



Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (Mucílago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*)

Cueva Tipán, Jairo Roberto

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

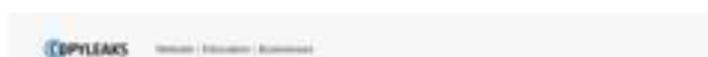
PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

23 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Identical Words	125
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	308
Unlisted Words	4544



Firma:



SUNGEY NAYNEE
 SANCHEZ LLAGUNO

Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD

C.C: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencia de la Vida Y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (*Mucilago*), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*)" fue realizado por el señor Cueva Tipán, Jairo Roberto, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2022

Firma:



SUNGEY NAYNEE
SANCHEZLLAGUNO

Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD

C.C: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencia de la Vida Y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cueva Tipán, Jairo Roberto**, con cédula de ciudadanía n° 2300315302, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (Mucilago), *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*)"** es de mí 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, 23 de agosto del 2022

Firma

Cueva Tipán, Jairo Roberto

C.C.: 2300315302



Departamento de Ciencia de la Vida Y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo/ nosotros **Cueva Tipán, Jairo Roberto**, con cédula de ciudadanía n° 2300315302, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (Mucilago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2022

Firma


Cueva Tipán, Jairo Roberto
C.C.: 2300315302

Dedicatoria

Este trabajo de titulación se lo dedico con todo mi corazón a mi madre querida Sara Tipan, gracias por haberme inculcado el estudio desde la niñez y darme los recursos para terminar mi carrera universitaria.

A mi hermano Andrés Cueva, por su apoyo incondicional, brindarme su sabiduría y consejos durante la elaboración de este escrito.

A mi gran amiga Vaquita, por darme su cariño y estar siempre en los momentos que la necesite.

Jairo

Agradecimiento

Agradezco a cada uno de los docentes por sus enseñanzas, consejos y demostrarme cómo debe ser un gran profesional.

A la empresa café “La Tierrita” y al Dr. Henry Gaibor por colaborar con la donación del mucílago de café.

A mis amigos que he conocido a lo largo de la carrera universitaria, gracias por estar desde el primer nivel compartiendo experiencias y dándome consejos, Asimismo, a mi pareja Angela por brindarme su apoyo, amor y alegría todos los días.

Muchas gracias a todas las personas que me tienen en su corazón y por cuestiones de la vida nos hemos distanciado, pero, que sepan que guardo los mejores recuerdos en mi mente y son importantes para mí.

Jairo

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de auditoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	7
Índice de Tablas.....	13
Índice de Figuras	15
Resumen.....	16
Abstract	17
Capítulo I.....	18
Introducción.....	18
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis	20
Hipótesis para el Factor A (Hortalizas).....	20
Hipótesis para el Factor B (Concentración de solución bacteriana)	20
Capítulo II.....	21
Revisión de Literatura.....	21
Café	21
Variedades.....	22

Mucílago de café	24
Fermentación.....	25
Bioconservación	26
Bacterias ácido lácticas.....	26
Generalidades	26
Taxonomía.....	27
Bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria	28
Características antimicrobianas	29
Identificación molecular	30
La Col	31
Manejo postcosecha.....	32
Enfermedades postcosecha.....	33
La Lechuga.....	33
Manejo postcosecha.....	34
Enfermedades postcosecha.....	35
Capítulo III.....	36
Metodología	36
Ubicación del Área de Investigación.....	36
Ubicación política	36
Ubicación geográfica.....	36
Ubicación ecológica.....	36
Materiales.....	38

	10
Determinación de pH	38
Determinación de Acidez Titulable	38
Determinación de Sólidos Solubles	39
Aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas	39
Enriquecimiento selectivo de las bacterias ácido lácticas.....	40
Bioconservación de las Hortalizas	40
Recuento de poblaciones microbianas.....	41
Métodos	41
Obtención de materia prima.....	41
Fermentación del mucílago de café.....	41
Aislamiento de las bacterias ácido lácticas	42
Identificación microbiana.....	42
Prueba de Tinción Gram	42
Test de catalasa	43
Secuenciación y análisis filogenético.....	43
Bioconservación de las frutas.....	43
Preparación de la solución bacteriana	43
Preparación de las muestras.....	44
Diseño Experimental.....	44
Factores de estudio y niveles	44
Comparación de tratamientos.....	44
Tipo de diseño	45

Repeticiones	45
Análisis estadístico.....	45
Análisis funcional.....	46
Variables evaluadas.....	46
Determinación de pH.....	46
Determinación de Sólidos Solubles (SS).....	46
Determinación de Acidez Titulable.....	46
Determinación de pérdida de peso	47
Recuento microbiano en placas Petrifilm™	48
Análisis sensorial.....	48
Capítulo IV	49
Resultados	49
Caracterización físico-química y microbiológica del mucílago de café.....	49
Identificación de BAL presentes en la fermentación del mucílago de café	50
Análisis de varianza	52
Análisis de varianza para pH.....	52
Análisis de varianza para sólidos solubles	54
Análisis de varianza para acidez titulable.....	56
Análisis de varianza para pérdida de peso.....	58
Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio	59
Resultados del estudio para las hortalizas (Factor A)	59
Resultados del estudio para la variable concentración de solución bacteriana (Factor B) .	61

Prueba de Tukey para las interacciones significativas en la bioconservación	63
Análisis de Tukey en la interacción A*B (Hortaliza*Concentración de solución bacteriana)63	
Análisis microbiológico.....	69
Recuento de aerobios	69
Recuento de mohos y levaduras.....	69
Análisis de conglomerados	70
Análisis de componentes principales.....	71
Análisis sensorial.....	75
Capítulo V	76
Discusión.....	76
Respecto al Factor A (Hortalizas).....	77
Respecto al Factor B (Concentración de solución bacteriana)	78
Respecto a la interacción A*B (Hortalizas* Concentración de solución bacteriana).....	80
Análisis microbiológico.....	82
Capítulo VI	83
Conclusiones.....	83
Factor A (Hortalizas)	83
Factor B (Concentración de solución bacteriana)	84
Respecto a la interacción A*B (Hortalizas* Concentración de solución bacteriana).....	84
Recomendaciones	86
Capítulo VII	87
Bibliografía	87

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica del café.....	21
Tabla 2 Clasificación taxonómica de la col.....	32
Tabla 3 Clasificación taxonómica de la lechuga.....	34
Tabla 4 Recursos utilizados para la determinación de pH.....	38
Tabla 5 Recursos utilizados para la determinación acidez titulable.....	38
Tabla 6 Recursos utilizados para la determinación sólidos solubles.....	39
Tabla 7 Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de café fermentado.....	39
Tabla 8 Recursos necesarios para el enriquecimiento de bacterias ácido lácticas.....	40
Tabla 9 Recursos necesarios para la preparación de la solución probiótica.....	40
Tabla 10 Recursos necesarios para el recuento microbiológico.....	41
Tabla 11 Factores y niveles a probar en el estudio de la bioconservación de col y lechuga con concentraciones diferentes de solución bacteriana.....	44
Tabla 12 Tratamientos a comparar en la bioconservación de hortalizas con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de café.....	44
Tabla 13 Esquema de análisis de varianza para el estudio de la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucílago de café.....	45
Tabla 14 Caracterización físico-química del mucílago de café puro y fermentado.....	49
Tabla 15 Resultados de pruebas microbiológicas de identificación bacteriana.....	50
Tabla 16 Análisis de varianza para pH en el día 0 de bioconservación.....	52
Tabla 17 Análisis de varianza para pH en el día 5 de bioconservación.....	53
Tabla 18 Análisis de varianza para pH en el día 10 de bioconservación.....	53
Tabla 19 Análisis de varianza para sólidos solubles en el día 0 de bioconservación.....	54
Tabla 20 Análisis de varianza para sólidos solubles en el día 5 de bioconservación.....	55
Tabla 21 Análisis de varianza para sólidos solubles en el día 10 de bioconservación.....	55

Tabla 22 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 0 de bioconservación	56
Tabla 23 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 5 de bioconservación	57
Tabla 24 Análisis de varianza para acidez titulable en el día 10 de bioconservación	57
Tabla 25 Análisis de varianza para pérdida de peso en el día 5 de bioconservación	58
Tabla 26 Análisis de varianza para pérdida de peso en el día 10 de bioconservación	59
Tabla 27 Resultados del análisis Tukey para el factor A en las variables físico-químicas	59
Tabla 28 Resultados del análisis Tukey para el factor B en las variables físico-químicas	61
Tabla 29 Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico químicas del día 0	63
Tabla 30 Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico químicas del día 5	64
Tabla 31 Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico químicas del día 10	64
Tabla 32 Resultados del conteo de colonias en aerobios (UFC/mL) durante el día 5 y 10	69
Tabla 33 Resultados del conteo de colonias en mohos y levaduras (UFC/mL) durante el día 5 y 10	69
Tabla 34 Matriz de correlación de componentes principales	71
Tabla 35 Matriz de componentes	72
Tabla 36 Porcentaje de varianza total explicada	72
Tabla 37 Análisis sensoriales de las hortalizas bioconservadas con diferentes concentraciones de solución bacteriana durante 10 días	75

Índice de Figuras

Figura 1 Composición química del mucílago de café, en base húmeda	25
Figura 2 Ubicación geográfica del lugar de estudio	37
Figura 3 Árbol filogenético elaborada a partir de las secuencias 16S ARNr de las bacterias ácido lácticas.....	51
Figura 4 Estudio del efecto de las hortalizas (Factor A) en las variables de estudio	60
Figura 5 Estudio del efecto de la concentración de la solución BAL (Factor B) en las variables de estudio.....	62
Figura 6 Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pH.....	65
Figura 7 Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable sólidos solubles	66
Figura 8 Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable acidez titulable	67
Figura 9 Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pérdida de peso	68
Figura 10 Dendrograma para los factores de estudio.....	70
Figura 11 Gráfica de sedimentación.....	73
Figura 12 Gráfica de componentes principales.....	74

Resumen

La producción de hortalizas tiene un gran impacto económico en el Ecuador, estos tienen un lapso de vida corta y son propensos a padecer infecciones por parte de bacterias y hongos, resultando en pérdidas para los comerciantes. Las BAL son microorganismos que habitualmente se los puede encontrar en vegetales, frutas y cárnicos, esto luego de una fermentación. Entre los beneficios de las bacterias ácido lácticas tenemos sus características de bioconservación de alimentos. Esta investigación fue realizada en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. La materia prima utilizada fue el mucílago de café el cual se lo fermento durante 72 horas, para posterior ser cultivado y aislado en medio MRS agar y caldo MRS. Se aplicó un diseño de experimentos el cual se basó en un modelo bifactorial (Hortalizas: Lechuga y Col; Concentraciones de solución bacteriana: 1% y 2%) con bloque completamente al azar, con 4 tratamientos y 4 réplicas; usando la prueba Tukey ($p < 0,05$) para la separación de medias. La bacteria ácido láctica obtenida del mucílago de café fue *Lactiplantibacillus plantarum*. Se presentaron diferencias significativas en los parámetros físico químicos (pH, sólidos solubles, acidez y pérdida de peso) y microbiológicos. Los tratamiento de Col con solución bacteriana al 2% y Lechuga con solución bacteriana al 1% presentaron mejores resultados en cuanto a pH, acidez y pérdida de peso, asimismo, no presentaron crecimiento de mohos y levaduras.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, mucílago de café, hortalizas, bioconservación.

Abstract

The production of vegetables has a great economic impact in Ecuador, they have a short life span and are prone to infections by bacteria and fungi, resulting in losses for traders. LAB are microorganisms that can usually be found in vegetables, fruits and meats, after fermentation. Among the benefits of lactic acid bacteria are their food biopreservation characteristics. This research was carried out in the facilities of the University of the Armed Forces ESPE, Santo Domingo. The raw material used was coffee mucilage, which was fermented for 72 hours, and then cultivated and isolated in MRS agar medium and MRS broth. A design of experiments was applied based on a bifactorial model (Vegetables: Lettuce and Cabbage; Bacterial solution concentrations: 1% and 2%) with a completely randomized block, with 4 treatments and 4 replicates; using the Tukey test ($p < 0.05$) for the separation of means. The lactic acid bacteria obtained from coffee mucilage was *Lactiplantibacillus plantarum*. There were significant differences in the physical-chemical (pH, soluble solids, acidity and weight loss) and microbiological parameters. The treatment of Cabbage with 2% bacterial solution and Lettuce with 1% bacterial solution showed better results in terms of pH, acidity and weight loss, as well as no growth of molds and yeasts.

Key words: lactic acid bacteria, coffee mucilage, vegetables, biopreservation.

Capítulo I

Introducción

La domesticación del café ha sido uno de los sucesos más importantes del mundo, en el Ecuador, los primeros ejemplares aparecen en 1830, en la provincia de Manabí, donde se empezaron a cultivar café arábigo. Esta ha tenido un impacto destacable para los ecuatorianos en los ámbitos: ambiental, social, económico, institucional y salud humana. En el aspecto económico, nos genera fuente de divisa e ingreso de diferentes franquicias de café, asimismo, ayuda al medio ambiente debido a los sistemas agroforestales que se implementan para los cultivos, conservando así la flora y fauna nativas. El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) ha implementado proyectos que favorecen a los caficultores ecuatorianos y, por último, el consumo de café ayuda a combatir vario tipos trastornos que padecen las familias ecuatorianas como diabetes, daños hepáticos y enfermedades neurodegenerativas (Ponce Vaca et al., 2018).

El Ecuador posee una gran producción cafetera debido a sus diferentes ecosistemas presentes y su ubicación geográfica favorable. Asimismo, posee diversos climas que cambian dependiendo las regiones, es decir, posee diferentes altitudes y temperaturas, debido a la presencia de la Cordillera de los Andes, lo que favorece al cultivo de diferentes variedades de café (Jiménez-Torres, 2015).

Las especies *Coffea canephora* y *Coffea arabica* son los principales cultivos de café que se encuentran en el Ecuador. Los avances tecnológicos y científicos dentro del país han aumentado la productividad de los cultivos de café, por ejemplo, el café arábigo aumentó a 3 toneladas por hectárea y el café robusto a 5 toneladas por hectárea, esto para productores con fincas de alto rendimiento. Pero uno de los principales problemas que presenta el sector cafetero es la baja producción nacional, los bajos costos y la baja aceptación de productos derivados del café (Ponce Vaca et al., 2018).

En el proceso de obtener un café libre de impurezas, se desprenden varios residuos o desperdicios como mucílago o la pulpa, los cuales son utilizados por pocos caficultores para realizar productos, como: café honey, cerveza, vinos, jabones, pasteles, entre otros (León-Serrano et al., 2020). El mucílago de café es un material vegetal viscoso que se encuentra adherido a la superficie del grano de café, este posee diferentes compuestos y bacterias, en donde, las más destacables son las bacterias ácidas lácticas (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011)

Las bacterias ácido lácticas tienen un impacto directo en la bioconservación de alimentos, estas poseen características que ayudan a alargar la vida de productos, inhibir algunos patógenos, atribuir propiedades organolépticas a los alimentos y contribuir a la salud humana. Entre las especies más destacables de BAL tenemos *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus damnosus* y *Leuconostoc mesenteroides* (Muñoz et al., 2011).

Dentro del país existen diferentes vegetales, cárnicos que se comercializan con gran interés, dentro de estos tenemos la col y la lechuga. Ambos vegetales son indispensables en una dieta diaria ya que aportan macronutrientes. Uno de los principales problemas de los comerciantes es la conservación de estos vegetales de interés, porque, en gran parte son contaminadas por patógenos o enfermedades. En los últimos años, se han utilizado métodos químicos que ayuden a evitar estas complicaciones, pero, la no aceptación de los consumidores por el uso de químicos ha disminuido la venta de algunos productos (Guamán et al., 2014).

El uso de las BAL para poder alargar la vida útil de los vegetales es una de las alternativas que se pueden tomar, ya que estas no presentan algún riesgo en la salud humana al consumirlas, dan beneficios al consumidor y logran a mejorar la economía de los

comerciantes. Asimismo, es de fácil obtención, mejora el microbiota intestinal y se puede aplicar a diferentes frutos y cárnicos (Thomas, 2018).

Objetivos

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (Mucílago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*).

Objetivos específicos

Aislar bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación dos variedades de café (Mucílago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*.

Evaluar el efecto de la aplicación de las bacterias ácido lácticas para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*).

Determinar mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos la influencia del bioconservante en las características de la col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*).

Hipótesis

Hipótesis para el Factor A (Hortalizas)

Ho: La especie de hortaliza no influye en la bioconservación de bacterias ácido lácticas.

Ha: La especie de hortaliza influyen en la bioconservación de bacterias ácido lácticas.

Hipótesis para el Factor B (Concentración de solución bacteriana)

Ho: La aplicación de distintas concentraciones de solución bacteriana no incluye en la bioconservación de hortalizas.

Ha: La aplicación de distintas concentraciones de solución bacteriana incluyen en la bioconservación de hortalizas

Capítulo II

Revisión de Literatura

Café

El café es una bebida mundial, su fruto se cultiva comercialmente en cuatro continentes y se consume en todo el mundo (Morris, 2018). Durante los siglos se han reunido diversas leyendas sobre el descubrimiento del café, posiblemente las primeras referencias de su uso se encuentran en el Antiguo testamento, sin embargo, la primera mención escrita del café como tal es de Razes, un médico árabe del siglo X, el cual describió sus propiedades medicinales (Smith, 1985).

Alrededor de 850 d. C., se descubrió la planta de café silvestre (*Coffea arabica*) autóctona de Etiopía y se cultivó en la colonia árabe de Harar y se extendió a la Meca, desde donde fue llevada por peregrinos a otras partes del mundo islámico, posteriormente en África se encontraron otras dos especies de café, *Coffea liberica* y *Coffea canephora* (café robusta) (Smith, 1985).

En Ecuador, se producen las especies de café *C. canephora* y *C. arabica*, el primero se cultiva en la región costa y región amazónica, mientras que el segundo se produce en la región sierra a 1.000 y 1.800 msnm y en la provincia de Manabí en condiciones adecuadas (CEFA, 2022).

Tabla 1

Clasificación taxonómica del café

Reino	Plantae
División	Anthophyta o Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Rubiales

Familia	Rubiaceae
Género	<i>Coffea L</i>
Especie	<i>arabica, canephora, liberica</i>

Nota. Recuperado de (Inglés, 2020).

Variedades

La formación de aromas de los cafés robusta y arábica luego del proceso de tostado es similar, pero se distingue por su concentración, es decir, ambos cafés se distinguen por presentar diferentes características organolépticas finales. Por una parte, el café Arábica posee más contenido de oligosacáridos, trigonelina, ácido clorogénico, ácidos orgánicos y lípidos, mientras que, el robusta presenta valores altos en cafeína y posee mayor cantidad de aminoácidos libres que la variedad arábica. En general, mayores cantidades de aminoácidos en los cerezos del café robusta proporcionan resultados mayores de tostado, pirazinas terrosas y un olor a nuez. El café robusta presenta en su perfil un aroma ahumado, tostado, terrenos y fenólico, asimismo, el triptófano está presente en las semillas del café robusta da como resultado cantidades elevadas de escatol, el cual da características organolépticas indeseables que no están presentes en el café Arábica (Poisson et al., 2017).

Producción y comercio de café

El café es una de las bebidas más populares en el mundo, siendo uno de los productos agrícolas más comercializado en la última década. En la actualidad, más de 70 países producen café, asimismo, el sector cafetero es fuente de empleo de aproximadamente 26 millones de personas (Deshpande et al., 2019). El comercio y producción del café involucra a los países productores de Sudamérica con los consumidores de América del norte y Europa, siendo una pieza importante dentro de la economía global, el consumo y venta de café y productos derivados del mismo, los cuales están relacionados con muchas de las culturas del

mundo. Los frutos de las plantas *Coffea arabica* y *Coffea canephora* son de gran valor, el grano verde sin procesar que se comercializa habitualmente no es superado por el petróleo como fuente de divisa, pero, a medida que el grano de café sea procesado este aumentará significativamente de valor (Dohrn, 2013).

Para poder aumentar la sostenibilidad en la industria del café se debe realizar un enfoque en la producción de café de alta calidad, acompañándose de una certificación que sirva como herramienta para validar el compromiso con la sostenibilidad ambiental, social y económica. Dentro de estas certificaciones existen tres aspectos importantes: comercio justo, orgánico y cultivado bajo sombra. El café que cumpla unos de estos aspectos tendrá más oportunidades de tener alta calidad y ser más caro, en comparación a uno no certificado. La organización internacional del café (OIC), las organizaciones de los países productores y los compradores internacionales de café, opinan que aumentar la producción de café de buena calidad en lugar de producir grandes cantidades de café de baja calidad, tendrá mayor impacto para la estabilidad de los mercados mundiales de café. Esto puede generar un equilibrio en la producción, con precios altos y disminuir la sobreplantación (Dohrn, 2013).

En el Ecuador, la producción de café para el 2019 se estimó en 60 kilogramos por saco, lo cual fue un aumento de un ocho por ciento en comparación del 2018. El aumento de la producción se debe a la recuperación de plantaciones antiguas y sustitución de árboles viejos, pero, la producción del café en el país se viene debilitando hace varios años por falta de inversión en el rejuvenecimiento de las plantaciones y de los nuevos cultivos. Por otra parte, la falta de apoyo por el gobierno, los altos precios internacionales y nacionales han motivado a la producción de café arábigo en el país. Asimismo, los precios de los cafés no se negocian, ya que serían una pérdida para los caficultores ecuatorianos. Otro factor clave en el comercio del café en Ecuador es su falta de competitividad, esto debido a los costos prohibitivos del agua y

electricidad, es decir, los altos salarios a pagar en comparación a otros países vecinos (Sepúlveda et al., 2018).

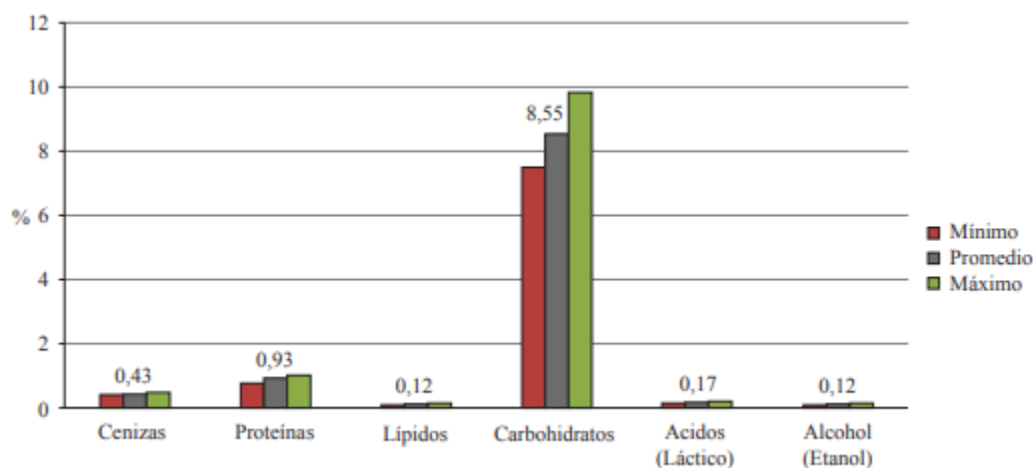
Mucílago de café

El mucílago es un material vegetal viscoso de color blanco, soluble en agua, el cual forma parte de la fibra, una de sus funciones es prevenir la deshidratación (Calle et al., 2021). Su estructura se basa en diferentes polisacáridos, los cuales tiene azúcares de hexosa, pentosa y ácidos uránicos, el cual es secretado por las células de la raíz a medida que ésta desarrolla su raíz por medio del suelo, dando como resultado final un gel (mucílago) que tiene muchas características beneficiosas. Asimismo, los lípidos que poseen mejoran la absorción del agua por parte de la planta, estos aspectos son fundamentales para la sostenibilidad agrícola, mejorar la sanidad vegetal y ambiental (Nazari, 2021).

La producción de mucílago de café depende de las condiciones ambientales, los frutos y la producción de café. El mucílago envuelve a la semilla de café, las cantidades de mucílago en el grano y el fruto dependen del estado de madurez del cerezo, se calcula que los granos despulpados producen un 18,8% de mucílago, esto quiere decir, que por cada tonelada de cerezo de café se puede obtener entre 80 y 140 kilogramos de mucílago, esto dependerá también de factores como: la cantidad de agua utilizada en el proceso de lavado y la madurez del fruto. La composición del mucílago es principalmente de azúcares, sustancias pépticas y agua, asimismo, posee levaduras como: *Candida*, *Saccharomyces* y *Torulopsis*, de igual manera goza de bacterias ácido lácticas, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, entre otros hongos y bacterias. La cantidad de microorganismos presentes en la fermentación del café están relacionados con la composición tanto del cerezo y el mucílago, como también de las condiciones ambientales (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011).

Figura 1

Composición química del mucílago de café, en base húmeda.



Nota. Recuperado de (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011)

Fermentación

La fermentación es un proceso biológico en donde moléculas se transforman en alcohol debido a algunos microorganismos que se encuentran en condiciones anaeróbicas. Los microorganismos usan diferentes sustratos orgánicos, como azúcares, alcoholes, aminoácidos y los convierte en CO₂ y otros productos. Este proceso ocurre dentro de las células microbianas y no necesita ningún estímulo para que ocurra. Uno de los productos que se da es el ATP, pero las vías fermentadoras tienen un agotamiento energético, mientras que, los alcoholes, los ácidos orgánicos de bajo peso molecular son los responsables de determinar la velocidad de otras reacciones metabólicas que se pueden producir durante la fermentación (Schlesinger & Bernhardt, 2020).

En la industria alimentaria el uso de microorganismos fermentadores es necesaria para poder lograr un producto deseable o una bebida fermentada, ya que estas darán cambios favorables en la calidad de los ingredientes de las bebidas y alimentos. Dentro de las fermentaciones en alimentos existen operaciones habituales como la fermentación alcalina, fermentación alcohólica y fermentación de ácido láctico, los cuales se producen en ausencia de

oxígeno. Cuando se producen estas fermentaciones se da la formación de metabolitos antimicrobianos como: alcoholes, bacteriocinas y ácidos orgánicos, que pueden ayudar a mejorar la seguridad del alimento o inhibir patógenos que se puedan producir en los alimentos (Nout, 2014). Por los beneficios químicos y microbianos, el mucílago de café se fermenta de manera natural en condiciones ambientales favorables con temperaturas entre 12 a 34°C. Asimismo, la velocidad de degradación está sujeta al método de fermentación y las temperaturas extrínsecas, estas afectarán directamente al crecimiento y metabolismo de los microorganismos (Puerta-Quintero & Ríos-Arias, 2011)

Bioconservación

La bioconservación es prolongar la vida útil de un alimento o productos, ayuda a mejorar la seguridad de los productos, esto mediante el uso de microorganismos específicos y sus propiedades (Zinoviadou et al., 2016). La bioconservación saca provecho a los procesos antimicrobianos que poseen algunos microorganismos para poder inhibir la propagación de patógenos que puedan causar daño a la salud humana. Su objetivo principal es eliminar o disminuir el uso de químicos en los alimentos, como: cloruro de sodio, nitrito y ácidos orgánicos. La mayoría de investigaciones sobre la bioconservación hacen referencia al uso de bacterias ácidas lácticas por sus actividades antagónicas contra bacterias patógenas, hongos y el impacto que tienen en contra del deterioro de los alimentos (Yost, 2014).

Bacterias ácido lácticas

Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias que se caracterizan por no formar esporas, ser gram positivas, catalasa negativa, pueden estar en forma de cocos o bacilos y producen ácido láctico como resultado de una fermentación (Mozzi, 2016). Forman parte de un gran grupo de diferentes microorganismos aptos para la conservación de alimentos y elaboración de algunos productos. Las BAL de manera habitual se pueden encontrar en

alimentos lácteos fermentados, carne fermentada, cereales fermentados y vegetales fermentados (Mathur et al., 2020).

Los subproductos que se producen por las fermentaciones de las BAL en gran parte ayudan a la salud, protegiendo al sistema de agentes infecciosos, efectos antialérgicos, efectos contra la obesidad, efectos antioxidantes, entre otros. Estudios muestran que el consumo de alimentos fermentados con BAL ayudan a mantener un peso adecuado y el consumo de yogures fermentados producen una baja probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Asimismo, entre los beneficios que brindan los productos lácteos fermentados es ayudar al microbiota intestinal de manera que la proliferación de microbios sea beneficiosa en el intestino o que se agreguen nuevas cepas, por otro lado, el consumo de alimentos fermentados tiene un impacto positivo en las mejoras en el estado de ánimo y funciones cognitivas (Mathur et al., 2020).

Un aspecto que se debe tomar en cuenta es que algunas especies psicrotróficas de las BAL son consideradas patógenas y en los últimos años el uso de BAL como probióticos ha estado en análisis por la seguridad humana, pero, la mayoría de enfermedades asociadas con las BAL son secuelas de otro tipo de dolencia (Narvhus & Axelsson, 2003).

Taxonomía

El uso de herramientas moleculares para determinar la relación entre las BAL con los alimentos ha dado como resultado un cambio en la clasificación de su taxonomía. En 1980, el género *Streptococcus* se dividió en los tres géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*. Entonces, las bacterias ácido lácticas que se asocian con los alimentos incorporan especies de los géneros *Weissella*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, en donde, el género *Lactobacillus* posee el género con más especies (60 especies) de las cuales la mayoría ayudan en los procesos fermentativos (Stiles & Holzapfel, 1997). En la mayoría de

casos, la fisiología y la posición taxonómica de las especies y cepas de estos géneros se analizaron mediante herramientas genéticas y fenotípicas. Los métodos fenotípicos se basan en el uso de las características enzimáticas, bioquímicas y fisiológicas de las bacterias, en donde se incluye un análisis de su pared celular, temperaturas de crecimiento y el análisis de las proteínas citoplasmáticas solubles totales (Klein et al., 1998).

Por otra parte, se han realizado varias modificaciones y se está reorganizando los géneros que no siguen una misma línea de diferenciación morfológica o fenotipo de *Leuconostoc* y *Pediococcus*, ambas filogenéticamente pertenecen a la rama *Actinomyces*. Entonces, estas ya no se consideran en el grupo de bacterias ácido lácticas de manera rigurosa. Asimismo, el nuevo género *Weissella* incluye otro miembro del género *Leuconostoc* (*Leuconostoc paramesenteroides*) el cual presenta puente entre péptido inusuales en el peptidoglicano, por lo que, las diferencias morfológicas y fisiológicas de *Weissella* no benefician a la agrupación de esta especie. En general, la taxonomía y la fisiología de las bacterias ácido lácticas sólo se pueden analizar mediante una taxonomía polifásica, la cual une las características bioquímicas, morfológicas y fisiológicas con técnicas genética y fenotipo (Stiles & Holzapfel, 1997).

Bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria

Las bacterias ácido lácticas pertenecen a un grupo grande de microorganismos seguros y de gran impacto industrial, en donde su principal función es ser usados como cultivos iniciadores, probióticos y prebióticos, asimismo, tiene una gran utilización en el campo de la biotecnología industrial para la biocatálisis y la transformación de materias secundarias en productos de valor agregado. Asimismo, entre las características que estas proporcionan a los alimentos tenemos que ayudan a mejorar su textura, olor, sabor, efectos para la salud y aumento de la vida útil del producto. El mercado global ha presentado un cambio notable en la implementación de las BAL como probióticos, aumentando las ganancias y la demanda de

estos alimentos, de igual manera, el uso de microorganismo en la industria es limitado, pero, la producción de ácido láctico por parte de las BAL se ha convertido en un producto deseado en la industria y en continuo crecimiento económico (Hatti-Kaul et al., 2018).

Las BAL utilizadas en la industria alimentaria en su mayoría pertenece a los productos lácteos (queso, yogur, leches fermentadas), cada uno de estos productos se elaboran con cepas, en donde se escoge la que presente mejores características o mejor adaptada, en las primeras producciones se usaba un fermentación espontánea, la cual era resultante de la microflora presente en la materia prima y su entorno, pero, en la actualidad se usan cultivos iniciadores, con características especiales para cada productos elaborado. El objetivo que tienen las industrias es poder producir productos con características sensoriales y alto valor nutricional que los productos comunes, o incluir cualidades que involucren la salud humana de manera controlada y segura (Thomas, 2018).

Características antimicrobianas

Una de las principales características de las bacterias ácido lácticas es la producción de bacteriocinas, es decir, polipéptidos sintetizados por las bacterias los cuales pueden tener un poder bactericida sobre patógenos. Las bacteriocinas ocasionan la muerte celular al inhibir la biosíntesis de la pared celular o alterar la misma mediante la creación de poros. Entonces, estas se consideran importantes en la industria alimentaria, ya que pueden evitar el daño en los alimentos o inhibir la proliferación de muchos microorganismos dañinos. Una de las bacterias más conocidas es la nisina, esta tiene una gran utilidad en la industria alimentaria, es utilizada como un aditivo alimenticio en aproximadamente 50 países, en productos como el queso procesado, alimentos enlatados y productos lácteos (Thomas, 2018).

Los metabolitos producidos por las BAL pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenos de los géneros *Listeria*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Escherichia*, esto en diferentes rangos, asimismo, los ácidos orgánicos y bacteriocinas presentan actividades antifúngicas y

fungistáticas contra levaduras y hongos como *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*, *Candida parapsilosis* y *Debaryomyces hansenii*, esto debido a la capacidad que presentan las BAL para disminuir las micotoxinas fúngicas, produciendo metabolitos antimicotoxinógenos, de igual forma afectan a las funciones de la membrana celular del patógeno, lo cual hace más permeable a la membrana, pérdida del contenido celular, lisis y la muerte del mismo, estas funciones antimicrobianas son gracias al ácido láctico y al ácido fenilacético (Cizeikiene et al., 2013). En los últimos años, las cepas de las BAL con características especiales se usan para modificar la microbiota intestinal y dañar algunos patógenos bacterianos (Zhang et al., 2021).

Identificación molecular

Para la identificación molecular de las bacterias ácido lácticas de manera usual se emplea la secuenciación de ARN ribosomal 16s, la cual nos permite clasificar e identificar bacterias y arqueas. La comparación de secuencias del gen 16s ARNr se emplea normalmente para analizar relaciones taxonómicas entre cepas procariotas, con un parentesco del 98,65%. Asimismo, es útil para disminuir el tiempo para la identificación de bacterias con lento desarrollo, lo cual permitirá realizar un debido diagnóstico y probar antibióticos contra esta bacteria, pero, esta puede tener varios inconvenientes cuando se presentan secuencias entre especies de *Mycobacterium*, ya que son muy similares entre ellas, por lo que, se recomienda usar métodos alternativos (Kim & Chun, 2014).

En el caso de las especies de BAL *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus paraplantarum*, la identificación no es tan confiable debido a la similitud de secuencias, entonces, el gen 16s ARNr identifica más los géneros y no las especies. El mismo caso aparece en secuencias entre diferentes cepas de *Enterococcus*. La solución puede darse al usar diferentes conjuntos de cebadores para tener un mayor rendimiento en la identificación. Para determinar un parentesco entre secuencias estas deben tener una identidad mayo al 97%

para ser idénticas, un valor menor significa poco parentesco a nivel genómico, por lo que, se puede decir que pertenecen a especies distantes (Caro et al., 2015).

La Col

La col (*Brassica oleracea*) es de origen Mediterráneo, el cual fue domesticado por primera vez en Europa occidental. Es un vegetal con gran impacto mundial, se cultiva en los cinco continentes y en más de 90 países. Se caracteriza por desarrollarse en climas húmedos y frescos, además, puede soportar ambientes fríos. En climas helados, la col se cultiva en otoño o primavera, mientras que, en climas más calientes se cultiva en principios de primavera e invierno. Para la alimentación se cocina como una vegetal verde, en la mayoría de casos se lo conserva como chucrut o escabeche (Moreb et al., 2020)

La col es rica en vitamina C, alta en proteínas y minerales. Su contenido de proteínas está entre un rango de 0,91 a 2,00 g/100g lo cual es considerado bajo, por tal razón, se la combina con otros alimentos ricos en proteína para obtener una excelente ingesta de macronutrientes. Esta posee aminoácidos esenciales como lo son: triptófano, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, treonina, histidina, lisina y valina. Al igual que la gran parte de vegetales la col es bajo en grasas, 100 g de col equivalen a 0,10 g de lípidos, en donde, predominan las grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas. Una característica importante es que no posee trazas de colesterol ni grasas trans, esto mezclado con su contenido de grasas insaturadas, es un vegetal que puede ser utilizado para disminuir los niveles de colesterol total en sangre y lipoproteínas de baja densidad. Por otra parte, la col es rica en fibra y escasa de almidón, por cada 100 g proporciona 2,5 g de fibra dietética, influyendo fibra solubles e insolubles, asimismo, este vegetal puede proporcionar una sensación de saciedad al consumirla (Moreb et al., 2020).

Tabla 2*Clasificación taxonómica de la col*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Capparales
Familia	Brassicaceae
Género	<i>Brassica L.</i>
Especie	<i>Brassica oleracea L.</i>

Nota. Recuperado de (Rochfort & Jones, 2011).

Manejo postcosecha

Para el manejo postcosecha es recomendable conservarla en sitios fríos, pero sin congelarse. Las coles deben ser cosechadas en su madurez para prevenir que se agrieten sus cabezas, asimismo, se debe cortar las cabezas esto con la finalidad de eliminar las hojas sueltas del revestimiento antes de ser almacenadas. Se deben analizar las coles que están con daños por insectos, quemaduras ocasionadas por el sol, daños por congelación y magulladuras, ya que deben ser descartadas o vendidas ya que no es posible su almacenamiento (Agblor & Waterer, 2001).

Para el almacenamiento se deben tomar en cuenta la variedad de las coles y su capacidad de almacenamiento por largos lapsos de tiempo, los cultivos de cabeza densa son los recomendables para conservarlos ya que maduran de manera lenta. Para un almacenamiento prolongado (5-6 meses) se necesita una humedad relativa del 98-10% a una

temperatura de 0°C, adicional a esto, las coles pueden sufrir daños fisiológicos. Estos se caracterizan por la aparición de puntos marrones y rugosos en el envés de las hojas, esto debido a un mal riego durante el periodo de desarrollo. Asimismo, la aparición de manchas negras en las hojas se da en las primeras semanas de almacenamiento y los daños por congelación ocasionan que las hojas se humedezcan, lo que provoca la descomposición de las coles. Estos daños fisiológicos dan como resultado pérdidas económicas, su causa cambia según la variedad y condiciones del cultivo, por lo que, se recomienda utilizar atmósferas controladas para el correcto almacenamiento de las coles (Agblor & Waterer, 2001).

Enfermedades postcosecha

La aparición de enfermedades postcosecha se puede dar por un mal ambiente de almacenamiento. Entre las principales enfermedades que afectan la col tenemos las causadas por *Sclerotinia* y *Botrytis*. Los principales síntomas se presentan en las hojas, estas presentan características oscuras en la parte exterior y avanzan hasta que todo el interior de la cabeza esté infectado, estos signos son visibles a los 3 a 4 meses de almacenamiento. Para poder controlar las enfermedades de almacenamiento se usan: la prevención de heridas, almacenamiento con atmósferas controladas, almacenamiento con temperaturas óptimas y aplicación de fungicidas antes de la cosecha (Agblor & Waterer, 2001).

La Lechuga

La lechuga (*Lactuca sativa L*) es una verdura de hoja, esta se cultiva en la mayoría de continentes, siendo Estados Unidos y Europa los mayores productores y consumidores. De la misma forma existen grandes hectáreas de cultivos en Japón, sureste de Australia, China, Israel, norte de México, Argentina, Chile, Perú y Brasil. La lechuga se caracteriza por poseer un ciclo de vida corto, es autofertil con grandes cantidades de autopolinización natural y es utilizada habitualmente para estudios genéticos, esto debido a que es posible realizar varios cruces en una misma planta, además, no ocupan gran cantidad de espacio en el cultivo. Los

principales inconvenientes son la producción de semillas híbridas y la baja cantidad de semillas producidas por cada polinización, pero, en la mayoría de casos estas dificultades son superadas (Pink & Keane, 1993).

Al consumo de lechuga se le atribuyen varios beneficios para la salud humana, esta contiene vitamina C, contenido alto de fibra y compuesto fenólicos, asimismo, es una rica fuente de vitamina A, betacarotenos, vitamina K, provitamina A, ácido fólico y hierro (Moreno & Fereres, 2012).

Tabla 3

Clasificación taxonómica de la lechuga

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Lactuca</i>
Especie	<i>Lactuca sativa L.</i>

Nota. Recuperado de (Flórez et al., 2012).

Manejo postcosecha

Se debe tener un cuidado en las temperaturas de almacenamiento. El tiempo y la temperatura de almacenamiento postcosecha pueden afectar en los contenidos de fenoles totales, ácido ascórbico y en la actividad antioxidante de la lechuga. Uno de los principales inconvenientes en el procesamiento postcosecha de la lechuga se da por las tasas de

respiración de los cultivares, el cambio de estación y el periodo de tiempo de la postcosecha, en donde, se recomienda usar máquinas especializadas que controlen las condiciones ambientales, esto con la finalidad de evitar pérdidas económicas. Las pérdidas postcosecha se dan entre rangos de 20 a 30%, por el motivo de estrés mecánico cuando se procesan las lechugas, cambiando las propiedades enzimáticas y sustratos, lo que da como resultado daños bioquímicos como: mal sabor, pardeamiento enzimático y amarronamiento de la textura (Patil et al., 2017).

Enfermedades postcosecha

Las enfermedades causadas durante la postcosecha de las lechugas se deben a una previa exposición a patógenos antes de su almacenamiento, asimismo, factores como altas temperaturas y condiciones adversas afectan al vegetal. La quemadura de punta, mancha marrón y costilla rosada son las principales afectaciones fisiológicas que se presentan en la postcosecha. Estas enfermedades se producen por un exceso de CO₂ y etileno, de igual forma, la escasez de calcio en hojas o tejidos promueve la aparición de estos trastornos. Se debe analizar la variedad de la lechuga, ya que los tiempos de descomposición varían dependiendo la especie, ya que algunas variedades presentan tolerancia a niveles altos de etileno y CO₂ (Puri et al., 2019).

La principal enfermedad que afecta a la lechuga durante la postcosecha es la pudrición blanda bacteriana, los síntomas se presencian en las hojas de la lechuga causando una ruptura grave del tejido. El mal almacenamiento y empaquetado puede facilitar a la enfermedad a progresar, asimismo, las condiciones de congelación altas afectan directamente al vegetal. Entre las especies que causan infecciones fúngicas tenemos *Sclerotinia spp* y *Botrytis cinerea*. Para que las lechugas perduren durante largos lapsos de tiempo debemos cortar y almacenar la lechuga a 1°C (Puri et al., 2019).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del Área de Investigación

Ubicación política

País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo

Parroquia: Luz de América

Sector: Km 24 Vía Quevedo

Ubicación geográfica

Para el actual proyecto de titulación se usaron las instalaciones de la Universidad de las fuerzas armadas “ESPE” sede Santo Domingo, específicamente los laboratorios de bromatología y microbiología.

Latitud: 00° 24' 36”

Longitud: 79° 18' 43”

Altitud: 270 msnm

Ubicación ecológica

Ubicación geográfica del lugar de estudio

Zona de vida: Bosque húmedo tropical

Altitud: 224 msnm

Temperatura media: 24.6 ° C

Precipitación: 2860 mm/año

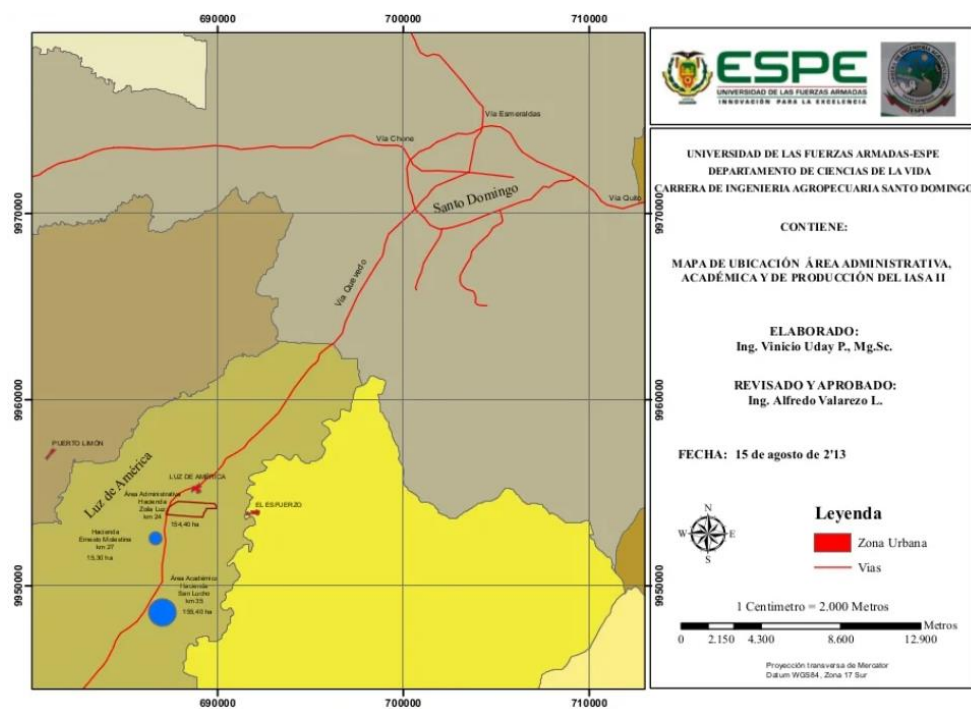
Humedad relativa: 85%

Heliofanía: 680 horas luz/año

Suelos: Francos Arenoso

Figura 2

Ubicación geográfica del lugar de estudio



Materiales

Determinación de pH

Tabla 4

Recursos utilizados para la determinación de pH

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Potenciómetro	Probeta (100mL)	Agua destilada	Mucílago de café
Balanza analítica	Vaso de precipitación (250mL)		Col
	Pipeta (10mL)		Lechuga
	Varilla de vidrio		
	Mortero y pistilo		

Determinación de Acidez Titulable

Tabla 5

Recursos utilizados para la determinación acidez titulable

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Potenciómetro	Probeta (100mL)	Agua destilada	Mucílago de café
Balanza analítica	Vaso de precipitación (250mL)	Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N	Col
Agitador electromagnético	Bureta graduada (25mL)		Lechuga
Kit de titulación	Agitador de vidrio Soporte universal		

Determinación de Sólidos Solubles

Tabla 6

Recursos utilizados para la determinación sólidos solubles

Equipos	Materiales/Insumos	Muestras
Refractómetro	Gotero	Mucílago de café
	Vaso de precipitación (200mL)	Col
	Mortero y pistilo	Lechuga

Aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas

Tabla 7

Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de café fermentado

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Incubadora	Tubos de ensayo	MRS Agar	Fermento
Cámara de flujo laminar	Mechero	Cristal violeta	de
Autoclave	Asa Digrafsky	Lugol	mucílago
			de café
Microscopio	Asa bacteriológica	Alcohol acetona	
Balanza	Placas de Petri	Safranina	
Plancha térmica magnética	Portaobjetos	Aceite de inversión	
	Frascos	Peróxido de	
	autoclavables	Hidrógeno	
	Micropipeta	Agua peptona	
	Parafilm		

Enriquecimiento selectivo de las bacterias ácido lácticas

Tabla 8

Recursos necesarios para el enriquecimiento de bacterias ácido lácticas

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Incubadora	Tubos de ensayo	Caldo MRS	Bacterias aisladas
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica		
Autoclave	Micropipeta		
Balanza	Matraz Erlenmeyer de 500 ml Frasco autoclavables		

Bioconservación de las Hortalizas

Tabla 9

Recursos necesarios para la preparación de la solución probiótica

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Incubadora	Tubos de ensayo	Ácido cítrico	Cultivo
Cámara de flujo laminar	Mechero	Citrato de sodio	enriquecido
Autoclave	Asa bacteriológica		selectivo de BAL
Balanza	Micropipeta		
Potenciómetro	Vaso de precipitación		
Centrífuga	Probeta		
Espectrofotómetro	Atomizador de 1L		

Recuento de poblaciones microbianas

Tabla 10

Recursos necesarios para el recuento microbiológico

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Incubadora	Tubos de ensayo	Agua de peptona	Col
Cámara de flujo laminar	Mechero	Petrifilm	Lechuga
Autoclave	Micropipeta		Cultivo de bacterias ácido lácticas
Balanza	Matraz Erlenmeyer		
Vortex	Vaso de precipitación		
Contador de colonias	Probeta		

Métodos

Obtención de materia prima

El mucílago de café de la variedad arabica fue obtenido de la finca Maputo ubicada en el recinto la Perla de la parroquia Nanegal, mientras que, la variedad robusta fue donada por la empresa “Café La Tierrita”, ubicado en el recinto Placer del Toachi, para ambas variedades se obtuvo 6 litros de mucílago de café.

Por otra parte, las hortalizas fueron adquiridas en el Mercado Municipal de Santo Domingo de los Tsachilas, en donde, se compraron 10 lechugas y coles, respectivamente.

Fermentación del mucílago de café

En primer lugar, con la ayuda de un cedazo se separaron las muestras sólidas del mucílago. Al mucílago de cada variedad se lo colocó en recipientes de plástico y se elaboró un

fermentador con trampa de agua, envolviendo cada recipiente en fundas negras, esto durante 72 horas.

Aislamiento de las bacterias ácido lácticas

En primer lugar, se realizaron los cálculos adecuados para poder preparar el medio suficiente para las placas de Petri. Se preparó agar MRS según lo necesitado y se lo calentó hasta la ebullición, para luego junto a los materiales colocarlos en la autoclave y esterilizarlos. Posteriormente, se desinfectó la cámara de flujo laminar. Para sembrar se realizaron diluciones en serie con agua peptona hasta 10^{-6} en 6 tubos de ensayo previamente llenados con 9ml de agua peptona. Se añadió 1 ml del fermento de café al primer tubo y se prosiguió con las diluciones.

Para sembrar se usó la técnica de extensión, en donde usando la pipeta se tomó 1 ml del tubo con la dilución 10^{-6} y se colocó en la placa de Petri, posteriormente, se usó el asa Digrafsky y mediante un movimiento circular se esparció la muestra. Luego, mediante el uso de Parafilm se selló la caja y se la etiquetó. Finalmente, se incubó la muestra por 48 horas a 37°C .

Identificación microbiana

Prueba de Tinción Gram

Con la ayuda del asa bacteriológica se tomó una pequeña porción de la muestra bacteriológica aislada y se la colocó en una gota de agua destilada, se la esparció hasta que quedó uniforme en el portaobjetos, luego, se usó el mechero para la fijación. Después, se añadió cristal violeta durante 1 minuto, posteriormente, se colocó Lugol por 1 minuto, seguido se esparció el decolorante alcohol-acetona por 15 segundos, finalmente, se añadió safranina durante 30 segundos a 1 minuto, inmediatamente pasado el tiempo con la piseta se choreó el exceso, y se dejó secar (Erkmen, 2021).

Test de catalasa

Se colocó una gota de agua destilada en un portaobjeto, mediante el uso del asa bacteriológica se tomó una muestra de una colonia de la caja Petri y se lo homogeneizó en el portaobjeto. Finalmente, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y se analizó la reacción (Serra et al., 2008).

Secuenciación y análisis filogenético

Se procedió a enviar las cajas de Petri de las muestras aisladas en medio MRS frescas (24horas) a la empresa Macrogen Inc. ubicada en Corea del sur para la secuenciación de ARNr 16S, una vez obtenidos los resultados se usó el programa BLASTn del NCBI para encontrar secuencias homólogas.

Para el análisis filogenético se utilizó el programa MEGA X, usando el algoritmo CrustalW para el alineamiento, por otra parte, la elaboración del árbol filogenético se construyó con el método de Neighbor-Joining, usando una distancia genética de Tamura-Nei con 1000 réplicas de Bootstrap. Se usó *Escherichia coli* como grupo externo.

Bioconservación de las frutas

Preparación de la solución bacteriana

Para la preparación de la solución a bacterias ácido lácticas se usó la metodología presentada por Russo et al., (2014) con algunas modificaciones. Se preparó 55,15 g de caldo MRS en 1 litro de agua destilada, luego, con la ayuda del asa bacteriológica se inoculó la cepa microbiana aislada dentro del matraz Erlenmeyer y se dejó incubando a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se usó el buffer de ácido cítrico-citrato de sodio (pH 3,8) junto con la centrifuga y se lavaron y recuperaron las células, esto hasta que el sobrenadante quedó transparente. Finalmente, se resuspendió en un 1 litro del tampón hasta regular la absorbancia deseada.

Preparación de las muestras

Los vegetales fueron lavados con ácido cítrico al 2%, posteriormente, se usó un atomizador para rociar a las hortalizas con la solución bacteriana. Cada hortaliza fue conservada durante 10 días en condiciones ambientales.

Diseño Experimental

Factores de estudio y niveles

Tabla 11

Factores y niveles a probar en el estudio de la bioconservación de col y lechuga con concentraciones diferentes de solución bacteriana

Factores	Simbología	Niveles
Hortalizas (A)	a ₀	Lechuga
	a ₁	Col
Concentración de solución bacteriana (B)	b ₀	1%
	b ₁	2%

Comparación de tratamientos

Tabla 12

Tratamientos a comparar en la bioconservación de hortalizas con bacterias ácido lácticas provenientes del mucílago de café

N°	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a ₀ b ₀	Lechuga + 1%
T2	a ₀ b ₁	Lechuga + 2%
T3	a ₁ b ₀	Col + 1%

T4

a1b1

Col + 2%

Tipo de diseño

Se aplicó un ANOVA con arreglo factorial AxB (2x2), en donde el factor A son las variedades de mucílago de café y el factor B son las hortalizas.

Repeticiones

El diseño experimental se aplicaron 4 repeticiones por cada tratamiento, obteniendo un total de 16 unidades experimentales.

Análisis estadístico**Tabla 13**

Esquema de análisis de varianza para el estudio de la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucílago de café

Fuente de variación		Grados de libertad
Concentración de solución bacteriana	a-1	1
Hortalizas	b-1	1
Concentración de solución bacteriana x Hortalizas	(a-1) (b-1)	1
Replicas	r-1	3
Error experimental		9
Total		15

Análisis funcional

A las variables que presentaron diferencia significativa en los análisis de varianza se les aplicó una prueba de significancia Tukey ($p < 0,05$) para elegir la mejor decisión.

Variables evaluadas

Determinación de pH

La determinación de pH se realizó tomando en cuenta la norma INEM 389 (1985):

Dentro de un vaso de precipitado se colocó 10 ml o 10 gr de la muestra y se le añadió 100 ml de agua destilada y se homogeneizó. Para medir el pH de la muestra se colocó el potenciómetro dentro del vaso evitando tocar las paredes del mismo, al notar estabilidad se anotó el resultado.

Determinación de Sólidos Solubles (SS)

Para poder determinar los grados brix se utilizó el refractómetro, se colocó una gota de la muestra preparada y se analizó en resultado mediante el ocular del equipo.

Determinación de Acidez Titulable

Para poder determinar la acidez titulable se realizó tomando en cuenta la norma INEN 0381 (1985):

Para muestras líquidas, se tomaron 25 ml de la muestra preparada y se los colocó en un matraz aforado de 250 ml, y se diluyó a volumen con agua destilada.

Por otra parte, para muestras sólidas, se mezcló y suavizó la muestra en un mortero. Luego, se pesó 25 g y se los colocó en un matraz Erlenmeyer con 50 ml de aguas destilada y se homogeneizó, para después llevarlo a baño María por 30 minutos. Finalmente, se pasó la muestra preparada a un matraz aforado de 250 ml y se diluyó a volumen con agua destilada.

Para calcular la acidez, se tomaron 25 ml de la muestra preparada y se lo colocó en un vaso de precipitado de 100 ml y se añadieron los electrodos. Después, mediante el uso de la bureta se añadió hidróxido de sodio 0,1 N hasta llegar a un pH 7, luego de llegar a este punto se adicionaron 4 gotas por vez y se anotó el volumen utilizado y el pH obtenido después de cada adición. Este procedimiento se lo realizó hasta llegar a un pH 8,3.

Usando la interpolación se estableció el volumen exacto de hidróxido de sodio 0,1 N que se utilizó para llegar a un pH de 8,1.

La acidez titulable se midió utilizando la siguiente fórmula:

$$A = \frac{(V_1 N_1 M) 10}{V_2}$$

Siendo:

A = Valor de la acidez en gramos.

V_1 = mL de NaOH usados en la titulación.

N_1 = Normalidad de la solución de NaOH.

M = Peso molar del ácido de referencia. (ácido láctico = 0.090).

V_2 = Volumen en mL o masa en gramos de la muestra tomada para el análisis.

Determinación de pérdida de peso

Para determinar la pérdida de peso, se tomaron datos del peso de cada muestra en los días 0, 5 y 10 y se calculó el resultado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Pérdida de peso}(\%) = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso final}} * 100$$

Recuento microbiano en placas Petrifilm™

Para muestras sólidas se utilizó una licuadora, en donde, se colocaron 25 g de la muestra y 25 ml de agua destilada. Luego, se realizaron soluciones seriadas con agua peptona hasta 10^{-3} para las muestras del día 5 y 10.

Para sembrar en las láminas de petrifilm se utilizaron 1 ml de la muestra preparada y se las diluyó hasta 10^{-3} , posterior, se tomó 1 ml del tubo diluido y se colocó en el petrifilm de manera lenta cuidando que no se provoquen burbujas de aire. Los petrifilm de aerobios se incubaron a 38° por 48 horas y el de mohos y levaduras a temperatura ambiente durante 72°C . Finalizado el tiempo de incubación se contaron las colonias.

Para determinar las unidades formadoras de colonias, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento } \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Inverso del factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado}}$$

Análisis sensorial

Se utilizaron a 10 personas inexpertas y se les realizó una prueba hedónica, en donde se analizaron varios parámetros: olor, color y textura de las hortalizas.

Capítulo IV

Resultados

Caracterización físico-química y microbiológica del mucílago de café

Tabla 14

Caracterización físico-química del mucílago de café puro y fermentado

Parámetro analizado	Unidad	Sin fermentar		Fermentado	
		Arábica	Robusta	Arábica	Robusta
pH		5,4	5,2	3,75	4,01
Acidez titulable	%	0,88	0,55	1,90	1,83
Sólidos solubles	°Bx	14	12	6	7
Bacterias	UFC/mL	-	-	6,1x10 ⁵	5,8x10 ⁵
Hongos y levaduras	UFC/mL	-	-	7,8x10 ⁵	1,2x10 ⁵

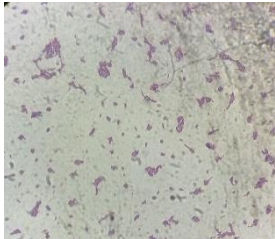
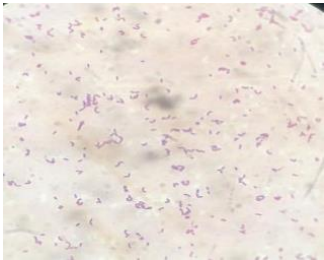
En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en las diferentes pruebas físico-químicas realizadas a las muestras de mucílago de ambas variedades antes y después de la fermentación. Para el mucílago de la variedad Arábica se obtuvo un pH de 5,4, un valor de sólidos solubles de 14 °Bx, acidez 0,88%, por otra parte, luego de 72 horas, sus propiedades cambiaron, se determinó un pH de 3,75, sólidos solubles de 6°Bx, acidez de 1,90% y para el conteo de colonias se analizaron una cantidad de 6,1x10⁵ UFC/mL en aerobios y 7,8x10⁵ UFC/mL para mohos/ levaduras.

Por otra parte, para la muestra de mucílago de la variedad robusta se consiguió un pH de 5,2, sólidos solubles de 12 °Bx, acidez 0,55%, por otro lado, después del lapso de 72 horas, el pH disminuyó a 4,01, sólidos solubles de 7 °Bx, acidez de 1,83% y para la variable microbiológica se obtuvieron 5,8x10⁵ UFC/mL para aerobios y 1,2x10⁵ para mohos/levaduras.

Identificación de BAL presentes en la fermentación del mucílago de café

Tabla 15

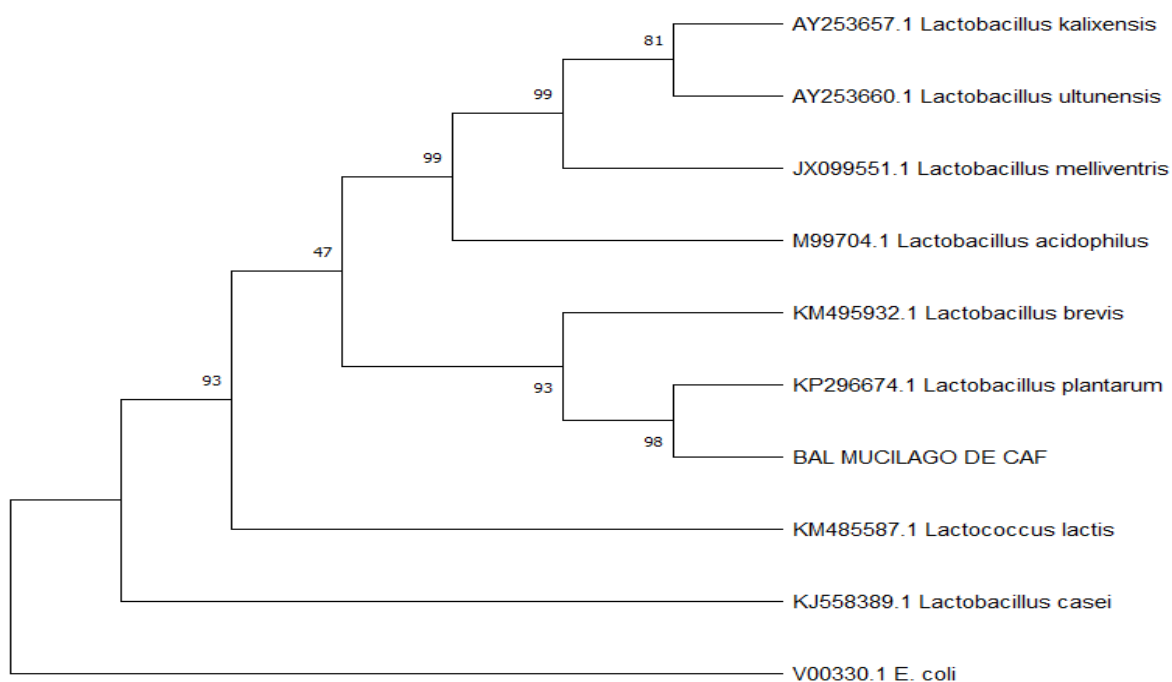
Resultados de pruebas microbiológicas de identificación bacteriana

Origen	Características	Tinción Gran
Café, variedad arábica (cepa 1)	Gran positivo Bacilo Catalasa negativa	
Café, variedad robusta (cepa 2)	Gran positivo Bacilo Catalasa negativa	

En la tabla 15, se muestran los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas a ambas variedades de mucílago de café. De cada muestra aislada se realizó una tinción de gram, la cual se la analizó con el microscopio óptico con el lente de 100x, en donde, se observó bacterias gram positivas, de morfología en forma de bacilo, esto para ambas variedades y cepas respectivamente. Por otra parte, para la prueba de catalasa, ambas cepas dieron negativo.

Figura 3

Árbol filogenético elaborada a partir de las secuencias 16S ARNr de las bacterias ácido lácticas



Nota: Árbol filogenético elaborado con la secuencia del gen 16S ARNr extraída del mucílago de café, usado otras especies de bacterias ácido lácticas. Se usó *Escherichia coli* como grupo externo.

En la figura 3, podemos analizar los resultados y comparación de las secuencias de 16S ARNr de 9 cepas relacionadas y 1 grupo externo. La BAL aislada del café formo un clado con *lactobacillus plantarum* con una similitud >98%. Asimismo, *lactobacillus brevis* presenta una similitud del >93% con las cepas aislada y *lactobacillus plantarum*.

Análisis de varianza

Análisis de varianza para pH

Tabla 16

Análisis de varianza para pH en el día 0 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	0,40	1	0,40	68,75	0,000167
B (Concentración de solución BAL)	0,06	1	0,06	11,00	0,016072
C: Repetición	0,01	3	0,003	0,43	0,668022
INTERACCIONES					
A*B	0,19	1	0,19	32,82	0,001228
RESIDUOS	0,04	9	0,01		
TOTAL	0,70	15			

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable pH en el día 0 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 17*Análisis de varianza para pH en el día 5 de bioconservación*

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	0,018	1	0,018	101,953	0,000055
B (Concentración de solución BAL)	0,114	1	0,114	631,8	0,000000
C: Repetición	0,0001	3	0,00005	0,323	0,735771
INTERACCIONES					
A*B	0,249	1	0,249	1381,34	0,000000
RESIDUOS	0,001	9	0,0001		
TOTAL	0,383	15			

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable pH en el día 5 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 18*Análisis de varianza para pH en el día 10 de bioconservación*

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	0,007	1	0,0075	51,923	0,000362
B (Concentración de solución BAL)	0,051	1	0,0507	350,9	0,000001
C: Repetición	0,0001	3	0,000033	0,230	0,800656
INTERACCIONES					
A*B	0,320	1	0,3201	2216,307	0,000000
Residuos	0,001	9	0,00014		
TOTAL	0,379	15			

En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable pH en el día 10 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Análisis de varianza para sólidos solubles

Tabla 19

Análisis de varianza para sólidos solubles en el día 0 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	2,394	1	2,394	1284,482	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	0,097	1	0,097	52,149	0,000357
C: Repetición	0,006	3	0,0031	1,703	0,259490
INTERACCIONES					
A*B	0,010	1	0,0096	5,168	0,063370
Residuos	0,011	9	0,00186		
TOTAL	2,519	15			

En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 0 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 20

Análisis de varianza para sólidos solubles en el día 5 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	6,5712	1	6,5712	1133,50839	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	7,36333333	1	7,36333333	1270,14854	0,000000
C: Repetición	0,00501666667	3	0,00250833333	0,432678486	0,66752015
INTERACCIONES					
A*B	1,02083333	1	1,02083333	176,090081	0,000011
Residuos	0,0347833333	9	0,00579722222		
TOTAL	14,995	15			

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 5 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 21

Análisis de varianza para sólidos solubles en el día 10 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	15,8240	1	15,8240	14277,32	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	0,62563	1	0,62563	564,481	0,000000
C: Repetición	0,0090	3	0,0045	4,0676	0,076478
INTERACCIONES					
A*B	1,48403	1	1,484	1338,97	0,000000
Residuos	0,0066	9	0,00110		
TOTAL	17,95	15			

En la tabla 21 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 10 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Análisis de varianza para acidez titulable

Tabla 22

Análisis de varianza para acidez titulable en el día 0 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	0,000597	1	0,000598	1424,25	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	0,000151	1	0,00015	361,516	0,000001
C: Repetición	0,0000001	3	0,00000006	0,14010	0,87203
INTERACCIONES					
A*B	0,00155	1	0,0015532	3700,84	0,000000
Residuos	0,0000025	9	0,00000042		
TOTAL	0,002	15			

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 0 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 23*Análisis de varianza para acidez titulable en el día 5 de bioconservación*

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	0,0005073	1	0,000507	214,931	0,000006
B (Concentración de solución BAL)	0,000509	1	0,0005092	215,703	0,000006
C: Repetición	0,0000033	3	0,00000167	0,7072	0,529944
INTERACCIONES					
A*B	0,0000442	1	0,0000442	18,718	0,004948
Residuos	0,0000142	9	0,0000024		
TOTAL	0,001	15			

En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 5 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 24*Análisis de varianza para acidez titulable en el día 10 de bioconservación*

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	0,00138675	1	0,00138675	3840,230	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	0,000030083	1	0,0000301	83,3077	0,000097
C: Repetición	0,0000012	3	0,000000583	1,6154	0,274625
INTERACCIONES					
A*B	0,00012675	1	0,000127	351,00	0,000001
Residuos	0,0000022	9	0,00000036		
TOTAL	0,002	15			

En la tabla 24 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 10 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Análisis de varianza para pérdida de peso

Tabla 25

Análisis de varianza para pérdida de peso en el día 5 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
<i>EFFECTOS PRINCIPALES</i>					
A (Hortalizas)	0,1640	1	0,1640	1891,68856	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	0,0592	1	0,0592	682,920445	0,000000
C: Repetición	0,000078	3	0,00003898	0,449578193	0,6578
<i>INTERACCIONES</i>					
A*B	2,42734303	1	2,42734303	27994,6984	0,000000
Residuos	0,000520	9	0,0000867		
TOTAL	2,651	15			

En la tabla 25 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable pérdida de peso en el día 5 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Tabla 26

Análisis de varianza para pérdida de peso en el día 10 de bioconservación

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A (Hortalizas)	54,784	1	54,7841	346005,053	0,000000
B (Concentración de solución BAL)	22,632	1	22,63	142942,31	0,000000
C: Repetición	0,000117	3	0,000058	0,368	0,706455
INTERACCIONES					
A*B	48,642	1	48,6421	307213,474	0,000000
Residuos	0,00095	9	0,000158		
TOTAL	126,060	15			

En la tabla 26 se muestran los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable pérdida de peso en el día 10 de bioconservación de hortalizas. Se encontró diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), factor B (Concentración de solución BAL) y la interacción A*B, mientras que, las repeticiones no presentaron diferencia significativa.

Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio

Resultados del estudio para las hortalizas (Factor A)

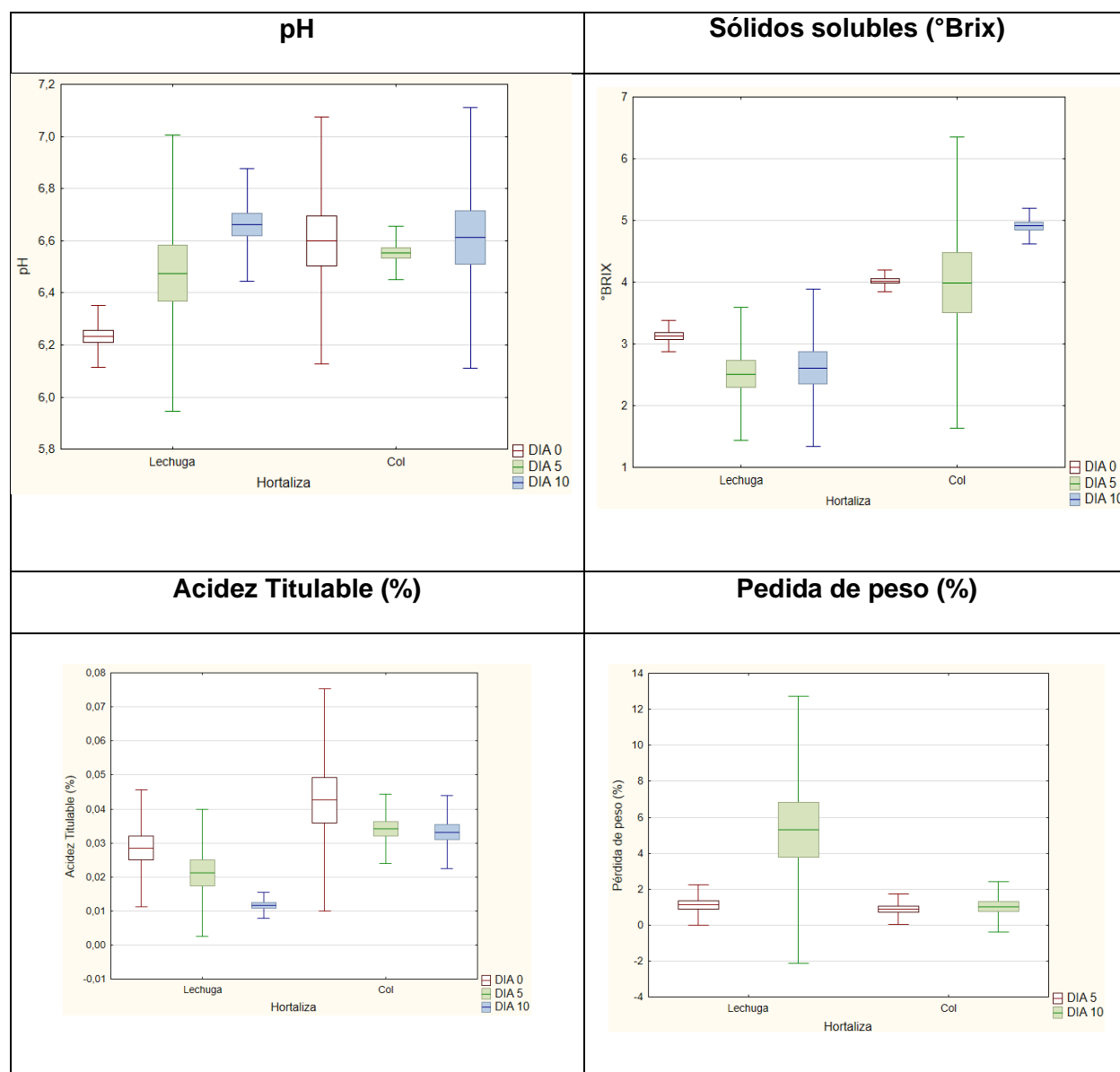
Tabla 27

Resultados del análisis Tukey para el factor A en las variables físico-químicas

Factor A (Hortalizas)	pH			Brix			Acidez			Pérdida de peso	
	Día 0	Día 5	Día 10	Día 0	Día 5	Día 10	Día 0	Día 5	Día 10	Día 5	Día 10
Lechuga	6,2 ^A	6,47 ^A	6,66 ^B	3, 12 ^a	2,51 ^A	2,61 ^A	0,03 ^A	0,02 ^A	0,01 ^A	1,12 ^B	5,3 ^B
Col	6,6 ^B	6,55 ^B	6,61 ^A	4,02 ^B	3,99 ^B	4,91 ^B	0,04 ^B	0,03 ^B	0,03 ^B	0,88 ^A	1,03 ^A

Figura 4

Estudio del efecto de las hortalizas (Factor A) en las variables de estudio



En la tabla 27 se muestra como la col presentó valores mayores que la lechuga en las variables: pH, sólidos solubles y acidez, pero, en la variable pérdida de peso la lechuga obtuvo un mayor resultado. Estos resultados se observaron en los días 0, 5 y 10 del estudio.

El pH de la lechuga aumenta con el transcurso del tiempo de 6,23 a 6,47 al día 5 y 6,66 al día 10. Para la Col el pH se mantuvo hasta el día 5 en 6,60 y aumentó para el día 10 en 6,61.

Los sólidos solubles para la lechuga disminuyeron para el día 5 de 3,12 a 2,51 °Brix, pero, para el día 10 subieron a 2,61 °Brix. Para la col, los sólidos solubles disminuyen de 4,02 a 3,99 °Brix y el día 10 aumentaron a 4,91 °Brix.

Para la acidez titulable, la lechuga presentó un porcentaje de acidez de 0,02% en los días 0 y 5, pero, para el día 10 disminuyeron a 0,01%. Para la col, la acidez paso 0,04% a 0,03% en los días 5 y 10, respectivamente.

La pérdida de peso de la lechuga aumentó de 1,12 a 5,3 % para el día 10. Para la col la pérdida de peso aumentó de 0,88 a 1,03% para el día 10.

Resultados del estudio para la variable concentración de solución bacteriana (Factor B)

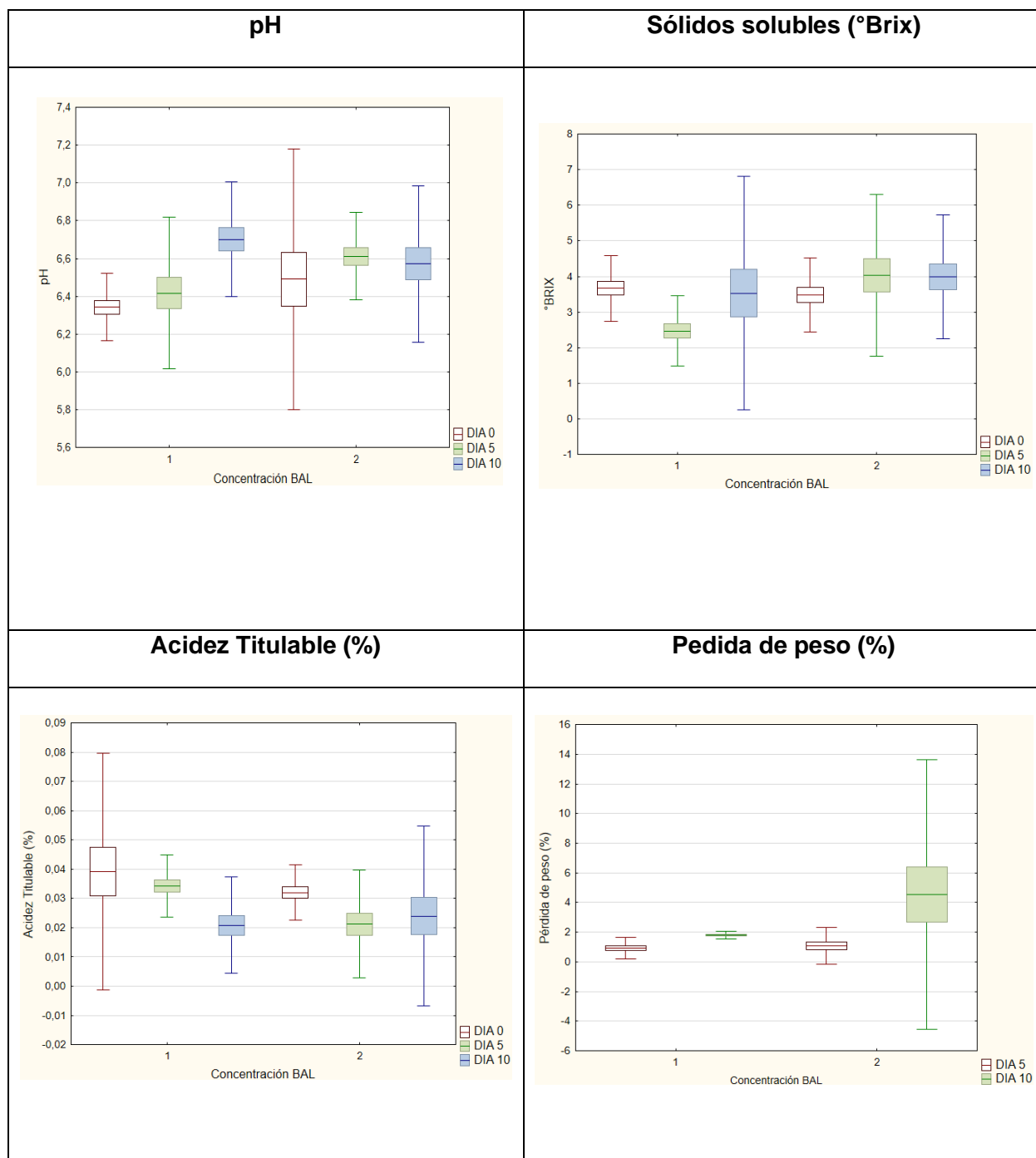
Tabla 28

Resultados del análisis Tukey para el factor B en las variables físico-químicas

Factor B (Concentración BAL)	pH			Brix			Acidez			Pérdida de peso	
	Día 0	Día 5	Día 10	Día 0	Día 5	Día 10	Día 0	Día 5	Día 10	Día 5	Día 10
1%	6,34 ^A	6,41 ^A	6,70 ^B	3,66 ^B	2,46 ^A	3,53 ^A	0,039 ^B	0,021 ^A	0,020 ^A	0,93 ^A	1,79 ^A
2%	6,49 ^B	6,61 ^B	6,57 ^A	3,48 ^A	4,03 ^B	3,99 ^B	0,032 ^A	0,034 ^B	0,024 ^B	1,07 ^B	4,54 ^B

Figura 5

Estudio del efecto de la concentración de la solución BAL (Factor B) en las variables de estudio



Para la variable pH, la solución bacteriana al 1% obtuvo un aumento de pH en el transcurso de los días, de 6,34 (día 0) a 6,41 (día 5) y 6,70 (día 10). Para la solución bacteriana al 2%, el pH aumentó de 6,49 a 6,61 para el día 5 y disminuyó para el día 10 a 6,57.

Los sólidos solubles para la solución bacteriana al 1% disminuyó de 3,66 a 2,46 °Brix y aumentó para el día 10 a 3,53 °Brix. Para la solución bacteriana al 2% los sólidos solubles aumentaron de 3,48 a 4,03 °Brix y disminuyeron a 3,99 para el día 10.

El porcentaje de acidez titulable para la solución bacteriana al 1% disminuyó de 0,03 a 0,02 en los días 5 y 10, respectivamente. Para solución al 2% el porcentaje de acidez se mantuvo hasta el día 5 en 0,02% y disminuyó para el día 10 a 0,02.

La solución bacteriana al 1% presentó un porcentaje de pérdida de peso de 0,93 a 1,79 para el día 10. Para la solución bacteriana al 2% el porcentaje de pérdida de peso aumentó de 1,07 a 4,54% para el día 10.

Prueba de Tukey para las interacciones significativas en la bioconservación

*Análisis de Tukey en la interacción A*B (Hortaliza*Concentración de solución bacteriana)*

Tabla 29

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico químicas del día 0*

Factor A (Hortalizas)	Factor B (Concentración de solución BAL)	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez titulable (%)
Lechuga	1%	6,28 ^A	3,24 ^B	0,021 ^A
Lechuga	2%	6,18 ^A	3,01 ^A	0,036 ^C
Col	1%	6,4 ^B	4,08 ^D	0,057 ^D
Col	2%	6,8 ^C	3,96 ^C	0,027 ^B

Tabla 30

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico químicas del día 5*

Factor A (Hortalizas)	Factor B (Concentración de solución BAL)	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez titulable (%)	Pérdida de peso (%)
Lechuga	1%	6,23 ^A	2,02 ^A	0,030 ^C	0,60 ^B
Lechuga	2%	6,72 ^D	3,003 ^B	0,013 ^A	1,64 ^D
Col	1%	6,6 ^C	2,92 ^B	0,039 ^D	1,27 ^C
Col	2%	6,51 ^B	5,1 ^C	0,0296 ^B	0,51 ^A

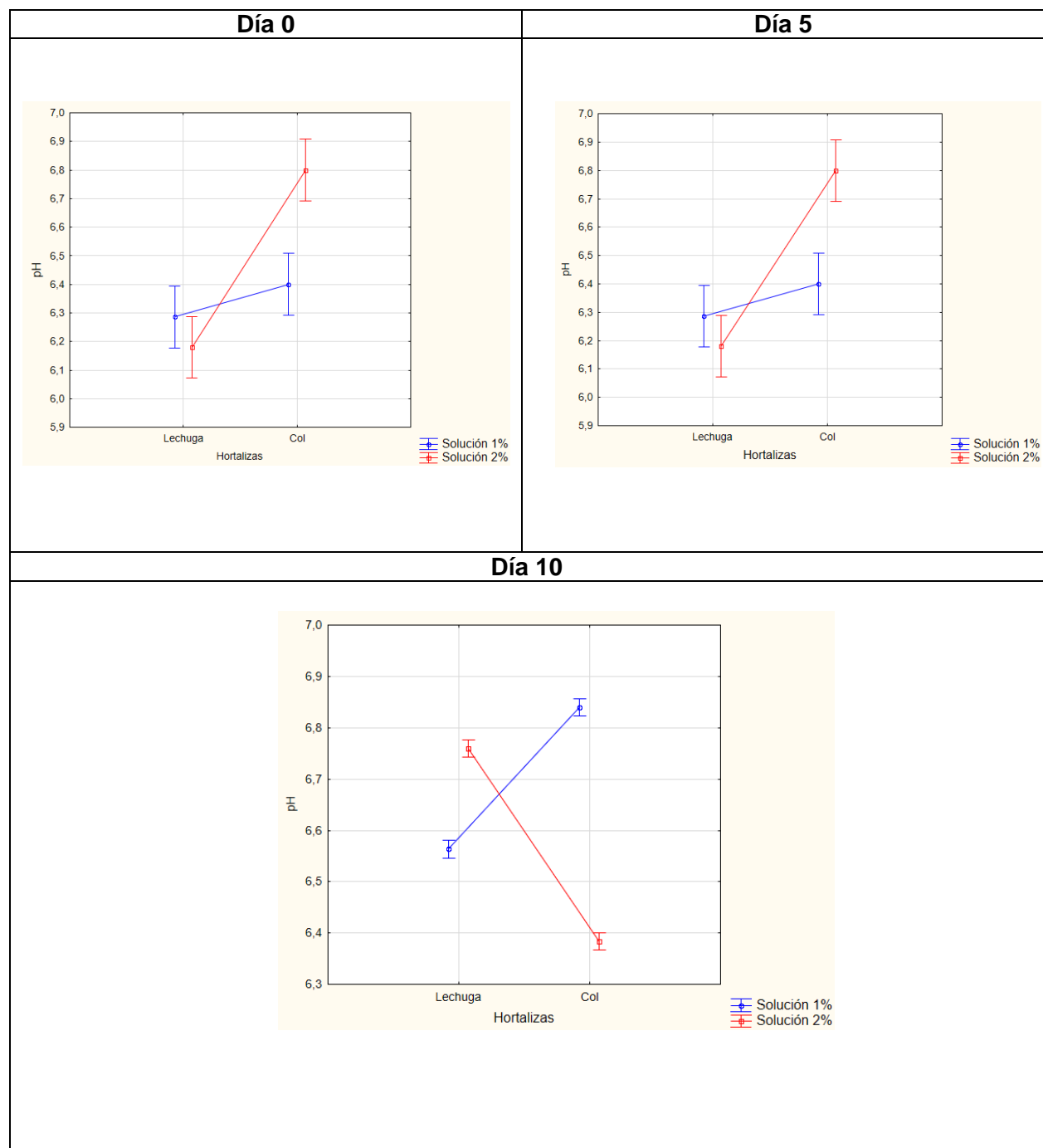
Tabla 31

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico químicas del día 10*

Factor A (Hortalizas)	Factor B (Concentración de solución BAL)	pH	Sólidos solubles (°Brix)	Acidez titulable (%)	Pérdida de peso (%)
Lechuga	1%	6,56 ^B	2,03 ^A	0,013 ^B	1,92 ^C
Lechuga	2%	6,76 ^C	3,2 ^B	0,01 ^a	8,69 ^D
Col	1%	6,84 ^D	5,03 ^D	0,028 ^C	1,67 ^B
Col	2%	6,38 ^A	4,8 ^C	0,038 ^D	0,39 ^A

Figura 6

Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pH

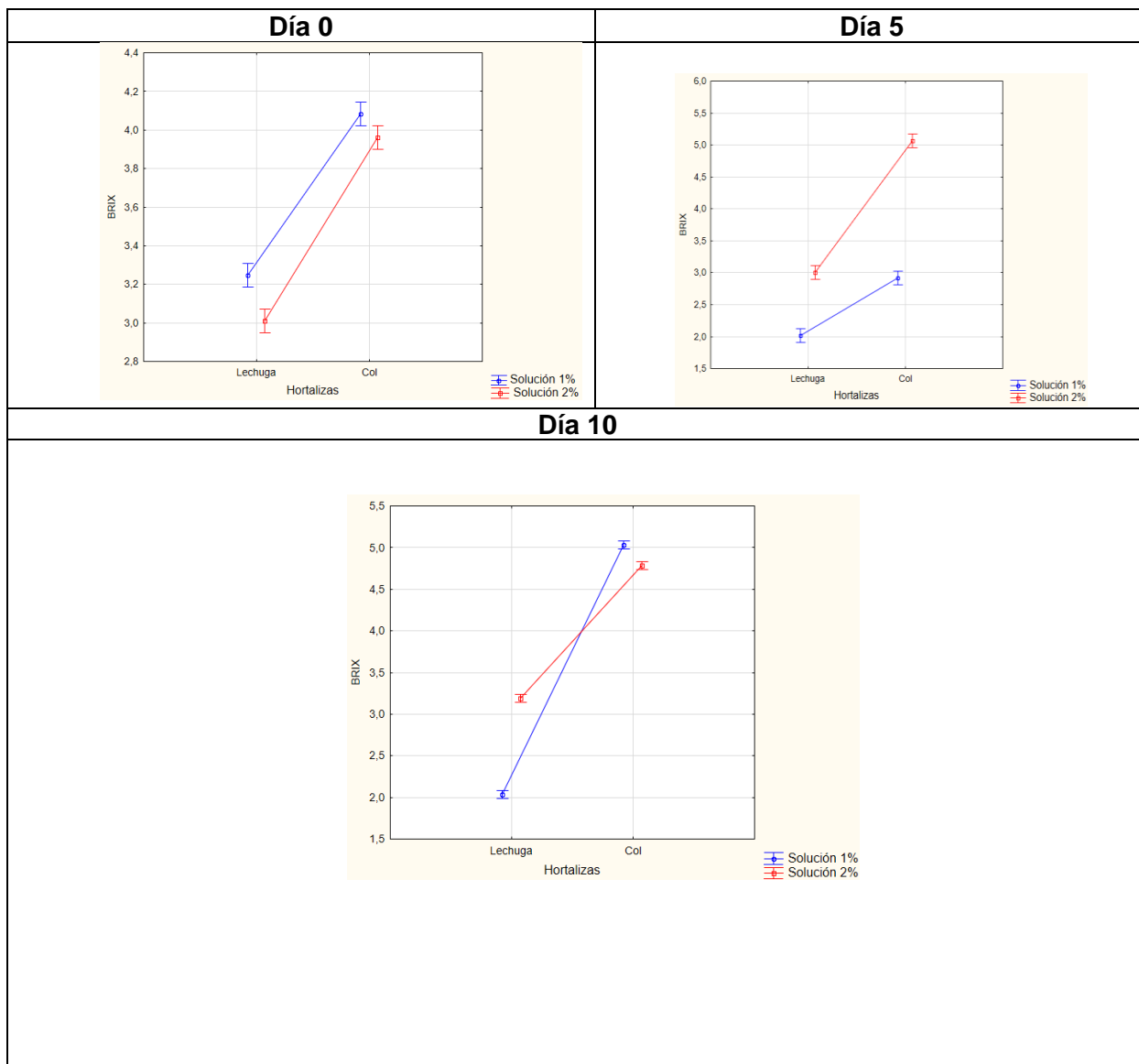


En a la figura 6, (interacción A*B para la variable pH) existe diferencia significativa en los tres días de estudio. El pH de lechuga con 1% de solución bacteriana redujo su pH hasta el

día 5, mientras que, la col con 2% solución bacteriana disminuyó su pH en el transcurso de los días. La lechuga con 2% de solución bacteriana y col con 1% de solución bacteriana aumentaron su pH en los 10 días de tratamiento.

Figura 7

*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable sólidos solubles*

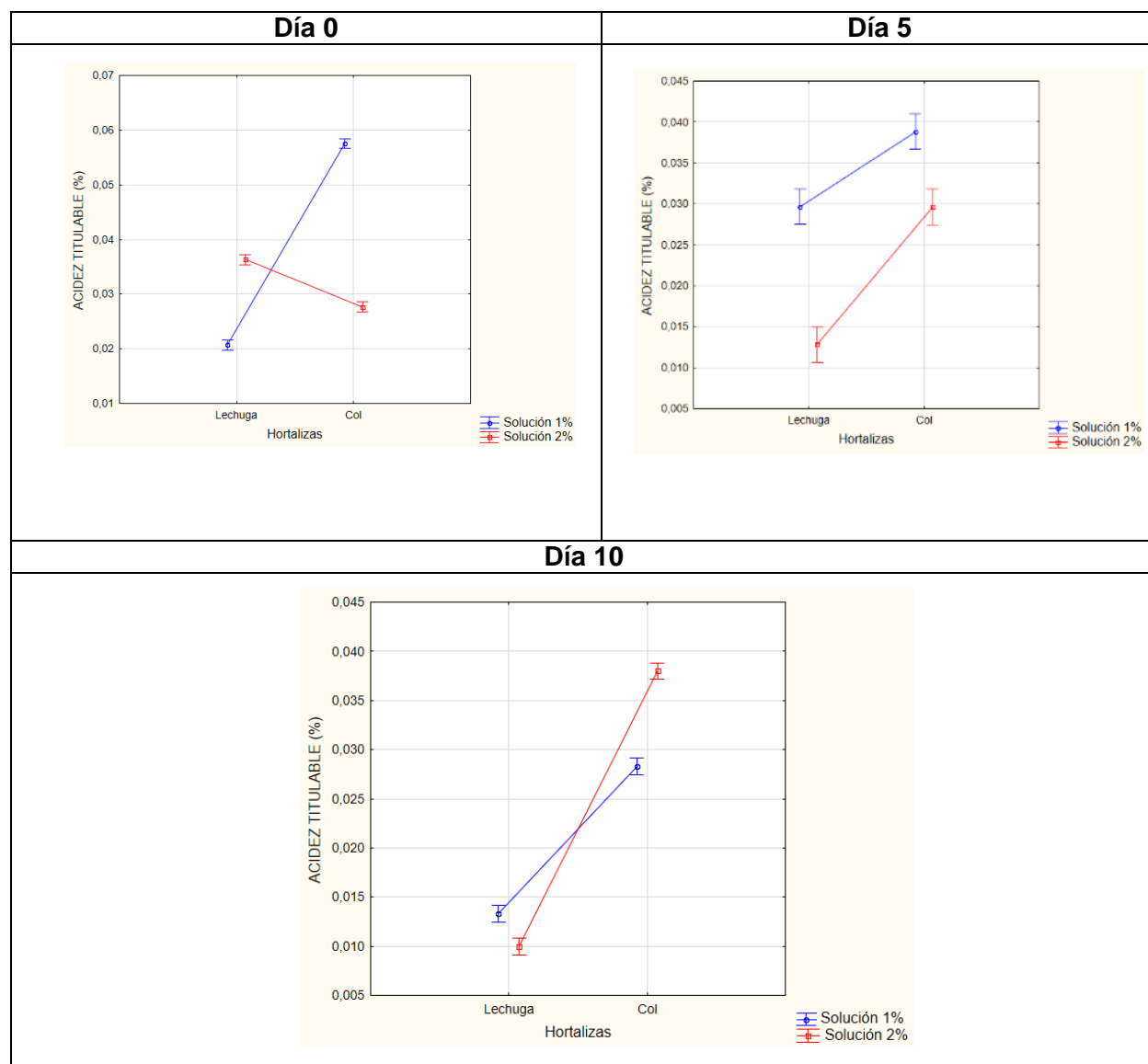


En a la figura 7, (interacción A*B para la variable sólidos solubles) existe diferencia significativa en los tres días de estudio. Los sólidos solubles para la interacción de lechuga con

1% de solución bacteriana, lechuga con 2% de solución bacteriana y col con 1% de solución bacteriana disminuyeron en el día 5 y volvieron a subir al día 10, mientras que, la col con 2% de solución bacteriana aumentó sus grados brix hasta el día 5 y decayeron para el día 10.

Figura 8

*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable acidez titulable*

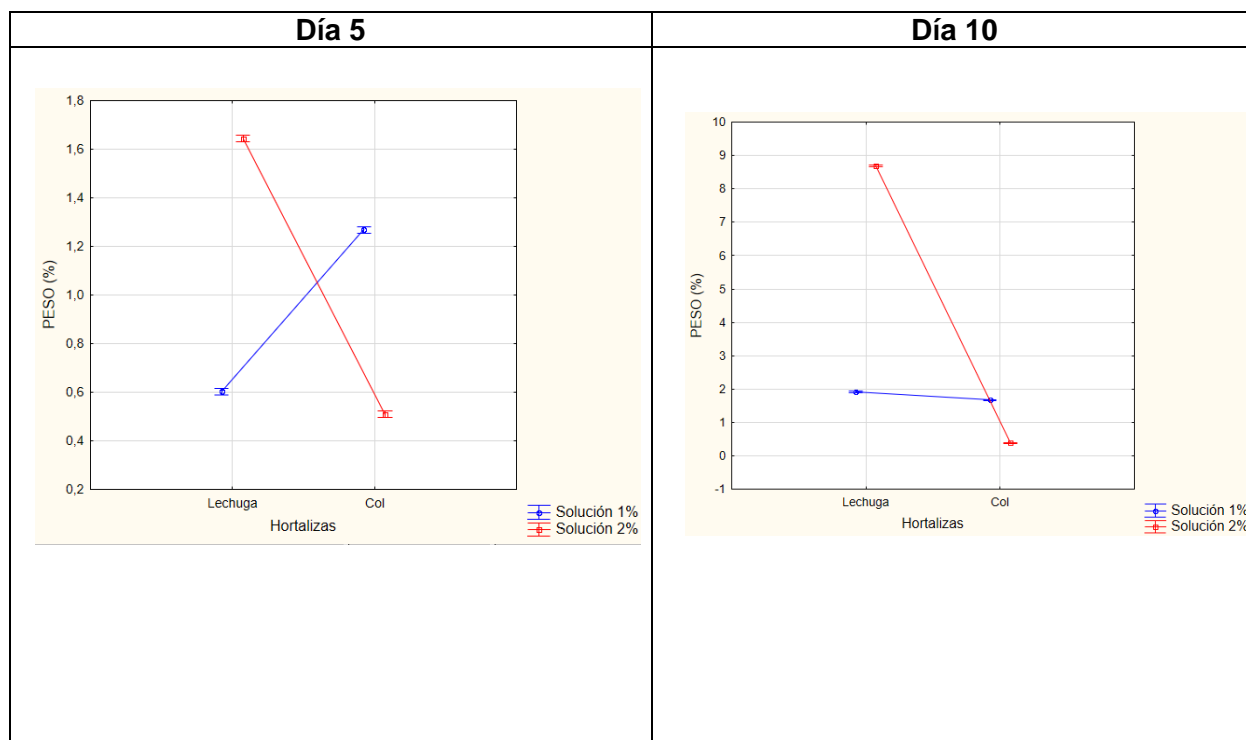


En a la figura 8, (interacción A*B para la variable acidez titulable) existe diferencia significativa en los tres días de estudio. La interacción de col con 2% de solución bacteriana aumentó su porcentaje de acidez titulable en el transcurso de los días, mientras que, la lechuga

con 1% de solución bacteriana solo lo hizo hasta el día 5. Las interacciones lechuga con 2% de solución bacteriana y col con 1% de solución bacteriana disminuyeron su porcentaje de acidez titulable con el lapso del tiempo.

Figura 9

*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pérdida de peso*



En a la figura 9, (interacción A*B para la variable pérdida de peso) existe diferencia significativa en los tres días de estudio. Todas las interacciones mostraron un aumento del porcentaje pérdida de peso para el día 5 y 10, exacto, la interacciones col con 2% de solución bacteriana la cual no tuvo un gran aumentó en su porcentaje de pérdida de peso para el día 10.

Análisis microbiológico

Recuento de aerobios

Tabla 32

Resultados del conteo de colonias en aerobios (UFC/mL) durante el día 5 y 10

Tratamiento	Día 5 (Dilución -3)	Día 10 (Dilución -3)
Lechuga con 1% de solución bacteriana	2,32E+05	3,40E+05
Lechuga con 2% de solución bacteriana	1,90E+05	3,70E+05
Col con 1% de solución bacteriana	3,74E+05	1,78E+05
Col con 2% de solución bacteriana	2,45E+05	2,15E+05

En la tabla 32, se muestran los análisis microbiológicos durante los días 5 y 10. Se pudo analizar un aumento de unidades formadoras de colonias en los días de estudio. Se debe tomar en cuenta la dilución (-3) para la relación del aumento de colonias.

Recuento de mohos y levaduras

Tabla 33

Resultados del conteo de colonias en mohos y levaduras (UFC/mL) durante el día 5 y 10

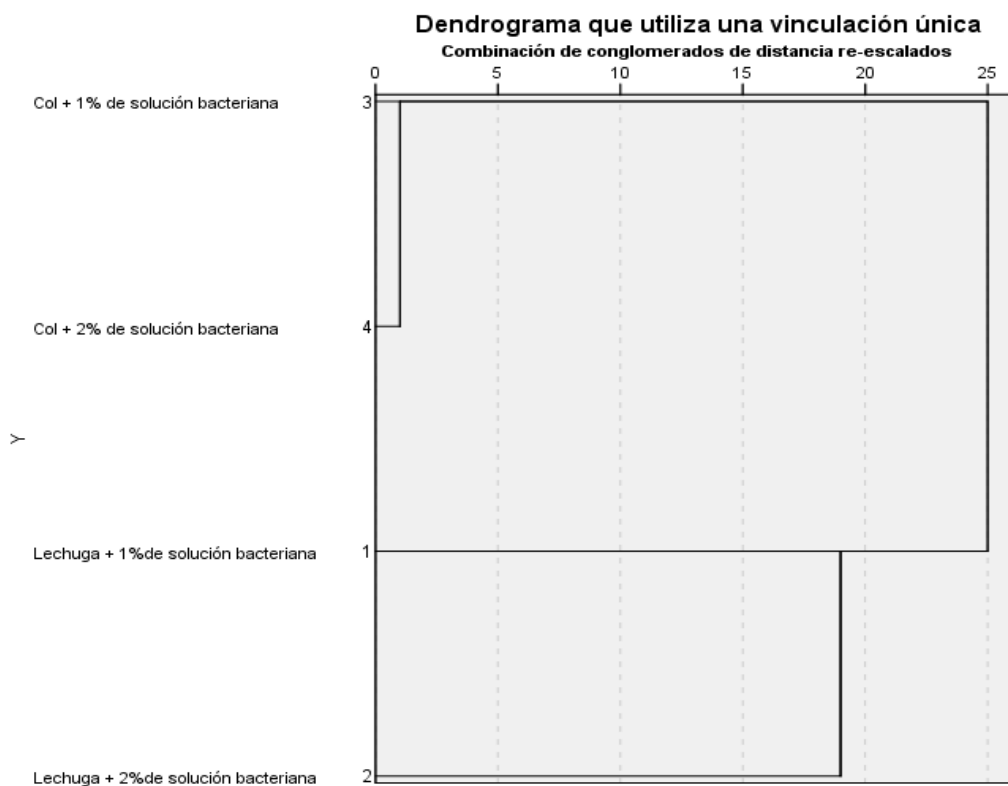
Tratamiento	Día 5 (Dilución -3)	Día 10 (Dilución -3)
Lechuga con 1% de solución bacteriana	9,00E+03	0
Lechuga con 2% de solución bacteriana	1,50E+04	1,20E+04
Col con 1% de solución bacteriana	7,00E+03	0
Col con 2% de solución bacteriana	0	0

En la tabla 33, se muestran los resultados obtenidos del conteo de colonias en mohos y levaduras (UFC/mL) durante el día 5 y 10. Se puede analizar como el tratamiento de col con 2% de solución bacteriana no presentó colonias en los días 5 y 10. Mientras que el tratamiento lechuga con 1% de solución bacteriana, presentó 1,10 E+04 UFC/mL en el día 5 y para el día 10 este número disminuyó a 0.

Análisis de conglomerados

Figura 10

Dendrograma para los factores de estudio



En la figura 10, se expone un dendrograma de vecinos más próximos aplicados a los diferentes tratamientos de estudio con las variables físico-químicas (pH, sólidos solubles, acidez titulable y pérdida de peso). Se observó una relación entre los tratamientos col con 2% de solución bacteriana tiene una relación con el tratamiento de col con 1% de solución bacteriana, mientras que, el tratamiento de lechuga con 1% de solución bacteriana y lechuga con 2% de solución bacteriana se relacionaron y mostraron menos relación con los otros tratamientos.

Análisis de componentes principales

Tabla 34

Matriz de correlación de componentes principales

		pH (Día0)	pH (Día5)	pH (Día10)	SS (Día0)	SS (Día5)	SS (Día10)	Acidez (Día0)	Acidez (Día5)	Acidez (Día10)	Pérdida de peso (Día 5)	Pérdida de peso (Día 10)
Correlación	pH (Día0)	1,000	-0,076	-0,714	0,740	0,884	0,647	-0,137	0,419	0,944	-0,653	-0,713
	pH (Día5)	-0,076	1,000	0,508	0,063	0,322	0,544	0,619	-0,401	0,065	0,797	0,587
	pH (Día10)	-0,714	0,508	1,000	-0,123	-0,591	0,063	0,790	-0,026	-0,451	0,863	0,510
	SS (Día0)	0,740	0,063	-0,123	1,000	0,532	0,866	0,488	0,815	0,914	-0,326	-0,765
	SS (Día5)	0,884	0,322	-0,591	0,523	1,000	0,681	-0,083	0,014	0,811	-0,312	-0,303
	SS (Día10)	0,647	0,544	0,063	0,866	0,681	1,000	0,647	0,447	0,836	0,072	-0,361
	Acidez (Día0)	-0,137	0,619	0,790	0,488	-0,83	0,647	1,000	0,364	0,190	0,628	0,069
	Acidez (Día5)	0,419	-0,401	-0,026	0,815	0,014	0,447	0,364	1,000	0,594	-0,466	-0,873
	Acidez (Día10)	0,994	0,065	-0,451	0,914	0,811	0,836	0,190	0,594	1,000	-0,483	-0,736
	Pérdida de peso (Día 5)	-0,653	0,797	0,863	-0,326	-0,312	0,072	0,628	-0,466	-0,483	1,000	0,820
	Pérdida de peso (Día 10)	-0,713	0,587	0,510	-0,765	-0,305	-0,361	0,069	-0,873	-0,736	0,820	1,000

En la tabla 34, se puede analizar la matriz de correlación de componentes principales en la que las variables acidez, sólidos soluble y pérdida de peso presentaron una correlación positiva moderada ($>0,5$) entre ellas. La variable pH en los días 0 y 5 se correlaciona con los sólidos solubles en los días 0, 5 y 10 con un valor promedio de 0,49. Asimismo, los sólidos solubles en el día 10 se correlacionan con la variable acidez en los días 0, 5 y 10. La variable

pérdida de peso se correlaciona con la variable pH en los días 5 y 10 con valores mayores a 0,58. Los sólidos soluble presentaron una correlación positiva muy baja con la variable pH en el día 5 con un valor de 0,063, de igual forma, la acidez obtuvo una correlación baja con respecto a la pérdida de peso en el día 10 donde se mostró un valor de 0,069.

Tabla 35*Matriz de componentes*

	Componente		
	1	2	3
pH (Día0)	0,949	-0,022	0,314
pH (Día5)	-0,221	0,846	0,485
pH (Día10)	-0,598	0,683	-0,418
SS (Día0)	0,868	0,436	-0,237
SS (Día5)	0,710	0,175	0,682
SS (Día10)	0,658	0,743	0,123
Acidez (Día0)	-0,005	0,934	-0,356
Acidez (Día5)	0,683	0,118	-0,721
Acidez (Día10)	0,959	0,255	0,125
Pérdida de peso (Día 5)	-0,703	0,705	0,095
Pérdida de peso (Día 10)	-0,882	0,227	0,413

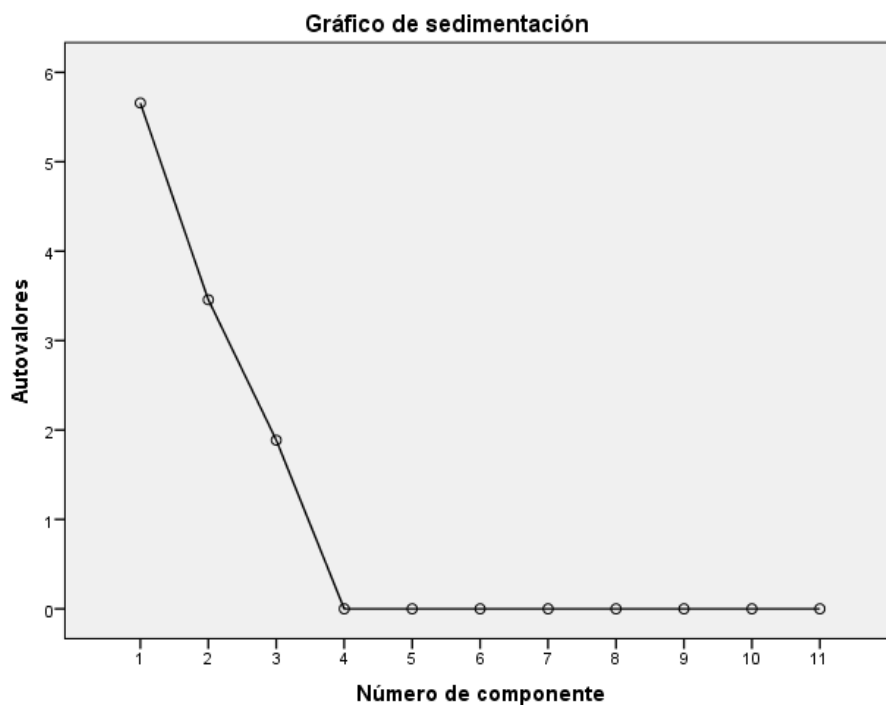
Tabla 36*Porcentaje de varianza total explicada*

Componente	Varianza total explicada					
	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	5,657	51,427	51,427	5,657	51,427	51,427
2	3,457	31,424	82,851	3,457	31,424	82,851
3	1,886	17,149	100,000	1,886	17,149	100,000
4	1,007E-013	1,061E-013	100,000			
5	1,002E-013	1,019E-013	100,000			
6	1,002E-013	1,015E-013	100,000			
7	1,000E-013	1,003E-013	100,000			
8	-1,002E-013	-1,014E-013	100,000			
9	-1,002E-013	-1,020E-013	100,000			

10	-1,004E-013	-1,035E-013	100,000
11	-1,007E-013	-1,064E-013	100,000

Figura 11

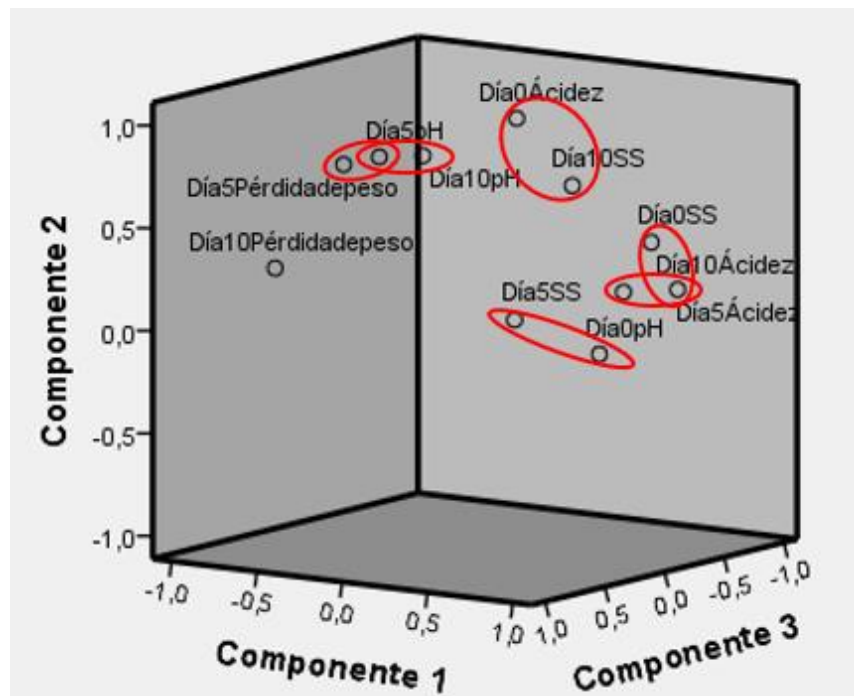
Gráfica de sedimentación



En la figura 11, se observa la gráfica de sedimentación en donde se analizaron las 11 variables, la varianza total explicada determinó 3 componentes con porcentajes mayores a 1, los cuales son: pH día 0 (componente 1), pH día 5 (componente 2), pH día 10 (componente 3). Para el pH día 0 se obtuvo un porcentaje mayor (51,427%), en comparación a los días 5 y 10, los cuales fueron 31,424% y 17,149%, respectivamente. El cuadro de porcentaje de varianza total explicada muestra que los demás componentes no presentan porcentajes significativos (>1), por tal razón, no son destacables para su análisis dentro del estudio.

Figura 12

Gráfica de componentes principales



En la figura 12, se analizaron los resultados de la gráfica de componentes principales de las 11 variables de estudio. Se puede analizar como en el componentes 3 se correlacionan los sólidos solubles en día 0 con la acidez del día 10, de la misma manera, existe un correlación entre el pH día 0 y los sólidos soluble en el día 5. La acidez en el día 0 se correlación con los sólidos solubles en el día 10. En el componente 2, se puede observar una correlaciona entre la pérdida de peso del día 5 con el pH en el día 5, asimismo, existe una correlación entre el pH del día 5 y el pH del día 10.

Análisis sensorial

Tabla 37

Análisis sensoriales de las hortalizas bioconservadas con diferentes concentraciones de solución bacteriana durante 10 días

Atributo	Tratamiento	Día 10
Textura	Lechuga + Solución bacteriana al 1%	3,01 ^B
	Lechuga + Solución bacteriana al 2%	2,51 ^A
	Col + Solución bacteriana al 1%	3,44 ^C
	Col + Solución bacteriana al 2%	3,5 ^D
Color	Lechuga + Solución bacteriana al 1%	2,82 ^A
	Lechuga + Solución bacteriana al 2%	2,80 ^A
	Col + Solución bacteriana al 1%	3,72 ^B
	Col + Solución bacteriana al 2%	3,75 ^B
Aroma	Lechuga + Solución bacteriana al 1%	3,11 ^B
	Lechuga + Solución bacteriana al 2%	2,86 ^A
	Col + Solución bacteriana al 1%	3,52 ^C
	Col + Solución bacteriana al 2%	3,54 ^C

Nota: La escala de valores fue 4 excelente, 3 bueno, 2 regular, 1 malo.

En la tabla 37, se analizar los resultados del análisis sensorial para determinar los mejores tratamientos. Se pudo establecer que el tratamiento que presto mejores resultados de Col + Solución bacteriana al 2%, en los aspectos de textura, color y aroma durante los días 10 de estudio. Para la variable lechuga se pudo observar que los mejores resultados se dieron en el tratamiento de Lechuga + Solución bacteriana al 1% ya que se obtuvieron valores de 3. La mayoría de datos obtenidos fueron mayores al promedio excepto el tratamiento de Lechuga + Solución bacteriana al 2% que obtuvo mala aceptación por los entrevistados.

Capítulo V

Discusión

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos, que se pueden encontrar en la mucosa intestinal de mamíferos, en plantas y algunos alimentos fermentados. Estos se caracterizan por su forma de cocos o bacilos, gram positivos, tolerancia a pH bajos, catalasa negativa y por producir ácido láctico producto de su fermentación. Entre los géneros más frecuentes en fermentaciones tenemos, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, etc. El uso de BAL para aplicaciones alimentarias es seguro, por tal razón, en los últimos años ha crecido la demanda de asilar nuevas cepas de BAL para poder ser usados en formulaciones de alimentos funcionales y saludables (Wang et al., 2021).

Mediante los resultados de la fermentación del mucílago de café, se pudo determinar una disminución en los sólidos solubles de ambas variedades. Según Puerta-Quintero & Ríos-Arias (2011), los carbohidratos se encuentran en el mucílago de café en porcentajes entre el 7,50% a 9,82% del peso fresco del mucílago. Entre estos carbohidratos existen azúcares reductores y no reductores, los cuales debido a procesos fermentativos son consumidos por las bacterias y levaduras, por ende, los sólidos solubles disminuyeron a las 72 horas de fermentación. Asimismo, Avallone et al., (2006) mencionan que los polisacáridos presentes en el mucílago del café son descompuestos por la acidez del medio y no por enzimas, esto se puede deber a la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol y otros compuestos por parte de las bacterias fermentadoras, lo cual puede afectar directamente a la disminución del pH y el incremento de la acidez con el tiempo (Jackels & Jackels, 2005).

Al analizar los resultados de la secuenciación, realizar un BLAST y armar un árbol filogenético se pudo determinar que la bacteria ácido láctica presente en el mucílago de café fue *Lactobacillus plantarum*. Esta bacteria se presenta en forma de bastones con extremos

redondos, rectos, miden de 0,9 a 1,1 μm de ancho y de 3 a 8 μm de largo, estos pueden presentarse de manera sola, en pares o cadenas cortas (Landete et al., 2010). Es ampliamente distribuida y versátil, se la puede encontrar en diferentes alimentos, como pueden ser carnes, pescados, lácteos y productos vegetales fermentados. *L. plantarum* es utilizado para aumentar la calidad y vida útil de algunos productos, añadir beneficios para la salud, asimismo, su genoma puede ser utilizado para analizar los mecanismos que explican sus propiedades intestinales específicas (de Vries et al., 2006).

Respecto al Factor A (Hortalizas)

Analizando los resultados físico-químicos de la variable hortalizas se obtuvo una disminución del pH en la Col hasta el día 5, para posteriormente observar un aumento en el día 10, según Sharma & Rao, (2013), las interacciones de las plantas con los factores de estrés ambiental, animales e insectos herbívoros, puede afectar en la manera de producción de los ácidos por parte de las coles. Por lo contrario, el aumento del pH en la lechuga en los días 0, 5 y 10, es posible por el consumo de los ácidos en el proceso respiratorio de la hortaliza (Galvis Vanegas et al., 2010).

Los sólidos solubles para ambas hortalizas disminuyeron para el día 5. De acuerdo a Sosa et al., (2022) el comportamiento mencionado se debe a que las bacterias ácidos lácticas utilizan los hidratos de carbono que se presentan en el tejido de las hortalizas y lo transforma en compuestos orgánicos, disminuyendo los sólidos solubles, pH y conllevando a un inhibición de algunos patógenos. Además, el aumento de los sólidos solubles en el último día y su mínimo cambio entre los días puede ocurrir por la degradación de los polisacáridos en azúcares simples, sin embargo, comúnmente las hortalizas presentan bajas cantidades de azúcar, por lo que, la cantidad de sólidos solubles no es un indicador de calidad importante, pero se relaciona con la preservación de un sabor agradable durante el lapso del tiempo (Vargas-Arcila et al., 2017).

La acidez presentó una disminución y poca variación en ambas hortalizas. Tumbarski et al, (2019), menciona que los ácidos pueden ser consumidos en el proceso respiratorio vegetal, por ende, pueden bajar esta variable con el tiempo. También, Vargas-Arcila et al. (2017) nombra que el porcentaje de acidez está relacionada con los ácidos orgánicos que presentan las hortalizas, el cual disminuye durante el almacenamiento ya que es utilizado como sustrato para hacer el proceso de respiración. Puede existir un aumento de la acidez por consecuencia del tipo de refrigeración que causa un efecto directo al proceso de respiración, volviéndola más moderada (Rodríguez et al., 2018). De igual forma, Agriopoulou et al. (2020) describen que el daño mecánico de las frutas y verduras frescas puede aumentar la tasa de respiración, lo que puede provocar un vida útil corta del alimento.

Los resultados del porcentaje de pérdida de peso mostraron que existió una disminución de peso hasta el día 10 en ambas hortalizas. Rodríguez et al., (2018) describe que las lechugas tratadas con ácido láctico pueden afectar a sus tejidos, por lo que, puede que exista un relación entre la producción de ácido láctico por parte de las BAL y exista un deterioro de los tejidos, disminuyendo así su porcentaje de peso. Asimismo, las condiciones de temperatura y humedad usadas durante la conservación pueden afectar a la disminución del peso, pero, una pequeña hidratación a las verduras puede evitar estos cambios (Taiz et al., 2015), de igual forma, Sánchez-González et al, (2013) reporta que la pérdida de peso se puede deber a procesos físicos de migración de agua desde los tejidos vegetales hacia el medio ambiente.

Respecto al Factor B (Concentración de solución bacteriana)

Para el factor B, se estudiaron los efectos de las distintas concentraciones de solución BAL rociadas a las hortalizas, observando sus cambios físicos químicos.

Para la concentración de la solución bacteriana, con respecto al pH, ambas concentraciones aumentaron su pH en comparación al día 0. En donde, al comparar ambas concentraciones en los días de estudio, la concentración al 2% obtuvo menor aumento de pH.

Según, Trias et al, (2009) la disminución del pH es consecuencia de la producción de ácido láctico por parte de las bacterias BAL, al existir mayor cantidad de BAL en una solución puede existir una disminución de pH en comparación en soluciones con menor concentración. Por otra parte, para poder producir bacteriocinas eficaces se necesitan condiciones de pH bajo en la mayoría de los casos (Tumbariski et al., 2018). También, la síntesis de algunos metabolitos primarios y secundarios antagonicos (ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno y diacetilo) son una de las características principales para la bioconservación, por lo cual, la presencia de estos metabolitos puede afectar directamente a las condiciones físico-químicas de la verdura (Oliveira et al., 2015).

En cuanto a los sólidos solubles, existió un aumento para la concentración al 2% de solución bacteriana en los tres días de estudio, mientras que, la solución bacteriana al 1% mostró una disminución de los sólidos solubles en el día 5. Mello et al, (2003) menciona que la lenta degradación de los polisacáridos puede afectar directamente al aumento de los grados Brix con el tiempo. La eficacia de dentro de los compuestos, las BAL usan los carbohidratos para producir varios productos, lo que ocasiona la disminución de los sólidos solubles dentro del medio que se encuentren, de igual forma, la gran cantidad de bacterias en una solución y los factores extrínsecos cambien las propiedades de las hortalizas (Dalié et al., 2010)

La acidez aumentó en la solución al 2%, pero la solución bacteriana al 1% mostró valores bajos de pH en el transcurso de los días. Höltzel et al. (2000) demostraron que una de las propiedades que utilizan las BAL para la bioconservación es la síntesis de compuestos orgánicos (ácido láctico), dióxido de carbono, etanol, entre otros. El ácido láctico acidifica el entorno y permite la inhibición de algunos patógenos. Además, Thomas (2018) describe que las BAL inhiben el crecimiento de microorganismo patógenos y el deterioro de los alimentos, mejoran su vida útil y calidad nutritiva, esto mediando la producción de ácido acético, ácido

láctico, la reuterina, peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas, lo que concuerda con el aumento de la acidez en los resultados obtenidos.

Con respecto al porcentaje de pérdida de peso se pudo analizar una mayor pérdida de peso en la solución bacteriana al 2%, esto se puede deber a la mayor cantidad de microorganismo presentes en la solución. La pérdida de peso se puede dar por propiedades físicas en las verduras o por el daño que pueden causar en los tejidos las bacterias ácido lácticas al momento de sintetizar sus ácidos orgánicos (Sánchez-González et al., 2013).

Respecto a la interacción A*B (Hortalizas* Concentración de solución bacteriana)

La bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de solución bacteriana mostró diferencia significativa entre las hortalizas y las concentraciones de solución bacteriana.

Para el pH, los tratamientos de col con solución bacteriana al 2% y lechuga con solución bacteriana al 1%, obtuvieron una disminución de su pH de 6,8 (día 0) a 6,38 (día 10) para col con solución bacteriana al 2%, mientras que, para lechuga con solución bacteriana al 1% se obtuvo un pH de 6,28 (día 0) a 6,23 (día 5). Sin embargo, el tratamiento lechuga con solución bacteriana al 2% y col con solución bacteriana al 1% aumentaron sus valores de pH durante el transcurso de los días. La disminución del pH en los tratamientos se debe a la producción de los metabolitos secundarios (ácidos orgánicos) que producen las BAL, estas presentan actividad antifúngica y protegen a las células del huésped de infecciones. Asimismo, las BAL ayudan a fomentar la biodegradación, ya que aceleran el contenido orgánico del suelo y producen metabolitos de ácidos orgánicos y bacteriocinas (Raman et al., 2022). Según los resultados del estudio, Cheng et al. (2022), presentaron de igual forma disminución de pH al aplicar bacterias ácido lácticas para el ensilaje de avena, y el aumento de pH de los otros tratamientos se puede deber a las temperaturas ambientes que se usaron durante el estudio, según Bernardes et al. (2018) la temperatura ambiente puede retrasar o detener la producción de ácido láctico por parte de las BAL, lo cual podría influir en un aumento del pH.

Para los sólidos solubles, el tratamiento de lechuga con solución bacteriana al 1% presentó una disminución de sus valores de 3,24 (día 0) a 2,03 (día 10) °Brix, por lo contrario, en los tratamientos lechuga con solución bacteriana al 1%, col con solución bacteriana al 1% y col con solución bacteriana al 2% existió un aumento de valores de sólidos solubles. La capacidad que tienen las BAL de consumir los carbohidratos presentes en su hospedador es importante para producir sus ácidos orgánicos, disminuyendo así el pH y los sólidos solubles del entorno (Cheng et al., 2022). Mello et al. (2003) indica que un aumento de los sólidos solubles se puede deber a la lenta degradación de compuestos complejos por parte de las BAL.

Los resultados de la acidez titulable, el tratamiento de col con solución bacteriana al 2% obtuvo un aumento de su porcentaje de acidez del día 0 (0,027%) al día 10 (0,038%), mientras que, la lechuga con solución bacteriana al 1% presentó un aumento del día 0 (0,021%) al día 5 (0,030), pero, los tratamientos de lechuga con solución bacteriana al 2% y col con solución bacteriana al 1% presentaron una disminución de sus porcentaje de acidez con el transcurso de los días. El aumento de los porcentajes de acidez en los tratamientos se debe al producto final de las BAL el ácido láctico, entre otros componentes. Cuando la acidez llega a un cierto porcentaje, el proceso de convertir carbohidratos en ácidos orgánicos se ralentiza, pero las enzimas siguen funcionando. También, el aumento de la acidez es significativamente favorable, ya que permite controlar el crecimiento del organismo de descomposición y ayuda a prolongar la vida útil de las hortalizas (Fan & Hansen, 2012). Marín et al. (2017), describe que la disminución de los ácidos se puede deber al proceso respiratorio de las hortalizas, retrasando la producción de ácidos orgánicos por parte de las BAL.

El porcentaje de pérdida de peso para el tratamiento de col con solución bacteriana al 2% existió una disminución del 0,51% (día 5) a 0,39 % (día 10), sin embargo, para los tratamientos de lechuga con solución bacteriana al 1%, lechuga con solución bacteriana al 2% y col con solución bacteriana al 1% existió un aumento en el porcentaje de pérdida en el día 10.

La pérdida de peso puede deberse a disminución del agua en las hortalizas, esto debido al deterioro provocado por microorganismo, pérdida mecánicas, entre otras. La mayoría de las hortalizas poseen una alta perecibilidad, debido a sus niveles respiratorios (Nunes et al., 2011).

Análisis microbiológico

En análisis microbiológico, el conteo en aerobio aumentó en los tratamientos en el transcurso de los días, menos en los tratamientos, de col con solución bacteriana al 1% y col con solución bacteriana al 2%. En el conteo de mohos y levaduras, para el día 10 solo los tratamientos lechuga con solución bacteriana al 1%, col con solución bacteriana al 1% y col con solución bacteriana al 2% presentaron 0 UFC/mL. Las bacterias ácido lácticas pueden producir algunas sustancias antimicrobianas que pueden afectar a cepas patógenas o indeseables. El peróxido de hidrógeno y los radicales libre presentan una actividad bacteriostática, estas al asociarse al sistema lactoperoxidasa/tiocianato, el peróxido forma nuevos compuestos inhibidores que son bacteriostáticos para las bacterias lácticas y bactericidas para las bacterias Gram negativas (Piard & Desmazeaud, 1991).

Asimismo, algunas bacterias ácido lácticas sintetizan compuestos antifúngicos los cuales son usados para prevenir o controlar el deterioro de alimentos durante su almacenamiento. El ácido láctico reduce el pH, por lo que, puede inhibir el crecimiento de diversos microorganismos o hasta incluso llegar a matar a las bacterias susceptibles. Ellos afectan a la membrana del hongo e inhiben la absorción de aminoácidos. De igual forma, la disminución del pH aumenta la actividad antifúngica de diversos ácidos. Uno de los componentes principales que sintetizan las BAL es la reuterina. Esta se la conoce por inhibir el crecimiento de especies de *Fusarium* y *Aspergillus* (Perczak et al., 2018). Según Zinedine et al. (2005) mencionan que existen diferentes especies de BAL que pueden eliminar micotoxinas, entre estas tenemos, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus*, cada una de estas actuando de

manera diferente en la disminución de micotoxinas, siendo *L. rhamnosus* es la más versátil y eficaz.

Capítulo VI

Conclusiones

En relación a la caracterización físico-química del mucílago de café, se concluye que existió diferencia entre el mucílago fresco y fermentado durante las 72 horas. Para ambas variedades, se pudo determinar una disminución del pH y grados Brix, por otra parte, existió un aumento de la acidez para ambas variedades, producto de procesos fermentativos. En la variedad arábica se $6,1 \times 10^5$ en aerobios y $7,8 \times 10^5$ en mohos y levaduras, mientras que, para la variedad robusta, $5,8 \times 10^5$ en aerobios y $1,2 \times 10^5$ en mohos y levaduras.

Se concluye que la bacteria ácido láctica que fue aislada de la fermentación del café y fue utilizada para la elaboración de la solución bacteriana es *Lactiplantibacillus plantarum*, presentado una forma de bacilo, gram positiva y catalasa negativa.

Factor A (Hortalizas)

En cuanto a las hortalizas conservadas con diferentes concentración de solución BAL se concluye que la Col presentó una disminución del pH hasta el día 5, mientras que, la lechuga aumentó sus valores en el transcurso del tiempo. Los sólidos solubles disminuyeron en el día 5 y volvieron a aumentar en el día 10, debido a la lenta degradación de los polisacáridos en azúcares simples, asimismo, la acidez para ambas hortalizas disminuyó, esto debido al proceso respiratorio vegetal. En la variable pérdida de peso, la lechuga presentó mayor porcentaje de pérdida de peso en comparación a la col.

Por tal razón, analizando la variables donde se entró diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el uso de las BAL si influye en la bioconservación de hortalizas.

Factor B (Concentración de solución bacteriana)

Analizando los resultados de las pruebas físico químicas, se concluye que existió diferencia significativa entre las dos concentraciones de solución bacteriana utilizada durante el estudio. El pH con la concentración bacteriana al 2% presentó una disminución del pH en el día 10 del estudio. En los sólidos solubles la concentración bacteriana al 1% presentó una disminución al día 5, mientras que, el porcentaje de acidez aumentó con la concentración al 2% en el día 5.

Para el análisis microbiológico, se concluye que el tratamiento que utilizó solución bacteriana al 1% no presentó mohos y levaduras para el día 10.

Por lo que, analizando los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que la aplicación de distintas concentraciones de solución bacteriana influye en la bioconservación de las hortalizas.

Respecto a la interacción A*B (Hortalizas* Concentración de solución bacteriana)

Analizando los resultados, se concluye que los tratamientos de col con solución bacteriana al 2% y lechuga con solución bacteriana al 1% presentaron una disminución en sus valores de pH en el transcurso del tiempo. Para los sólidos solubles los mejores resultados los presentó el tratamiento de lechuga con solución bacteriana al 1% y col con solución bacteriana al 1%, con una disminución de sus sólidos solubles. Con respecto al porcentaje de acidez los tratamientos col con solución bacteriana al 2% y lechuga con solución bacteriana al 1% presentaron un aumento en el transcurso de los días. El porcentaje de pérdida de peso, los tratamientos col con solución bacteriana al 2% y col con solución bacteriana al 1% mostraron mejores resultados.

Por otra parte, los tratamientos col con 2% de solución bacteriana, col con 1% de solución bacteriana, presentaron menor cantidad de aerobios en el día 10, mientras que, para

mohos y levaduras los tratamientos, lechuga con 1% de solución bacteriana, col con 1% de solución bacteriana y col con 2% de solución bacteriana no presentaron colonias en el día 10.

Recomendaciones

Una vez aislado e identificado *Lactiplantibacillus plantarum* en el mucílago de café se recomienda realizar un análisis de flora microbiana que existe en el mucílago de café con la finalidad de encontrar otro tipo de bacteria u organismo. Asimismo, realizar un estudio sobre la inhibición de *L. plantarum* frente a bacterias y hongos patógenos. Además, seguir recopilando información sobre las bacterias fermentadoras que puedan existir en frutas, verduras y carnes, esto para poder utilizar las BAL para la elaboración de bioproductos de gran impacto y poder beneficiar a los consumidores.

Con respecto a la hortalizas, mediante los resultados obtenidos en las variables físico-químicas y bacterianas, como pH, acidez, pérdida de peso y conteo bacteriano, se recomienda utilizar la solución bacteriana en la lechuga hasta el día 5 de conservación, mientras que, para la col se recomienda utilizar la solución bacteriana hasta el día 10.

En cuanto a las diferentes concentraciones de solución bacteriana, se recomienda utilizar la concentración al 1% de solución bacteriana, ya que esta permite una menor pérdida de peso y permite una mayor conservación de las propiedades de las hortalizas. Para el inhibición de mohos y levaduras se recomienda utilizar el tratamiento de lechuga con solución al 1% y col con solución bacteriana al 1% y 2% ya que hubo una disminución de colonias al día 10.

Capítulo VII

Bibliografía

- Agblor, S., & Waterer, D. (2001). *Cabbage—Post-Harvest Handling and Storage*. 2.
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. *Microorganisms*, 8(6), 952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
- Avallone, S., Guiraud, J. -P, Guyot, B., Olguin, E., & Brillouet, J. -M. (2006). Polysaccharide Constituents of Coffee-Bean Mucilage. *Journal of Food Science*, 65, 1308-1311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10602.x>
- Bernardes, T. F., Daniel, J. L. P., Adesogan, A. T., McAllister, T. A., Drouin, P., Nussio, L. G., Huhtanen, P., Tremblay, G. F., Bélanger, G., & Cai, Y. (2018). Silage review: Unique challenges of silages made in hot and cold regions. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4001-4019. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13703>
- Café – CEFA Ecuador*. (2022). <https://cefaecuador.org/productos/cafe/>
- Calle, J., Gasparre, N., Benavent-Gil, Y., & Rosell, C. M. (2021). Aroids as underexplored tubers with potential health benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*, 97, 319-359. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.018>
- Caro, I., Bécares, G., Fuentes, L., Garcia-Armesto, M. R., Rúa, J., Castro, J. M., Quinto, E. J., & Mateo, J. (2015). Evaluation of three PCR primers based on the 16S rRNA gene for the identification of lactic acid bacteria from dairy origin. *CyTA - Journal of Food*, 13(2), 181-187. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.934297>
- Cheng, Q., Chen, L., Chen, Y., Li, P., & Chen, C. (2022). Effects of LAB Inoculants on the

- Fermentation Quality, Chemical Composition, and Bacterial Community of Oat Silage on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Microorganisms*, 10(4), 787.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10040787>
- Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, A., & Bartkiene, E. (2013). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. *Food Control*, 31(2), 539-545.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.004>
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370-380.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- de Vries, M. C., Vaughan, E. E., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2006). *Lactobacillus plantarum*—Survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16(9), 1018-1028.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>
- Deshpande, S., Singh, S., Panneerselvam, A., & Devi Rajeswari, V. (2019). 11—Nutrients in Caffeinated Beverages—An Overview. En A. M. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Caffeinated and Cocoa Based Beverages* (pp. 367-389). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815864-7.00011-8>
- Dohrn, C. (2013). A case study of small-scale coffee production: Coffee farming as a potential tool for environmental conservation and community development in rural Minas Gerais, Brazil. *Interdisciplinary Environmental Review*, 14, 1-31.
<https://doi.org/10.1504/IER.2013.054121>
- Erkmen, O. (2021). Practice 10—Gram staining technique. En O. Erkmen (Ed.), *Laboratory Practices in Microbiology* (pp. 99-105). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0->

323-91017-0.00028-7

- Fan, L., & Hansen, L. T. (2012). *Fermentation and Biopreservation of Plant-Based Foods with Lactic Acid Bacteria*. Routledge Handbooks Online. <https://doi.org/10.1201/b12055-4>
- Flórez, L. E., González, G., Pulido, S. P., Wyckhuys, K., Escobar, H., Salamanca, C., Zamudio, A., Jiménez, J., Gil, R., Fuentes, L. S., Niño, N., Fuentes, L., & Bojacá, C. (2012). *Manual para el cultivo de hortalizas. Familia Compuestas*. Produmedios.
- Galvis Vanegas, J. A., Gonzalez Blair, G. H., & Florez Vergara, A. (2010). *Manual de procesamiento y conservación de lechugas (Lactuca sativa L.) variedades verde y morada crespa minimamente procesadas*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia (Uniagraria).
- Guamán, L., Zapata, S., Serrano, M., & P, G. A. T. (2014). Caracterización de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados radicionales del Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.18272/aci.v6i1.155>
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T., & Enshasy, H. E. (2018). Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS Microbiology Letters*, 365(20), fny213. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny213>
- Höltzel, A., Nicholson, G., Hammes, W., & Jung, G. (2000). The First Low Molecular Weight Antibiotic from Lactic Acid Bacteria: Reutericyclin, a New Tetramic Acid. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 39, 2766-2768. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000804\)39:153.3.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000804)39:153.3.CO;2-7)
- INEN 0381. (1985). *Conservas Vegetales. Determinación de Acidez Titulable, Método Potenciométrico de Referencia*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.pdf>

INEN 389. (1985). Conservas vegetales. Determinación de ion hidrogeno (pH).

<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/389.pdf>

Inglés, M. F. M. (2020). *DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL CAFETO*. 3.

Jackels, S. C., & Jackels, C. F. (2005). Characterization of the Coffee Mucilage Fermentation Process Using Chemical Indicators: A Field Study in Nicaragua. *Journal of Food Science*, 70(5), C321-C325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09960.x>

Jiménez-Torres, A. (2015). *Producción de café y variables climáticas: El caso de Espíndola, Ecuador*. 22.

Kim, M., & Chun, J. (2014). Chapter 4—16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. En M. Goodfellow, I. Sutcliffe, & J. Chun (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 41, pp. 61-74). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.08.001>

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-125.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X)

Landete, J. M., Rodríguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., & Muñoz, R. (2010). Chapter 43—Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains. En V. R. Preedy & R. R. Watson (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 387-396). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7>

León-Serrano, L. A., Matailo-Pinta, A. M., Romero-Ramón, A. A., Portalanza-Chavarría, C. A., León-Serrano, L. A., Matailo-Pinta, A. M., Romero-Ramón, A. A., & Portalanza-Chavarría, C. A. (2020). Ecuador: Producción de banano, café y cacao por zonas y su

- impacto económico 2013-2016. *Revista Científica UISRAEL*, 7(3), 103-121.
<https://doi.org/10.35290/rcui.v7n3.2020.324>
- Marín, A., Atarés, L., & Chiralt, A. (2017). Improving function of biocontrol agents incorporated in antifungal fruit coatings: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 27(10), 1220-1241. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1390068>
- Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, 12(6), 1679. <https://doi.org/10.3390/nu12061679>
- Mello, J. C., Dietrich, R., Meinert, E. M., Teixeira, E., & Amante, E. R. (2003). Efeito do cultivo orgânico e convencional sobre a vida-de-prateleira de alface americana (*Lactuca sativa* L.) minimamente processada. *Food Science and Technology*, 23, 418-426.
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000300022>
- Moreb, N., Murphy, A., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2020). Chapter 3—Cabbage. En A. K. Jaiswal (Ed.), *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (pp. 33-54). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00003-9>
- Moreno, A., & Ferreres, A. (2012). Chapter 7—Virus Diseases in Lettuce in the Mediterranean Basin. En G. Loebenstein & H. Lecoq (Eds.), *Advances in Virus Research* (Vol. 84, pp. 247-288). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394314-9.00007-5>
- Morris, J. (2013). *Coffee: A Global History*. Reaktion Books.
- Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 501-508). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. V., & Rivas, B. de las. (2011). Chapter 8—Lactic Acid Bacteria.

- En A. V. Carrascosa, R. Muñoz, & R. González (Eds.), *Molecular Wine Microbiology* (pp. 191-226). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10008-6>
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). LACTIC ACID BACTERIA. En B. Caballero (Ed.), *Encyclopedía of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 3465-3472). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>
- Nazari, M. (2021). Plant mucilage components and their functions in the rhizosphere. *Rhizosphere*, 18, 100344. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100344>
- Nout, M. J. R. (2014). Food Technologies: Fermentation. En Y. Motarjemi (Ed.), *Encyclopedía of Food Safety* (pp. 168-177). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00270-5>
- Nunes, M. C. N., Emond, J.-P., Dea, S., & Yagiz, Y. (2011). Distribution center and retail conditions affect the sensory and compositional quality of bulk and packaged slicing cucumbers. *Postharvest Biology and Technology*, 59(3), 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.10.004>
- Oliveira, T. L. C. de, Ramos, A. L. S., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Cristianini, M. (2015). Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 60-85. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.007>
- Patil, S., Dhumal, S., Patgaonkar, D., Garande, V., & Kaur, M. (2017). Post-Harvest Behavior of Different Lettuce Cultivars and their Cut Form sunder Different Storage Conditions. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2, 1232-1246. <https://doi.org/10.22161/ijeab/2.3.29>
- Perczak, A., Goliński, P., Bryła, M., & Waśkiewicz, A. (2018). The efficiency of lactic acid

- bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 69(1), 32-45. <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3051>
- Piard, J., & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le Lait*, 71(5), 525-541.
- Pink, D. A. C., & Keane, E. M. (1993). 40 - Lettuce: *Lactuca sativa* L. En G. Kalloo & B. O. Bergh (Eds.), *Genetic Improvement of Vegetable Crops* (pp. 543-571). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-040826-2.50044-8>
- Poisson, L., Blank, I., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2017). Chapter 12—The Chemistry of Roasting—Decoding Flavor Formation. En B. Folmer (Ed.), *The Craft and Science of Coffee* (pp. 273-309). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803520-7.00012-8>
- Ponce Vaca, L. A., Orellana Suarez, K. D., Acuña Velásquez, I. R., Alfonso Alemán, J. L., & Fuentes Figueroa, T. (2018). Situación de la caficultura ecuatoriana: Perspectivas. *Revista Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina*, 6(1), 307-325.
- Puerta-Quintero, G. I., & Ríos-Arias, S. (2011). *COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MUCÍLAGO DE CAFÉ, SEGÚN EL TIEMPO DE FERMENTACIÓN Y REFRIGERACIÓN*. 18.
- Puri, K. D., Vallad, G. E., Qin, Q.-M., Hayes, R. J., & Subbarao, K. V. (2019). Harvest of Lettuce from *Verticillium*-Infested Fields Has Little Impact on Postharvest Quality. *Plant Disease*, 103(4), 668-676. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0546-RE>
- Raman, J., Kim, J.-S., Choi, K. R., Eun, H., Yang, D., Ko, Y.-J., & Kim, S.-J. (2022). Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7784. <https://doi.org/10.3390/ijms23147784>

- Rochfort, S. J., & Jones, R. (2011). Chapter 30—Glucosinolate Phytochemicals from Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* L.) Seeds and Their Potential Health Effects. En V. R. Preedy, R. R. Watson, & V. B. Patel (Eds.), *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (pp. 253-261). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10030-1>
- Rodríguez, D. A., Ortega-Toro, R., Piñeros-Castro, Y., Rodríguez, D. A., Ortega-Toro, R., & Piñeros-Castro, Y. (2018). Propiedades Fisicoquímicas, Funcionales y Microbiológicas de Lechuga (*Lactuca sativa* L.) adicionada con Ácidos Orgánicos. *Información tecnológica*, 29(4), 21-30. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000400021>
- Russo, P., de Chiara, M. L. V., Vernile, A., Amodio, M. L., Arena, M. P., Capozzi, V., Massa, S., & Spano, G. (2014). Fresh-Cut Pineapple as a New Carrier of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *BioMed Research International*, 2014, e309183. <https://doi.org/10.1155/2014/309183>
- Sánchez-González, L., Quintero Saavedra, J. I., & Chiralt, A. (2013). Physical properties and antilisterial activity of bioactive edible films containing *Lactobacillus plantarum*. *Food Hydrocolloids*, 33(1), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.011>
- Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2020). Chapter 7—Wetland Ecosystems. En W. H. Schlesinger & E. S. Bernhardt (Eds.), *Biogeochemistry (Fourth Edition)* (pp. 249-291). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814608-8.00007-4>
- Sepúlveda, W. S., Ureta, I., Mendoza, C., & Chekmam, L. (2018). Ecuadorian Farmers Facing Coffee and Cocoa Production Quality Labels. *Journal of International Food & Agribusiness Marketing*. <https://doi.org/10.1080/08974438.2017.1413612>
- Serra, B., Zhang, J., Morales, M. D., de Prada, A. G.-V., Reviejo, A. J., & Pingarrón, J. M. (2008). A rapid method for detection of catalase-positive and catalase-negative bacteria

- based on monitoring of hydrogen peroxide evolution at a composite peroxidase biosensor. *Talanta*, 75(4), 1134-1139. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.009>
- Sharma, D., & Rao, D. (2013). BIOCHEMICAL ANALYSIS OF CABBAGE (BRASSICA OLERACEA) AFTER INFECTION OF PEST. *INTERNATIONAL RESEARCH JOURNAL OF PHARMACY*, 4, 127-130. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04628>
- Smith, R. F. (1985). A History of Coffee. En M. N. Clifford & K. C. Willson (Eds.), *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (pp. 1-12). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1_1
- Sosa, F., Marguet, E., & Vallejo, M. (2022). Cambios en la concentración de ácido fítico, fósforo libre y hierro soluble durante la fermentación de repollo blanco y repollo chino. *Bionatura*, 7(2), 1-6. <https://doi.org/10.21931/RB/2022.07.02.3>
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01233-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01233-0)
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). Plant physiology and development. *Plant Physiology and Development.*, Ed. 6. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173165866>
- Thomas, B. (2018). Lactic acid bacteria: Their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 6(2). <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- Trias, R., Bañeras, L., Montesinos, E., & Badosa, E. (2009). Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 11, 231-236. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.66>

- Tumbariski, Y., Lante, A., & Krastanov, A. (2018). Immobilization of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and Possibilities for Application in Food Biopreservation. *The Open Biotechnology Journal*, 12(1). <https://doi.org/10.2174/1874070701812010025>
- Tumbariski, Y., Nikolova, R., Petkova, N., Ivanov, I., & Lante, A. (2019). Biopreservation of Fresh Strawberries by Carboxymethyl Cellulose Edible Coatings Enriched with a Bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47. *Food Technology and Biotechnology*, 57(2), 230-237. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6128>
- Vargas-Arcila, M., Cartagena-Valenzuela, J. R., Franco, G., Correa-Londoño, G. A., Quintero-Vásquez, L. M., Gaviria-Montoya, C. A., Vargas-Arcila, M., Cartagena-Valenzuela, J. R., Franco, G., Correa-Londoño, G. A., Quintero-Vásquez, L. M., & Gaviria-Montoya, C. A. (2017). Changes in the physico-chemical properties of four lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties during storage. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 257-273. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:632
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Yost, C. K. (2014). BIOPRESERVATION. En M. Dikeman & C. Devine (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)* (pp. 76-82). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00111-2>
- Zhang, H., HuangFu, H., Wang, X., Zhao, S., Liu, Y., Lv, H., Qin, G., & Tan, Z. (2021). Antibacterial Activity of Lactic Acid Producing *Leuconostoc mesenteroides* QZ1178 Against Pathogenic *Gallibacterium anatis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.630294>

Zinedine, A., Faid, M., & Benlemlih, M. (2005). In Vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY*, 8530, 7-1.

Zinoviadou, K. G., Gougouli, M., & Biliaderis, C. G. (2016). Chapter 9—Innovative Biobased Materials for Packaging Sustainability. En C. M. Galanakis (Ed.), *Innovation Strategies in the Food Industry* (pp. 167-189). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803751-5.00009-X>