



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA A BASE DE ZAPALLO  
(*Cucurbita maxima*) Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS.**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: ELIZABETH VALERIA GALLEGOS ESCOBAR**

**DIRECTORA: DRA. JANNETH MARÍA GALLEGOS NÚÑEZ, PhD.**

Riobamba–Ecuador

2024

© 2024, Elizabeth Valeria Gallegos Escobar

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, Elizabeth Valeria Gallegos Escobar, 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 autora 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.


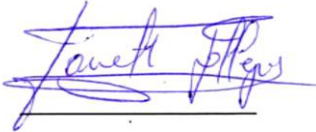

Riobamba, 07 de junio del 2024

*Elizabeth Gallegos E.*

**Elizabeth Valeria Gallegos Escobar**  
**1727312728**

**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 A BASE DE ZAPALLO (*Cucurbita maxima*) Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**, realizado por la señorita: **ELIZABETH VALERIA GALLEGOS ESCOBAR**, 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.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Simón Bolívar Moreano Bejarano, MSc. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2024-06-07
Dra. Janneth María Gallegos Núñez, PhD. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2024-06-07
BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes, MSc. <b>ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2024-06-07

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo de titulación a mi querida madre, la cual ha sido un apoyo fundamental en lo largo de mi trayectoria académica y en mi formación personal inculcándome valores importantes para forjar la persona que soy hoy en día. Además, este logro se lo dedico a mi hermano David por haber sido parte de este proceso desde el primer día de mis estudios universitarios y a mi mejor amigo Michael, el cual ha estado conmigo durante muchos años y hemos crecido juntos formando una amistad que espero dure hasta el último día de nuestras vidas.

Elizabeth

## AGRADECIMIENTO

Tengo tanto que agradecer, en primer lugar, a Dios, que desde muy pequeña ha sabido mis sueños y anhelos para mi vida profesional y personal, guiándome siempre y dándome la sabiduría necesaria para seguir por el camino correcto hacia mis metas. Agradezco a mi papito Víctor que fue un padre para mi y siempre le pedía que me cuidara y estuviera para mi en mis sueños, dándome ese abrazo reconfortante que necesitaba para poder seguir. Además, tengo que agradecer a mis tías Elsa y Rosa que siempre fueron un apoyo que con sus consejos y vivencias me hicieron ver la vida diferente. A mis hermanos David, Sebastián y Arelis, siempre pensé en ellos para darme la motivación que necesitaba para no rendirme en este camino que no ha sido fácil. A mi padre Ángel y a mi madre Grisel por haberme dado la vida y por haber sido un impulso para ser mejor cada día, a mi mejor amigo Michael por siempre haber estado conmigo en los momentos buenos y en los más difíciles hasta ahora en mi vida, le agradezco a él y a su familia por hacerme parte de ellos, los quiero mucho. Les agradezco a cada uno de los docentes de la carrera por haberme inculcado valores y enseñanzas de la vida como profesional y personal, en especial a quienes formaron parte de este trabajo de titulación, la Dra. Janneth Gallegos y la Bqf. Adriana Rodríguez, por haber estado siempre prestando ayuda en cualquier inquietud, por tener la paciencia y la dedicación para enseñarme y poderme guiar en este proceso.

Elizabeth

## ÍNDICE DE CONTENIDO

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

### CAPÍTULO I

<b>1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Planteamiento del problema.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Justificación.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1. <i>Objetivo general</i> .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....</b>	<b>5</b>

### CAPÍTULO II

<b>2. Marco TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Antecedentes de la investigación.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2. Referencias teóricas .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1. <i>Zapallo</i> .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1.1. <i>Caracterización</i> .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1.2. <i>Taxonomía de la calabaza</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.1.3. <i>Valor nutricional</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.1.4. <i>Propiedades y beneficios de C. maxima</i>.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2. <i>Fermentación</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3. <i>Prebióticos</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.4. <i>Probióticos</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.4.1. <i>Beneficios de los probióticos</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.4.2. <i>Tipos de probióticos</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.5. <i>Microbiota intestinal</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.6. <i>Enfermedades intestinales</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2.6.1. <i>Tipos</i>.....</b>	<b>11</b>

2.2.7.	<i>Norma INEN para la producción de la bebida fermentada</i> .....	12
2.2.7.1.	<i>NTE INEN 2 337:2008 JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS. REQUISITOS</i> .....	12
2.2.7.2.	<i>Requisitos microbiológicos para los productos pasteurizados</i> .....	12

### CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	14
3.1.	<b>Lugar de investigación</b> .....	14
3.2.	<b>Población de estudio</b> .....	14
3.2.1.	<i>Criterios de inclusión</i> .....	14
3.2.2.	<i>Criterios de exclusión</i> .....	14
3.3.	<b>Tamaño de la muestra por el ensayo sensorial</b> .....	14
3.4.	<b>Materia prima, materiales, equipos y reactivos</b> .....	14
3.4.1.	<i>Materia prima</i> .....	14
3.4.2.	<i>Materiales</i> .....	15
3.4.3.	<i>Equipos</i> .....	15
3.4.4.	<i>Reactivos</i> .....	16
3.5.	<b>Técnicas de estudio</b> .....	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>Técnica para el proceso de fermentación</i> .....	20
3.5.2.1.	<i>Proceso de fermentación</i> .....	20
3.5.2.2.	<i>Determinación de pH</i> .....	20
3.5.2.3.	<i>Determinación del índice de acidez</i> .....	21
3.5.2.4.	<i>Determinación de solidos solubles</i> .....	21
3.5.3.	<i>Análisis microbiológico de las bebidas posterior a la pasteurización</i> .....	21
3.5.3.1.	<i>Determinación de Mohos y Levaduras mediante la técnica de microfast</i> .....	22
3.5.3.2.	<i>Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast.</i> .....	22
3.5.3.3.	<i>Determinación de E. coli/coliformes mediante la técnica de microfast</i> .....	23
3.5.3.4.	<i>Determinación de Staphylococcus aureus mediante la técnica de microfast</i> .....	24
3.5.4.	<i>Técnica de aislamiento y recuento por diluciones</i> .....	24
3.5.5.	<i>Preparación de medios de cultivo</i> .....	24
3.5.5.1.	<i>Preparación de Agar MRS</i> .....	24



3.5.5.2.	<i>Preparación de Agar MI7</i> .....	25
3.5.6.	<b><i>Preparación de diluciones</i></b> .....	25
3.5.7.	<b><i>Siembra y Aislamiento de BAL</i></b> .....	25
3.5.8.	<b><i>Pruebas de identificación para los aislamientos</i></b> .....	26
3.5.8.1.	<i>Tinción Gram</i> .....	26
3.5.8.2.	<i>Prueba de catalasa</i> .....	26
3.5.8.3.	<i>Prueba de oxidasa</i> .....	26
3.5.9.	<b><i>Pruebas de caracterización</i></b> .....	26
3.5.9.1.	<i>Prueba de Movilidad</i> .....	26
3.5.9.2.	<i>Producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa</i> .....	27
3.5.9.3.	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i> .....	27
3.5.9.4.	<i>Tolerancia a distintos pH</i> .....	27
3.5.10.	<b><i>Elaboración de la bebida a base de zapallo (Cucurbita maxima)</i></b> .....	28
3.5.10.1.	<i>Recepción de la materia prima</i> .....	28
3.5.10.2.	<i>Clasificado</i> .....	28
3.5.10.3.	<i>Despulpado</i> .....	28
3.5.10.4.	<i>Triturado</i> .....	28
3.5.10.5.	<i>Pesaje</i> .....	28
3.5.10.6.	<i>Mezclado</i> .....	29
3.5.10.7.	<i>Envasado y pasteurización</i> .....	29
3.5.11.	<b><i>Formulaciones de las bebidas</i></b> .....	29

## CAPÍTULO IV

4.	<b>MARCO de análisis e interpretación de resultados</b> .....	30
4.1.	<b>Análisis, interpretación y discusión de resultados</b> .....	30
4.1.1.	<b><i>Análisis proximal de la materia prima</i></b> .....	30
4.1.1.1.	<i>Humedad</i> .....	30
4.1.1.2.	<i>Cenizas</i> .....	31
4.1.1.3.	<i>Grasa</i> .....	31
4.1.1.4.	<i>Fibra cruda</i> .....	31
4.1.1.5.	<i>Proteínas</i> .....	32
4.1.2.	<b><i>Análisis Físico- Químico y Microbiológico de las formulaciones</i></b> .....	32
4.1.2.1.	<i>Análisis Físicoquímico</i> .....	32
4.1.2.2.	<i>Análisis Microbiológico</i> .....	33
4.1.3.	<b><i>Análisis Físicoquímico y Microbiológico de las formulaciones en fermentación</i></b> ...	34
4.1.3.1.	<i>Determinación de pH</i> .....	34

4.1.3.2.	<i>Determinación del índice de acidez</i>	35
4.1.3.3.	<i>Determinación de sólidos solubles</i>	35
4.1.3.4.	<i>Determinación de indicadores de calidad microbiológica</i>	37
4.1.4.	<b><i>Aceptabilidad de las formulaciones</i></b>	37
4.1.4.1.	<i>Resultado de aceptabilidad</i>	37
4.1.5.	<b><i>Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias ácido-lácticas</i></b>	38
4.1.5.1.	<i>Tinción Gram, catalasa y oxidasa</i>	38
4.1.6.	<b><i>Pruebas de caracterización de bacterias ácido-lácticas</i></b>	40
4.1.6.1.	<i>Prueba de movilidad</i>	40
4.1.6.2.	<i>Crecimiento a diferentes temperaturas</i>	41
4.1.6.3.	<i>Tolerancia a distintos pH</i>	42
4.1.6.4.	<i>Producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa</i>	43

## **CAPÍTULO V**

5.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	44
5.1.	<b>Conclusiones</b>	44
5.2.	<b>Recomendaciones</b>	45

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2-1:</b>	Descripción taxonómica del zapallo ( <i>Cucurbita máxima</i> ) .....	8
<b>Tabla 2-2:</b>	Descripción nutricional del zapallo ( <i>Cucurbita maxima</i> ).....	8
<b>Tabla 2-3:</b>	Descripción de los requisitos microbiológicos para productos pasteurizados .....	13
<b>Tabla 3-1:</b>	Formulaciones de las bebidas .....	29
<b>Tabla 3-2:</b>	Proporciones en gramos y mililitros de los ingredientes .....	29
<b>Tabla 4-1:</b>	Análisis proximal de la materia prima .....	30
<b>Tabla 4-2:</b>	Análisis físico químico de las formulaciones .....	32
<b>Tabla 4-3:</b>	Análisis microbiológico de las formulaciones .....	33
<b>Tabla 4-4:</b>	Resultado del pH tomado a diferentes horas a cada una de las formulaciones .....	34
<b>Tabla 4-5:</b>	Valores de la determinación del índice de acidez.....	35
<b>Tabla 4-6:</b>	Resultados de la determinación de sólidos solubles .....	36
<b>Tabla 4-7:</b>	Determinación de indicadores de calidad microbiológica.....	37
<b>Tabla 4-8:</b>	Resultado obtenido de la encuesta de aceptabilidad mediante la prueba hedónica	38
<b>Tabla 4-9:</b>	Pruebas de tinción, oxidasa y catalasa de BAL en medios MRS y M17 .....	39
<b>Tabla 4-10:</b>	Movilidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL) .....	40
<b>Tabla 4-11:</b>	Crecimiento de BAL a diferentes temperaturas .....	41
<b>Tabla 4-12:</b>	Tolerancia a distintos pH .....	42

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 2-1:</b> Zapallo ( <i>Cucurbita maxima</i> ) .....	7
<b>Ilustración 4-1:</b> Determinación de pH .....	34
<b>Ilustración 4-2:</b> Determinación del índice de acidez .....	35
<b>Ilustración 4-3:</b> Determinación de sólidos solubles .....	36
<b>Ilustración 4-4:</b> Valoración de encuestas .....	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA (*Cucurbita maxima*)
- ANEXO B:** ELABORACIÓN DE LA BEBIDA A BASE DE ZAPALLO (*Cucurbita maxima*)
- ANEXO C:** PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS
- ANEXO D:** PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE LAS PRUEBAS DE CALIDAD
- ANEXO E:** DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD
- ANEXO F:** PREPARACIÓN DE DILUCIONES
- ANEXO G:** PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO
- ANEXO H:** SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS
- ANEXO I:** COLONIAS EN MEDIOS SELECTIVOS Y ENRIQUECIMIENTO EN CALDO
- ANEXO J:** TINCIÓN GRAM PARA COLONIAS DEL MEDIO DE CULTIVO MRS
- ANEXO K:** TINCIÓN GRAM PARA COLONIAS DEL MEDIO DE CULTIVO M17
- ANEXO L:** PRUEBA DE CATALASA Y OXIDASA
- ANEXO M:** PRUEBA DE MOVILIDAD Y PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub> DE GLUCOSA
- ANEXO N:** CRECIMIENTO DE COLONIAS A 30 Y 37°C
- ANEXO O:** CRECIMIENTO DE COLONIAS A DISTINTOS pH 4.5 Y 5.4
- ANEXO P:** PRUEBA DE ACEPTABILIDAD
- ANEXO Q:** ENCUESTA APLICADA A ESTUDIANTES DE OCTAVO SEMESTRE

## RESUMEN

En la actualidad la mala alimentación constituye un parámetro fundamental en la aparición de enfermedades a nivel mundial, llegando a afectar principalmente al sistema gastrointestinal, es por este motivo que existen investigaciones en la industria alimentaria que han contribuido en la búsqueda de productos que ayudan en la mejora de salud de la población, teniendo como una alternativa a los probióticos, es por esto que este trabajo experimental tiene como objetivo elaborar una bebida fermentada a base de zapallo (*Cucurbita maxima*) y caracterizar bacterias ácido lácticas. Para la elaboración de las formulaciones se trabajó con zapallos del Mercado “La Condamine” de la ciudad de Riobamba, cumpliendo con parámetros de exclusión e inclusión. La materia prima de *Cucurbita maxima* fue sometida a un análisis proximal mediante pruebas de humedad, cenizas, fibra, proteína y grasas, dando paso a la elaboración de las tres formulaciones siguiendo un proceso de despulpado, triturado, pesaje, mezclado y pasteurización, una vez obtenidas las tres formulaciones con distintas concentraciones de materia prima de *Cucurbita maxima*, se procedió a realizar una fermentación espontánea, considerando las pruebas fisicoquímicas como pH, acidez titulable y grados Brix, y para garantizar la inocuidad de las mismas se realizaron las pruebas de calidad microbiológicas. Para la selección de la formulación más adecuada se realizó una prueba hedónica a un grupo de estudiantes, una vez obtenida la formulación optimizada se procedió a realizar la siembra en los medios de cultivo selectivos, además de la realización de las pruebas de caracterización, obteniendo así la presencia de bacterias ácido lácticas. En conclusión, en este trabajo investigativo fue posible la elaboración de una bebida fermentada a base zapallo (*Cucurbita maxima*), 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> <ZAPALLO (*Cucurbita maxima*)> <FERMENTACIÓN>.

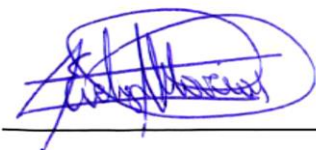
1323-DBRAI-UPT-2024



## ABSTRACT

The main objective of this research study was to focus on the poor nutrition of the population which is a fundamental parameter in the appearance of diseases worldwide, affecting mainly the gastrointestinal system, which is why there is research in the food industry that has contributed to the search for products that help to improve the health of the population, having probiotics as an alternative, which is why this experimental work aims to develop a fermented drink based on pumpkin (*Cucurbita maxima*) and characterize lactic acid bacteria. For the elaboration of the formulations, we worked with pumpkins from “La Condamine” market in the city of Riobamba, complying with exclusion and inclusion parameters. The raw material of *Cucurbita maxima* was subjected to a proximal analysis by means of moisture, ash, fiber, protein and fat tests, giving way to the elaboration of the three formulations following a process of pulping, crushing, weighing, mixing and pasteurization, Once the three formulations with different concentrations of *Cucurbita maxima* raw material were obtained, a spontaneous fermentation was carried out, considering physicochemical tests such as pH, titratable acidity and Brix degrees, and microbiological quality tests were carried out to guarantee their innocuousness. For the selection of the most appropriate formulation, a hedonic test was carried out on a group of students, and once the optimized formulation was obtained, the sowing was carried out in selective culture media, in addition to the performance of characterization tests, thus obtaining the presence of lactic acid bacteria. In conclusion, in this research work it was possible to elaborate a fermented beverage based on pumpkin (*Cucurbita maxima*), through 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>, <ZAPALLO (*Cucurbita maxima*)>, <FERMENTATION>.



Mgs. Evelyn Carolina Macias Silva

C.I 0603239070

## INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo experimental comprende la elaboración de una bebida fermentada a base de zapallo (*Cucurbita maxima*) y la caracterización de bacterias ácido lácticas, teniendo en cuenta que la mala alimentación es una problemática a nivel mundial que se puede generar tanto en niños como en adultos, lo cual puede alterar la microbiota intestinal, situación que con el paso del tiempo generaría problemas de salud a nivel digestivo, aumentando cada vez más las cifras de personas afectadas por este tipo de padecimientos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2023 un concepto sobre la malnutrición, mencionando lo siguiente “Las ingestas inadecuadas de vitaminas y minerales (los denominados micronutrientes) se pueden reunir en un mismo grupo. El organismo necesita micronutrientes para producir enzimas, hormonas y otras sustancias esenciales para un crecimiento y desarrollo adecuado” (OMS, 2023).

Villanueva en su artículo del 2015 hace referencia a la flora intestinal, la cual puede ser alterada desequilibrando el medio natural del organismo con la ingesta de ciertos alimentos o bebidas como el alcohol, alimentos contaminados, medicamentos como los antibióticos, y factores como el envejecimiento, enfermedades digestivas y el estrés. Se puede disminuir el potencial efecto barrera que tiene la microbiota normal con los cambios producidos en el medio, generando así problemas de salud con la surgimiento de dolores, incluyendo malestares a nivel gastrointestinal (Villanueva 2015, p. 266).

Hoy en día, en la industria de alimentos se han incrementado las investigaciones sobre los probióticos, encontrándose que estos microorganismos ayudan a mantener la salud digestiva, por lo anterior el presente trabajo experimental ofrece una alternativa saludable en lo que se refiere a bebidas fermentadas con actividad probiótica, para así aportar beneficios en la salud desde la alimentación.

En la actualidad las bebidas vegetales tienen una gran aceptabilidad por parte de los consumidores, pudiendo adaptarse a los diversos planes alimenticios y estilos de vida que mantienen las personas hoy en día. Estos productos que la industria alimentaria se han incluido en la dieta diaria de las personas, con variadas preparaciones de recetas, formando parte de una dieta balanceada, la cual ayuda a mantener la buena salud (Primicias, 2023).

El presente trabajo experimental se enfocó en: la caracterización de la materia prima, el ensayo de tres formulaciones para seleccionar la más adecuada de acuerdo a la caracterización



fisicoquímica, microbiológica y sensorial y en el screening de las bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica en la mejor formulación.

La realización de este trabajo experimental es oportuna y factible debido a que se dispone de los recursos académicos, técnicos y económicos necesarios. En este sentido la materia prima es de fácil acceso y los recursos académicos, y las herramientas para la ejecución de los análisis de laboratorio están disponibles, adicionalmente se contará con la participación de estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia, para poder seleccionar la mejor formulación de la bebida a elaborar.

Como inconvenientes posibles al momento de realizar la parte práctica de la investigación, se tiene la falta de ciertos insumos en los laboratorios como reactivos y medios de cultivos que pueden retrasar el tiempo de la ejecución del trabajo experimental.

## CAPÍTULO I

### 1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Planteamiento del problema

Las bebidas fermentadas son el producto de un proceso a nivel catabólico de oxidación incompleta de los azúcares presentes en las frutas, vegetales y cereales. La Fermentación es un proceso bioquímico, del cual están encargados los microorganismos que transforman los azúcares (NOA, 2022). Además, las bebidas fermentadas han pasado por ese proceso gracias a la ayuda de ciertos microorganismos como levaduras y bacterias, los cuales ayudan a metabolizar los azúcares para la producción de alcohol y otros compuestos.

Los probióticos son los encargados de los beneficios de las bebidas fermentadas, con los cuales se previenen ciertos problemas de salud a nivel intestinal, gracias a que estos microorganismos ayudan a formar una barrera frente a las patógenos, mejorando así las defensas de organismo (CONAHCYT, 2022).

Hoy en día a nivel global, el estilo de vida puede afectar a la salud humana, provocando problemas digestivos, desequilibrando el microbiota intestinal. De acuerdo con la OMS la malnutrición está “relacionada con los micronutrientes, que incluye las carencias o el exceso de estos (la falta de vitaminas o minerales importantes)” (OMS, 2023). Las dietas no equilibradas y cargadas con cantidades elevadas de grasas y azúcares es considerada una mala alimentación con nulo aporte nutricional (Instituto-DYN, 2022). La presente investigación prevé un alcance a nivel social mediante el aporte de datos relevantes y específicos en cuanto a bebidas fermentadas con posible actividad probiótica, pudiendo así ser de ayuda para emprendimientos futuros que busquen una alternativa nutritiva para ayudar a mejorar el microbiota intestinal.

El siguiente trabajo experimental, considerará como variable dependiente la población de bacterias ácido-lácticas y la potencial actividad probiótica de la bebida de zapallo (*Cucurbita maxima*) de formulación óptima y como variables independientes, tres formulaciones de la bebida de zapallo considerando las proporciones del fruto y las proporciones de agua

En el Ecuador existen pocas evidencias científicas actuales sobre investigaciones con la materia prima que es el zapallo (*Cucurbita maxima*), por lo cual en este trabajo experimental se busca dicha materia prima, pudiendo así aportar una alternativa nutricional con posible actividad

probiótica, la cual sea implementada para futuras investigaciones y emprendimientos dentro del Ecuador.

## **1.2. Justificación**

Una buena alimentación implica poder consumir alimentos de alto valor nutricional, que ofrezcan propiedades beneficiosas para la salud, lo que se puede lograr con la suplementación de microorganismos benéficos que permitan mantener un equilibrio del microbiota intestinal en el organismo.

Se sabe que el estilo de vida actual contribuye a llevar una alimentación decadente, con base en productos procesados, con exceso de grasas, carbohidratos y azúcares, entre otros; además la falta de protocolos de higiene dentro y fuera de los hogares puede contaminar a los alimentos con microorganismos que contribuyen al deterioro del microbiota saludable del tracto digestivo. En la actualidad los alimentos suplementados con probióticos son una alternativa para mejorar la salud digestiva, para prevenir o tratar ciertas patologías que el desgaste o el desequilibrio del microbiota puede ocasionar.

Los probióticos por lo general están dirigidos al mejoramiento del microbiota intestinal normal del organismo, ya que son considerados como microorganismos vivos, por el contrario, los prebióticos son microorganismos que ayudan a mantener el microbiota, sirviendo como nutrientes para esta. Los probióticos se pueden encontrar en ciertos alimentos como el chucrut, el yogurt, bananas, cereales, soja, hortalizas de hojas verdes, entre otros (Zeratsky, 2022).

Las bacterias ácido lácticas consideradas como probióticas, gracias a la capacidad de producción de ácido láctico que tienen, considerando que pueden ser homofermentativas o heterofermentativas, dicha característica es aprovechada en la industria de alimentos para la producción de lácteos, productos cárnicos, masa madre, condimentos y en si una variedad de bebidas fermentadas con mejores propiedades a nivel nutricional, sensorial y químico (García, 2022).

## **1.3. Objetivos**

### ***1.3.1. Objetivo general***

Elaborar una bebida fermentada a base de zapallo (*Cucurbita maxima*) y caracterizar a las bacterias ácido-lácticas presentes

### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Caracterizar la materia prima.
- Ensayar tres formulaciones para seleccionar la más adecuada.
- Realizar la caracterización físico químico, microbiológico y sensorial de la formulación optimizada.
- Llevar a cabo un screening de las bacterias ácido lácticas con posible actividad probiótica.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

En la tesis realizada por Cajas Yessenia en el 2015 titulada “Leche fermentada suplementada con fibra de zapallo (*Cucurbita maxima*) utilizando un género de bacterias probióticas: *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*”, menciona que “El zapallo es una hortaliza que posee muchos nutrientes que benefician a nuestro organismo algunos de ellos son: fibra, celulosa, minerales, vitaminas, etc. Dicha hortaliza ayuda a problemas con el sistema digestivo, cardiovascular, y sobre todo a las mujeres embarazadas con sus mareos. Es una hortaliza de fácil consumo y su siembra no pide mucho cuidado ya que es una planta rastrera que cría como maleza” (Cajas 2015, p. 2).

Romero, L en el 2011 realizó un estudio titulado “Desarrollo de la línea de producción de un complemento alimenticio rico en fibra a partir de zapallo” dicho proyecto se centra en la alimentación desordenada que presentan las personas, y el aumento de las enfermedades como son: cáncer, desorden en el aparato digestivo, estrés, diabetes, etc; el presente trabajo pretende obtener fibra de zapallo que se usaría en diferentes productos como son: galletas, yogurt, granola, etc (Romero 2012, p. 1).

Salazar, M en el 2011 realizó un estudio titulado “Elaboración y control de calidad de yogurt con zapallo endulzado con stevia para pacientes diabéticas.” el trabajo tiene como finalidad elaborar una mermelada y un yogurt de zapallo endulzado con stevia para añadir al yogurt para pacientes con diabetes ya que esta es considerada como la epidemia del siglo XXI, aplicando tres formulaciones con diferentes concentraciones para conocer cuál es la más aceptable por el consumidor (Cajas 2015, p. 2).

Arroyo, 2018 con su trabajo de titulación con tema “*Barra energética con el fruto del zapallo (Cucurbita maxima)*”, este trabajo tiene como finalidad la elaboración de una barra energética con el zapallo, aprovechando así todo este tipo de vegetal (cáscara, semillas y pulpa) (Arroyo 2018, p. 1).

## 2.2. Referencias teóricas

### 2.2.1. Zapallo

#### 2.2.1.1. Caracterización



**Ilustración 2-1:** Zapallo (*Cucurbita maxima*)

Fuente: Guía-Verde, 2022

La calabaza o zapallo (*Cucurbita maxima*) es una planta herbácea anual perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas. Es conocida también como *Cucurbita andreana*, *Cucurbita pileiformis*, *Cucurbita turbaniformis*, *Pepo maximus*. Se trata de una planta de porte rastrero que puede alcanzar los 50-70 cm de altura. Se trata de una planta hortícola muy popular por sus frutos que son las calabazas (Guía-verde, 2022).

Esta planta presenta unas hojas de gran tamaño, de forma cordiforme, pentalobuladas que surgen de unos tallos rastreros, pilosos (al igual que las hojas). Son plantas monoicas cuyas flores, de color amarillo o anaranjado, generan un fruto de gran tamaño llamado pepónide y en forma de baya. Estos frutos pueden ser muy diferentes dependiendo de la variedad. Existen globosos, elongados, redondos, alargados. EL fruto tiene una pulpa de color naranja, sabrosa, muy empleada culinariamente. Las semillas, de color blanco, comestibles, se corresponden con las pipas de calabaza. Tienen una pulpa de color blanco en su interior. Esta especie hibrida con mucha facilidad con otras especies del género *Curcubita* e incluso otros géneros (Guía-verde, 2022).

#### 2.2.1.2. Taxonomía de la calabaza

La taxonomía vegetal es de importancia para poder conocer a que especie pertenece la planta, el fruto o la verdura estudiados. En la tabla 2-1 se muestra la taxonomía del zapallo del género *Cucurbita*, especie *maxima*, la cual fue la materia prima para la realización de este proyecto experimental.

**Tabla 2-1:** Descripción taxonómica del zapallo (*Cucurbita máxima*)

TAXONOMÍA	
REINO	Magnoliophyta
FILUM	Magnoliosida
CLASE	Cucurbitaceae
FAMILIA	Cucurbitales
ORDEN	Cucurbita
GÉNERO	Cucurbita
ESPECIE	<i>Cucurbita maxima</i>

Fuente: Cajas. 2015

Calabaza, es el nombre popular que desde Argentina hasta Costa Rica se da a los cultivares derivados de las especies *Cucúrbita moschata*, *Cucúrbita maxima*, *Cucúrbita pepo*. Este género está compuesto por 12 – 14 especies distribuidas desde Norteamérica hasta Argentina. Los frutos inmaduros o maduros y las semillas son las partes más utilizadas en la alimentación, mientras que las flores generalmente se usan en menor escala (Cajas 2015, p. 2).

#### 2.2.1.3. Valor nutricional

En la tabla 2-2 se muestra el valor nutricional del zapallo (*Cucurbita maxima*).

**Tabla 2-2:** Descripción nutricional del zapallo (*Cucurbita maxima*)

COMPONENTES	VALOR NUTRICIONAL
Valor energético	26,0 cal
Proteína	0,7 gr
Lípidos	0,2 gr
Carbohidratos	6,4 gr
Fibra	1,0 gr
Calcio	26,0 gr
Hierro	0,6 mg
Caroteno	1,0 mg
Riboflavina	0,04 mg
Niacina	0,40 mg
Ácido ascórbico	5,70 mg

Fuente: Guía-Verde, 2022

#### 2.2.1.4. Propiedades y beneficios de *C. maxima*

El zapallo (*Cucurbita maxima*) contiene ciertos componentes como los betacarotenos, los cuales ayudan a mantener una piel en buen estado y pueden prevenir ciertos tipos de cáncer.

El zapallo contiene una gran cantidad de fibra, este vegetal ayuda en la regulación del buen funcionamiento intestinal, por lo cual se lo recomienda incluir en las dietas para ciertas patologías digestivas como la gastritis. Es un purificador de los riñones y ayuda a mejorar la salud de la vejiga.

Tiene una variedad de vitaminas en su composición, teniendo así la presencia de vitamina A, B, C y E; contiene además fósforo, potasio, calcio y magnesio. Este vegetal ayuda a cuidar la vista, los huesos, el cabello y la piel (Mendoza, 2022).

Es recomendable incluir este vegetal en la dieta de personas que padezcan cáncer de próstata, esto debido a la presencia de antioxidantes, los cuales ayudan a inhibir las enfermedades que provengan de la degeneración celular. Al tener Vitamina C ayuda a prevenir la oxidación del colesterol, y en conjunto con la vitamina A previenen la sedimentación del colesterol en las arterias (Salazar 2011, p. 1).

### **2.2.2. Fermentación**

La fermentación es un proceso metabólico, en el cual el sustrato da lugar a un homogenizado de productos finales. “En la fermentación, el sustrato da lugar a una mezcla de productos finales, unos más oxidados que él y otros más reducidos. Los sustratos fermentables no pueden ser ni muy oxidados ni muy reducidos” (Carbonero 1975, p. 1). Además, vale mencionar que la fermentación es considerada un proceso que se da lugar naturalmente y que ocurre con la presencia de ciertas bacterias o levaduras, las cuales con la descomposición de los azúcares se produce este efecto fermentativo.

### **2.2.3. Prebióticos**

Los prebióticos son considerados como ingredientes en estado de fermentación, los cuales producen cambios que pueden ser específicos para la composición o la actividad de la flora intestinal, confiriendo propiedades beneficiosas dentro del organismo (Jiménez 2020, p. 8).

### **2.2.4. Probióticos**

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas generan efectos en beneficio del organismo, ayudando a contribuir al buen mantenimiento y equilibrio de la flora intestinal normal, además de que ayuda a aumentar el sistema inmune. Estos probióticos



acidifican el medio con la producción de ácido láctico, esto para ayudar con el proceso de digestión (Rondón et al. 2015, p. 123).

La exclusión competitiva es el método por el cual los probióticos ayudan a inhibir o a disminuir el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas, ya que van a competir con los microorganismos “malos” por los receptores que están ubicados en las células intestinales, además modifican el medio bacteriano.

Los probióticos tienen la capacidad de cambiar el medio que habitan, con la producción de ácido láctico y acético, lo cual hace que el pH disminuya. *Helicobacter pylori* es una de las principales bacterias que es eliminada por el ácido láctico, además de otras como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. Otro método por el cual los probióticos ayudan a bloquear los efectos producidos por los patógenos es con la formación de bacteriocinas y de antibacterianos como los péptidos sintetizados por el ribosoma, los cuales inhiben el crecimiento de los patógenos con la producción de poros en la membrana del citoplasma de la bacteria (Camacho, 2022).

#### 2.2.4.1. Beneficios de los probióticos

- *Inmunológicos*

Los probióticos ayudan a activar a los macrófagos para aumentar los niveles de antígenos, los cuales ayudan a la presentación de los linfocitos B, ayudando a la producción de IgA secretora, además pueden ajustar los perfiles de las citoquinas para desatar la respuesta tolerogénica de la flora intestinal hacia los patógenos (García, 2022).

- *No inmunológicos*

Los beneficios no inmunológicos se relacionan con los alimentos, los cuales van a mantener una competencia con los patógenos, alterando el pH del ambiente en donde se encuentran, desfavoreciendo a los agentes patógenos, produciendo sustancias bacteriostáticas y bactericidas, las cuales van a eliminar a los patógenos (García, 2022).

#### 2.2.4.2. Tipos de probióticos

Dentro de los probióticos existen bacterias y hongos, los cuales pueden estar conformados por uno o varios microorganismos. Dentro *Lactobacillus* se encuentran diferentes especies, teniendo

asi *L.reuteri*, *L.casei*, *L.rhamnosus GG*, *L.bulgaricusy* *L.acidophilus*. Existen además levaduras que son probióticos, teniendo a *Saccharinyses boulardii* (Salinas, 2021).

### **2.2.5. Microbiota intestinal**

La microbiota intestinal comprende microorganismos que habitan en el sistema digestivo. La tecnología actual ha contribuido a su estudio del microbiota intestinal, dando como resultado conocer un número de bacterias de gran importancia, las cuales son propias de este sistema. Dicha microbiota es necesaria para el buen funcionamiento, además ayuda a desarrollar la inmunidad y la nutrición del organismo en general (Rondón et al. 2015, p. 1).

### **2.2.6. Enfermedades intestinales**

Las enfermedades intestinales afectan a los intestinos y al estómago, por lo general son causadas por bacterias, virus, parásitos o alimentos inflamatorios como la leche y las grasas, además ciertos medicamentos también pueden ocasionar molestias en el sistema digestivo (IMSS, 2015).

Una dieta muy poco nutritiva puede generar problemas gastrointestinales incluyendo inflamaciones y trastornos funcionales del sistema en general. Además, existen alimentos considerados como inflamatorios e intolerantes hacia la población, los cuales pueden producir ciertas afecciones como síndrome de intestino irritable por mencionar un ejemplo (Velásquez, 2018).

#### **2.2.6.1. Tipos**

- **Celiaquía:** Es una patología autoinmune, en la cual el sistema inmunitario produce anticuerpos en respuesta al gluten que es ingerido en los alimentos. El intestino se encuentra dañado por este tipo de afección, con lo cual no es posible que pueda absorber adecuadamente los alimentos y nutrientes, derivando así en signos y síntomas que sobrepasan el sistema digestivo.
- **Enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE):** Se produce cuando el alimento ingerido es devuelto hacia el esófago, en consecuencia, el tubo digestivo se puede dañar por los ácidos del estómago que previamente se han mezclado con los alimentos.
- **Dispepsia:** Ocurre esta afección cuando existen signos y síntomas muy frecuentes de las indigestiones, las cuales no presentan una causa aparente, lo que puede generar molestias como ardor, eructos, náuseas, vómitos e incluso distensión abdominal.
- **Síndrome del intestino irritable (SII):** Esta afección se considera un cumulo de sintomatologías, los cuales van desde dolores consecutivos en el área abdominal, diarrea y estreñimiento.

- Gastritis: En esta afección se evidencia la inflamación interna del tejido que está revistiendo al estómago.
- Enfermedad de Crohn: Es una enfermedad que causa la inflamación del intestino (Sánchez, 2022).

### **2.2.7. Norma INEN para la producción de la bebida fermentada**

#### **2.2.7.1. NTE INEN 2 337:2008 JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS**

La elaboración de la bebida fermentada a base de zapallo (*Cucurbita maxima*) debe basarse en una normativa nacional para su producción, teniendo, así como referencia a la norma NTE INEN 2337: 2008

En el literal 5.3 de la normativa INEN sobre “Requisitos específicos para los jugos y pulpas concentradas”, se menciona lo siguiente:

- 5.3.1 El jugo concentrado puede ser turbio, claro o clarificado y debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- 5.3.2 La pulpa concentrada debe tener las características sensoriales propias de la fruta de la cual procede.
- 5.3.3 El jugo y pulpa concentrado, con azúcar o no, debe estar exento de olores o sabores extraños u objetables.
- 5.3.4 El contenido de sólidos solubles (°Brix a 20 °C con exclusión de azúcar) en el jugo concentrado será por lo menos, un 50% más que el contenido de sólidos solubles en el jugo original.

#### **2.2.7.2. Requisitos microbiológicos para los productos pasteurizados**

Para la elaboración de productos alimenticios es necesario tener en cuenta los análisis que se deben realizar para que éste sea apto para el consumo humano, por lo que en las normativas existen requisitos microbiológicos para los productos de alimentación, como se detalla en la tabla 2-3.

**Tabla 2-3:** Descripción de los requisitos microbiológicos para productos pasteurizados

	<b>n</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>c</b>	<b>Método de ensayo</b>
<b>Coliformes NMP/cm<sup>3</sup></b>	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-6
<b>Coliformes fecales NMP/cm<sup>3</sup></b>	3	< 3	--	0	NTE INEN 1529-8
<b>Recuento estándar en placa REP UFC/cm<sup>3</sup></b>	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-5
<b>Recuento de mohos y levaduras UP/cm<sup>3</sup></b>	3	< 10	10	1	NTE INEN 1529-10

Fuente: INEN 2 337: 2008

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de integración curricular tuvo lugar en los laboratorios de Bromatología, Microbiología, Procesos Industriales e Investigación de la Facultad de Ciencias de las Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 3.2. Población de estudio

La población de estudio estuvo conformada por zapallos del Mercado La Condamine de la ciudad de Riobamba. La materia prima fue escogida mediante un muestreo aleatorio simple. Para la recolección del material vegetal se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

##### 3.2.1. *Criterios de inclusión*

La materia prima vegetal (zapallo) en óptimo estado, considerando los requisitos que debe cumplir el zapallo (*Cucurbita maxima*) destinado a consumo humano.

##### 3.2.2. *Criterios de exclusión*

Aquellos zapallos que presenten daños, o deterioro visiblemente o que no cumplan con los requisitos organolépticos y físicos.

#### 3.3. Tamaño de la muestra por el ensayo sensorial

Para el tamaño de la muestra para el análisis sensorial, prueba se trabajó con 35 estudiantes del octavo semestre, paralelo A de la carrera de Bioquímica y Farmacia, a los cuales se les solicitó la ejecución de la prueba hedónica para la elección de la mejor formulación.

#### 3.4. Materia prima, materiales, equipos y reactivos

##### 3.4.1. *Materia prima*

- Zapallo

### **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

## Reactivos

- Ácido acético
- Agua purificada
- Azúcar
- Peptona
- Placas Petrifilm para *E. coli*, *Coliformes*, *Staphylococcus aureus*, *Mohos* y *levaduras*

### 3.5. Técnicas de estudio

#### 3.5.1. Caracterización de la materia prima

##### 3.5.1.1. Determinación de Humedad

La determinación de humedad se llevó a cabo mediante la técnica empleada en la termobalanza RADWAG, este equipo se encuentra dentro del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### **PROCEDIMIENTO:**

Se pesaron 5 g de la muestra de zapallo fresco, se colocó la muestra en el equipo, el cual se calentó durante 15 minutos llegando a una temperatura de 85°C y bajo el principio de pérdida de peso se obtuvo el porcentaje de humedad presente en la muestra, al finalizar el tiempo se registró el porcentaje de humedad presente en la muestra.

##### 3.5.1.2. Determinación de Cenizas

La determinación de cenizas se llevó a cabo mediante las técnicas establecidas dentro del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias, con base en la pérdida de peso de la muestra por calcinación de la materia orgánica.

#### **PROCEDIMIENTO:**

Se procedió a tarar los crisoles, los crisoles limpios y secos se trataron a 300°C en la mufla durante 12 horas, después se sacaron los crisoles de la mufla con ayuda de las pinzas para llevarlos al desecador a que tomen la temperatura ambiente, luego se pesaron los crisoles en la balanza analítica para anotar su peso inicial

Se pesaron 3 gramos de la muestra seca, se pre calcinó en los crisoles y se incineró a 300° C, se enfrió en el desecador y se registró el peso final.

## CÁLCULOS:

### Ecuación 3-1: Determinación de cenizas

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

En donde:

%Ceniza= Contenido de cenizas en porcentaje de masa.

m = Masa del crisol vacío en g.

m<sub>1</sub> = Masa del crisol con la muestra seca en g.

m<sub>2</sub> = Masa del crisol con la muestra incinerada en g.

#### 3.5.1.3. Determinación de grasa

La determinación de grasas se llevó a cabo mediante las técnicas establecidas dentro del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias.

## PROCEDIMIENTO:

Se pesaron 3g de la muestra previamente secada, se colocó en un sobre de papel filtro, luego se procedió a terminar de cerrar dicho sobre para que la muestra permanezca en su interior. Se tomó un balón de aforo y se pesó en una balanza analítica, tomando nota del peso inicial, se adicionó 250 mL de hexano, posteriormente se embonó el balón en la cámara de sifonación, se colocó el condensador con las mangueras sobre la cámara de sifonación, después se procedió a encender la placa calefactora y se controló la entrada y salida de agua, se extrajo la grasa de la muestra con el solvente orgánico durante 2 horas. Al finalizar el tiempo estimado, se retiró el balón con el solvente, más el extracto graso (en caso de haberlo) y se destiló el solvente en el rota vapor.

El balón se colocó en la estufa por media hora, para eliminar el solvente residual, se enfrió en el desecador y se procedió a registrar su peso.

## CÁLCULOS:

### Ecuación 3-2: Determinación de grasa

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



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.

#### *3.5.1.4. Análisis de Fibra Cruda*

La determinación de la fibra cruda se llevó a cabo mediante las técnicas establecidas dentro del laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias.

#### **PROCEDIMIENTO:**

Se pesó 1.5g de la muestra seca y se colocó en los crisoles, los cuales previamente fueron tarados, se introdujeron dichos crisoles en el equipo Dosi-Fiber, se precalentaron los reactivos.

- *Hidrólisis ácida en caliente*

Se debe asegurar que las válvulas estén cerradas, se encendió la calefacción, después se añadió 120 mL de ácido sulfúrico en cada columna, esperando a que se dé la ebullición para añadir unas gotas de antiespumante.

Se abrió el circuito de refrigeración y se activaron las resistencias calefactoras con una potencia al 90%, se esperó a que hierva y luego se redujo la potencia al 30%, se dejó hervir durante 30 minutos. Para realizar una hidrólisis más efectiva se debe accionar la bomba de aire en la posición de “soplar”. Se abrió el circuito vacío y se colocaron los mandos de las válvulas en posición de “absorción”, después se procedió a lavar con agua destilada para filtrar. Se repitió este procedimiento 3 veces.

- *Hidrólisis básica en caliente*

Se debe asegurar que las válvulas estén cerradas, se encendió la calefacción, después se añadió 120 mL de hidróxido de potasio en cada columna, esperar a que se dé la ebullición para añadir unas gotas de antiespumante.

Se abrió el circuito de refrigeración y se activaron las resistencias calefactoras con una potencia al 90%, se esperó a que hierva y luego se redujo la potencia al 30%, se dejó hervir durante 30 minutos. Para realizar una hidrólisis más efectiva se debe accionar la bomba de aire en la posición

de “soplar”. Se detuvo la calefacción y se procedió a abrir el circuito vacío y se colocaron los mandos de las válvulas en posición de “absorción”, después se procedió a lavar con agua destilada para filtrar. Se repitió este procedimiento 3 veces.

Preparar el frasco de Kitasato, se situó el crisol en la entrada del mismo y se añadió acetona, el circuito de vacío estuvo absorbiendo hacia el frasco dicha sustancia, se repitió la operación 3 veces.

Se colocaron las muestras en la estufa a 150°C durante 1 hora para que se puedan secar, transcurrido este tiempo se dejaron enfriar en el desecador, se pesaron (W1) y se llevaron a la mufla a una temperatura de 500°C durante 3 horas en los crisoles. Después, se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron (W2), teniendo así los pesos necesarios para el cálculo de fibra cruda.

### **CÁLCULOS:**

**Ecuación 3-3:** Determinación de fibra bruta

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

En donde:

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

W<sub>1</sub> = peso del crisol poroso con la muestra después del secado en la estufa

W<sub>2</sub> = peso del crisol poroso con la muestra después de la incineración en la mufla

W<sub>0</sub> = 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:**

Se pesó entre 1 – 2 gr de la muestra seca para introducirla en el balón de digestión Kjeldahl, se añadió 1 g de sulfato de cobre, 9 g de sulfato de sodio y 25 mL de ácido sulfúrico sin manchar las paredes del balón de digestión. Se colocó el balón en el digestor y se calentó hasta obtener un líquido color verde esmeralda. Una vez obtenida esta tonalidad se dejó enfriar el balón, después se adicionó 200 mL de agua, 100 mL de NAOH y granallas de zinc: se procedió a destilar.

Recibir el destilado en un vaso conteniendo 100 mL de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Se procedió a destilar hasta obtener aproximadamente 100 mL de destilado, en el destilado se colocó entre 3-4 gotas de indicador mixto y se tituló con HCL.

### **CÁLCULOS:**

**Ecuación 3-4:** Determinación de proteína

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

En 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. Técnica para el proceso de fermentación**

#### *3.5.2.1. Proceso de fermentación*

### **PROCEDIMIENTO:**

Las formulaciones fueron llevadas a incubación a una temperatura de 35 °C durante un tiempo aproximado de 4 días. Se realizó la determinación de pH, índice de acidez y la sacarosa cada 24 horas hasta alcanzar un pH de 4,5, posteriormente se realizó el análisis microbiológico de las formulaciones, es decir los indicadores de calidad comercial y sanitaria

#### *3.5.2.2. Determinación de pH*

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

### **PROCEDIMIENTO:**

Se tomaron 50 mL de la muestra a analizar en un vaso de precipitación, se introdujo el electrodo del potenciómetro en el vaso de precipitación que contiene la muestra, evitando que se dé el contacto con las paredes del recipiente, se debió esperar hasta que el valor que arroja la pantalla sea constante y se registró el dato

### 3.5.2.3. Determinación del índice de acidez

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

#### **PROCEDIMIENTO:**

Se realizó una dilución 1:6 en la que consten 50 mL de agua purificada y 10 mL de la muestra. Se homogenizó y se procedió a tomar 25 mL de la solución en un matraz Erlenmeyer. Se colocó 1 o 2 gotas del indicador de fenolftaleína, se procedió a realizar la titulación con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta obtener un color rosado persistente. Al final leer en la bureta el volumen de solución utilizada y registrar.

#### **CALCULOS:**

**Ecuación 3-5:** Determinación del índice de acidez

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

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,

m<sub>1</sub> = masa en gramos del matraz Erlenmeyer con la muestra

### 3.5.2.4. Determinación de sólidos solubles

#### **PROCEDIMIENTO:**

El procedimiento se realizó por duplicado sobre la misma muestra de laboratorio. Se ajustó la circulación de agua del refractómetro para operar a la temperatura requerida (15 – 25 °C). Se procedió a 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. Al finalizar leer el índice de refracción o el porcentaje en masa de sacarosa.

### 3.5.3. Análisis microbiológico de las bebidas posterior a la pasteurización.

### *3.5.3.1. Determinación de Mohos y Levaduras mediante la técnica de microfast*

#### **PROCEDIMIENTO:**

Se utilizaron placas Microfast, las cuales se sacaron de su empaque y se colocaron en una superficie plana y nivelada, se levantó la película superior mientras se sostenía la placa sin tocar el área de prueba, con ayuda de la pipeta en posición vertical a la superficie de inoculación, se dispuso 1 mL de suspensión de muestra en el centro de la película inferior, se dejó caer la película superior lentamente sobre la muestra y la disolución se esparció automáticamente en toda la superficie del medio, se dejó durante al menos un minuto para permitir que la disolución se extienda por completo antes de mover la placa a la incubadora.

Las placas microfast se incubaron en posición horizontal con la película hacia arriba en pilas de no más de 20, a una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  h para levaduras y  $72 \pm 2$  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.

### *3.5.3.2. Determinación de aerobios mesófilos mediante la técnica de microfast.*

#### **PROCEDIMIENTO:**

Se preparó el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente, se colocó en un erlenmeyer 90 mL de agua de peptona, se esterilizó en el autoclave por 15 min a  $121^\circ\text{C}$ , se añadió 10 mL de la muestra de la bebida se colocó en el Erlenmeyer con 90 mL de diluyente y se homogenizó para obtener la dilución ( $10^{-1}$ ), mL de la dilución  $10^{-1}$ . Se transfirió con una pipeta a un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona.

Después, 1mL de la dilución recién preparada se transfirió a un nuevo tubo con diluyente, procediendo de esta manera a preparar las diluciones necesarias, por ejemplo, de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ .

Previamente se rotularon las placas para evitar confusiones, se colocaron en una superficie plana y se levantó el film.

Con la micropipeta ubicada perpendicularmente a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, se colocó 1000  $\mu\text{L}$  de muestra en el centro del film inferior, se bajó 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.

Se procedió a 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.

La incubación se realiza a una temperatura de más o menos  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Proceder a la lectura de las placas de acuerdo con la guía de interpretación.

#### *3.5.3.3. Determinación de E. coli/coliformes mediante la técnica de microfast.*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se preparó el agua de peptona 15 g en 1000 mL, respectivamente, después se colocó en un Erlenmeyer con 90 mL de agua de peptona, se procedió a esterilizar en el autoclave por 15 min a  $121^{\circ}\text{C}$ .

Se colocaron 10 mL de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer y homogenizar ( $10^{-1}$ ), se transfirieron 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  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ . Se rotularon las placas microfast respectivamente. Se colocaron las placas microfast en una superficie plana y levantar el film superior. Con la pipeta automática, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, se colocó 1000  $\mu\text{L}$  de muestra en el centro del film inferior, se procedió a 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.

Se incubaron las placas microfast con la película transparente hacia arriba sin invertir. Se pueden colocar varias placas una sobre otra, en columnas que no excedan 20 unidades.

**E. coli / Coliformes:** En el caso de Coliformes, incubar por  $24 \pm 2$  horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Para E. coli, incubar durante  $48 \pm 2$  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.

#### *3.5.3.4. Determinación de Staphylococcus aureus mediante la técnica de microfast*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se preparó el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente, se colocó en un Erlenmeyer con 90 mL de agua de peptona, se procedió a esterilizar en el autoclave por 15 min a 121 °C.

Se colocaron 10 mL de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer con 90 mL de diluyente y homogenizar para preparar la dilución ( $10^{-1}$ ).

Transferir con ayuda de una pipeta 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de peptona para preparar la dilución ( $10^{-2}$ ), realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ . Rotular las placas Microfast con anterioridad, colocar las placas en una superficie plana y levantar el film superior.

Con la micropipeta, ubicada de modo perpendicular a la placa, y utilizando para cada depósito puntas de plástico distintas y estériles, se colocó 1000  $\mu$ 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.

#### **3.5.4. Técnica de aislamiento y recuento por diluciones**

Para realizar el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) se preparó medios de cultivo selectivos, en este caso MRS y M17 respectivamente.

#### **3.5.5. Preparación de medios de cultivo**

##### *3.5.5.1. Preparación de Agar MRS*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se pesó 65,13 g en 1000 ml de AGAR MRS (Man, Rogosa y Sharpe HIMEDIA M641I), se añadió la cantidad calculada del volumen requerido en un Erlenmeyer de 500 mL, se agregó los mL de agua destilada calculados para las cajas Petri, posteriormente se le agregó AGAR BACTO (BD 214010), después se esterilizó por 15 minutos en el Autoclave a 121 °C.

Se dejó enfriar hasta 46°C, previa esterilización se añadió ácido acético 6 M, lo suficiente hasta alcanzar un pH 4,5 en el medio estéril, se adicionó también cicloheximida 2,5 mg/1000 mL (inhibidor del crecimiento de levaduras). Finalmente, se plaqueó y se conservó el medio de cultivo.

#### *3.5.5.2. Preparación de Agar M17*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se pesó 33,25 g en 1000 mL de AGAR M17 (CONDALAB 205062) se añadió la cantidad calculada del volumen requerido en un Erlenmeyer de 500 mL, se agregó los ml de agua destilada calculados para las cajas Petri.

Se procedió a esterilizar en el autoclave a 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar a 45-50°C Finalmente, plaquear y conservar.

#### *3.5.6. Preparación de diluciones*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se preparó el agua de peptona 1 g en 1000 mL, respectivamente, se colocó en un Erlenmeyer con 90 ml de agua de peptona, esterilizar en el autoclave por 15 min a 121 °C. Se colocaron 10 mL de la muestra de la bebida en el Erlenmeyer con 90 mL de diluyente y se homogenizó para preparar la dilución  $10^{-1}$ , se transfirió con una pipeta 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  en un tubo de ensayo con 9 ml de agua de peptona para preparar la dilución  $10^{-2}$ . Realizar el mismo proceso hasta obtener la dilución requerida  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ .

#### *3.5.7. Siembra y Aislamiento de BAL*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se tomaron 10 mL de la muestra de la formulación y se transfirió a un erlenmeyer, conteniendo 90 mL de agua de peptona al 0,1 %, a partir de este homogeneizado se procedió a preparar disoluciones consecutivas seriadas  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ .

Se seleccionaron las cajas Petri con Agar MRS y M17, se sembró mediante la técnica de extensión en superficie con la ayuda de un asa de drigalsky. Se incubaron las cajas en posición invertida a 32°C por 48 a 72 horas en condiciones microaerofílicas utilizando el sistema de jarras Gas-Pack y sobres de anaerobiosis (OXOID)



### **3.5.8. Pruebas de identificación para los aislamientos**

#### *3.5.8.1. Tinción Gram*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se colocó 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, proceder a secar y fijar la colonia con ayuda de un mechero de alcohol. Después de tener la muestra seca se colocó una gota de cristal violeta sobre la placa por un minuto y enjuagar, posterior aplicar una gota de Lugol durante un minuto y enjuagar, luego se colocó alcohol cetona sobre la placa durante 30 segundos y enjuagar. Al finalizar se aplicó safranina por 30 segundos y enjuagar y secar al ambiente, colocar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio (Casasola 2022, p. 89).

#### *3.5.8.2. Prueba de catalasa*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% sobre un portaobjetos o una caja Petri vacía y limpia, se tomó una colonia pequeña con la ayuda de un asa, se homogenizó la muestra y se esperaron unos segundos hasta ver o no la presencia de un burbujeo. Si existe tal burbujeo significa que el resultado fue positivo, aunque para el caso de las BAL, se debe tener la ausencia del burbujeo para poder confirmar la presencia de las mismas (Fernández et al. 2018, p. 2).

#### *3.5.8.3. Prueba de oxidasa*

##### **PROCEDIMIENTO:**

Para la realización de esta prueba se contó con unas tirillas reactivas, las cuales se procedió a humedecer con una gota de agua destilada y con ayuda de un asa se tomó una colonia pequeña y se untó en la almohadilla de la tirilla. Se esperó alrededor de un minuto para ver si existía el cambio de coloración o no. En caso de ser positivo se debió cambiar de color, dando así un color púrpura. Para el caso de las BAL debía dar un resultado negativo (Fernández et al. 2018, p. 2).

### **3.5.9. Pruebas de caracterización**

#### *3.5.9.1. Prueba de movilidad*

El procedimiento empleado para la realizar la prueba de movilidad se lo obtuvo a partir 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. 10).

**PROCEDIMIENTO:**

Previamente se prepararon los tubos de ensayo con agar semisólido SIM, se tomó una colonia pura con ayuda de una aguja de inoculación, se procedió a realizar la siembra en línea recta por punción profunda en el tubo correspondiente abarcando alrededor de 2 tercios de profundidad. Luego se llevó a la incubadora a una temperatura de 37°C por 24 horas en condiciones anaeróbicas.

*3.5.9.2. Producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa*

**PROCEDIMIENTO:**

Se suspendió 54.8 gr del agar Kligler en 1 litro de agua purificada. Se dejó reposar durante 5 minutos, después se calentó hasta hervir durante 1 o 2 minutos y se mantuvo una agitación constante hasta la dilución total. Se colocó el medio en los tubos, en un volumen hasta la tercera parte de estos. Se procedió a esterilizar el medio en el autoclave a una temperatura de 115°C durante 15 minutos. Se enfrió y se dejó solidificar en posición inclinada (pico de flauta) (Rossi, 2021).

*3.5.9.3. Crecimiento a diferentes temperaturas*

**PROCEDIMIENTO:**

Se colocaron 5 mL del caldo MRS en tubos de ensayo previamente esterilizados, con ayuda de un asa de inoculación, se colocó una colonia pura en el tubo y homogenizar, se llevó a incubar a 10°C y 45°C durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de espera, se puede reportar como positivo (+) cuando exista presencia de turbidez en el medio (Vargas 2018, p. 10).

*3.5.9.4. Tolerancia a distintos pH*

**PROCEDIMIENTO:**

Se colocaron 5 mL de caldo MRS en tubos de ensayo previamente esterilizados, hubo que ajustar el pH a 4.5 para ciertos tubos y otros a un pH de 5.4 con la ayuda de ácido acético 5M. Se llevó a incubar durante 48 horas a 32°C y reportar si la prueba es positiva si se observa crecimiento (Vargas 2018, p. 10).

### **3.5.10. Elaboración de la bebida a base de zapallo (*Cucurbita maxima*)**

#### **3.5.10.1. Recepción de la materia prima**

Las formulaciones se elaboraron con la materia prima que es el zapallo (*Cucurbita maxima*) del Mercado La Condamine de la ciudad de Riobamba. La materia prima fue seleccionada mediante un muestreo aleatorio simple, con criterios de inclusión y exclusión (Quiroz 2022, p. 1).

#### **3.5.10.2. Clasificado**

En esta etapa se verifica que el zapallo se encuentre en óptimo estado, considerando los requisitos que debe cumplir el mismo (*Cucurbita maxima*) destinado a consumo humano, con parámetros organolépticos básicos.

#### **3.5.10.3. Despulpado**

Una vez seleccionada la materia prima (*Cucurbita maxima*) se procedió al despulpado. Se tomó el zapallo, se lavó la corteza con agua purificada, manteniendo normas de higiene como el lavado de los materiales a usar, la limpieza del área de trabajo y el uso de los equipos de protección personal (guantes, mascarilla y cofia). Una vez limpia la materia prima se procedió a cortar en la mitad el zapallo para poder quitar las semillas que se encuentran en su interior y así proceder a despulpar dicho vegetal.

#### **3.5.10.4. Triturado**

Después del despulpado se tiene la materia prima en un estado bruto, por lo que se debe proceder con el triturado para que al momento del mezclado exista una mezcla homogénea con los otros ingredientes, por lo cual, con ayuda de una licuadora limpia y lo más aséptica posible se introdujo la pulpa del zapallo y se la licuó hasta que no presente grumos ni pedazos gruesos de dicho vegetal.

#### **3.5.10.5. Pesaje**

Cuando ya se obtuvo el triturado de la pulpa del vegetal, se procedió a pesar las cantidades necesarias para las tres formulaciones, cada una con una concentración diferente de la materia prima.

### 3.5.10.6. Mezclado

Una vez pesado cada ingrediente para las formulaciones de las bebidas se procedió a mezclar todas las cantidades de agua, materia prima (zapallo) y azúcar, necesarios para la elaboración de las bebidas.

### 3.5.10.7. Envasado y pasteurización

Una vez obtenidas todas las formulaciones se procedió a envasar cada una de ellas en los frascos previamente etiquetados, además, se realizó la pasteurización de estas.

### 3.5.11. Formulaciones de las bebidas

La Tabla 3-1 muestra las proporciones en porcentaje de los ingredientes utilizados para las diferentes formulaciones.

**Tabla 3-1:** Formulaciones de las bebidas

Formulación	Cantidad de zapallo (%)	Cantidad de Agua (%)	Cantidad de azúcar (%)
F1	34	60	6
F2	54	40	6
F3	74	20	6

Realizado por: Gallegos E., 2024

En la tabla 3-2 se puede observar las proporciones en gramos y mililitros respectivamente para cada uno de los ingredientes.

**Tabla 3-2:** Proporciones en gramos y mililitros de los ingredientes

Formulación	Cantidad de zapallo (gr)	Cantidad de Agua (ml)	Cantidad de azúcar (gr)
F1	85	150	15
F2	135	100	15
F3	185	50	15

Realizado por: Gallegos E., 2024

## 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 zapallo, para lo cual se efectuaron diferentes pruebas por duplicado. Previamente, la materia prima y la bebida fermentada se sometieron a ensayos de caracterización fisicoquímica

##### 4.1.1. Análisis proximal de la materia prima

El análisis proximal realizado a la materia prima que es el zapallo (*C. maxima*) está detallado en la tabla 4-1, en la cual se encuentran los análisis de humedad, cenizas, grasa, fibra cruda y proteínas.

**Tabla 4-1:** Análisis proximal de la materia prima

DETERMINACIÓN	UNIDAD	CANTIDAD
Humedad	%	89,21
Ceniza	%	1,69
Grasa	%	0,1
Fibra cruda	%	8,08
Proteína	%	0,85

Realizado por: Gallegos E., 2024

##### 4.1.1.1. Humedad

La humedad es uno de los parámetros a analizar en la industria alimentaria que se debe realizar con el fin de conocer el porcentaje de agua que está presente en las materias primas para la elaboración de productos, ya que estos suelen presentar una gran cantidad de este líquido. Para este análisis se tuvo como muestra a la pulpa del zapallo (*Cucurbita maxima*), en el cual se obtuvo un resultado de 89,21%, teniendo así una gran cantidad de agua presente en la muestra, esto concuerda con diferentes estudios bromatológicos realizado a esta materia prima; teniendo así a Vargas, K en el 2022 en su trabajo experimenta de titulación en donde menciona que obtuvo un 87,78% de humedad para la pulpa del zapallo, en dicho estudio se puede observar una aproximación en el resultado de Vargas y en el obtenido en este análisis (Vargas 2022, p. 12). Otro estudio realizado por Salazar, M en el 2011 en donde menciona que la humedad obtenida fue de

84,55%, con respecto a este resultado se ve una varianza un poco más en comparación al obtenido en este trabajo experimental (Salazar 2011, p. 5).

Por otro lado Armijos, C en el 2013 en su estudio obtuvo un resultado para la humedad de 96,0%, se puede evidenciar una varianza de 6,79% con respecto a la humedad obtenida en este estudio (Armijo 2013, p. 11). En cuanto a los resultados mencionados a otros estudios en comparación con el obtenido, se puede mencionar que el estudio realizado por Vargas, K., 2022 fue el de mayor similitud al porcentaje de humedad resultante en este trabajo experimental.

#### *4.1.1.2. Cenizas*

Las cenizas representan el contenido en minerales del alimento; en general, las cenizas suponen menos del 5% de la materia seca de estos. Las cenizas se determinan como el residuo que queda al quemar en un horno o mufla (Márquez 2014, p. 2).

El resultado obtenido de cenizas en este estudio fue de 1.69%, Varela, J & Zambrano, T en el 2016 en su estudio realizado obtuvo un porcentaje de 1,28 para la determinación de cenizas, en comparación con el resultado obtenido en este trabajo experimental se denota una diferencia del 0,41% por lo que se puede tomar como un valor de referencia para poder relacionar y validar dicho resultado (Varela 2016, p. 11).

#### *4.1.1.3. Grasa*

La determinación de grasas es uno de las pruebas de importancia en la industria alimentaria, ya que es necesario saber si el alimento reúne los requisitos de estándar de identidad y es uniforme (Márquez 2014, p. 2).

El porcentaje de grasa obtenido en esta investigación fue de 0,1%, el cual tiene similitud con el resultado del estudio de Armijos, C en el 2013 el cual obtuvo 0,2% de grasa, con lo cual se puede mencionar que el zapallo es un vegetal que contiene muy poca o casi nula cantidad de grasa, por lo que resulta beneficiosa para el consumo en una dieta diaria (Armijo 2013, p. 2).

#### *4.1.1.4. Fibra cruda.*

La fibra alimentaria se refiere al conjunto de polisacáridos y lignina que no son digeridos por las secreciones endógenas del tracto digestivo humano.

Como resultado de este análisis se obtuvo un valor de 8,08%, Cajas, Y en el 2015 en su trabajo experimental menciona que el valor de fibra obtenida fue de 10,99% por lo que es un valor mayor al obtenido en este estudio, pero no es una valoración muy alejada (Cajas 2015, p. 2).

#### 4.1.1.5. Proteína.

La proteína es una determinación de importancia en la industria alimentaria. El porcentaje de proteína resultante del análisis a la materia prima fue de 0, 85%, un valor casi similar fue el obtenido por Armijos, C en el 2023 en su estudio, teniendo así un resultado de 0,6%, se puede observar que hay una ligera varianza entre ambos valores, pero es la información bibliográfica más aproximada para este parámetro (Armijo 2013, p. 2).

### 4.1.2. Análisis Físico- Químico y Microbiológico de las formulaciones

#### 4.1.2.1. Análisis Fisicoquímico

El análisis físico químico realizado a las diferentes formulaciones se encuentra detallado en la tabla 4-2, teniendo requisitos como el color, la consistencia, el porcentaje de materia prima utilizado para cada formulación, el pH y los grados Brix.

**Tabla 4-2:** Análisis físico químico de las formulaciones

Requisito	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3
<b>Color</b>	Naranja	Naranja	Naranja
<b>Consistencia</b>	Líquida	Líquida	Espesa
<b>Porcentaje de zapallo</b>	34%	54%	74%
<b>pH</b>	4,54	4,50	4,45
<b>Grados Brix</b>	5,65	6,60	7,52

Realizado por: Gallegos E., 2024

Los resultados del análisis físico químico realizado a las diferentes formulaciones fueron comparados con la normativa NTE INEN 2337: 2008 JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS, en la cual se menciona que el porcentaje de pulpa no debe ser inferior al 10%, por lo cual para las diferentes formulaciones se utilizaron porcentajes que fueron desde el 34, 54 y 74% de pulpa para cada una de ellas. Las tres formulaciones presentaron una coloración naranja, característica del zapallo (*Cucurbita maxima*), para la formulación 1 (F1) y la formulación 2 (F2) la consistencia fue líquida, por el contrario, la consistencia de la formulación 3 (F3) que fue espesa.

Las tres formulaciones obtuvieron un pH diferente para cada una de ellas, teniendo así para la F1: 4,54; F2: 4,50 y F3: 4,45; la normativa menciona que el pH debe ser inferior a 4,5 pero las formulaciones no contenían un acidificante que les ayude a mantenerse estables, es por esto su varianza. La normativa también menciona que los grados Brix de las bebidas deben ser proporcionales al contenido de la fruta, esto se cumplió, como se puede evidenciar en la tabla anterior, ya que a medida que se fue aumentando el porcentaje de la fruta, aumentaron los grados Brix.

#### 4.1.2.2. Análisis Microbiológico.

En la tabla 4-3 se pueden observar los análisis microbiológicos realizados a las formulaciones para verificar que estén aptas para el consumo humano, los análisis fueron realizados posterior a la pasteurización y en estado de fermentación espontánea para proceder el ensayo sensorial

**Tabla 4-3:** Análisis microbiológico de las formulaciones

Determinación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Nivel de Aceptabilidad	NTE INEN
<b>Coliformes NMP/mL</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 3	NTE INEN 1529-6
<b>Coliformes fecales NMP/mL</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 3	NTE INEN 1529-8
<b>Recuento estándar en placa REP UFC/mL</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 10	NTE INEN 1529-5
<b>Recuento de mohos y levaduras UP/mL</b>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	< 10	NTE INEN 1529-10

Realizado por: Gallegos E., 2024

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico se presentan en la tabla 8, los mismos que fueron comparados con la normativa NTE INEN 2337: 2008 JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS. Se obtuvo una ausencia para coliformes, coliformes fecales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, por lo que se puede mencionar que las formulaciones fueron elaboradas con normas higiénicas que garantiza que se pueden consumir de forma segura.



### 4.1.3. Análisis Fisicoquímico y Microbiológico de las formulaciones durante la fermentación

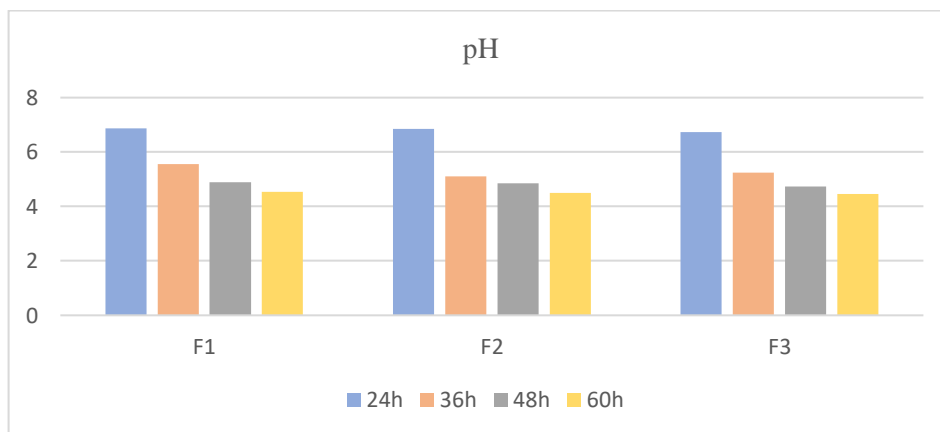
#### 4.1.3.1. Determinación de pH

Para la medición del pH en las formulaciones, se dejó transcurrir un tiempo aproximado de 24 horas para comenzar con el proceso de fermentación, teniendo a las formulaciones expuestas a una temperatura de 35°C en la estufa luego de haber sido pasteurizadas. Se obtuvieron así los siguientes resultados como lo indica la tabla 4-4.

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

	pH			
	24h	36h	48h	60h
F1	6,87	5,55	4,90	4,54
F2	6,85	5,10	4,85	4,50
F3	6,74	5,25	4,74	4,45

Realizado por: Gallegos E., 2024



**Ilustración 4-1:** Determinación de pH

Realizado por: Gallegos E., 2024

Para el proceso de fermentación se dejó transcurrir un tiempo de 24 horas hasta las 60 horas, en donde al finalizar se obtuvieron pH de 4.54 para la F1, 4.50 para la F2 y 4.45 para la F3, dando así una característica óptima para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas.

El pH dentro de una fermentación es uno de los parámetros más comúnmente medidos, ya que las células durante la fermentación producen ácidos como producto de su propio metabolismo. Por lo cual para generar el mayor crecimiento celular depende altamente del pH (Hernández et al. 2016, p. 162).

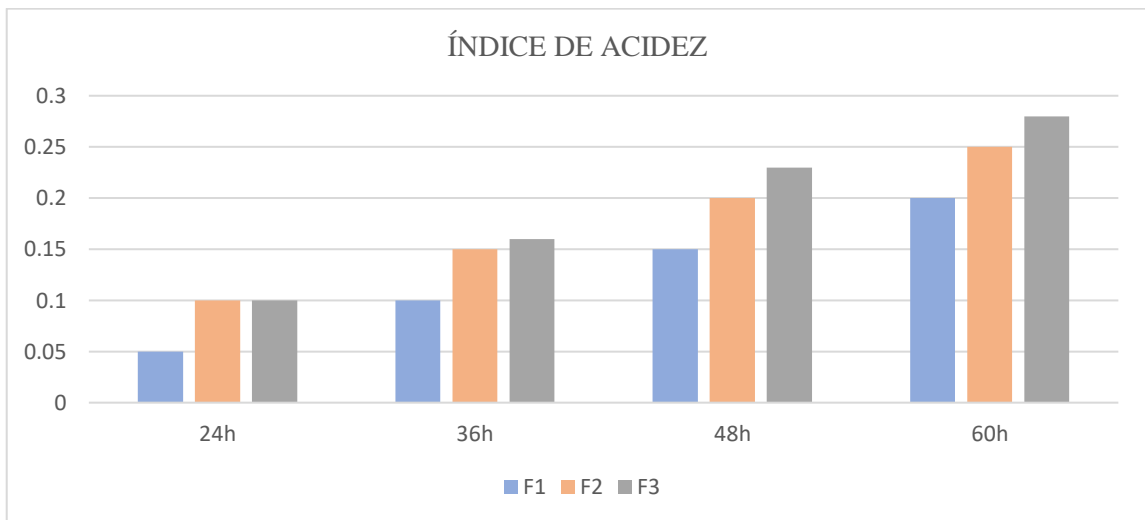
#### 4.1.3.2. Determinación del índice de acidez

El índice de acidez fue tomado en diferentes horas, teniendo así, que a las 24 horas fue la primera medición de dicha prueba, los resultados obtenidos de las diferentes mediciones se encuentran en la tabla 4-5.

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

	F1	F2	F3
24	0.05	0.10	0.10
36	0.10	0.15	0.16
48	0.15	0.20	0.23
60	0.20	0.25	0.28

Realizado por: Gallegos E., 2024



**Ilustración 4-2:** Determinación del índice de acidez

Realizado por: Gallegos E., 2024

El índice de acidez (IA) o Valor ácido se define como el volumen de NaOH que va a ir en aumento a medida que el pH de las formulaciones disminuye. (Rodríguez et al. 2016, p. 843).

Por lo que se menciona con anterioridad se puede manifestar que, en el proceso de fermentación, en donde el volumen de hidróxido de sodio será mayor a medida que el pH va disminuyendo.

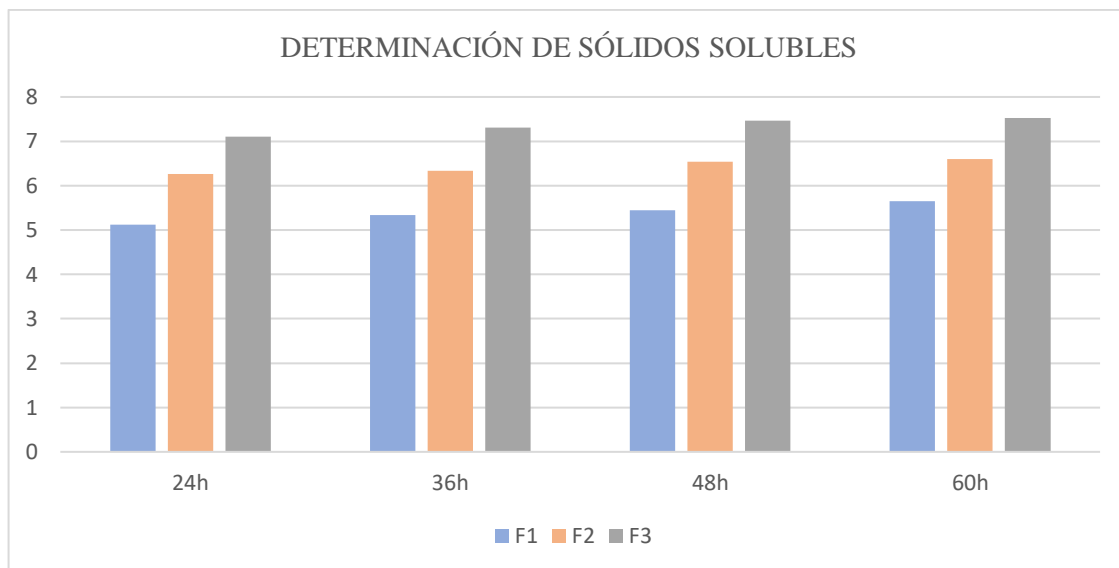
#### 4.1.3.3. Determinación de sólidos solubles.

En la tabla 4-6 se pueden observar los resultados obtenidos para la determinación de los sólidos solubles.

**Tabla 4-6:** Resultados de la determinación de sólidos solubles

	F1	F2	F3
24	5.12	6,26	7.10
36	5.34	6.33	7.31
48	5.45	6.54	7.46
60	5.65	6.60	7,52

Realizado por: Gallegos E., 2024



**Ilustración 4-3:** Determinación de sólidos solubles

Realizado por: Gallegos E., 2024

Los sólidos solubles se miden mediante el índice de refracción, este método es empleado para la determinación de sacarosa. La concentración de sólidos solubles de un alimento con fase líquida suele venir expresada bien por 100 gramos de producto, o bien por 100 gramos de fase líquida del mismo. La concentración de sólidos solubles expresada por 100 gramos de fase líquida se le conoce también como grados Brix ( $^{\circ}$ Brix). Ambas formas de expresar la concentración de sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix o gr sólidos solubles/100 g de producto) son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria (Pastor 2022, p. 1).

En el caso de las formulaciones a un tiempo de 60 horas se obtuvieron, para la F1 un valor de 5,65 la misma contenía un 34% de pulpa de zapallo, para la F2 un valor de 6,60 con 54% de pulpa de zapallo y para a F3 un valor de 7,52 con 74% de pulpa de zapallo, con esto se da garantía a lo que menciona la normativa NTE INEN 2337: 2008 JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS, en donde dice 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 zapallo.

#### 4.1.3.4. Determinación de indicadores de calidad microbiológica.

En la tabla 4-7 se mencionan los resultados obtenidos en el análisis de indicadores de calidad microbiológica de las diferentes formulaciones realizadas.

**Tabla 4-7:** Determinación de indicadores de calidad microbiológica

Determinación	Formulación 1	Formulación 2	Formulación 3	Nivel de Aceptabilidad	NTE INEN
Coliformes NMP/mL	Ausencia	Ausencia	Ausencia	<b>Ausencia</b>	NTE INEN 1529-6
Coliformes fecales NMP/mL	Ausencia	Ausencia	Ausencia	<b>Ausencia</b>	NTE INEN 1529-8
Aerobios mesófilos	3	4	3	<b>&lt; 10</b>	NTE INEN 1529-5
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	<b>Ausencia</b>	UNE-EN ISO 6888-2
Mohos y Levaduras	Ausencia	Ausencia	Ausencia	<b>&lt; 10</b>	NTE INEN 1529-10

Realizado por: Gallegos E., 2024

En la presente tabla se mencionan los resultados obtenidos del análisis microbiológico de las bebidas, esto posterior al proceso de fermentación. Se realizó la determinación de los indicadores de calidad, teniendo así a *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, fecales y aerobios mesófilos y mohos y levaduras, teniendo en cuenta la normativa ecuatoriana.

La calidad microbiológica y la vida útil de los alimentos se pueden estimar determinando el número de bacterias aerobias y anaerobias, la presencia de indicadores de contaminación fecal e higiene (coliformes fecales y totales). Además, la determinación de hongos y levaduras es importante ya que ellos pueden causar la descomposición de los alimentos (Rodríguez, 2010).

#### 4.1.4. Aceptabilidad de las formulaciones

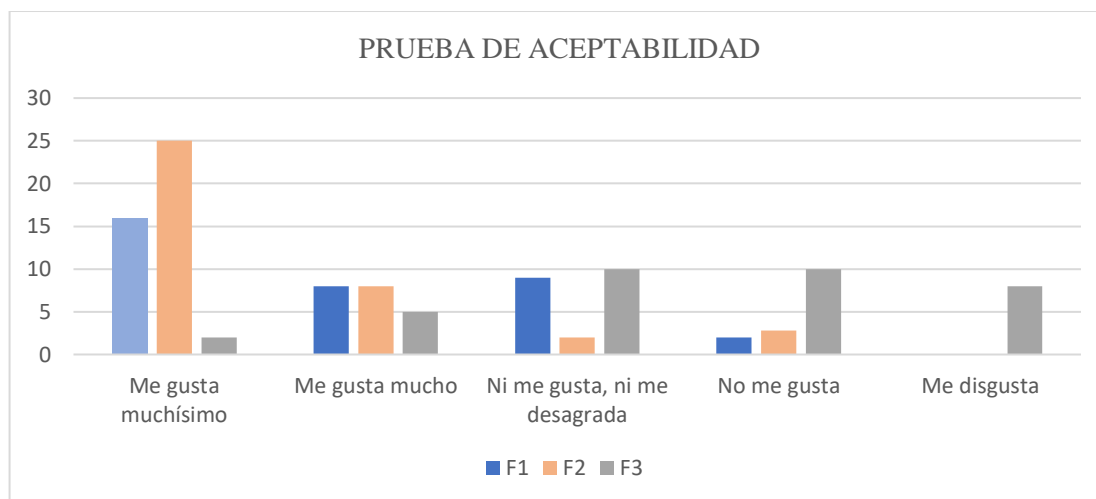
##### 4.1.4.1. Resultado de aceptabilidad

Se realizó una evaluación de las tres formulaciones realizadas, con la aplicación de una prueba hedónica para poder identificar qué formulación óptima y la más aceptada por la población de estudio. Participaron 35 estudiantes de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). Los resultados obtenidos de la prueba hedónica se aprecian en la tabla 4-8.

**Tabla 4-8:** Resultado obtenido de la encuesta de aceptabilidad mediante la prueba hedónica

Puntuación	F1	F2	F3
Me gusta muchísimo	16	25	2
Me gusta mucho	8	8	5
Ni me gusta ni me desagrada	9	2	10
No me gusta	2		10
Me disgusta			8

Realizado por: Gallegos E., 2024



**Ilustración 4-4:** Valoración de encuestas

Realizado por: Gallegos E., 2024

La prueba de aceptabilidad fue realizada a los estudiantes de octavo semestre de la carrera de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, en la cual se obtuvieron resultados favorables para la formulación 2 (F2), teniendo así un valor de 25 votos a favor para la opción de “Me gusta muchísimo”, seguida de la Formulación 1 (F1) con 16 votos y la Formulación 3 (F3) con tan solo 2 votos favorables. Mediante esto se puede mencionar que la F2 fue la formulación con mayores votos a favor para ser la seleccionada entre las tres bebidas.

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

##### 4.1.5.1. Tinción Gram, catalasa y oxidasa

Para la realización de la prueba de Tinción Gram, Catalasa y Oxidasa se tomaron veinte colonias del medio de cultivo MRS y veinte colonias del medio de cultivo M17, obteniendo los resultados detallados en la tabla 4-9.

**Tabla 4-9:** Pruebas de tinción, oxidasa y catalasa de BAL en medios MRS y M17

Colonia	Tinción gram	Catalasa	Oxidasa	Colonia	Tinción gram	Catalasa	Oxidasa
BAL 1 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 1 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 2 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 2 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 3 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 3 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 4 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 4 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 5 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 5 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 6 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 6 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 7 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 7 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 8 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 8 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 9 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 9 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 10 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 10 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 11 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 11 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 12 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 12 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 13 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 13 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 14 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 14 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 15 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 15 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 16 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 16 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 17 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 17 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 18 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 18 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 19 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 19 (M17)	Cocos (+)	-	-
BAL 20 (MRS)	Cocos (+)	-	-	BAL 20 (M17)	Cocos (+)	-	-

Realizado por: Gallegos E., 2024

Como se muestra en la tabla 4-14 los resultados obtenidos para las pruebas bioquímicas de identificación de bacterias ácido-lácticas se obtuvieron que las colonias del medio MRS se mostraron más pequeñas en comparación con las del medio M17, además presentaron una elevación menos pronunciada, mostraron una apariencia menos lechosa, por el contrario las

colonias del medio M17 se mostraron más grandes, mejor definidas y con una apariencia más lechosa, en ambos medios de cultivo se denotaba un olor característico de las BAL a lácteo.

En cuanto a la morfología de las bacterias ácido lácticas, estas pueden ser cocos, cocobacilos o bacilos, aunque para esta investigación se obtuvieron solamente cocos para ambos medios. Ramírez, C y Vélez J, en el año 2016 mencionan que las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, catalasa negativas, y anaerobio-facultativas. Para su aislamiento se ha reportado el uso de diferentes medios de cultivo; Man Rogosa Sharpe (MRS) y M17. Utilizando éstos medios y variando las condiciones de incubación es posible realizar un aislamiento dirigido de BAL, en que los géneros más importantes son; *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Ramírez 2018, p. 115).

#### 4.1.6. Pruebas de caracterización de bacterias ácido-lácticas

##### 4.1.6.1. Prueba de movilidad

La prueba de movilidad fue realizada a las 20 colonias de cada medio de cultivo (MRS y M17), lo resultados se encuentran detallados en la tabla 4-10.

**Tabla 4-10:** Movilidad de las bacterias ácido-lácticas (BAL)

MOVILIDAD	COLONIA	MOVILIDAD	COLONIA
-	BAL 1 (MRS)	-	BAL 1 (M17)
-	BAL 2 (MRS)	-	BAL 2 (M17)
-	BAL 3 (MRS)	-	BAL 3 (M17)
-	BAL 4 (MRS)	-	BAL 4 (M17)
-	BAL 5 (MRS)	-	BAL 5 (M17)
-	BAL 6 (MRS)	-	BAL 6 (M17)
-	BAL 7 (MRS)	-	BAL 7 (M17)
-	BAL 8 (MRS)	-	BAL 8 (M17)
-	BAL 9 (MRS)	-	BAL 9 (M17)
-	BAL 10 (MRS)	-	BAL 10 (M17)
-	BAL 11 (MRS)	-	BAL 11 (M17)
-	BAL 12 (MRS)	-	BAL 12 (M17)
-	BAL 13 (MRS)	-	BAL 13 (M17)
-	BAL 14 (MRS)	-	BAL 14 (M17)
-	BAL 15 (MRS)	-	BAL 15 (M17)
-	BAL 16 (MRS)	-	BAL 16 (M17)
-	BAL 17 (MRS)	-	BAL 17 (M17)
-	BAL 18 (MRS)	-	BAL 18 (M17)

-	BAL 19 (MRS)	-	BAL 19 (M17)
-	BAL 20 (MRS)	-	BAL 20 (M17)

Realizado por: Gallegos E., 2024

Como se puede observar en la tabla 4-15 las BAL no presentan movilidad, no es una característica propia de ellas, por lo que los resultados obtenidos son acorde a este tipo de bacterias, lo que menciona Parra, R en el 2010 comprueba que estos resultados son una característica de las BAL “Se trata de un grupo de bacterias fisiológicamente uniformes, son organismos Gram-positivos, formadores de no esporas, no motilidad y forma de cocos y carencia de catalasa” (Parra 2018, p. 93).

#### 4.1.6.2. Crecimiento a diferentes temperaturas

El crecimiento a diferentes temperaturas se realizó para los dos medios de cultivos utilizados para las BAL, teniendo así 30 y 37°C, durante un tiempo de 24 y 48 horas para poder determinar cuál es su temperatura y el tiempo de crecimiento óptimo para estas bacterias. Los resultados se reflejan en la tabla 4-11.

**Tabla 4-11:** 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	
30	MRS	no	Sí	
37	MRS	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	-	
30	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	
37	M17	sí	-	



37	M17	sí	-	
----	-----	----	---	--

Realizado por: Gallegos E., 2024

En la presente tabla (4-11), se pueden observar los resultados del crecimiento de las BAL en medios de cultivo como el MRS y el M17 a diferentes temperaturas (30 y 37°C), en donde se puede divisar que a las 48 horas existe un crecimiento al 100% de las colonias de las bacterias para ambas temperaturas utilizadas. Lo que menciona Parra, R en el 2010 cobra mucho sentido después de estos resultados, “además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL.

Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, como también las condiciones ambientales” (Parra 2018, p. 93).

#### 4.1.6.3. Tolerancia a distintos pH

Se realizó la tolerancia del pH a las BAL para poder identificar el pH más adecuado para su crecimiento, teniendo así los resultados obtenidos en la tabla 4-12.

**Tabla 4-12:** 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	
5.4	MRS	no	sí	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
4.5	MRS	sí	-	
5.4	M17	no	si	100%
5.4	M17	no	si	
5.4	M17	no	si	
5.4	M17	no	si	
5.4	M17	no	si	
4.5	M17	sí	-	
4.5	M17	sí	-	

4.5	M17	sí	-	
4.5	M17	sí	-	
4.5	M17	sí	-	

Realizado por: Gallegos E., 2024

En la tabla 4-17 se pueden observar los resultados del crecimiento de las colonias de las bacterias ácido lácticas a diferentes pH, teniendo así un pH de 4.5 y otro de 5.4, obteniendo así que a las 24 horas con el pH de 5.4 no hubo crecimiento para ninguno de los medios, pero con el pH de 4.5 ya se podía observar un crecimiento aproximado, no al 100%, pero se lograban observar las pequeñas colonias. A partir de las 48 horas existió un crecimiento al 100% de todas las colonias para los medios MRS y M17 para los dos pH utilizados en esta prueba.

Sánchez, L & Tromps, J en el año 2014 realizaron su investigación utilizando como variable al pH para la prueba de crecimiento, en donde ellas pudieron observar el crecimiento de sus colonias con pH de 3.4, 5 y 6, obteniendo resultados favorables para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Sánchez 2014, p. 124).

#### 4.1.6.4. Producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa

Las bacterias ácido-lácticas pueden ser de diferentes tipos, pero con respecto a los resultados obtenidas, hubo la presencia exclusivamente de cocos, por lo cual son BAL homofermentativas, teniendo como producto final únicamente el ácido láctico, dando como negativo a la producción de gas por parte de las bacterias. Esto lo menciona Chisag, L en el año 2022 en su trabajo de titulación “Las BAL homolácticas utilizan la glicólisis o ruta de Embden-Meyerhof para catabolizar la glucosa y producir 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* (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*) (Chisag 2022, p. 5).

## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Ante la falta de una normativa ecuatoriana para este vegetal, la caracterización de *Cucurbita maxima*, materia prima para la elaboración de la bebida fermentada se realizó mediante un análisis proximal, con determinaciones de humedad, cenizas, grasas, fibra cruda y proteína, pudiendo así corroborar con datos bibliográficos que los resultados obtenidos son similares con otros estudios realizados dentro del territorio ecuatoriano.
- En este trabajo de titulación se elaboraron tres formulaciones de bebidas fermentadas a base de zapallo (*Cucurbita maxima*), cada una tuvo una composición diferente, teniendo así para la formulación 1 (F1) un 34% de materia prima, 60% de agua y 6% de azúcar, esta última variable fue fija para todas las formulaciones, para la formulación 2 (F2) un 54% de materia prima y 40% de agua, para la formulación 3 (F3) un 74% de materia prima y 20% de agua. Sobre cada una de las formulaciones se ensayaron pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, de acuerdo con la normativa técnica ecuatoriana NTE INEN 2 337:2008 JUGOS, PULPAS, CONCENTRADOS, NECTARES, BEBIDAS DE FRUTAS Y VEGETALES. REQUISITOS, la cual establece los requisitos necesarios para las bebidas fermentadas. La fermentación desarrollada fue espontánea, en donde se realizaron pruebas de determinación de pH, índice de acidez y sólidos solubles. Con respecto al pH fue uno de los parámetros más importantes, ya que las bebidas debían llegar al pH óptimo de 4.5 para saber en qué momento se frena el proceso. Además, se realizaron pruebas de indicadores de calidad, con las cuales se garantizó que las formulaciones se encontraban en óptimas condiciones para el consumo humano, ya que se debía realizar la prueba de aceptabilidad, la cual permitió escoger a la F2 como la más adecuada.
- La caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial garantiza la calidad, inocuidad y aceptabilidad de la bebida fermentada a base de zapallo (*Cucurbita maxima*), constituida por 54% de zapallo, 40% de agua y 6% de azúcar.
- A partir de la F2 fue posible aislar bacterias ácido lácticas, verificando que el proceso de fermentación fue generado por esta microbiota, las mismas que serían responsables de las características sensoriales y de inocuidad, ya que son antagonicas de microorganismos potencialmente patogénico. Adicionalmente, estas bacterias estarían implicadas en su conservación. Además, los tratamientos de pH y cambios de temperatura a los cuales fueron

sometidas las bacterias indican la posibilidad de emplearlas en estudios posteriores. En cuanto a la producción de CO<sub>2</sub> se denota que las bacterias eran homolácticas, ya que no hubo la producción de gas. Con todos los resultados obtenidos se pudo verificar en bibliografía que las colonias obtenidas en el análisis microbiológico se trataban de bacterias ácido lácticas, que posiblemente tengan actividad probiótica.

## **5.2. Recomendaciones**

- Para dicho trabajo experimental es necesario que se realicen los estudios en un periodo de tiempo adecuado, además de que se requieren que los materiales empleados para este estudio estén presentes, para así evitar infortunios en la práctica.
- Este estudio realizado sirve para futuras investigaciones en las cuales se pueda profundizar y así poder darle un valor agregado a dicho estudio, ya que con los resultados obtenidos se comprobó que la materia prima utilizada tiene la presencia de bacterias ácido lácticas, que con ayuda de los medios adecuados pueden crecer en óptimas condiciones y puede ser usadas para posteriores estudios.
- Con esta investigación se da paso a que con un mayor aporte económico se puedan conocer el tipo de bacterias ácido lácticas presentes en la materia prima empleada, con ayuda de estudios moleculares poder determinar la especie de bacteria ácido láctica encontrada en este estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **ARMIJO, Carlos.** Elaboración de harina de zapallo (curcuvita máxima) fortificada con harina de soya, (glisine max) para uso alimenticio, en el cantón las naves. [en línea] Trabajo de Titulación. Repositorio Universidad Estatal de Bolivar. Ecuador. 2013. pág. 21. [Consulta: 30 de noviembre 2023]. Disponible en: [https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UEB\\_a0128863b1a60c340c8505b3e31e9814](https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UEB_a0128863b1a60c340c8505b3e31e9814)
2. **ARROYO, Erika.** Barra energética a partir del fruto del zapallo (Cucirbita máxima) [en línea] Trabajo de Titulación. UDLA. Ecuador. 2018. pág. 59. [Consulta: 15 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/10219/1/UDLA-EC-TIAG-2018-35.pdf>
3. **CAJAS, Yessenia.** Leche fermentada suplementada con fibra de zapallo (*Cucurbita máxima*) utilizando dos géneros de bacterias probióticas (Lactobacillus y Bifidobacterium). *Angewandte Chemie International Edition* [en línea] Trabajo de Titulación. Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador. 2015. pág. 29. [Consulta: 15 de noviembre 2023]. Disponible en: [https://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/19172/1/7802\\_1.pdf](https://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/19172/1/7802_1.pdf)
4. **CAMACHO, Jhon.** "Probióticos: una mirada al mecanismo de acción y aplicaciones clínicas en Pediatría". *Salud Uninorte* [en línea] 2022, (Colombia), vol. 38(3), pág. 891. [Consulta: 2 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/817/81775299015/html/>.
5. **CARBONERO, Pilar.** Bioquímica de las fermentaciones. Monografías de la Universidad Politécnica de Madrid [en línea] España: Universidad Politécnica, 1975. [Consulta: 2 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://oa.upm.es/55235/1/FERMENTACIONES.pdf>.
6. **CASASOLA, María.** "La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana". *Revista Colegio de Microbiología Química Clínica de Costa Rica* [en línea] 2022, (Costa Rica), vol. 27(2), pág. 1. [Consulta: 5 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://revista.microbiologos.cr/wp-content/uploads/2023/11/Volumen-27-No2-Articulo-3-89-98.pdf>
7. **CHISAG, Lourdes.** Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en un fermentado láctico de granos germinados de quinua (*Chenopodium quinoa*) para potenciales aplicaciones [en línea] Trabajo de Titulación. ESPOCH. Ecuador. 2022. pág. 24. [Consulta: 1 de

noviembre 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17394>

8. **CONAHCYT.** *Bebidas fermentadas mexicanas: ¿benéficas para la salud?* [blog] México: CONAHCYT, 2022. [Consulta: 1 de noviembre 2023]. Disponible en: [https://www.ciad.mx/bebidas-fermentadas-mexicanas-beneficas-para-la-salud/#:~:text=Las%20principales%20bebidas%20fermentadas%20hechas,entre%20otros%20\(t%20abla%201\)](https://www.ciad.mx/bebidas-fermentadas-mexicanas-beneficas-para-la-salud/#:~:text=Las%20principales%20bebidas%20fermentadas%20hechas,entre%20otros%20(t%20abla%201))

9. **FERNÁNDEZ, Ana et al.** *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.* [en línea] Madrid: SEIMC, 2018. [Consulta: 13 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>

10. **GARCÍA, Carlos.** "Produccion De Acido Lactico Por Via Tecnológica". *Temas Agrarios* [en línea] 2022, (Colombia), vol. 15(2), pág. 9. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4149619.pdf>.

11. **GUÍA-VERDE.** *Cucurbita maxima.* [blog] España: Guía Verde, 2022. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.guiaverde.com/guia-de-plantas/cucurbita-maxima-4715/>

12. **HERNÁNDEZ, Aldo et al.** "Medición en línea de pH, Temperatura y Agitación de medio de cultivo en fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*". *Ecorfan* [en línea] 2016, (México), vol. 1(1), págs. 162-173. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: <http://www.ecorfan.org/handbooks/Ciencias de la Ingenieria y Tecnologia T-VI/ARTICULO 17.pdf>.

13. **IMSS.** *Enfermedades Gastrointestinales.* [blog] México: IMSS, 2015. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.imss.gob.mx/saludenlinea/enfermedadesgastrointestinales#:~:text=Son%20enfermedades%20que%20atacan%20el,algunos%20medicamentos%20que%20las%20provocan..>

14. **INSTITUTO-DYN.** *Estas son las consecuencias de una mala alimentación y las enfermedades asociadas.* [blog] España: Instituto Europeo de Dietética, 2022. [Consulta: 23 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://institutodyn.com/mala-alimentacion-causas-consecuencias/>.

15. **JIMÉNEZ, Ana.** "Nutrición y microbiota en población pediátrica. Implicaciones sanitarias". *Nutrición hospitalaria* [en línea] 2020, (México), vol. 37(2), págs. 1-4. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112020000600003](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112020000600003)
16. **MÁRQUEZ, Betsy.** Refrigeración y congelación de alimentos: terminología, definiciones y explicaciones. [en línea] Trabajo de Titulación. Universidad Nacional de Perú. 2014. pág. 3. [Consulta: 1 de noviembre 2023]. Disponible en: [https://prezi.com/00ehyiiku\\_j3/refrigeracion-y-congelacion-de-alimentos/](https://prezi.com/00ehyiiku_j3/refrigeracion-y-congelacion-de-alimentos/)
17. **MENDOZA, Ana.** *Zapallo: versátil, rico, liviano y lleno de vitaminas.* [blog] España: Gobierno de Mendoza, 2022. [Consulta: 24 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://www.mendoza.gov.ar/prensa/zapallo-versatil-rico-liviano-y-lleno-de-vitaminas/#:~:text=En%20su%20punto%20justo%20contiene,es%20tolerable%20a%20cualquier%20edad..>
18. **NOA.** "Diferencias entre bebidas fermentadas y destiladas". *Noa Drinks.* [en línea]. [en línea] 2023, (España), vol. 1(1), pág. 1. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://noadrinks.com/blogs/news/bebidas-fermentadas-y-bebidas-destiladas-cuales-son-mas-sanas>
19. **OMS.** *Malnutrición.* [blog] Suiza: OMS, 2023. [Consulta: 12 de enero 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>.
20. **PARRA, Ricardo.** "Bacterias ácido-lácticas". *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [en línea]. [en línea] 2018, (Colombia), vol. 8(1), pág. 18. [Consulta: 6 de diciembre 2023]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012)
21. **PASTOR, Clara.** "Determinación de los sólidos solubles De Un Alimento Con Un Alto Y Un Bajo Contenido En Agua". *Universidad Politecnica de Valencia* [en línea] 2022, (Valencia), vol.1 (1), pág. 5. [Consulta: 22 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/102969/Pastor%3BGonz%C3%A1lez%20-%20Determinaci%C3%B3n%20de%20los%20s%C3%B3lidos%20solubles%20de%20un%20alimento%20con%20un%20alto%20y%20un%20bajo%20cont....pdf?sequence=1&isAllowed=y>

22. **PRIMICIAS.** *La revolución de las bebidas vegetales: Un viaje nutritivo y versátil.* [blog] España: Primicias, 2023. [Consulta: 12 de enero 2024]. Disponible en: <https://www.primicias.ec/noticias/patrocinado/la-revolucion-de-las-bebidas-vegetales-un-viaje-nutritivo-y-versatil/>.
23. **QUIROZ, Tanya.** Calidad bromatológica y tiempo de vida útil de una bebida láctea a base zapallo (*Cucúrbita mkáxima*) y piña (*Ananá comosus*) [en línea] Trabajo de Titulación. Universidad Técnica de Manabí, 2022. pág. 25. [Consulta: 13 de noviembre 2023]. Disponible en: <http://repositorio.utm.edu.ec/items/8c020eaa-21a1-476e-846c-621e1c92337e/full>
24. **RAMÍREZ, Carolina.** "Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra". *Informacion Tecnologica* [en línea] 2018, (México), vol.27(6), pág. 115. [Consulta: 9 de diciembre 2023]. Disponible en: [https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000600012&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000600012&script=sci_abstract&tlng=pt)
25. **RODRÍGUEZ, Jorge et al.** "Determinación Del Índice De Acidez Y Acidez Total De Cinco Mayonesas". *Universidad Autónoma de Nuevo León* [en línea] 2018, (México), vol.1(2), pág. 843. [Consulta: 9 de diciembre 2023]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/23853/>
26. **RODRÍGUEZ, Evelyn.** "Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* [en línea] 2010, (Costa Rica), vol. 60(2), pág. 5 [Consulta: 9 de diciembre 2023]. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2010/2/art11/#:~:text=La%20calidad%20microbiol%C3%B3gica%20y%20la,de%20contaminaci%C3%B3n%20fecal%20e%20higiene%20>
27. **ROSSI, Alejandro.** "Kligler Hierro Agar". *Britania* [en línea] 2021, (Argentina), vol.1(1), pág.. 2. [Consulta: 9 de diciembre 2023]. Disponible en: [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_60706c3393e51.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60706c3393e51.pdf)
28. **SALINAS, Renata.** "Probióticos: desafíos, revisión y alcance". *Dialnet* [en línea] 2021, (Costa Rica), vol.6(6), pág.. 13. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7968552>.
29. **ROMERO, María.** Desarrollo de la línea de producción de un complemento alimenticio rico en fibra a partir de zapallo. [en línea] Trabajo de Titulación. ESPOL. Ecuador, 2012. pág. 15. [Consulta: 25 de noviembre 2023]. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/31187/D->



79570.pdf?sequence=-1&isAllowed=y.

30. **RONDÓN, Lisett et al.** "Probióticos: generalidades". *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* [en línea] 2015, (Venezuela), vol.78(4), pág.. 123. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3679/367945817006.pdf>
31. **SALAZAR, Marcia.** Elaboración y control de calidad de yogurt con zapallo endulzado con stevia para pacientes diabéticas [en línea] Trabajo de Titulación. ESPOCH, Ecuador, 2011. pág. 15. [Consulta: 25 de noviembre 2023]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1624/1/56T00295.pdf>
32. **SÁNCHEZ, Lilian.** "Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico". *Revista Salud Animal* [en línea] 2014, (Venezuela), vol.36(2), pág.. 125. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2014000200008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2014000200008)
33. **SÁNCHEZ, Margarita.** *15 enfermedades digestivas comunes*. [blog] España: Vivo labs, 2022. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: <https://vivolabs.es/15-enfermedades-digestivas-comunes/>.
34. **RODRÍGUEZ, Evelyn.** "Evaluación microbiológica de alimentos listos para consumo procesados por pequeñas industrias costarricenses". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* [en línea] 2010, (Costa Rica), vol.60(2), pág.. 15. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2010/2/art11/#:~:text=La%20calidad%20microbiol%C3%B3gica%20y%20la,de%20contaminaci%C3%B3n%20fecal%20e%20higiene%20>
35. **VARELA, José.** Evaluación química y bromatológica de las dosis de lactobacillus plantarum en la producción de ensilajes de zapallo ( *Cucurbita máxima* ) y yuca ( *Manihot esculenta* ). [en línea] Trabajo de Titulación. ESPAM, Ecuador, 2016. pág. 13. [Consulta: 25 de noviembre 2023]. Disponible en: <https://repositorio.espam.edu.ec/handle/42000/259>
36. **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] Trabajo de Titulación. ESPOCH, Ecuador, 2018. pág. 20. [Consulta: 25 de noviembre 2023]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/8834>
37. **VARGAS, Kerly.** Diseño de un proceso industrial para la elaboración de una barra proteica

con soya (*Glycine max*) germinada y semillas de zapallo (*Cucurbit max*). [en línea] Trabajo de Titulación. ESPOCH Ecuador, 2022. pág. 20. [Consulta: 25 de noviembre 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17689>

38. **VELÁSQUEZ, Carlos.** "Enfermedades gastrointestinales y hepáticas". *Gaceta Médica Mexicana* [en línea] 2016, (México), vol.152(1), pág.. 74. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: [https://anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM\\_152\\_2016\\_S1\\_074-083.pdf](https://anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_074-083.pdf)

39. **VILLANUEVA, Rafael.** "Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos". *Ingeniería Industrial* [en línea] 2015 (Perú), vol. 33 (1), pág. 265. [Consulta: 11 de enero 2024]. Disponible en: [https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria\\_industrial/article/viewFile/545/513](https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria_industrial/article/viewFile/545/513).

40. **ZERATSKY, Katherine.** *Nutrición y comida saludable*. [blog] Estados Unidos: Mayo clinic, 2022. [Consulta: 20 de enero 2024]. Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es/healthylifestyle/nutritionandhealthyeating/expertanswers/probiotics/faq-20058065>.



## ANEXOS

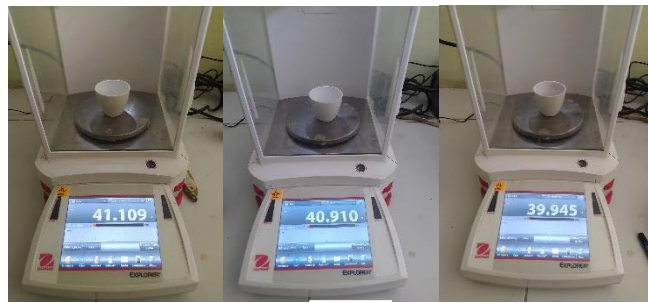
### ANEXO A: ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MATERIA PRIMA (*Cucurbita maxima*)



a)



b)



c)



d)



e)

- a) Determinación de humedad mediante la termobalanza.
- b) Determinación de cenizas mediante la calcinación en la mufla.
- c) Pesaje para la determinación de fibra.
- d) Equipo para la determinación de grasas.
- e) Determinación de proteína mediante el método Kjeldahl.

**ANEXO B: ELABORACIÓN DE LA BEBIDA A BASE DE ZAPALLO (*Cucurbita maxima*)**



## ANEXO C: PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS



a)



b)



c)



d)

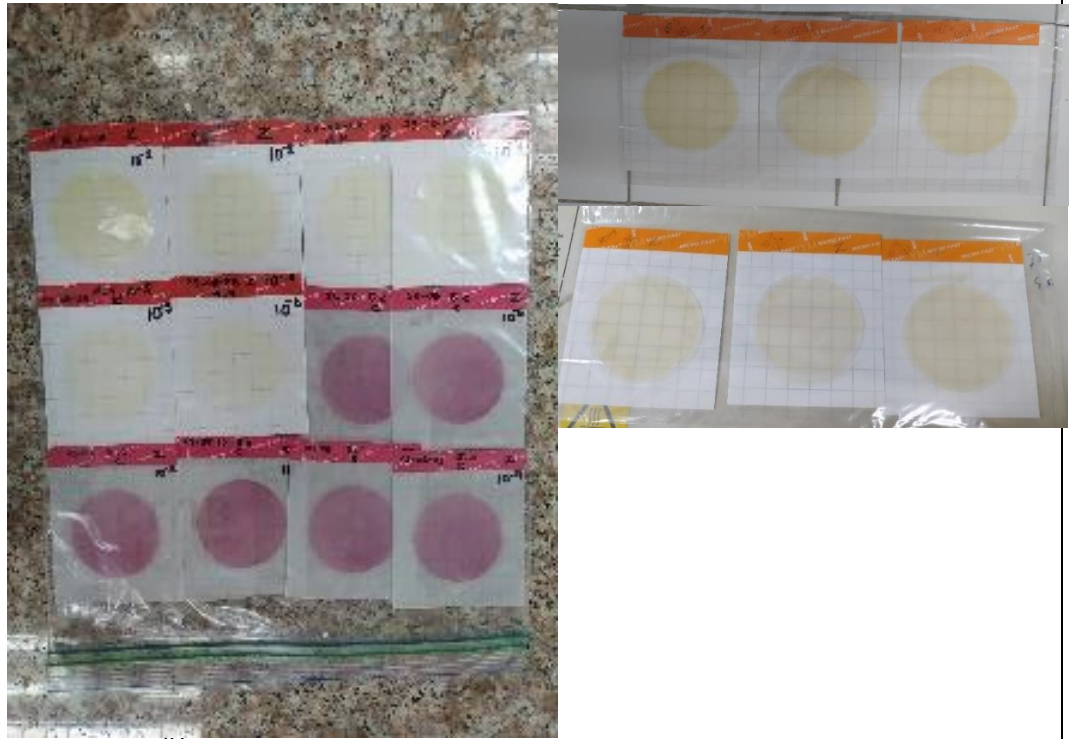
- a) Incubación de las formulaciones a 30°C.
- b) Determinación del pH a las tres formulaciones
- c) Determinación del índice de acidez de las tres formulaciones.
- d) Determinación de sólidos solubles.

## ANEXO D: PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE LAS PRUEBAS DE CALIDAD





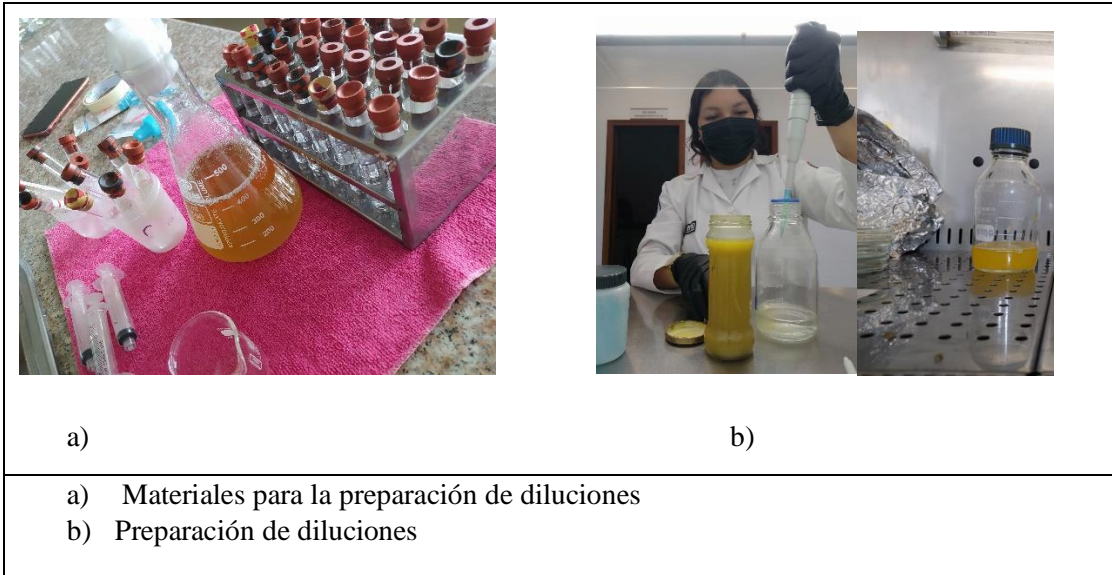
## ANEXO E: DETERMINACIÓN DE INDICADORES DE CALIDAD



a)

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

## ANEXO F: PREPARACIÓN DE DILUCIONES

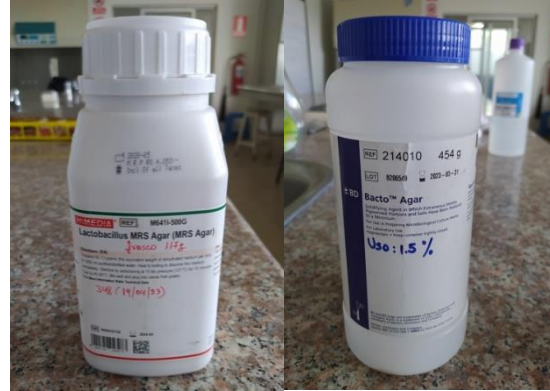




## ANEXO G: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



a)



b)



c)



d)

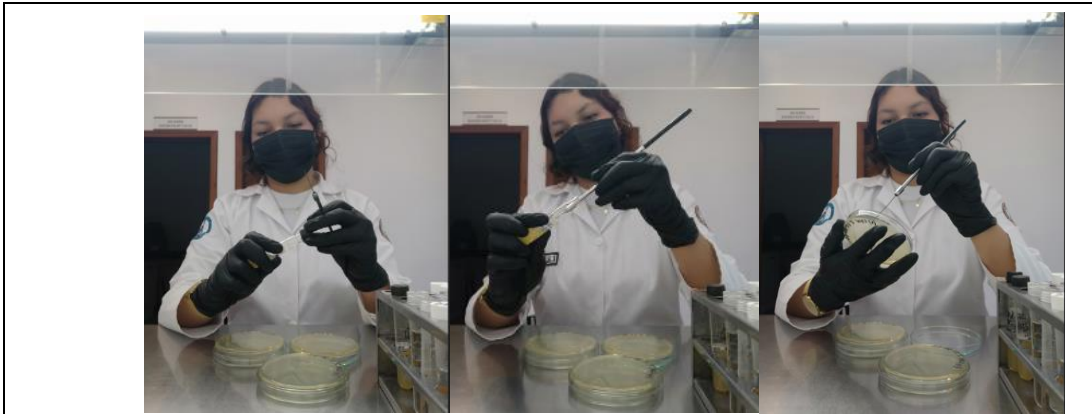
a) Medio de cultivo M17.

b) Medio de cultivo MRS con Bacto Agar.

c) Medios de cultivos preparados y listos para ser esterilizados.

d) Medios de cultivo ya plaqueados y solidificados.

## ANEXO H: SIEMBRA EN MEDIOS DE CULTIVOS SELECTIVOS



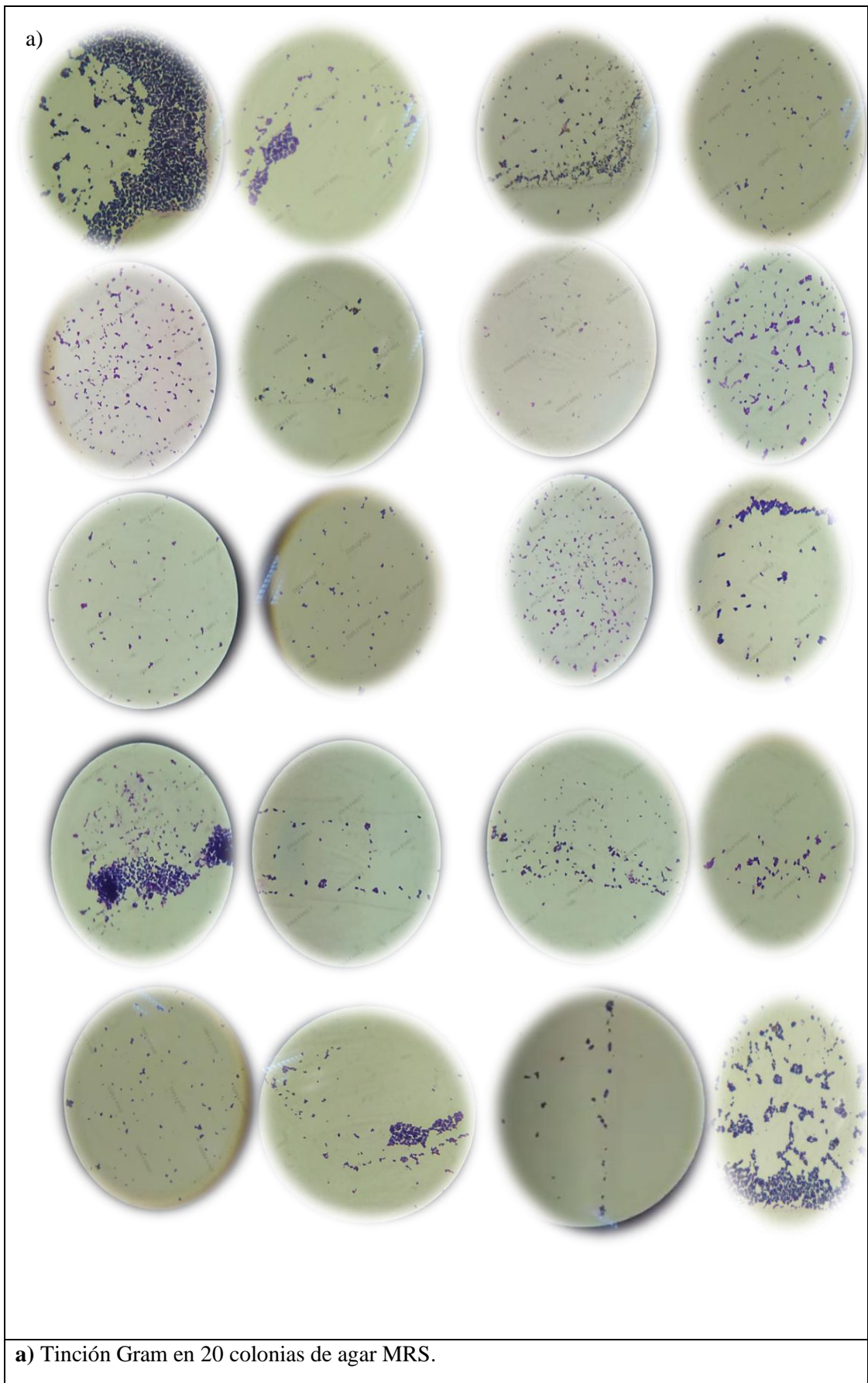
a)

a) Siembra en superficie en los medios de cultivos selectivos.

**ANEXO I: COLONIAS EN MEDIOS SELECTIVOS Y ENRIQUECIMIENTO EN CALDO**

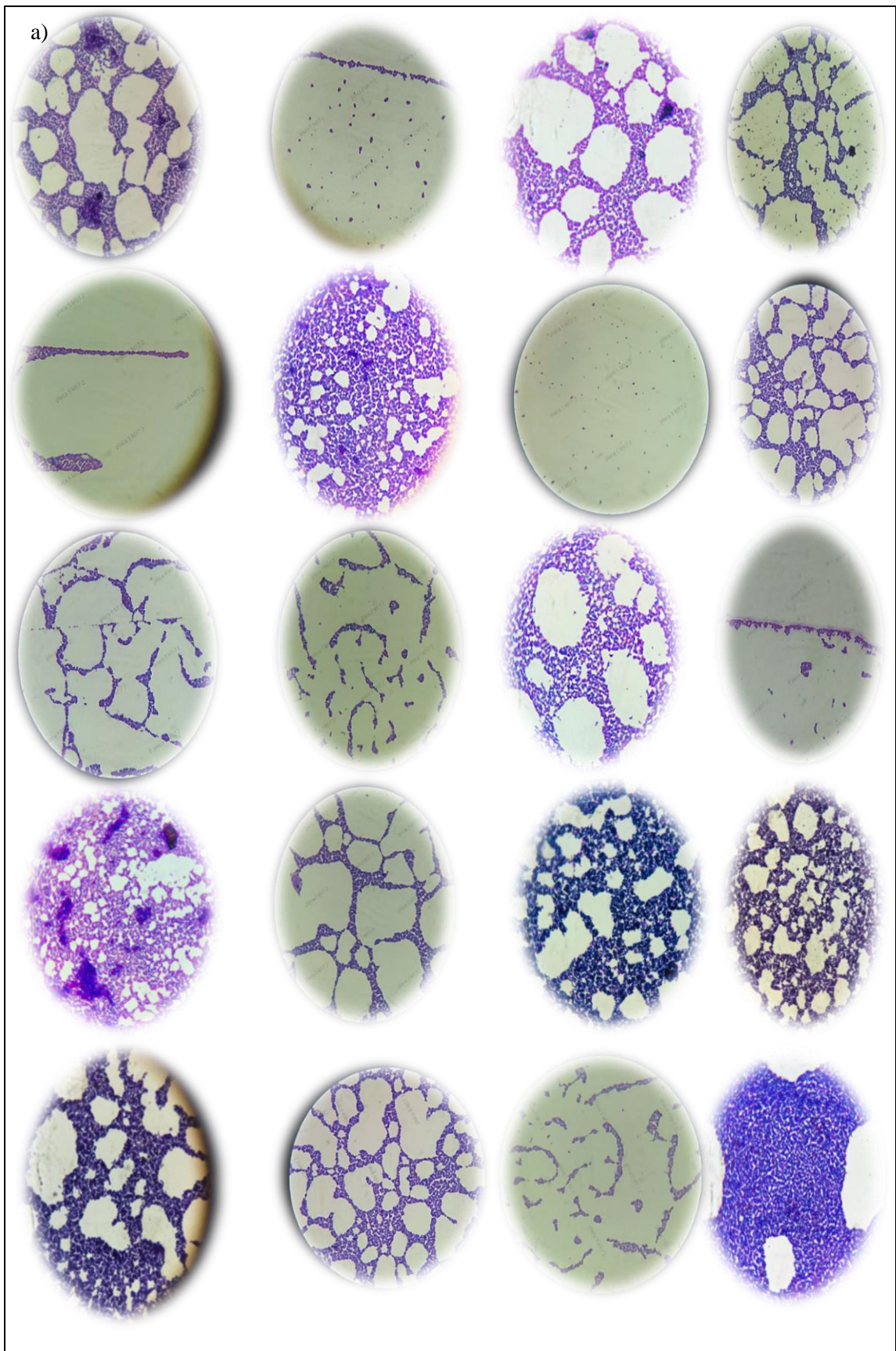


**ANEXO J: TINCIÓN GRAM PARA COLONIAS DEL MEDIO DE CULTIVO MRS**



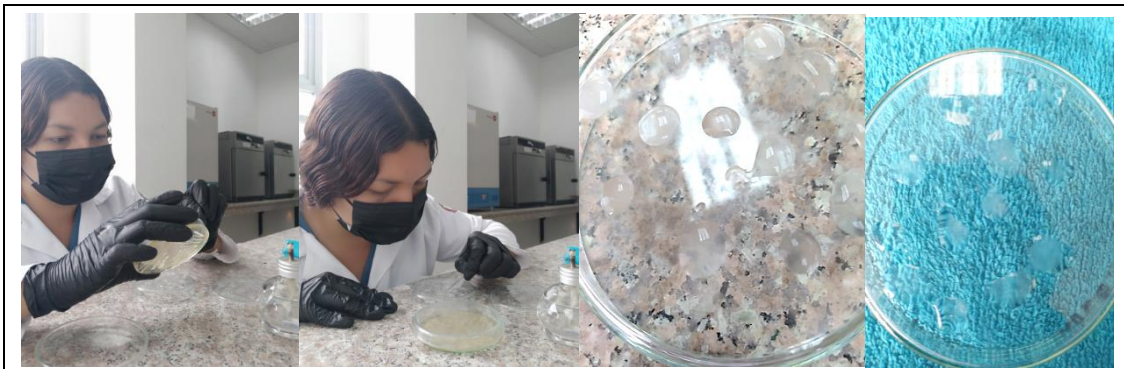


**ANEXO K: TINCIÓN GRAM PARA COLONIAS DEL MEDIO DE CULTIVO M17**

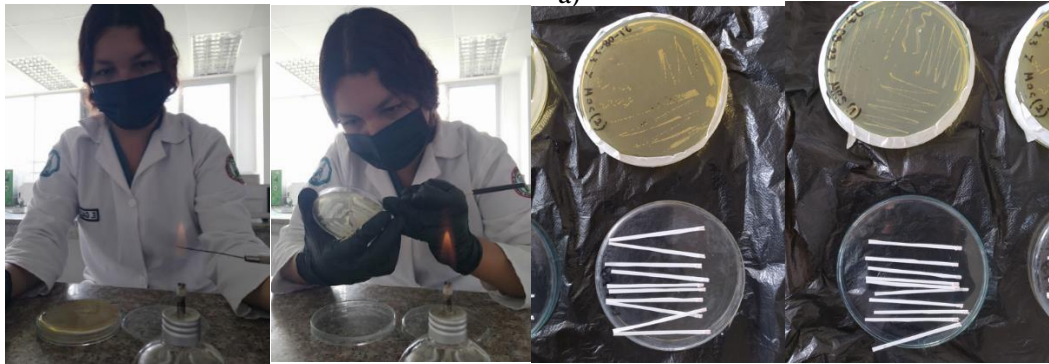


**a)** Tinción Gram en 20 colonias de agar M17.

**ANEXO L: PRUEBA DE CATALASA Y OXIDASA**



a)



b)

**a) Prueba de catalasa.**

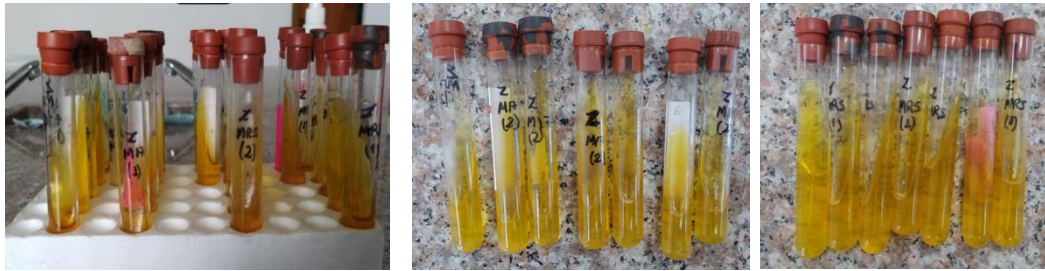
**b) Prueba de oxidasa**

**ANEXO M: PRUEBA DE MOVILIDAD Y PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub> DE GLUCOSA**

a)



b)

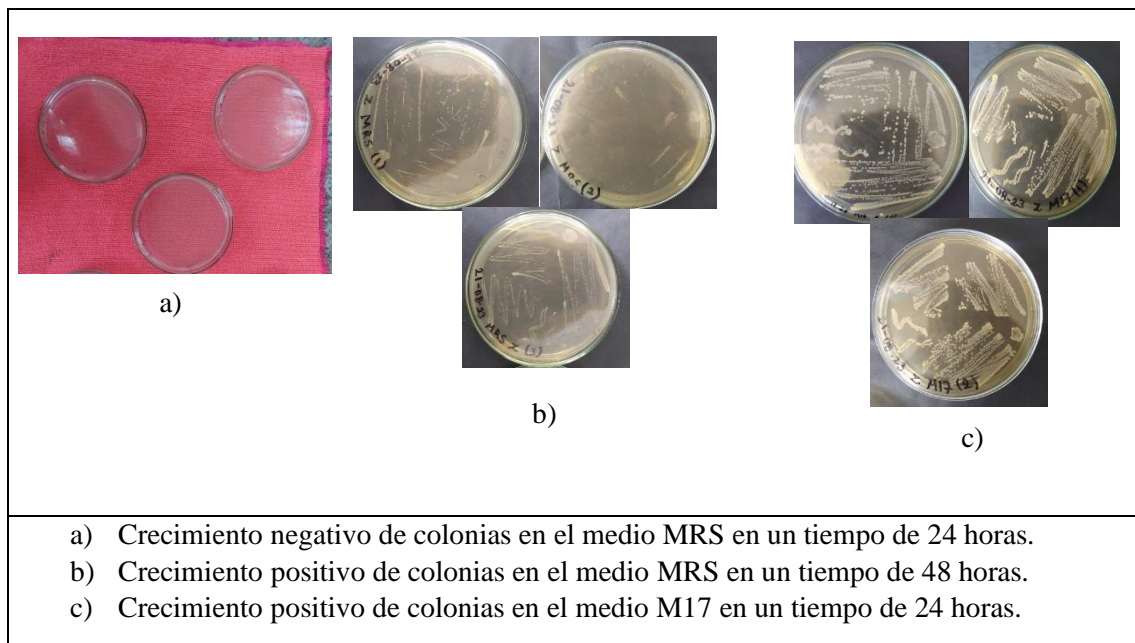


**a)** Prueba de movilidad con resultado negativo.

**b)** Prueba de producción de CO<sub>2</sub> a partir de glucosa mediante el medio de cultivo Kligler, con resultado negativo para la producción de gas.

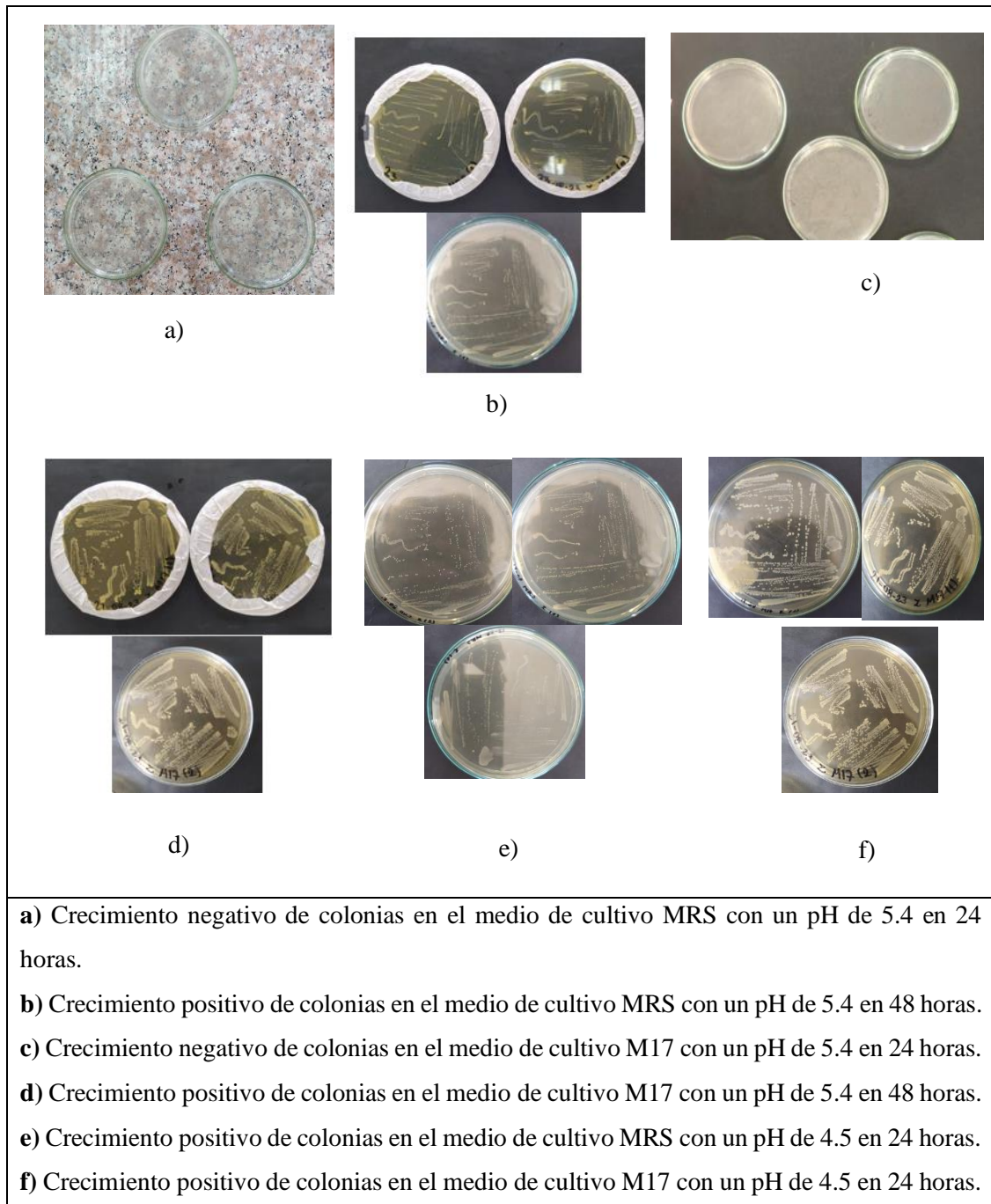


**ANEXO N: CRECIMIENTO DE COLONIAS A 30 Y 37°C**





**ANEXO O: CRECIMIENTO DE COLONIAS A DISTINTOS pH 4.5 Y 5.4**



## ANEXO P: PRUEBA DE ACEPTABILIDAD

a)



a) Realización de la prueba de aceptabilidad para elegir la mejor formulación.

# ANEXO Q: ENCUESTA APLICADA A ESTUDIANTES DE OCTAVO SEMESTRE



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



### Encuesta de Aceptabilidad

**Tema:** ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE ZAPALLO (*Cucurbita maxima*) 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:** 19/ 11 / 2024

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Elizabeth Valeria Gallegos Escobar
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímica Farmacéutica
 Dra. Janneth María Gallegos Núñez, PhD. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>
 BQF. Adriana Isabel Rodríguez Basantes, MSc. <b>ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>