



Estudio del efecto de las concentraciones de cloruro de sodio, ácido acético y estado fisiológico de pepinillo (*Cucumis sativus L.*) con fines de bioconservación mediante la identificación de bacterias ácido lácticas.

Guevara Camino, Leonor Mariana

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

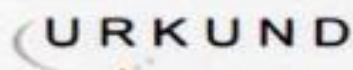
Carrera de Ingeniería Agropecuaria Santo Domingo

Trabajo de integración

Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería Agropecuaria

Ph.D. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

06 de septiembre del 2021



Urkund Analysis Result

Analysed Document: Guevara Camino, Leonor Mariana TESIS, 2.docx (D112041023)
Submitted: 9/3/2021 9:41:00 PM
Submitted By: neiramosquera@uteq.edu.ec
Significance: 8 %

Sources included in the report:

TESIS - Josselyn López, final.docx (D111895559)
TESIS VERA Y ZAMBRANO.docx (D45913448)
TESIS ESTRADA-SEGARRA.docx (D111851993)
Tesis. Srta.Baque-Srta. Romero..docx (D111729343)
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15798/3/T-ESPED-002891-D.pptx>
<http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/436/1/TESIS%20PIMIENTO%20EN%20CONSERVA.pdf>
<http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/964/1/016-ESTRELLA%20ERAZO%20FERNANDA%20MILENA.pdf>
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13420/1/T-ESPED-002811.pdf>

Instances where selected sources appear:

45

Firma:



SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

.....
Ph.D. Sungey Naynee Sánchez Llaguno

C.C. 1205348673



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO, ÁCIDO ACÉTICO Y ESTADO FISIOLÓGICO DE PEPINILLO (*CUCUMIS SATIVUS L.*) CON FINES DE BIOCONSERVACIÓN MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**” fue realizado por la señorita Guevara Camino, Leonor Mariana el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 06 de septiembre de 2021



Código electrónico por:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

C.C.: 12053488673



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

Responsabilidad de autoría

Yo, Guevara Camino, Leonor Mariana, con cédula de ciudadanía n° 2300615198 declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO, ÁCIDO ACÉTICO Y ESTADO FISIOLÓGICO DE PEPINILLO (CUCUMIS SATIVUS L.) CON FINES DE BIOCONSERVACIÓN MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 06 de septiembre de 2021

Guevara Camino, Leonor Mariana

C.C.: 2300615198



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA SANTO DOMINGO

Autorización de Publicación

Yo, Leonor Mariana Guevara Camino con cédula de ciudadanía N° 2300615198, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE a publicar el trabajo de titulación: **"ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE SODIO, ÁCIDO ACÉTICO Y ESTADO FISIOLÓGICO DE PEPINILLO (CUCUMIS SATIVUS L.) CON FINES DE BIOCONSERVACIÓN MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 06 de septiembre de 2021

Guevara Camino, Leonor Mariana

C.C.: 2300615198

Dedicatoria

A mi mamá Rebeca Piedad, por su apoyo incondicional en cada paso de mi vida, sus consejos tan valiosos y su amor de madre que me ayudaron a alcanzar esta meta tan anhelada, tanto por ella como por mí.

A mi padre Luis Napoleón, un hombre muy noble y amoroso, que me lleno de valores y enseñanzas con su amor bonito y a pesar de no haber podido acompañarme en esta etapa de mi vida, me preparó para llegar a culminar la misma, haciéndome prometerle que alcanzaría mis sueños; mi ángel en el cielo te guardo siempre en mi corazón y en mi mente.

A mi hija Amaia, que es el motor de mi vida, me ayuda a no desmayar ante las adversidades y me impulsa siempre con su tierna sonrisa que engrandece mi corazón, con tanto amor.

A mis hermanas Karina, Gabriela y Dayana por ayudarme incondicionalmente en todo momento sin importar nada, este logro también es suyo hermanitas.

A mis sobrinos Josue, Camila, Doménica y Catalina son mi fuente de inspiración para dar mi mayor esfuerzo.

A mi Abuelitos Marianita y Luis por siempre estar presentes en cada momento de mi vida y a pesar de que mi abuelo ya no está, sé que él esperaba este momento.

Leonor Mariana.

Agradecimiento

A Dios por permitirme cumplir con este logro

A mis padres por darme la herencia más valiosa que es el estudio.

A mis hermanas porque siempre me han ayudado incondicionalmente

A mis amigas y compañeras que conocí en esta linda etapa universitaria Mabelyn Mendoza, Yadira Arias, Anita Sánchez y Gema Chica por todos los momentos compartidos en el transcurso de cumplir este sueño que fue lo que nos unió.

A Fabián Alegría por ser mi apoyo incondicional y constancia durante este último período. Gracias por estar para mí.

A mi directora de tesis Ph.D. Sungey Sánchez por su amistad, sus enseñanzas y conocimientos impartidos con absoluta profesionalidad.

Al Ph.D. Juan Neira por su colaboración y predisposición, como guía durante esta última etapa.

A la Ing. Katty Medina por su ayuda y paciencia en la fase de laboratorio.

A mi amiga Dayanara Espinoza por su apoyo y contribución para lograr culminar mi proyecto de investigación.

A los ingenieros, Gustavo Núñez, Freddy Enríquez, Vinicio Uday, Patricio Vaca, Doc. Félix Valdiviezo, mis estimados docentes que me guiaron en esta etapa tan importante, les agradezco infinitamente por sus enseñanzas

Leonor Mariana.

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Análisis urkund.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Contenido	8
Índice de Tablas.....	14
Índice de Figuras	17
Resumen.....	19
Abstract	20
Capítulo I.....	21
Introducción.....	21
Objetivos	24
Objetivo General	24

Objetivos Específicos	24
Hipótesis Nula.....	25
Hipótesis Alternativa	25
Capítulo II.....	26
Revisión Bibliográfica	26
Origen del Pepinillo.....	26
Clasificación Taxonómica.....	26
Etapas fenológicas del pepinillo	26
Características Botánicas	27
Requerimientos Edafoclimáticos del Pepinillo	28
Propiedades Nutricionales.....	29
Usos y Propiedades.....	29
Encurtidos	30
Fermentación	30
Conserva de Pepinillos	32
Bacterias Ácido Lácticas.....	32
Sustancias Químicas Producidas por BAL	33
Capítulo III.....	39
Materiales y métodos.....	39

	10
Ubicación del área de Investigación.....	39
Ubicación Política	39
Ubicación Geográfica	39
Ubicación Ecológica.....	40
Materiales.....	40
Establecimiento del cultivo	40
Cosecha de los pepinillos	41
Elaboración y manejo de los pepinillos encurtidos	41
Determinación de los grados Brix en los pepinillos cosechados y encurtido.....	42
Determinación del pH en los pepinillos cosechados y encurtidos.....	42
Determinación de la acidez titulable de los pepinillos cosechados y encurtidos.....	43
Determinación de la ceniza en los pepinillos cosechados y encurtidos.....	43
Determinación de la fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.	44
Determinación de la humedad en los pepinillos cosechados y encurtidos .	44
Inoculación de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo.....	45
Identificación de las bacterias ácido lácticas procedentes de los medios de cultivo.	45
Recuento de poblaciones microbianas procedentes del producto encurtido.....	46
Análisis sensorial de los pepinillos encurtidos	47

	11
Análisis estadístico	47
Factores y niveles del experimento	47
Tratamientos	48
Diseño experimental	48
Variables medidas	50
Métodos	51
Balance de materiales	51
Establecimiento del cultivo	52
Elaboración y manejo de los pepinillos fermentados.....	53
Determinación de los grados brix de los pepinillos cosechados y fermentados	54
Determinación de pH de los pepinillos cosechados y fermentados	55
Determinación de la acidez titulable en los pepinillos cosechados y fermentados	55
Determinación de ceniza en los pepinillos cosechados y fermentados	57
Determinación de fibra bruta de los pepinillos cosechados y fermentados	58
Determinación de humedad de los pepinillos cosechados y fermentados..	60
Inoculación de las bacterias ácido lácticas del producto fermentado	60
Identificación de bacterias procedentes del producto fermentado	61
Análisis sensorial del producto fermentado	64
Capítulo IV	65

Resultados y discusiones	65
De la determinación de las características físico-químicas de los estados fisiológicos de los pepinillos utilizados para la elaboración de encurtidos.	65
Análisis físico-químico de los pepinillos	65
Análisis de varianza para las variables de estudio.	66
Análisis de varianza para grados brix.	66
Análisis de varianza para pH.....	67
Análisis de varianza para acidez titulable.	68
Análisis de varianza para cenizas.	69
Análisis de varianza para fibra.	70
Análisis de varianza para humedad.	71
Análisis de varianza para bacterias.....	72
Análisis de varianza para hongos.	73
Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para el Factor A.....	74
Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la concentración de NaCl utilizada en la bioconservación de pepinillos: al 15% y 20%.	74
Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para el Factor B.....	77
Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de los tipos de ácido acético utilizados en la bioconservación de pepinillos: de manzana y vino tinto.....	77
Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para el Factor C.....	81
Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio del estado fisiológico de los pepinillos utilizados para su bioconservación: verde, pintón y maduro.....	81

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la interacción: AxB (Concentración*Ácidos).....	84
Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la interacción: AxC (Concentración*Estado fisiológico).....	85
Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la interacción: AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico).....	86
Identificación de las bacterias presentes en los encurtidos de pepinillo	88
Análisis sensorial	93
Discusiones.....	97
Análisis Físico-Químico de los Pepinillos.....	97
Factor A (Concentración: NaCl al 15% y 20%).....	98
Factor B (Ácidos: sidra de manzana y vino tinto).....	98
Factor C (Estado Fenológico: Verde, Pintón y Maduro).....	99
Interacción: AxB (Concentración*Ácido).....	99
Interacción: AxC (Concentración*Estado fisiológico).....	100
Interacción: AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico).....	100
Identificación de las Bacterias presentes en los Encurtidos de Pepinillo.....	100
Análisis Sensorial.....	101
Capítulo V	102
Conclusiones.....	102
Análisis Físico-Químico de los Pepinillos.....	102

Factor A (Concentración de NaCl: 15% y 20%).....	102
Factor B (Ácidos: de Manzana y Vino Tinto).....	102
Factor C (Estado fisiológico: Verde, Pintón y Maduro).....	103
Interacción AxB (Concentración*Ácidos)	103
Interacción AxC (Concentración*Estado fisiológico).....	103
Interacción AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico).....	104
Identificación de bacterias presentes en los encurtidos de pepinillo.....	104
Análisis sensorial	104
Recomendaciones	105
Capítulo VI	107
Bibliografía	107

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica del pepinillo.</i>	26
Tabla 2 <i>Fenología del cultivo de pepinillo.</i>	27
Tabla 3 <i>Composición nutricional de Cucumis sativus L.</i>	29
Tabla 4 <i>Alteraciones provocadas en el proceso de fermentación.</i>	31
Tabla 5 <i>Sustancias químicas beneficiosas producidas por BAL</i>	33

Tabla 6 <i>Características de las bacteriocinas</i>	34
Tabla 7 <i>Clasificación de las bacteriocinas</i>	36
Tabla 8 <i>Formas y estrategias de aplicación de las bacteriocinas en alimentos</i>	38
Tabla 9 Características de la ubicación ecológica del lugar de la investigación.....	40
Tabla 10 Recursos utilizados para el establecimiento del cultivo.....	40
Tabla 11 Recursos utilizados para la cosecha de los pepinillos.....	41
Tabla 12 Recursos utilizados para la elaboración y manejo de los pepinillos encurtidos.....	41
Tabla 13 Recursos utilizados para la determinación de sólidos solubles en los pepinillos cosechados y encurtidos.....	42
Tabla 14 Recursos utilizados para la determinación del pH de los pepinillos cosechados y encurtidos.....	42
Tabla 15 Recursos utilizados para la determinación de la acidez titulable de los pepinillos cosechados y encurtidos.....	43
Tabla 16 Recursos utilizados para la determinación de la ceniza en los pepinillos cosechados y encurtidos.....	43
Tabla 17 Recursos utilizados para la determinación de la fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.....	44
Tabla 18 Recursos utilizados para la determinación de la fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.....	44
Tabla 19 Recursos utilizados para la inoculación de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo.....	45
Tabla 20 Recursos utilizados para la identificación de las bacterias ácido lácticas procedentes de los medios de cultivo.....	45

Tabla 21 Recursos utilizados para el recuento e identificación de poblaciones microbianas procedentes del producto encurtido.	46
Tabla 22 Recursos utilizados para el análisis sensorial.	47
Tabla 23 <i>Factores y niveles probados en la elaboración de las conservas de pepinillo (Cucumis sativus) para la identificación de bacterias ácido lácticas.</i>	47
Tabla 24 <i>Tratamientos comparados en la elaboración de las conservas de pepinillo (Cucumis sativus) para la identificación de bacterias ácido lácticas.</i>	48
Tabla 25 <i>Esquema del análisis de varianza en la elaboración de las conservas de pepinillo (Cucumis sativus) para la identificación de bacterias ácido lácticas.</i>	49
Tabla 26 <i>Análisis físico-químicos de los pepinillos.</i>	65
Tabla 27 <i>Análisis de la varianza para grados brix.</i>	66
Tabla 28 <i>Análisis de la varianza para pH</i>	67
Tabla 29 <i>Análisis de la varianza para acidez titulable.</i>	68
Tabla 30 <i>Análisis de la varianza para cenizas.</i>	69
Tabla 31 <i>Análisis de la varianza para fibra.</i>	70
Tabla 32 <i>Análisis de la varianza para humedad.</i>	71
Tabla 33 <i>Análisis de la varianza para bacterias.</i>	72
Tabla 34 <i>Análisis de la varianza para hongos.</i>	73
Tabla 35 <i>Valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico de las concentraciones de NaCl estudiadas.</i>	74
Tabla 36 <i>Valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico de los tipos de ácido acético estudiados.</i>	77

Tabla 37 Valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico del estado fisiológico de los pepinillos estudiados.....81

Tabla 38 Resultados obtenidos en la identificación microbiológica a través de: Tinción de Gram, catalasa y oxidasa.88

Índice de Figuras

Figura 2 Ubicación geográfica de la investigación.....39

Figura 2 *Flujograma de la elaboración de pepinillos fermentados.*51

Figura 3 *Comportamiento del pH con respecto al factor A (Concentración: NaCl al 15% y 20%).*75

Figura 4 *Comportamiento de las cenizas con respecto al factor A (Concentración: NaCl al 15% y 20%).*76

Figura 5 *Comportamiento del pH con respecto al factor B (Ácidos: de manzana y vino tinto).*78

Figura 6 *Comportamiento de la acidez titulable con respecto al factor B (Ácidos: de manzana y vino tinto).*79

Figura 7 *Comportamiento de los hongos (UFC/ml) con respecto al factor B (Ácidos: de manzana y vino tinto).*80

Figura 8 *Comportamiento de las cenizas con respecto al factor C (Estado fenológico: verde, pintón y maduro).*82

Figura 9 *Comportamiento de la fibra con respecto al factor C (Estado fisiológico: verde, pintón y maduro)*83

Figura 10 *Comportamiento del pH con respecto al interacción A*B (Concentración: NaCl al 15% y 20% y Ácidos: de manzana y vino tinto).*84

- Figura 11** Comportamiento de las bacterias (UFC/ml) con respecto a la interacción AxC (Concentración: NaCl al 15% y 20% y Estado fisiológico: verde, pintón y maduro).85
- Figura 13** Comportamiento de las bacterias (UFC/ml) con respecto a la interacción AxBxC (Concentración: NaCl al 15% y 20%; Ácidos: de manzana y vino tinto; y Estado fisiológico: verde, pintón y maduro).86
- Figura 13** Comportamiento del análisis sensorial referente al color de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.93
- Figura 14** Comportamiento del análisis sensorial referente al sabor de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.94
- Figura 15** Comportamiento del análisis sensorial referente a la textura de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.95
- Figura 16** Comportamiento del análisis sensorial referente al olor de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.96

Resumen

La presente investigación se basó en estudiar el efecto de las concentraciones de cloruro de sodio, ácido acético y estado fisiológico de pepinillo (*Cucumis sativus L.*) con fines de bioconservación mediante la identificación de bacterias ácido lácticas. El desarrollo del estudio se llevó a cabo en la parroquia Abraham Calazacón, en la ciudad de Santo Domingo de los Tsáchilas, donde se estableció un cultivo de pepino. La experimentación se desarrolló mediante la aplicación de un ANOVA, trifactorial (Concentración: NaCl al 15% y NaCl al 20%; Ácidos: vinagre de manzana y vinagre de vino tinto y; Estado fisiológico: verde, pintón y maduro) bajo un esquema DBCA con 12 tratamientos y 3 repeticiones; para la diferencia de medias se aplicó Tukey ($p > 0,05$). En cuanto al análisis proximal de los estados fisiológicos de los pepinillos cosechados, en los pepinillos verdes se encontraron mejores características físico químicas con respecto a los pintones y maduro. En cuanto al factor A (Concentración), esta influyó en el incremento de pH (4,93% NaCl al 20%) y cenizas (10,43% NaCl al 20%); mientras que el factor B (Ácidos) incrementó el pH con el ácido acético de vino tinto y la acidez titulable en 4,98 y 0,25; además se demostró un mejor control de hongos con ácido acético de vino tinto ($2,08E+07$). En cuanto al factor C (Estado fisiológico); la mejor conservación de las características físico-químicas se produjo en el estado verde de forma generalizada. Entre tanto, el tratamiento con mayor cantidad de UFC/ml fueron el de NaCl al 20% + Ác.Acético de manzana + Pintón ($4,57E+10$). Por lo cual, al finalizar el ensayo se recomendó la utilización de pepinillos pintones y ácido acético de manzana para la producción de BAL.

Palabras clave:

- **PEPINILLOS**
- **CONCENTRACIÓN DE SAL**
- **ESTADOS FISIOLÓGICOS**
- **BAL**
- **CONSERVACIÓN**

Abstract

The present research was based on studying the effect of sodium chloride concentrations, acetic acid and physiological state of cucumber (*Cucumis sativus* L.) for biopreservation purposes through the identification of lactic acid bacteria. The study was carried out in the parish of Abraham Calzacón, in the city of Santo Domingo de los Tsáchilas, where a cucumber crop was established. The experiment was developed by applying a three-factor ANOVA (Concentration: NaCl at 15% and NaCl at 20%; Acids: apple vinegar and red wine vinegar and; Physiological state: green, pinto and mature) under a DBCA scheme with 12 treatments and 3 replicates; for the difference of means Tukey was applied ($p>0.05$). As for the proximal analysis of the physiological stages of the harvested gherkins, better physical and chemical characteristics were found in the green gherkins compared to the pinto and ripe ones. As for factor A (Concentration), it influenced the increase in pH (4.93% NaCl at 20%) and ash (10.43% NaCl at 20%); while factor B (Acids) increased pH with red wine acetic acid and titratable acidity by 4.98 and 0.25; in addition, better fungus control was demonstrated with red wine acetic acid ($2.08E+07$). As for factor C (physiological state); the best preservation of physicochemical characteristics occurred in the green state in a generalized way. Meanwhile, the treatment with the highest number of CFU/ml was that of 20% NaCl + apple acetic acid + Pintón ($4.57E+10$). Therefore, at the end of the trial, the use of pinto gherkins and apple acetic acid for the production of LAB was recommended.

KEYWORDS:

- **GHERKINS**
- **SALT CONCENTRATION**
- **PHYSIOLOGICAL STATES**
- **LAB**
- **PRESERVATION**

Capítulo I

Introducción

El pepino (*Cucumis sativus*) es una de las especies más importantes de la familia cucurbitácea (Montaño, Gil, & Palmares, 2018); su centro de origen radica en la parte sur de Asia, más específicamente en la India donde fue cultivado hace al menos 3000 años (Orellana, 2019). Algunos historiadores consideran que luego de haber sido introducido en Europa, este fue trasladado hacia América, a través de Cristóbal Colón (López, y otros, 2015). Esta hortaliza, se destaca por poseer una fuente notable de vitamina K en sus frutos (Abdel, Faisal, Alatar, Saquib, & Alwathnami, 2020).

En el año 2016, la producción mundial de pepino superó los 80'600.000 toneladas, con un rendimiento promedio de 375.893 kg/ha en relación a 2'144.672 ha, situación que ubicó a este cultivo en el ranking 18, de los cultivos más consumidos en el mundo; China, por su parte ha sido considerada como el principal productor de pepinillos (Abdel, Faisal, Alatar, Saquib, & Alwathnami, 2020). A nivel nacional según los datos más recientes, durante el año 2014 se produjeron 4164 tn; siendo el mayor porcentaje, procedente de las provincias de Guayas, Manabí y Chimborazo (Vaca, 2018).

En Ecuador, los pepinillos se comercializan en fresco y como conservas a través de encurtidos (Cabezas, 2016), siendo esta última presentación, una de las más antiguas, dentro de la conservación de alimentos, que se deriva en dos tipos; los encurtidos sin fermentar (salmuera de hasta el 16%) que por lo general son pasteurizados y los fermentados que se clasifican en; encurtidos agrios: sumergidos en salmuera diluida de 2 a 5%, y encurtidos dulces: conservados por la aplicación de ácido acético, láctico, especias y sacarosa (Sudhanshu, Behera, Farag, Riadh, & Kumar, 2020).

La bioconservación, se caracteriza por controlar microorganismos patógenos a través del empleo de microbiota beneficiosa (BAL) o bacterias ácido lácticas, que son microorganismos propios de los ambientes fermentativos, con

variadas concentraciones de cloruro de sodio (Montero, 2016); o a su vez, mediante la utilización de sustancias derivadas de sus procesos biológicos como, las bacteriocinas (Alegre, Abadías, Colás, Collazo, & Viñas, 2020), compuestos aromáticos y exopolisacáridos que contribuyen también con la textura, sabor y prolongación de la vida útil en encurtidos fermentados (Sudhanshu, Behera, Farag, Riadh, & Kumar, 2020); Por otra parte, (López M. , 2017), menciona el potencial de las bacteriocinas para ser aplicadas en alimentos mínimamente procesados a través de un “efecto de barrera” para el alargamiento de su vida de anaquel.

Dentro del campo de la agroalimentación, se necesita de métodos que sean seguros y adecuados para la reducción de riesgos por contaminación; con la finalidad de garantizar que, tanto frutas y hortalizas cumplan con las normas para su comercialización y posterior consumo.

La bioconservación, se constituye como una alternativa viable para la industria de los alimentos mínimamente procesados; más específicamente mediante el uso de las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL), que pueden ser extraídas de alimentos encurtidos fermentados, para su posterior aislamiento, caracterización, propagación y aplicación.

Según un estudio realizado por (Savitri, Kumar, Kamuri, Angomy, & Bhalla, 2017), se aisló y caracterizó un total de 15 BAL a partir de encurtidos tradicionales, los aislados identificados fueron *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sp.* Las mismas que exhibieron actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, es decir, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella dysenteriae*. Estos resultados sugirieron que las BAL aisladas de encurtidos tradicionales tienen muy buen potencial para ser utilizado como probióticos.

(Yang, Zhang, Jiang, & He, 2015), realizaron una investigación que se basó en las propiedades químicas y las bacterias del ácido láctico (BAL) de

pepinillos, donde, mediante los resultados obtenidos se demostró que la acidez total tuvo un impacto significativo en la enumeración de las BAL. En total 16 cepas de BAL fueron aisladas e identificadas de los pepinillos incluyendo *Lactobacillus fermentum* (2 cepas), *Lactobacillus plantarum* (3 cepas), *Lactobacillus brevis* (2 cepas), *Lactobacillus acidophilus* (1 cepa), *Lactobacillus casei* (1 cepa), *Lactobacillus pentosus* (1 cepa), *Lactobacillus delbrueckii* (1 cepa), *Lactococcus lactis* (3 cepas) y *Pediococcus pentosaceus* (2 cepas). Se concluyó que este estudio revela la biodiversidad de las bacterias del ácido láctico en los encurtidos y las cepas aisladas pueden proporcionar cultivos de iniciación para la industria de la fermentación.

Actualmente, el mercado de los pepinillos en nuestro país atraviesa varios desafíos, uno de ellos es la sobreproducción; puesto que, genera un alto porcentaje de desperdicios y pérdidas en la cadena productiva. Sin embargo, existen alternativas para el aprovechamiento de estas materias primas; tal es el caso, de las conservas que permiten prolongar la vida útil de los alimentos e incluso, se han constituido como una importante fuente de innovación para la obtención y asilamiento de microorganismos beneficiosos, como las bacterias ácido lácticas.

Con base a lo anteriormente manifestado, la presente investigación aporta con ideas para el desarrollo del sector agrícola y agroindustrial a través de la fundamentación científica; mediante el establecimiento del valor agregado por la fabricación de conservas a partir de cultivos que exceden sus niveles de producción; productos que, a su vez tienen el potencial de generar opciones para la bioconservación debido a sus características microbiológicas.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar el efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio, ácido acético y estado fisiológico de pepinillo (*Cucumis sativus L.*) con fines de bioconservación mediante la identificación de bacterias ácido lácticas.

Objetivos Específicos

Evaluar el efecto de las dos diferentes concentraciones de cloruro de sodio al 15% y 20% en la conservación de pepinillo.

Comparar dos tipos de ácido acético (ácido acético de frutas y con ácido acético tinto) en la conservación de pepinillo.

Analizar la incidencia de los estados fisiológicos de pepinillo (verde, pintón, maduro), en la conservación de pepinillo.

Identificar bacterias ácido lácticas y analizar la incidencia como agente antimicrobiano en la bioconservación de pepinillo.

Hipótesis Nula

Ho: Las dos concentraciones de cloruro de sodio no influyen en la conservación de pepinillo y la identificación de las bacterias ácido lácticas con fines de bioconservación.

Ho: Los tipos de ácido no influyen en la conservación de pepinillo y la identificación de las bacterias ácido lácticas con fines de bioconservación.

Ho: Los estados fisiológicos, no influyen en la conservación de pepinillo y la identificación de las bacterias ácido lácticas con fines de bioconservación.

Hipótesis Alternativa

Ha: Las dos concentraciones de cloruro de sodio influyen en la conservación de pepinillo y la identificación de las bacterias ácido lácticas con fines de bioconservación.

Ha: Los tipos de ácido influyen en la conservación de pepinillo y la identificación de las bacterias ácido lácticas con fines de bioconservación.

Ha: Los estados fisiológicos, influyen en la conservación de pepinillo y la identificación de las bacterias ácido lácticas con fines de bioconservación.

Capítulo II

Revisión Bibliográfica

Origen del Pepinillo

Los orígenes del pepino han sido atribuidos al sector norte de la India y al área del África tropical, antigua. En la actualidad, su distribución ocupa gran parte del mundo. Según algunos autores esta hortaliza, ha sido utilizada como alimento hace más de 3000 años puesto que, fue conocida por los egipcios y posteriormente introducida en China en el año 100 a.C. Se conoce que los griegos y romanos, domesticaron esta cucurbitácea, a través de su cultivo; el cual fue llevado a Francia en el siglo IX; para el siglo XII, ya era bastante popular en Inglaterra, de donde fue introducida luego hacia EEUU (García & Soliz, 2016).

Clasificación Taxonómica

Tabla 1

Clasificación taxonómica del pepinillo.

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Violales
Familia	Cucurbitaceae
Género	Cucumis
Epíteto	sativus

Nota: Esta tabla muestra la clasificación taxonómica del pepinillo (Díaz, 2016).

Etapas fenológicas del pepinillo

Por lo general, son cortas; sin embargo, su duración depende de diversos factores tales como las condiciones edafoclimáticas de las zonas de

siembra, la eficiencia del manejo agronómico o las condiciones de las variedades empleadas (Córdova, 2019).

Tabla 2

Fenología del cultivo de pepinillo.

Etapa fenológica	Días después de la siembra
Emergencia	4 - 6
Emisión de guías	16 – 25
Floración	35 – 42
Cosecha	53 – 60
Fin de cosecha	110 – 120

Nota: Esta tabla muestra las diferentes etapas fenológicas del cultivo de pepinillo junto a su duración en días (Córdova, 2019).

Características Botánicas

A continuación, se describen las características botánicas del pepino, detalladas por (Masaquiza, 2016) en su estudio:

Sistema radicular: Está compuesto por una raíz principal ramificada, sus derivaciones son raicillas finas blancas y elongadas. Incluso, esta especie tiene la particularidad de emitir raíces del tipo adventicio, sobre el cuello.

Tallo: Pubescente, de porte rastrero-trepador y angular.

Hojas: Posee un peciolo alargado, con limbo en forma de corazón y tres lóbulos pronunciados. Son de color verde oscuro.

Flor: Poseen pétalos amarillos y pedúnculo corto. Son emitidas desde las axilas de las hojas, estas pueden ser hermafroditas e incluso, masculinas o femeninas.

Fruto: Son pepónides lisos o ásperos, en función de la variedad que varían del color verde claro, a travesando por el verde oscuro hasta alcanzar el

color amarillo cuando envejecen. La pulpa, es de color blanco, rica en agua con semillas distribuidas a lo largo del fruto; las semillas son ovales algo aplastadas y de color blanco-amarillento

Requerimientos Edafoclimáticos del Pepinillo

Según (Díaz, 2016), los requerimientos para el cultivo de pepinillo, son:

Suelo: Su cultivo puede llevarse a cabo en cualquier tipo de suelo; sin embargo, se han obtenido mejores rendimientos en suelos francos y arcillo-arenosos bien drenados. Si el suelo no es el óptimo, este debe ser acondicionado para la prevención de anegamientos. Cabe recalcar, que la planta de pepino no tolera la salinidad y el pH debe encontrarse entre 5.5 y 6.8.

Temperatura: Para el pepinillo, la temperatura ideal se encuentra entre los 20 y 30°C.

Precipitación: La planta de esta especie, no tolera el exceso de riego por lo que se produce en zonas donde se alcanza una precipitación entre 500 a 1200 mm/años bien distribuidos.

Altitud: Las mejores condiciones para el desarrollo de este cultivo va desde los 400 hasta los 1200 msnm.

Luminosidad: El cultivo se desarrolla con normalidad hasta en días con horas de luz menores a 12; no obstante, cuando existe mayor cantidad de horas luz y radiación la producción se incrementa.

Humedad relativa: El requerimiento de humedad es elevado en esta especie, por lo cual la HR óptima durante el día debe encontrarse entre el 60 a 70% y durante la noche entre 70 a 90%.

Viento: Este factor resulta determinante para la producción de pepinillo. Es por esto, que el viento de varias horas de duración y con una velocidad mayor a 30 km/h acelera la pérdida de agua en las plantas, reduciendo así la HR del aire e incrementando sus exigencias hídricas.

Propiedades Nutricionales

(Fuentes, 2015) la especie *C. sativus L.* posee una composición nutricional por 100 g de porción comestible, bastante amplia en cuanto a vitaminas y minerales, que se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 3

Composición nutricional de Cucumis sativus L.

Aporte por ración	Minerales		Vitaminas		
Energía (kcal)	13,28	Calcio (mg)	18,45	B1 Tiamina (mg)	0,04
Proteína (g)	0,63	Hierro (mg)	0,20	B2 Riboflavina (mg)	0,03
Hidratos de carbono (g)	1,90	Yodo (mg)	0,30	Niacina (mg)	0,36
Fibra (g)	0,70	Magnesio (mg)	7,30	B6 Piridoxina (g)	0,06
Grasa total (g)	0,20	Zinc (mg)	0,14	Ácido fólico (g)	0,06
AGS (g)	0,07	Selenio (g)	0,80	B12 Cianocobalamina	0
AGM (g)	0,01	Sodio (mg)	0,30	Ácido ascórbico (mg)	7
AGP (g)	0,09	Potasio (mg)	140	Vitamina A (g)	28,17
Agua (g)	96,60	Fósforo (mg)	11		

Nota: Esta tabla muestra la composición nutricional del pepinillo por cada 100 g de porción comestible (Fuentes, 2015).

Usos y Propiedades

El pepinillo como tal posee propiedades antioxidantes que favorecen a la conectividad neuronal; antiinflamatorias e hidratantes. Además, reducen el impacto de la ansiedad y el estrés gracias al grupo de vitaminas B que poseen en su composición; incluso, el contenido de fibra y agua permiten mejorar la digestión combatiendo posibles reflujos. Por otra parte, es excelente para cuidar el control de peso corporal, puesto que poseen un bajo aporte calórico. Además, es esencial el aporte del ion potasio que regula las funciones celulares, cuidando la correcta transmisión de los impulsos nerviosos (Penelo, 2019).

Encurtidos

Son hortalizas que se someten a diferentes procedimientos, pero tienen en común la utilización del líquido de cobertura ácido que, bajo condiciones de almacenamiento ideal, pueden conservarse hasta un año (Vargas, 2017).

Fermentación

Es la transformación que provoca cambios en las características propias de productos sometidos a proceso fermentativo, los cambios que ocasiona se pueden notar en extensión de la vida útil y características organolépticas. El proceso de fermentación se da en muchos otros alimentos procesados. La fermentación en salmuera ocasiona un proceso natural y así se evita la descomposición del producto y que este proceso lo realicen patógenos indeseables. Al realizar el encurtido con salmuera se provocará una fermentación de tipo ácido láctica ocasionada por bacterias ácido lácticas, para que el proceso sea óptimo y eficaz se debe usar la dosis adecuada de salmuera con un pH en un rango que tienda de ácido acercándose a neutro (Rascón, 2016).

Fermentación con Sal. Esta se elige según la temperatura a la que vaya a estar sometido el alimento.

Concentración de sal al 8%

La evolución del fermentado es más breve, provoca mínima porción de gas, es necesario vigilar para que no crezcan poblaciones bacterianas y la textura del alimento se mantenga (Rascón, 2016).

Concentración de sal al 10%

La evolución del fermentado es más tardía, provoca una porción de gases superior y con más fuerza, con esta concentración hay menos peligro de que exista presencia de microorganismos no deseados (Rascón, 2016).

Conservación por ácido

A partir de concentraciones del 2% el ácido acético actúa sobre la mayor parte de las bacterias. En el caso de los encurtidos caseros, es común la adición de vinagre o ácido cítrico. A nivel industrial se controla con la adición de ácidos o con autoclave, donde se alcanzan temperaturas de 120°C (Castelli, 2018).

Tabla 4

Alteraciones provocadas en el proceso de fermentación.

Alteración	Descripción
Transformación física	<p>Osmosis en las primeras 78 – 42 horas, en este proceso el agua, minerales, azúcar, proteínas, etc., pasan a la solución del concentrado por el proceso de osmosis.</p> <p>La salmuera sirve de alimento para las BAL, y se infiltra mediante los poros dándole una apariencia turgente</p>
Alteración química	<p>Cambio de azúcares a ácido láctico por la presencia de las bacterias ácido lácticas también puede llegar a haber presencia de hidrogeno y anhídrido carbónico.</p> <p>El pH está en función del ácido láctico. El pH inicial es de 6,5 a 7 y posterior al proceso de fermentado el pH se vuelve ácido con valores de 3,4 a 3,8 pero no supera el 4.</p> <p>La acidez al final del proceso estará en función de la concentración de sal</p>
Cambios microbiológicos	<p>Hay presencia de bacterias ácido lácticas que crean levaduras y gases = presencia de <i>Lactobacillus plantarum</i> principalmente.</p> <p>Cuando hay presencia de gas también =presencia de bacterias de genero <i>aerobacter</i>, (productoras de hidrogeno y anhídrido carbónico)</p>

Concentración de sal más elevada= presencia de aerobacterias

Cuando se presentan levaduras oxidativas baja la calidad del encurtido y se presentan olores desagradables para evitar estos daños por levaduras se usa rayos U.V., la luz del sol o aceite mineral.

Nota: Esta tabla muestra la descripción de las alteraciones que atraviesan los pepinillos durante el proceso de fermentación (Rascón, 2016).

Conserva de Pepinillos

Básicamente es el fruto de pepino, pero en estado de inmadurez el cual es rentable venderlo después de que haya pasado por un proceso de fermentación. El pepino resiste la salinidad y temperaturas altas, estas características permiten su conservación en encurtido, el microorganismo principal responsable de este procedimiento es *Lactobacillus plantarum*. En cuanto al contenido nutricional del contenido en conservar es ligeramente más bajo que el pepino fresco, pero sobresale el contenido en contenido de vitaminas C y B6 (Rascón, 2016).

Bacterias Ácido Lácticas

Son microorganismos que se caracterizan por ser gram positivos, no forman esporas, son cocos y bacilos de varios tamaños; en su mayoría son anaeróbicas (Hurtado, 2017), con la habilidad de adaptarse a pH ácido en medios vegetales o pH neutro en medios de origen animal; salinos y con temperaturas elevadas, esto se debe a que tiene gran variedad fisiológica y morfológica (Rascón, 2016). Además, son aerotolerantes, sin porfirinas o citocromos, por lo cual son oxidasa y catalasa negativos (Hurtado, 2017).

Conforme al proceso fermentativo se clasifican en:

Homofermentativas: cuando obtiene como resultado final únicamente ácido láctico (Rascón, 2016). Las más comunes son *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* tienen la enzima aldolasa y realizan la fermentación por la vía de glucólisis

Heterofermentativas: cuando obtienen como resultado final ácido láctico y adicionalmente otros elementos como acetato, etanol y CO₂ (Rascón, 2016). Aquí están las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, entre otros.

Según la temperatura donde sobreviven:

Mesófilas: 20°C a 25°C temperatura de incubación por 18 a 20 horas

Termófilas: 40 a 45°C temperatura de incubación durante 2 a 4 horas (Rascón, 2016).

Sustancias Químicas Producidas por BAL

Tabla 5

Sustancias químicas beneficiosas producidas por BAL

Sustancias químicas	Microorganismos
Bacteriocinas	<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Leuconostoc</i> .
Exopolisacáridos (EPS)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i>
Ácido gama-aminobutírico (GABA)	<i>Lactococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> y <i>Streptococcus</i>
Vitaminas (B12, ácido fólico y biotina)	<i>L. plantarum</i> , <i>S. Thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>L. delbrueckii</i> y <i>Propionibacterium</i>
Oligosacáridos	<i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>

Péptidos con actividad:

- Inmunomoduladora *L. rhamnosus* GG
 - Antihipertensiva *L. helveticus*, *L. rhamnosus* GG, y *S.*
 - Antioxidante *thermophilus*
 - Antimicrobiana *Bifidobacterium longum* y *L. delbrueckii*
L. acidophilus y *L. helveticus*
-

Nota: Esta tabla muestra la descripción de las sustancias químicas y las BAL que las producen (Hurtado, 2017).

Bacteriocinas. Son moléculas que poseen una estructura denominada proteína biológicamente activa; se caracterizan por ser bacteriocidas y su composición es bastante variada. Su síntesis se produce a nivel ribosómico (Valencia, 2020). Son consideradas también una de las mejores sustancias antimicrobianas de interés tecnológico; por su no toxicidad, ya que cumplen con parámetros óptimos para la conservación de productos alimenticios (Rascón, 2016).

Tabla 6

Características de las bacteriocinas.

Origen	Se originan en los ribosomas como péptidos extracelulares producidos por bacterias Gram (+) y (-). Al menos el 99% pueden sintetizar una bacteriocina.
Efectos	A nivel invitro no son tóxicas para líneas celulares normales pero sí para células cancerígenas In vivo no puede estimular el sistema inmuno ya que no son tóxicos para humanos o animales
Espectro de acción	Pueden actuar sobre bacterias gram (-) y (+) Entre las bacterias susceptibles a este ataque están: <i>E. coli</i> , <i>Cl.botulinum</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Ent. Fecalis</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i>

Modo de acción	Bactericida, fungicida y bacteriostático
Mecanismo de acción	Permeabilizan la membrana, provocando lisis celular
Estructura química	Péptidos, lipoproteínas y glicoproteínas
Peso molecular	Gram (-): de tamaño variable que puede alcanzar hasta los 80kDa Gram (+): de tamaño menor a los 10kDa, sin embargo existen valores más altos Archea: alcanzan hasta los 20kDa
Carácter	Hidrofóbico Anfipático
Pi	DE 8,1 A 10
Localización de genes que codifican para las bacteriocinas	Plásmidos Cromosomas Transposones; ambos (plásmidos y cromosomas)
Sensibilidad a enzimas	Todas son sensibles a enzimas proteolíticas (pronasa, pepsina y tripsina)
Sensibilidad a temperaturas	Compuestos termoestables: soportan de 100-121°C por 15 a 30 minutos
Sensibilidad a pH	La mayoría son estables en un pH de 3 a 9

Nota: Esta tabla muestra las características generales de las bacteriocinas (Heredia, Hernández, González, & Vallejo, 2017).

Clasificación de las bacteriocinas. Esta clasificación se ha dado conforme a las características físico-químicas, genéticas, y su espectro de actividad (Heredia, Hernández, González, & Vallejo, 2017).

Tabla 7*Clasificación de las bacteriocinas*

Clasificación	Característica	Subcategoría	Ejemplo
Clase I (lantibióticos)	Péptidos que poseen aminoácidos modificados	Tipo A(moléculas lineales)	*Nisina, subtilina, epidermina
		Tipo B(moléculas globulares)	*Mersacidina
Clase II	Clase heterogénea de péptidos termoestables pequeños	Subclase IIa (pediocina-antilisteria)	*Pediocina, enterocina, salcacina
		Subclase IIb (compuesto de dos péptidos)	*Plantaricina, lacticina F, *Lactocina
		Subclase IIc (otras bacteriocinas)	
		Subclase IIe	*Propionicina F
	Grupo de péptidos lineales	Subclase IIc	*Lacticina Q
	Degradación de proteínas grandes		
Clase III	Péptidos grandes termolábiles		*Helveticina J, millericina B
Clase IV	Péptidos cíclicos		Reutericina 6
Clase V	Péptidos de estructura circular		Enterocina AS-58, gasericina A

Nota: Esta tabla muestra la clasificación de las bacteriocinas, sus características, subcategorías y ejemplos (Heredia, Hernández, González, & Vallejo, 2017).

Mecanismos de Acción de las Bacteriocinas. Las bacteriocinas interrumpen el crecimiento de microorganismos mediante la formación de poros en las membranas celulares; a través de fuerzas electrostáticas hasta la bacteria blanco. Esta unión bacteriocina-bacteria diana ocurre en la sección N-terminal de la región hidrofílica de la bacteriocina; una vez ocurrido esto, la región C-

terminal penetra la membrana celular, vaciándola, y originando pérdidas de iones K en forma de moléculas de ATP, o aminoácidos. Consecuentemente, se produce una disminución del potencial de membrana con bajas reservas energéticas lo que se traduce en la reducción de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, que finalizan en la muerte celular (Heredia, Hernández, González, & Vallejo, 2017).

Aplicación de las bacteriocinas en los alimentos. El uso de bacteriocinas en sistemas de biopreservación puede satisfacer la demanda de conservantes naturales de los consumidores y también se considera una medida de seguridad adicional para los productos mínimamente procesados. Además, dado que las bacteriocinas son capaces de matar el microorganismo objetivo al interrumpir la integridad de la membrana, son menos propensas a inducir resistencia, ya que sus fragmentos no interactúan con las células diana, y pueden considerarse una solución potencial para el creciente problema de la resistencia microbiana a los antibióticos (Da Costa, Voloski, Mondadori, Duval, & Fiorentini, 2019).

El potencial de aplicación de una determinada bacteriocina puede predecirse por sus propiedades, como la estabilidad de la temperatura, el pH y el amplio espectro de acción. Además, el uso de bacteriocinas puede no suponer riesgos para la salud del consumidor ni afectar la calidad nutricional y sensorial de los alimentos, y las bacterias productoras deben tener el estado GRAS (Da Costa, Voloski, Mondadori, Duval, & Fiorentini, 2019).

Tabla 8

Formas y estrategias de aplicación de las bacteriocinas en alimentos.

Formas	Estrategias
Preparación purificada o semicompuesta (bacteriocina como ingrediente alimentario)	Adición directa en la fórmula alimentaria o inmersión en una solución con el péptido
Incorporación de un ingrediente previamente producido por BAL	Adsorción de la bacteriocina en películas plásticas de polietileno, películas comestibles de celulosa, superficies como acetato de vinilo de etileno, polipropileno, entre otros
Uso de BAL como cultivo de arranque o adjunto de forma directa en el producto fermentado para la producción in situ de bacteriocina	Recubrimientos antimicrobianos con preparados de bacteriocina y cultivos BAL

Nota: Esta tabla muestra las formas y estrategias de aplicación de las bacteriocinas en alimentos (Da Costa, Voloski, Mondadori, Duval, & Fiorentini, 2019).

Bacteriocina NISIN. Producida por *Lactococcus lactis* es usada en algunos países. Fue descrita por primera vez por Rogers como sustancia que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus*. Esta inhibe el crecimiento de otras esporas Gram-positivas y *Clostridium* y *Bacillus* y se reconoció como aditivo alimentario por la FAO/OMS en 1969, con el límite máximo para la ingestión de 33.000 unidades internacionales/kg (UI/Kg) de peso corporal. Más de 50 países permiten su uso en productos como leche, queso procesado, queso rallado, productos lácteos, tomates y otras verduras enlatadas, sopas y carne, así como productos de la cervecería y mayonesa. (Da Costa, Voloski, Mondadori, Duval, & Fiorentini, 2019).

Capítulo III

Materiales y métodos

Ubicación del área de Investigación

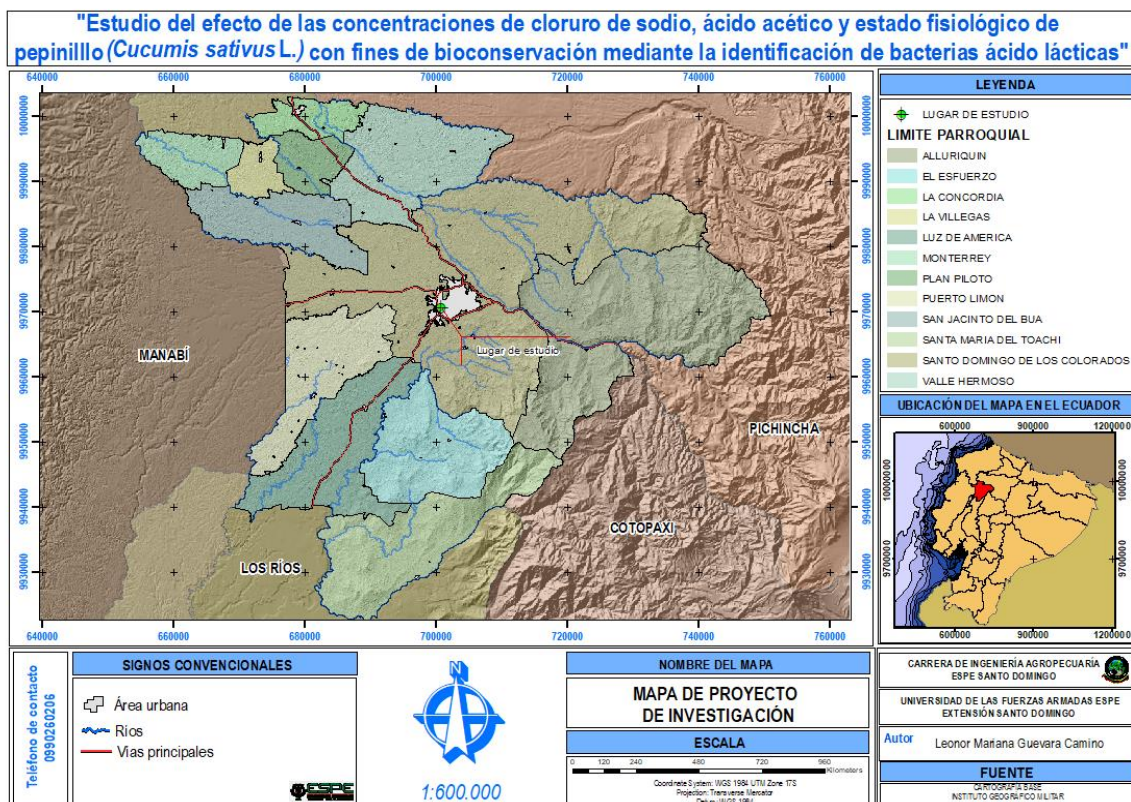
Ubicación Política

El ensayo se realizó en el cantón, Santo Domingo de los Colorados, parroquia Abraham Calazacón; sector: km 3 ½ vía a Quevedo, Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Ubicación Geográfica

Figura 1

Ubicación geográfica de la investigación.



Nota: Esta figura presenta la ubicación geográfica del lugar donde se desarrolló la investigación. Latitud: 700703.252; Longitud 9970618.133.

Ubicación Ecológica

Tabla 9

Características de la ubicación ecológica del lugar de la investigación.

Zona de vida:	Bosque húmedo Tropical
Altitud:	554 msnm
Temperatura media:	24 °C
Precipitación:	2860 mm año
Humedad relativa:	85%
Tipo de suelo:	Franco arenoso

Nota: Esta tabla demuestra la ubicación ecológica del lugar de la investigación.

Materiales

Establecimiento del cultivo

Tabla 10

Recursos utilizados para el establecimiento del cultivo.

Materiales	Insumos
Fundas plásticas de 20 libras	Hidróxido de calcio
Tierra negra	Coctel de microorganismos eficientes
Estiércol de ganado vacuno	DAP
Cascarilla de arroz	Semillas Híbrido Midas F1
Pala	Turba
Bandeja germinadora	
Plástico negro	
Recipiente de 20 litros	

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para el establecimiento del cultivo.

Cosecha de los pepinillos

Tabla 11

Recursos utilizados para la cosecha de los pepinillos.

Materiales
Tijeras
Cesta plástica
Papel periódico

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la cosecha de los pepinillos.

Elaboración y manejo de los pepinillos encurtidos

Tabla 12

Recursos utilizados para la elaboración y manejo de los pepinillos encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Material vegetal
Refractómetro	Pisetas	Ácido acético de frutas	Pepinillos
Balanza	Bisturí	Ácido acético tinto	
analítica	Varilla de vidrio	Cloruro de sodio	
Baño María	Vasos de precipitación de 200 mL	Agua corriente	
	Probeta de vidrio 100 mL		
	Espátula		
	Recipiente metálico de 3 L		
	Termómetro digital		
	Frascos de vidrio de 250 mL		
	Tapas para los frascos de vidrio		
	Temporizador		
	Etiquetas		

Regla graduada

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados en la elaboración y manejo de los pepinillos encurtidos.

Determinación de los grados Brix en los pepinillos cosechados y encurtidos

Tabla 13 Recursos utilizados para la determinación de sólidos solubles en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Muestras
Balanza analítica	Licuadaora	Pepinillos cosechados
Refractómetro Atago	Bisturí	Pepinillos encurtidos
Baño María	Varilla de vidrio	
	Vaso de precipitación de 100 mL	
	Embudo de vidrio	
	Papel filtro	

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la determinación de sólidos solubles en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Determinación del pH en los pepinillos cosechados y encurtidos

Tabla 14

Recursos utilizados para la determinación del pH de los pepinillos cosechados y encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Potenciómetro	Vaso de precipitación de 200 mL.	Agua destilada estéril	Pepinillos cosechados
Balanza analítica	Mortero	Soluciones buffer	Pepinillos encurtidos
Baño María			

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la determinación del pH de los pepinillos cosechados y encurtidos.

Determinación de la acidez titulable de los pepinillos cosechados y encurtidos

Tabla 15

Recursos utilizados para la determinación de la acidez titulable de los pepinillos cosechados y encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Potenciómetro	Vaso de precipitación	NaOH 0,1N	Pepinillos
Agitador	de 50 ml.	Agua destilada	cosechados
Plancha térmica magnética	Vasos de precipitación 200 mL		Pepinillos encurtidos
Equipo de titulación	Matraz volumétrico de		
Plato calentador	250 mL		
Equipo de titulación	Probeta de 100 mL		
	Embudo de vidrio		
	Bureta de 25 mL		

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la determinación de la acidez titulable de los pepinillos cosechados y encurtidos.

Determinación de la ceniza en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Tabla 16

Recursos utilizados para la determinación de la ceniza en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Mufla	Cápsulas de platino	Agua destilada	Pepinillos cosechados
Desecador	Mechero bunsen	Aceite vegetal	Pepinillos encurtidos
Balanza analítica	Pinzas metálicas con protección		

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la determinación de ceniza en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Determinación de la fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Tabla 17

Recursos utilizados para la determinación de la fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Balanza analítica sensible al 0,1 mg	Mortero. Probeta de 100 mL.	Ácido sulfúrico 0,18 M	Pepinillos cosechados
Equipo Dosi-Fiber	Pisetas.	KOH o NaOH	Pepinillos
Bomba de vacío	Pipetas.	Antiespumanete	encurtidos
Estufa.	Matraz kitasato	(acetona)	
Mufla	Crisoles porosos		
Desecador			

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la determinación de fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Determinación de la humedad en los pepinillos cosechados y encurtidos

Tabla 18

Recursos utilizados para la determinación de la fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Equipos	Materiales/Insumos	Muestras
Balanza analítica sensible al 0,1 mg	Vaso de precipitación de 100 ml	Pepinillos cosechados
Estufa		Pepinillos encurtidos

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la determinación de fibra en los pepinillos cosechados y encurtidos.

Inoculación de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo.

Tabla 19 Recursos utilizados para la inoculación de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo.

Equipos	Materiales/Reactivos	Muestras
Incubadora.	Tubos de ensayo.	Producto encurtido
Autoclave.	Mecheros bunsen	
Cámara de flujo laminar.	Medio de cultivo Agar MRS. Medio de cultivo MRS BROTH	
Plato calentador	Fosfato dibásico	
Agitador	Fosfato monobásico	
Balanza analítica	Asas metálicas.	
sensible al 0,1 mg	Vaso de precipitación de 500 mL Tubos de ensayo Eppendorf	
Stomacher	Solución salina al 0,9% Bolsas herméticas estériles Cajas Petri Espátula	

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la inoculación de las bacterias ácido lácticas en medios de cultivo.

Identificación de las bacterias ácido lácticas procedentes de los medios de cultivo.

Tabla 20

Recursos utilizados para la identificación de las bacterias ácido lácticas procedentes de los medios de cultivo.

Equipos	Materiales/Reactivos	Muestras
Incubadora.	Mecheros	Producto encurtido
Autoclave.	Asas metálicas.	
Cámara de flujo laminar.	Portaobjetos Cubreobjetos	

Microscopio	Aceite de inmersión. H ₂ O ₂ (Agua oxigenada) KOH al 3% Agua destilada Cristal violeta Lugol Safranina Alcohol al 96%
-------------	--

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para la identificación de BAL procedentes de los medios de cultivo.

Recuento de poblaciones microbianas procedentes del producto encurtido.

Tabla 21

Recursos utilizados para el recuento e identificación de poblaciones microbianas procedentes del producto encurtido.

Equipos	Materiales/Reactivos	Muestras
Incubadora.	Tubos de ensayo	Producto encurtido
Autoclave.	Peptona	
Cámara de flujo laminar.	Agua destilada estéril	
Balanza analítica sensible al 0,1 mg	Vaso de precipitación de 500 mL	
Stomacher	Asas metálicas Mecheros bunsen Láminas Petri film Difusor Espátula	

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados para el recuento de poblaciones microbianas procedentes del producto encurtido.

Análisis sensorial de los pepinillos encurtidos

Tabla 22

Recursos utilizados para el análisis sensorial.

Insumos	Muestras
Fichas	Producto encurtido
Esferos	
Cámara fotográfica	

Nota: Esta tabla demuestra los recursos utilizados el análisis sensorial.

Análisis estadístico

Factores y niveles del experimento

Tabla 23

Factores y niveles probados en la elaboración de las conservas de pepinillo (Cucumis sativus) para la identificación de bacterias ácido lácticas.

Factores	Niveles
Concentraciones de Cloruro de Sodio (C)	c1= 15% c2= 20%
Tipos de Ácido Acético (T)	t1= Ácido acético de Frutas t2= Ácido acético Tinto
Estados fisiológicos (E)	e1= Verde e2= Pintón e3= Maduro

Nota: Esta tabla muestra los factores y niveles probados en la elaboración de las conservas de pepinillo para la identificación de bacterias ácido lácticas.

Tratamientos

Tabla 24

Tratamientos comparados en la elaboración de las conservas de pepinillo (Cucumis sativus) para la identificación de bacterias ácido lácticas.

Tratamiento	Código	Descripción
T1	c1t1e1	NaCl al 15% + Ácido acético de manzana + Verde.
T2	c1t1e2	NaCl al 15% + Ácido acético de manzana + Pintón.
T3	c1t1e3	NaCl al 15% + Ácido acético de manzana + Maduro.
T4	c1t2e1	NaCl al 15% + Ácido acético Tinto + Verde.
T5	c1t2e2	NaCl al 15% + Ácido acético Tinto + Pintón.
T6	c1t2e3	NaCl al 15% + Ácido acético Tinto + Maduro.
T7	c2t1e1	NaCl al 20% + Ácido acético de manzana + Verde.
T8	c2t1e2	NaCl al 20% + Ácido acético de manzana + Pintón.
T9	c2t1e3	NaCl al 20% + Ácido acético de manzana + Maduro.
T10	c2t2e1	NaCl al 20% + Ácido acético Tinto + Verde.
T11	c2t2e2	NaCl al 20% + Ácido acético Tinto + Pintón.
T12	c2t2e3	NaCl al 20% + Ácido acético Tinto + Maduro.

Nota: Esta tabla muestra los tratamientos comparados en la elaboración de las conservas de pepinillo para la identificación de bacterias ácido lácticas.

Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue el esquema trifactorial (2X2X2) conducido en un D.B.C.A. con tres repeticiones por tratamiento; utilizando el programa Statistica.

Tabla 25

Esquema del análisis de varianza en la elaboración de las conservas de pepinillo (Cucumis sativus) para la identificación de bacterias ácido lácticas.

Fuente de Variación		Grados de Libertad
Concentración	C-1	1
Ácidos	T-1	1
Estado fisiológico	E-1	2
Concentración x Ácidos	(C-1) (T-1)	1
Concentración x Estados fisiológicos	(C-1) (E-1)	2
Ácidos x Estados fisiológicos	(T-1) (E-1)	2
Concentración x Ácidos x Estados fisiológicos	(C-1) (T-1) (E-1)	2
Error Experimental		24
Total		35

Nota: Esta tabla muestra el esquema del análisis de varianza en la elaboración de las conservas de pepinillo para la identificación de bacterias ácido lácticas.

Coeficiente de variación. Para el cálculo del coeficiente de variación se utilizó la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{\sqrt{CM_e}}{X} * 100$$

Dónde:

CV = Coeficiente de variación.

CM_e = Cuadrado medio del error experimental.

X = Promedio de tratamientos

Análisis funcional. Para los tratamientos que presentaron diferencia estadística, se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5%.

Variables medidas

Grados brix. Para la determinación de esta variable se utilizó un refractómetro, colocando una pequeña cantidad de la muestra a medir en el prisma, que se cerró para proceder a dar lectura al resultado. Se realizó tanto para los pepinillos cosechados, así como para los pepinillos encurtidos.

pH. Se evaluó el pH de los pepinillos cosechados y fermentados.

Acidez titulable. Para determinar esta variable se empleó un potenciómetro e hidróxido de sodio.

Ceniza. Durante la determinación de esta variable se calcinó las muestras de pepinillos cosechados y encurtidos, hasta obtener cenizas de color blanco.

Fibra bruta. La fibra bruta se determinó a partir del material vegetal fresco y el producto final que fueron los pepinillos encurtidos.

Humedad. La humedad se obtuvo a partir del material vegetal fresco y fermentado a través del método gravimétrico.

Inoculación de BAL. Para la inoculación de las BAL, se utilizó el medio Agar MRS.

Identificación de BAL. Para verificar que se trató de BAL, se aplicaron tres pruebas microbiológicas; estas fueron: tinción de Gram, prueba Catalasa y Oxidasa con KOH.

Recuento de poblaciones microbianas. Para determinar esta variable se utilizaron láminas Petri film, con diferentes diluciones del inóculo en agua peptonada así como un stomacher para su agitación.

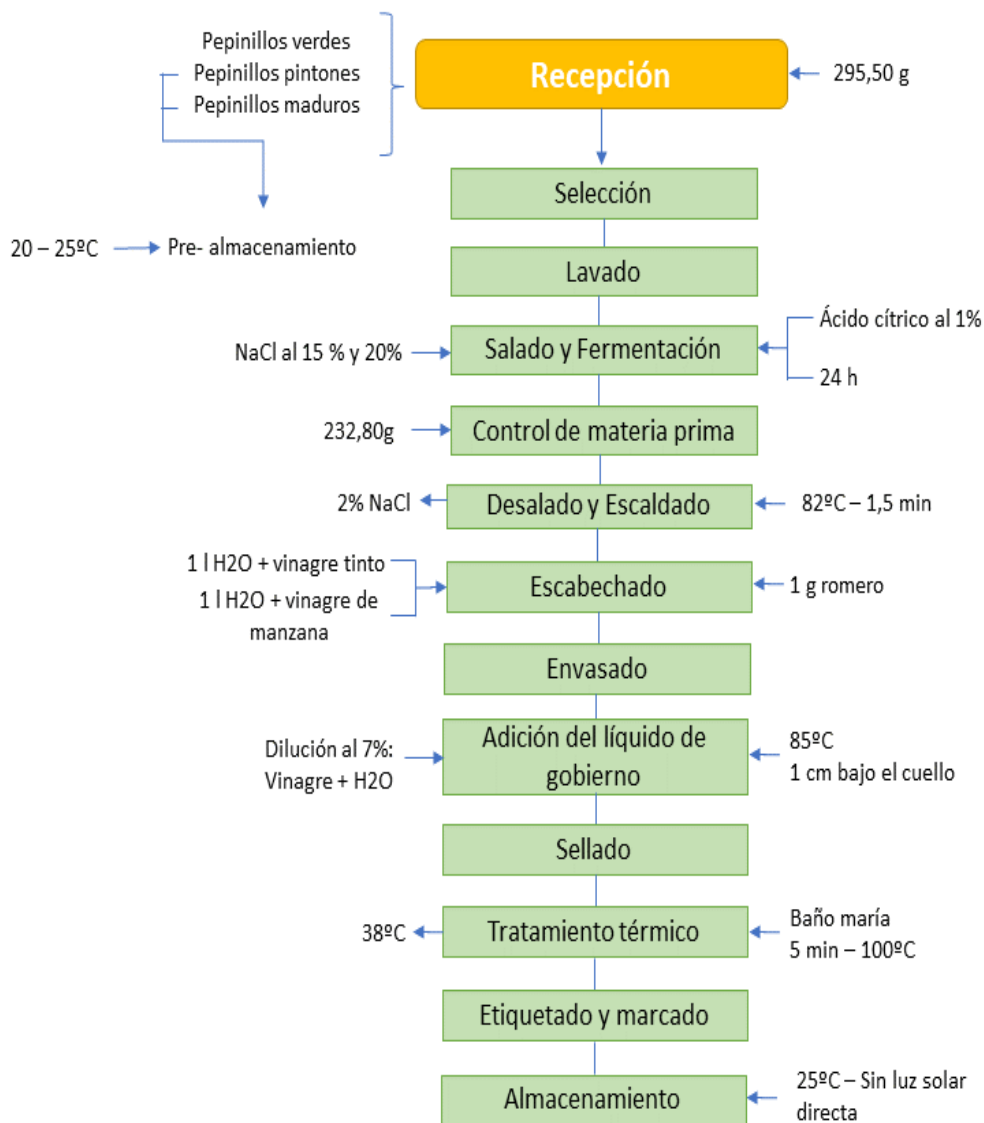
Análisis sensorial del producto fermentado. Se analizaron las variables: sabor, color, textura y olor con 10 individuos.

Métodos

Balace de materiales

Figura 2

Flujograma de la elaboración de pepinillos fermentados.



Nota: Esta gráfica muestra el balance de materiales utilizados en la elaboración de pepinillos fermentados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

Establecimiento del cultivo

Para el establecimiento del cultivo, se utilizó un invernadero de 16 m² ubicado en la residencia de la Sra. Piedad Camino; puesto que, este recurso durante la pandemia sirvió para la siembra de diversas hortalizas destinadas al consumo del hogar.

En la siembra bajo invernadero se preparó el sustrato para 40 plantas, en fundas de 20 lbs de capacidad, con 10% de cascarilla de arroz, 25% de estiércol descompuesto de ganado vacuno y 65% de tierra negra; estos componentes fueron mezclados con hidróxido de calcio como mejorador de suelo y controlador de plagas.

Durante la siembra se utilizó 0,5 kg de turba, agua hirviendo y 10 ml del coctel de microorganismos eficientes diluidos en 250 mL de agua sin clorar, que se mezcló para posteriormente ubicarlos en la bandeja germinadora. La desinfección de la turba se realizó un día antes y al día siguiente se llevó a cabo la siembra de las semillas de pepinillo, procedentes del híbrido Jaguar F1. Al finalizar la siembra, se realizó un riego sutil sobre la bandeja utilizando la dilución de los microorganismos.

Luego de 7 días, se llevó a cabo la siembra de los plantines en las fundas previamente preparadas y distanciadas a 25 cm entre planta y 1 m entre hileras. En cada funda se colocó un plantín en el centro del sustrato, con 5 g de DAP como fertilización de fondo. Finalmente, se realizó el riego con los microorganismos eficientes a razón de 2 l diluidos en 18 l de agua corriente sin clorar.

Cosecha de los pepinillos. La cosecha se realizó a los 55 días después de la siembra de forma manual utilizando tijeras de podar con sumo cuidado, para ubicarlos después sobre el papel periódico ubicado en el fondo de una cesta plástica, a fin de evitar daños mecánicos en la planta. El tamaño para los encurtidos fue de 15 cm de largo, con un diámetro de 4 a 6 cm; los frutos presentaron el color típico de la variedad, así como semillas tiernas en su pulpa,

sin estrías, ni barriga pálida o amarilla y sin heridas producto de plagas, enfermedades o manejo.

Elaboración y manejo de los pepinillos fermentados

Recepción. En el caso de los tratamientos con pepinillos verdes estos fueron fermentados sin una conservación previa; sin embargo, los pepinillos pintones y maduros, fueron almacenados a temperatura ambiente dentro de un lugar fresco y seco hasta alcanzar una coloración amarillenta (pintones) y totalmente amarilla (maduros).

Selección. Se retiraron hojas y flores adheridos a los frutos.

Lavado. Los pepinillos verdes, pintones y maduros se lavaron con agua corriente, para reducir impurezas.

Salado y fermentación. En el salado y fermentación, se deshidrató el material vegetal disminuyendo sabores astringentes y amargos; la salmuera se preparó con un 15 y 20% de concentración de cloruro de sodio, para posteriormente añadir el líquido de gobierno con el ácido conforme al tratamiento: sidra de manzana y vino tinto en 1%, que fueron aplicados para impedir la oxidación durante las primeras 24 horas de fermentación.

Control de materia prima. La materia prima fue pesada, para proceder a tomar muestras de los productos y comprobar si obtuvieron o no la calidad deseada. También se estableció el contenido de sal de salmuera, pH y acidez total.

Desalado. En este paso, se eliminó la salmuera inicial, hasta alcanzar una concentración aproximada del 2% de sal.

Escaldado. En este punto los pepinillos fueron ubicados sobre agua hervida a una temperatura de 82°C, durante 1,5 min.

Esacabechado. Aquí se preparó en una olla de agua donde se ubicó 1 l de agua, junto con el ácido acético (vino tinto y sidra de manzana) seguido del romero.

Envasado. Se realizó el llenado de los envases sin verter el producto, para evitar contaminar el sector de cierre.

Adición del líquido de gobierno. Se llevó a cabo la disolución de los dos tipos de vinagre al 7% en agua; se realizó a una temperatura de 85°C, llenando los frascos hasta 1 cm por debajo del cuello.

Sellado. Los frascos, se cerraron a presión atmosférica, eliminando el aire previamente para obtener un vacío parcial.

Tratamiento térmico. Este se llevó a cabo a baño maría durante 5 min a 100°C, enfriando los envases de manera paulatina para evitar la sobrepresión. La temperatura final de enfriamiento fue de 38°C. Una vez finalizado el envasado se llevó a cabo el etiquetado.

Etiquetado y marcado. Una vez terminado el proceso se realizó la marcación y etiquetación de los diferentes envases.

Almacenamiento. En este paso, se evitó la luz solar directa, manteniendo una temperatura ambiental menor a 25°C.

Determinación de los grados brix de los pepinillos cosechados y fermentados

A través de la técnica de refractometría, descrita por la NTE (INEN 380, 1985), se empleó un refractómetro manual Atago. que fue previamente calibrado con agua destilada a 20°C hasta ajustarlo a 0° Brix.

Para la preparación de la muestra, se utilizó 10 g de material vegetal, incluyendo pulpa, cáscaras y semillas pesadas con aproximación a 0,01 g, que posteriormente se licuaron añadiendo 100 ml de agua destilada. Consecuentemente, la muestra licuada se flotó a baño maría durante 30 minutos, agitando de forma ocasional el contenido con una varilla de vidrio.

Finalmente, la mezcla se dejó reposar durante 20 minutos, pesándola de nuevo con aproximación al 0,01 g para luego filtrarla y reservar el contenido para la determinación.

En el prisma fijo del refractómetro, se ubicaron de 2 a 3 gotas de muestra que permitieron realizar la lectura de los grados brix.

Determinación de pH de los pepinillos cosechados y fermentados

El procedimiento se rigió a la NTE (INEN 0389, 1986).

Para la preparación de la muestra, se utilizó 10 g de material vegetal y 10 g de los pepinillos encurtidos, incluyendo pulpa, cáscaras y semillas que fueron pesadas con aproximación a 0,01 g, para posteriormente licuarlas y así se añadieron 100 ml de agua destilada, hervida y enfriada. Posteriormente, la muestra triturada se sometió a baño maría durante 30 minutos, agitando de forma ocasional el contenido con una varilla de vidrio. Finalmente, la mezcla se dejó reposar durante 20 minutos.

Luego de verificar el correcto funcionamiento del potenciómetro, mediante el uso de las soluciones buffer y agua destilada. A continuación, se midió 10 ml de muestra que se colocó en un vaso de precipitación, agitándose suavemente hasta que las partículas quedaron suspendidas de manera uniforme.

Consecuentemente para los tres casos se determinó el pH mediante lectura directa, introduciendo los electrodos del potenciómetro en el vaso de precipitación con la muestra, cuidando que estos no toquen las paredes del recipiente.

Determinación de la acidez titulable en los pepinillos cosechados y fermentados

Se llevó a cabo conforme a los procedimientos de la NTE (INEN 0381, 1986):

Se trituró 25 g de la muestra, con una aproximación al 0,01 g en un matraz volumétrico de 250 cc hasta alcanzar el volumen con agua destilada caliente y así obtener un líquido uniforme, durante al menos 30 minutos a baño maría. El contenido, se enfrió para proceder a derivar alícuotas de 25 mL para la medición respectiva con el potenciómetro.

Rápidamente se añadieron de 10 a 50 cc de la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, agitando hasta alcanzar pH 6, determinado con el potenciómetro.

Se continuó añadiendo lentamente solución 0,1 N de hidróxido de sodio hasta obtener pH 7; luego, adicionando la solución 0,1 N de hidróxido de sodio en cuatro gotas por vez, y así se registró el volumen y el pH de la misma que se obtuvo después de cada adición, hasta que se alcanzó pH 8,3 aproximadamente.

Por interpolación se estableció el volumen exacto de solución 0,1 N de hidróxido de sodio añadido, correspondiente al pH 8,1 y se procedió a realizar los cálculos siguientes para obtener el resultado:

$$A = \frac{(V_1 N_1 M)}{V_2}$$

Siendo:

A = g de ácido en 100 g de producto.

V_1 = cm³ de NaOH usados para la titulación de la alícuota.

N_1 = normalidad de la solución de NaOH.

M = peso molecular del ácido considerado como referencia (0,060)

V2 = volumen de la alícuota tomada para el análisis

Determinación de ceniza en los pepinillos cosechados y fermentados

Basándose en la NTE (INEN 401, 1985). Previo a la colocación de la muestra, se ubicó las cápsulas en la mufla, calentándolas durante 15 min a 550°C +/- 25°C; luego se transfirieron al desecador para enfriarlas y pesarlas con aproximación a 0,1 mg. Posteriormente en la cápsula de platino, se pesó 10 g de muestra colocándola sobre una fuente calórica a 105° +/- 5°C, donde se evaporó. Luego se extrajeron las cápsulas para adicionarles unas gotas de aceite de oliva. A continuación, se calentaron sobre un mechero bunsen con la ayuda de unas pinzas metálicas hasta que cese el borboteo.

Terminada la quema de la muestra, se colocó las cápsulas con su contenido dentro de la mufla a 550°C +/- 25°C hasta obtener cenizas blancas en los casos donde las cenizas fueron de un color oscuro, se humedecieron con unas gotas de agua destilada, y nuevamente se evaporaron sobre el mechero bunsen, para proceder a calcinarlas por segunda vez en la mufla hasta que las cenizas se tornaron completamente blancas.

Finalmente, se pesó las cápsulas con su contenido en una balanza analítica. Los resultados obtenidos fueron reemplazados en la siguiente fórmula:

$$C = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \times 100$$

C = contenido de cenizas, en porcentaje de masa.

m_1 = masa de la cápsula vacía, en gramos.

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

m_3 = masa de la cápsula con las cenizas, en gramos.

Determinación de fibra bruta de los pepinillos cosechados y fermentados

En este caso, la metodología aplicada fue la utilizada por (Nogales, 2018):

Para la preparación de la muestra, se pesó 5 g que fueron triturados posteriormente con un mortero, de los cuales se pesó 1,5 g de muestra para cada crisol poroso con precisión de +/- 1 mg. Consecuentemente, se calentó el reactivo en la placa calentadora a 95 – 100°C; en otro escenario los crisoles se llenaron con las muestras molidas para ser situados en las “gradillas porta-crisoles”, que fueron recogidos e introducidos en la unidad principal frente a las resistencias, a continuación, se bajaron las palancas de fijación y la reflectora.

Después, los mandos de la válvula se situaron en la posición “OFF”, abriendo el grifo de entrada de agua refrigerante (caudal: 1- 2 l/min) y accionando el botón de encendido.

En el proceso de extracción caliente, se levantó la tapa superior para añadir el reactivo en cada columna; el potenciómetro de ajuste se giró en sentido antihorario hasta la posición 80-90%, poniendo la resistencia en marcha. Continuamente, se añadió el antiespumante; al empezar el hervor del reactivo, se disminuyó la potencia de calor girando el potenciómetro hasta el 20-30%. Mientras ocurrió dicho proceso, se calentó agua destilada. Finalizada la extracción se apagó el calefactor y seguido a esto se abrió el grifo de la trompa de agua, situando los mandos de la válvula en la posición “aspirar”, completada la filtración, la válvula se cerró.

La muestra, se lavó con el agua destilada caliente, introduciéndola por la entrada de la columna. Las válvulas fueron situadas en la posición aspirar para dejar las muestras secas. Continuando, los crisoles se extrajeron con una “asa porta-crisoles”

Para la hidrólisis ácida en caliente, se verificó que las válvulas se encontrasen cerradas, y así se añadió 150 ml de H₂SO₄ caliente en cada

columna y unas gotas de antiespumante; a continuación, se abrió el circuito de refrigeración activando las resistencias calefactoras.

Luego se esperó que hierva, reduciendo el potencial de 90% a 30% durante 30 min a 1 h, conforme al material utilizado. Para una hidrólisis más efectiva, se accionó la bomba de aire en la posición “soplar”. En el punto de calefacción se abrió el circuito de vacío poniendo los mandos en la posición “Adsorción”. Posteriormente, se lavó y filtró con agua destilada.

En la parte de la extracción en frío con acetona, fue importante recordar que no se debía realizar este tipo de procedimientos con el equipo Dosi-Fiber. En esta parte del proceso, se preparó el fisco “kitasatos” con las trompas de vacío, situando el crisol en la entrada y añadiendo acetona a la vez que el circuito vacío adsorba hacia el frasco.

Las muestras se secaron en la estufa a 150 °C durante 1 h, luego se transfirieron al desecador y posteriormente fueron pesadas con una precisión de 0,1 mg. A continuación, se incineraron las muestras de los crisoles en la mufla a 550°C durante un lapso de 3 horas; nuevamente se enfriaron en el desecador para pesarlas con una precisión de 0,1 mg. La siguiente fórmula, fue utilizada para calcular fibra bruta:

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

%FB = Porcentaje de fibra bruta

W0= Peso de la muestra

W1= Peso del crisol + muestra seca

W2= Peso del crisol + muestra calcinada.

Determinación de humedad de los pepinillos cosechados y fermentados

Para la determinación de humedad se utilizó el método gravimétrico, a través de la adaptación de la metodología realizada por (Álvarez & Guevara, 2020):

Se tomó y registró el dato del peso de cada vaso de precipitación de 100 ml destinado a contener las muestras, con la ayuda de una balanza analítica; donde posteriormente se ubicaron 5g de los pepinillos en función de cada tratamiento. A continuación, se colocaron los vasos con la muestra en la estufa a 105°C por 24 horas; luego de haber transcurrido este período se prosiguió con el registro de peso. El procedimiento se repitió para los pepinillos cosechados.

Los cálculos se realizaron con la fórmula:

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

Dónde:

m_1 = masa del vaso de precipitación vacío (g).

m_2 = masa del vaso de precipitación con la muestra previo al secado(g).

m_3 = masa del vaso de precipitación con la muestra seca (g).

Inoculación de las bacterias ácido lácticas del producto fermentado

En cuanto a este procedimiento, se utilizó el protocolo aplicado por (Rascón, 2016).

Para la preparación del medio se utilizó 240 mL, conforme a las indicaciones del fabricante, se tomó 16 g de MRS agar y 240 mL de agua

destilada estéril, para lo que se empleó una balanza con referencia 0,1 mg y un matraz donde se realizó la mezcla.

Una vez hecha la mezcla, el matraz fue introducido en la autoclave a una temperatura de 115°C durante 20 minutos, que luego se dejó temperar a 50°C en un baño térmico. Consecuentemente, se vertió el contenido en las placas Petri (previamente esterilizadas) junto a un mechero bunsen encendido, para evitar una posible contaminación.

Posteriormente, se dejó enfriar y solidificar las placas para proceder a guardarlas en la cámara fría hasta que se pudieron utilizar.

Procesamiento de los encurtidos. Se cortaron cuatro discos de los pepinillos procedentes de cada tratamiento con 2mm de grosor para proceder a ubicarlos sobre el medio de cultivo; que se lo dividió en cuatro partes. Todo este procedimiento fue realizado cuidando de mantener el material cerca del mechero bunsen encendido.

Crecimiento bacteriano. Luego de la incubación, las colonias que crecieron en el medio, fueron picadas con una pipeta junto a un mechero bunsen encendido para ser inoculadas en el MRS. Para este procedimiento, se eligieron las colonias blancas y pequeñas, puesto que son características inherentes de las BAL.

Identificación de bacterias procedentes del producto fermentado

La metodología aplicada fue la utilizada por (Rascón, 2016):

Tinción de Gram: Se transfirió una porción de la colonia bien aislada desde la placa sembrada y se mezcló con una gota de agua destilada (usando un asa de platino) en el portaobjetos del microscopio.

La masa bacteriana fue difundida y se dejó secar la extensión al aire. Luego, se fijó la extensión con calor pasando el portaobjetos sobre la llama de un mechero. Para consecuentemente ejecutar la tinción de Gram:

En primera instancia se cubrió la extensión con cristal violeta (Tinción primaria) durante dos minutos, lavando suavemente la extensión una vez teñida. A continuación, se inundó la extensión con la solución de Lugol durante 2 minutos.

El exceso de colorante se lavó con alcohol al 96% por 30 segundos. A continuación, se retiró el alcohol con abundante agua destilada y se procedió a cubrir la extensión con safranina (tinción secundaria) durante 3 minutos para posteriormente lavar con agua destilada, y dejar secar la muestra.

La primera observación se realizó con el lente de 100X, anotando la interpretación de la tinción Gram. Las células Gram positivas aparecieron de un color azul y las Gram negativas con color de rosado a rojo, observando la forma y tinción características de cada cepa.

Prueba Catalasa. Esta prueba se realizó conforme a los lineamientos de (Álvarez & Guevara, 2020).

Se depositó una colonia en un porta objetos, añadiendo una gota del reactivo (peróxido de hidrógeno). Para efectuar la lectura en 10-20 segundos e interpretar los resultados, se tomó en cuenta los siguientes criterios: Positivo - formación de burbujas y negativo - sin formación de burbujas o muy escasa producción tras 20 segundos.

Prueba Oxidasa con KOH. Esta prueba se realizó en base al procedimiento según (Lagunas & Vega, 2013):

Se colocó sobre un porta objeto una gota de KOH al 3 %, con el asa se recolectó muestras de las colonias bacterianas en estudio, mezclando con la gota de KOH, a través de movimientos giratorios durante 1 a 3 minutos.

Para esto el criterio fue: si en el asa de la mezcla se formaba una hebra viscosa, la prueba era positiva e indicaba que se trató de bacterias Gram negativas. Si al separar el asa no se formaba la hebra, la prueba era negativa, e indicaba que las bacterias eran Gram positivas.

Recuento de poblaciones microbianas procedentes del producto fermentado

Este método se llevó a cabo mediante la metodología aplicada por (Álvarez & Guevara, 2020):

Inoculación en lámina Petri film. Se preparó la muestra en base a las diluciones 10^{-8} , con agua peptonada al 0,1% homogenizándola en Stomacher. Luego se inoculó (hongos y bacterias), transfiriendo 1 ml del inóculo a la superficie de la lámina de Petri film. Se deslizó cuidadosamente hacia abajo la película con el fin de evitar que queden burbujas atrapadas.

Se colocó el difusor encima del inóculo, el círculo dentado limitó el área por la que se extendió el inóculo aplicando suavemente presión sobre el difusor que distribuyó uniformemente el inóculo sobre la totalidad del área circular. Consecuentemente se retiró el difusor y se esperó 1 minuto para que el gel se solidifique.

El Petri film de bacterias se incubó a 37°C y el de hongos a 24°C por 48 horas. Transcurrido este período se procedió a efectuar el conteo. El número de microorganismos se calculó con la siguiente fórmula aplicada por (Álvarez & Guevara, 2020):

$$\text{Recuento} \left(\frac{UFC}{ml} \right) = \frac{\text{media del número de colonias de placas duplicadas}}{\text{factor de dilución} \times \text{volumen inoculado en la placa}}$$

Análisis sensorial del producto fermentado

Se evaluaron cuatro variables sensoriales que fueron: color, sabor, olor y textura a través de una escala cualitativa que se realizó con 10 individuos.

Capítulo IV

Resultados y discusiones

De la determinación de las características físico-químicas de los estados fisiológicos de los pepinillos utilizados para la elaboración de encurtidos.

Análisis físico-químico de los pepinillos

Tabla 26

Análisis físico-químicos de los pepinillos.

Parámetros analizados	Unidad	Pepinillos verdes	Pepinillos pintones	Pepinillos maduros
Sólidos solubles	°Brix	4,00	3,40	3,80
Acidez titulable	%	0,06	0,24	0,31
pH		5,00	4,80	4,90
Fibra	%	0,87	0,78	0,72
Humedad	%	98,52	98,23	89,74
Cenizas	%	0,59	0,56	0,54

Nota: Esta tabla muestra el análisis físico-químico de los pepinillos.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En cuanto a las características físico-químicas referentes a los diferentes estados de maduración de los pepinillos cosechados maduros se obtuvo 3,80 °Brix y 4,90 de pH; mientras que los pepinillos pintones presentaron en pH 4,80 y 3,40 °Brix; entre tanto los pepinillos verdes, obtuvieron 5°Brix con 4,9 de pH; mientras que, en acidez titulable los pepinillos verdes, pintones y maduros presentaron el mismo valor (0,05). Para la variable fibra, el mayor porcentaje se halló en los pepinillos verdes (0,87%), mientras que, se encontraron menores contenidos en los pepinillos pintones (0,78%) y en los pepinillos maduros (0,72%). En el caso del porcentaje de humedad, pudo notarse que esta no fue tan distante entre los tres tipos de maduración; sin embargo, los pepinillos

pintones (98,23) presentaron un contenido superior al de los pepinillos maduros (89,74) los que, a su vez, fueron aún más inferiores con respecto a los pepinillos verdes (98.52). Finalmente, el porcentaje de cenizas demostró superioridad en pepinillos verdes con 0,59%, seguido por los pepinillos pintones y verdes con 0,56% y 0,54% respectivamente.

Análisis de varianza para las variables de estudio.

Análisis de varianza para grados brix.

Tabla 27

Análisis de la varianza para grados brix.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	0,04	1	0,04	0,31	0,5820
B: Ácidos	0,30	1	0,30	2,36	0,1387
C: Estado Fisiológico	0,0017	2	0,00083	0,007	0,9935
Repeticiones	0,62	2	0,31	2,43	0,1110
AB	0,02	1	0,02	0,18	0,6793
AC	0,20	2	0,10	0,79	0,4677
BC	0,01	2	0,0033	0,03	0,9744
ABC	0,03	2	0,010	0,10	0,9016
Error	2,82	22	0,13		
Total	4,05	35			
Coefficiente de variación	17,75				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para la variable grados brix.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la tabla 27 del análisis de varianza para Grados brix en el Factor A (Concentración), Factor B (Ácidos) y Factor C (Estado fisiológico), en las repeticiones y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos), *A*C (Concentración*Estado Fisiológico), B*C (Ácidos* Estado Fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos* Estado Fisiológico) no existen diferencias significativas.

Análisis de varianza para pH

Tabla 28

Análisis de la varianza para pH

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	0,2943	1	0,2943	389	0,000000*
B: Ácidos	0,7183	1	0,7183	948	0,000000*
C: Estado Fisiológico	0,0006	2	0,0003	0	0,672269
Repeticiones	0,0004	2	0,0002	0	0,776557
AB	0,0743	1	0,0743	98	0,000000*
AC	0,0006	2	0,0003	0	0,672269
BC	0,0003	2	0,0001	0	0,842028
ABC	0,0009	2	0,0005	1	0,556280
Error	0,0167	22	0,0008		
Total	0,0167	35			
Coeficiente de variación	0,57				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para pH

Elaborado por: Guevara, L (2021).

El análisis de varianza para pH de los pepinillos fermentados (ver tabla 28), demuestra diferencia significativa en los factores B (Ácidos) y Factor A (Concentración); así como también, en la interacción: A*C

(Concentración*Estado Fisiológico). No obstante, en el factor C (Estado fisiológico); las repeticiones y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos), B*C (Ácidos*Estado Fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico) no se presenta diferencia significativa.

Análisis de varianza para acidez titulable.

Tabla 29

Análisis de la varianza para acidez titulable.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	0,000016	1	0,000016	0,066	0,799225
B: Ácidos	0,005329	1	0,005329	22,075	0,000110*
C: Estado Fisiológico	0,001265	2	0,000632	2,619	0,095412
Repeticiones	0,000280	2	0,000140	0,580	0,568074
AB	0,000042	1	0,000042	0,175	0,679744
AC	0,000686	2	0,000343	1,422	0,262633
BC	0,000065	2	0,000033	0,135	0,874082
ABC	0,000203	2	0,000101	0,420	0,662406
Error	0,005311	22	0,000241		
Total	0,01	35			
Coeficiente de variación	6,46				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para acidez titulable.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la tabla 29 de análisis de varianza para acidez titulable se aprecia diferencia significativa en el Factor B (Ácidos); mientras que, en el Factor A (Concentración), Factor C (Estado fisiológico), las repeticiones y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos), A*C (Concentración*Estado

fisiológico), B*C (Ácidos*Estado fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico) no existen diferencias significativas.

Análisis de varianza para cenizas.

Tabla 30

Análisis de la varianza para cenizas.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	46,346	1	46,346	137,514	0,000000*
B: Ácidos	1,198	1	1,198	3,554	0,072677
C: Estado Fisiológico	3,479	2	1,740	5,162	0,014520*
Repeticiones	1,258	2	0,629	1,866	0,178365
AB	1,264	1	1,264	3,752	0,065705
AC	0,085	2	0,042	0,126	0,882223
BC	0,261	2	0,131	0,387	0,683354
ABC	0,051	2	0,025	0,076	0,927491
Error	7,415	22	0,337		
Total	61,36	35			
Coeficiente de variación	6,25				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para cenizas.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

El análisis de varianza de cenizas (ver tabla 30) expone diferencia significativa en el Factor A (Concentración) y Factor C (Estado fisiológico); entre tanto, el Factor B (Ácidos), las repeticiones y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos), A*C (Concentración*Estado fisiológico), B*C (Ácidos*Estado fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico) no existen diferencias significativas en las repeticiones.

Análisis de varianza para fibra.**Tabla 31***Análisis de la varianza para fibra.*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:					
Concentración	0,00080	1	0,00080	0,79	0,383073
B: Ácidos	0,00090	1	0,00090	0,89	0,356223
C: Estado Fisiológico	0,02174	2	0,01087	10,73	0,000560*
Repeticiones	0,00154	2	0,00077	0,76	0,479878
AB	0,00040	1	0,00040	0,39	0,536299
AC	0,00054	2	0,00027	0,27	0,768955
BC	0,00072	2	0,00036	0,35	0,706073
ABC	0,00035	2	0,00018	0,17	0,842529
Error	0,02229	22	0,00101		
Total	0,09	35			
Coeficiente de variación	35,85				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para fibra.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

La tabla 31 muestra el análisis de varianza de fibra, donde se observa diferencia significativa en el factor C (Estados fisiológicos); mientras que, en el factor A (Concentración), B (Ácidos), en las repeticiones y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos), A*C (Concentración*Estado fisiológico), B*C (Ácidos*Estado fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico) no existen diferencias significativas.

Análisis de varianza para humedad.**Tabla 32***Análisis de la varianza para humedad.*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	5,32	1	5,32	0,89	0,3569990
B: Ácidos	15,00	1	15,00	2,49	0,128611
C: Estado fisiológico	23,74	2	11,87	1,97	0,162805
Repeticiones	25,48	2	12,74	2,12	0,144105
AB	12,69	1	12,69	2,11	0,160454
AC	1,10	2	0,55	0,09	0,912817
BC	4,15	2	2,07	0,34	0,712107
ABC	25,12	2	12,56	2,09	0,147797
Error	132,33	22	6,01		
Total	244,90	35			
Coeficiente de variación	5,20				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para humedad.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

Conforme al análisis de varianza para humedad (ver tabla 32) no se aprecia diferencia significativa en el Factor A (Concentración), el Factor B (Ácidos), Factor C (Estado fisiológico); en las repeticiones y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos), A*C (Concentración*Estado fisiológico), B*C (Ácidos*Estado fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico) no existen diferencias significativas.

Análisis de varianza para bacterias.**Tabla 33***Análisis de la varianza para bacterias.*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	3,315392E+20	1	3,315392E+20	2,48199	0,129429
B: Ácidos	1,817735E+21	1	1,817735E+21	13,60804	0,001284*
C: Estado Fisiológico	4,569588E+20	2	2,284794E+20	1,71046	0,203961
Repeticiones	3,219124E+20	2	1,609562E+20	1,20496	0,318728
AB	2,083665E+20	1	2,083665E+20	1,55989	0,224809
AC	1,251214E+21	2	6,256068E+20	4,68345	0,020205*
BC	6,268152E+20	2	3,1340756E+20	2,34625	0,119225
ABC	1,444091E+21	2	7,220454E+20	5,40542	0,012316*
Error	2,938718E+21	22	1,335781E+20		
Total	9,397349E+21	35			
Coeficiente de variación	128,56				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para bacterias.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

La tabla 33 muestra el análisis de varianza de bacterias, donde se observa diferencia significativa en el Factor B (Ácidos) y A*C (Concentración*Estado fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico); mientras que, en el Factor A (Concentración), Factor C (Estado fisiológico) y en las interacciones A*B (Concentración*Ácidos) y B*C (Ácidos*Estado fisiológico) no existen diferencias significativas.

Análisis de varianza para hongos.**Tabla 34***Análisis de la varianza para hongos.*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A: Concentración	4,925934E+15	1	4,925934E+15	0,090534	0,766324
B: Ácidos	3,282163E+17	1	3,282163E+17	6,032324	0,022410*
C: Estado Fisiológico	1,116324E+17	2	5,581621E+16	1,025852	0,375012
Repeticiones	2,389343E+17	2	1,194671E+17	2,195700	0,135071
AB	5,829323E+13	1	5,829323E+13	0,001071	0,974184
AC	1,443581E+17	2	7,217906E+16	1,326587	0,285791
BC	1,615786E+17	2	8,078931E+16	1,484836	0,248375
ABC	5,898772E+16	2	2,949386E+16	0,542071	0,589113
Error	1,197011E+18	22	5,440960E+16		
Total	2,245703E+18	35			
Coeficiente de variación	200,64				

Nota: Esta tabla muestra el análisis de varianza para hongos

Elaborado por: Guevara, L (2021).

La tabla 34 muestra el análisis de varianza de hongos, donde se observa diferencia significativa en el Factor B (Ácidos); mientras que, para el Factor A (Concentración), Factor C (Estado fisiológico) repeticiones, interacciones A*B (Concentración*Ácidos), A*C (Concentración*Estado fisiológico), B*C (Ácidos*Estado fisiológico) y A*B*C (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico); no existen diferencias significativas.

Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para el Factor A

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la concentración de NaCl utilizada en la bioconservación de pepinillos: al 15% y 20%.

Tabla 35

Valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico de las concentraciones de NaCl estudiadas.

Factor A	° Brix	Acidez titulable	Fibra	Humedad	Bacterias (UFC/ml)	Hongos (UFC/ml)
NaCl al 15%	2,05	0,24	0,55	47,57	5,96E+09	1,28E+08
NaCl al 20%	1,98	0,24	0,56	46,80	1,20E+10	1,05E+08

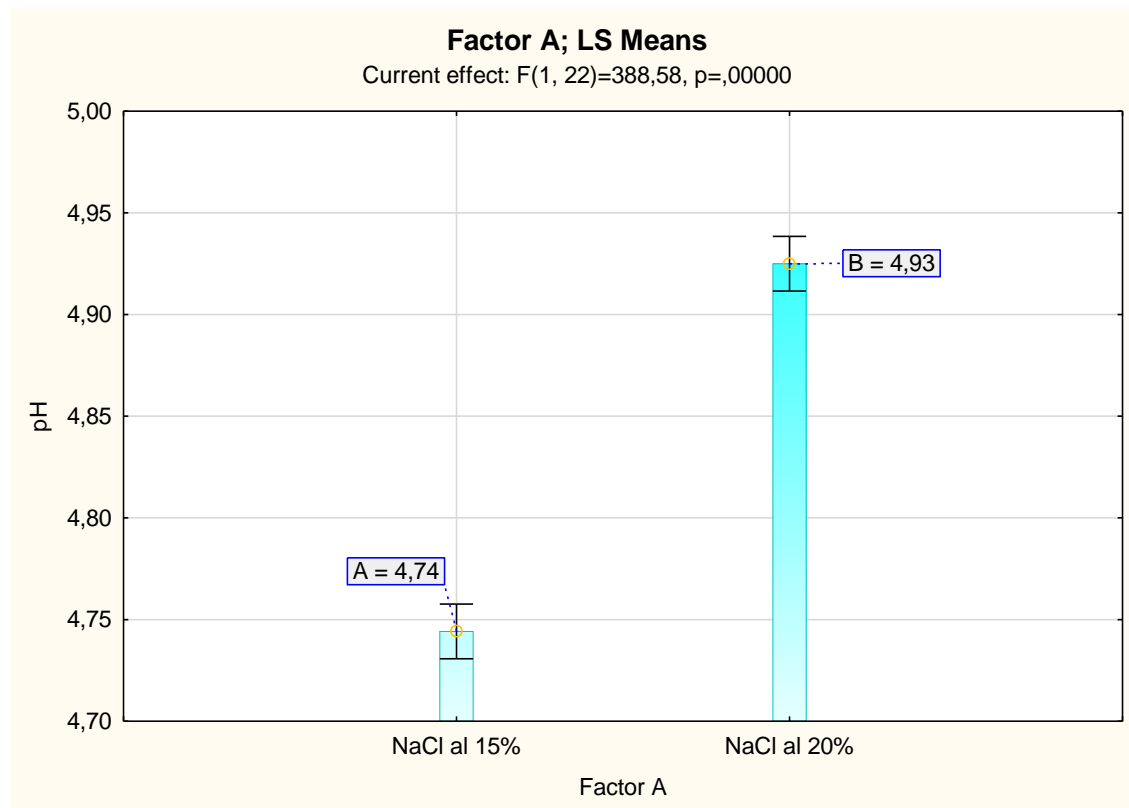
Nota: Esta tabla muestra los valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico de las concentraciones de NaCl estudiadas.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 35 se encuentran los resultados obtenidos que no presentaron diferencias significativas. En los ° Brix se determinaron valores de 2,05 y 1,98 para las concentraciones de NaCl al 15% y 20% de manera respectiva. En acidez titulable, en cambio existió un 0,24% en ambas concentraciones. Respecto a fibra, el mayor porcentaje lo obtuvo NaCl al 20% (0,56) y el menor, NaCl al 15% (0,55). La variable humedad presentó valores de 46,80% para la concentración de NaCl al 20% y 47,57% con NaCl al 15%; en bacterias se determinaron valores de 5,96E+09 y 1,20E+10 E al 15% y 20% de NaCl, mientras que, para hongos (UFC/ml) se presentó 1,28E+08 al 15% y 1,05E+08 al 20% de sal. Sin embargo, para las variables: cenizas y fibra, no se halló diferencia significativa.

Figura 3

Comportamiento del pH con respecto al factor A (Concentración: NaCl al 15% y 20%).



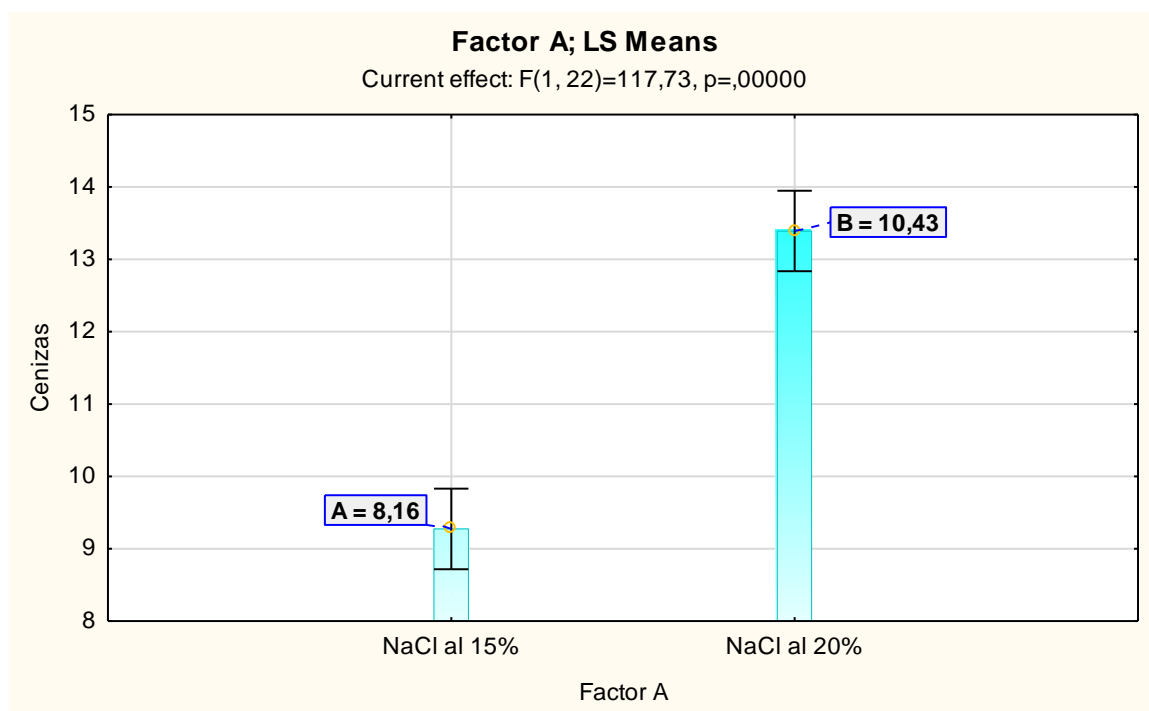
Nota: Esta tabla muestra los resultados del porcentaje de pH que presentaron diferencia significativa conforme a la concentración de NaCl (15% y 20%).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

La figura 3, muestra los valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que exponen las diferencias significativas encontradas en: pH, donde se obtuvo 4,93 con NaCl al 20% mientras que NaCl al 15% demostró una cantidad menor con 4,74.

Figura 4

Comportamiento de las cenizas con respecto al factor A (Concentración: NaCl al 15% y 20%).



Nota: Esta tabla muestra los resultados del porcentaje de cenizas que presentaron diferencia significativa conforme a la concentración de NaCl (15% y 20%).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 4, se puede identificar valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que demuestran las diferencias significativas halladas en: cenizas, donde se obtuvo un porcentaje más alto con la concentración de NaCl al 20% (10,43%); mientras que NaCl al 15% demostró una cantidad más reducida (8,16%).

Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para el Factor B

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de los tipos de ácido acético utilizados en la bioconservación de pepinillos: de manzana y vino tinto.

Tabla 36

Valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico de los tipos de ácido acético estudiados.

Factor B	°Brix	Cenizas	Fibra	Humedad
Sidra de manzana	1,93	0,60	0,55	47,83
Vino tinto	2,11	0,60	0,56	46,54

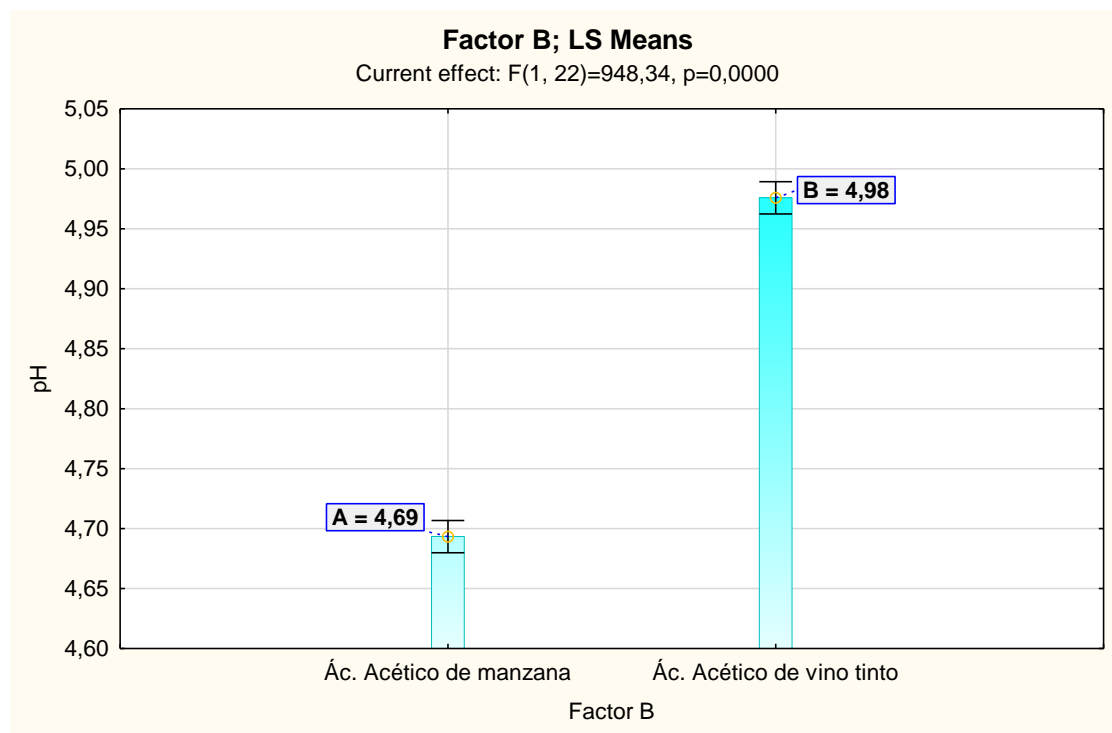
Nota: Esta tabla muestra los valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico de los tipos de ácido acético estudiados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la tabla 36, se presentan los resultados obtenidos, donde: ° Brix se expresó sin diferencia significativa entre los tipos de ácido acético utilizados, con valores de 1,93 y 2,11 para ác. acético de manzana y vino tinto respectivamente. Para cenizas se obtuvo 0,60% con ác. acético de manzana y el vino tinto; mientras que, en fibra los valores registrados fueron de 0,55% para ác. acético de manzana y 0,56% en vino tinto; la humedad por su parte, obtuvo 47,83% para el vinagre de manzana y 46,54% del vinagre de vino tinto. Finalmente, las variables: pH, acidez titulable, hongos (UFC/ml) de este factor sí, se presentaron diferencias significativas.

Figura 5

Comportamiento del pH con respecto al factor B (Ácidos: de manzana y vino tinto).



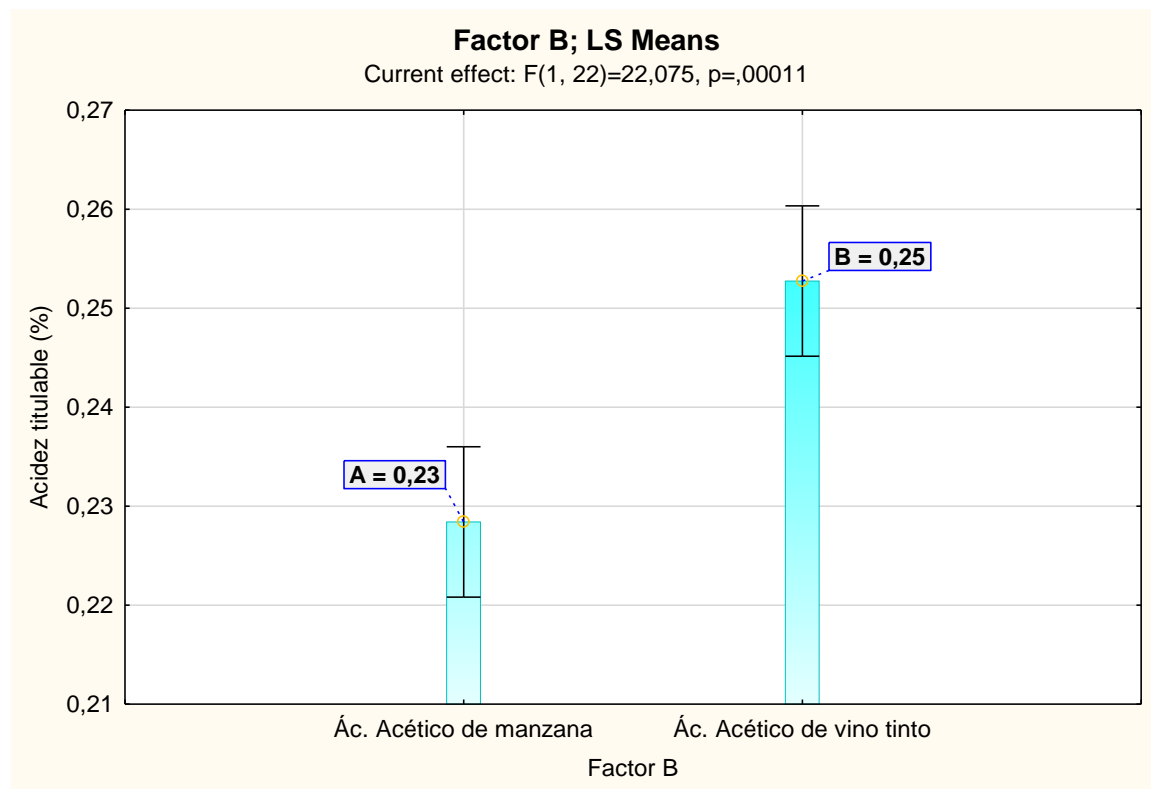
Nota: Esta tabla muestra los resultados de pH que presentaron diferencia significativa conforme al tipo de ácido (de manzana y vino tinto).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

La figura 5, representa los valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que mostraron diferencias significativas encontradas en: pH, donde se obtuvo un porcentaje mayor en el ácido acético de vino tinto (4,98) mientras que el ácido acético de manzana manifestó una cantidad más reducida (4,69).

Figura 6

Comportamiento de la acidez titulable con respecto al factor B (Ácidos: de manzana y vino tinto).



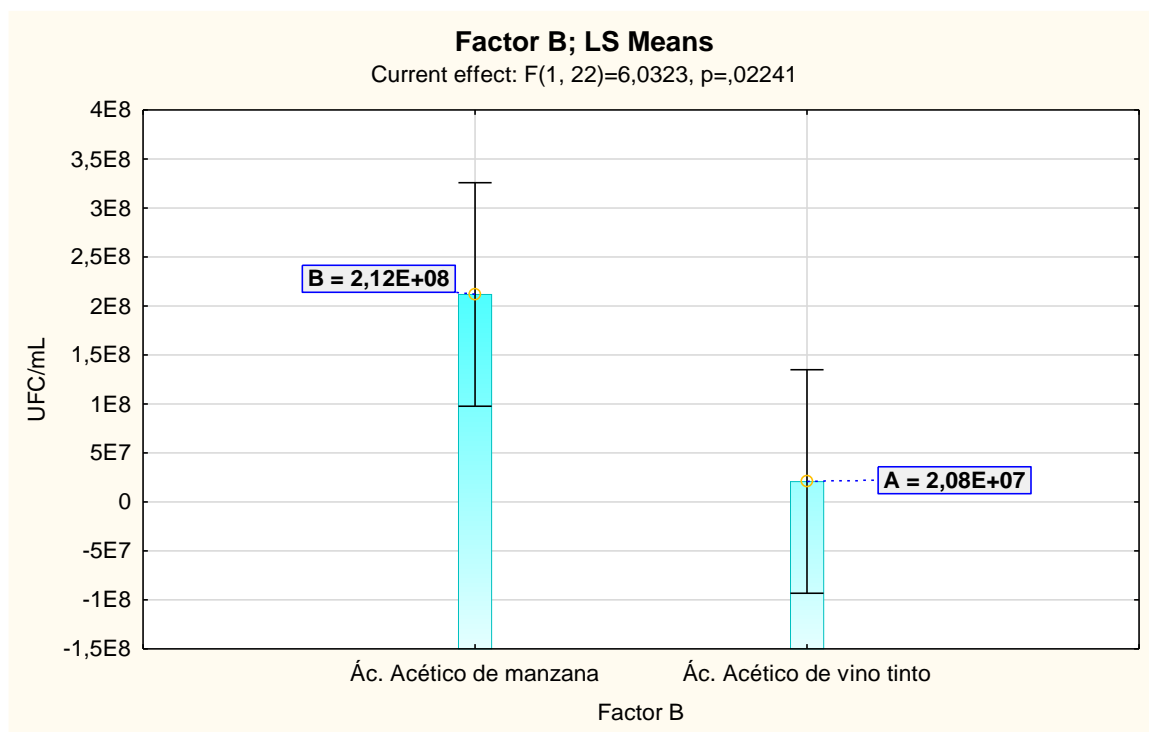
Nota: Esta tabla muestra los resultados de acidez titulable que presentaron diferencia significativa conforme al tipo de ácido (de manzana y vino tinto).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 6, se presentan los valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que demuestran las diferencias significativas encontradas en: acidez titulable, donde se obtuvo un porcentaje altamente diferencial en el ácido acético de manzana que resultó ser más ácido (0,23) mientras que el ácido acético de vino tinto manifestó una cantidad menos ácida (0,25).

Figura 7

Comportamiento de los hongos (UFC/ml) con respecto al factor B (Ácidos: sidra de manzana y vino tinto).



Nota: Esta tabla muestra los resultados de los hongos (UFC/ml) que presentaron diferencia significativa conforme al tipo de ácido (sidra de manzana y vino tinto).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 7, se presentan los valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que exponen las diferencias significativas encontradas en: hongos (UFC/ml) donde se obtuvo un porcentaje altamente diferencial en el ácido acético de manzana ($2,12E+08$) mientras que el ácido acético de vino tinto manifestó una cantidad más reducida ($2,08E+07$).

Prueba de significancia de Tukey $p < 0,05$ para el Factor C

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio del estado fisiológico de los pepinillos utilizados para su bioconservación: verde, pintón y maduro.

Tabla 37

Valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico del estado fisiológico de los pepinillos estudiados.

Factor C	°Brix	pH	Acidez titulable	Humedad	Bacterias (UFC/ml)	Hongos (UFC/ml)
Verde	2,01	4,83	0,25	46,07	5,58E+09	1,93E+08
Pintón	2,03	4,83	0,24	47,51	7,48E+09	9,17E+07
Maduro	2,02	4,84	0,24	47,98	1,39E+10	6,39E+07

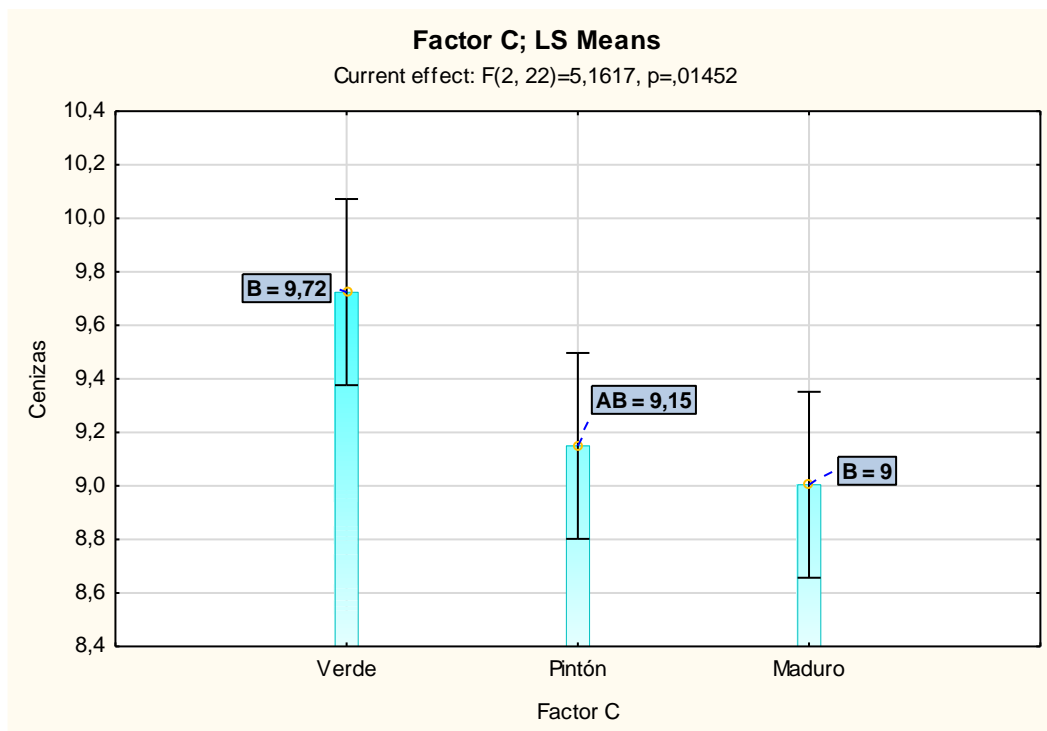
Nota: Esta tabla muestra los valores correspondientes al análisis físico químico y microbiológico del estado fisiológico de los pepinillos estudiados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la tabla 37, se presentan los resultados obtenidos, donde: ° Brix se expresó sin diferencia significativa entre los estados fisiológicos utilizados, verde (2,01), pintón (2,03) y maduro (2,02). El pH en pepinillos verdes y pintones fue igual 4,83; mientras que en maduros fue de 4,84. Para la acidez titulable, tampoco se encontró diferencia significativa puesto que, se obtuvieron 0,25% para verde y 0,24% para pintón y maduro. En cuanto a humedad, las medias alcanzadas fueron 46,07, 47,51 y 47,98 para pepinillos verdes, pintones y maduros de forma respectiva. No obstante, se hallaron valores de 5,58E+09 en pepinillos verdes, 7,48E+09 en pepinillos pintones y 1,39E+10 en pepinillos maduros; mientras que, en hongos las cantidades obtenidas fueron: 1,93E+08, 9,17E+07 y 6,39E+07 en pepinos verdes, pintones y maduros respectivamente. Entre tanto, las variables: pH, cenizas y fibra sí, se obtuvo diferencias significativas.

Figura 8

Comportamiento de las cenizas con respecto al factor C (Estado fenológico: verde, pintón y maduro).



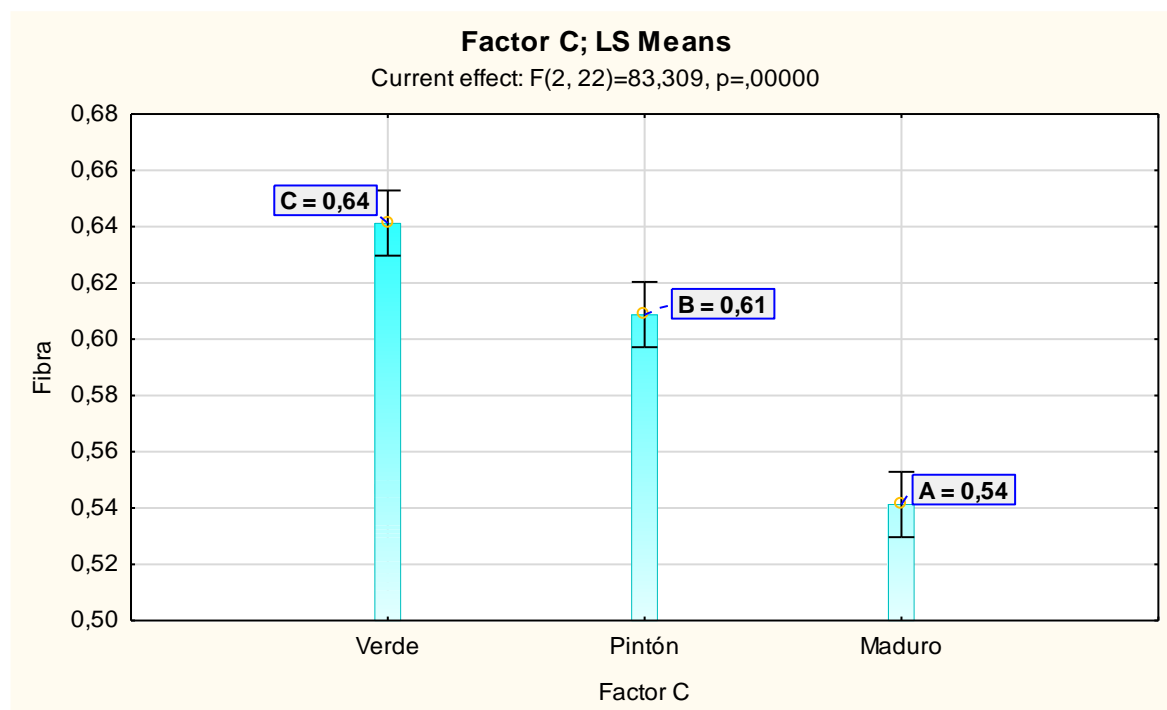
Nota: Esta tabla muestra los resultados de las cenizas que presentaron diferencia significativa conforme al estado fisiológico (verde, pintón y maduro).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 8 se puede identificar valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que demuestran las diferencias significativas halladas en: cenizas, donde se obtuvo un porcentaje mayor para los pepinillos verdes (9,72%), seguida por los pintones (9,15%) y maduros (9%).

Figura 9

Comportamiento de la fibra con respecto al factor C (Estado fisiológico: verde, pintón y maduro)



Nota: Análisis de los resultados de la fibra que presentó diferencia significativa conforme al estado fisiológico de los pepinillos encurtidos (verde, pintón y maduro).

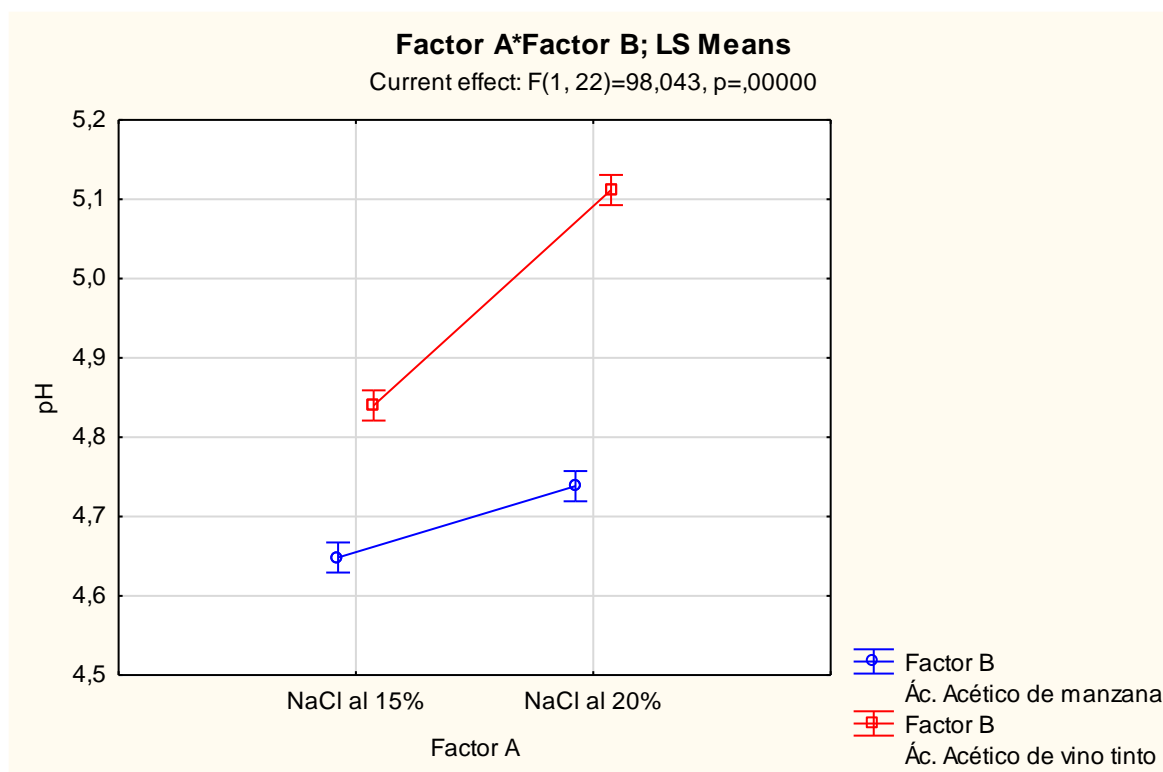
Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 9, se puede identificar valores conforme a Tukey ($p < 0.05$), que demuestran las diferencias significativas halladas en: fibra, donde se obtuvo un porcentaje mayor para los pepinillos verdes (9,72%), seguida por los pintones (9,15%) y maduros (9%).

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la interacción: AxB (Concentración*Ácidos).

Figura 10

Comportamiento del pH con respecto a la interacción A*B (Concentración: NaCl al 15% y 20% y Ácidos: de manzana y vino tinto).



Nota: Esta gráfica muestra los resultados de la variable pH que presentaron diferencia significativa conforme a la interacción AxB (Concentración*Ácidos).

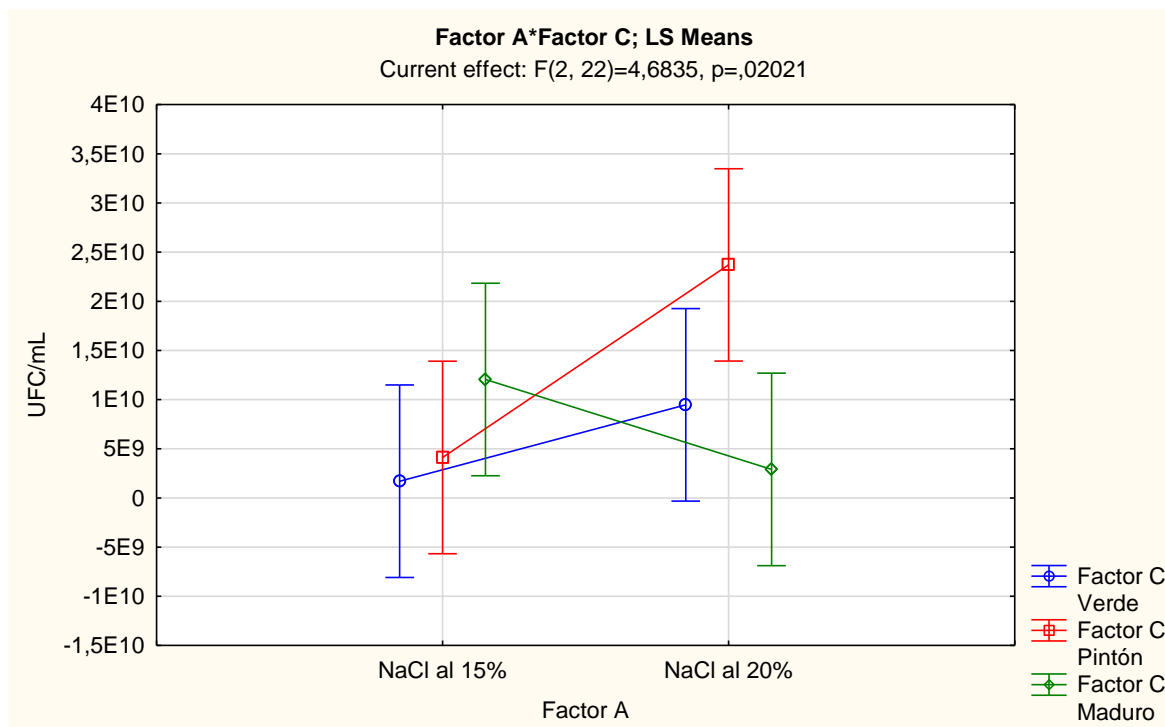
Elaborado por: Guevara, L (2021).

La figura 10 presenta los valores de Tukey ($p < 0.05$), que demuestran las diferencias significativas en: pH con el resultado más alto en NaCl al 20% + Ácido acético de vino tinto (5,11) seguido por NaCl al 15% + Ácido acético de vino tinto (4,84) continuando con NaCl al 20% + Ácido acético de manzana (4,74) y finalmente NaCl al 20% + Ácido Acético de manzana (4,65).

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la interacción: AxC (Concentración*Estado fisiológico).

Figura 11

Comportamiento de las bacterias (UFC/ml) con respecto a la interacción AxC (Concentración: NaCl al 15% y 20% y Estado fisiológico: verde, pintón y maduro).



Nota: Esta gráfica muestra los resultados de la variable bacterias (UFC/ml) que presentaron diferencia significativa conforme a la interacción AxC (Concentración*Estado fisiológico).

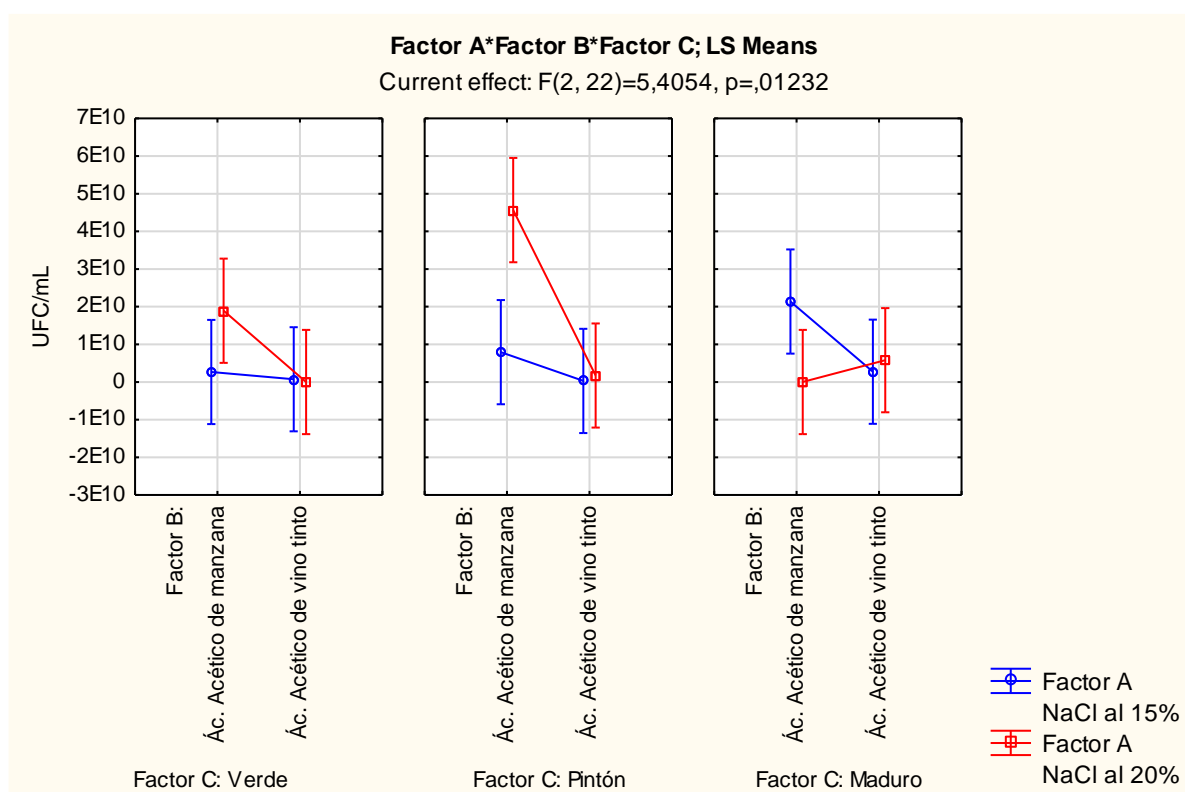
Elaborado por: Guevara, L (2021).

La figura 11 presenta los valores de Tukey ($p < 0,05$), que demuestran las diferencias significativas en: pH con el resultado más alto en NaCl al 20% + Pintón ($2,37E+10$) seguido por NaCl al 15% + Maduro ($1,21E+10$) continuando con NaCl al 20% + Verde ($9,47E+09$), NaCl al 15% + Pintón ($4,12E+09$), NaCl al 20% + Maduro ($2,90E+09$) y finalmente NaCl al 15% + Verde ($1,70E+09$).

Resultados (Tukey $p < 0,05$) del estudio de la interacción: AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico).

Figura 12

Comportamiento de las bacterias (UFC/ml) con respecto a la interacción AxBxC (Concentración: NaCl al 15% y 20%; Ácidos: Sidra de manzana y vino tinto; y Estado fisiológico: verde, pintón y maduro).



Nota: Esta gráfica muestra los resultados en bacterias (UFC/ml) que presentaron diferencia significativa conforme a la interacción AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico).

Elaborado por: Guevara, L (2021).

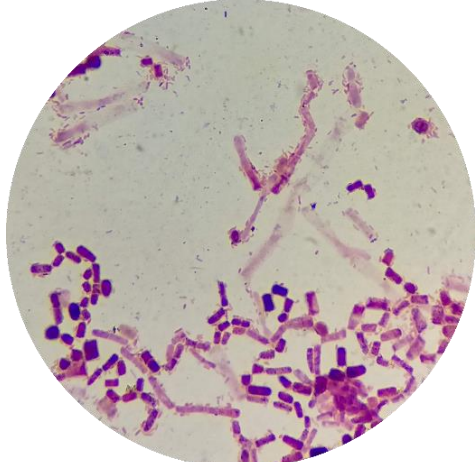
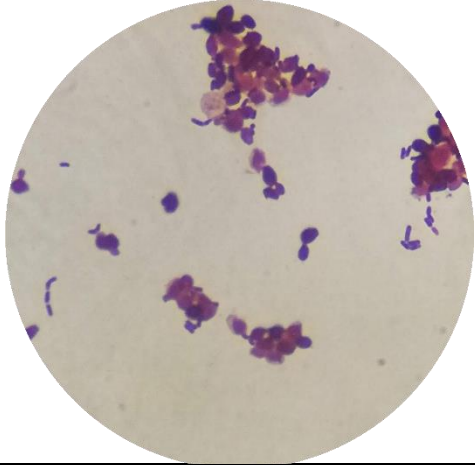
En la figura 13 se muestran los valores de Tukey ($p < 0.05$), que presentaron diferencias significativas en: bacterias (UFC/ml) con el resultado más alto en NaCl al 20% + Ác. Acético de manzana + Pintón ($4,57E+10$) seguido por NaCl al 15% + Ác. Acético de manzana + Maduro ($2,14E+10$); NaCl al 20%

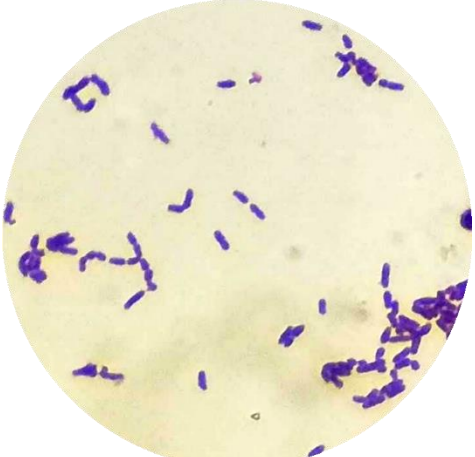
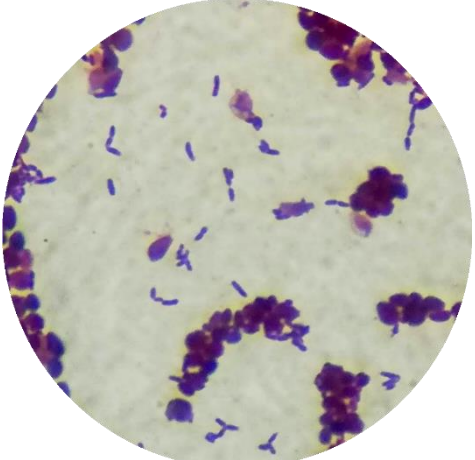
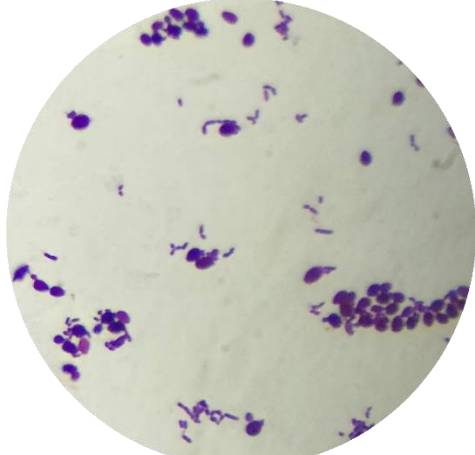
+ Ác. Acético de manzana + Verde (1,89E+10), NaCl al 15% + Ác. Acético de manzana + Pintón (7,93E+09), NaCl al 20% + Ác. Acético de vino tinto + Maduro (5,80E+09), NaCl al 15% + Ác. Acético de vino tinto + Maduro (2,73E+09), NaCl al 15% + Ác. Acético de manzana + Verde (2,67E+09), NaCl al 20% + Ác. Acético de vino tinto + Pintón (1,73E+09), NaCl al 15% + Ác. Acético de vino tinto + Verde (7,33E+08), NaCl al 15% + Ác. Acético de vino tinto + Pintón (3,00E+08), continuando con NaCl al 20% + Ác. Acético de manzana + Maduro (7,30E+06), y concluyendo con NaCl al 20% + Ác. Acético de vino tinto + Verde (6,64E+06) que obtuvo el valor más reducido.

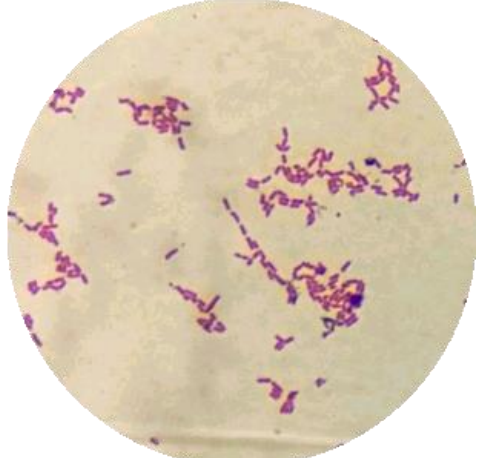
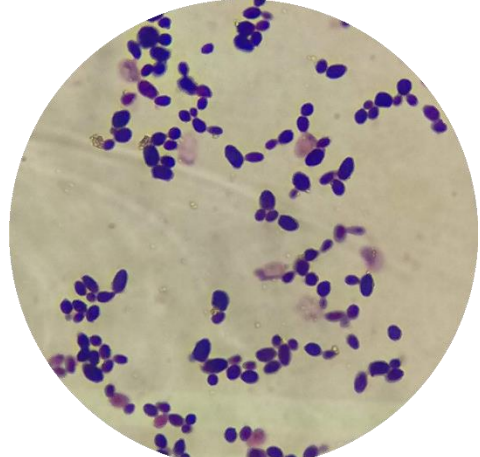
Identificación de las bacterias presentes en los encurtidos de pepinillo

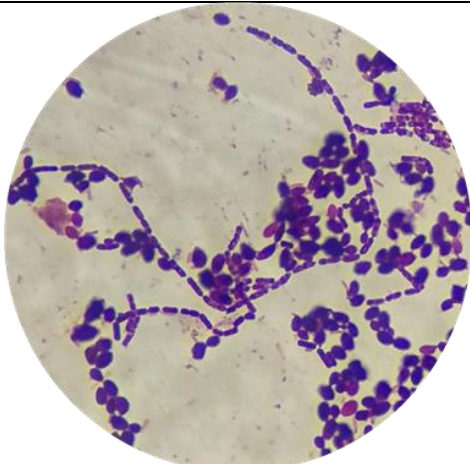
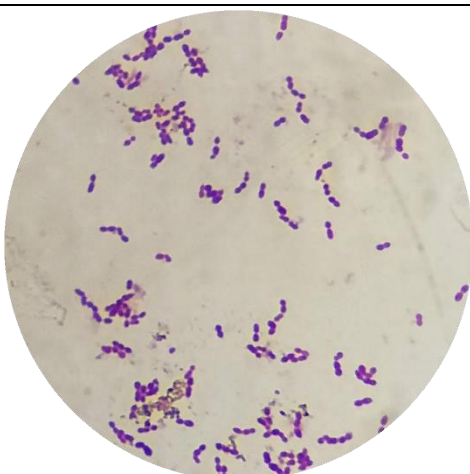
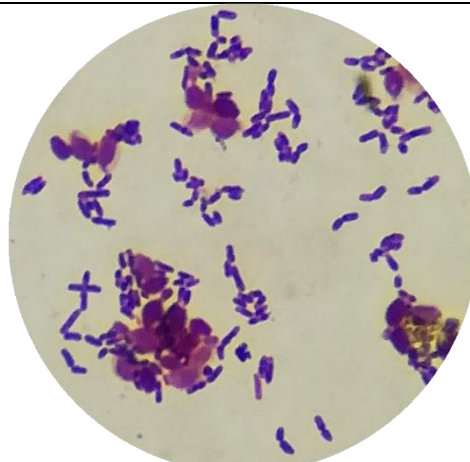
Tabla 38

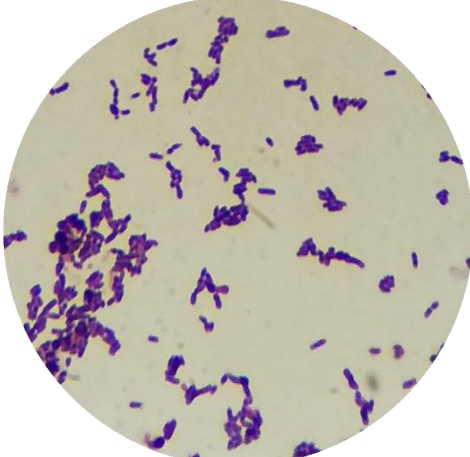
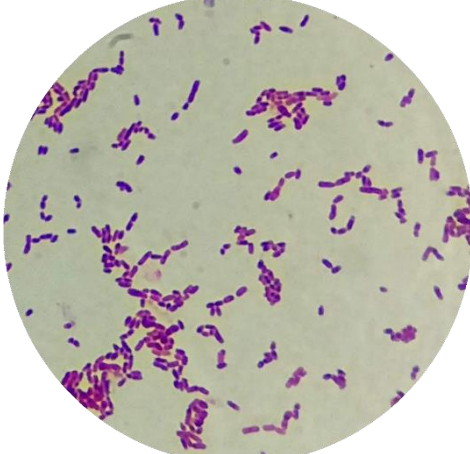
Resultados obtenidos en la identificación microbiológica a través de: Tinción de Gram, catalasa y oxidasa.

Tratamientos y pruebas	Identificación
NaCl al 15% + Ácido acético de manzana + Verde.	Pseudomonas spp.
Bacilos Gram - Catalasa positiva Oxidasa negativa	
NaCl al 15% + Ácido acético de manzana + Pintón.	Lactococcus spp.
Cocos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa	
NaCl al 15% + Ácido acético de manzana + Maduro.	Lactobacillus spp.

<p>Bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	
<p>NaCl al 15% + Ácido acético Tinto + Verde.</p>	<p>Lactococcus spp. y Lactobacillus spp</p>
<p>Cocos y bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	
<p>NaCl al 15% + Ácido acético Tinto + Pintón.</p>	<p>Lactococcus spp y Lactobacillus spp</p>
<p>Cocos y bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	

NaCl al 15% + Ácido acético Tinto + Maduro.	Pseudomonas spp.
Bacilos Gram – Catalasa positiva Oxidasa negativa	
NaCl al 20% + Ácido acético de manzana + Verde.	Staphylococcus aureus
Cocos Gram + Catalasa positiva Oxidasa negativa	
NaCl al 20% + Ácido acético de manzana + Pintón.	Streptococcus aureus y Lactobacillus sp.

<p>Cocos Gram + Catalasa positiva Oxidasa negativa</p>	
<p>NaCl al 20% + Ácido acético de manzana + Maduro.</p>	<p>Lactobacillus spp.</p>
<p>Bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	
<p>NaCl al 20% + Ácido acético Tinto + Verde.</p>	<p>Lactobacillus spp.</p>
<p>Bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	

NaCl al 20% + Ácido acético Tinto + Pintón.	Lactobacillus spp.
<p>Bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	
NaCl al 20% + Ácido acético Tinto + Maduro.	Lactobacillus spp.
<p>Bacilos Gram + Catalasa negativa Oxidasa negativa</p>	

Nota: Esta tabla muestra los resultados obtenidos en la identificación microbiológica a través de: Tinción de Gram, catalasa y oxidasa.

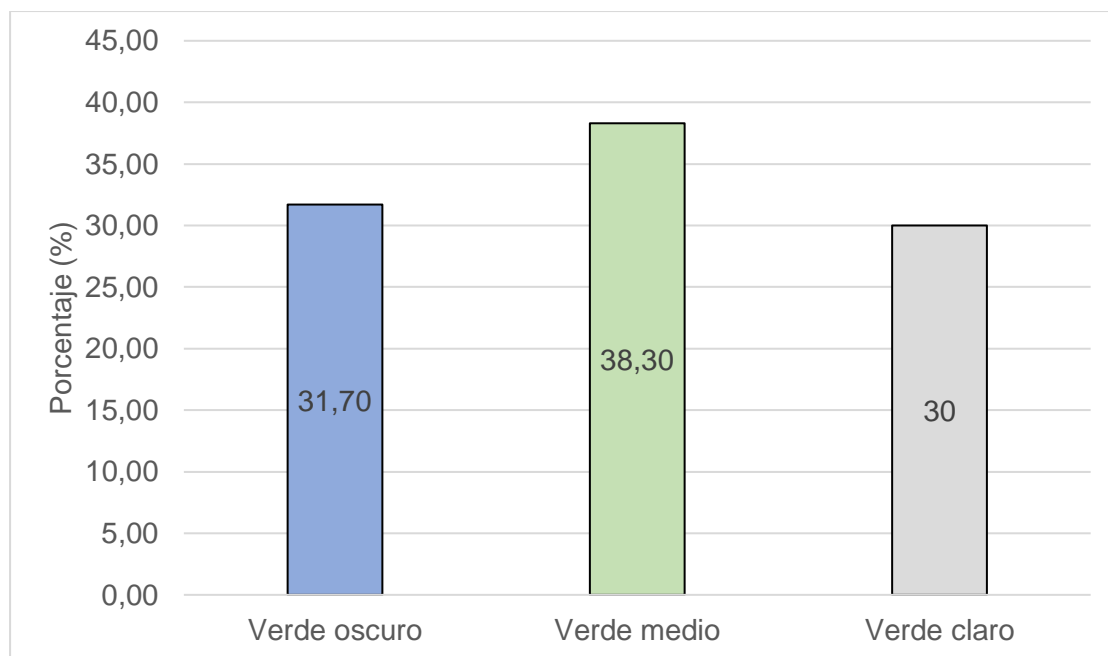
Elaborado por: Guevara, L (2021).

Los resultados reflejados en la tabla 38, se halló una presencia notable de bacilos de naturaleza Gram (+), catalasa negativa y oxidasa negativa; así como también: cocos, Gram (+), catalasa negativa y oxidasa negativa. No obstante, también se hallaron: Bacilos Gram (-), catalasa positiva y oxidasa negativa; y, Cocos, Gram (+), catalasa positiva y oxidasa negativa.

Análisis sensorial

Figura 13

Comportamiento del análisis sensorial referente al color de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.



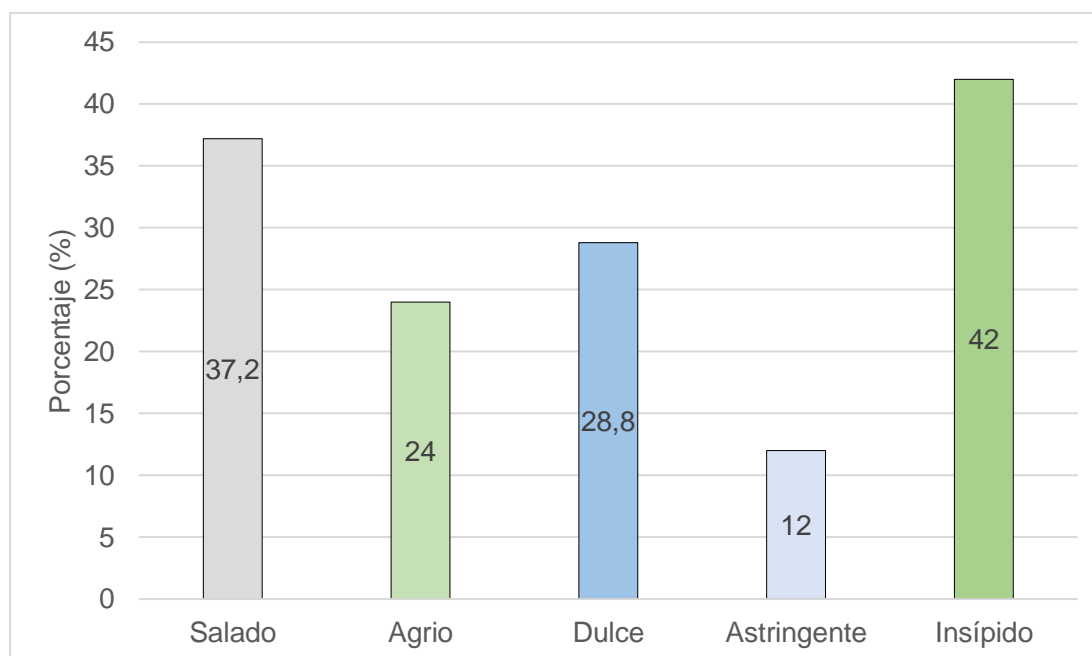
Nota: Esta figura muestra los resultados obtenidos en los tratamientos en cuanto al análisis organoléptico del color de los pepinillos fermentados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En cuanto al color, la mayor parte de los pepinillos de los tratamientos fueron catalogados como verde medio (38,30%); seguido por verde oscuro (31,70%) y verde claro (30%).

Figura 14

Comportamiento del análisis sensorial referente al sabor de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.



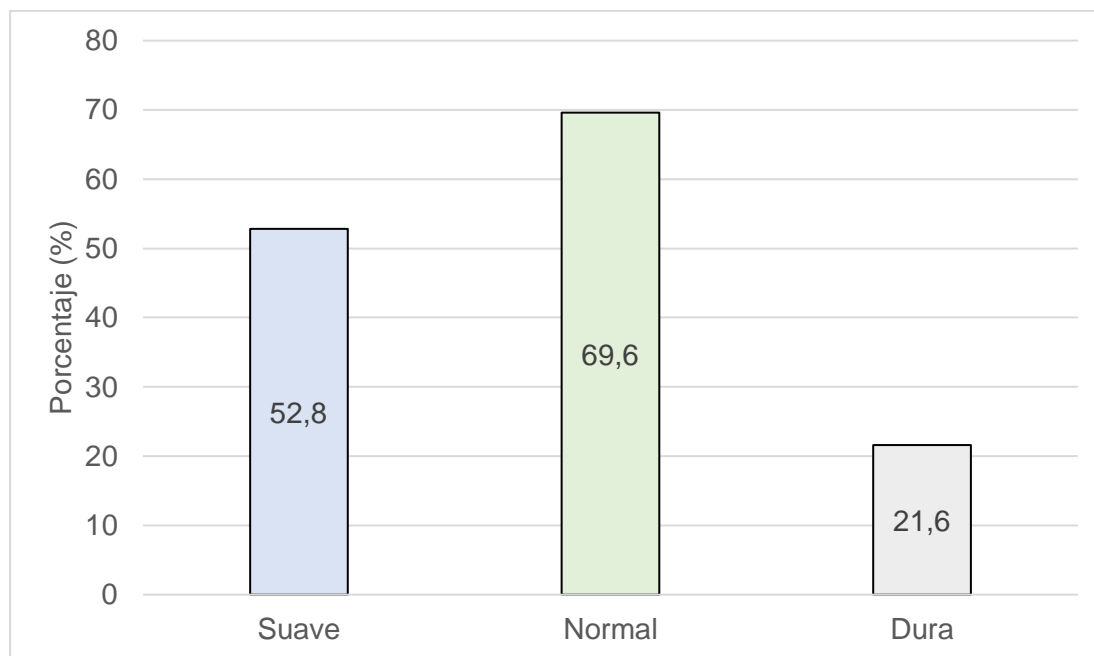
Nota: Esta figura muestra los resultados obtenidos en los tratamientos en cuanto al análisis organoléptico del sabor de los pepinillos fermentados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En la figura 14, se muestra el comportamiento del análisis sensorial con respecto al sabor el que presentó un mayor grado de correspondencia fue el insípido (42%), seguido por salado (37,20%), dulce (28,80%), agrio (24%) y al finalizar con astringente (12%).

Figura 15

Comportamiento del análisis sensorial referente a la textura de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.



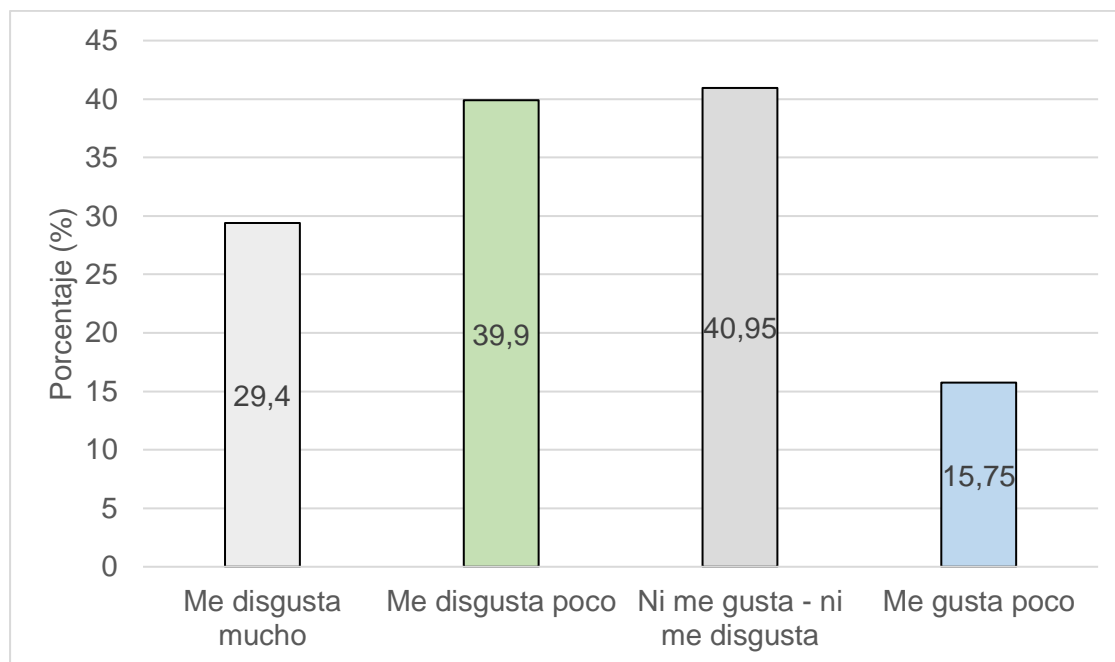
Nota: Esta figura muestra los resultados obtenidos en los tratamientos en cuanto al análisis organoléptico de la textura de los pepinillos fermentados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

La figura 15, presenta los resultados obtenidos en la textura luego del análisis sensorial en los pepinillos fermentados; en cuanto a textura predominó normal con 69,60% seguida por suave con 52,80% y al finalizar dura con 21,60%.

Figura 16

Comportamiento del análisis sensorial referente al olor de los pepinillos fermentados obtenidos en los diferentes tratamientos.



Nota: Esta figura muestra los resultados obtenidos en los tratamientos en cuanto al análisis organoléptico del olor de los pepinillos fermentados.

Elaborado por: Guevara, L (2021).

En cuanto al color, se destacó “Ni me gusta – ni me disgusta” (40,95%), seguido por “Me disgusta poco” (39,90), continuando con “Me disgusta mucho” (29,40%) y finalizando con “Me gusta poco” (15,75%).

Discusiones

Análisis Físico-Químico de los Pepinillos

Conforme a lo expresado por (Jara, 2018); el pepino, por su naturaleza no climatérica, demuestra niveles de °Brix relativamente bajos durante su cosecha. No obstante, (Sandí, 2016) explicó que los grados Brix en esta especie por lo general se encuentran entre 2,2 a 6; valores que abarcan a los determinados durante esta investigación; y, que se diferenciaron por la madurez fisiológica, según lo expresado por (Sandí, 2016) ya que conforme esta avanza, los °Brix, tienden a incrementarse.

En cuanto a acidez titulable, fue posible notar el incremento de este parámetro con el tiempo. Según (Ferrer, 2020) la acidez es un factor atribuible al grado de madurez de las frutas puesto que su aumento se relaciona con el incremento de los niveles de azúcar en las plantas. Hecho que respalda el comportamiento de la variable en este estudio y que además se encuentra dentro de los rangos obtenidos en otros estudios; tal y como lo describe (Moreno, y otros, 2015) en su investigación, donde detallan que se han reportado entre 0,05 a 0,83% de acidez titulable para pepino.

(Uzuazokaro, Okwesili, & Chioma, 2018), hallaron valores de 94,2% en humedad de pepinillos frescos, valor que es relativamente menor al obtenido en esta investigación; no obstante, según (Sade & Onyekwere, 2016) el contenido de humedad se ve reducido por la senescencia de los frutos con la consecuente pérdida de agua, lo que sustenta la reducción de la humedad en los estados fisiológicos donde la maduración avanzó. Además, con el proceso de senescencia también viene la degradación de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectina) que es la principal fuente de fibra en pepino (Prasanna & Mitra, 2020); que por cierto alcanza niveles de alrededor de 1,02 (Uzuazokaro, Okwesili, & Chioma, 2018) en pepino; este elemento, se descompone a través de las poligalacturonasas, (Yang, Yu, Liang, Anderson, & Cao, 2018).

El contenido de cenizas por su parte, permite determinar el contenido de minerales de los productos en investigación; en este caso, los pepinos que se caracterizan por poseer porcentajes cercanos al 1% (Sandí, 2016). (Uzuazokaro, Okwesili, & Chioma, 2018) en su estudio logró determinar 0,94% en pepinillos verdes; mientras que, en este caso, se hallaron valores entre 0,54% y 0,59%.

Factor A (Concentración: NaCl al 15% y 20%).

En encurtidos la función de la sal se basa en mejorar la acción del ácido acético para reducir la actividad del agua y así reducir las condiciones que son favorables para vida de los microorganismos que ponen en riesgo la calidad del producto; además también reduce el porcentaje de oxígeno en agua (Lee, 2012).

Las cenizas en los alimentos, son consideradas como el porcentaje de minerales o residuos orgánicos que resultan tras la incineración de la materia orgánica; las cantidades altas se encuentran relacionadas con las sales, óxidos, fosfatos, carbonatos entre otros (Chicaiza, 2020). (Cuenca, 2013) logró obtener un 29,75% de cenizas con 20% de NaCl y 20,18% con NaCl al 10% en melloco encurtido; sin embargo, los valores alcanzados en la presente investigación no alcanzaron este rango, atribuiblemente por la especie encurtida.

Factor B (Ácidos: sidra de manzana y vino tinto).

Los valores finales de pH en las conservas se vieron reducidos en comparación a los de la fruta previo a la fermentación; sin embargo, se registró una menor disminución con el ácido acético de manzana, esto debido al pH de cada tipo de vinagre (LaMotte, 2021).

Según (Lee, 2012) el equilibrio deseado en conservas de pepinillo se encuentra entre 0,3 a 0,5% de acidez titulable; demostrando que el efecto en la acidez titulable de los ácidos no se encuentra dentro de este rango puesto que se obtuvieron valores de 0,23% en vinagre de manzana y 0,25% en vinagre de vino tinto.

Bajo condiciones de ácido acético de vino tinto se demostró una menor cantidad de hongos; según (Lee, 2012), el ácido acético tiende a ser efectivo contra las películas que forman las levaduras y hongos; aunque se considere deficiente para su control en comparación a otros conservantes; el mismo autor menciona que, el desarrollo de los hongos puede inhibirse bajo concentraciones entre 3,5 a 4%.

Factor C (Estado Fenológico: Verde, Pintón y Maduro).

Varios autores concuerdan con que el porcentaje de cenizas es el resultado de los minerales (Cuenca, 2013) (Roldán, Llanos, García, & Mejía, 2018); sin embargo, en encurtidos el (Codex Stan 115-1981) manifiesta que el porcentaje de materia inorgánica en encurtidos puede variar entre 1,5% hasta 14%; rango en el que se encuentran los valores obtenidos.

Según (Correa, 2018) el cloruro de sodio bajo diferentes concentraciones puede originar cambios de manera distinta en las proteínas, por la penetración en los tejidos. Conforme a (Chicaiza, 2020), el contenido de fibra presentado en frutas y hortalizas está condicionado por la calidad de la cáscara; lo que explica la variación entre los estados fisiológicos; puesto que, las paredes celulares tienden a reducir sus niveles de fibra con el proceso de maduración, debido a la hidrólisis centrada en las cadenas de galacturónidos, lo que se correlaciona con un aumento de las pectinas solubles, haciendo que el fruto se ablande en la maduración (Yang, Yu, Liang, Anderson, & Cao, 2018).

Interacción: AxB (Concentración*Ácido).

Según (Lee, 2012) el ácido acético en combinación con la sal beneficia la conservación en pepinillos; a través de la disminución del pH de la conserva siendo mejorado su efecto a través de la sal que baja la actividad acuosa. Conforme a (Gómez, 2018) los encurtidos deben asegurar un equilibrio de pH que no sea menor a 4,6.

Interacción: AxC (Concentración*Estado fisiológico).

Según (Lee, 2012) las bacterias halofílicas son las que se desarrollan mejor bajo la presencia de sal; existen cepas que pueden tolerar entre 5 a 20% e incluso existen cepas que al ser en extremo halofílicas pueden sobrevivir hasta condiciones con el 30% de sal.

Interacción: AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico).

La lacto fermentación que se produce en los encurtidos se encuentra mediada por cepas de *Lactobacillus* que conservan el alimento; estos microorganismos habitan en la superficie de las plantas, pero mucho tienen que ver con la cercanía de estas al suelo (Palomino & Meza, 2017). Según (Mozzi, 2016) la aparición de las BAL y su proporción dependen del estado de maduración de los vegetales empleados para la fermentación debido a su acidez. La cantidad de bacterias ácido lácticas detectadas por ml varía entre 10^5 a 10^9 según (Rezac, Kok, Heermann, & Hutkins, 2018); dicho valor abarca el obtenido en esta investigación.

Identificación de las Bacterias presentes en los Encurtidos de Pepinillo

Las bacterias ácido lácticas corresponden a un grupo diverso de bacterias homofermentativas Gram+, anaerobias-aerotolerantes y productoras de ácido láctico; donde se destaca el género *Lactobacillus* (Behera, Ray, & Zdolec, 2018) *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pedococcus*, y *Vagococcus* quienes además poseen la enzima aldolasa (Santolaya, 2016).

Sin embargo, también existen otros géneros fermentadores como algunos *Lactobacillus*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y *Weisella* aunque también es posible hallar géneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacterias*, entre otras que producen problemas en las características organolépticas produciendo olores y sabores y colores, desagradables; *Pseudomonas* por ejemplo se caracteriza por generar colores rosáceos en fermentos (Santolaya, 2016).

Lactobacillus plantarum es la especie con mayor presencia en vegetales fermentados, posee catalasa y oxidasa negativa con una cantidad considerable de levaduras fermentadas; esto ocurre debido a su capacidad para resistir el alto contenido de salinidad y acidez en la fermentación de aceitunas, pepinos y chucrut (Behera, Ray, & Zdolec, 2018).

Staphylococcus aureus, es un bacilo Gram (+), con catalasa positiva y oxidasa negativa; puede encontrarse en pares de cocos, cadenas cortas o racimos. Se considera no móvil y es uno de los principales microorganismos relacionados con la contaminación de productos fermentados; de tal manera que se ha hallado contaminación en encurtidos con un 13,33% de *Staphylococcus aureus* (Mendez & Molina, 2018).

Análisis Sensorial

Conforme a (Loardo, 2018) uno de los efectos de la salmuera es la afectación en la apariencia (color) y textura de las hortalizas.

(Fuentes H. , 2015), expresó que el sabor es una percepción que se determina a través de las sensaciones químicas que detecta el sentido del gusto y el olfato; siendo el 80% de estas procedentes del olfato.

(Vargas, 2017) manifestó que, la textura puede ser alterada cuando se somete a factores que intervienen en su estructura; tales como: el calor, o la calidad de la materia prima utilizada.

Cabe recalcar que según (Zeballos, 2016), el olor no es una constante, puesto que puede reducirse rápidamente cómo una especie de adaptación

Capítulo V

Conclusiones

Análisis Físico-Químico de los Pepinillos

Se determinó mayor cantidad de sólidos solubles, pH, fibra, humedad y cenizas en los pepinillos verdes. Mientras que, en acidez titulable, el mayor porcentaje se halló en pepinillos maduros. Por lo cual se pudo notar el deterioro de las características físico-químicas del pepinillo con respecto a la edad fisiológica.

Factor A (Concentración de NaCl: 15% y 20%)

Las concentraciones de NaCl al 15% y 20% no influyeron sobre °Brix, acidez titulable, fibra, humedad; sin embargo, demostraron incrementar el porcentaje de ceniza debido a su naturaleza mineral, por lo que se considera que ejercen cambios en la conservación de pepinillo.

Sin embargo, en cuanto a bacterias (UFC/ml) ninguna de las concentraciones tuvo efecto; por lo que se concluye que las concentraciones no influyeron sobre la identificación de bacterias ácido lácticas.

Factor B (Ácidos: de Manzana y Vino Tinto)

En los tipos de ácidos utilizados no se pudo encontrar diferencias significativas en cuanto a las variables: °Brix, cenizas, fibra y humedad. Sin embargo, en la variable pH se pudo hallar mayor porcentaje en ácido acético de manzana (4,98) sobre el ácido acético de vino tinto (4,69); por otra parte, la acidez titulable demostró ser mayor en el ácido acético de vino tinto (0,25%) que en el ácido de manzana (0,23%). Por lo cual, se concluye que los ácidos sí influyen sobre la conservación de pepinillos.

Mientras que, en hongos (UFC/ml) se encontraron poblaciones más significantes con el ácido de manzana ($2,12E+08$) que con el ácido de vino tinto ($2,08E+07$). Por lo cual se concluye que no existió variación debido al pH de cada ácido, demostrando que existe un control más deficiente con el ácido

acético de manzana. Lo que indica que el mejor ácido para el control de hongos es el ácido acético de vino tinto; lo que contribuye en la calidad de las conservas, pero no sobre la identificación de bacterias ácido lácticas.

Factor C (Estado fisiológico: Verde, Pintón y Maduro)

Con respecto a este factor, no se presentaron diferencias significativas conforme a las variables, °Brix, acidez titulable, humedad, bacterias (UFC/ml) y hongos (UFC/ml). En cuanto a pH, el más alcalino fue el estado verde (5,08), y el menor el maduro (4,75). Al igual que en cenizas donde en estado verde (9,72%) y pintón (9,16%) existió un contenido más elevado que en maduro (9%). En fibra, ocurrió lo mismo: verde (0,64%), pintón (0,61%) y maduro (0,54%).

Demostrando así que los estados fisiológicos influyen sobre las características físico-químicas ya que, a mayor edad, más degradación se produce en el producto final. Sin embargo, los estados fisiológicos por sí solos, no ejercen efectos sobre la identificación de las BAL.

Interacción AxB (Concentración*Ácidos)

La única interacción que se presentó en este caso fue en la variable pH donde la cantidad más alta se encontró en NaCl al 20% + ác. acético de vino tinto (4,93) por lo cual se considera que la sal contribuyó con el incremento de pH en esta interacción.

Interacción AxC (Concentración*Estado fisiológico)

En la variable bacterias se demostró una interacción significativa; donde el valor más alto se encontró con NaCl al 20% + Pintón ($2,37E+10$) mientras que la menor población se presentó en NaCl al 15% + Verde ($1,70E+09$) demostrando así que las bacterias halladas en los encurtidos pueden sobrevivir en altas concentraciones dentro de estos rangos de NaCl debido a su naturaleza haliofílica.

Interacción AxBxC (Concentración*Ácidos*Estado fisiológico)

El mejor tratamiento para identificación de bacterias ácido lácticas fue: NaCl al 20% + Ác. Acético de manzana + Pintón puesto que demostró una cantidad de $4,57E+10$ UFC/ml.

Identificación de bacterias presentes en los encurtidos de pepinillo

En la mayor parte de los tratamientos se hallaron Lactobacillus y Lactococcus que son bacterias ácido lácticas; con una mínima proporción de bacterias como Pseudomonas y Streptococcus, que se relacionan con una fermentación deficiente ya que degradan las características del producto final.

Análisis sensorial

En cuanto a color, la mayoría de los pepinillos fueron catalogados de color verde medio; lo que demuestra el efecto de la concentración de sal a nivel exterior; mientras que, con respecto al sabor, en su mayoría lo definieron como insípido, debido probablemente a las concentraciones de sal y el tamaño de los pepinos utilizados. En cuanto a textura, un gran porcentaje diversificó a los pepinillos como normal y otros los distinguieron como suaves, lo que probablemente con certeza se debió al estado fisiológico de la materia prima utilizada. Y finalmente en cuanto a olor, la mayoría definió el olor como una característica bastante variable por lo cual se determinó que este no fue constante.

Recomendaciones

Es necesario implementar estudios conforme a las concentraciones de salado y el tamaño de los frutos.

Es recomendable emplear vinagre de vino tinto como método de control para hongos.

No es recomendable utilizar pepinillos pintones o maduros para la elaboración de conservas; puesto que, sus características organolépticas no son las más aceptadas por los consumidores.

Sin embargo, para la identificación de BAL, los pepinillos pintones se recomienda utilizar pepinillos pintones y ácido acético de manzana.

Debido a que *L. plantarum* se encuentra a menudo en frutos que crecen cercanos al suelo; es recomendable estudiar otras hortalizas de porte pequeño para la identificación de BAL.

Para evitar la presencia de microorganismos que puedan afectar la calidad de las conservas, es necesario aplicar el método de vacío procurando reducir el oxígeno al mínimo dentro del producto.

Se considera que este estudio deja cimentados los principios para futuras investigaciones relacionadas con la obtención y perpetuación de BAL enfocadas hacia la producción de bacteriocinas.

La elaboración de conservas es también un método eficiente para la conservación de vegetales que son sobre producidos y a menudo desechados.

Capítulo VI

Bibliografía

- Abdel, E., Faisal, M., Alatar, A., Saquib, Q., & Alwathnami, H. (2020). Comparative Analysis between Wild and Cultivated Cucumbers Reveals Transcriptional Changes during Domestication Process. *Plants*, 2-15.
- Alegre, I., Abadías, M., Colás, P., Collazo, C., & Viñas, I. (2020). Bioconservación frente a patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Seguridad alimentaria*.
- Álvarez, N., & Guevara, D. (2020). *Estudio de la cinética del crecimiento en el proceso fermentativo de abacá (Musa textilis) para la bioconservación y la producción de alcohol con fines industriales*. Santo Domingo : Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Behera, S., Ray, R., & Zdolec, N. (2018). Lactobacillus plantarum with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed Research International*, <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>.
- Cabezas, F. (2016). *Evaluación de dos variedades de pepino (Cucumis sativus L.) cultivadas en hidroponía con tres dosis de fertilizante foliar bioneat*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Castelli, J. (2018). *Manual de conservas: Recetas caseras para elaborar*. Buenos Aires: Agencia de Extensión Rural del INTA.
- Chicaiza, G. (2020). *Tipificación nutricional de frutos de Sorbus domestica*. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- Codex Stan 115-1981. (s.f.). Norma para pepinos encurtidos.
- Córdova, H. (2019). *Efecto de la inducción magnética del agua de riego, en el desarrollo, producción y rendimiento del cultivo de pepinillo (Cucumis sativus L.), variedad jaguar en la Granja Experimental ECAA*. Ibarra, Ecuador: Pontífica Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

- Correa, H. (2018). *Elaboración de marinado frito de paiche (Arapaima gigas) en salsa de frutos de la selva*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Cuenca, K. (2013). "ELABORACIÓN DE UN ENCURTIDO DE MELLOCO (*Ullucus Tuberosus*) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE SALMUERA Y VINAGRE PARA INCREMENTAR SU CONSUMO, SANTO DOMINGO 2011". . Santo Domingo: Univerisdad Tecnológica Equinoccial.
- Da Costa, R., Voloski, F., Mondadori, R., Duval, E., & Fiorentini, A. (2019). *Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat*. Journal of Food Quality.
- Díaz, R. (2016). *Evaluación del comportamiento fenológico de pepino (Cucumis sativus L.), variedad "Indio" con diferentes porcentajes de compost en invernadero*. Torreón, Coahuila, México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Ferrer, Y. (2020). *Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de almidón de cidrayota (Sechium edule) de la variedad virens levis en la calidad y vida útil de la fresa (Fragaria ananassa)*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.
- Fuentes, E. (2015). *Descripción de la dinámica de absorción nutrimental en el cultivo de pepino (Cucumis sativus L. híbrido Diomede), bajo condiciones de invernadero en el Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía (CEDA), Guatemala, C.A.* Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Fuentes, H. (2015). *PROYECTO PARA LA ELABORACIÓN ARTESANAL DE CINCO VARIEDADES DE ENCURTIDOS CUYO INGREDIENTE PRINCIPAL ES ELMANGO Y FUTURA COMERCIALIZACIÓN*. Quito: UIDE.
- García, J., & Soliz, C. (2016). *Influencia del tutorado y densidad poblacional en el rendimiento del cultivo de pepino H. Diamante*. Calceta: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.
- Gómez, L. (2018). *Perfil de riesgo de aditivos químicos en encurtidos*. Bogotá, Colombia: Unniversidad de La Salle.

- Heredia, P., Hernández, A., González, A., & Vallejo, B. (2017). Bacteriocinas de Bacterias Ácido Lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Asociación Interciencia*, 42(6):-.
- Hurtado, A. (2017). *Cuantificación de bacterias ácido lácticas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en la fermentación controlada de Capsicum frutescens, ají "charapita"*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- INEN 0381. (1986). *Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico dereferencia*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Obtenido de <https://studylib.es/doc/6465588/nte-inen-0381--conservas-vegetales.-determinaci%C3%B3n-de>
- INEN 0389. (1986). *CONSERVAS VEGETALES. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION DEL ION HIDRÓGENO (pH)*. Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización. Obtenido de <https://studylib.es/doc/6913835/nte-inen-0389--conservas-vegetales.-determinaci%C3%B3n-de-la>
- INEN 380. (1985). *INEN 380*. Quito: Norma Técnica Ecuatoriana.
- INEN 401. (1985). *CONSERVAS VEGETALES. DETERMINACIÓN DE CENIZAS*. Quito: Instiuto Ecuatoriano de Normalización.
- Jara, F. (2018). *Efecto del abastecimiento hídrico en ambiente protegido sobre el rendimiento y variables morfofisiológicas de chile (Capsicum annum L.) y pepino (Cucumis sativus L.) en Heredia, Costa Rica*. Heredia, Costa Rica: UNIVERSIDAD NACIONAL.
- Lagunas, S., & Vega, L. (2013). *MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA*. México: Subdirección Académica. Obtenido de http://veterinaria.uaemex.mx/_docs/607_970_MP%20Bacteriolog%C3%ADa%20y%20Micol%C3%ADa.pdf
- LaMotte, S. (27 de Julio de 2021). *CNN*. Obtenido de Los principales beneficios del vinagre de manzana para tu salud, según expertos:

<https://cnnespanol.cnn.com/2021/07/27/beneficios-vinagre-de-manzana-salud-trax/>

- Lee, S. (2012). Seguridad Microbiana de Encurtidos de Frutas y Vegetales y la Tecnología de Barreras. *Mundo Alimentario*, 20-27.
- Loardo, J. (2018). *Conservación de ají charapita (Capsicum frutescens) utilizando tres líquidos de cobertura (Salmuera, agridulce y ácido acético)*. Pucallpa, Perú: Universidad Nacional de Ucayali.
- López, J., Garza, S., Huez, M., Jiménez, J., Rueda, E., & Murillo, B. (2015). Producción de pepino (*Cucumis sativus* L.) en función de la densidad de plantación en condiciones de invernadero. *European Scientific Journal* , 1857-7881.
- López, M. (2017). *Aplicación de bacteriocinas para la bioprotección de alimentos*. Jaén: Universidad de Jaén.
- Masaquiza, P. (2016). *Manejo de población de insectos en pepino (Cucumis sativus L.), bajo principios de producción limpia en el sector La Isla, cantón Cumandá*. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato.
- Mendez, H., & Molina, J. (2018). *Determinación de la calidad microbiológica de Escabeche y encurtido empacado comercializado en los supermercados del Distrito dos del área metropolitana de San Salvador*. San Salvador, Guatemala: Universidad de El Salvador.
- Montaño, N., Gil, J., & Palmares, Y. (2018). Rendimiento de pepino (*Cucumis sativus* L.) en función del tipo de bandeja y la edad de transplante de las plántulas. *Anales Científicos*, 377-385.
- Montero, D. (2016). *Determinación de producción de bacteriocinas a partir de Lactobacillus casei*. Cuenca: Universidad del Azuay.
- Moreno, D., Hernández, B., Barrios, J., Ibáñez, A., Cruz, W., & Berdeja, R. (2015). Calidad poscosecha de frutos de pepino cultivados con diferente solución nutritiva. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3).

- Mozzi, F. (2016). *Lactic Acid Bacteria*. Encyclopedia of Food and Health.
- Nogales, D. (2018). *Estudio del manejo poscosecha de borojó Borojoa patinoi (Cuatrec). Delprete & C.H. Perss mediante la aplicación de tres métodos de conservación en la zona de Santo Domingo de los Tsáchilas*. Santo Domingo: Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.
- Orellana, C. (2019). *Control de plagas en el cultivo de pepino (Cucumis sativus L.), en el cantón Yaguachi*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Palomino, C., & Meza, L. (2017). *Formulación y evaluación de la influencia de la salmuera en la fermentación láctica de tallos de espárragos (Asparagus officinalis L.)*. Arequipa, Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
- Penelo, L. (2019). *Pepino: propiedades, beneficios y valor nutricional*. Madrid: La Vanguardia.
- Prasanna, S., & Mitra, J. (2020). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from Cucumis sativus peels. *Carbohydrate Polymers*, 247(10): 116706.
- Rascón, A. (2016). *Producción de bacteriocinas de bacterias lácticas aisladas de encurtidos*. Universidad de Jaén .
- Rezac, S., Kok, C., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9(1785).
- Roldán, D., Llanos, Y., García, L., & Mejía, F. (2018). Formulación de encurtido a base de cidra sechium edule para la asociación de mujeres ASMUFARE. *UG Ciencia*, 23, 28-39.
- Sade, O., & Onyekwere, U. (2016). Postharvest physicochemical properties of cucumber fruits (Cucumber sativus L) treated with chitosan-lemon grass extracts under different storage durations. *Academic Journals*, 15(50): 2578-2766.
- Sandí, C. (2016). *Crecimiento, producción y absorción nutricional del cultivo de pepino (Cucumis sativus L.) con dos soluciones nutritivas en ambiente protegido en la*

zona de San Carlos, Costa Rica. San Carlos, Costa Rica: Tecnológico de Costa Rica.

- Santolaya, M. (2016). *Análisis microbiológico de diferentes encurtidos*. Jaén: Universidad de Jaén.
- Savitri, M., Kumar, V., Kamuri, A., Angomy, K., & Bhalla, C. (2017). *Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India*. India: Journal Food Science Technology .
- Succi, M., Pannella, G., Tremonte, P., Tipaldi, L., Coppola, R., Lorizzo, M., . . . Sorrentino, E. (2017). Sub-optimal pH preadaptation improves the survival of *Lactobacillus plantarum* strains and the malic acid consumption in wine-like medium. *Frontiers in Microbiology*, 8: 470.
- Sudhanshu, S., Behera, Farag, A., Riadh, H., & Kumar, A. (2020). Traditionally Fermented Pickles: How Is Microbial Diversity Associated With Their Nutritional And Health Benefits? *Functional Food Magazine*.
- Tenorio, M., Aparicio, I., Prádena, J., García, M., Pérez, M., . . . Zapata, M. (2014). *El vino y su análisis*. Madrid: Universidad Complutense.
- Uzuazokaro, M., Okwesili, N., & Chioma, A. (2018). Phytochemical and proximate composition of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit from Nsukka, Nigeria. *Full Length Research Paper*, 17(38): 1215-1219.
- Vaca, G. (2018). *Estudio de la adaptación y rendimiento de 8 variedades de pepinillo (Cucumis sativus L.) bajo invernadero, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Valencia, V. (2020). *Determinación de la capacidad conservante de bacterias ácido-lácticas (Lactobacillus plantarim, Pediococcus acidilactici) y mesófilas (Streptococcus lactis, Streptococcus diacetylactis) aplicadas en salami para evitar el uso de conservantes artificiales*. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.

- Vargas, P. (2017). *Evaluación de la preservación del encurtido de rocoto (Cpasicum pubescens), mediante la utilización de lactosuero ácido como líquido de gobierno*. Puno, Perú: Universidad Nacional del Altiplano.
- Yang, J., Zhang, L., Jiang, H., & He, Z. (2015). *Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Pickled Vegetables from Meishan City*. Meishan: Universidad del Suroeste, Centro de Investigación de Tecnología de Ingeniería de Alimentos.
- Yang, Y., Yu, Y., Liang, Y., Anderson, C., & Cao, J. (2018). A Profusion of Molecular Scissors for Pectins: Classification, Expression, and Functions of Plant Polygalacturonases. *Frontiers Plant Science*, 9(1208).
- Zeballos, G. (2016). *Elaboración de dos tipos de escabeches de Scomber japonicus peruanus caballa para el consumo humano*. Moquegua, Perú: Universidad Nacional de Moquegua.