



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE
LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) Y
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

MICHAEL YANDRY CASTILLO PROAÑO

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE
LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) Y
CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: MICHAEL YANDRY CASTILLO PROAÑO

DIRECTORA: BQF. ADRIANA ISABEL RODRÍGUEZ BASANTES MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Michael Yandry Castillo Proaño

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, Michael Yandry Castillo Proaño, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo 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, 15 de diciembre del 2023

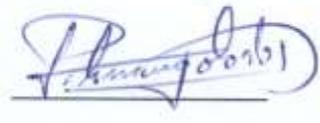


Michael Yandry Castillo Proaño

080379196-1

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 LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**, realizado por el señor: **MICHAEL YANDRY CASTILLO PROAÑO**, 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		2023-12-15
BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-12-15
Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-12-15

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación se lo dedico a toda mi familia, principalmente, a mis padres que han sido un apoyo fundamental e incondicional a lo largo de mi formación personal y profesional, ya que los valores impartidos desde casa han jugado un rol importante en el alcance de esta meta. También quiero dedicarle este trabajo a mi mejor amiga Elizabeth ya que sin su ayuda desde el primer día en la universidad no hubiera sido posible esta meta que después de todo ha sido nuestra.

Michael

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, a Dios por iluminar mi camino y darme la sabiduría necesaria a lo largo de todo este proceso, de igual manera a mi madre por nunca dejar de apoyarme en cada momento que ha sido necesario y no dejarme vencer con facilidad, a mi padre por estar pendiente ante cada necesidad suscitada a lo largo de mi formación profesional, a mi hermano Gulber que ha sido como un segundo padre para mí y este también es su logro, a mi mejor amiga Elizabeth por ser mi recordatorio de que siempre puedo con todo, a mi tutora la BQF. Adriana Rodríguez por estar siempre presta a ayudarme en cada momento que ha sido necesario a lo largo de la realización de este trabajo, a mi asesor el Dr. Carlos Pilamunga por la paciencia brindada, de igual manera un agradecimiento muy especial a la Ing. Violeta Dalgo porque nunca dejo de creer en mí desde el primer semestre y que ha sido una de mis docentes que me inspiran a seguir en este proceso de formación profesional.

Michael

ÍNDICE DE CONTENIDO

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

CAPÍTULO I

1.	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	2
1.1.	Planteamiento del problema.....	2
1.2.	Justificación.....	3
1.3.	Objetivos.....	4
1.3.1.	<i>Objetivo general</i>	4
1.3.2.	<i>Objetivos específicos</i>	4

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.	Antecedentes de la investigación.....	5
2.2.	Referencias teóricas.....	5
2.2.1.	<i>Quinua</i>	5
2.2.1.1.	Descripción botánica.....	6
2.2.1.2.	<i>Taxonomía</i>	7
2.2.1.3.	<i>Propiedades</i>	7
2.2.1.4.	<i>Valor nutricional</i>	7
2.2.2.	<i>Leche de quinua</i>	8
2.2.3.	<i>Probióticos</i>	8
2.2.3.1.	<i>Beneficios de los probióticos</i>	9
2.2.3.2.	<i>Clasificación de los probióticos</i>	9
2.2.4.	<i>Bacterias ácido lácticas</i>	9
2.2.4.1.	<i>Tipos de bacterias ácido lácticas</i>	10
2.2.5.	<i>Microbiota y enfermedades intestinales</i>	10

2.2.5.1.	<i>Infección por Helicobacter pylori</i>	11
2.2.5.2.	<i>Enterocolitis necrosante</i>	11
2.2.5.3.	<i>Enfermedad inflamatoria intestinal</i>	11
2.2.5.4.	<i>Enfermedad celíaca</i>	12
2.2.5.5.	<i>Diarrea aguda</i>	12
2.2.6.	NTE INEN 1673:2013	12
2.2.6.1.	<i>Requisitos específicos</i>	12
2.2.6.2.	<i>Requisitos físicos</i>	13
2.2.6.3.	<i>Requisitos bromatológicos</i>	13
2.2.6.4.	<i>Requisitos microbiológicos</i>	13

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	14
3.1.	Lugar de investigación	14
3.2.	Población de estudio	14
3.2.1.	<i>Criterios de inclusión</i>	14
3.2.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	14
3.3.	Tamaño de la muestra	14
3.4.	Materia prima, materiales, equipos y reactivos	15
3.4.1.	<i>Materia prima</i>	15
3.4.2.	<i>Materiales</i>	15
3.4.3.	<i>Equipos</i>	15
3.4.4.	<i>Reactivos</i>	16
3.5.	Técnicas de estudio	16
3.5.1.	<i>Caracterización de la materia prima</i>	16
3.5.1.1.	<i>Determinación de humedad</i>	16
3.5.1.2.	<i>Determinación de cenizas</i>	16
3.5.1.3.	<i>Determinación de grasa</i>	17
3.5.1.4.	<i>Análisis de fibra cruda</i>	18
3.5.1.5.	<i>Determinación de proteína</i>	19
3.5.2.	<i>Elaboración de la bebida a base de leche de quinua</i>	20
3.5.3.	<i>Formulación de las bebidas</i>	21
3.5.4.	<i>Análisis microbiológico de las bebidas posterior a su pasteurización</i>	21
3.5.4.1.	<i>Determinación de mohos y levaduras mediante la técnica de microfast</i>	22
3.5.4.2.	<i>Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast</i>	22

3.5.5.	Proceso de fermentación	23
3.5.5.1.	Determinación de pH	23
3.5.5.2.	Determinación del índice de acidez	24
3.5.5.3.	Determinación de solidos solubles	24
3.5.5.4.	Determinación de E. coli mediante la técnica de microfast	25
3.5.6.	Técnica de aislamiento y recuento por diluciones	27
3.5.7.	Preparación de medios de cultivo	27
3.5.7.1.	Preparación de Agar MRS	27
3.5.7.2.	Preparación de Agar M17	27
3.5.8.	Diluciones	27
3.5.8.1.	Preparación de diluciones	28
3.5.9.	Siembra y aislamiento de BAL	28
3.5.10.	Pruebas bioquímicas para el aislamiento	28
3.5.10.1.	Tinción gram	28
3.5.10.2.	Catalasa	29
3.5.10.3.	Oxidasa	29
3.5.11.	Pruebas de caracterización	30
3.5.11.1.	Prueba de movilidad	30
3.5.11.2.	Producción de CO₂ a partir de glucosa	30
3.5.11.3.	Formulación del caldo rojo fenol	30
3.5.11.4.	Producción de CO₂ a partir de glucosa	30
3.5.11.5.	Crecimiento a diferentes temperaturas	31
3.5.11.6.	Tolerancia a distintos pH	31

CAPÍTULO IV

4.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	32
4.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	32
4.1.1.	Análisis proximal de la materia prima	32
4.1.1.1.	Humedad	32
4.1.1.2.	Cenizas	33
4.1.1.3.	Grasa	33
4.1.1.4.	Fibra cruda	33
4.1.1.5.	Proteína	34
4.1.2.	Análisis físico-químico y microbiológico de las formulaciones	34
4.1.2.1.	Análisis físico-químico	34

4.1.2.2.	<i>Análisis microbiológico</i>	35
4.1.3.	<i>Análisis físico-químico y microbiológico de las formulaciones</i>	36
4.1.3.1.	<i>Determinación de pH</i>	36
4.1.3.2.	<i>Determinación del índice de acidez</i>	37
4.1.3.3.	<i>Determinación de sólidos solubles</i>	38
4.1.3.4.	<i>Determinación de indicadores de calidad</i>	39
4.1.4.	<i>Aceptabilidad de las formulaciones</i>	39
4.1.4.1.	<i>Resultado de aceptabilidad</i>	39
4.1.5.	<i>Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido-lácticas</i>	41
4.1.5.1.	<i>Tinción gram, catalasa y oxidasa</i>	41
4.1.6.	<i>Pruebas de caracterización de bacterias ácido-lácticas</i>	42
4.1.6.1.	<i>Prueba de movilidad</i>	42
4.1.6.2.	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	43
4.1.6.3.	<i>Tolerancia a distintos pH</i>	44
4.1.6.4.	<i>Producción de CO₂ a partir de glucosa</i>	44
CONCLUSIONES		46
RECOMENDACIONES		48
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1:	Taxonomía de la quinua.....	7
Tabla 2-2:	Valor nutricional de la quinua.....	7
Tabla 2-3:	Requisitos físicos de la quinua.....	13
Tabla 2-4:	Requisitos bromatológicos de la quinua.....	13
Tabla 2-5:	Requisitos microbiológicos de quinua.....	13
Tabla 3-1:	Porcentaje de quinua y agua.....	21
Tabla 3-2:	Ingredientes empleados para las formulaciones de leche de quinua.....	21
Tabla 4-1:	Análisis Proximal de la materia prima.....	32
Tabla 4-2:	Requisitos físico-químicos de las formulaciones.....	34
Tabla 4-3:	Análisis microbiológico de las formulaciones.....	35
Tabla 4-4:	Resultado del pH a diferentes horas a cada formulación.....	36
Tabla 4-5:	Valores de la determinación del índice de acidez.....	37
Tabla 4-6:	Determinación de indicadores de calidad.....	39
Tabla 4-7:	Resultado de la encuesta de aceptabilidad mediante la prueba hedónica.....	40
Tabla 4-8:	Resultado de pruebas bioquímicas para la identificación de BAL.....	41
Tabla 4-9:	Movilidad de las BAL.....	42
Tabla 4-10:	Crecimiento de BAL a diferentes temperaturas.....	43
Tabla 4-11:	Tolerancia a distintos pH.....	44

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Planta de quinua.....	6
Ilustración 4-1:	Determinación de pH	36
Ilustración 4-2:	Valoración del índice de acidez	37
Ilustración 4-3:	Valoración de sólidos totales	38
Ilustración 4-4:	Valoración de encuestas.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA (*Chenopodium quinoa*)
- ANEXO B:** ELABORACIÓN DE LA BEBIDA A BASE DE LECHE DE QUINUA
- ANEXO C:** PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS
- ANEXO D:** PROCESO DE FERMENTACIÓN.
- ANEXO E:** DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD
- ANEXO F:** PREPARACIÓN DE DILUCIONES
- ANEXO G:** PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
- ANEXO H:** SIEMBRA EN AGARES SELECTIVOS
- ANEXO I:** COLONIAS EM AGAR MRS Y M17
- ANEXO J:** ENRIQUECIMIENTO EN CALDO MRS
- ANEXO K:** TINCIÓN GRAM EN COLONIAS DE AGAR MRS
- ANEXO L:** TINCIÓN GRAM EN COLONIAS DE AGAR M17
- ANEXO M:** PRUEBA DE CATALASA
- ANEXO N:** PRUEBA DE OXIDASA
- ANEXO Ñ:** PRUEBA DE MOVILIDAD
- ANEXO O:** PRODUCCIÓN DE CO₂ A PARTIR DE GLUCOSA
- ANEXO P:** CRECIMIENTO DE COLONIAS A 30 °C EN AGAR MRS
- ANEXO Q:** CRECIMIENTO DE COLONIAS A 37 °C EN AGAR MRS
- ANEXO R:** CRECIMIENTO DE COLONIAS A 30 y 37 °C EN AGAR M17
- ANEXO S:** TOLERANCIA DE COLONIAS DE AGAR MRS A DISTINTOS pH
- ANEXO T:** TOLERANCIA DE COLONIAS DE AGAR MRS A DISTINTOS pH
- ANEXO U:** TOLERANCIA DE COLONIAS DE AGAR M17 A DISTINTOS pH
- ANEXO V:** PRUEBA HEDÓNICA
- ANEXO W:** MODELO DE ENCUESTA APLICADA A ESTUDIANTES

RESUMEN

La mala alimentación contribuye a la aparición de patologías gastrointestinales, y esto representa un problema en el ámbito de la salud, por lo que se mencionan como alternativas saludables a esta problemática, la ingesta de productos probióticos, por lo que este trabajo experimental tiene como objetivo elaborar una bebida fermentada a base de leche de quinua (*Chenopodium quinoa*) y caracterizar bacterias ácido lácticas. Para la elaboración de las formulaciones se trabajó con los granos de quinua de la empresa maquita productos, los cuales debieron aprobar criterios de inclusión y exclusión, posterior se le realizó un análisis proximal a la materia prima mediante pruebas de humedad, cenizas, fibra, proteína y grasas, con lo cual se dio paso a la elaboración de las 3 formulaciones siguiendo un proceso de eliminación de saponinas, secado, molienda, batido, filtración, envasado y pasteurización, una vez obtenidas las 3 formulaciones con distintas concentraciones de quinua, se arrancó con el proceso de fermentación espontánea, considerando las pruebas fisicoquímicas como pH, acidez titulable y grados brix, de igual manera los indicadores de calidad que garantizan que las bebidas están aptas para el consumo humano, una vez concluido este procedimiento, se realizó una prueba hedónica a un grupo de estudiantes para escoger la formulación óptima y con la formulación escogida se realizó la siembra en los medios selectivos para bacterias ácido lácticas, al igual que las diferentes pruebas bioquímicas y pruebas de caracterización para ese tipo de bacterias obteniendo así en los resultados la presencia de bacterias ácido lácticas con diferente morfología y con características propias de las mismas. Como conclusión de este trabajo fue posible la elaboración de una bebida fermentada a base leche de quinua (*Chenopodium quinoa*) y mediante las distintas pruebas microbiológicas se logró caracterizar y determinar la presencia de bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <MICROBIOLOGÍA>, <PROBIÓTICOS>, <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS>, <QUINUA>, <FERMENTACIÓN>.

0232-DBRA-UPT-2024



ABSTRACT

The main objective of this research study was to focus on poor nutrition that contributes to the appearance of gastrointestinal pathologies, and this represents a problem in the field of health, which is why the ingestion of probiotic products is mentioned as a healthy alternative to this problem. This experimental work aims to produce a fermented drink based on quinoa milk (*Chenopodium quinoa*) and to characterize lactic acid bacteria. For the elaboration of the formulations, we worked with quinoa grains from the company maquita productos, which had to pass inclusion and exclusion criteria, after which a proximal analysis was carried out on the raw material using moisture, ash, fiber, protein, and fat tests, This led to the preparation of the 3 formulations following a process of elimination of saponins, drying, grinding, beating, filtration, packaging, and pasteurization. Once the 3 formulations were obtained with different concentrations of quinoa, the spontaneous fermentation process was started, considering the physicochemical tests such as pH, treatable acidity, and degrees of spontaneous fermentation, Once this procedure was completed, a hedonic test was carried out on a group of students to choose the optimum formulation, and with the chosen formulation, sowing was carried out in the selective media for lactic acid bacteria, as well as the different biochemical tests and characterization tests for this type of bacteria, thus obtaining in the results the presence of lactic acid bacteria with different morphology and with their characteristics. As a conclusion of this work, it was possible to elaborate on a fermented beverage based on quinoa milk (*Chenopodium quinoa*), and using the different microbiological tests it was possible to characterize and determine the presence of lactic acid bacteria with possible probiotic activity.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <MYCROBIOLOGY>, <PROBIOTICS>, <LACTIC ACID BACTERIA>, <QUINUA>, <FERMENTATION>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo experimental hace referencia a la elaboración de una bebida fermentada a base de leche de quinua (*Chenopodium quinoa*) y caracterización de bacterias ácido lácticas, dado que hoy en día los malos hábitos alimenticios contribuyen a que se desencadenen múltiples problemas digestivos, pudiendo así llegar a afectar el equilibrio de la flora intestinal, resultando esto en un problema en el ámbito de la salud que a lo largo de los años se ha visto incrementado.

En la actualidad se ha evidenciado un aumento en el interés por parte de la industria alimentaria en la investigación y formulación de bebidas con agentes prebióticos y probióticos, a base de frutas o vegetales, ya que resultan beneficiosas para la salud digestiva, la falta de este tipo de bebidas en el mercado nacional es evidente, por lo cual la presente investigación busca aportar una iniciativa que de paso a futuros emprendimientos que contribuyan a mejorar la calidad de vida de la población mediante una buena alimentación,

Para llevar a cabo esta investigación, se tienen contemplados los siguientes objetivos, caracterizar la materia prima en base a la normativa NTE INEN 1673:2013, ensayar tres formulaciones para seleccionar la más adecuada mediante la aplicación de encuestas, realizar la caracterización físico química, microbiológica y sensorial de la formulación optimizada, llevar a cabo un screening de las bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica.

Resulta oportuna la realización de este trabajo experimental ya que se cuenta con los recursos necesarios a nivel económico, académico como lo son los conocimientos y los laboratorios de la institución, social, contando con la participación de un grupo de estudiantes para la degustación de las formulaciones. Dentro de la ejecución de este trabajo se pudieran suscitar inconvenientes como la contaminación en la parte microbiológica, pudiendo alterar ciertas pruebas para la identificación y caracterización de las bacterias ácido lácticas, obteniendo así resultados no favorables.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

“Las bebidas fermentadas son las que se consiguen gracias a la fermentación de la glucosa presente en algunos líquidos de origen natural” (NOA, 2023). Las bebidas fermentadas se obtienen de la interacción controlada de microorganismos o enzimas con el alimento, lo cual ocasiona cambios en sus componentes, obteniendo como producto principal un líquido con diversas propiedades. Estas bebidas se clasifican en alcohólicas y no alcohólicas, estas últimas derivadas de la fermentación de la leche (Cabanillas et al., 2022).

La dieta que llevamos afecta a muchos aspectos de nuestra vida. Puede condicionar la forma en la que nos vemos, por dentro y por fuera. Una mala alimentación afecta a nuestra microbiota (flora intestinal) y esto puede causarnos problemas digestivos, como una mala digestión, o un aumento de peso (Bioithas, 2023). “Los alimentos ingeridos influyen mucho en la estructura y en la composición de las comunidades microbianas del intestino” (Álvarez et al., 2020, pp. 11–15).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus o parásitos que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados, comprenden varias dolencias y constituyen un problema de salud pública a nivel mundial. La manifestación clínica más común es la aparición de síntomas gastrointestinales. En Ecuador durante el 2019, las enfermedades transmitidas por agua y alimentos alcanzaron 19487 casos, decremento del 54% con relación al año 2020. El grupo de edad más afectado es de 20 a 49 años, mayoritariamente el sexo femenino (MSP, 2021, p.1).

En el Ecuador 1 de cada 4 niños menores de 5 años sufren desnutrición crónica infantil, en especial en el área rural, con condiciones del núcleo familiar vulnerable, entornos desfavorables, relacionados la calidad alimentaria, el estado nutricional y calidad de vida de la población, afectando a los niños y niñas en su crecimiento y desarrollo (Lara et al., 2022, pp. 24–36). Una investigación de la Universidad Católica del Ecuador y el CEDIS, realizada entre los años 2018 y 2019, evidenció los altos índices de desnutrición infantil en los cantones de la provincia de Chimborazo: Riobamba (51%), Guamote (55%), Alausí (57%), Colta (52%) y Guano (62%). En todos estos cantones se producen cereales, legumbres, frutas, carne y leche, pero ello no ha mejorado la situación de sus habitantes ni su dieta (Rea, 2022, p.2).

Ante la problemática expuesta, resulta oportuna la ejecución del presente trabajo experimental, ya que presenta un alcance a nivel social que mediante futuras investigaciones a partir de la quinua se podría generar un emprendimiento donde resulten beneficiados ciertos grupos poblacionales que presenten afecciones digestivas a causa de una mala alimentación, a la vez resulta factible dado que la materia prima es de fácil acceso y no representaría un problema a nivel económico, en lo que refiere al ambiente, al ser un producto natural, no se verían implicaciones relacionadas a una contaminación o afectación directa al mismo.

En la ejecución de este trabajo experimental, se tiene a consideración la operacionalización de las siguientes variables, dependiente como la actividad probiótica de la bebida fermentada a base de *Chenopodium quinoa*, e independientes como las propiedades organolépticas como el olor, color y sabor, el análisis microbiológico, análisis fisicoquímico y presencia de bacterias ácido lácticas.

A nivel del Ecuador se han llevado a cabo diversas investigaciones donde se han elaborado bebidas cuya materia prima es la quinua (*Chenopodium quinoa*), con este trabajo, se busca aportar información a las investigaciones ya mencionadas, mediante la identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica, beneficiosas para la salud digestiva.

1.2. Justificación

Se ha evidenciado que la mala alimentación contribuye a la aparición de patologías gastrointestinales, las cuales representan un problema en el ámbito de la salud que ha venido en aumento. En este marco se mencionan como alternativas saludables a esta problemática, la ingesta de productos probióticos como lo son las bebidas probióticas.

Dentro de las causas asociadas a los problemas digestivos de mano de los malos hábitos alimenticios, se encuentran la ingesta de alimentos procesados, exceso de comida chatarra, alimentos altos en edulcorantes y conservantes e inclusive agentes infecciosos por falta de higiene en la manipulación de alimentos o propios del ambiente en casos de extrema pobreza.

La principal virtud de los probióticos es incidir en el desarrollo de la comunidad microbiana que habita en el hospedero, asegurando así el adecuado equilibrio entre patógenos y bacterias para el funcionamiento correcto del organismo. Otra acción es neutralizar la actividad de los patógenos, adquiridos a través de la dieta (Camarena et al., 2022, pp. 27–37)

Se han publicado diferentes estudios que señalan que la leche de vaca, así como sus derivados lácteos, podrían ser potenciales causantes de diversas patologías como el cáncer. Por este motivo se recomienda eliminarlos de una dieta saludable, siendo la leche de quinua un potencial sustituto. Además, la quinua tiene un alto valor nutricional (alto grado de proteínas, gran número de fibras, alta variedad de vitaminas y minerales y bajo nivel de grasa) por lo que se afirma que puede reemplazar al producto vacuno (Cisneros y Luque, 2020, p. 1)

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Elaborar una bebida fermentada a base de leche de quinua (*Chenopodium quinoa*) y caracterizar bacterias ácido lácticas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Realizar el análisis proximal de la quinua (*Chenopodium quinoa*).
- Ensayar tres formulaciones para seleccionar la más óptima mediante pruebas de aceptabilidad.
- Realizar la caracterización físico química, microbiológica y sensorial de la formulación optimizada.
- Llevar a cabo un screening de las bacterias ácido lácticas con posible actividad prebiótica.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Los profesionales de la salud están prestando cada vez más atención a los efectos beneficiosos de los alimentos con microbios vivos (probióticos) en la salud humana, y en particular de los productos lácteos en los niños y otros grupos de alto riesgo de la población. Se ha informado de que estos probióticos pueden desempeñar un importante papel en las funciones inmunitaria, digestiva y respiratoria y podrían contribuir de forma significativa a aliviar las enfermedades infecciosas en los niños (Fao et al., 2006)

En la Universidad San Francisco de Quito se llevó a cabo un estudio donde se obtuvo una bebida fermentada de quinoa con 9 g de proteína por una porción de 200 g y con una vida útil estimada en 70 días a 4°C. Este producto resultó ser una alternativa al yogur de leche de vaca y a la bebida fermentada de soya. Además, en este mismo estudio se menciona que el valor nutricional de la quinoa es superior al de la soya y demás alimentos tradicionales con base vegetal. Esto se debe principalmente a que la composición de aminoácidos del pseudo-cereal está considerada muy cercana a la ideal (FAO/WHO, 2013). Es así, que su calidad nutricional en cuanto a proteínas rivaliza incluso con las encontradas en la leche (Maldonado et al., 2018)

De acuerdo con (Flores, 2011) en la Universidad Técnica de Ambato, se investigaron métodos que permitieran obtener una tecnología adecuada para la elaboración de leche de quinua con prebióticos, dicha tecnología se adaptó a verificar el aporte nutritivo y el control de calidad del producto donde se realizaron pruebas físico químicas y sensoriales las cuales se basan en el contenido de nutrientes, acidez, pH, Humedad, Cenizas, Grasa, y su aceptación ante los potenciales consumidores en base a su; dulzor, color, sabor, textura y aceptabilidad en general.

2.2. Referencias teóricas

2.2.1. *Quinoa*

La quinua es una planta de la familia Chenopodiaceae, género *Chenopodium*, sección *Chenopodia* y subsección *Cellulata*. El género *Chenopodium* es el principal dentro de la familia Chenopodiaceae y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies. Se cultiva, sobre

todo, en la cordillera andina. Los principales países productores son: Argentina, Bolivia, Ecuador, Estados Unidos, Chile, Colombia y Perú, aunque su cultivo se está extendiendo a diversos países de Europa y Asia, con altos niveles de rendimiento (Miranda, 2007, p.10)

2.2.1.1. Descripción botánica

La quinua es una planta de desarrollo anual, de hojas anchas, dicotiledónea y usualmente alcanza una altura de 1 a 2 m. El tallo central comprende hojas lobuladas y quebradizas. El tallo puede tener o no ramas, dependiendo de la variedad y/o densidad del sembrado. La raíz principal normalmente mide de 20 a 25 cms. de longitud, formando una densa trama de radículas, las cuales penetran en la tierra tan profundamente como la altura de la planta. Las panículas o panojas crecen generalmente en la punta de la planta y algunas veces debajo del tallo. Las flores son pequeñas y carecen de pétalos. Generalmente son bisexuales y se autofertilizan. El fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm. de diámetro (de 250 a 500 semillas por grano), circundando al cáliz, el cual es del mismo color que el de la planta. La semilla es usualmente lisa y de color blanco, rosado, naranja como también rojo, marrón y negro), el peso del embrión constituye el 60% del peso de la semilla, formando una especie de anillo alrededor del endospermo que se desprende cuando la semilla es cocida (Botanical, 2019)



Ilustración 2-1: Planta de quinua

Fuente: (Orgaz, 2020).

2.2.1.2. Taxonomía

Tabla 2-1: Taxonomía de la quinua

Reino:	Vegetal
División:	<i>Mangonoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Caryophyllidae</i>
Orden:	<i>Caryophyllales</i>
Familia:	<i>Chenopodiaceae</i>
Género:	<i>Chenopodium</i>
Sección:	<i>Chenopodia</i>
Subsección:	<i>Cellulata</i>
Especie:	<i>Chenopodium quinoa Willdenow</i>

Fuente: (Orgaz, 2020)

Realizado por: Castillo M., 2024

2.2.1.3. Propiedades

La quinua es un alimento que destaca por su alto valor proteico, lo que, unido al aporte de energía, hace que sea ideal para personas que llevan a cabo una alta actividad física. Asimismo, puede ser consumida sin problemas por personas celíacas al no contener gluten. También tiene un bajo valor glucémico que la hace apta para quienes tienen problemas de diabetes. Por otro lado, contiene fibra que ayuda a regular el tránsito intestinal y combate problemas de estreñimiento.

Contiene manganeso, fósforo y magnesio, necesarios todos para mantener unos huesos sanos y fuertes. También presenta hierro, indispensable para prevenir problemas de anemia. Su consumo también se recomienda entre mujeres embarazadas gracias a la presencia de vitamina B9 que contribuye al buen desarrollo del feto (Escalante, 2019).

2.2.1.4. Valor nutricional

Tabla 1-2: Valor nutricional de la quinua

Nutriente	Quinua por 100g.
Calorías (Kcal.)	374
Carbohidratos (g.)	68,9
Proteínas (g.)	13,1
Grasas (g.)	5,8
Fibra (g.)	5,9
Calcio (mg.)	60

Magnesio (mg.)	210
Zinc (mg.)	3,3

Fuente: (Botanical, 2019)

Realizado por: Castillo M., 2024

2.2.2. Leche de quinua

La leche de quinua no contiene ingredientes de origen animal, lactosa ni gluten, con lo que es ideal para gente vegana, vegetariana, intolerante a la lactosa y celíaca. Se trata de una semilla de fácil digestión y extraordinariamente nutritiva, ya que comparándola con otros cereales (arroz, trigo, cebada, avena, etc.) es más rica en magnesio, fósforo, potasio, hierro, fibra y vitamina E. Contiene 8 aminoácidos esenciales y gran cantidad de otros, no esenciales para el organismo humano (Vegan, 2021, p.1)

Entre los aminoácidos presentes en sus proteínas destacan la lisina (importante para el desarrollo del cerebro) y la arginina e histidina, básicos para el desarrollo humano durante la infancia. Igualmente es rica en metionina y cistina, mientras que es pobre en grasas, complementando de este modo a otros cereales y/o legumbres como las vainitas. En general, la quinoa posee un excepcional equilibrio de proteínas, grasas y carbohidratos (fundamentalmente almidón). Es reguladora del colesterol y contribuye a revertir el estreñimiento por su alto contenido en fibra natural (Vegan, 2021, p.1).

2.2.3. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos (como bacterias y levaduras) que al consumirlos en una cantidad adecuada proporcionan beneficios para la salud. Se encuentran naturalmente presentes en algunos alimentos fermentados, agregados a algunos productos alimenticios y disponibles como suplementos dietéticos.

Los probióticos actúan principalmente en el aparato digestivo, donde pueden afectar el microbioma intestinal. Este microbioma está formado por muchos microorganismos (en su mayor parte bacterias) que viven principalmente en el intestino grueso. Cuando una persona come o bebe suficientes probióticos, estos le ayudan a proteger el aparato digestivo de microorganismos nocivos, a mejorar la digestión y la función intestinal, y además podrían proporcionar otros beneficios para la salud (ODS, 2022)

2.2.3.1. Beneficios de los probióticos

Si son consumidos en cantidades suficientes y en forma permanente, los probióticos realizan los siguientes aportes a la salud:

- Incrementan la resistencia a infecciones por organismos potencialmente patógenos en el intestino.
- Disminuyen la duración de la diarrea, por ejemplo, asociados a antibióticos y a infecciones del viajero
- Reducen la intolerancia a la lactosa (promueven la digestión a nivel intestinal)
- Incrementan el valor nutricional (mejor digestión, incremento de la absorción de vitaminas y minerales)
- Regulan la motilidad intestinal (alivian la constricción y síndrome del intestino irritable, entre otros)
- Mantenimiento de la integridad de la mucosa intestinal (Agar, 2021).

2.2.3.2. Clasificación de los probióticos

Se pueden diferenciar principalmente 2 tipos de probióticos:

- Probióticos de origen bacteriano: aquí podemos encontrar varias especies, pero destacan principalmente las bifidobacterias y los lactobacilos. Las bifidobacterias son microorganismos que habitan en la flora del intestino, pero también en diferentes alimentos, sobre todo lácteos fermentados. Los lactobacilos están de forma natural en el sistema urinario, digestivo y genital, pero también en algunos alimentos como los yogures y ayudan a la absorción de nutrientes.
- Levaduras: son otro tipo de microorganismos que no son de origen bacteriano, se trata de levaduras como *Saccharomyces boulardii* CNCM i-745 (Bravo et al., 2008).

2.2.4. Bacterias ácido lácticas

Constituyen un gran grupo de microorganismos benignos que producen ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza y también en nuestro sistema digestivo. Aunque se las conoce sobre todo por sus aplicaciones en la industria láctea, también se las usa para curar pescado, carne y embutidos.

Se vienen empleando para fabricar alimentos desde hace al menos 4 mil años. Su uso más corriente se relaciona con la producción de productos lácteos fermentados, como el yogurt, el queso, la manteca, la crema de leche, el kefir y el kumis (Smith 2018, p.1).

2.2.4.1. Tipos de bacterias ácido lácticas

Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (produce sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos.

Homofermentativas: el grupo homofermentativo compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En contraste, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, y así solamente generan la mitad de la energía del grupo homofermentativa.

Heterofermentativas: producen solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa. Este grupo está compuesto de un número de géneros incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa; así que, en lugar de seguir la vía (EMP), utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Parra 2010, p.2).

2.2.5. Microbiota y enfermedades intestinales

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino.

El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo. La población microbiana del intestino humano incluye unos 100 billones de bacterias de unas 500 a 1.000 especies distintas.

La presencia de ciertas bacterias como parte de la flora intestinal es necesaria para una correcta nutrición y desarrollo corporal, así como para un adecuado mantenimiento del sistema inmune. La homeostasis intestinal es crítica para la extracción eficiente de energía de los alimentos y la protección frente a los microorganismos patógenos.

A continuación, se revisan las principales enfermedades gastrointestinales pediátricas que tienen una relación más evidente con la microbiota gastrointestinal. Entre ellas se incluyen la infección por *Helicobacter pylori*, la enterocolitis necrosante, la enfermedad inflamatoria intestinal, la enfermedad celíaca y la diarrea aguda.

2.2.5.1. Infección por Helicobacter pylori

Más del 50% de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), entre un 30 y un 40% en países desarrollados y más del 80% en los países en vías de desarrollo. Aunque la carga bacteriana en el estómago es baja, la especie *Helicobacter* ha recibido una atención especial, debido a su asociación con varias enfermedades gástricas. El *H. pylori*, bacteria espirilar gramnegativa, es una de las causas más frecuentes de infección bacteriana en el ser humano, que puede producir gastritis, úlcera gástrica y duodenal, cáncer de estómago y linfoma del tejido linfoide mucoso adenocarcinoma, como linfoma tipo MALT.

Está documentada la eficacia de las bacterias acidolácticas, bifidobacterias, leches fermentadas, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus acidophilus* en la disminución de los efectos adversos asociados al tratamiento erradicador de *H. pylori*. Diversos estudios han demostrado la eficacia de algunos probióticos (entre ellos *S. boulardii* y su combinación con *L. casei*) para erradicar *H. pylori* en pacientes pediátricos. Más evidencias existen aún en población adulta que respaldan la recomendación de emplear probióticos para incrementar la tasa de erradicación de *H. pylori*

2.2.5.2. Enterocolitis necrosante

Es la urgencia médica gastrointestinal más común en recién nacidos. La ECN continúa siendo una enfermedad potencialmente muy grave en recién nacidos pretérmino, sin cambios significativos en la incidencia de mortalidad y de la morbilidad a largo plazo. Autores comentan que los lactantes pretérmino, sin la suficiente colonización de Proteobacteria durante la primera semana de la vida, pueden no ser capaces de modular una respuesta inmunitaria adaptativa frente al aumento posterior de Proteobacteria y la inmadurez de los mecanismos de tolerancia, influida por calidad y cantidad de la microbiota, puede estar asociada a esta enfermedad.

2.2.5.3. Enfermedad inflamatoria intestinal

En la enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) se produce una respuesta anómala del sistema inmune frente a elementos del microbiota en la mucosa intestinal,

produciendo lesiones intestinales. Varios estudios citados por Danese indican que la microbiota encontrada en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal es diferente de la de los individuos sanos, y señalan que la disbiosis puede conducir a la intolerancia. Estos pacientes presentan una microbiota mal diversificada, con predominio de Clostridium, Bacterioides y Bifidobacteria (microbiota comensal) y un aumento concomitante en bacterias patógenas, tales como Escherichia coli, rara en individuos sin afectación inflamatoria intestinal.

2.2.5.4. Enfermedad celíaca

En la actualidad se considera a la enfermedad celíaca (EC) como un trastorno sistémico mediado inmunológicamente, provocado por la ingestión de gluten en individuos genéticamente susceptibles y caracterizado por la presencia de una combinación variable de manifestaciones clínicas dependientes del gluten, anticuerpos específicos de la enfermedad, haplotipos HLA DQ2 o DQ8 y enteropatía. Además de los factores inmunológicos y genéticos, se sospecha que factores ambientales, tales como la nutrición en la infancia y la microbiota intestinal, también juegan un papel en la etiopatogenia de la EC.

2.2.5.5. Diarrea aguda

La gastroenteritis aguda (GEA) se define como la emisión de 3 o más heces acuosas o líquidas en un día, de duración menor de 14 días, lo que la diferencia de la diarrea crónica, y que habitualmente es infecciosa, ya que el agente etiológico es un microorganismo patógeno: virus, bacterias o parásitos. La racionalidad del uso de probióticos para tratar y prevenir la GEA se basa en la modificación de la composición de la microbiota intestinal, evitando el crecimiento de las cepas entéricas patógenas (Polanco, 2015, p.6).

2.2.6. NTE INEN 1673:2013

Esta norma establece los requisitos que debe cumplir el grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) destinado a consumo humano. Abarca requisitos específicos, físicos, bromatológicos y microbiológicos

2.2.6.1. Requisitos específicos

- Color. La quinua en grano debe presentar un color natural y uniforme, característico de la variedad.

- Sabor. Para efectos de esta norma de acuerdo con la prueba de espuma, se considera como quinua dulce aquella que da una altura de espuma de 1,0 cm o menor y como quinua amarga aquella que da una altura de espuma superior a 1,0 cm
- Olor. La quinua en grano, en un examen organoléptico, debe estar libre de olores producidos por contaminación de mohos o por una mala conservación u otros olores objetables.

2.2.6.2. Requisitos físicos

Tabla 2-3: Requisitos físicos de la quinua

REQUISITO	VALORES		
	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Piedrecillas en 100 g de muestra	-	Ausencia	NTE INEN 1671
Insectos (enteros, partes o larvas)	-	Ausencia	NTE INEN 1671

Fuente: (Normas INEN, 2021)

2.2.6.3. Requisitos bromatológicos.

Tabla 2-4: Requisitos bromatológicos de la quinua

REQUISITO	VALORES		
	Mínimo	Máximo	Método de ensayo
Humedad, %(m/m)	-	13,5%	NTE INEN 1235
Proteínas, %(m/m)	10,0 %	-	ISO 20483
Cenizas, %(m/m)	-	3,5 %	NTE INEN 1671
Grasa, %(m/m)	4,0 %	-	ISO 11085
Fibra cruda, %(m/m)	3,0 %		NTE INEN 1671
Carbohidratos , % (m/m)	65,0 %		Determinación indirecta

Fuente: (Normas INEN, 2021).

2.2.6.4. Requisitos microbiológicos

Tabla 2-5: Requisitos microbiológicos de quinua

MICROORGANISMO	N	c	VALORES		
			M	M	Método de ensayo
Mohos	5	3	10 ²	10 ⁵	NTE INEN 1529-10

Fuente: (Normas INEN, 2021).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de integración curricular tuvo lugar en los diferentes laboratorios como lo fueron de Bromatología, Microbiología, 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 la conformaron los granos o semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*) de la empresa maquita productos.

Para la recolección del material vegetal se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

3.2.1. Criterios de inclusión

La materia prima vegetal (quinua) en óptimo estado, considerando los requisitos que cumplir el grano de quinua (*Chenopodium quinoa*) destinado a consumo humano, que establece la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1673:2013.

3.2.2. Criterios de exclusión

Aquellos granos de quinua que presenten daños, o deterioro visiblemente o que no cumplan con los requisitos organolépticos y físicos que establece la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1673:2013.

3.3. Tamaño de la muestra

Para el tamaño de la muestra se trabajó con los 30 estudiantes correspondientes al paralelo A del octavo semestre de la carrera de Bioquímica y Farmacia, a los cuales se les realizó la prueba hedónica para la elección de la mejor formulación.

3.4. Materia prima, materiales, equipos y reactivos

3.4.1. *Materia prima*

- Granos de *Chenopodium quinoa*

3.4.2. *Materiales*

- Mortero y pistilo
- Crisoles
- Vidrio reloj
- Papel aluminio
- Espátula
- Vaso de precipitación
- Tubo refrigerante
- Tubo condensador
- Balón de destilación
- Olla
- Frascos de vidrio 250 ml
- Filtro de tela
- Cuchillo
- Envases plásticos
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Puntas azules y amarillas estériles
- Pipetas automáticas de 1000 uL
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Algodón
- Gasas

3.4.3. *Equipos*

- Balanza analítica
- Desecador
- Mufla
- Estufa

- Sistema de Pasteurización
- Licuadora
- Rota evaporador
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar

3.4.4. Reactivos

- Ácido acético
- Agua purificada
- Azúcar
- Hexano
- Peptona
- Petrifilm para *E. coli* y *Staphylococcus aureus*

3.5. Técnicas de estudio

3.5.1. Caracterización de la materia prima

3.5.1.1. Determinación de humedad

Se llevó a cabo mediante un determinador de humedad o termobalanza dentro del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Procedimiento:

- Pesar entre 3 o 5 g de la muestra.
- Colocar la muestra en el equipo donde se calentará y bajo el principio de disminución de peso, se obtendrá el porcentaje de humedad de la muestra, esto conlleva un tiempo aproximado de 15 minutos para la muestra de quinua.
- Una vez transcurrido el tiempo, el equipo emitirá un sonido, que indica que la termobalanza ha culminado el proceso.
- Registrar el porcentaje de humedad que arroja en la pantalla.

3.5.1.2. Determinación de cenizas

Se determinó mediante técnicas establecidas en el laboratorio de Bromatología.

Procedimiento:

- Tarar los crisoles, sacarlos crisoles con ayuda de las pinzas hacia el desecador
- Pesar los crisoles en una balanza analítica (peso inicial)
- Pesar en los crisoles 3 gramos de la muestra a analizar.
- Llevar los crisoles con la muestra a la mufla y se deja incinerar hasta el día siguiente.
- Introducir en el desecador los crisoles para enfriar
- Pesar los crisoles con la muestra incinerada y registrar.

Cálculos:

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

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 las técnicas del Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos

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.
- Registrar el peso de balón previamente tarado y 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 destilar 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:

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

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. Análisis de fibra cruda

Se realizó mediante técnicas del Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos

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 la bomba de aire 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 la bomba de aire 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 ± 0.1 mg. La cantidad pesada es W1
- Incinerar las muestras de los crisoles en el Horno de mufla a 500°C durante mínimo de 3h.
- Dejar enfriar en desecador.
- Pesar los crisoles con una precisión de ± 0.1 mg. La cantidad pesada es W2
- Realizar el siguiente calculo:

Cálculos:

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

En donde:

% 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*

Para la determinación de proteína se utilizó el método Kjeldahl.

Procedimiento:

- Pesar entre 1- 2gr de muestra seca para introducirla en el balón de digestión Kjeldahl.
- Se añade 1g de sulfato de cobre, 9 g de sulfato de sodio y 25ml de ácido sulfúrico sin manchar las paredes del balón de digestión.

- Se coloca el balón en el digestor y se calentó hasta obtener un líquido color verde esmeralda.
- Una vez obtenida esta tonalidad se deja enfriar el balón, después se adiciono 200ml de agua, 100ml de NAOH y granallas de zinc: procedemos a destilar.
- Recibir el destilado en un vaso conteniendo 100ml de H₃BO₃.
- Se procede a destilar hasta obtener 100ml aproximadamente de destilado.
- Se retira el destilado, se coloca entre 3-4gotas de indicador mixto.
- Se procede a titular el destilado con HCL.

Cálculos:

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

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 leche de quinua*

Para la elaboración de la bebida a base de leche de quinua (*Chepodium quinoa*), se empleó la metodología del Trabajo de Investigación (Graduación) “Desarrollo de una tecnología adecuada para la elaboración de leche de quinua (*Chepodium quinoa*) con adición de prebióticos para consumo de escolares de la parroquia Aloag del Cantón Mejía” (Flores, 2011, p. 36).

Recepción de la materia prima: Las formulaciones se elaboraron con granos o semillas de quinua (*Chenopodium quinoa*) de la empresa maquita productos, esta quinua se recepta en el Laboratorio de Procesos Industriales.

Clasificado: En esta etapa se verifica que los granos de quinua se encuentren en óptimo estado, considerando los requisitos que debe cumplir el grano de quinua (*Chenopodium quinoa*) destinado a consumo humano, que establece la Normativa Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1673:2013.

Eliminación de saponinas: La quinua se lavó con agua potable en un recipiente de acero inoxidable, con ayuda de una manguera, este procedimiento se realizó múltiples veces y se consideró que la quinua se encontraba libre de saponinas una vez que no aparecía espuma en el agua de lavado de la misma.

Secado: Una vez lavados los granos de quinua, se procedió a secarlos con papel absorbente, antes de colocarlos en el horno secador a una temperatura de 50°C, durante toda la noche para su secado.

Molienda: Una vez seca la quinua, fue sometida a molienda, con ayuda del molino eléctrico en el Laboratorio de Procesos Industriales esto para obtener un material fino a manera de harina que facilite la preparación de las formulaciones.

Batido: Este procedimiento se realizó con ayuda de una licuadora, donde se mezcló la harina de quinua con agua y se procedió a licuar durante unos 20 segundos aproximadamente.

Filtración: La solución de harina de quinua y agua fue sometida a filtración con ayuda de un filtro de tela, para obtener la leche de quinua libre de residuos sólidos de la misma.

3.5.3. *Formulación de las bebidas*

Para el estudio se realizaron tres formulaciones con diferentes porcentajes de agua y quinua

Tabla 3-1: Porcentaje de quinua y agua

Formulación	Cantidad de Quinua (%)	Cantidad de Agua (%)
F1	18	82
F2	15	85
F3	27	73

Realizado por: Castillo M, 2024

Tabla 3-2: Ingredientes empleados para las formulaciones de leche de quinua

INGREDIENTES	F1	F2	F3
Quinua	45 g	35 g	65 g
Azúcar	10 g	15 g	15 g
Agua	200 mL	205 mL	175 mL

Realizado por: Castillo M, 2024

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

3.5.4.1. Determinación de mohos y levaduras mediante la técnica de microfast

- Abra la bolsa de papel de aluminio y coloque el MicroFast en una superficie plana y nivelada.
- Levante la película superior mientras sostiene la placa sin tocar el área de prueba.
- Con la pipeta vertical a la superficie de inoculación, dispense 1 ml de suspensión de muestra en el centro de la película inferior.
- Deje caer la película superior lentamente sobre la muestra y la solución se esparcirá automáticamente. Dejar durante al menos un minuto para permitir que la solución se extienda por completo antes de mover la placa a la incubadora.
- Incube las placas MicroFast en posición horizontal con la película hacia arriba en pilas de no más de 20. Incube a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 h para levaduras y 72 ± 2 h para mohos.
- Las colonias de levadura son pequeñas, bien definidas, de color uniforme y rojo violeta. Las colonias de moho son grandes con bordes difusos, el color no es uniforme y la intensidad del color es de rosa claro a rojo violeta.

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
- 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 la técnica de microfast.

- Abra la bolsa de papel de aluminio y coloque el MicroFast en una superficie plana y nivelada.
- Levante la película superior mientras sostiene la placa sin tocar el área de prueba.
- Con la pipeta vertical a la superficie de inoculación, dispense 1 ml de suspensión de muestra en el centro de la película inferior.
- Deje caer la película superior lentamente sobre la muestra y la solución se esparcirá automáticamente. Dejar durante al menos un minuto para permitir que la solución se extienda por completo antes de mover la placa a la incubadora.
- Incube las placas MicroFast en posición horizontal con la película hacia arriba en pilas de no más de 20. Cultive a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 h.
- Las placas de MicroFast se pueden contar visualmente usando un contador de colonias estándar u otra lupa iluminada. Escherichia coli cuenta colonias azules con burbujas, coliformes cuenta colonias azules y rojas con burbujas.

3.5.5. Proceso de fermentación

- Las formulaciones deben ser llevadas a incubación a 35°C durante un tiempo aproximado de 7 días
- Realizar la determinación de pH, índice de acidez y la sacarosa cada 24 horas hasta alcanzar un pH de 4,5
- Realizar el análisis microbiológico de las formulaciones, es decir los indicadores de calidad.

3.5.5.1. Determinación de pH

Se realizó mediante técnicas del Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos

Procedimiento:

- Se toman 50 ml de la muestra a analizar en un vaso de precipitación.
- Se introduce el electrodo del medidor de pH en el vaso de precipitación que contiene la muestra, evitando que se dé el contacto con las paredes del recipiente.
- Esperar hasta que el valor que arroja la pantalla sea constante y registrar.

3.5.5.2. Determinación del índice de acidez

Se determinó mediante las técnicas del Laboratorio de Bromatología y Análisis de Alimentos

Procedimiento:

- Realizar una dilución, en la que consten 50 ml de agua purificada y 10 ml de la muestra.
- Homogenizar y tomar 25 ml de la solución en un matraz Erlenmeyer.
- Colocar 1 o 2 gotas del indicador de fenolftaleína
- Realizar la titulación con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener un color rosado persistente.
- Leer en la bureta el volumen de solución utilizada y registrar.

Cálculos:

$$A = 0.009 \frac{V \times N}{m_1 - m} \times 10$$

En donde:

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:

- Realizar 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 ± 0,5°C durante toda la determinación

- Leer el índice de refracción o el porcentaje en masa de sacarosa.

3.5.5.4. Determinación de *E. coli* mediante la técnica de microfast

- Preparar el agua de peptona 15 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 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.
- **Coliformes:** En el caso de Coliformes, incubar por 24 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- ***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.

3.5.5.5. 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 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

3.5.5.6. Determinación de *Staphylococcus aureus* mediante 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 1 ml de la dilución 10^{-1} en un tubo 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 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.

3.5.6. Técnica de aislamiento y recuento por diluciones

Para realizar el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) se prepara medios de cultivo selectivos, en este caso 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 los ml de 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
- Añadir ácido acético 6 M (inhibidor del crecimiento de hongos) y cicloheximida 2,5 mg/1000 ml (inhibidor del crecimiento de levaduras)
- 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 realiza mediante la NTE INEN 1529-1

Procedimiento:

- Tomar 10 ml de la muestra de la formulación y colocar en un Erlenmeyer, luego homogenizar en 90 ml de solución de peptona
- Preparar disoluciones 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 microaerófilas utilizando el sistema de jarras Gas-Pack

3.5.10. Pruebas bioquímicas para el aislamiento

3.5.10.1. Tinción gram

El procedimiento empleado para la realización de la tinción Gram se lo obtuvo de la tesis que lleva por nombre Caracterización De Microorganismos Con Actividad Antimicrobiana Provenientes De Suelos De Los Cantones Quito Y Rumiñahui (Bastidas et al. 2018, p. 31).

Procedimiento:

- Colocar una gota de agua estéril sobre un portaobjetos

- Con ayuda de un asa de siembra recoger una colonia con crecimiento puro y extenderla 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 segundo y enjuagar
- Finalmente aplicar safranina por 1 minuto y enjuagar.
- Dejar secar al ambiente, colocar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio con el lente de 100x

3.5.10.2. *Catalasa*

El procedimiento empleado para la realizar la prueba de la catalasa se lo obtuvo de la tesis que lleva por nombre *Caracterización De Microorganismos Con Actividad Antimicrobiana Provenientes De Suelos De Los Cantones Quito Y Rumiñahui* (Bastidas et al. 2018, p. 31).

Procedimiento:

- Colocar una gota del peróxido de hidrógeno o H_2O_2 al 3 % sobre un portaobjetos,
- Colocar una pequeña cantidad de nuestra colonia con la ayuda de un asa y esperar a que se forme una emulsión,
- El resultado será positivo siempre y cuando se observe la formación de burbujas.
- Aunque en el caso de las BAL, la usencia de burbujas será un indicativo de que en efecto se trata de bacterias ácido lácticas.

3.5.10.3. *Oxidasa*

El procedimiento empleado para la realizar la prueba de la oxidasa, se lo obtuvo del Trabajo de Titulación *Identificación De Microorganismos De Suelos De La Provincia De Pichincha, Con Capacidad De Producir Antibióticos De Amplio Espectro* (Núñez et al. 2018, p. 29).

Procedimiento:

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

3.5.11. Pruebas de caracterización

3.5.11.1. Prueba de movilidad

El procedimiento empleado para la realizar la prueba de movilidad se lo 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:

- Previamente preparar tubos de ensayo con agar semisólido SIM.
- Tomar una colonia pura con ayuda de una aguja de inoculación.
- 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

El procedimiento empleado para la realizar la prueba de producción de CO₂ a partir de glucosa se lo 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, pág. 30).

3.5.11.3. Formulación del caldo rojo fenol

- Agregar en un Erlenmeyer 1000 ml de agua destilada
- Pesar 12g de peptona
- Pesar 1 g de extracto de carne
- Pesar 5g de cloruro de sodio (NaCl)
- Pesar 0.018g de rojo fenol
- Pesar 10 g de glucosa
- Homogenizar

3.5.11.4. Producción de CO₂ a partir de glucosa

- Colocar 10 mL del caldo rojo fenol en un tubo de ensayo estéril que contiene en su interior un tubo Durham con la abertura hacia abajo

- Autoclavar los tubos de ensayo a 121 °C por 15 minutos, sin exceder este tiempo ya que el carbohidrato puede sufrir la reacción de Maillard
- Con el asa de inoculación tomar una cepa aislada e inocularla en el caldo
- Incubar a 32°C por 48 horas y observar la fermentación y producción de CO₂

3.5.11.5. Crecimiento a diferentes temperaturas

El procedimiento empleado 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, pág. 31).

Procedimiento:

- Colocar 5 ml del caldo MRS en tubos de ensayo previamente esterilizados
- Con ayuda de un asa de inoculación colocar una colonia pura en el tubo y homogenizar
- Incubar a 10°C y 45°C durante 24 horas
- Reportar como positivo (+) cuando exista presencia de turbidez

3.5.11.6. Tolerancia a distintos pH

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, pág. 32).

Procedimiento:

- Colocar 5 ml de caldo MRS en tubos de ensayo previamente esterilizados
- Ajustar el pH a 4.4 con la ayuda de ácido acético 5M
- En los otros tubos ajustar el pH a 9.6 con ayuda de hidróxido de sodio (NaOH) 2M
- Incubar durante 48 horas a 32°C y reporta si la prueba es positiva si se observa crecimiento

CAPÍTULO IV

4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

Para esta investigación se han efectuado múltiples determinaciones cuantitativas y cualitativas, orientadas a determinar si existe la presencia de bacterias ácido lácticas en la bebida fermentada a base de leche de quinua, para lo cual se efectuaron diferentes pruebas por duplicado.

4.1.1. Análisis proximal de la materia prima

Tabla 4-1: Análisis Proximal de la materia prima

DETERMINACIÓN	UNIDAD	CANTIDAD
Humedad	%	11,8
Ceniza	%	2,90
Grasa	%	6,4
Fibra cruda	%	6,7
Proteína	%	10,3

Realizado por: Castillo M., 2024

4.1.1.1. Humedad

Como se sabe la mayoría de los alimentos dentro de su composición contienen agua en grandes cantidades, resultando así la determinación de la humedad en un parámetro fundamental con el que se garantiza el control, conservación y procesamiento de los alimentos en esta industria.

Ahora bien, se obtuvo un porcentaje de humedad del 11,8 % el cual se encuentra dentro del rango que establece la norma NTE INEN 1667 ya que en dicha norma se establece que el grano de quinua dentro de los requisitos bromatológicos debe cumplir con un porcentaje de humedad máximo de 13,5%, por lo que una vez realizada la determinación de humedad, se puede establecer que el grano de quinua en efecto cumple con el porcentaje de humedad que debe tener para el consumo humano o en este caso para la elaboración de las formulaciones (NTE INEN 1673:2013, p. 2).

4.1.1.2. Cenizas

De acuerdo a un informe sobre la determinación de cenizas es referida como un análisis de residuos inorgánicos que quedan después de la ignición u oxidación completa de la materia orgánica de un alimento, a la vez constituye uno de los análisis imprescindibles en los estudios de calidad y caracterización dentro de la industria de alimentos (Arriaga, L et al., 2022, p. 1).

Una vez realizada la determinación de cenizas en la quinua mediante el método de incineración en mufla se obtuvo un porcentaje de 2,90%, el mismo que se encuentra similar al del estudio Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa w*) variedad piartal en los andes colombianos, (Romo et al., 2007, p.49), donde se obtuvo un porcentaje de cenizas de 2,72% el mismo que a más de ser similar al de la investigación, coincide con el establecido por la norma NTE INEN 1673 establece que debe ser un valor máximo de 3,5%, en tanto se encontraría dentro del rango.

4.1.1.3. Grasa

La determinación de grasas constituye uno de los análisis fundamentales en de la industria alimentaria, dentro de los análisis realizados, se obtuvo un porcentaje de grasas del 6,4 % el cual coincide con lo que establece la FAO, la quinua contiene más grasas (6,3 g) por cada 100 g de peso en seco en comparación con los frijoles (1,1 g), el maíz (4,7 g), el arroz (2,2 g) y el trigo (2,3 g). Las grasas son una importante fuente de calorías y facilitan la absorción de vitaminas liposolubles, (FAO, 2013, p. 1) a la vez el porcentaje de grasas coincide con lo que establece la norma NTE INEN 1673 la cual establece que el porcentaje mínimo de grasa debe ser de 4,0 % por lo que se considera que esta dentro del rango según la norma.

4.1.1.4. Fibra cruda

La fibra cruda se suele emplear habitualmente para evaluar la calidad de los alimentos de origen vegetal partiendo de la premisa de que constituye su parte menos digerible (Möller, 2014, p. 2). Al realizar la determinación de fibra cruda para la quinua, se obtuvo un porcentaje de 6,7%, el mismo que es similar al de un estudio que lleva por nombre Bocadito con alto contenido proteico: un extruido a partir de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*), tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) y camote (*Ipomoea batatas L.*), (Pérez et al., 2017, p. 382) en donde se realizó un análisis de la composición química de las materias primas y se obtuvo un porcentaje fibra cruda para la quinua blanca de Junín de 5,7% el cual es similar al obtenido en la investigación y a la vez estaría dentro

del rango que establece la normativa NTE INEN 1673 la cual menciona que el porcentaje de fibra cruda debe ser como mínimo de un 3,0% y no establece el valor máximo, por lo que se considera que el valor obtenido en la investigación en efecto estaría dentro del rango.

4.1.1.5. Proteína

La quinua es un alimento con un aporte proteico muy alto, y distinto al de los otros cereales. En general, “todos los cereales aportan proteínas, pero la quinoa aporta más”, explica Elena Maestre, miembro del Colegio de Dietistas-Nutricionistas de Catalunya (Castanyer, 2021, p. 1). En la investigación se obtuvo un porcentaje de proteína para la quinua de 10,3 %, el mismo que al comparar con lo que establece la FAO, donde menciona que la cantidad de proteínas en la quinua depende de la variedad, con un rango comprendido entre un 10,4 % y un 17,0 % de su parte comestible (FAO, 2013, p.1) se puede establecer de igual manera que se encuentra dentro del rango con lo que establece la normativa NTE INEN 1673, la misma que establece que el porcentaje de proteína para la quinua debe ser como mínimo de 10,0 % , por lo que se puede establecer que el porcentaje sí cumple.

4.1.2. Análisis físico-químico y microbiológico de las formulaciones

4.1.2.1. Análisis físico-químico

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

Requisito	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
Color	Blanco Turbio	Blanco turbio	Blanco turbio
Consistencia	Líquida	Líquida	Espesa
Porcentaje de quinua	18%	15%	27%
pH	4,49	4,50	4,51
Grados Brix	7,2	7,0	7,5

Realizado por: Castillo M., 2024

En lo que refiere a los requisitos físico-químicos que debían cumplir las formulaciones a base de leche de quinua, se compararon con lo que establece la normativa NTE INEN 2 337:2008 jugos, pulpas, concentrados, nectares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos. Para lo cual se establecía en dicha norma que el contenido de fruta, en este caso de la quinua no debe ser menor al 10% por lo que en este caso la formulación 1 constaba de un 18% de quinua, la formulación 2 de un 15% de quinua, la formulación 3 con un 27% de quinua, con lo cual se cumplía con este requisito, de

igual manera las 3 formulaciones conservaban las características sensoriales propias de la quinua al igual que el color era un blanco distintivo de la quinua, la consistencia de las formulaciones aumentaba conforme se aumentaba el porcentaje de quinua, teniendo así a la formulación 3 como la más espesa.

En lo que respecta al pH se denota que lograron cumplir con el requisito que menciona que este debe ser inferior a 4,5 muy a pesar de que se quería de un pH de 4,5 para considerar que las formulaciones se encontraban fermentadas, para la formulación 1 se tuvo un pH de 4,49, para la formulación 2 se obtuvo un pH de 4,50 y para la formulación 3 un pH de 4,51. La normativa mencionaba que los grados brix o sólidos solubles de la bebida serán proporcionales al aporte de fruta y así se evidenció en cada una de las formulaciones acorde al porcentaje de quinua que presentaban.

4.1.2.2. Análisis microbiológico

Tabla 4-3: Análisis microbiológico de las formulaciones

Determinación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Nivel de Aceptabilidad	NTE INEN
Coliformes NMP/cm³	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 UP/cm³	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 10	NTE INEN 1529-10

Realizado por: Castillo M., 2024

Los resultados para el análisis microbiológico en las formulaciones fueron corroborados con lo que establece la NTE INEN 2337: 2008 jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos. Ahora bien, los resultados obtenidos tanto para coliformes, coliformes fecales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras denotaron ausencia para las tres formulaciones, lo cual da a entender que las formulaciones en efecto se prepararon bajo las mejores condiciones

higiénicas y asépticas, con lo cual se garantiza que las formulaciones se encuentran aptas para el consumo humano.

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

4.1.3.1. Determinación de pH

Para la medición del pH en las formulaciones se dejó transcurrir un tiempo aproximado de 24 horas para que el proceso de fermentación tenga lugar, teniendo a las formulaciones expuestas a una temperatura de 35°C en la estufa luego de haber sido pasteurizadas.

Obteniendo así los siguientes resultados como lo indica la tabla 10-4

Tabla 4-4: Resultado del pH tomado a diferentes horas a cada una de las formulaciones

FORMULACIONES	pH			
	24h	36h	48h	60h
F1	6,89	5,84	4,98	4,49
F2	6,91	5,75	4,88	4,50
F3	6,83	5,92	4,89	4,51

Realizado por: Castillo M., 2024

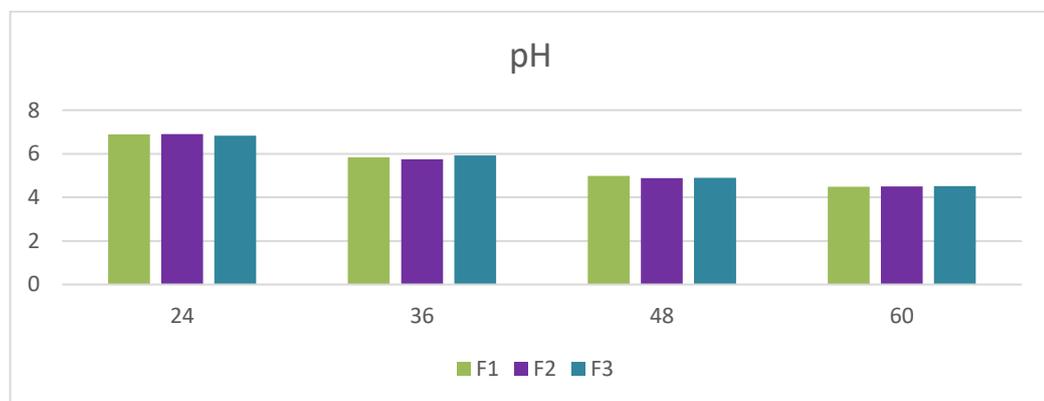


Ilustración 4-1: Determinación del pH

Realizado por: Castillo M., 2024

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y multiplicación de los microorganismos durante la preparación, almacenamiento y distribución (Chemical, 2022, p. 1); además de que el pH ayuda a la conservación de los alimentos, inhibiendo así el crecimiento de diferentes bacterias (Chavarrías, 2013, p. 1) que pueden resultar perjudiciales para la salud. La mayoría de las bacterias crecen bien a un rango de

pH de 4.5 a 9 (Chemical, 2022, p. 1). Para el caso de las bebidas se utilizó una fermentación láctica, obteniendo, así como resultado de esta fermentación al ácido láctico, el cual es uno de los indicativos de que existe la presencia de bacterias ácido-lácticas en la formulación. Como resultado de la medición de pH para las tres formulaciones luego de 60 horas, se obtuvieron los siguientes: F1 4.49, F2 4,50 y F3 4.51.

4.1.3.2. Determinación del índice de acidez

Tabla 4-5: Valores de la determinación del índice de acidez

	F1	F2	F3
24	0.1	0.2	0.1
36	0.3	0.3	0.3
48	0.5	0.4	0.5
60	0.6	0.6	0.7

Realizado por: Castillo M., 2024

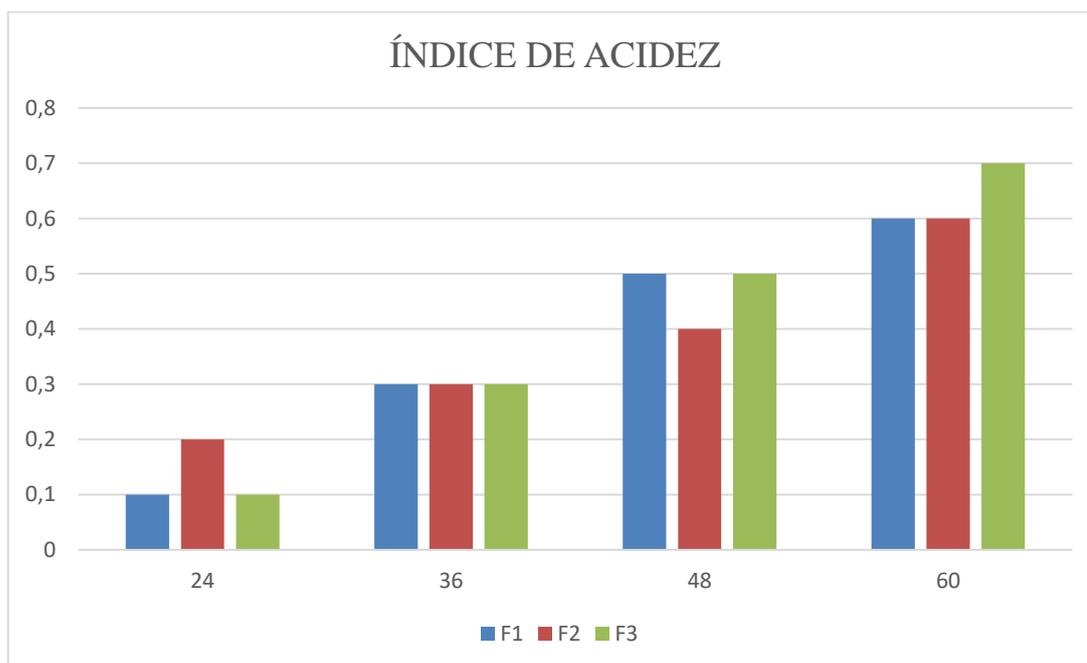


Ilustración 4-2: Valoración del índice de acidez

Realizado por: Castillo M., 2024

El índice de acidez (IA) o Valor ácido se define como la cantidad de mililitros de hidróxido de sodio (NaOH) necesaria para neutralizar (Rodríguez et al, 2016, pág. 844) el ácido presente en una muestra analizada. Es por ende que se puede indicar que el volumen de NaOH va a ir en aumento a medida que el pH de las formulaciones disminuye.

4.1.3.3. Determinación de sólidos solubles

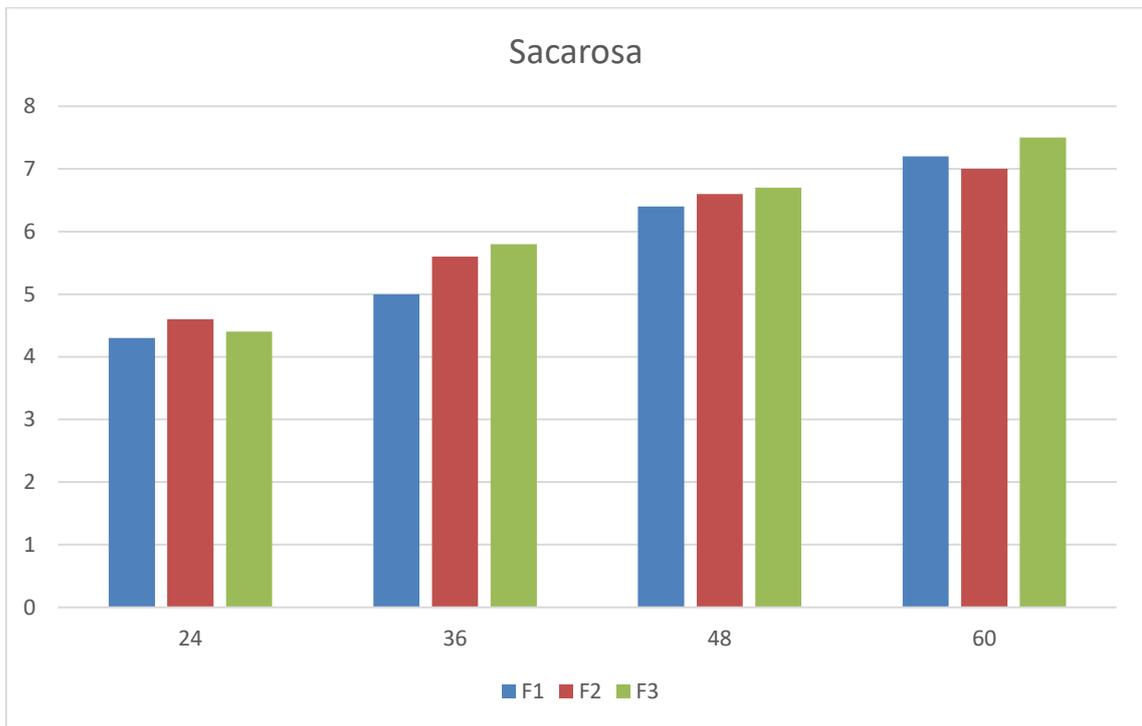


Ilustración 4-3: Valoración de sólidos solubles

Realizado por: Castillo M., 2024

El contenido de sólidos solubles se determina a través del índice de refracción. Este método se emplea para determinar la concentración de sacarosa de estos productos. La concentración de sacarosa se expresa mediante los grados °Brix a una temperatura de 20° C. (CIED et al., 2013, p. 1).

Para el caso de las formulaciones a las 60 horas se obtuvieron, para la formulación 1 un valor de 7,2 la misma que contenía un 18% de quinua, para la formulación 2 un valor de 7,0 para un porcentaje de 15% de quinua y para a formulación 3 un valor de 7,5 con un porcentaje del 27% de quinua, con lo cual se corrobora lo que establece la NTE INEN 2337: 2008 jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos, donde menciona que los grados brix o solidos solubles de la bebida serán proporcionales al aporte de fruta y así se evidenció en cada una de las formulaciones acorde al porcentaje de quinua que estas presentaban.

4.1.3.4. Determinación de indicadores de calidad

Tabla 4-6: Determinación de indicadores de calidad

Determinación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Nivel de Aceptabilidad	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	4	6	5	< 10	NTE INEN 1529-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	UNE-EN ISO 6888-2

Realizado por: Castillo M., 2024

Se obtuvieron los resultados de los análisis microbiológicos realizado a las bebidas después de la fermentación de estas, como se indica en la tabla cada uno de los análisis realizados tiene su normativa específica.

Los análisis de los indicadores de calidad se los debe realizar para saber que las condiciones del producto son las óptimas para su consumo, por ende, se menciona que los indicadores de calidad microbiológicos son los análisis de la presencia de microorganismos en los alimentos frescos y procesados, con la finalidad de determinar la carga microbiana y decidir si es apto para su consumo humano en la medida que cumpla con los estándares establecidos (Casilla, 2020, pág. 23).

4.1.4. Aceptabilidad de las formulaciones

4.1.4.1. Resultado de aceptabilidad

Se evaluaron las tres formulaciones realizadas de las bebidas, mediante una prueba hedónica, para así poder identificar la formulación óptima, por lo cual se tuvo la participación de 30 estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Los resultados se muestran en la tabla a continuación (tabla 11-4) y el modelo de encuesta aplicada se puede observar en el apartado de anexos.

Tabla 4-7: Resultado obtenido de la encuesta de aceptabilidad mediante la prueba hedónica.

Puntuación	F1	F2	F3
Me gusta muchísimo	13	20	5
Me gusta mucho	6	8	3
Ni me gusta ni me desagrada	7	2	15
No me gusta	4		5
Me disgusta			2

Realizado por: Castillo M., 2024



Ilustración 4-4: Valoración de encuestas

Realizado por: Castillo M., 2024

La encuesta aplicada a los estudiantes de octavo nivel “A” de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, dio como resultado que la formulación 2 (F2) se obtuvo 20 respuestas favorables en el criterio “me gusta muchísimo” de un total de 30 encuestados; 13 personas seleccionaron a la formulación 1 (F1) como la mejor y las 5 personas restantes mencionaron que la formulación 3 (F3) fue la mejor para ellos.

Concluyendo así que la formulación con mejor aceptabilidad según la prueba hedónica aplicada a los estudiantes es la formulación 2 (F2).

4.1.5. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido-lácticas

4.1.5.1. Tinción gram, catalasa y oxidasa

Se realizó la prueba de tinción Gram en un total de 16 colonias, de las cuales 8 pertenecían a cultivos de agar MRS y 8 a cultivos de agar M17, como se muestra a continuación:

Tabla 4-8: Resultado de pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido-lácticas

COLONIA	TINCIÓN GRAM	CATALASA	OXIDASA
BAL 1 (MRS)	Bacilos (+)	-	-
BAL 2 (MRS)	Bacilos (+)	-	-
BAL 3 (MRS)	Cocobacilos (+)	-	-
BAL 4 (MRS)	Cocobacilos (+)	-	-
BAL 5 (MRS)	Bacilos (+)	-	-
BAL 6 (MRS)	Bacilos (+)	-	-
BAL 7 (MRS)	Cocobacilos (+)	-	-
BAL 8 (MRS)	Bacilos (+)	-	-
BAL 1 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 2 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 3 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 4 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 5 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 6 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 7 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 8 (M17)	Cocos (+)	-	-

Realizado por: Castillo M., 2024

Como se puede denotar se dio el crecimiento de colonias tanto para el medio de cultivo MRS como para M17, sin embargo, las colonias de cada medio tenían características que distinguían a las unas de las otras, las colonias del medio MRS eran más pequeñas, una elevación menos pronunciada que las del medio M17, se denotaban menos lechosas, contrario a las colonias del medio M17 donde las colonias eran más grandes, más definidas y con una apariencia más lechosa, de igual manera las BAL denotaban un olor característico a lácteo. En lo que refiere a la morfología estas pueden ser tanto cocos, cocobacilos o bacilos, el medio de cultivo MRS es apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos por lo cual en su morfología destacaban tanto bacilos como cocobacilos, mientras que el medio M17 es útil para el cultivo y conteo de

estreptococos lácticos destacando así en su morfología cocos, esta información se puede corroborar con lo que establece Ricardo Adolfo Parra Huertas en su investigación que lleva por nombre review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos (Parra, 2010, p. 102), donde menciona que las bacterias ácido lácticas son Grampositivas, son cocos y bacilos de longitud variable y de un grosor de 0.5 - 0.8 μm .

En lo que se refiere a pruebas de oxidasa y catalasa todas las colonias arrojaron resultados negativos con lo cual se corrobora que se trata de bacterias ácido lácticas, ya que en bibliografía refiere que las bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos que se caracterizan por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Son cocos o bacilos Gram positivos, no forman esporas, inmóviles, anaerobios o microaerófilos y son oxidasa y catalasa negativos. (Requena, 2018, p. 1) con lo cual se puede comprobar que en efecto las colonias pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas.

4.1.6. Pruebas de caracterización de bacterias ácido-lácticas

4.1.6.1. Prueba de movilidad

Tabla 4-9: Movilidad de las BAL

MOVILIDAD	COLONIA
-	BAL 1 (MRS)
-	BAL 2 (MRS)
-	BAL 3 (MRS)
-	BAL 4 (MRS)
-	BAL 5 (MRS)
-	BAL 6 (MRS)
-	BAL 7 (MRS)
-	BAL 8 (MRS)
-	BAL 1 (M17)
-	BAL 2 (M17)
-	BAL 3 (M17)
-	BAL 4 (M17)
-	BAL 5 (M17)
-	BAL 6 (M17)
-	BAL 7 (M17)
-	BAL 8 (M17)

Realizado por: Castillo M., 2024

En lo que respecta al ensayo de movilidad, se pudo denotar que las BAL analizadas no poseen movilidad dado a que no se presenció crecimiento fuera del área de inoculación, esto se puede corroborar con lo que establece (Parra, 2010, p. 102), *Las bacterias ácido lácticas son Gram-positivas, formadoras de no esporas, no motilidad, forma de cocos y carencia de catalasa*, constituyendo así la motilidad en una característica propia de estas bacterias.

4.1.6.2. Crecimiento a diferentes temperaturas

Tabla 4-10: Crecimiento de BAL a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Medio de cultivo	Tiempo (h) de crecimiento		Porcentaje de crecimiento (%)
		24h	48h	
30	MRS	no	Sí	100%
30	MRS	no	Sí	
30	MRS	no	sí	
30	MRS	no	sí	
37	MRS	sí	-	
37	MRS	sí	-	
37	MRS	sí	-	
37	MRS	sí	-	
30	M17	sí	-	100%
30	M17	sí	-	
30	M17	sí	-	
30	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	

Realizado por: Castillo M., 2024

En el trabajo titulado Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico realizado por Sánchez y Tromps en el año 2014 se muestran como resultado el crecimiento de las bacterias ácido lácticas a diferentes temperaturas, teniendo así: 15°C, 30°C, 37°C y 45°C; para este caso se tomaron como referencias a las temperaturas mencionadas en la tabla 14-4, concordando así que las BAL crecen a diferentes temperaturas, a pesar que las del medio de cultivo MRS se tardaron un poco más en crecer a una temperatura de 30°C (Sánchez & Tromps, 2014, p. 126)

4.1.6.3. Tolerancia a distintos pH

Tabla 4-11: Tolerancia a distintos pH

pH	Medio de cultivo	Tiempo (h) de crecimiento		Porcentaje de crecimiento (%)
		24h	48h	
5.4	MRS	no	Sí	100%
5.4	MRS	no	Sí	
5.4	MRS	no	sí	
5.4	MRS	no	sí	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
5.4	M17	sí	-	100%
5.4	M17	sí	-	
5.4	M17	sí	-	
5.4	M17	sí	-	
4.5	M17	sí	-	
4.5	M17	sí	-	
4.5	M17	sí	-	

Realizado por: Castillo M., 2024

En el trabajo ya antes mencionado, titulado Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico realizado por (Sánchez & Tromps, 2014) se muestran como resultado el crecimiento de las bacterias ácido lácticas a diferentes pH, teniendo así: pH 3.4; 5 y 6.

En base a esto todos los medios de cultivos sometidos a diferentes pH lograron tener un crecimiento óptimo, pudiendo denotarse una similitud entre lo expuesto en la tabla 15-4 y lo mencionado en dicho estudio (Sánchez & Tromps, 2014, p. 126).

4.1.6.4. Producción de CO₂ a partir de glucosa

Las BAL pueden ser de diferentes tipos, pero en este caso existió la presencia de cocos, cocabacilos y bacilos, por lo cual son BAL homofermentativas, teniendo como producto final solamente al ácido láctico, evitando así la producción de gas por parte de las bacterias, como menciona en su trabajo de titulación realizado en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Las bacterias ácido lácticas homolácticas producen ácido láctico casi exclusivamente como producto final bajo condiciones estándar. Los géneros de BAL homolácticas son: *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* *Vagococcus* y algunas especies de los géneros *Lactobacillus* (Chisag, 2022, p. 15)

CONCLUSIONES

- Mediante los diferentes ensayos ejecutados, se pudo realizar el análisis proximal en los granos de quinua (*Chenopodium quinoa*), arrojando así que la quinua de la empresa maquila productos tiene un porcentaje de humedad 11,8 %, cenizas un 2,90% , grasas 6,4%, fibra cruda 6,7% y un 10,3% de proteína, lo que la vuelve óptima para la preparación de formulaciones de leche de quinua y a la vez cumple con los requisitos bromatológicos que establece la normativa NTE INEN 1673:2013
- Se ensayaron tres formulaciones de bebidas fermentadas a base de leche de *Chenopodium quinoa*, las cuales en su composición tenían 18, 15 y 27 % de quinua. Estas bebidas fueron sometidas a un análisis físico, químico y microbiológico de acuerdo a lo que establece la normativa técnica ecuatoriana NTE INEN 2337 para posteriormente ser llevadas a un proceso de fermentación espontánea, durante el proceso de fermentación se analizaron parámetros químicos como determinación de pH, índice de acidez y sólidos solubles, considerando que las formulaciones debían tener un pH ideal de 4,5 que propicie la proliferación de microorganismos de carácter láctico. Posterior al proceso de fermentación, se realizaron las pruebas de indicadores de calidad con lo cual se garantizó que las formulaciones se encontraban aptas para el consumo humano y a la vez para la realización de la prueba hedónica, mediante la cual se escogería a la formulación 2 (F2) como la más óptima.
- Fue posible la determinación de las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de la formulación optimizada, que en este caso fue la formulación 2 seleccionada por los catadores mediante las pruebas de aceptabilidad, con estos análisis se garantiza la calidad de la formulación a la vez que esta se encuentra apta para el consumo humano.
- Mediante la realización de pruebas bioquímicas como tinción Gram, catalasa y oxidasa fue posible la identificación de bacterias ácido lácticas, teniendo así que en la morfología pueden ser coco, cocobacilos o bacilos Grampositivos, mediante las pruebas de catalasa y oxidasa negativas se corrobora que se trata de bacterias ácido lácticas, de igual manera se llevaron a cabo pruebas de caracterización, como la prueba de movilidad cuyo resultado fue negativo y esto contribuye a ser una característica de este tipo de bacterias, de igual manera se corroboró que las bacterias ácido lácticas pueden crecer a diferentes temperaturas e igual tolerar diferentes pH.
- En lo que se refiere a la generación de CO₂ al tratarse de bacterias homolácticas, no se produce la generación de este gas, resultando así en una característica igual de este tipo de

bacterias y contribuyendo así a la técnica de screening para bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica.

RECOMENDACIONES

- Profundizar la investigación en base a los resultados obtenidos de este estudio, dado que en efecto los granos de quinua al contar con bacterias ácido lácticas, constituyen un potencial para futuras investigaciones donde se les pueda dar mayor provecho e inclusive constituir una alternativa alimentaria que ayude a la salud digestiva.
- Mediante técnicas moleculares para la determinación de las especies de bacterias ácido lácticas se podría complementar la identificación de este tipo de bacterias.
- Prolongar el tiempo de fermentación de este tipo de bebidas para poder saber el alcance que podría llegar a tener

BIBLIOGRAFÍA

1. **AGAR, María.** Probióticos: Qué son y cómo benefician a la salud. *Clínica Alemana*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.clinicaalemana.cl/articulos/detalle/2021/probioticos-que-son-y-como-benefician-a-la-salud>
2. **ÁLVAREZ, Guillermo et al.** Dieta y microbiota [en línea]. 2021. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112018001200004
3. **ARRIAGA, Leandro et al.** Determinación de ceniza y humedad - determinación de ceniza y humedad en los alimentos [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.studocu.com/es-mx/document/instituto-tecnologico-de-tapachula/analisis-de-alimentos/determinacion-de-ceniza-y-humedad/45632762>
4. **BASTIDAS, Yomaira et al.** Caracterización de microorganismos con actividad antimicrobiana provenientes de suelos de los cantones Quito y Rumiñahui. [en línea]. 2018. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/16074>
5. **BIOITHAS.** Dieta y microbiota: mala digestión, obesidad y probióticos. [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.bioithas.com/dieta-microbiota-mala-digestion-obesidad/> Una mala dieta afecta a nuestra microbiota y causarnos problemas, como una mala digestión u obesidad. Conoce cómo los probióticos te ayudan.
6. **BOTANICAL, Masats.** Características de la quinoa. *Botanical-online*. [en línea]. 2019. Disponible en: <https://www.botanical-online.com/botanica/quinoa-caracteristicas> Excelente estudio sobre la quinoa, características de la planta, del grano, variedades, composición, propiedades y usos en la alimentación.
7. **BRAVO, María.** Probióticos: qué son, tipos y beneficios. *Ultra Levura*. [en línea]. 2008. Disponible en: <https://www.ultralevura.com/probioticos/> Descubre qué son los probióticos, para qué sirven, beneficios, características, los tipos de probióticos que existen... Aquí toda la información
8. **CABANILLAS, Luis et al.** Bebidas fermentadas mexicanas: ¿benéficas para la salud? *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)*. [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.ciad.mx/bebidas-fermentadas-mexicanas-beneficas-para-la-salud/>

9. **CAMARENA, Isaac et al.** Probióticos como suplemento alimenticio y su efecto en enfermedades gastrointestinales | Acta de Ciencia en Salud. [en línea]. 2022. Disponible en: <https://actadecienciaensalud.cutonala.udg.mx/index.php/ACS/article/view/104> diseases.
10. **CASTANYER, María.** Todo sobre la quinoa: qué es, propiedades y beneficios. *Mundo Deportivo*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.mundodeportivo.com/vidae/nutricion/20210722/410628871164/quinoa-proteina-propiedades-beneficios-act-pau.html>
11. **CIED.** Determinación de sólidos solubles. *Cursos gratis*. [en línea]. 2013. Disponible en: <https://conocimientosweb.net/dcmt/ficha19948.html>
12. **CISNEROS, Alvaro et al.** Estudio de prefactibilidad para la instalación de una planta industrial de leche de quinua saborizada.. [en línea]. 2020. Disponible en: <https://repositorio.ulima.edu.pe/handle/20.500.12724/12769>
13. **FAO.** Valor nutricional- International Year of Quinoa 2013. [en línea]. 2013. Disponible en: https://www.fao.org/quinoa-2013/what-is-quinoa/nutritional-value/es/?no_mobile=1
14. **FLORES, Jorge.** Desarrollo de una tecnología adecuada para la elaboración de leche de quinua (chequium quinoa) con adición de prebióticos para consumo de escolares de la parroquia Aloag del cantón Mejía [en línea]. 2011. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/3267>
15. **NOA.** Diferencias entre bebidas fermentadas y destiladas. *Noa Drinks*. [en línea]. 2023. Disponible en: <https://noadrinks.com/blogs/news/bebidas-fermentadas-y-bebidas-destiladas-cuales-son-mas-sanas>
16. **NORMAS INEN.** Mucho Mejor Ecuador, [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.muchomejorecuador.org.ec/tag/normas-inen/>
17. **NÚÑEZ, José et al.** Identificación de microorganismos de suelos de la provincia de Pichincha, con capacidad de producir antibióticos de amplio espectro. [en línea]. 2022. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15186>

18. **ODS.** Office of Dietary Supplements - Probióticos. *Probióticos*. [en línea]. 2022. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Probiotics-DatosEnEspañol/>.
19. **ORGAZ, Gabriela.** Adaptación de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) a las condiciones agroecológicas de la zona centro peninsular. [en línea]. 2020. Disponible en: <https://oa.upm.es/65953/east=-2.6405659north=41.068032name>
20. **PARRA, Ricardo.** Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. June 2010. Vol. 8, no. 1, p. 93–105.
21. **POLANCO, Ilan.** Microbiota y enfermedades gastrointestinales. *Anales de Pediatría*. 1 December 2015. Vol. 83, no. 6, p. 443.e1-443.e5.
22. **REQUENA, Teresa.** Bacterias lácticas en la alimentación y en la salud. Online. 2018. [en línea]. 2018. Disponible en: <https://digital.csic.es/handle/10261/194782>,
23. **ROMO, Sandra et al.** Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa* w) variedad piartal en los andes colombianos primera parte. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 1 June 2006. Vol. 4, no. 1, p. 112–125.
24. **SMITH, Katheryn.** ¿Qué son las bacterias acidolácticas? [en línea]. 2018. Disponible en: <https://infoalimentos.org.ar/temas/salud-y-alimentos/98-las-bacterias-acidolacticas>
25. **VARGAS, Jhoana.** Evaluación microbiológica comparativa del queso de hoja tradicional elaborado en una planta industrial y en una artesanal de la ciudad de Latacunga. [en línea]. 2018. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/8834>
26. **VEGAN, Vegan et al.** Leche de quinoa: propiedades y receta leche casera. *Vegan Milker*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.veganmilker.com/leche-de-quinoa-propiedades-y-receta-leche-casera/>



ANEXOS

ANEXO A: ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA (*Chenopodium quinoa*)



a)



b)



c)



d)



e)

- a) Termobalanza para determinación de cenizas
- b) Pesaje para determinación de cenizas
- c) Pesaje para determinación de fibra
- d) Determinación de proteínas
- e) Rotavapor para determinación de grasas.

ANEXO B: ELABORACIÓN DE LA BEBIDA A BASE DE LECHE DE QUINUA



a)



b)



c)



d)



e)



f)



g)



h)

- a) Materia prima (quinua) para la elaboración de las bebidas
- b) Clasificado de la materia prima
- c) eliminación de saponinas
- d) Secado de la materia prima
- e) Proceso de molienda
- f) Batido de la materia prima con agua y adición de azúcar
- g) Filtración
- h) Envasado y pasteurización de las bebidas

ANEXO C: PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS



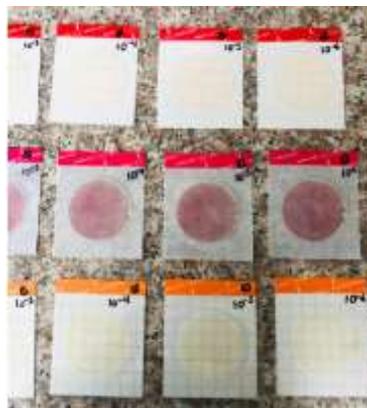
a)



b)



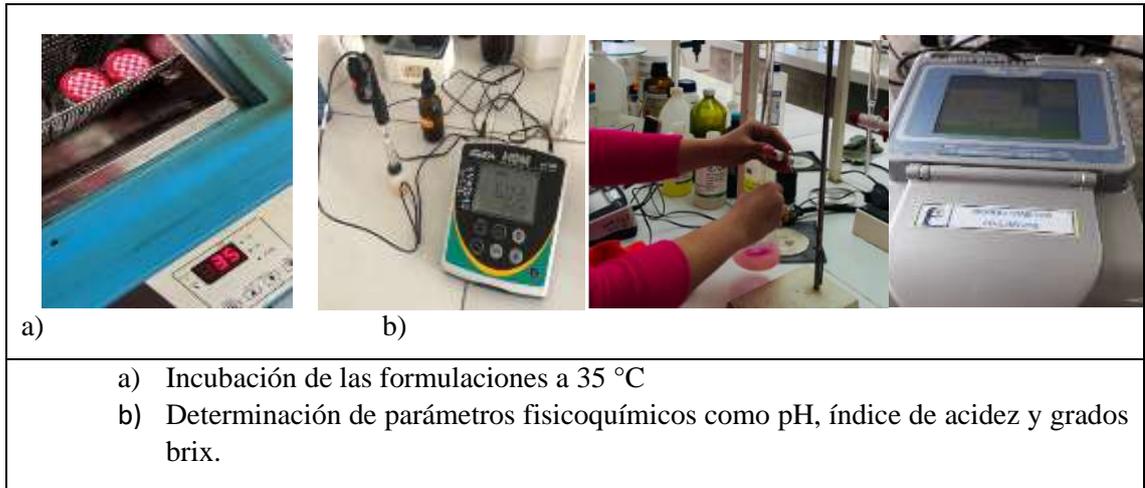
c)



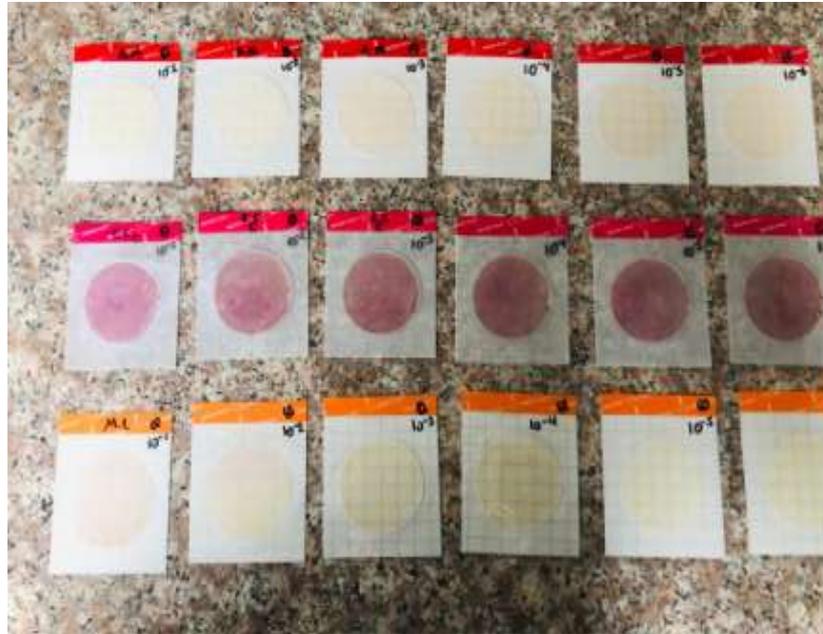
d)

- a) Determinación del pH.
- b) Determinación del índice de acidez.
- c) Determinación de sólidos solubles.
- d) Determinación de parámetros microbiológicos (aerobios mesófilos, coliformes, mohos y levaduras)

ANEXO D: PROCESO DE FERMENTACIÓN.



ANEXO E: DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD



a)

a) Determinación de indicadores de calidad mediante técnica de Microfast (aerobios mesófilos, coliformes, *Staphylococcus aureus*)

ANEXO F: PREPARACIÓN DE DILUCIONES



a)



b)

- a) Materiales para la preparación de diluciones
- b) Preparación de diluciones

ANEXO G: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



a)



b)



c)

- a) Medio selectivo MRS
- b) Medio selectivo M17
- c) Preparación y pesaje de los medios de cultivo

ANEXO H: SIEMBRA EN AGARES SELECTIVOS



a)

a) Siembra en superficie con asa de digralsky

ANEXO I: COLONIAS EM AGAR MRS Y M17



a)



b)

- a) Colonias en Agar MRS
- b) Colonias en Agar M17

ANEXO J: ENRIQUECIMIENTO EN CALDO MRS

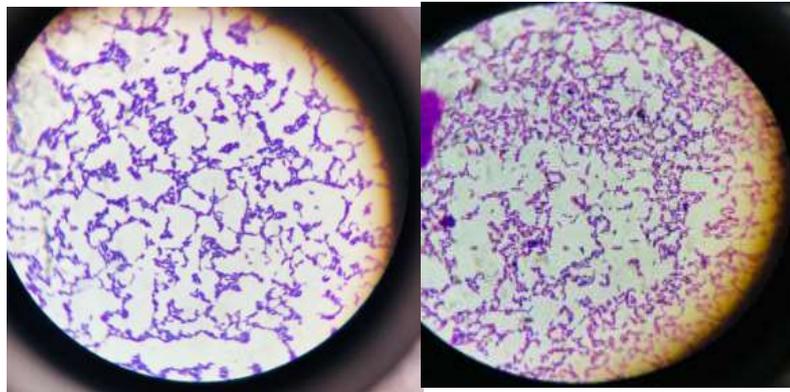
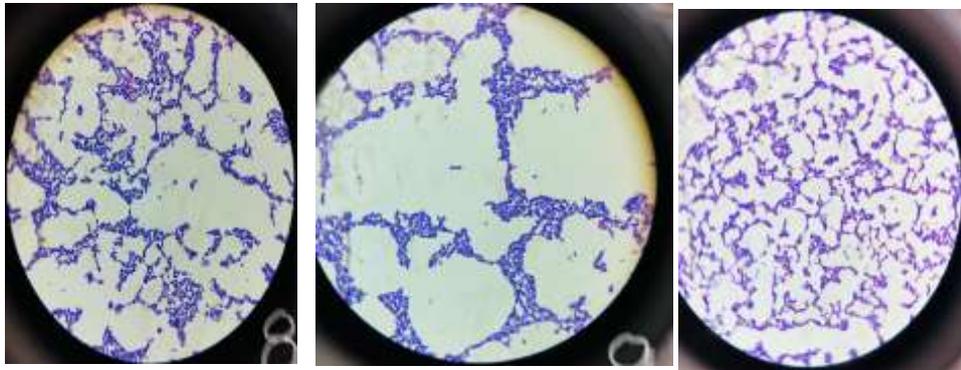
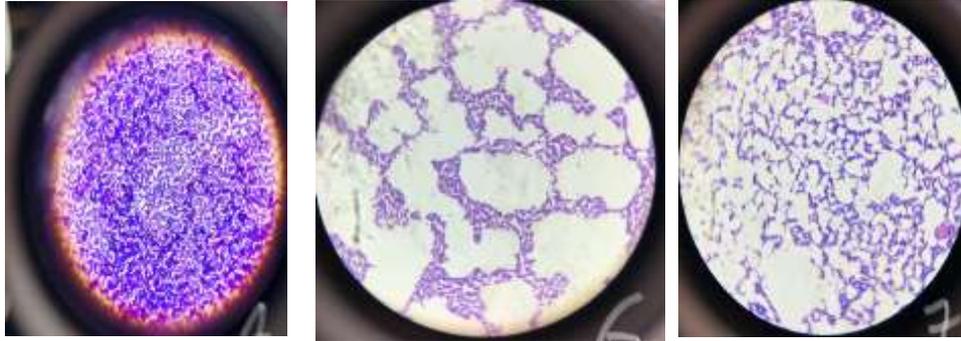


a)

a) Enriquecimiento de colonias en caldo MRS

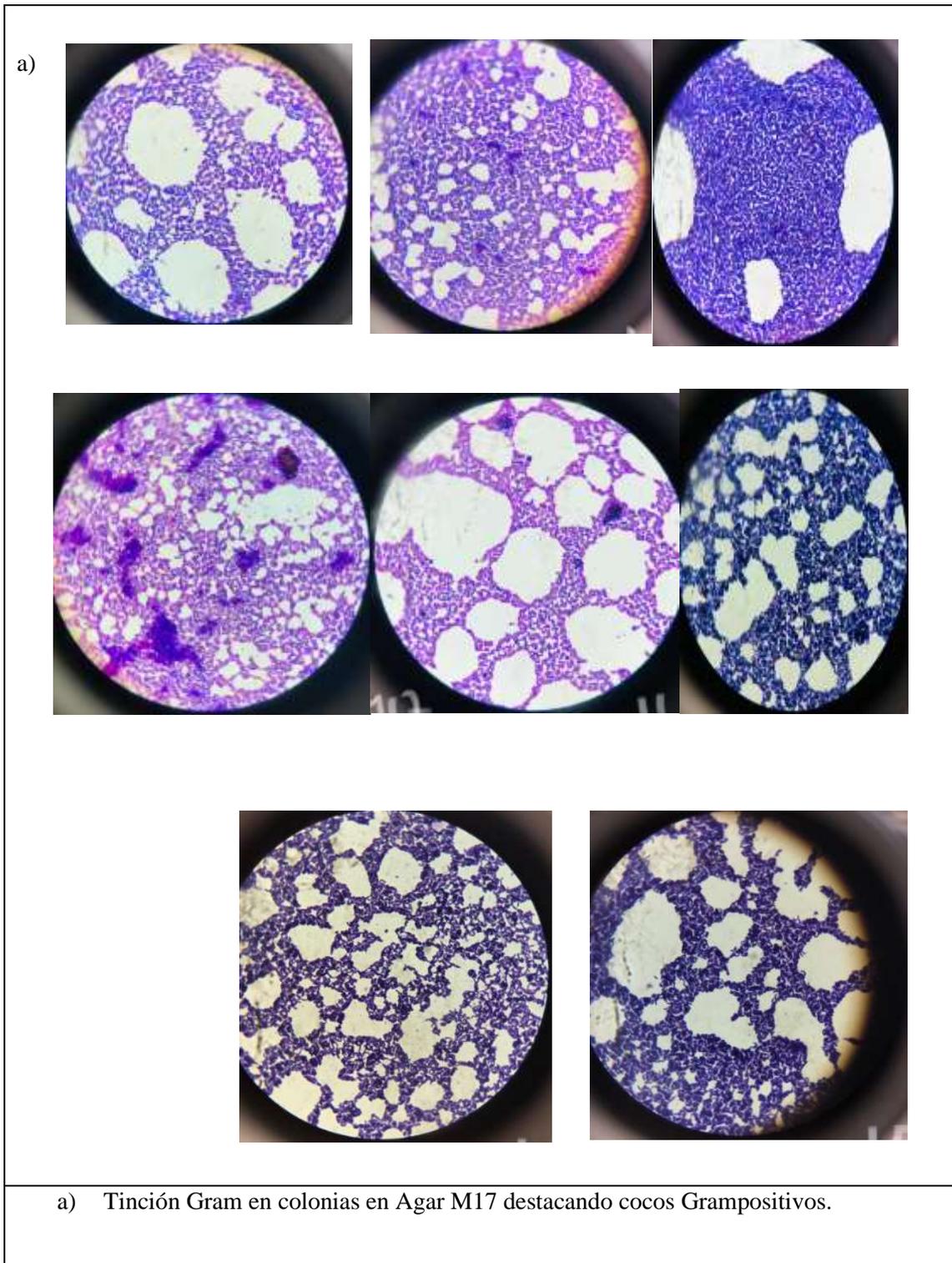
ANEXO K: TINCIÓN GRAM EN COLONIAS DE AGAR MRS

a)

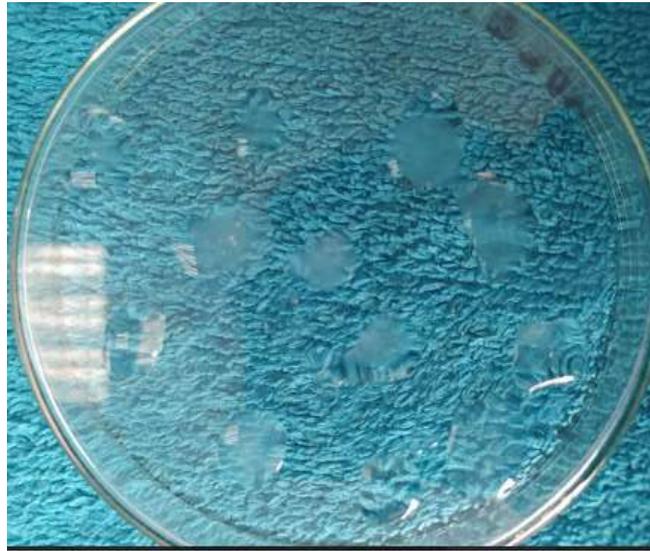


a) Tinción Gram de colonias en Agar MRS destacando bacilos y cocobacilos Grampositivos.

ANEXO L: TINCIÓN GRAM EN COLONIAS DE AGAR M17



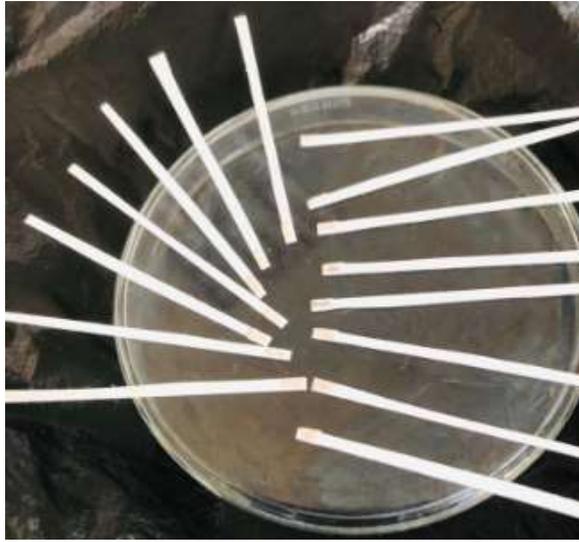
ANEXO M: PRUEBA DE CATALASA



a)

a) Prueba de catalasa con resultado negativo para todas las colonias

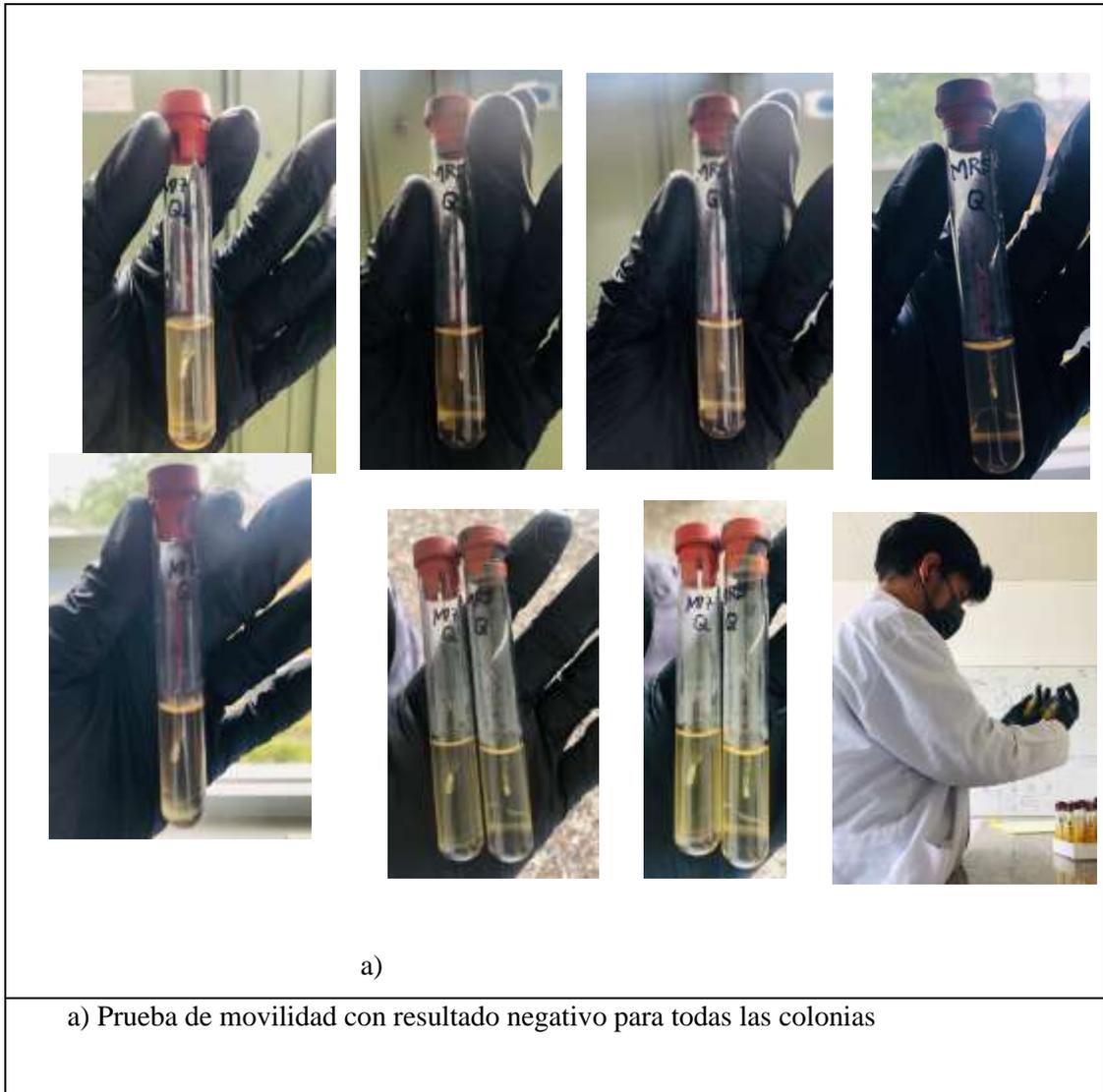
ANEXO N: PRUEBA DE OXIDASA



a)

a) Prueba de oxidasa con resultado negativo para todas las colonias

ANEXO Ñ: PRUEBA DE MOVILIDAD



ANEXO O: PRODUCCIÓN DE CO₂ A PARTIR DE GLUCOSA



a)

a) Resultado negativo para producción de CO₂ a partir de glucosa

ANEXO P: CRECIMIENTO DE COLONIAS A 30 °C EN AGAR MRS



a)

a) No se presenta crecimiento a las 24 horas negativo



b)

b) Si se presenta crecimiento a las 48 horas

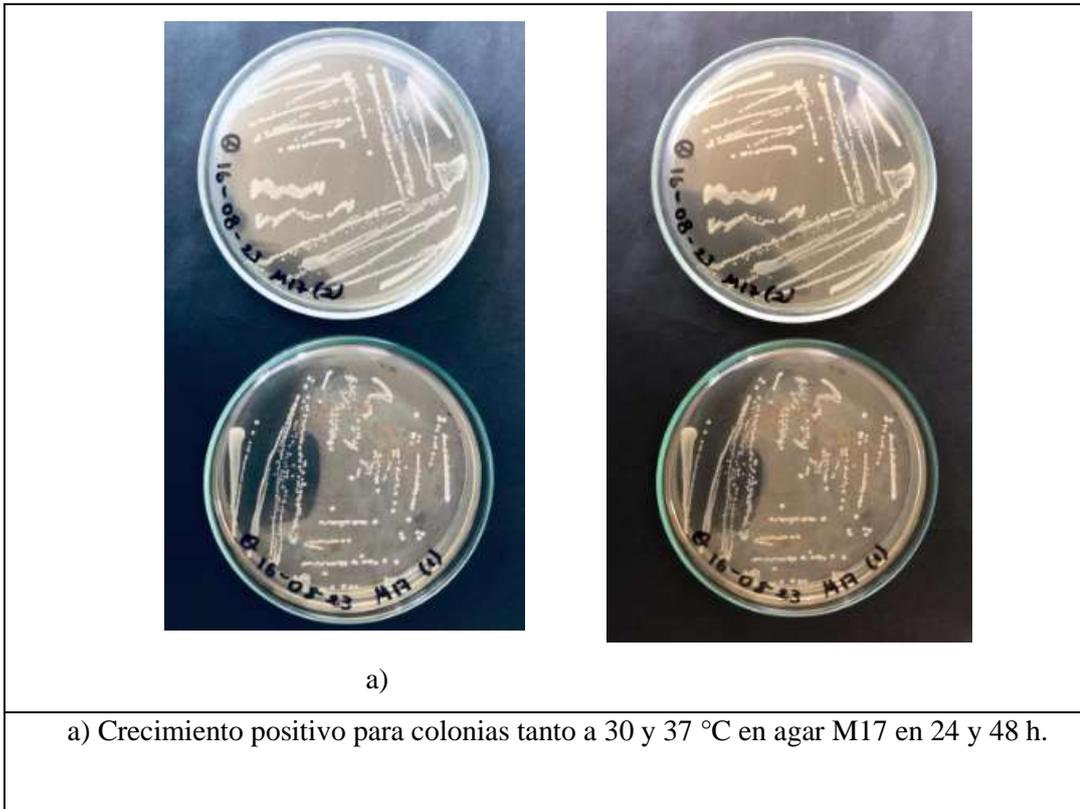
ANEXO Q: CRECIMIENTO DE COLONIAS A 37 °C EN AGAR MRS



a)

a) Crecimiento positivo para colonias a 37 °C en agar MRS tanto a las 24 como 48 h

ANEXO R: CRECIMIENTO DE COLONIAS A 30 y 37 °C EN AGAR M17



ANEXO S: TOLERANCIA DE COLONIAS DE AGAR MRS A DISTINTOS pH



a)

a) Crecimiento nulo a las 24 h a un pH de 5.4 y crecimiento positivo a las 48 h a un pH de 5.4

ANEXO T: TOLERANCIA DE COLONIAS DE AGAR MRS A DISTINTOS pH



ANEXO U: TOLERANCIA DE COLONIAS DE AGAR M17 A DISTINTOS pH

a)



a) Crecimiento positivo a las 24 y 48 h a un pH de 4.5 y 5.4 en agar M17

The image shows two petri dishes containing M17 agar. The agar is a light brown color. Both dishes show visible bacterial growth, appearing as white, fuzzy colonies. The growth is more dense and widespread in the dish on the right compared to the dish on the left. The dishes are labeled with handwritten text, including 'pH 4.5' and 'pH 5.4'.

ANEXO V: PRUEBA HEDÓNICA



a)

a) Aplicación de la encuesta de aceptabilidad a estudiantes del paralelo A del octavo semestre de la carrera de Bioquímica y Farmacia

ANEXO W: MODELO DE ENCUESTA APLICADA A ESTUDIANTES



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



Encuesta de Aceptabilidad

Tema: ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE LECHE DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

Fecha: **Edad:**

Sexo: M.... F.....

Por favor, pruebe las muestras de izquierda a derecha, e indique señalando con una de las caritas que formulación fue de su mayor agrado. Entre las evaluaciones de las muestras enjuague la boca con agua y espere 30 segundos.

FORMULACIÓN 1

ESCALA HEDÓNICA

 1	 2	 3	 4	 5
Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Ni me gusta ni me disgusta	No me gusta	Me disgusta

Puntuación:

FORMULACIÓN 2

ESCALA HEDÓNICA

 1	 2	 3	 4	 5
Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Ni me gusta ni me disgusta	No me gusta	Me disgusta

Puntuación:

FORMULACIÓN 3

ESCALA HEDÓNICA

 1	 2	 3	 4	 5
Me gusta muchísimo	Me gusta mucho	Ni me gusta ni me disgusta	No me gusta	Me disgusta

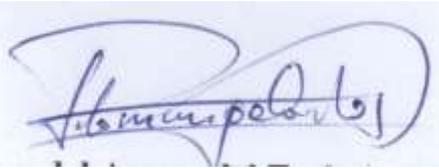
Puntuación:

Gracias por su colaboración



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

Fecha de entrega: 16/ 02 / 2024

INFORMACIÓN DEL AUTOR
Nombres – Apellidos: Michael Yandry Castillo Proaño
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímico Farmacéutico
 Firma del Director del Trabajo de Titulación
 Firma del Asesor del Trabajo de Titulación