	Bacilos	Pos	Pos	Neg

Col: Codificación empleada para delimitar seguido del número de colonia analizada

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Campoverde C., 2023

Como se puede evidenciar en las tablas 12-4 y 13-4 pertenecientes a las bacterias que se tendieron a crecer en medios de cultivos MRS y M17. Una vez realizada la purificación posterior a su aislamiento se procede a realizar pruebas bioquímicas como: tinción Gram, Catalasa y Oxidasa de las cuales de las 15 colonias que se desarrollaron en agar M17 12, de ellas cumplían con ser catalasa y oxidasa negativas y Gram positivos.

Por otro lado, de las 15 colonias que se desarrollaron en agar MRS solo 8 de estas cumplían con características de catalasa y oxidasa negativa y Gram positivos. Las BAL constituyen un grupo heterogéneo de microorganismo que se caracterizan por la producción de ácido láctico, son bacilos o cocos Gram positivos, oxidasa y catalasa negativa (Hernández et al 2020, p. 4).

4.1.7. Pruebas de caracterización de BAL

En las tablas 14-4 y 15-4, se encuentran los resultados de pruebas de movilidad y producción de CO₂, además de los crecimientos en diferentes condiciones de temperatura y pH, tanto para bacilos como en cocos aislados.

Tabla 4-9: Pruebas de caracterización en agar M17

N°	Código	Movilidad	Producción de CO ₂ a partir de glucosa	Crecimiento a distintas temperaturas		Tolerancia a diferentes pH	
				30°C	37°C	4.4	9.6
1	CO 2	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
2	CO 3	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
3	CO 4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
4	CO 5	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
5	CO 6	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
6	CO 8	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
7	CO 9	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
8	CO 10	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
9	CO 11	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
10	CO 12	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
11	CO 13	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
12	CO 14	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos

CO: Codificación empleada para delimitar colonia de cocos seguido del número de colonia analizada

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Campoverde C., 2023

Una vez realizada las pruebas bioquímicas para la identificación del total de las cepas aisladas en el medio M17 como BAL se seleccionaron 12 colonias y se procedió a realizar las pruebas de caracterización siendo estas movilidad, producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento a diferentes valores de pH y temperatura. En cuanto a la prueba de movilidad todas las colonias no presentaron movilidad alguna en agar SIM lo que se puede comparar en el trabajo donde esto se debe a que las BAL son incapaces difundir en el medio semisólido SIM debido a la ausencia en BAL de flagelo o al gen que lo codifique (Fiallos 2022, p. 24).

En cuanto a la prueba de producción de CO₂ a partir de glucosa ninguna de las 12 colonias seleccionadas presentó la producción de gas dando un resultado negativo con lo cual se puede determinar que son homofermentativas. Sin embargo, existió cambio de coloración en el medio en la que se pudo evidenciar que de las 12 colonias 5 de ellas fermentaron glucosa, mientras el resto de las colonias fermentó glucosa y lactosa. En un estudio se manifiesta que la capacidad fermentativa se puede ver dividida fisiológicamente por grupos dependiendo de la ruta metabólica empleada para fermentar la glucosa. Las bacterias homofermentativas se caracterizan por la producción de ácido láctico mediante la ruta metabólica de la glucólisis mientras que las heterofermentativas que caracterizan por producción de ácido láctico mediante la ruta metabólica de la d-galactosa (Ramírez y Vélez, 2018, p. 120).

En la prueba de tolerancia a distintas temperaturas, las cepas aisladas de agar M17 fueron sometidas a distintas temperatura con la finalidad de evaluar el crecimiento de estas. Las colonias seleccionadas fueron sometidas a temperaturas de 30°C y 37°C en la cual se pudo identificar que las colonias tenían crecimiento en ambas temperaturas con la única peculiaridad de que empleaban más tiempo para su crecimiento.

El crecimiento en la estufa calibrada con una temperatura de 37°C se pudo evidenciar a las 24 horas posterior a su incubación, mientras que el crecimiento en la estufa a 30°C demoró entre las 72 horas. Según una investigación se menciona que las BAL pueden desarrollar diversos mecanismos adaptativos a los cambios abruptos de temperatura. Un mecanismo característico es la producción de proteínas de choque térmico lo cual le brinda adaptaciones que garanticen la supervivencia de la colonia (Doyle 2016, pp: 56-91).

Las cepas aisladas del medio de M17 también fueron analizadas frente a distintas condiciones de pH con la finalidad de garantizar la tolerancia a un pH de 9,6 y 4,4. El resultado obtenido fue que de las 12 colonias seleccionadas todas crecieron a un pH de 4,4 mientras que las que fueron sometidas a un pH básico de 9,6 de las 12 cepas 9 crecieron perfectamente a excepción de las colonias con las codificación CO5, CO8 y CO9.

Esto es corroborado con los resultados obtenidos en un estudio donde manifiesta que el crecimiento de BAL a un pH ácido es variable mientras que a un pH básico es decir de 9,6 de desarrollan las cepas de bacterias ácido lácticas a excepción de aquellas que pertenecen al género *Lactococcus* las cuales no toleran estas condiciones (Vargas 2018, p. 47).

Tabla 4-10: Pruebas de caracterización en agar MRS

N°	Código	Movilidad	Producción de CO ₂ a partir de glucosa	Crecimiento a distintas temperaturas		Tolerancia a diferentes pH	
				30°C	37°C	4.4	9.6
1	BA 1	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
2	BA 2	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
3	BA 3	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
4	BA 4	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
5	BA 5	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
6	BA 6	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
7	BA 10	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos
8	BA 13	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos

CO: Codificación empleada para delimitar colonia de cocos seguido del número de colonia analizada

Pos: Indica un resultado positivo en la prueba

Neg: Indica un resultado negativo en la prueba

Realizado por: Campoverde C., 2023

Una vez realizada las pruebas bioquímicas para la identificación del total de las cepas aisladas en el medio MRS como BAL se seleccionaron 8 colonias y se procedió a realizar las pruebas de caracterización siendo estas movilidad, producción de CO₂ a partir de glucosa, crecimiento a diferentes valores de pH y temperatura.

En la prueba de movilidad se puede evidenciar que de las 8 colonias seleccionadas del medio de cultivo MRS todas carecen de movilidad lo cual se puede confirmar con el trabajo en cual manifiesta que el género *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas, forma bacilar, no formadoras de esporas, catalasa negativa y no móviles. Su principal característica es la formación de ácido láctico como producto principal (Cobos y Pulla, 2019, p. 9).

En cuanto a la prueba de producción de CO₂ a partir de glucosa, todas las 8 colonias del medio MRS seleccionadas arrojaron un resultado negativo por lo que se puede concluir que se tratan de BAL homofermentativas. pero también se pudieron notar diferencias durante la realización de la prueba ya que la colonia BA5, BA13 fermentaron lactosa. En un estudio se indica que las bacterias ácido lácticas se subdividen en bacterias homofermentativas y heterofermentativas como resultado de los productos de su metabolismo las primeras se caracterizan ya que mediante su fermentación de los carbohidratos generan como principal producto ácido láctico mientras que

las heterofermentativas pueden originar otros productos como dióxido de carbono, ácido acético o etanol (Sánchez y Tromps, 2014, p. 124).

En la prueba de tolerancia a distintas temperaturas, las cepas seleccionadas del medio de cultivo MRS fueron sometidas a distintas temperaturas con la finalidad de evaluar el crecimiento de estas. Las colonias seleccionadas fueron sometidas a temperaturas de 30°C y 37°C en la cual se pudo identificar que las colonias tenían crecimiento en ambas temperaturas con la única peculiaridad de que empleaban más tiempo para su crecimiento. El crecimiento a 37°C se pudo evidenciar posterior a 48 horas de iniciar la incubación lo cual se encuentra establecido en las indicaciones del frasco del medio de cultivo. Por otro lado, la incubación a una temperatura de 30°C se pudo evidenciar a las 96 horas posterior a la incubación. Estos resultados fueron comparados y demostrados con el estudio en el cual se evaluaron bacterias ácido lácticas aislados de muestras de quesos y sus resultados fueron positivos en el crecimiento de colonias tanto de cocos como bacilos distintas temperaturas lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación (Vargas 2019, p. 49).

Finalmente, las colonias seleccionadas del medio de cultivo MRS fueron sometidas al crecimiento a distintos pH siendo estos pH de 4,4 y 9,6. Dando como resultado que de las 8 colonias seleccionadas todas las 8 crecieron a un pH ácido mientras que en el pH alcalino las colonias codificadas BA1 y BA5 no presentaron crecimiento. Estos resultados coincidieron con los proporcionados en el trabajo donde analizaron cepas aislada de muestras de queso en la cual existo mayor crecimiento en un pH ácido a comparación de un pH alcalino (Vargas 2019, p. 44).

Mediante la realización de estas pruebas se puede determinar que de las 15 colonias analizadas 9 podrían tratarse de bacterias del género *Lactococcus plantarum* mientras que 6 de estas colonias podrían tratarse presumiblemente de *Lactobacillus plantarum*. En la cual se menciona que el género *Lactobacillus* tienen un metabolismo fermentativo, son mayoritariamente aerotolerantes mientras que otras especies son estrictamente anaeróbicas. El crecimiento se da a un pH de 4,5-5,8. Son exigentes en cuanto a metabolitos primarios y se pueden clasificar en homolácticos y heterolácticas con base en la vía de fermentación que utilizan.

Cabe reiterar que estas pruebas no permiten descartar ninguna de las colonias ya que son pruebas para tratar de identificar a que genero pertenece la colonia, pero esto es complejo en el caso de las bacterias ácido lácticas (Vargas 2018, p. 44). Las BAL comparten muchas de estas características y en además algunos de sus perfiles de tolerancia son variables por lo tanto estas pruebas no nos permiten una caracterización certera de las bacterias evaluadas.

CONCLUSIONES

- Se realizó el análisis proximal de la materia prima para la elaboración de bebidas, en este caso *Psidium guajava* (guayaba), donde se llegó a la conclusión que la fruta posee un 82,52% de humedad, 0,79% de cenizas, 4,33% de proteína, 0,66% de grasa, 2,16% de fibra y 9,53 % de azúcares, lo cual la convierte en una fruta ideal para la elaboración de bebidas funcionales a base de la fruta y con un excelente aporte de nutrientes para el consumo humano
- Se elaboró y ensayó tres formulaciones de bebidas a base de zumo de *Psidium guajava* las cuales tenían una composición de 30, 40 y 50 % de fruta. Estas bebidas fueron sometidas a un análisis físico, químico y microbiológico según la normativa técnica ecuatoriana NTE INEN 2337 para posteriormente ser llevadas a un proceso de fermentación espontánea durante 7 días a una temperatura de 35 °C sin necesidad de inocular ningún tipo de microorganismos.
- Se determinó las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de la formulación 2, la cual fue la bebida seleccionada por los catadores mediante la prueba hedónica. Empleando métodos sensorial, potenciométrico, volumétrico y refractométrico. Finalmente se realizó la determinación de los indicadores de calidad mediante las Normativas Técnicas Ecuatorianas establecidas para cada microorganismo.
- Se aislaron las cepas de bacterias ácido lácticas presentes en la bebida elaborada a base de zumo de *Psidium guajava* mediante la técnica de siembra por extensión y purificación de las cuales según su morfología y crecimiento en agar selectivo M17 para cocos y agar MRS para bacilos, permitió seleccionar 15 aislamientos de cocos y 15 aislamiento de bacilos para posterior análisis e identificación. En cuanto a los ensayos de identificación se emplearon pruebas bioquímicas propias de bacterias ácido lácticas, donde se seleccionaron 12 *Lactococcus* en agar M17 y 8 *Lactobacillus* en agar MRS, que cumplieron con la morfología microscópica de BAL, es decir bacilos o cocos Gram +, catalasa y oxidasa negativa. Finalmente fueron sometidas a pruebas de caracterización como ensayos de movilidad, producción de CO₂ a partir de glucosa y crecimiento a distinto pH y temperatura.

RECOMENDACIONES

- En el ensayo de fermentación se determinó hasta un llegar a un tiempo de 168 horas y se obtuvo resultados placenteros pero este tiempo aún no se determinó como el tiempo final de la actividad de BAL por lo que sería interesante aumentar el tiempo de fermentación y determinar cuál es el alcance que podría tener
- Complementar la identificación de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de muestras de bebidas fermentadas a base de frutas mediante técnicas moleculares para la determinación de las especies de bacterias ácido lácticas.
- Avivar la continuidad de la investigación realizando estudios posteriores de una mayor evaluación in vitro, donde estas cepas de BAL podrían emplearse a futuro como posibles candidatas a probióticos con aplicación en la industria alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. **BASTIDAS, y VACA, J.** *Caracterización De Microorganismos Con Actividad Antimicrobiana Provenientes De Suelos De Los Cantones Quito Y Rumiñahui*. [en línea]. 2018. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16074/1/UPS-QT13247.pdf>
2. **BURINI, J et al.** *Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing*". *Revista Argentina de Microbiología* [en línea] 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>.
3. **CABEZAS, M.** *Evaluación de la Capacidad de Colonización Intestinal de un Lactobacillus sp Proveniente de un Fermento Comercial*. [en línea] 2018. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/929>
4. **CAMARGO, E y QUIRÓZ, K.** *Estudio bromatológico de cuatro variables de guayaba (Psidium guajava) localizadas en la Provincia de Chiriquí*". *Revista Plus Economía*. [en línea], [en línea] 2022. Disponible en: <https://jadimike.unachi.ac.pa/bitstream/handle/123456789/749/Plus%20Eco.%20Vol.10%20N.2%20CAMARGO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. **CASTAÑEDA, C.** *Actualización en prebióticos*. *Revista Cubana de Pediatría*. [en línea], 2018. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubped/cup-2018/cup184h.pdf>
6. **CASTRO, W et al.** *Probióticos extraídos de fuente vegetal y animal*". *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*. [en línea] 2022. Disponible en: <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icap/issue/archive>
7. **COBOS, E y TAPIA, H.** *Caracterización de bacterias ácido-lácticas a partir de leche bovina del cantón Cayambe con potencial probiótico en animales*. [en línea] 2019. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16555/4/UPS-QT13597.pdf>
8. **CONTERO, V.** *Evaluación Higiénico – Sanitaria De La Quesera Artesanal Cod.Q4 Ubicada En La Parroquia Químiag, Cantón Riobamba, Provincia De Chimborazo*. [en línea]. 2017. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6792/1/56T00721.PDF>
9. **DA CUNHA, D et al.** *Métodos para aplicar las pruebas de aceptación para la alimentación escolar: validación de la tarjeta lúdica*". *Revista Chilena de Nutrición* [en línea]. 2013. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46929416005>

10. **DE LA CRUZ, A. y TERÁN, A.** *Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1785/3/AGI-2013-T012.pdf>.
11. **DEL CAMPO, R et al.** *Microbiota en la salud humana: Técnicas de caracterización y transferencia.* *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* [en línea], 2018, Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>
12. **DOYLE, M.** *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria.* New York: Springer, 2016, pp: 55-92.
13. **ENRÍQUEZ, M.** *Caracterización Físicoquímica Y Microbiológica De Una Bebida Fermentada De (Annona cherimola) Dulce Y Seca.* *FABICID.* [en línea], 2021. Disponible en: [10.14409/fabicib.v24i0.10744](https://doi.org/10.14409/fabicib.v24i0.10744)
14. **ESPÍN, S.** *Aislamiento, Identificación Y Caracterización De Microorganismos De Interés Industrial Y Ambiental Para Crear Un Cepario De La Facultad De Ingeniería Y Ciencias Aplicadas (Fica) De La Universidad Internacional SEK* [en línea]. 2021. Disponible en: <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4509/1/Esp%C3%ADn%20Osorio%20Samia%20Mishell.pdf>
15. **FAJARDO, A et al.** *Morphological and biochemical characterization of guava (Psidium guajava L.) types collected in Sumapaz.* *Revista Fitotécnica Mexicana.* 2019.
16. **FAY, F y ZUMBADO, H.** *Análisis proximal en alimentos Fundamentos teóricos y técnicas experimentales* [en línea]. 2019. Disponible en: <http://colloquiumbiblioteca.com/index.php/web/article/view/43>
17. **FIALLOS, H.** *Caracterización Y Susceptibilidad Antimicrobiana De Bacterias Ácido Lácticas Recuperadas De Lactosuero En La Cooperativa De Producción De Leche "Chuquipogyo" Del Quinual-La Merced Parroquia San Andrés.* [en línea]. 2022. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17408>
18. **FUENTES, L et al.** *Indicadores microbiológicos en alimentos.* [en línea]. 2017. Disponible en: https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/indicadores_microbiologicos_en_alimentos_0.pdf

19. **GALLARDO, A.** *Evaluar si la ingesta de probióticos puede disminuir el riesgo de padecer cáncer de colon* [en línea]. 2018. Disponible en: https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/150688/Gallardo_Ledo_Ainhoa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
20. **GUALLICHICO, R.** *Investigación de las características fisicoquímicas y nutricionales de la especie *Psidium guajava* L. (guayaba) de las variedades latinoamericanas de mayor exportación* [en línea]. 2022. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/26161>
21. **GUAMÁN, M.** *Yogurt Tipo I Con Una Sustitución Parcial Utilizando Leche De Coco (*Cocos nucifera* L.)* [en línea]. 2021. Disponible en: <http://dspace.espe.edu.ec/bitstream/123456789/15549/1/27T00502.pdf>
22. **GUEVARA, K.** *Influencia De Las Condiciones De Expendio Sobre La Calidad Microbiológica De Ceviches De Chochos Comercializados En La Parroquia Lizarzaburu Riobamba* [en línea]. 2021. Disponible en: <http://dspace.espe.edu.ec/bitstream/123456789/14735/1/56T00968.pdf>
23. **HERNÁNDEZ, J et al.** *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de abejas adultas *Apis mellifera** *Revista de Salud Animal*. [en línea], 2021. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v42n2/2224-4700-rsa-42-02-e07.pdf>
24. **JARDO, M et al.** *Probióticos En Matrices De Origen Vegetal: Terminología, Cepas, Técnicas De Vehiculización Y Salud. Revista Nutrición Investiga*. [en línea], 2021. Disponible en: http://escuelanutricion.fmed.uba.ar/revistani/pdf/21b/rb/938_c.pdf
25. **JURADO, H et al.** *Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Revista de Veterinaria y Zootecnia*. [en línea], 2013,. Disponible en: <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v7n2a03.pdf>
26. **LATORRE, I.** *Caracterización Bioquímica Y Tecnológica De Cepas De Ácido Lácticas Aisladas De Leche Cruda De Oveja En El Proceso De Elaboración De Queso Artesano De Teruel*. 2022.
27. **LÓPEZ, E et al.** *Análisis de componentes principales aplicado a la fermentación alcohólica*”. *Revista Científica de la UCSA*. [en línea], 2019. Disponible en: 10.18004/ucsa/2409-8752/2019.006.02.011-019
28. **LÓPEZ, J.** *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (*mucílago*), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*)* [en línea]. 2021. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25894/1/T-ESPESD-003144.pdf>

29. **MARIÑO, A; et al.** *Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. Pediatría Integral.* [en línea], 2018. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/actamedica/acm-2016/acm161g.pdf>.
30. **MARIÑO, E; et al.** *Probióticos y Prebióticos. Rol en la Terapéutica de la Enfermedad Diarreica Aguda Infantil. International Journal of Morphology.* [en línea], 2021. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v39n1/0717-9502-ijmorphol-39-01-294.pdf>
31. **MSP.** *Enfermedades Transmitidas por Aguas o Alimentos.* [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/03/Etas-SE-11.pdf>
32. **NAULA, M.** *Elaboración Y Valoración Nutricional De Pan A Base De Harina De Trigo (Triticum Aestivum) Y Almidón De Achira (Canna Indica), Fortificada Con Suero De Leche* [en línea]. 2016. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/handle/123456789/4954>
33. **OBANDO, D y VALERA, M.** *Estudio y Análisis del tampoi (Baccaurea Macrocarpa), y desarrollo de una propuesta culinaria en la ciudad de Guayaquil.* [en línea]. 2020. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/51347/1/BINGQ-GS-20P70.pdf>
34. **OMS.** *Enfermedades No Transmisibles (ENT).* [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
35. **OROZCO, F.** *Producción de ácido láctico por medio de fermentación anaerobia y su polimerización a partir de reacción de apertura de anillo* [en línea]. 2021. Disponible en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/1333/1/PMP_M_Tesis_2011_Fatima_Orozco_Olivarez.pdf
36. **ORTEGA, A.** *Análisis proximal y evaluación de la actividad antioxidante de semillas de la especie Inga densiflora Benth* [en línea]. 2020. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/21956>
37. **PARRA, R.** *Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. BIO-AGRO* [en línea], 2010. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.
38. **PAZ, M.** *Determinación Del Contenido De Fibra Dietética En Dos Variedades De Piña (Golden sweet y Ananás comosus) Considerando El Estado Fisiológico Y Las Condiciones Agroecologicas.* [en línea]. 2015. Disponible en: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/T-UTEQ-0034.pdf>

39. **PÉREZ, E et al.** *Flavonoides en frutos de guayabo criolla roja (Psidium guajava L.)*". *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. [en línea]. 2019. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/34916/36891>
40. **PLAZA, V.** *Determinación de alcohol, acidez y azúcares en bebidas alcohólicas mediante espectroscopia infrarroja* [en línea]. 2011. Disponible en: <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/5691/1/08459.pdf>
41. **RAMÍREZ, J et al.** *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*" *Revista Fuente Año* [en línea]. 2011. Disponible en: [http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias lácticas%2C Importancia en alimentos y sus efectos en la salud.pdf](http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias_lácticas%2C_Importancia_en_alimentos_y_sus_efectos_en_la_salud.pdf).
42. **RAMÍREZ, C y VÉLEZ, J.** *Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra Importancia Tecnológica*. 2016.
43. **RAPPACCIOLI, R et al.** *Probióticos: desafíos, revisión y alcance*. *Revista Médica Sinergia*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.31434/rms.v6i6.686>
44. **REBELLO, Á et al.** *Lactococcus lactis autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo*. *Latu* [en línea], 2016. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/6061/606163652005/html/>
45. **RODRÍGUEZ, P. Y ARENAS, R.** *Hans Christian Gram Y Su Tinción*". *Revista de Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. [en Línea]. 2018. Disponible En: <https://Www.Medigraphics.Com/Pdfs/Cosmetica/Dcm-2018/Dcm182n.Pdf.%0d>
46. **RODRÍGUEZ, C et al.** *Avances En El Estudio De La Bioactividad Multifuncional Del Kéfir*". *Asociación Interciencia*. [en Línea]. 2017. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621003.pdf>
47. **RODRÍGUEZ, V. y ZUMBA, D.** *Influencia De Tres Variedades De Col (Brassica Oleracea) En La Elaboración De Chucrut*. *Revista Ciencia Ecuatoriana*. 2022.
48. **ROJAS, C et al.** *Characterization of Phytochemicals in Costa Rican guava (Psidium friedrichsthalianum -Nied.) Fruit and Stability of Main Compounds During Juice Processing - (U)HPLC-DAD-ESI-TQD-MSn*, *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018.

49. **SAMANIEGO, K.** *Efecto de la adición de pulpa de morete (*Mauritia flexuosa* L. f.) en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del dulce de guayaba* [en línea]. 2019. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/30552>
50. **SÁNCHEZ, A et al.** *Efectividad de probióticos sobre síntomas, histología y tolerancia alimentaria en colitis ulcerativa. Revista Medica del Instituto Mexicano de Seguro Social.* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2019/im191d.pdf>
51. **SÁNCHEZ, J.** *Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto* [en línea]. 2019. Disponible en: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10767/Sanchez_dj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
52. **SANCHÉZ, L y TROMPS, J.** *Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. Salud Animal* [en línea], 2014. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2014000200008
53. **SANTOS, J.** *Bacterias gram positivas: Staphylococcus y Streptococcus* [en línea]. 2021. Disponible en: <https://es.slideshare.net/jsantossantana/estafilococos-y-estreptococos>.
54. **SERVICIO NACIONAL DE INSPECCIÓN Y CERTIFICACIÓN DE SEMILLAS.** *Generalidades de la red Guayaba.* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/guayaba-psidium-guajava-l>
55. **SINGH, K. B.** *Guavas. En Encyclopedia of Food and Health* 2016.
56. **TIPÁN, M et al.** *Diseño Y Construcción De Un Prototipo De Pasteurizadora Para El Procesamiento De 50 Litros De Leche/Hora* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15180/4/UPS-KT01484.pdf>
57. **TRUJILLO, Y.** *Determinación de la calidad nutritiva de un crepe elaborado a base de harina de amaranto fortificado con harina de arroz para la población con enfermedad celíaca* [en línea]. 2022. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17379>
58. **ULPGC.** *Pruebas bioquímicas de identificación de bacterias* [en línea]. 2022. Disponible en: https://www2.ulpgc.es/hege/almacen/download/35/35729/pruebas_bioquimicas_de_identificacion_de_bacterias.pdf

59. **UPAEP.** *Análisis sensorial* [en línea]. 2014. Disponible en: https://investigacion.upaep.mx/micrositios/assets/analisis-sensorial_final.pdf
60. **VALDÉS, M et al.** *Empleo De Pulpa De Acerola Y Guayaba En Una Leche Fermentada Probiótica*. *Revista Ciencia y Tecnología*. [en línea], 2020. Disponible en: <https://www.revcitecal.iiiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/view/124/107>
61. **VANEGAS, C.** *Obtención De Bacterias Ácido Lácticas Mediante Aislamiento En El Kéfir De Leche* [en línea]. 2022. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/16476/u686800.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
62. **VARGAS, J.** *Evaluación Microbiológica Comparativa Del Queso De Hoja Tradicional Elaborado En Una Planta Industrial Y En Una Artesanal* [en línea]. 2018. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/8834>
63. **VÁSQUEZ, H y DACOSTA O.** *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas* [en línea]. 2007. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-77432007000400004
64. **VINDEROLA, G. y Pérez, G.** *Alimentos Fermentados Y Probióticos En Niños. La Importancia De Conocer Sus Diferencias Microbiológicas*. *Archivos Argentinos de Pediatría*. [en Línea], 2021. Disponible en: <https://www.sap.org.ar/docs/publicaciones/archivosarg/2021/v119n1a13.pdf>
65. **VIÑAN, G et al.** *Agentes contaminantes en superficies de equipos, instrumental y ambiente en la Clínica Odontológica de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21583/1/TESIS%20GABRIELA%20VI%C3%91AN.pdf>



ANEXOS

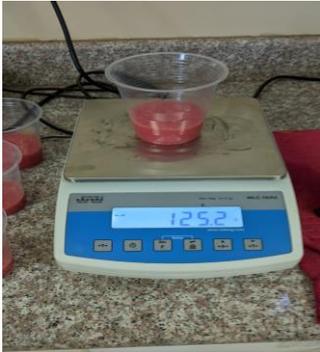
ANEXO S: RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA



ANEXO T: ANÁLISIS PROXIMAL DEL FRUTO

 <p>a)</p>	 <p>b)</p>	 <p>c)</p>
 <p>d)</p>	 <p>e)</p>	<p>a) HUMEDAD b) CENIZA c) FIBRA d) PROTEÍNA e) GRASA</p>

ANEXO U: ELABORACIÓN DE LAS BEBIDAS

 <p>a)</p>	 <p>b)</p>	 <p>c)</p>
 <p>d)</p>	 <p>e)</p>	 <p>f)</p>
 <p>g)</p>	 <p>h)</p>	<p>a) Recepción-selección</p> <p>b) Escaldado</p> <p>c) Pelado</p> <p>d) Despulpado</p> <p>e) Obtención de pulpa</p> <p>f) Estandarizado</p> <p>g) Pasteurizado</p> <p>h) Envasado</p>

ANEXO V: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Determinación de pH	Determinación de índice de acidez	Determinación de grados brix
		

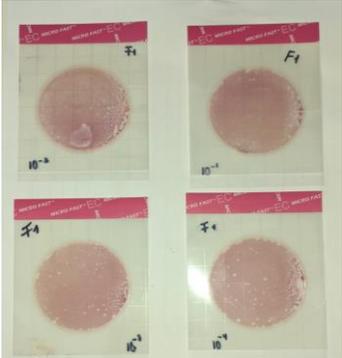
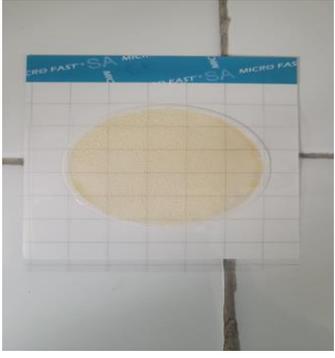
ANEXO W: DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

Determinación de Coliformes	Determinación de aerobios mesófilos	Determinación de mohos y levaduras
		

ANEXO X: PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS FORMULACIONES



ANEXO Y: DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD

Determinación de Coliformes	Determinación de aerobios mesófilos	Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>
 <p>Four petri dishes showing bacterial growth on red agar. The dishes are arranged in a 2x2 grid. The top-left dish is labeled 10^{-2} and shows a dense, pinkish-red bacterial lawn. The top-right dish is labeled 10^{-3} and shows a similar dense lawn. The bottom-left dish is labeled 10^{-4} and shows a less dense lawn. The bottom-right dish is labeled 10^{-5} and shows a very sparse lawn. Each dish has a red label with 'MICRO FAST' and 'EC' visible.</p>	 <p>A single petri dish showing bacterial growth on red agar. The dish is labeled 'MICRO FAST' and 'AC' on the red label. It shows a dense, pinkish-red bacterial lawn.</p>	 <p>A single petri dish showing bacterial growth on blue agar. The dish is labeled 'MICRO FAST' and 'SA' on the blue label. It shows a dense, yellowish bacterial lawn.</p>

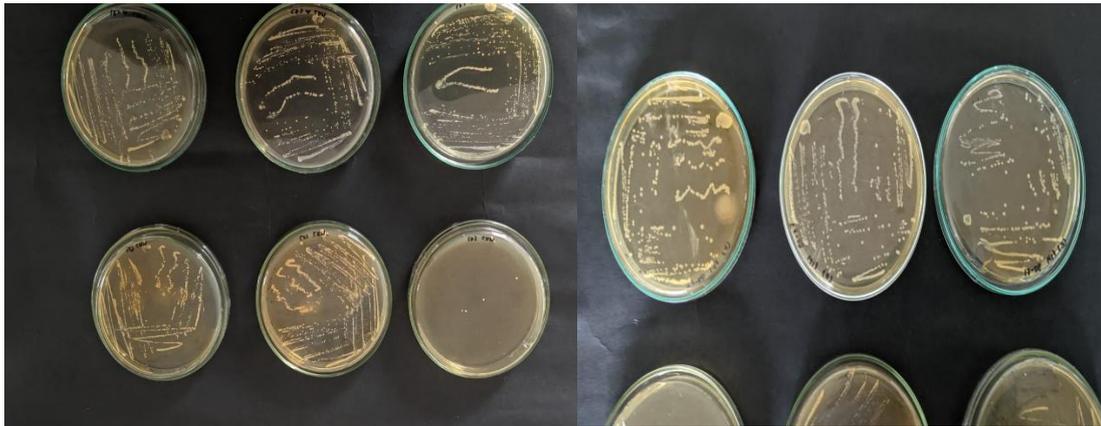
ANEXO Z: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS



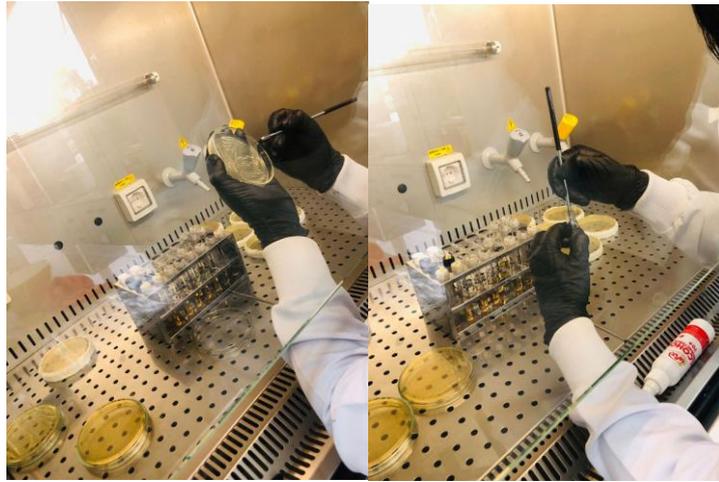
ANEXO AA: TÉCNICA DE PLAQUEO EN PLACA PETRI DE VIDRIO



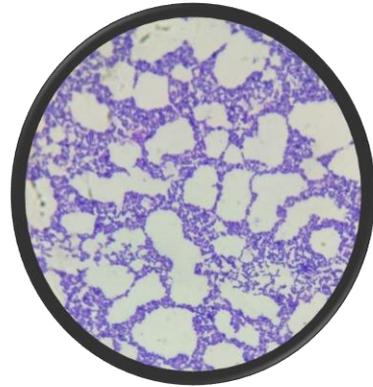
ANEXO BB: SELECCIÓN DE COLONIAS



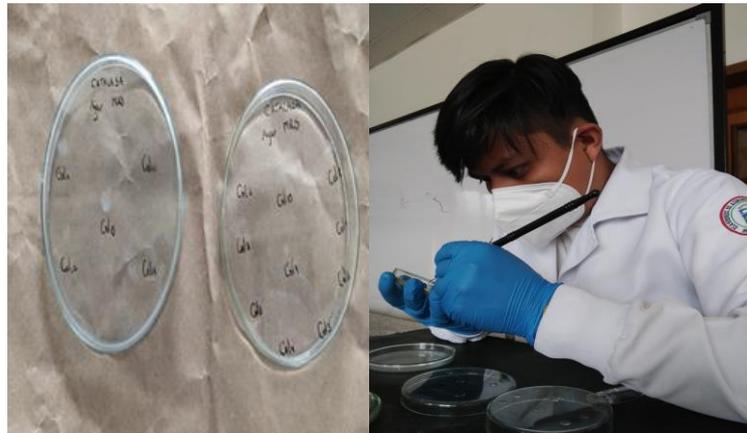
ANEXO CC: ENRIQUECIMIENTO EN CALDO MRS



ANEXO DD: TINCIÓN GRAM



ANEXO EE: PRUEBA DE CATALASA



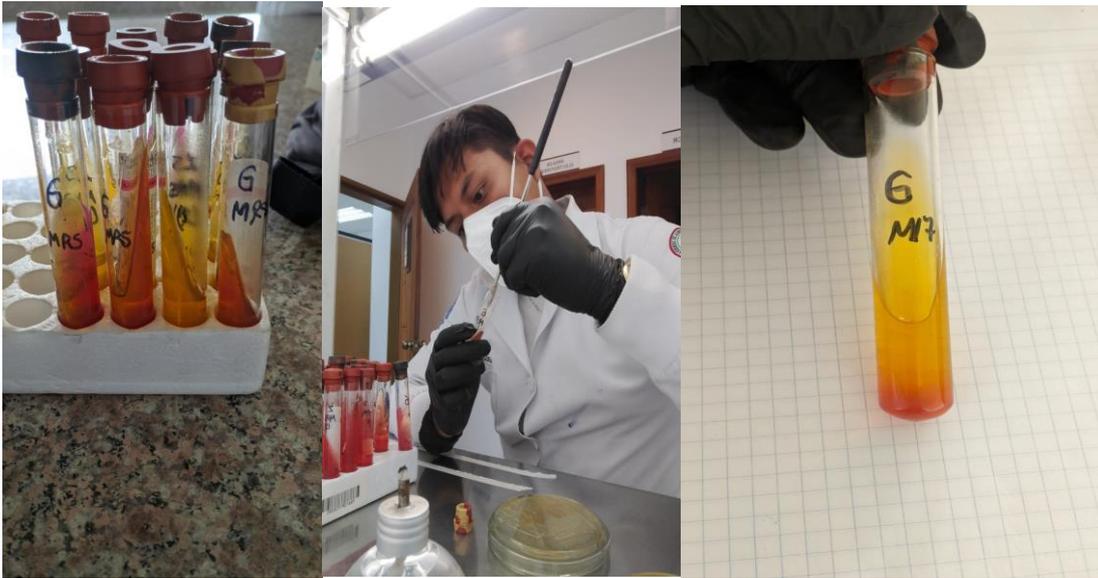
ANEXO FF: PRUEBA DE OXIDASA



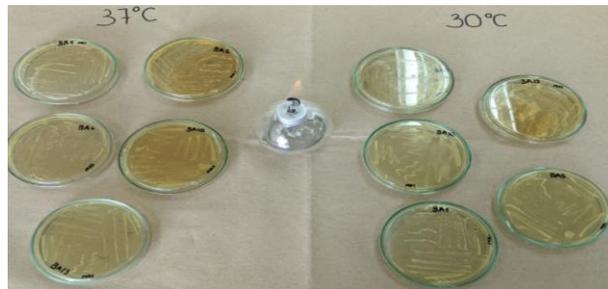
ANEXO GG: PRUEBA DE MOVILIDAD



ANEXO HH: PRODUCCIÓN DE DIÓXIDO DE CARBONO A PARTIR DE GLUCOSA



ANEXO II: CRECIMIENTO A DISTINTAS TEMPERATURAS



ANEXO JJ: CRECIMIENTO A DISTINTOS PH





ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
CERTIFICADO DE CUMPLIMIENTO DE LA GUÍA PARA
NORMALIZACIÓN DE TRABAJOS DE FIN DE GRADO

Fecha de entrega: 25/01/2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: <i>Cristhian Roberto Campoverde Costa</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Bioquímica y Farmacia</i>
Título a optar: <i>Bioquímico Farmacéutico</i>
 BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes, MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  Dra. Janeth María Gallegos Núñez PhD ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

