



“Obtención y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (Placenta) Nacional y CCN-51, para la bioconservación de vegetales IV Gama (Mínimamente procesados)”

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

Autor: Tapia Chávez, Edwin Geovanny

Tutora: Sánchez Llaguno, Sungey Naynee PhD.

Santo Domingo, Ecuador
2023

INTRODUCCIÓN

Theobroma cacao L.

- Árbol perteneciente a las Malváceas.
- De origen sudamericano, su fruto es utilizado ampliamente en la industria alimentaria.
- En Ecuador, se cultiva en Los Ríos, Santo Domingo, Guayas y Manabí.
- 4 variedades son las más consumidas y exportadas.



Su placenta

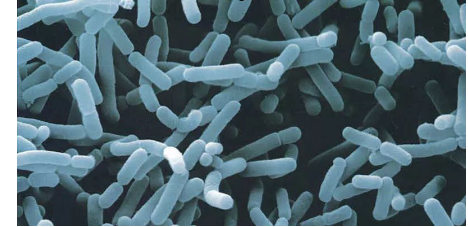
Es el eje central de la mazorca, de aspecto fibroso y húmedo. Alto contenido de azúcares, fibra y proteína

Fermentación

Proceso que se inicia por levaduras, quienes transforman los azúcares en alcohol y CO₂. Los ácidos del cacao favorece la presencia de BAL durante la fermentación.

Son aquellos que pasaron por un proceso (lavado, trozado, etc) antes de su consumo.

Vegetales IV Gamma



Bacterias gram positivas, formas de coco y bacilo, tienen propiedades antimicrobianas.

Bacterias ácido lácticas

OBJETIVOS

Objetivo General

- ❑ Obtener y Caracterizar bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (Placenta) Nacional y CCN-51, para la bioconservación en vegetales mínimamente procesados (IV Gamma)

Objetivos Específicos

- ❑ Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas presentes en la placenta de cacao considerando dos variedades: Nacional y CCN-51
- ❑ Evaluar el efecto de la aplicación de las bacterias ácido lácticas para la bioconservación en vegetales mínimamente procesados (IV Gamma): Uvilla y Tomate
- ❑ Determinar mediante análisis físico químicos y microbiológicos la influencia del bioconservante aplicado en los vegetales mínimamente procesados (IV Gamma)

HIPÓTESIS

Factor A

Ho: La aplicación de solución bacteriana con diferentes concentraciones no influye en la bioconservación de los vegetales.

Ha: La aplicación de solución bacteriana con diferentes concentraciones influye en la bioconservación de los vegetales.

Factor B

Ho: El tipo de vegetal no influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

Ha: El tipo de vegetal influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

HIPÓTESIS

Factor C

Ho: La temperatura ambiente y refrigeración no influyen en la bioconservación de los vegetales.

Ha: La temperatura ambiente y refrigeración influyen en la bioconservación de los vegetales.

Interacción A*B*C

Ho: El efecto de las interacciones entre los factores concentraciones de solución bacteriana, tipo de vegetal y acondicionamiento no influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

Ha: El efecto de las interacciones entre los factores concentraciones de solución bacteriana, tipo de vegetal y acondicionamiento influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

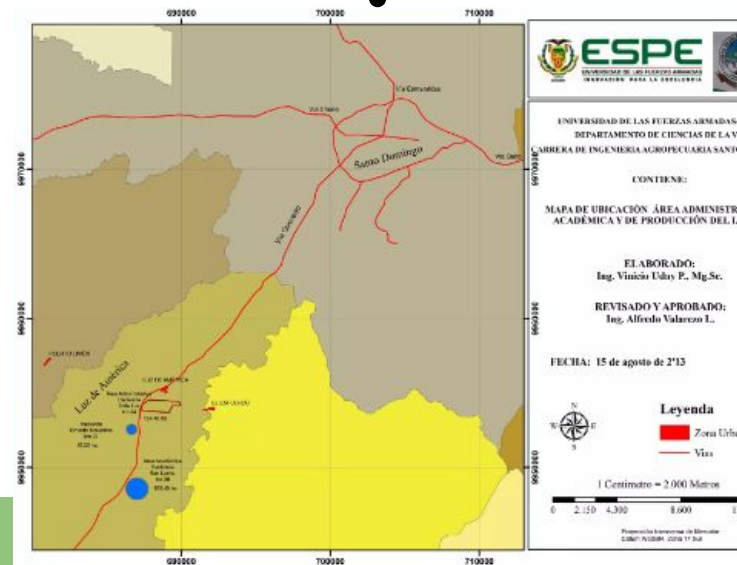
METODOLOGÍA

Ubicación política

País: Ecuador
Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón: Santo Domingo
Parroquia: Luz de América
Sector: Km. 24 vía Santo Domingo-Quevedo

Ubicación ecológica

| | | | |
|----------------------|--------------------|--------------------------|------------------|
| Zona de vida: | B. húmedo tropical | Precipitación: | 2860 mm/año |
| Altitud: | 224 msnm | Humedad relativa: | 85 % |
| Temperatura: | 24,7 °C | Suelos: | Francos arenosos |



METODOLOGÍA

Obtención de materia prima



Se desinfectó la mazorca con agua hervida, luego se trituró la placenta y se colocó en un recipiente con trampa de aire.

Fermentación

Se dejó fermentar durante 72 horas.

Caracterización fisicoquímica y microbiológica del mosto

pH

Acidez titulable

Sólidos solubles

Grados alcohólicos

Petrifilm

Mohos y Levaduras

BAL

Aerobios

METODOLOGÍA

Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas

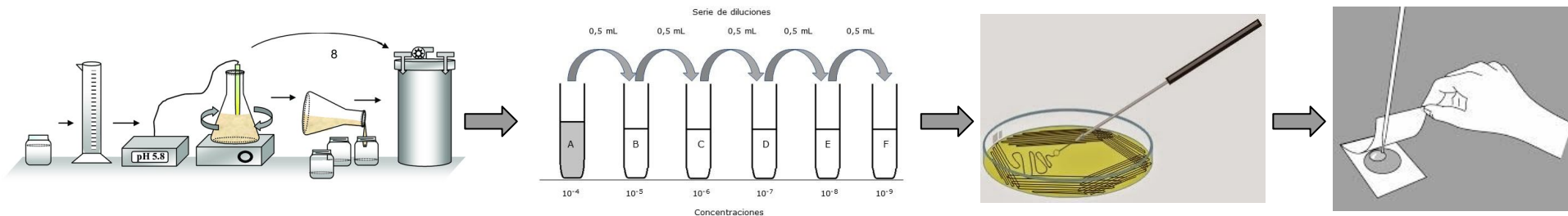
Se preparó el medio Agar MRS y agua peptona.

Se dispensó en cajas petri

Se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-4} con las muestras de las 2 variedades de cacao.

Se sembró en placas petri con el método de extensión

Se sembró en petrifilm de BAL.

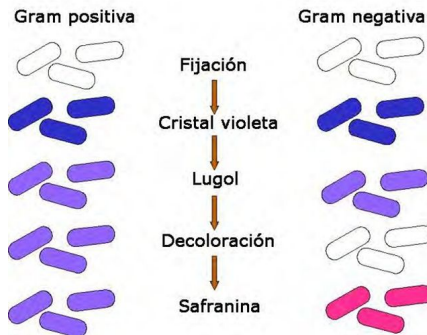


METODOLOGÍA

Identificación de la Bacteria Ácido Láctica

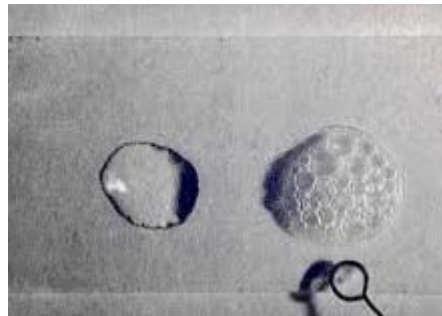
Identificación microscópica

Se realizó una tinción gram y se visualizó en el microscopio



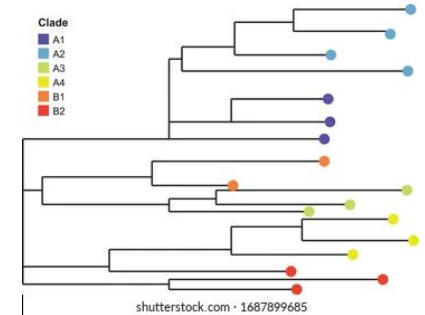
Identificación bioquímica

Se realizó la prueba de catalasa para ver si da positivo o negativo



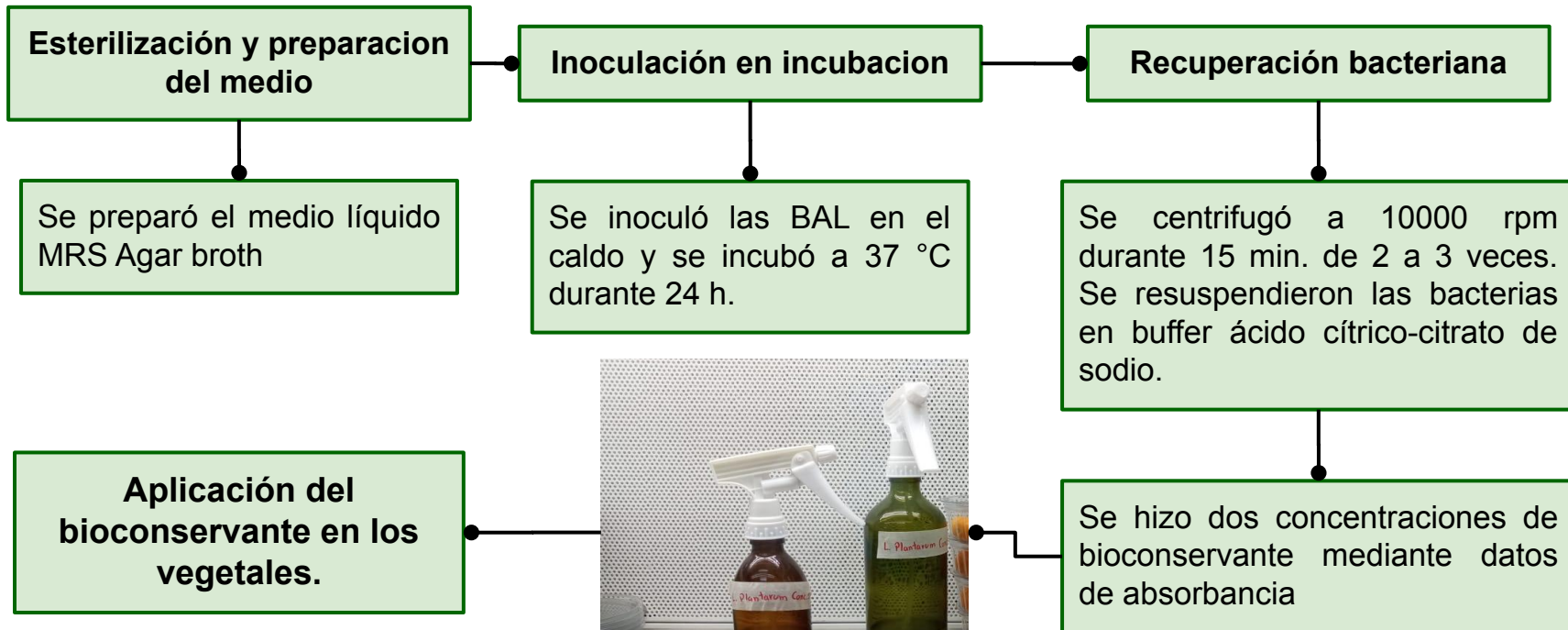
Identificación molecular

Se envió a la empresa Macrogen Inc. y se realizó la filogenia



METODOLOGÍA

Preparación de solución bioconservante



METODOLOGÍA

Análisis de variables físicoquímicas

pH

NORMA INEN 389

Mediante el método de potenciómetro



acidez

NORMA INEN 381

Mediante titulación con NaOH
0,1 N

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

humedad

20 gr de la muestra en la estufa a 130°
C durante 2 h.

$$\%H = \frac{W_2 - W_1}{W_0} * 100$$

ceniza

20 gr de la muestra quemada, en la
mufla a 600°C por 3 h.

$$\%C = \frac{W_2 - W_1}{W_0} * 100$$

dureza

Se tomó datos con el penetrómetro en
3 puntos de la fruta.



METODOLOGÍA

Análisis microbiológico

Esterilización y preparación del medio

Se utilizó el medio Agar MRS

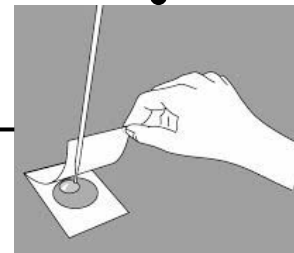
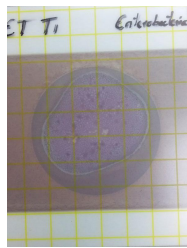
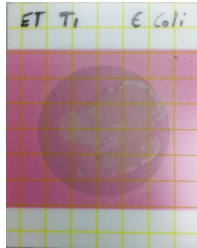
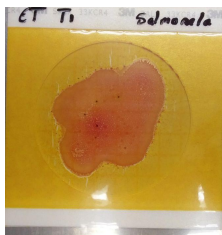
Diluciones seriadas

Se trituró la muestra y se realizaron diluciones hasta 10^{-5} de una muestra de vegetal.

Siembra en petrifilm

Se sembró en petrifilm de aerobios, mohos y levaduras.

Al mejor tratamiento se le analizó crecimiento en petrifilm de *e. coli*, *salmonella* y enterobacterias.



METODOLOGÍA

Diseño Experimental

Factores y niveles de experimentación

| Factores | Simbología y niveles |
|----------------------------------|---|
| Concentración bioconservante (A) | a0: 1×10^{15} UFC/ml a1: 8×10^8 UFC/ml |
| Tipo de vegetal (B) | b0: Tomate b1: Uvilla |
| Acondicionamiento (C) | c0: Con refrigeración c1: Sin refrigeración |

Tipo de diseño

Se aplicó un ANOVA DBCA (Diseño de bloques completos al azar) con un arreglo factorial $A*B*C$ ($2 \times 2 \times 2$)

Repeticiones

Se realizó con 3 réplicas por cada tratamiento, teniendo un total de 24 unidades experimentales.

Tratamientos a comparar

| N° | Interacciones | Unidades |
|----|---------------|---|
| T1 | a0b0c0 | 1×10^{15} UFC/ml+tomate+refrigeración. |
| T2 | a0b0c1 | 1×10^{15} UFC/ml+tomate+sin refrigeración. |
| T3 | a0b1c0 | 1×10^{15} UFC/ml+uvilla+refrigeración. |
| T4 | a0b1c1 | 1×10^{15} UFC/ml+uvilla+sin refrigeración. |
| T5 | a1b0c0 | 8×10^8 UFC/ml+tomate+refrigeración. |
| T6 | a1b0c1 | 8×10^8 UFC/ml+tomate+sin refrigeración. |
| T7 | a1b1c0 | 8×10^8 UFC/ml+uvilla+refrigeración. |
| T8 | a1b1c1 | 8×10^8 UFC/ml+uvilla+sin refrigeración. |

RESULTADOS Y DISCUSION

Mosto de cacao

Caracterización fisicoquímica

| Parámetros analizados | Unidades | Fresco | | Fermentado | |
|-----------------------|----------|----------|--------|------------|--------|
| | | Nacional | CCN-51 | Nacional | CCN-51 |
| pH | NA | 3,51 | 3,55 | 3,98 | 3,87 |
| Acidez | % | 1,15 | 1,22 | 1,86 | 1,72 |
| Sólidos solubles | °Brix | 14 | 11,5 | 7 | 8 |
| Grados alcohólicos | °GL | NA | NA | <4°GL | <°4GL |

La acidez aumentó debido a la producción de ácidos orgánicos por los microorganismos presentes (Ortiz et al., 2009)

Los ss disminuyeron por el consumo de azúcares por parte de microorganismos (Vera et al., 2018)

El pH aumentó, debido al aumento de etanol durante la fermentación y al consumo del ácido cítrico como parte del metabolismo de los microorganismos presentes en la placenta de cacao (García González et al., 2019)

RESULTADOS Y DISCUSION

Mosto de cacao

Caracterización microbiológica

| Parámetros analizados | Unidades | Fresco | | Fermentado | |
|--------------------------|----------|----------|--------|-----------------------|----------------------|
| | | Nacional | CCN-51 | Nacional | CCN-51 |
| Aerobios | UFC/ml | NA | NA | $3,2 \times 10^{-3}$ | $4,3 \times 10^{-3}$ |
| Bacterias ácido lácticas | UFC/ml | NA | NA | $2,76 \times 10^{-2}$ | $3,0 \times 10^{-2}$ |
| Mohos y Levaduras | UFC/ml | NA | NA | $1,8 \times 10^{-3}$ | $2,1 \times 10^{-3}$ |

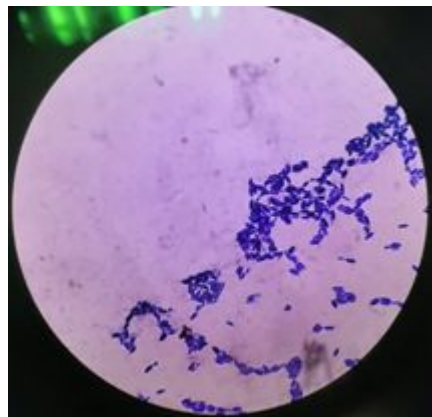
La microbiota en el mosto fermentado demuestra la presencia no solo de BAL sino también de mohos y levaduras, es necesario tomar en cuenta este aspecto ya que la presencia de otros microorganismos afecta el aislamiento de las BAL

Por ende es necesario purificar y aislar varias veces las colonias de BAL

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación de BAL

Variedad Nacional

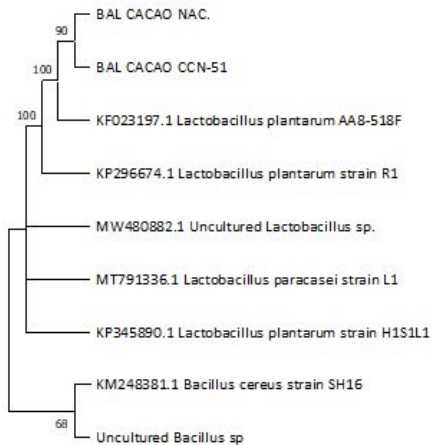


Bacteria gram positiva

Forma de bacilos

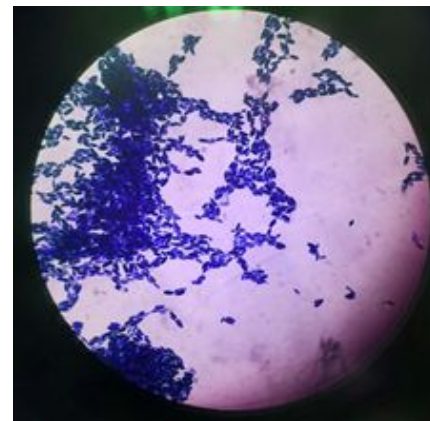
Catalasa negativa

Identificación molecular



Se comparó con otras secuencias, obteniéndose que pertenece a la especie *L. plantarum*

Variedad CCN-51



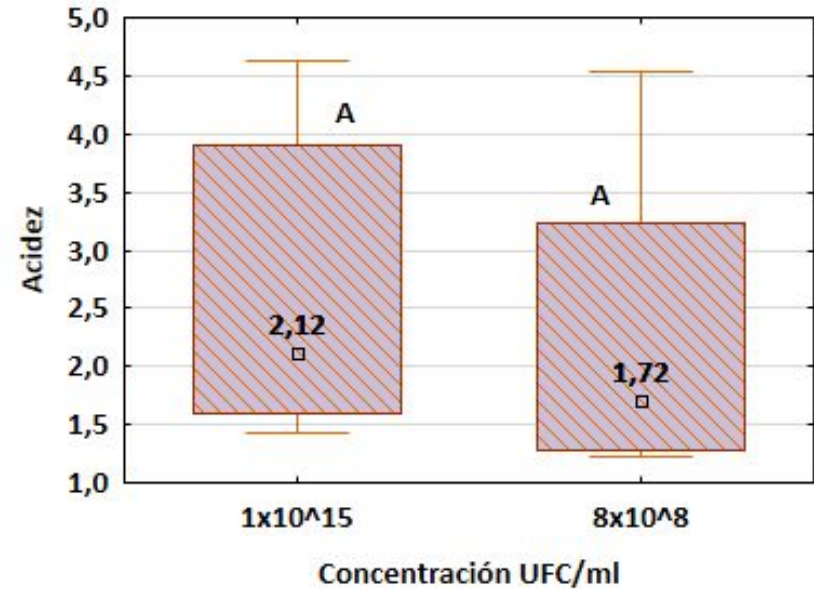
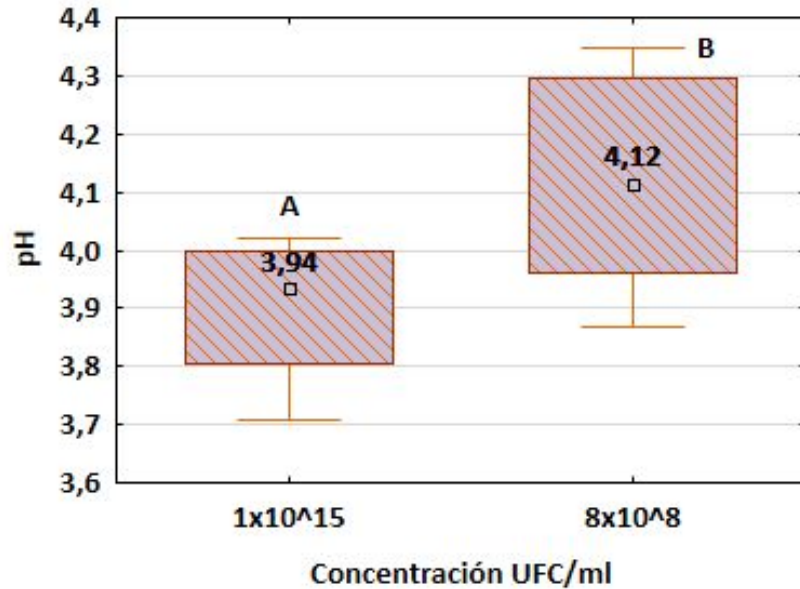
Bacteria gram positiva

Forma de bacilos

Catalasa negativa

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor A (Concetración)

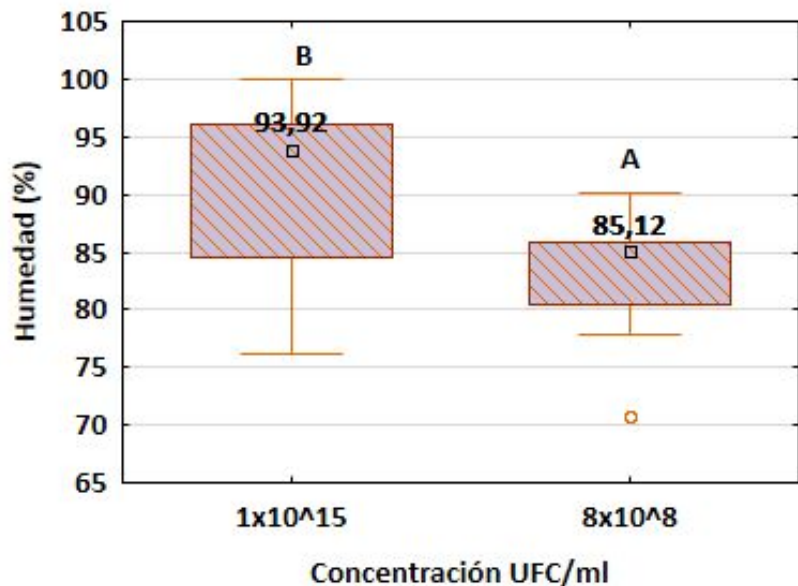


Los ácidos orgánicos de uvilla influyen en el valor de pH (Brito et al., 2008).

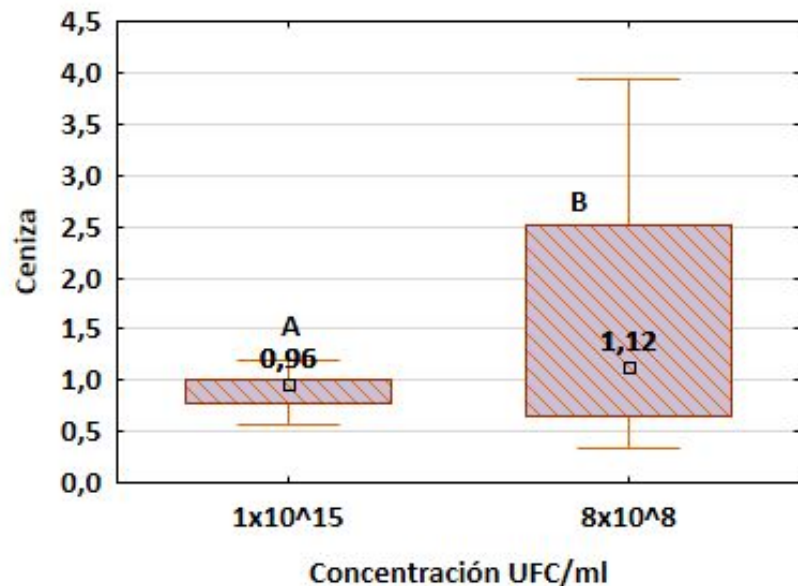
Una mayor concentración conduce a una mayor producción de ácido láctico por parte de las BAL, esto termina en una mayor acidez (Brito et al., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor A (Concetración)



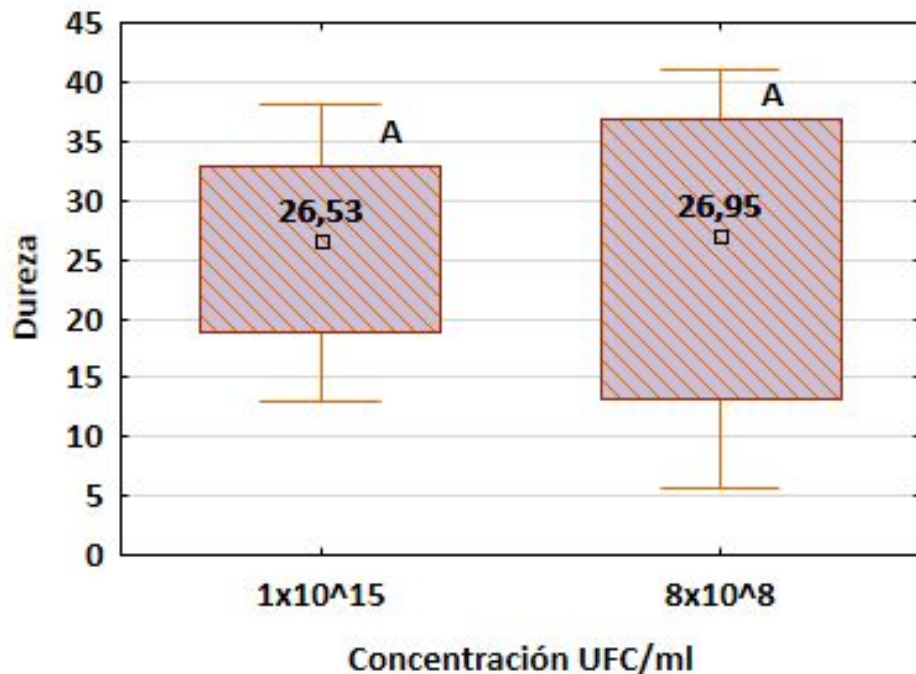
Los compuestos producidos por las BAL afectan la piel de las frutas y acelera la pérdida de peso (Ramirez & Vélez, 2016).



Una menor cantidad de ceniza implica una menor presencia de minerales en la muestra (Wegkamp et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor A (Concetración)



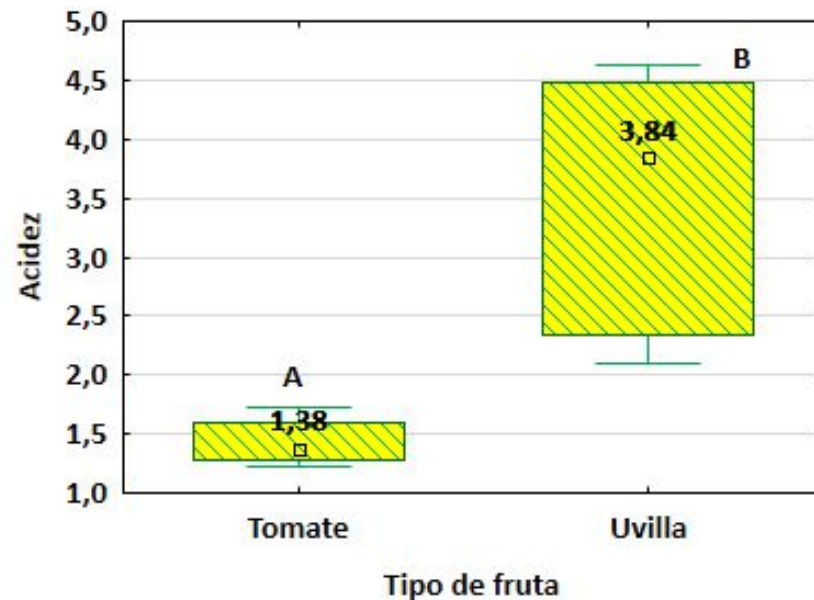
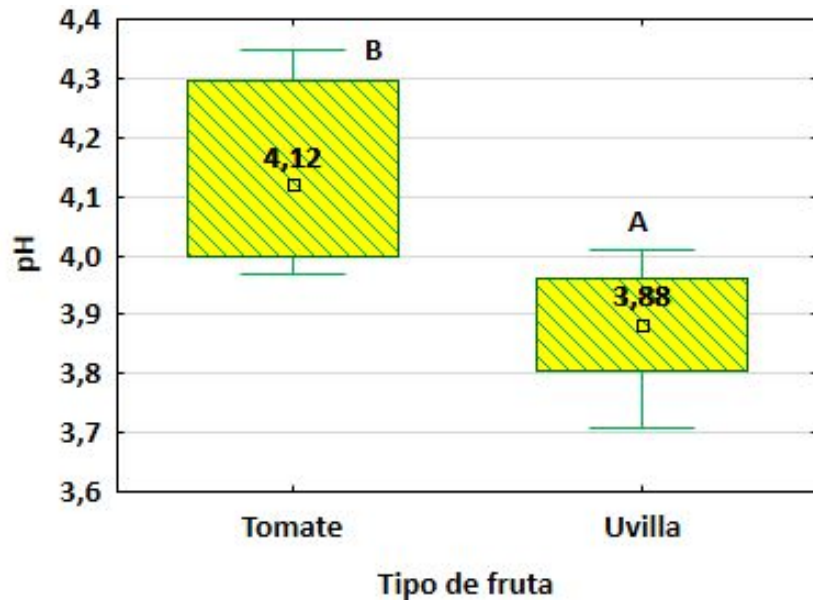
no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con las 2 concentraciones

BAL inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos que suelen descomponer y romper los tejidos externos de los vegetales (Brito et al., 2008).

Esto debilita la piel de los vegetales, por tanto debilita la dureza

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor B (Tipo de vegetal)

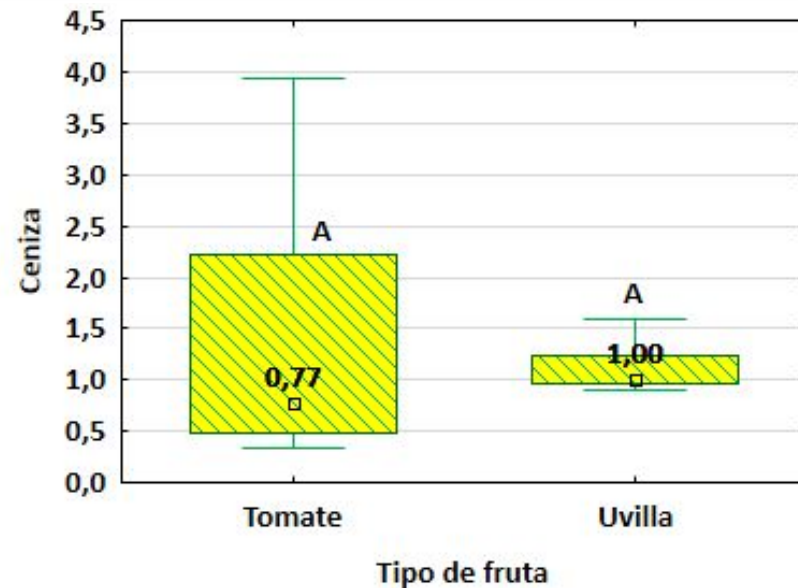
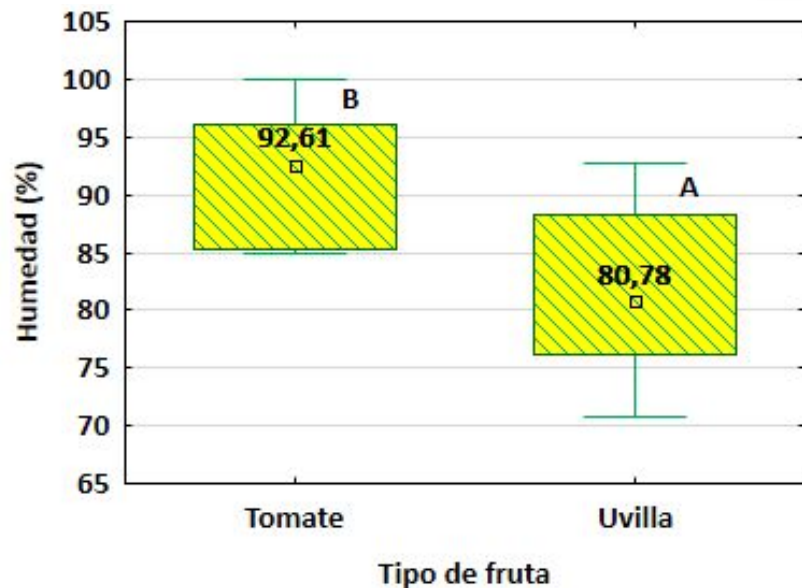


Estos valores se deben principalmente a los contenidos de cada vegetal, siendo la uvilla más ácida (Arias & Brito, 2008).

Mayor cantidad de ácido cítrico en la uvilla que en el tomate, esto conduce consecuentemente a una mayor producción de ácido láctico por parte de BAL (De Porrata & Miranda, 2012).

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor B (Tipo de vegetal)

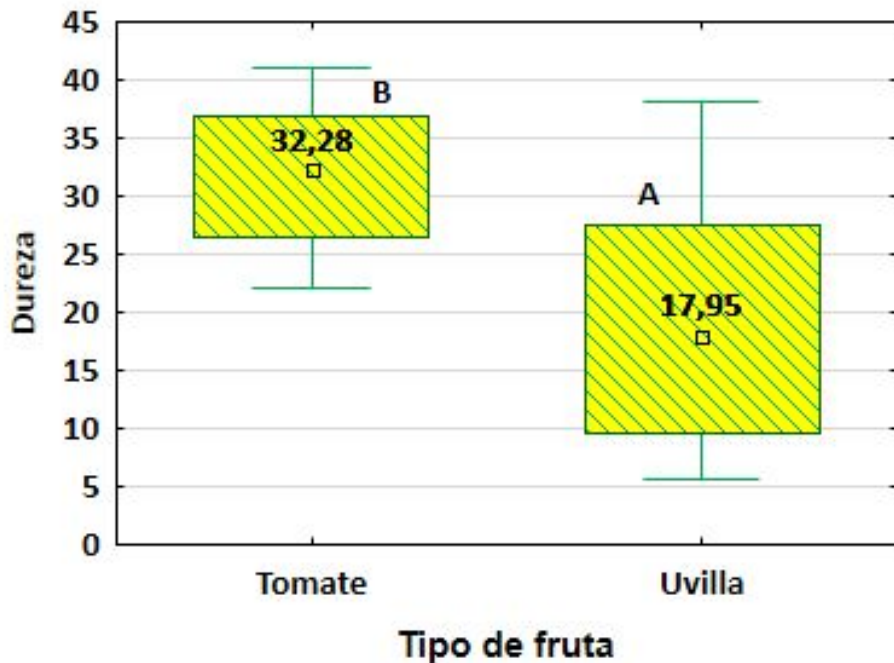


Se debe principalmente a la cantidad de agua presente en cada tipo de vegetal (López et al., 2017).

La cantidad de residuos inorgánicos y minerales no varía entre los vegetales al aplicar la solución bioconservante.

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor A (Concetración)

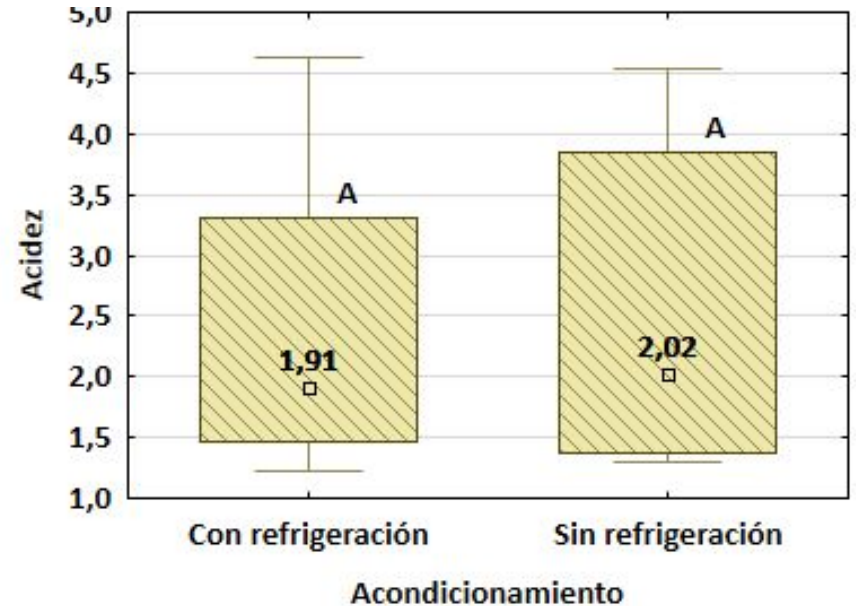
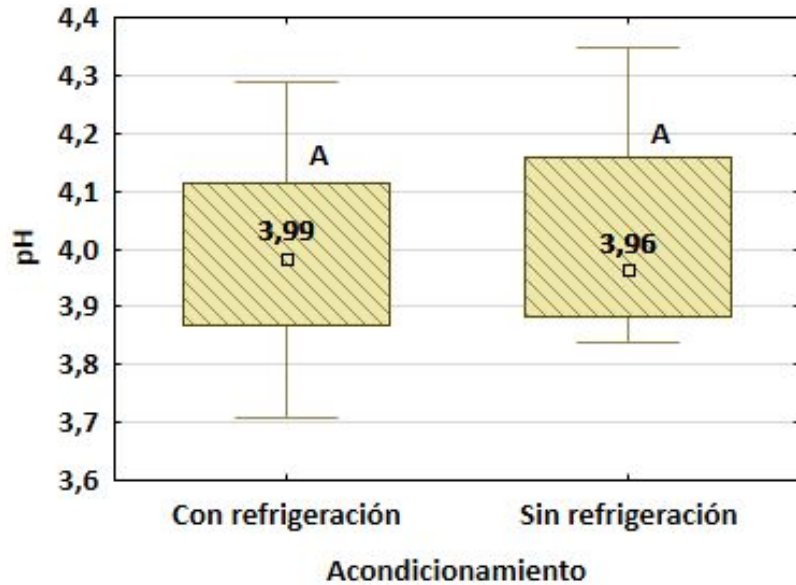


El ácido láctico puede afectar a los tejidos externos de los vegetales (Ponce, 2020)

La piel de la uvilla tiende a romperse fácilmente, entonces la acción de las BAL sobre la piel de la uvilla puede afectar su dureza (Ponce, 2020)

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor C (Acondicionamiento)

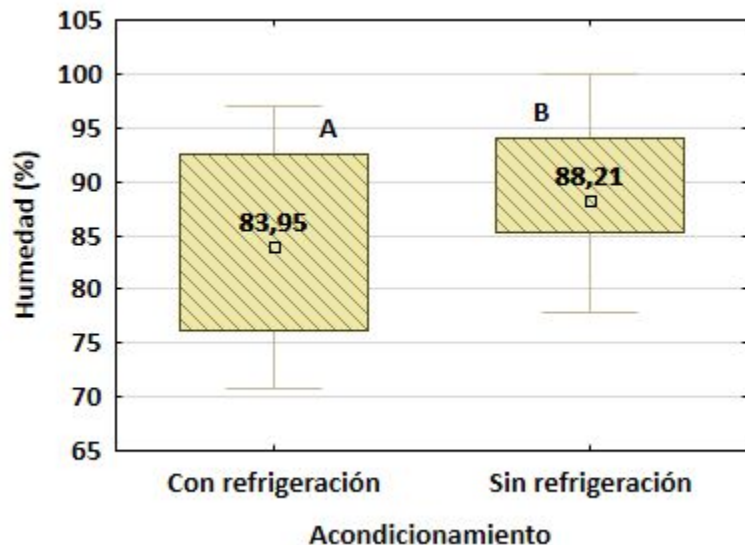


BAL necesita una temperatura óptima de 18°C a 45 °C (Clima, 1955).

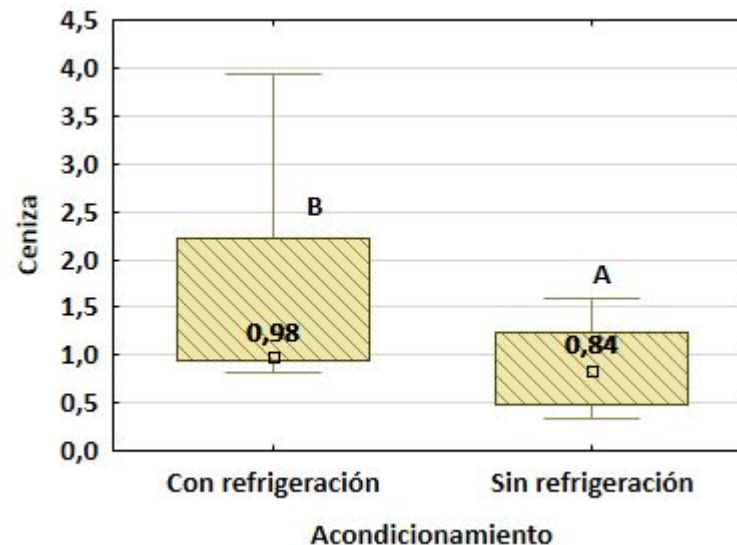
Se debe a la ralentización de los cambios metabólicos naturales del tomate y frutilla, donde los ácidos orgánicos tienden a transformarse en azúcares (Hernández, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor C (Acondicionamiento)



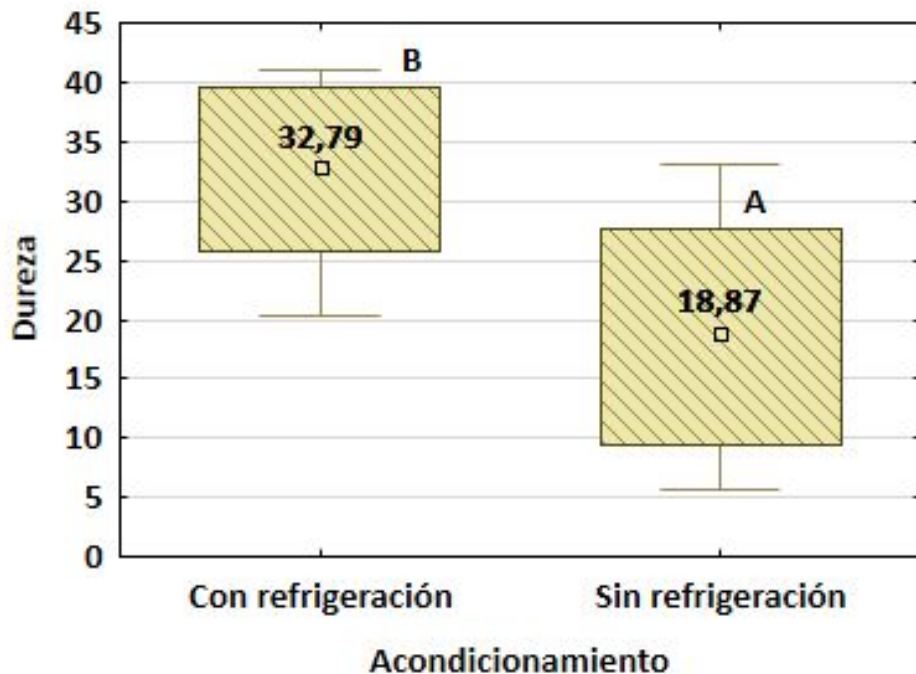
Menor pérdida de peso en los tratamientos con refrigeración (83,95%) en comparación con los tratamientos a temperatura ambiente (88,21%). 12°C es la temperatura óptima (Estrada et al., 2010)



Esta diferencia se debe principalmente al consumo más lento de los minerales (Nitrógeno y Azufre) por parte de las BAL debido a las bajas temperaturas (Wegkamp et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSION

Factor C (Acondicionamiento)



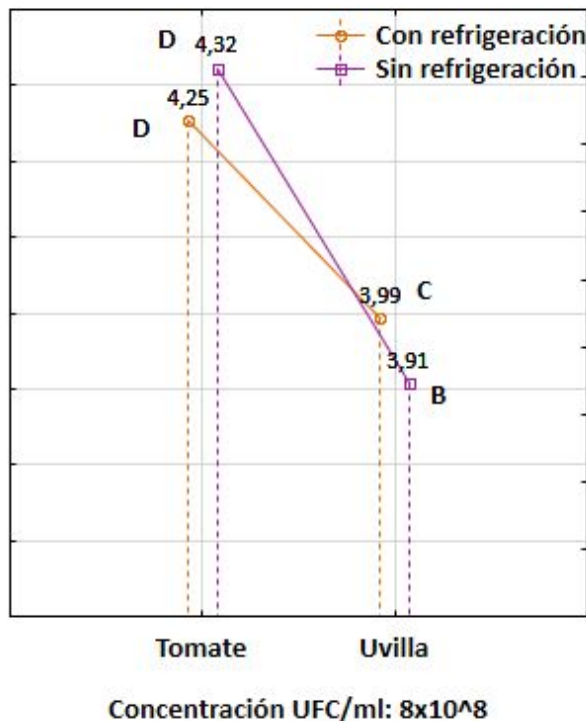
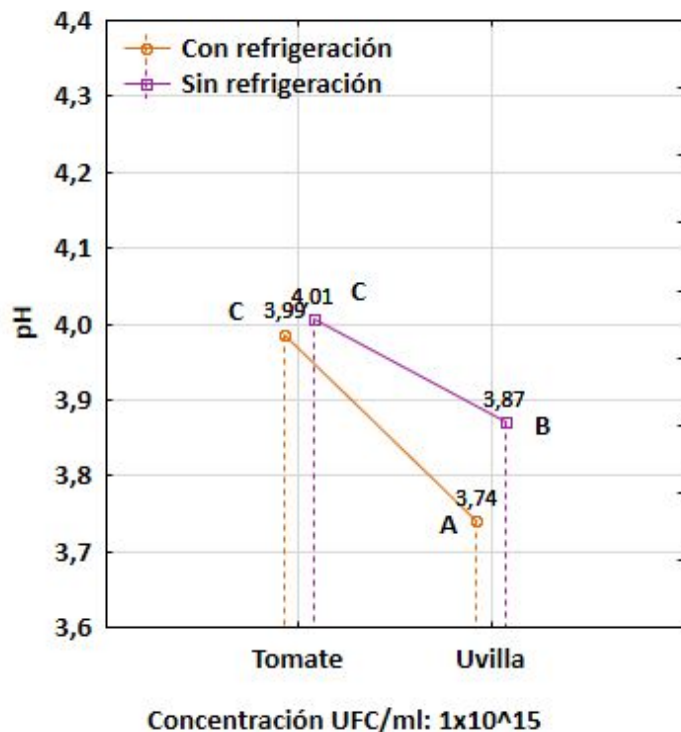
La mayor dureza en las muestras refrigeradas se debe principalmente a dos causas:

Las bajas temperaturas es un ambiente hostil y poco favorable para el crecimiento de hongos y bacterias como *e. coli* (Wheatly, 2022).

Efecto inhibitor de las BAL sobre los microorganismos patógenos

RESULTADOS Y DISCUSION

Interacción A*B*C



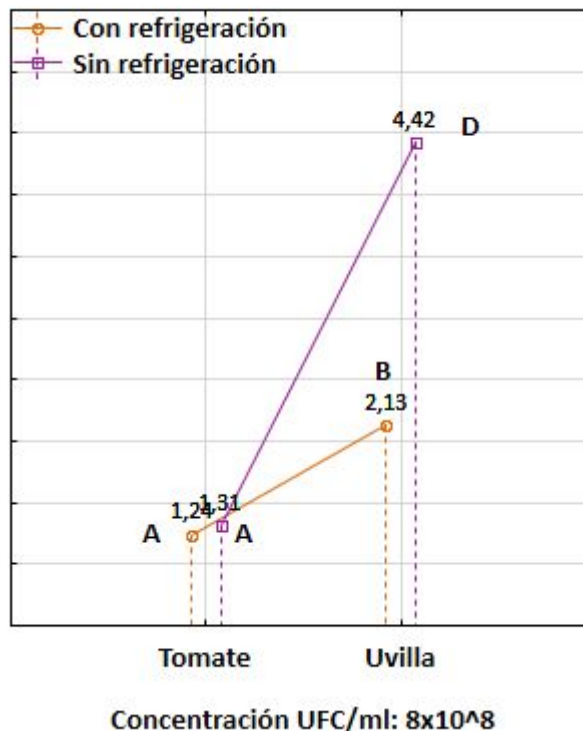
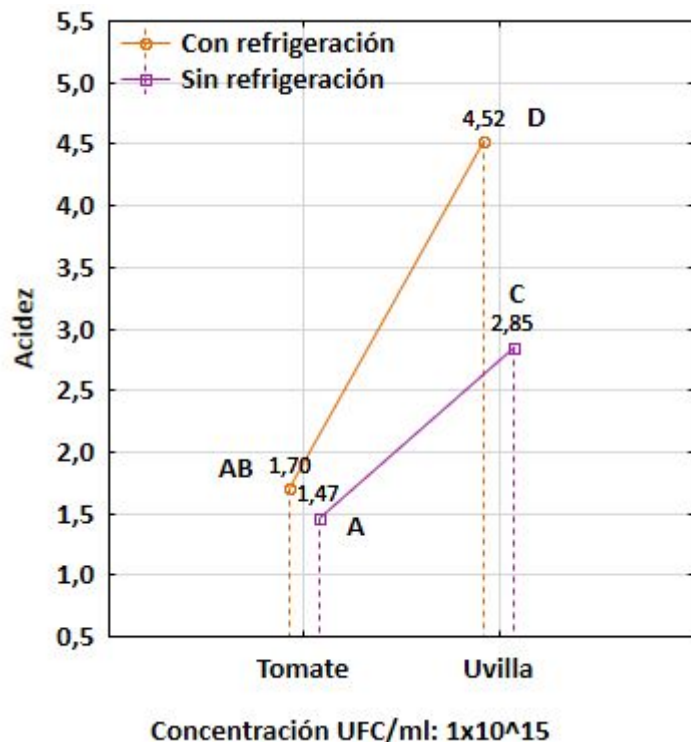
Tratamientos a0b1c0 y a0b1c1 obtuvieron menores valores de pH.

valores menores de pH demuestra una mayor producción de ácido láctico.

Correlación negativa entre pH y acidez, menores valores de pH deben dar valores mayores de acidez.

RESULTADOS Y DISCUSION

Interacción A*B*C

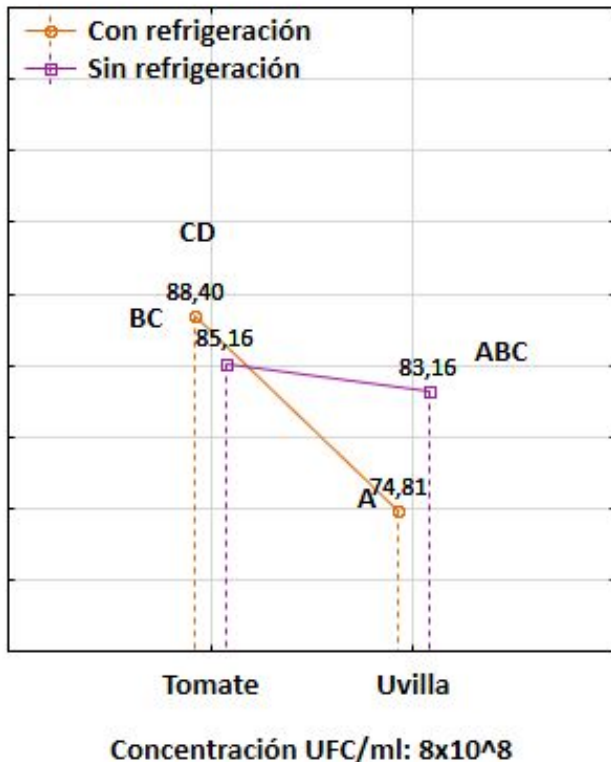
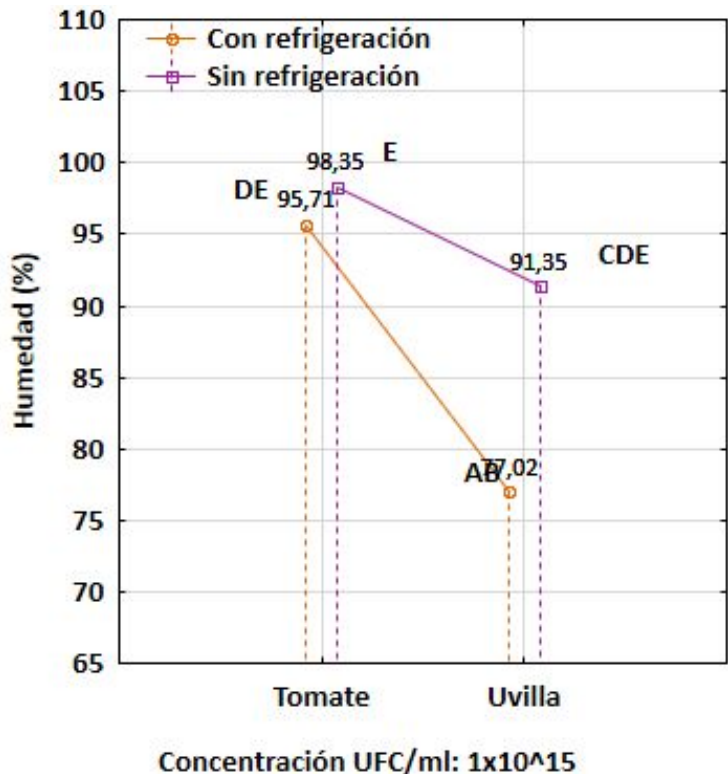


Tratamientos a0b1c0 y a0b1c1 obtuvieron valores mayores de acidez

Mayor presencia de ácido láctico por parte de las BAL.

RESULTADOS Y DISCUSION

Interacción A*B*C

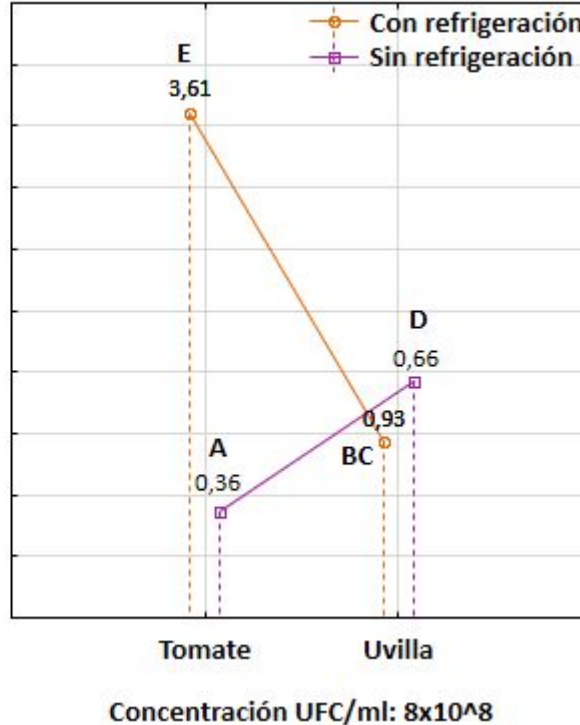
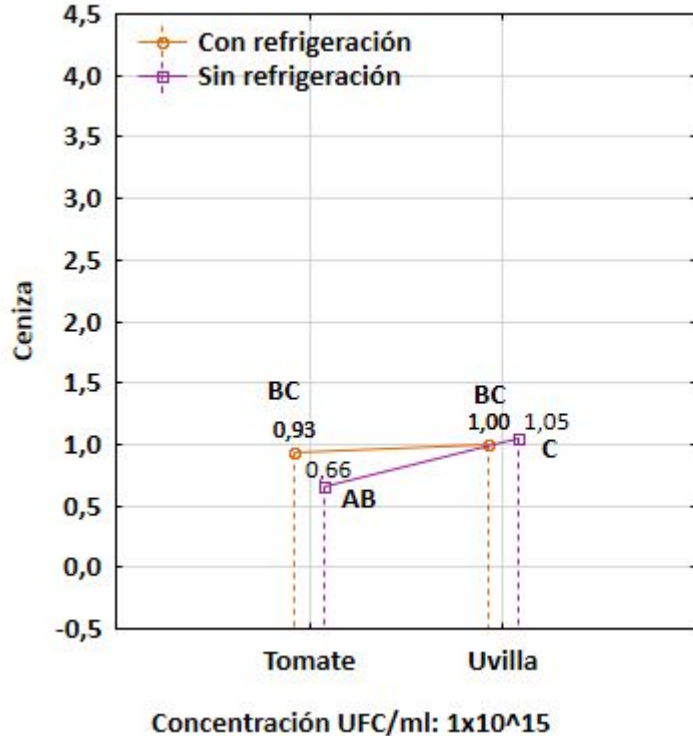


Este resultado se debe en parte al factor B, es decir, el tipo de vegetal, ya que el tomate contiene mucha más agua en su composición (Ruíz et al., 2006).

Un factor clave que influye en los valores de humedad es el acondicionamiento, debido al microambiente que se genera al conservar las muestras dentro del recipiente a bajas temperaturas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Interacción A*B*C

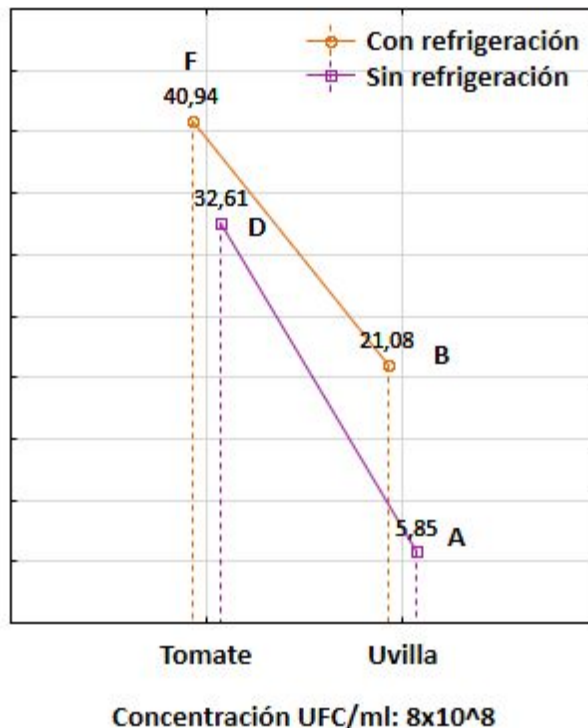
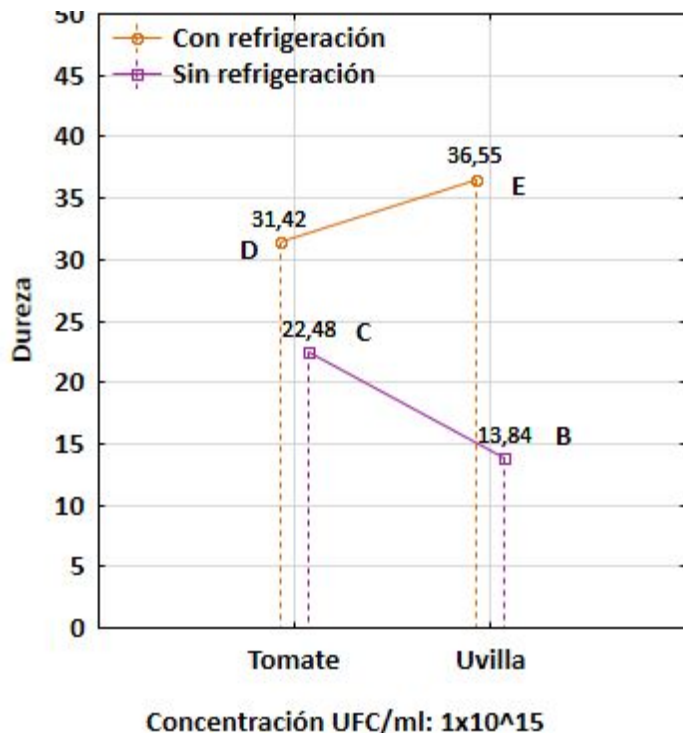


Tratamiento a1b0c0 obtuvo mejores valores de ceniza

Debido a que contiene mayor contenido de minerales y dando a entender que el efecto de las BAL no afecta de manera significativa a la cantidad de minerales o residuos inorgánicos (Quiroz, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSION

Interacción A*B*C



Tratamiento a1b0c0 obtuvo mejores valores de dureza

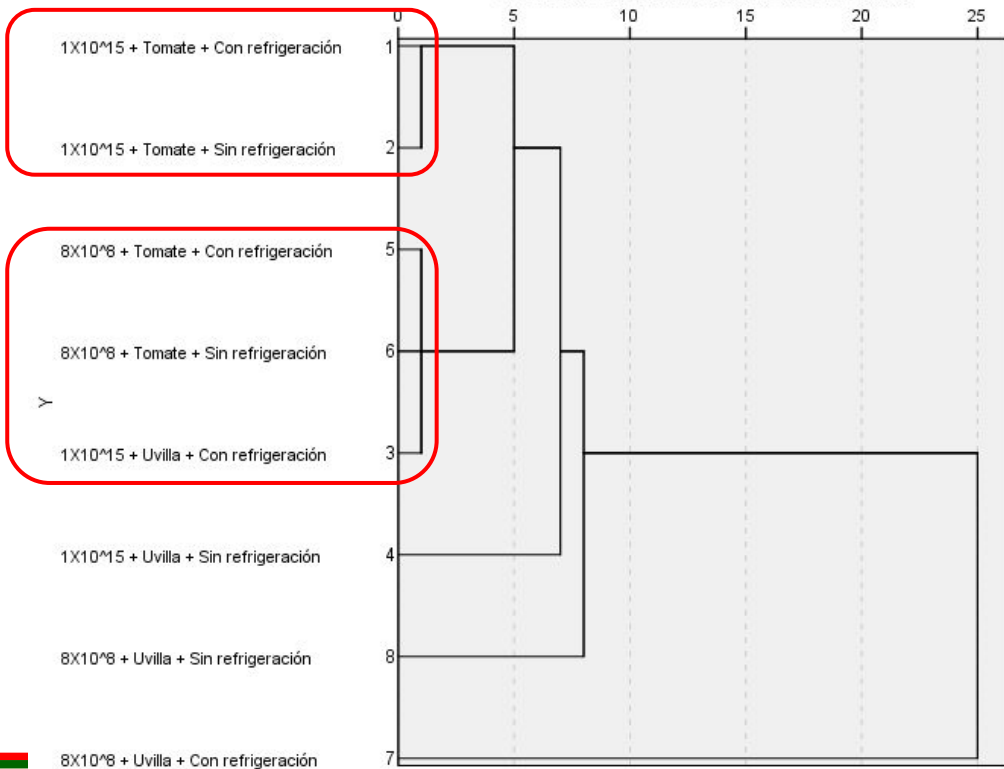
Una mayor preservación en buen estado de las frutas con refrigeración

esto complementado con la concentración de la solución bacteriana, ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos que rompen y debilitan la piel de las frutas (Palacio & Cambra, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSION

Interacción A*B*C

Dendrograma que utiliza un enlace único
Combinación de clúster de distancia re-escalada



Tratamientos a0b0c0 y a0b0c1 mostraron estrecha relación, diferencia menor al 5 %.

Tienen los niveles de concentración y tipo de vegetal en común

Los grupos que menor relación presentaron son a1b1c1 y a1b1c0

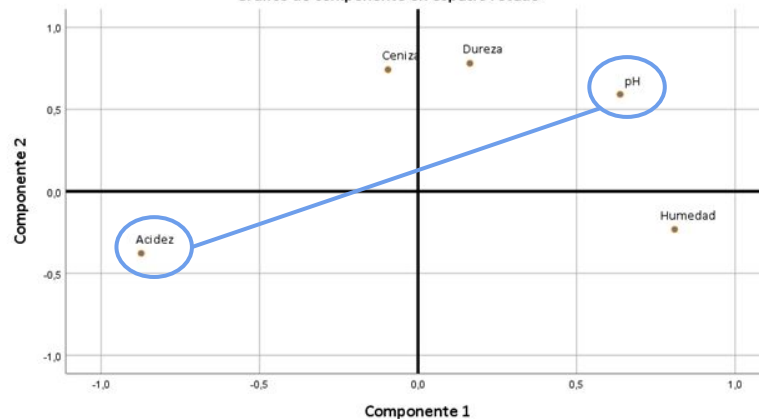
RESULTADOS Y DISCUSION

Correlación multivariable

| | pH | Acidez | Humedad | Ceniza | Dureza |
|---------|-------|--------|---------|--------|--------|
| pH | 1,000 | -,792 | ,195 | ,285 | ,410 |
| Acidez | -,792 | 1,000 | -,503 | -,123 | -,420 |
| Humedad | ,195 | -,503 | 1,000 | ,004 | -,008 |
| Ceniza | ,285 | -,123 | ,004 | 1,000 | ,327 |
| Dureza | ,410 | -,420 | -,008 | ,327 | 1,000 |

Correlación

Gráfico de componente en espacio rotado

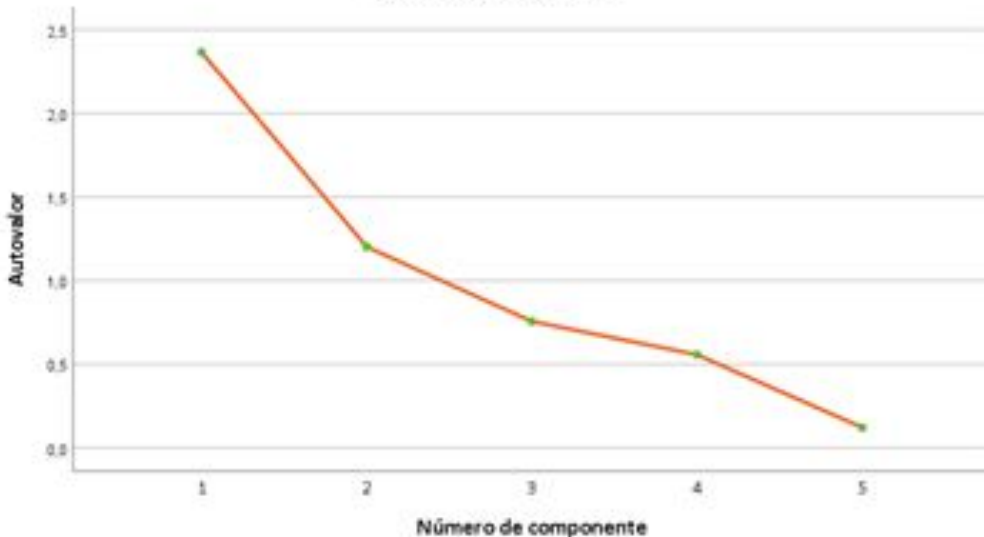


pH tiene una correlación negativa con la acidez, es decir están relacionados de manera inversamente proporcional, mientras el pH aumenta, la acidez baja.

RESULTADOS Y DISCUSION

Componentes principales

Gráfico de sedimentación



| Variable | Componente 1 | Componente 2 |
|----------|--------------|--------------|
| ph | 0,896 | 0,025 |
| acidez | -0,906 | 0,291 |
| humedad | 0,456 | -0,708 |

| Componente | % Varianza |
|------------|------------|
| 1 | 47,302 |
| 2 | 24,033 |

RESULTADOS Y DISCUSION

Recuento bacteriano

Recuento aerobios

| Tratamiento | UFC/ml |
|-------------|----------|
| 1 | 8,20E+04 |
| 2 | 3,10E+03 |
| 3 | 1,05E+03 |
| 4 | 4,00E+04 |
| 5 | 6,70E+02 |
| 6 | 1,40E+04 |
| 7 | 1,05E+03 |
| 8 | 2,40E+04 |

Recuento Mohos y Levaduras

| Tratamiento | UFC/ml |
|-------------|----------|
| 1 | 2,00E-05 |
| 2 | 5,00E-05 |
| 3 | 1,40E-03 |
| 4 | 1,00E-04 |
| 5 | 4,50E-03 |
| 6 | 6,00E-05 |
| 7 | 3,00E-05 |
| 8 | 3,00E-05 |

CONCLUSIONES

Factor A (Concentración bioconservante)

Las variables de pH (3,94), ceniza (0,96) y dureza (26,53) disminuyeron en la concentración 1×10^{15} UFC/ml en comparación con la concentración 8×10^8 UFC/ml.

El bioconservante más concentrado arroja mejores resultados sobre los vegetales, al compararlo con investigaciones similares.

La concentración del bioconservante influye en la bioconservación con BAL.

Factor B (Tipo de vegetal)

Los tratamientos con uvilla obtuvieron mejores resultados en las variables de pH (3,88), acidez (3,84) y humedad (80,78) de acuerdo a investigaciones semejantes.

El tipo de vegetal influye en la bioconservación con BAL.

Factor C (Acondicionamiento)

De acuerdo a los resultados en las variables evaluadas, los tratamientos con refrigeración obtuvieron mejores resultados en las variables de pH (3,96), humedad (83,95) y dureza (32,79).

El acondicionamiento influye en la bioconservación con BAL.

Interacción A*B*C

El tratamiento a0b1c0 es el que mejores resultados arrojó el estudio, con pH de 3,74, acidez de 4,52, pérdida de peso de 77,02%, ceniza 1,00 y dureza 36,55. Las variables más determinantes en la calidad fueron pH, acidez y humedad.

RECOMENDACIONES

El estudio se determinó que las variables de pH, acidez y humedad son las que más influyen y determinan la efectividad de la bioconservación, en base a ello, se recomienda utilizar el bioconservante con 1×10^{15} UFC/ml en la uvilla debido a que, según los resultados, este fue el que mejores valores arrojó (3,74 para pH 4,52 para acidez, 91,35 para humedad).

Se recomienda utilizar la solución bioconservante concentrada en complemento con una refrigeración para tener una mayor conservación de los vegetales.

Es recomendable utilizar cualesquiera de los vegetales, ya sea tomate o uvilla, esto debido a los resultados similares obtenidos al comparar con otras investigaciones, y a que la diferencia de valores obtenidos se debe a la composición propia del vegetal

En cuanto al acondicionamiento, se recomienda aplicar refrigeración, debido a que se conservan mejor los vegetales, y la capacidad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas perdura durante mucho más tiempo

AGRADECIMIENTOS

Dra. Sungey Sánchez

Dr. Juan Neira

Ing. Johan Plua

Giovany Tapia

Cecilia Chávez

Amigos y cercanos

*Muchas
Gracias!*