



**ESPE**  
**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS**  
**INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA**

**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)**

Tapia Chávez, Edwin Geovanny

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, Ph.D.

22 de febrero de 2023

## Reporte de verificación de contenido

CERTIFICADO DE ANÁLISIS  
magister

## TESIS EDWIN

6%  
Similitudes2% Texto entre comillas  
0% similitudes entre comillas  
0% Idioma no reconocido

Nombre del documento: TESIS EDWIN.pdf

ID del

documento: 3fb631cb76cf507e5ad36f068741bbdccc3a7bd

Tamaño del documento original: 2,8 Mo

Depositante: MILTON VINICIO UDAY PATIÑO

Fecha de depósito: 21/2/2023

Tipo de carga: interface

fecha de fin de análisis: 21/2/2023

Número de palabras: 23.831

Número de caracteres: 172.589

Ubicación de las similitudes en el documento:



Firma:

Firmado electrónicamente por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

.....

**Sánchez Llaguno, Sungey Naynee PhD.**

C. C: 1205348873

**Director del Proyecto de Investigación**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“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)”** fue realizado por el señor **Tapia Chávez, Edwin Geovanny**; 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 analizado 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, 22 febrero del 2023**

Firma:



.....

**Sánchez Llaguno, Sungey Naynee PhD.**

C. C: 1205348873

**Director del Proyecto de Investigación**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Tapia Chávez, Edwin Geovanny**, con cédula de ciudadanía N° 2350924011, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“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)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 febrero del 2023**

Firma

**Tapia Chávez, Edwin Geovanny**

C.C.: 2350924011



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Tapia Chávez, Edwin Geovanny**, con cédula de ciudadanía N° 2350924011, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“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)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 febrero del 2023**

Firmas

**Tapia Chávez, Edwin Geovanny**

C.C.: 2350924011

### **Dedicatoria**

El presente trabajo de titulación va dedicado en primer lugar a Dios, quien me ha traído donde estoy ahora y me ha dado fuerzas y voluntad para salir adelante y no perder el camino.

A dos personas que son la razón de estar hoy aquí, mis queridos padres, a mi Madre querida Cecilia Chávez, quien ha sabido ver lo mejor que hay en mí y ser un pilar fundamental en mi vida, un apoyo que va más allá de lo moral. A mi querido Padre Giovany Tapia, la persona más fuerte y perseverante que conozco, mi inspiración; a ustedes dos no me alcanza las palabras para agradecerles, pero esta dedicatoria es una pequeña muestra de ello.

A mi hermana Lizbeth, quien me ha sabido aconsejar a lo largo de mi vida estudiantil y me ha sacado varias sonrisas y enojos.

A todos quienes creyeron en mí y siguen estando en mis mejores y peores momentos.

Finalmente, dedico este trabajo a la vida misma, que me ha permitido experimentar las mejores y peores experiencias, que me ha permitido conocer personas maravillosas y me da esperanza de un futuro mejor.

## **Agradecimiento**

Agradezco a mis padres quienes han dado todo de sí para apoyarme y ayudarme a seguir siempre adelante y no perder la Fé.

A Bryan, Josselyn, Jairo, Nayeli, Freddy, Nicole, Jhon y Cristian que me han acompañado desde el colegio y me han apoyado, les agradezco de corazón y siempre llevo una parte de ustedes conmigo.

A mis amigos Fabian, Angie, Sebas, Oswaldo y Evelyn que conocí en esta etapa Universitaria y con quienes compartí gratos y maravillosos momentos, gracias por estar en mis mejores días y apoyarme en los más difíciles, siempre tendrán un lugar en mi corazón y memoria.

A mis amigos que formaron parte en algún tiempo de mi etapa universitaria, que han estado allí y me han sabido alegrar la vida, he aprendido mucho de cada uno de ustedes, y les estaré siempre agradecido por hacer más divertida esta etapa, agradecer en especial a aquellas amistades con quienes compartí muchas anécdotas este año.

Agradecimientos especiales a mi tutora y docente que me ha sabido guiar en este proceso de titulación, Doctora Sungey Sánchez, y a su esposo el Doctor Juan Neira, les estoy infinitamente agradecido por confiar en mí y guiarme en este trabajo. Un agradecimiento a Johan Plua, quien me guió en el trayecto de la tesis en la interpretación estadística.

A todo aquel docente a lo largo de mi vida estudiantil que me ha sabido inspirar a adquirir más conocimiento, que me han inculcado el valor de la responsabilidad y me han hecho ver lo bonito que es enseñar y compartir conocimiento.

Finalmente agradecer a aquellas personas con quienes compartí algún momento de mi vida y la misma nos ha llevado por caminos distintos, gracias por ayudarme a mejorar como persona y compartir una parte de su vida.

## Índice de contenido

Carátula .....	1
Reporte de verificación de contenido .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento .....	7
Índice de tablas .....	15
Índice de figuras .....	17
Resumen .....	18
Abstract .....	19
Capítulo I .....	20
Introducción .....	20
Objetivos .....	22
Objetivo General .....	22
Objetivos Específicos .....	22
Hipótesis .....	23
Hipótesis para el factor A (Concentración de solución bacteriana) .....	23
Hipótesis para el factor B (Vegetales) .....	23

Hipótesis para el factor C (Acondicionamiento).....	23
Hipótesis para la interacción AXBXC .....	23
Capítulo II.....	24
Revisión de literatura.....	24
Cacao ( <i>Theobroma Cacao L.</i> ).....	24
Generalidades .....	24
Taxonomía .....	25
Variedades .....	25
Composición de la mazorca del cacao.....	27
Placenta del cacao .....	27
Fermentación de la placenta del cacao.....	28
Productos mínimamente procesados (IV Gama).....	29
Alteración de Vegetales Mínimamente Procesados por microorganismos.....	31
Uvilla ( <i>Physalis peruviana L.</i> ).....	31
Generalidades .....	31
Taxonomía y morfología .....	32
Componentes y contenido del fruto .....	33
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	34
Generalidades .....	34
Taxonomía y morfología .....	35

	10
Variedades .....	38
Composición nutricional del tomate .....	39
Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	40
Generalidades .....	40
Taxonomía y características .....	41
Clasificación .....	42
Fermentación del ácido cítrico .....	43
Producción de bacteriocinas .....	43
Biopreservación de alimentos.....	43
Bioconservación de vegetales .....	44
Capítulo III.....	45
Metodología .....	45
Ubicación del área de investigación.....	45
Ubicación política.....	45
Ubicación ecológica .....	45
Ubicación geográfica.....	46
Materiales.....	47
Determinación de pH .....	47
Determinación de Acidez .....	47
Determinación de Sólidos solubles .....	48

Determinación de presencia de bacterias ácido lácticas, microorganismos aerobios, mohos y levaduras.....	48
Aislamiento y purificación de Bacterias ácido lácticas .....	49
Identificación de Bacterias ácido lácticas.....	50
Bioconservación de vegetales mínimamente procesados (IV Gama).....	51
Determinación de humedad .....	52
Determinación de cenizas.....	53
Determinación de dureza.....	53
Métodos.....	53
Obtención de materia prima.....	53
Fermentación de la placenta del cacao.....	54
Características microbiológicas y fisicoquímicas del mucílago fermentado.....	54
Aislamiento de Bacterias ácido lácticas .....	55
Identificación de Bacterias ácido lácticas.....	55
Bioconservación de vegetales mínimamente procesados (IV Gama).....	56
Diseño experimental.....	57
Factores y niveles de experimento .....	57
Tipo de diseño experimental.....	58
Repeticiones .....	58
Análisis estadístico.....	59
Análisis funcional .....	59

	12
Variables evaluadas .....	60
pH .....	60
Determinación de acidez titulable .....	60
Determinación de humedad .....	61
Ceniza.....	61
Dureza.....	62
Recuento microbiano en petrifilm™ .....	62
Capítulo IV .....	64
Resultados .....	64
Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la placenta del cacao.....	64
Identificación de BAL presentes en la fermentación de la placenta de cacao.....	66
Análisis de varianza de análisis fisicoquímicos .....	67
Análisis de varianza para el pH.....	67
Análisis de varianza para la acidez .....	68
Análisis de varianza para la pérdida de humedad (%) .....	69
Análisis de varianza para la ceniza .....	69
Análisis de varianza para la dureza .....	70
Pruebas de significación.....	70
Resultados del estudio de dos concentraciones de Bioconservante (Factor A). Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$ ).....	70
Resultados del estudio de dos Tipo de fruta. Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$ ).....	73

Resultados del estudio de dos acondicionamientos (Factor C). Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$ )	75
Resultados del estudio de interacción entre dos concentraciones, dos tipos de vegetal y dos acondicionamientos (Interacción A*B*C). Prueba de significación (Tukey $p < 0,05$ )	77
Análisis microbiológico	82
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	82
Recuento de Mohos y Levaduras	83
Análisis de conglomerados	84
Análisis de componentes principales	85
Capítulo V	88
Discusión	88
Respecto a la caracterización físico química de la placenta de cacao	88
Respecto al Factor A (Concentración de la solución bioconservante)	90
Respecto al Factor B (Tipo de vegetal)	92
Respecto al Factor C (Acondicionamiento)	94
Respecto a la interacción del Factor A*B*C (Concentración de la solución bioconservante*Tipo de vegetal*Acondicionamiento)	95
Respecto al análisis microbiológico	97
Capítulo VI	98
Conclusiones	98
Factor A (Concentración de la solución bioconservante)	98

Factor B (Tipo de vegetal) .....	98
Factor C (Acondicionamiento) .....	99
Interacción A*B*C (concentración de la solución bioconservante*tipo de vegetal*acondicionamiento) .....	100
Recomendaciones.....	100
Capítulo VIII .....	102
Bibliografía.....	102

### Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> Taxonomía correspondiente al cacao.....	25
<b>Tabla 2</b> Componentes de la placenta de cacao.....	28
<b>Tabla 3</b> Clasificación de la gama de los alimentos. ....	30
<b>Tabla 4</b> Clasificación taxonómica de la uvilla. ....	32
<b>Tabla 5</b> Composición nutricional de la uvilla.....	33
<b>Tabla 6</b> Clasificación taxonómica del tomate.....	36
<b>Tabla 7</b> Composición nutricional del tomate por cada 100 gramos.....	40
<b>Tabla 8</b> Recursos utilizados para la determinación del pH del mosto de cacao y los vegetales de IV gama. .....	47
<b>Tabla 9</b> Recursos utilizados para determinar la acidez titulable del mosto fermentado y los vegetales IV Gama. ....	47
<b>Tabla 10</b> Recursos utilizados para determinar los grados brix del mosto de cacao fermentado. ....	48
<b>Tabla 11</b> Recursos utilizados para determinar la presencia de BAL, aerobios mesófilos, mohos y levaduras del mosto fermentado y los vegetales IV gama. ....	48
<b>Tabla 12</b> Recursos utilizados para aislar las BAL a partir del mosto fermentado y la posterior purificación de las colonias.....	49
<b>Tabla 13</b> Recursos utilizados para la identificación de BAL mediante tinción gram.....	50
<b>Tabla 14</b> Recursos utilizados para la identificación de BAL mediante prueba de catalasa.....	50
<b>Tabla 15</b> Recursos utilizados para la preparación y elaboración del bioconservante a partir de las BAL.	51
<b>Tabla 16</b> Recursos utilizados para la aplicación de la solución bioconservante en las muestras vegetales. .....	52
<b>Tabla 17</b> Recursos utilizados para la determinación de la pérdida de humedad de las muestras vegetales. .....	52

<b>Tabla 18</b> Recursos utilizados para la determinación de cenizas de las muestras secas vegetales. ....	53
<b>Tabla 19</b> Recursos utilizados para la determinación de la dureza de las muestras vegetales.....	53
<b>Tabla 20</b> Factores y niveles a probar en el estudio de la bioconservación del tomate y la uvilla en diferentes concentraciones de la solución bacteriana. ....	57
<b>Tabla 21</b> Tratamientos a comparar en el estudio de la bioconservación de vegetales mínimamente procesados con bacterias ácido lácticas provenientes de la placenta del cacao, en distintas concentraciones y acondicionamientos. ....	57
<b>Tabla 22</b> Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de la bioconservación de los productos IV Gama con bacterias ácido lácticas a partir de la placenta de cacao y con diferentes concentraciones del bioconservante. ....	59
<b>Tabla 23</b> Resultados de los parámetros fisicoquímicos de la placenta del cacao Nacional y CCN-51. ....	64
<b>Tabla 24</b> Resultados de las pruebas microbiológicas que se realizó para la identificación de BAL.....	66
<b>Tabla 25</b> Análisis de varianza para el pH en el día 7 de la bioconservación. ....	67
<b>Tabla 26</b> Análisis de varianza para la variable acidez en el día 7 de la bioconservación. ....	68
<b>Tabla 27</b> Análisis de varianza para la variable humedad en el día 7 de la bioconservación. ....	69
<b>Tabla 28</b> Análisis de varianza para la variable ceniza en el día 7 de la bioconservación. ....	69
<b>Tabla 29</b> Análisis de varianza para la variable dureza en el día 7 de la bioconservación. ....	70
<b>Tabla 30</b> Prueba de significación de Tukey para la interacción de factores (A*B*C). ....	77
<b>Tabla 31</b> Recuento de microorganismos aerobios en los tratamientos al día 7 de la bioconservación. ...	82
<b>Tabla 32</b> Recuento de mohos y levaduras en los tratamientos en el día 7 de la bioconservación.....	83
<b>Tabla 33</b> Matriz de correlación de los componentes principales de la bioconservación. ....	85
<b>Tabla 34</b> Porcentajes de la varianza total explicada. ....	86

### Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Volumen de tomates frescos productos al año en el mundo entre 2012 y 2020. ....	35
<b>Figura 2</b> Ubicación geográfica del lugar del estudio. ....	46
<b>Figura 3</b> Árbol filogenético de las secuencias obtenidas de la secuenciación 16s. ....	67
<b>Figura 4</b> Prueba de significación de Tukey para la concentración de la solución bacteriana (Factor A). ..	70
<b>Figura 5</b> Prueba de significación de Tukey para el tipo de vegetal (Factor B). ....	73
<b>Figura 6</b> Prueba de significación de Tukey para el acondicionamiento (Factor C). ....	75
<b>Figura 7</b> Prueba de significación de Tukey para Concentración*Tipo de vegetal*Acondicionamiento (Interacción A*B*C). ....	78
<b>Figura 8</b> Dendrograma para los factores de estudio. ....	84
<b>Figura 9</b> Gráfico de sedimentación de los componentes principales. ....	86
<b>Figura 10</b> Gráfico de componentes en espacio rotado. ....	87

## Resumen

En el Ecuador, las hortalizas y frutas son generalmente utilizadas en la industria alimentaria como parte de productos conservados, enlatados, el almíbar y ensaladas de frutas, sin embargo, debido al poco tiempo de vida útil, se suelen utilizar conservantes químicos, y una alternativa a estos conservantes es el uso de bioconservantes a base de microorganismos inhibidores de patógenos. Por otra parte, el cultivo del cacao en Ecuador es muy amplio y tiene gran historia en el país, sin embargo, no se ha aprovechado todo el potencial que ofrece el cacao aparte de su uso alimenticio, dejando de lado el potencial microbiológico que tiene los residuos del mismo, especialmente el mucílago y la placenta. En el presente estudio se obtuvo y caracterizó bacterias ácido lácticas a partir de la fermentación de la placenta de dos variedades de cacao (Nacional y CCN-51) con el fin de elaborar un bioconservante con dos concentraciones diferentes para aplicarlo en dos vegetales mínimamente procesados como son el tomate y uvilla y en dos condiciones diferentes (con y sin refrigeración) para evaluar la efectividad de las bacterias ácido lácticas en la conservación de los vegetales, esta evaluación se la realizó mediante características fisicoquímicas (pH, acidez, humedad, ceniza y dureza) y microbiológicas (recuento microbiano). El resultado del estudio mostró resultados positivos en la bioconservación de los vegetales frente a microorganismos patógenos. Además, se demostró que una mayor concentración de bioconservante influye notablemente en la efectividad de la conservación, mientras que el acondicionamiento tiene una influencia menor pero no menos importante sobre la conservación, así mismo el tipo de vegetal que se use afectará los resultados de una u otra manera. Se espera en un futuro seguir ampliando el estudio de las bacterias ácido lácticos como agente conservante y la posterior comercialización de bioconservantes que reemplacen a los químicos.

*Palabras clave:* cacao, bioconservante, bacteria ácido láctica, vegetal

### **Abstract**

In Ecuador, vegetables and fruits are generally used in the food industry as part of preserved products, canned products, syrup and fruit salads, however, due to the short shelf life, chemical conservatives are often used, and an alternative to these conservatives is the use of bioconservatives based on pathogen-inhibiting microorganisms. On the other hand, cocoa cultivation in Ecuador is very extensive and has a long history in the country; however, the full potential of cocoa has not been exploited, apart from its food use, leaving aside the microbiological potential of cocoa residues, especially mucilage and placenta. In the present study, lactic acid bacteria were obtained and characterized from the fermentation of the placenta of two varieties of cocoa (Nacional and CCN-51) in order to elaborate a bioconservative with two different concentrations to be applied in two minimally processed vegetables such as tomato and goldenberry and in two different conditions (with and without refrigeration) to evaluate the effectiveness of lactic acid bacteria in the conservation of vegetables, This evaluation was carried out by means of physicochemical (pH, acidity, humidity, ash and hardness) and microbiological (microbial count) characteristics. The results of the study showed positive results in the bioconservation of vegetables against pathogenic microorganisms. In addition, it was shown that a higher concentration of bioconservative has a significant influence on the effectiveness of conservation, while conditioning has a lesser but no less important influence on conservation, likewise the type of vegetable used will affect the results in one way or another. It is expected in the future to continue expanding the study of lactic acid bacteria as a preservative agent and the subsequent commercialization of bioconservatives to replace chemical conservatives.

*Keywords:* cocoa, bioconservative, acid lactic bacteria, vegetable

## Capítulo I

### Introducción

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es un árbol que tiene su origen en las regiones tropicales del continente americano, específicamente en el territorio centro y sudamericano, aunque no se sabe a ciencia cierta el lugar específico de origen debido al estilo de vida nómada que llevaban los primeros habitantes del continente. Las zonas habituales donde crece es en las regiones húmedas de las selvas tropicales que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. En el Ecuador, el cacao crece a lo largo de la creación litoral y la Amazonía gracias a las condiciones climáticas, y ha sido uno de los productos pilares de la base económica del país entre los años 1860 y 1920 en la época denominada “Pepa de oro”, y continúa siendo actualmente uno de los productos referentes en lo que se refiere a exportación (León-Villamar et al., 2016).

Dentro del Ecuador, existen diferentes variedades de cacao, entre las más conocidas se encuentran el híbrido denominado CCN-51 el cual resalta debido a su tolerancia a enfermedades que acechan el cacao, así como gran productividad de la siembra y alta calidad de la fruta, y se encuentra también el cacao fino de aroma Nacional, el cual posee características individuales que lo hacen único y distinto, entre ellas su peculiar aroma y su sabor “arriba” (Andrade-Almeida et al., 2019). Estas 2 variedades han sido de gran importancia en la zona cacaotera del Ecuador, y en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas donde en el año 2018 se registró 19837 ha cultivadas con *Theobroma cacao L.* lo que refleja una gran proyección para el uso que se puede dar a los residuos que genera la cosecha del cacao (Anzules-Toala et al., 2018).

Dentro del proceso de cosecha y seca de la almendra de cacao se generan residuos como la baba, placenta y cáscara de la mazorca, y que, debido al desconocimiento general de las propiedades físico químicas y microbiológicas que poseen estos residuos, junto con la carencia de innovación, falta

de incentivo y tecnología para el manejo y transformación de estos desechos, no se han logrado explotar adecuadamente para la obtención de productos, bebidas o conservantes (Santana et al., 2019).

Dentro de los varios usos que se les puede dar a los desechos de los residuos del cacao, se encuentra uno que ha tomado impulso en los últimos años, el uso de los microorganismos presentes en los residuos para la elaboración de bioconservantes de alimentos y frutas, especialmente aquellos que no hayan sido procesados (IV Gama), el uso de las bacterias ácido lácticas presentes en residuos de *Theobroma cacao L.* así como de otras frutas o fermentaciones puede servir como una barrera extra para el control e inhibición del crecimiento de agentes patógenos después del proceso de lavado con hipoclorito de sodio, además de mejorar la calidad microbiológica de los alimentos y evitar la alteración de sus propiedades organolépticas (Mondragón et al., 2013).

## **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

### Hipótesis para el factor A (Concentración de solución bacteriana)

**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.

### Hipótesis para el factor B (Vegetales)

**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 para el factor C (Acondicionamiento)

**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.

### Hipótesis para la interacción AXBXC

**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.

## Capítulo II

### Revisión de literatura

#### **Cacao (*Theobroma Cacao L.*)**

##### ***Generalidades***

*Theobroma cacao* es la materia prima que funciona de base que sostiene la millonaria industria del chocolate, siendo la principal fuente de ingresos de alrededor de 6 millones de productores de esta fruta en todo el mundo. Este árbol de talla pequeña pertenece a la familia Malvaceae y de la cual se conocen actualmente más de 20 variedades. Tiene un origen americano, aunque no se puede saber a ciencia cierta cuál es el lugar de origen, varios estudios sugieren que el cacao es originario de América del Sur, en las regiones amazónicas que comprende países como Brasil, Colombia, Perú y Ecuador, siendo estas regiones donde se ha encontrado mayor variabilidad de esta especie (Enriquez & Paredes, 1987).

Este árbol perennifolio generalmente tiene una altura de 4 a 7 metros cuando se trata de una especie cultivada, y puede llegar a medir hasta 20 metros cuando se trata del cacao silvestre. Posee una copa baja y extendida de hojas elípticas. Las flores se presentan en racimos en todo el tronco y ramas, y de las cuales nace el fruto, que se presenta como una baya grande que comúnmente se le denomina “mazorca”. Esta mazorca puede variar en color y forma dependiendo de la especie, suele tener una longitud de 15 a 30 cm y consta de unas 30 a 40 semillas en su interior, estas semillas están recubiertas de una masa de pulpa (De Souza et al., 2018).

En cuanto al hábitat, el cacao crece en ambientes donde la temperatura media anual sea elevada, una temperatura media diaria de 20 a 30 °C, es decir un clima húmedo, con precipitaciones anuales de 1300 a 2800 mm por año. El cacao es una especie con gran facilidad de adaptación a climas muy variables, además es conocida por ser una especie adaptada a la sombra. *Theobroma cacao*

comienza a producir flores en el tercer y sexto año, y al momento de la cosecha del fruto, suelen producir alrededor de 3,7 toneladas/ha anual del grano (Jaimez et al., 2008).

### ***Taxonomía***

El estudio taxonómico del cacao ha sido ampliamente estudiado y delimitado, ha sido ubicado como especie, en la siguiente clasificación taxonómica que se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Taxonomía correspondiente al cacao.*

<b>Theobroma Cacao L.</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Tipo</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Malvaceae
<b>Género</b>	Theobroma
<b>Especie</b>	cacao L.

*Nota.* Recuperado de Leon J., 1968

### ***Variedades***

El cacao es una especie que cuenta con una rica y extensa cantidad de variedades, algunos estudios detallan que cuenta con alrededor de 12000 variedades, sin embargo, en el continente americano predominan 3 variedades: Criollo, Forastero y Trinitario, las cuales se usan mayormente para la producción y comercialización de productos derivados del cacao. Sin embargo, en Ecuador y Perú existe otra variedad muy usada y con propiedades organolépticas un tanto diferente al resto, estamos hablando de la variedad “Nacional” o también denominada “Cacao Arriba” (Enriquez, 1985).

**Criollo.** Esta variedad se caracteriza por tener mazorcas cilíndricas, con diez surcos distribuidos en cinco pares, la cáscara de ésta tiene bien acentuada las rugosidades. En su interior tienen una ligera capa lignificada ubicada en el centro del pericarpio. El color de mazorca de esta variedad suele tener tonalidades verdes y cuando maduran pueden cambiar a tonos rojizos o anaranjados. Las semillas son blancas y de forma ovoide o cilíndrica. Los árboles suelen ser más bajos de lo común y menos robustos (De Fariñas et al., 2002).

**Forastero.** A esta variedad se le suele llamar también amazónico, se caracteriza por tener la mazorca de forma ovoide o amelonada, los surcos son más profundos y marcados, la cáscara suele ser más lisa o en algunos casos, ligeramente arrugada, tiene los extremos redondeados y no en punta, en algunos casos suelen tener cuello de botella en la base de la mazorca. Las tonalidades del fruto suelen ir desde verde, blanquecino, hasta un rosa leve. Las semillas tienen un color morado, son pequeñas y aplanadas. El árbol es más vigoroso y robusto que el criollo, y actualmente es el que más se produce debido a su precocidad y resistencia a las plagas (Quintero & Díaz, 2004).

**Trinitario.** Esta variedad es un híbrido resultado entre el cruce espontáneo de las especies criollo y forastero. Comúnmente esta variedad mezcla las 2 cualidades de sus predecesores, teniendo como características que es un árbol vigoroso con aroma de cacao criollo y la mayor productividad del cacao forastero, las mazorcas tienen características intermedias entre las 2 variedades que le dieron origen (Motomayor et al., 2003).

**Nacional.** Esta variedad también conocida como “Cacao Arriba” o “Cacao fino de aroma” es de origen ecuatoriano. La principal característica que distingue a esta variedad de otras es su potente aroma frutal y su sabor único, la mazorca del cacao nacional tiene forma amelonada, las semillas tienen un color violeta, y cuentan con un potente olor frutal, el árbol es robusto, de follaje denso. Las mazorcas comúnmente tienen tonalidades amarillentas o anaranjadas. Actualmente existen pocas semillas de

grano puro debido a la introducción de un germoplasma no relacionado, lo cual ha dado como resultado plantaciones híbridas (Bhattacharjee & Akoroda, 2018).

**CCN-51.** En el Ecuador, el botánico Homero Castro en la década de 1960 desarrolló la variedad denominada “Colección Castro Naranjal 51 (CCN-51) el cual pertenece a grupo de especies híbridas, esta variedad es considerada de alta producción y rendimiento, se caracteriza por tener mazorcas con forma elíptica u ovoide, que va desde tonalidades rojizas hasta anaranjadas y moradas, además de tener surcos profundos y rugosidades bien marcadas. Esta variedad ha entrado en competencia con la variedad Nacional dentro del territorio ecuatoriano, esto debido a la mayor rentabilidad de producción a comparación con la Nacional (Abad et al., 2020).

### ***Composición de la mazorca del cacao***

La fruta del árbol de cacao consta de una mazorca que a rasgos generales tiene una cáscara dura, de textura rugosa y con surcos (puede variar de especie a especie) dentro consta de la pulpa color blanquecino, la placenta que es aquella que une los racimos de semillas, las cuales se encuentran rodeadas de una baba blanquecina y con aroma potente. El grano del cacao es la principal materia prima que se utiliza del fruto con fines de comercialización de productos derivados del mismo. La composición de los granos consta de proteínas y aminoácidos como  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -fructosidasa y  $\beta$ -glucosidasa, teobromina y cafeína en cantidades mínimas (alrededor de 1,2 % de la composición total), la grasa compuesta generalmente de un 97 % de triglicéridos y de 0,5 a 2% de ácidos libres, carbohidratos (mayoritariamente almidón). Otros compuestos en menor proporción presentes en el cacao son compuestos volátiles y aromáticos (Torres Moreno, 2012).

### ***Placenta del cacao***

La placenta del cacao se encuentra dentro del cacao y tiene la función de ser el eje central de la mazorca, uniendo los granos del cacao, físicamente se caracteriza por ser de textura blanda, color

blanquecino, aspecto fibroso y algo húmedo. En cuanto a la composición de la placenta, se detalla en la Tabla 2. La placenta contiene alto contenido de azúcares, fibra y proteína cruda, además según varios estudios contiene una considerable cantidad de compuestos fenólicos. La placenta junto con el mucílago y el cascarón de cacao forman los residuos que para la industria no se utilizan en el proceso de obtención de productos, ignorando las propiedades antioxidantes y de antimicrobianas que contienen estos residuos (Vera et al., 2021).

**Tabla 2**

*Componentes de la placenta de cacao.*

<b>Componente</b>	<b>Base húmeda (%)</b>
pH	5,41
Acidez titulable	0,12
Humedad	83,52
Materia seca	0,77
Cenizas	16,48

*Nota.* Recuperado de Vera Chang & Tapia García, 2016

### ***Fermentación de la placenta del cacao***

El término “fermentación” se deriva del latín *fervere* que significa hervir, y describe la acción de la levadura que tiene sobre extractos ya sea de fruta o de cereales, este proceso da como resultado la aparición de burbujas de dióxido de carbono debido al catabolismo anaeróbico de los azúcares presentes en los extractos. La fermentación de la placenta del cacao, al igual que ocurre con la fermentación del mucílago y la pulpa del cacao, se inicia debido a la presencia de levaduras. Generalmente la placenta del cacao antes de la fermentación suele tener un pH ácido, variando de 3 a 4, esto debido al contenido de ácido cítrico que se encuentra en la placenta (Stanbury et al., 2016).

Dentro de los cambios visibles a simple vista de la fermentación de la placenta, se tiene el cambio de la pigmentación del mosto de la placenta, de un color blanquecino o violeta a marrón claro, la presencia de burbujas de CO<sub>2</sub> debido a la transformación de azúcares en alcohol gracias a las levaduras. Las levaduras son hongos unicelulares y son imprescindibles en el proceso de la fermentación de la placenta ya que estos hongos son los encargados de transformar los carbohidratos en energía, generando etanol y CO<sub>2</sub>. Este proceso se da en condiciones anaeróbicas, estas condiciones junto con la presencia de las levaduras en el proceso, favorecen el desarrollo de las bacterias ácido lácticas, las cuales en un tiempo de 48 a 96 horas de iniciada la fermentación ya se encuentran desarrolladas, para posteriormente producirse la fermentación acética, en donde gracias al descenso del pH y a la remoción del ambiente, se transforma el etanol en ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) mediante una oxidación fermentativa (Teneda Llerena, 2016).

#### **Productos mínimamente procesados (IV Gama)**

Los productos mínimamente procesados se definen a aquellas verduras y frutas que han pasado por un mínimo proceso antes del envasado, este proceso mínimo puede ser un lavado, un troceado o pelado, dependiendo de la hortaliza y del producto final. Esta gama de productos se caracteriza por no llevar ni preservantes, ni aditivos, además de que en algunos casos se envasan en bolsas con atmósfera controlada (sellado al vacío). Es recomendable mantener estos productos en cadena de frío para una vida útil apta para el consumo humano de aproximadamente 10 días (Gómez et al., 2007). Estos productos forman parte de la clasificación de alimentos donde existen 5 gamas y se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Clasificación de la gama de los alimentos.*

<b>Gama de los alimentos</b>	
<b>I GAMA</b>	Frutas y hortalizas que se venden en su estado fresco, conservadas por deshidratación y/o encurtidas.
<b>II GAMA</b>	Frutas y hortalizas que se comercializan en conserva.
<b>III GAMA</b>	Frutas y hortalizas que se comercializan congeladas.
<b>IV GAMA</b>	Frutas y hortalizas mínimamente procesadas, con venta en fresco.
<b>V GAMA</b>	Frutas y hortalizas que son cocinadas y se almacenan refrigeradas.

*Nota.* Recuperado de Pefaur, 2014

Los vegetales mínimamente procesados (VMP) suelen presentar características organolépticas y nutricionales parecidas a las frutas y hortalizas frescas, con la ventaja de que son fáciles de usar al consumidor, esto debido a que ha tenido un proceso previo al envasado, permitiéndole al consumidor evitar lavar el producto, trocearlo o pelarlo, lo cual agiliza el trabajo en las preparaciones culinarias rápidas. Un factor importante a tener en cuenta aparte de la inocuidad y seguridad del producto, es el control y minimización de los factores que afecten la estructura original del vegetal, que altere sus propiedades organolépticas, microbianas o nutricionales. Como el principal objetivo de los productos de IV Gama es la preservación de un período de tiempo de vida útil, es necesario conocer con qué hortaliza o vegetal se está trabajando. La actividad metabólica de deterioro o putrefacción del vegetal se produce desde el momento de la cosecha y va aumentando a medida que avanza a cada etapa antes de la salida al mercado, la principal causa del deterioro del vegetal se debe a la ruptura del tejido por daños mecánicos, esto puede deberse a la mala manipulación, o al proceso de pelado o cortado del producto,

causando así una degradación en las propiedades del producto (olor, color, textura, sabor, aroma)

(Fernández-Salguero & Wiley, 1997).

### ***Alteración de Vegetales Mínimamente Procesados por microorganismos***

Debido a las características óptimas de los vegetales para el crecimiento de microorganismos (alto contenido de nutrientes y actividad de agua) hongos, bacterias y levaduras suelen crecer en el tejido exterior de los vegetales, causando alrededor de un 15 % de pérdidas poscosecha, por ello es necesario la detección de patógenos antes de sacar el producto al mercado para rectificar su inocuidad. Para la eliminación de microorganismos no deseados en los productos mínimamente procesados se suelen utilizar diversos ácidos orgánicos en bajas concentraciones, los más comunes son el ácido cítrico, ácido benzoico y ácido propiónico, utilizados en concentraciones de 0,1-0,3 %, 1,5 % y 0,2-0,4 % correspondientemente (Fernández-Salguero & Wiley, 1997).

### ***Uvilla (*Physalis peruviana* L.)***

#### ***Generalidades***

*Physalis peruviana* L. mejor conocida como uvilla es una planta silvestre que se ubica en el territorio tropical de América del Sur, generalmente en Colombia, Ecuador y Perú, sin embargo, esta especie también ha sido introducida al continente africano gracias a España hace más de 200 años. Esta fruta tiene un sabor ácido y dulce, es muy apreciada y exportada al mercado mundial por su alto contenido de ácido cítrico y su sabor agridulce, la fruta se caracteriza por un alto contenido de vitamina C, proteínas y carotenos. Su producción y exportación aún no es masiva debido a que aún es considerada una fruta exótica y no se le ha dado la debida importancia (Criollo et al., 2001).

El tiempo de vida de la uvilla es de 2 a 2,5 años, y la etapa productiva suele comenzar a los 5 meses, aunque, la etapa productiva va a variar dependiendo de la altura a la que se siembre, ya que, por ejemplo, los sembríos que se encuentran sobre los 3000 m.s.n.m suelen comenzar esta etapa a los 5 o 6

meses. En Ecuador, el cultivo de la uvilla suele ser propicio hacerlo entre 1000 a 2800 m.s.n.m, y con una temperatura óptima de 13 a 18°C. Esta planta requiere de suelos franco arenosos y franco arcillosos para un crecimiento y producción ideal (Moreno et al., 2021).

### ***Taxonomía y morfología***

Esta planta herbácea pertenece a la familia de las Solanáceas, y corresponde a la clasificación taxonómica que se indica en la tabla 4. La uvilla recibe otros nombres en otras regiones del continente, como uchuva, aguaymanto o topotopo.

**Tabla 4**

*Clasificación taxonómica de la uvilla.*

<b>Uvilla ( <i>Physalis peruviana</i> L. )</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Tipo</b>	Fanerógamas
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	Physalis
<b>Especie</b>	Physalis peruviana L.

*Nota.* Recuperado de Moreno et al., 2021

La uvilla es una planta perenne, arbustiva y muy ramificada, sus raíces pivotantes son fibrosas y suelen tener un crecimiento de unos 10 a 16 cm. El tallo es delgado y quebradizo, tiene la presencia de vellosidades, generalmente la planta puede crecer hasta 1,5 m naturalmente, ya cultivada y con poda la planta puede alcanzar los 2,5 m. Las hojas son de forma acorazonada, pecioladas, son pubescentes y están distribuidas de forma alterna, en el nudo solo se desarrolla una hoja y en las ramas laterales se

desarrollan 2 hojas por nudo, su tamaño oscila de 4 a 10 cm de ancho y 5 a 15 cm de largo (Vinuesa López, 2015).

Las flores son pedunculadas y bisexuales, están formadas por una corona de color amarillo, es una flor de cinco pétalos con puntos morados en su base. El fruto es redondo, pequeño, de color amarillo que puede variar hasta tonalidades anaranjadas tenue, es carnoso y contiene varias semillas en su interior (alrededor de 100 a 300) , el fruto es jugoso y generalmente tiene un diámetro que suele ir desde 1,24 a 2,5 cm, tiene cierto parecido a un tomate pero más pequeño. Las semillas suelen tener un tamaño de 1,5 a 2 mm de diámetro, suelen ser de color amarillas, blanquecinas o doradas (Vinuesa López, 2015).

### ***Componentes y contenido del fruto***

Dentro de los componentes de esta fruta, la semilla y cáscara comprenden un 16,82 % del peso total de la fruta, el capuchón representa un 4,32 % y la pulpa un 78,86 %, esto quiere decir que es una fruta carnosa. Dentro del contenido nutricional, *Physalis peruviana* se caracteriza por ser un fruto con alto contenido de azúcar y vitamina A, muestra un 4,4 % de contenido de proteína, 17,16 % de fibra, 0,96 % de ceniza y grasa tan solo comprende el 0,02 %, en cuanto a la humedad, tiene un 78,9 % de humedad, siendo una fruta que por su contenido de humedad y sus características, tiende a entrar en estado de putrefacción en poco tiempo, teniendo un tiempo de vida útil poscosecha poco favorable (Arias et al., 2008). En la tabla 5 se detalla la composición nutricional de la uvilla.

**Tabla 5**

*Composición nutricional de la uvilla.*

<b>Componentes</b>	<b>Contenido de 100 gr de la pulpa</b>
Calorías	73,00 g
Agua	78,90 g

<b>Componentes</b>	<b>Contenido de 100 gr de la pulpa</b>
Carbohidratos	16,90 g
Grasas	0,16 g
Proteínas	0,054 g
Fibra	4,90 g
Cenizas	1,01 %
Calcio	8,00 mg
Fósforo	55,30 mg
Hierro	1,23 mg
Vitamina A	1460,0 U.I
Tiamina	0,101 mg
Riboflavina	0,032 mg
Niacina	1,730 mg
Ácido ascórbico	43,00 mg

*Nota.* Recuperado de Morton, 2013.

### **Tomate (*Solanum lycopersicum*)**

#### **Generalidades**

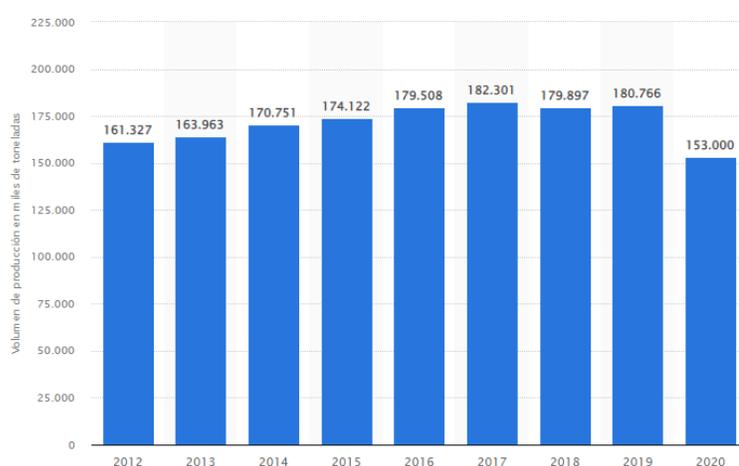
El tomate es una planta tipo herbácea que tiene su origen en los continentes de Centro y Sudamérica, es uno de los vegetales más exportados y consumidos en la actualidad a nivel mundial, su importancia y relevancia en la economía y progreso de los países, así como de sus beneficios para el organismo son tales, que actualmente se la considera “cosmopolita”. El crecimiento de la planta puede ser determinado o indeterminado dependiendo del objetivo de la siembra y la forma de cultivo, generalmente, las plantaciones son destinadas a la elaboración de procesos industriales o a productos de

consumo fresco, esto debido a que el tomate puede ser cultivado en una variedad de climas y condiciones (Torres, 2017).

El tomate es de origen andino, y su cultivo se extendió hasta Centroamérica, encontrándose hallazgos arqueológicos de civilizaciones preincaicas en Perú que suponen que ellos lo cultivaban y servía de base como uno de los alimentos clave en su nutrición, y con la llegada de los españoles se llevó su cultivo y producción hasta el continente europeo y asiático. Su importancia actual es tal, que es uno de los vegetales más producidos en los últimos años, como se detalla en la figura 1. Esta planta no exige muchos requerimientos en cuanto al clima y tierra, requiere una temperatura de aproximadamente 20 °C pero puede adaptarse a climas donde alcanzan los 10° C, se adapta bien en suelos silíceos-arcillosos (Hernansaez & Pastor, 1957).

### Figura 1

*Volumen de tomates frescos producidos al año en el mundo entre 2012 y 2020.*



Tomado de *Statista*, por A. Orús, 2021

### ***Taxonomía y morfología***

El tomate pertenece a las Solanáceas, en el año 1881 Philip Millar ubicó al tomate en el género *Lycopersicon*, sin embargo, en 1753 Carlos Linneo ya había lo había ubicado en el género *Solanum*,

después de años de cuestionamientos finalmente se le dió el nombre que hoy se le conoce hasta hoy, y se detalla en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Clasificación taxonómica del tomate.*

<b>Tomate ( <i>Solanum lycopersicum L.</i> )</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanaceae
<b>Género</b>	Solanum
<b>Especie</b>	<i>Solanum lycopersicum L.</i>

*Nota.* Recuperado de Gaviola, 2020

Es una planta herbácea semileñosa, puede ser rastrera, semierecta o erecta, la altura que alcanza depende del cultivo, existen desde 50 centímetros hasta 2 metros. El tallo principal, así como los secundarios son anchos, sólidos, con pequeñas vellosidades, las cuales contienen glándulas que desprenden un aroma muy característico, es color verde y contiene bastante agua dentro del mismo. El crecimiento de la planta varía, teniendo 2 tipos de crecimiento: uno indeterminado e ilimitado, es decir, donde prevalece una yema vegetativa en el ápice de las ramas, y el otro tipo es el determinado o compacto, es decir, donde en el ápice de las ramas se emite la inflorescencia terminal. El tallo es recto en las primeras etapas de desarrollo, sin embargo, suele torcerse en las etapas productivas debido al peso de los frutos (Fornaris, 2010).

Las hojas del tomate son pinnadas y compuestas, y se encuentran ordenadas de forma alternada en el tallo de la planta, el limbo foliar (parte laminar plana de la hoja) suele estar compuesta de 7 a once

foliolos, y al igual que el tallo, también poseen las glándulas que segregan el aroma característico de la planta de tomate. La epidermis inferior presenta bastantes estomas, dentro, en el parénquima se encuentran gran cantidad de cloroplastos (Saavedra, 2019).

La flor es regular e hipógina, es decir, los pétalos, y estambres están insertados debajo del gineceo, suele tener 5 o más sépalos y pétalos, la flor suele ser color amarillo, pero puede variar a tonos más blanquecinos. Tiene igual número de estambres que se alternan con los pétalos, formando una especie de cono que envuelve el ovario súpero (gineceo). Este ovario puede ser bilocular o plurilocular, y da origen al fruto tipo baya que todos conocen. Las inflorescencias son de tipo racimo simple, y la planta puede llegar a tener hasta 50 flores por inflorescencia (Escobar & Lee, 2010).

La semilla del tomate tiene una forma ovoide y aplastada de color gris o blanco, tiene de 3 a 5 mm de diámetro, en un tomate suelen existir de 15 a 20 semillas, sin embargo, esto también dependerá de la variedad. En cuanto al fruto, este se puede clasificar de acuerdo a su tamaño y de acuerdo a sus requerimientos industriales. Según el estudio de (Prohens & Nuez, 2008) de acuerdo a su tamaño se divide en 3 grupos:

**Fruto grande (<67 mm).** Dentro de este grupo se encuentran las variedades Beefsteak y Marmande. La variedad Beefsteak se diferencia del Marmande por tener la costilla suave y no muy pronunciada, y por no tener el hombro verde.

**Fruto mediano ( <57 mm y < 67 mm).** Dentro de este grupo se encuentra el tipo Vemone, el cual es fruto tenuemente aplanado, contiene de 2 a 3 lóculos y con una costilla suave y ligera. El otro tipo de fruto es el tomate pimiento, que como su nombre lo indica, tiene forma de pimiento, es muy carnoso y firme, esta variedad se suele encontrar en España.

**Fruto pequeño (<47 mm y <57 mm).** En este grupo se encuentra la variedad Moneymaker, que es un fruto redondo y sin hombro verde, y el tipo Cocktail, el cual tiene la peculiaridad de tener forma de pera, tiene un peso que suele aproximarse a los 50 gramos.

**Fruto muy pequeño (peso < 30 gr).** La única variedad en este grupo es el tomate Cherry, el cual tiene forma ovoide, es carnoso y no tiene hombro verde.

De acuerdo a los requerimientos industriales existen 2 grupos a tomar en cuenta, aquellos frutos que son usados para la producción de pastas o subproductos derivados del tomate, los cuales no tienen restricciones en su forma ni tamaño, y aquellos frutos que son usados para conservar, los cuales sí deben tener una forma alargada, ovoide o cilíndrica, esto por razones estéticas y por su mayor facilidad para ser pelados (Prohens & Nuez, 2008).

### ***Variedades***

El tomate es uno de los vegetales que mayor variedad de especies tiene en todo el mundo, con diferentes formas, tamaños e intensidad de sabores, todo esto viene dado por la adaptabilidad del tomate en los distintos climas y terrenos, existiendo actualmente alrededor de 10000 variedades de tomate en el mundo, sin embargo, las más conocidas y utilizadas en la comercialización y exportación son el tomate saladette, tomate redondo, tomate cherry, tomate beefsteak, tomate de pera.

**Tomate saladette o Roma.** Este tipo de tomate tiene como característica del fruto, una forma ovoide, contiene bastante pulpa en su interior, la cáscara de este tomate es fina, lisa y brillante, cuando está maduro, suele tener colores rojos no tan intenso, con variaciones de tonalidades hacia el naranja. Este tipo de tomate es uno de los más consumidos y comercializados en el mundo, y los países que más lo consumen son México (donde lo conocen con el nombre de jitomate), España y Estados Unidos (INTAGRI, 2017).

**Tomate redondo.** Este tomate es grande, de forma redonda, contiene mucha pulpa, tiene un color rojo intenso, en algunos casos puede tener leves acentuaciones o surcos parecido al tomate beefsteak, es ideal para ensaladas, conservas, pastas. Su diámetro oscila entre 54 y 90 mm aproximadamente, es uno de los tomates que más se exporta y el principal consumidor es Estados Unidos (INTAGRI, 2017).

**Tomate Cherry.** Este tomate tiene este nombre debido a su parecido con las cerezas. Su diámetro varía entre 1 a 3 cm, su peso ronda entre los 10 y 15 gramos, suele contener una pulpa muy carnosa, colores rojos intensos y un sabor muy dulce. La forma de esta variedad es ovalada, es muy utilizado en ensaladas y en conservas, tiene una excelente textura y sabor. Es muy consumido en Europa, especialmente en España e Italia (Rosales, 2008).

**Tomate beefsteak.** También conocido como corazón de buey, tiene un peso que va de 300 a 500 gramos, el fruto presenta coloraciones rojizas a veces aproximándose al naranja. Tiene una forma achatada y presenta surcos a los que se les denominan costillas, estos surcos son bien marcados, lo que le da un parecido a una calabaza. Su pulpa es carnosa y un sabor ácido bien marcado. Esta variedad es muy cultivada y consumida en España y en las zonas mediterráneas (Rosales, 2008).

### ***Composición nutricional del tomate***

El tomate en su composición nutricional contiene principalmente agua y carbohidratos. Además, es de destacar el alto contenido de  $\beta$ -carotenos, vitamina A. El color rojo tan característico del tomate se debe a la presencia del licopeno. El licopeno es un carotenoide con el beneficio de ser antioxidante, según estudios la variedad de tomate que mayor contenido de licopeno tiene es el tomate de pera (Vilaplana, 2004). Además, contiene otros carotenoides como la luteína y zeaxantina, a continuación, se detalla su composición en la tabla 7.

**Tabla 7**

*Composición nutricional del tomate por cada 100 gramos.*

<b>Composición nutricional de <i>S. lycopersicum</i></b>	
Proteínas	1 g
Lípidos	0,11 g
Carbohidratos	3,5 g
Agua	94 g
Fibra	1,4 g
Calcio	11 g
Hierro	0,6 g
Yodo	7 g
Magnesio	10 g
Potasio	290 mg

*Nota.* Recuperado de Vilaplana, 2004

### **Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

#### ***Generalidades***

Las bacterias ácidas lácticas comprenden un grupo de bacterias gram positivas que se encuentran distribuidas en diversos ecosistemas y ambientes, y que generalmente se utilizan a gran escala en la producción de alimentos, productos derivados de la fermentación, probióticos, bebidas alcohólicas, ensilados, sustratos, levaduras, etc. Además de ser usados como parte de la industria alimentaria, las BAL en los últimos años han sido la base para la biopreservación de alimentos, esto gracias a las bacteriocinas producidas por las mismas, además de darle mayor sabor, textura y olor a los productos que se conservan (Rivera & Drider, 2016).

El conocimiento acerca de los cultivos de las BAL tuvo su origen en el siglo XVII, cuando los agricultores se dieron cuenta que la leche se coagulaba y tomaba una textura y sabor diferentes en los

meses más cálidos, escogiendo la leche fermentada de mejor sabor y textura la inocularon en nueva leche. Dándose entonces cuenta que las bacterias ácido lácticas pueden estar contenidas en cultivos lácticos o también llamados iniciadores (Parra Huertas, 2003).

Las BAL se definen como un grupo de microorganismos compuestos por varios géneros que tienen generalmente las mismas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, comúnmente se presentan en forma de cocos o bacilos gram positivos, no esporulados, inmóviles, anaerobios, carecen de citocromo (proteínas con función de transporte de energía química e involucrada en la catalización de reacciones redox) y producen ácido láctico como principal metabolito de la fermentación de carbohidratos, además, las BAL pueden crecer en ambientes tan ácidos como 3,2, hasta ambientes alcalinos como 9,6, es decir son ácido tolerantes (Ramírez et al., 2011).

Son microorganismos que exigen bastantes requerimientos nutricionales, estos microorganismos son capaces de hidrolizar los péptidos presentes en la leche, puesto que, la concentración de aminoácidos libres en la leche es limitado, el crecimiento de las BAL dependerá de proteinasas y peptidasas específicas. La mejora en las propiedades organolépticas de los alimentos fermentados se debe a la producción de exopolisacáridos, estos actúan sobre azúcares, proteínas y lípidos, contribuyendo a la digestibilidad y preservación del producto (Parra Huertas, 2003).

### ***Taxonomía y características***

Las BAL comprenden un grupo de bacterias gram positivas, formadoras de no esporas, generalmente en forma de bacilos y cocos, carencia de catalasa. Los cocos y bacilos suelen tener un grosor que varía entre 0,5 y 0,8  $\mu\text{m}$ , las bacterias son bacterias fisiológicamente uniformes con pared gram positiva, tienen la capacidad de crecer con o sin oxígeno, es decir son anaerobias facultativas, carecen de citocromo, por lo que carecen de actividad respiratoria, a pesar de tener un metabolismo anaerobio, las BAL son anaerobios tolerantes, debido a esto en los cultivos con medios sólidos forman

colonias en presencia de aire (Ekinici & Gurel, 2008). La temperatura óptima a la que crecen es de 20 a 25 °C. Generalmente las BAL crecen en medios que contengan aminoácidos, vitamina del grupo B (tiamina, biotina, etc) y suelen crecer en medios complejos debido a que son quimioorganotrofas, es decir que la energía que utilizan es liberada mediante reacciones químicas, esta energía parte de fuentes de carbono como hidratos de carbono fermentables y alcoholes, y con estas fuentes forman el ácido láctico mediante la degradación de las hexosas a lactato (Rivera & Drider, 2016).

### **Clasificación**

Las BAL comprenden alrededor de 20 géneros, estos géneros se pueden clasificar de acuerdo a los metabolitos que producen en la fermentación, existiendo 2 grupos, las bacterias homofermentativas (sólo producen ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias), a continuación, se detalla cada grupo:

**Homofermentativas.** Dentro de este grupo se encuentran los géneros *Lactococcus*, *pediococcus*, *enterococcus* y *streptococcus*. Estas BAL convierten 1 mol de glucosa en 2 de ácido láctico, produciendo un 85 % de ácido láctico a partir de la glucosa, esto mediante la vía Embden-Meyerhoff-Parnas. Las bacterias de este grupo carecen de la enzima fosfoacetolasa. En cuanto a la morfología de estas bacterias, los lactobacillus suelen tener formas de bastones y se encuentran en grupos o cadenas cortas, y los streptococcus se suelen encontrar en forma esférica y en cadenas cortas (Hernández et al., 2007).

**Heterofermentativas.** Dentro de este grupo se encuentran *Lactococcus*, *lactobacillus*, *enterococcus*, *streptococcus*, *leuconostoc* y *pediococcus*. Estas bacterias producen el 50 % de ácido láctico. Transforman 1 mol de glucosa en 1 mol de ácido láctico, 1 mol de CO<sub>2</sub>, 1 mol de etanol, este grupo si contiene la enzima fosfoacetolasa pero no posee la aldosa ni hexosa isomerasa, utilizan la vía hexosa monofosfato o la de la pentosa (Hernández et al., 2007).

### ***Fermentación del ácido cítrico***

La fermentación del ácido cítrico es dada por las bacterias heterofermentativas, las cuales son generalmente utilizadas en la producción de quesos y mantequillas, en principio, este proceso se basa en la transformación del ácido cítrico en aromatizantes como es el caso del diacetilo y acetoina, y aparte generan sustancias antimicrobianas como el acetaldehído, el cual inhibe el crecimiento de *E. coli* (Agurto & Ramos, 2008).

### ***Producción de bacteriocinas***

Las bacteriocinas son péptidos que tienen actividad antimicrobiana, y son producidos por las BAL para inhibir el crecimiento de microorganismos competidores, estas bacteriocinas actúan sobre la membrana celular. Las bacteriocinas segregadas por las bacterias ácido lácticas reciben el nombre de GRAS y se utilizan en la preservación y conservación de alimentos. La producción de estas toxinas dependerá de la actividad fisiológicas de la bacteria productora, y para obtener grandes producciones de bacteriocinas se requieren medios con alto contenido de carbohidratos, proteínas, minerales, ácidos nucleicos y aminoácidos, por eso, los medios MRS, TGE y APT son aptos para el cultivo de las bacterias productoras de bacteriocinas (Mondragón et al., 2013).

### ***Biopreservación de alimentos***

La bioconservación es el proceso de alargar o extender la vida de un producto (alimento) mediante el uso de microorganismos (microbiota natural). Este método de conservación ha ganado bastante notoriedad hace algunos años debido en parte como una alternativa al uso de conservantes químicos que suelen usarse comúnmente y que ya habido estudios que pueden causar efectos nocivos en la salud a largo plazo, además con la llegada del uso de la biotecnología alimentaria, el uso de microorganismos a gran escala (industrial) ha ganado una relevancia en las empresas debido a los costes y beneficios que conlleva esta técnica de conservación (Stiles, 1996).

Las BAL tienen un papel muy importante en la conservación de alimentos, ya que mediante la producción de bacteriocinas que éstas generan, inhiben el crecimiento de microorganismos como *E. coli*, *salmonella*, *clostridium botulinum*, *staphylococcus aureus*, etc. En el continente Europeo alrededor de un 25 % de la dieta de las personas lo constituyen los productos fermentados, y en los países desarrollados como EE.UU y China un 60 %, es por ello que el uso de las BAL en ambientes controlados o en combinación con tratamientos previos (lavado y desinfección con concentraciones bajas de ácidos orgánicos) ha demostrado ser efectivo y menos nocivo para la salud, además de dotar de aromas y mejores sabores a los alimentos conservados con estos microorganismos (De la Fuente & Barboza, 2010).

### ***Bioconservación de vegetales***

Los microorganismos patógenos que con frecuencia se encuentran en los vegetales son aquellos que se encuentran en la mayoría de los suelos, estos suelen ser *B. cereus*, *Salmonella*, *E. coli*, etc. Estos microorganismos suelen encontrarse en el suelo debido a los residuos fecales de animales, así como el paso de aguas residuales que salen de las ciudades, es por ello que la desinfección y conservación de los vegetales es muy importante antes de sacar un producto al mercado. El mejor proceso de bioconservación de los vegetales es aplicarlo en forma líquida, esto se realiza en las grandes industrias mediante un baño con dispersadores grandes. Esta técnica se suele acompañar con un lavado y desinfección previo con ácido cítrico o en algunos casos con desinfectantes químicos. Se han dado casos de listeriosis por consumo de lechuga, apio y otros vegetales frescos, en estos casos se suele aplicar la nisina, un antibiótico usado comercialmente sintetizado, pero que naturalmente lo produce la bacteria *L. lactis*. Otro bioconservante utilizado es la mundticina, la cual la produce la bacteria *E. mundtii*, este péptido inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* (De la Fuente & Barboza, 2010).

### Capítulo III

#### Metodología

#### Ubicación del área de investigación

##### *Ubicación política*

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

##### *Ubicación ecológica*

Zona de vida:	Bosque húmedo tropical
Altitud:	224 m.s.n.m
Temperatura:	24,7 °C
Precipitación:	2860 mm/año
Humedad relativa:	85 %
Heliofanía:	680 horas luz/año
Suelos:	Francos arenosos

### **Ubicación geográfica**

El presente trabajo de integración curricular se lo realizó en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de Alimentos correspondientes a la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) extensión Santo Domingo la cual está ubicada en el Km. 24 vía Santo Domingo-Quevedo en la Hacienda “Zoila Luz” al margen derecho.

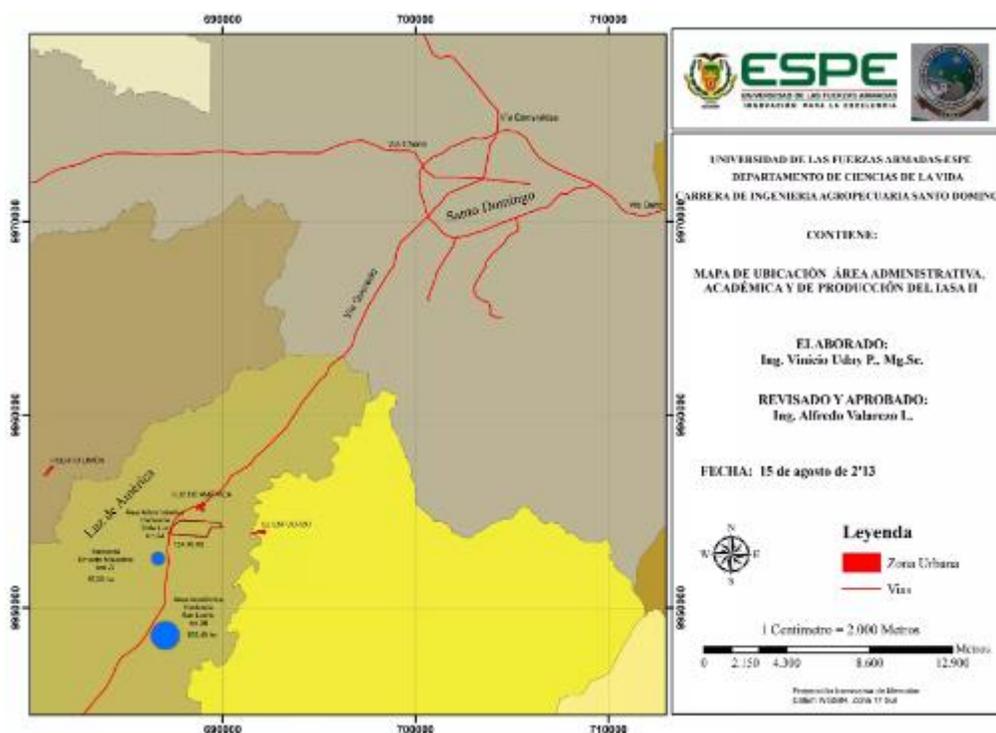
Latitud: 00° 24' 36''

Longitud: 79° 18' 43''

Altitud: 270 m.s.n.m

### **Figura 2**

*Ubicación geográfica del lugar del estudio.*



*Nota.* Mapa de la ubicación geográfica de la Universidad de las Fuerzas Armadas UFA-ESPE. Tomada de Slideshare, por V. Uday, 2014.

## Materiales

### *Determinación de pH*

**Tabla 8**

*Recursos utilizados para la determinación del pH del mosto de cacao y los vegetales de IV gama.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Balanza Analítica	Vaso de precipitación (250 ml)	Agua destilada	Mosto de cacao
Potenciómetro	Vaso de precipitación (100 ml)		Uvilla
Hornilla	Probeta (100 ml)		Tomate cherry
	Mortero		
	Colador		
	Varilla de vidrio		

### *Determinación de Acidez*

**Tabla 9**

*Recursos utilizados para determinar la acidez titulable del mosto fermentado y los vegetales IV Gama.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Balanza Analítica	Vaso de precipitación (250 ml)	Agua destilada	Mosto de cacao
Potenciómetro	Vaso de precipitación (100 ml)	NaOH (0,1 N)	Uvilla
Plancha de agitación	Probeta (100 ml)		Tomate cherry
	Probeta ( 25 ml)		

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestras
	Balón de aforo (250 ml)		
	Bureta graduada (25 ml)		
	Soporte Universal		

### ***Determinación de Sólidos solubles***

**Tabla 10**

*Recursos utilizados para determinar los grados brix del mosto de cacao fermentado.*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestras
Refractómetro	Vaso de precipitación (25 ml)	Agua destilada	Mosto de cacao

### ***Determinación de presencia de bacterias ácido lácticas, microorganismos aerobios, mohos y levaduras***

**Tabla 11**

*Recursos utilizados para determinar la presencia de BAL, aerobios mesófilos, mohos y levaduras del mosto fermentado y los vegetales IV gama.*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestras
Autoclave	Tubos de ensayo	Agua destilada	Mosto de cacao
Incubadora	Micropipeta	Agua peptona	Uvilla
Cámara de flujo laminar	Gradilla		Tomate cherry
Contador de colonias	Mechero		

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Vortex	Vaso de precipitación (25 ml)		
Balanza Analítica	Puntas		
	Petrifilm (aerobios, BAL, mohos y levaduras)		

### ***Aislamiento y purificación de Bacterias ácido lácticas***

**Tabla 12**

*Recursos utilizados para aislar las BAL a partir del mosto fermentado y la posterior purificación de las colonias.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Autoclave	Cajas Petri	Agua destilada	Mosto de cacao
Incubadora	Asa bacteriológica	Agar MRS	Colonias de BAL
Cámara de flujo laminar	Parafilm	Agua peptona	
Plancha de agitación	Mechero		
Balanza Analítica	Rotulador		
	Frasco graduado (100 ml)		
	Matraz Erlenmeyer (100 ml)		
	Tubos de ensayo		

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestras
	Gradilla		

### ***Identificación de Bacterias ácido lácticas***

**Tabla 13**

*Recursos utilizados para la identificación de BAL mediante tinción gram.*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestras
Microscopio	Mechero	Agua destilada	Colonias aisladas
Cámara de flujo laminar	Portaobjetos	Cristal violeta	
Autoclave	Asa bacteriológica	Lugol	
	Parafilm	Alcohol acetona	
	Rotulador	Safranina	
	Aceite de inmersión		

**Tabla 14**

*Recursos utilizados para la identificación de BAL mediante prueba de catalasa.*

Equipos	Materiales/insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Mechero	Peróxido de hidrógeno	Colonias aisladas
	Portaobjetos		
	Asa bacteriológica		

**Bioconservación de vegetales mínimamente procesados (IV Gama)****Tabla 15***Recursos utilizados para la preparación y elaboración del bioconservante a partir de las BAL.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Autoclave	Matraz Erlenmeyer (500 ml)	Agua destilada	Colonias de BAL
Incubadora	Asa bacteriológica	Agar MRS broth	
Cámara de flujo laminar	Parafilm	Citrato de sodio	
Plancha de agitación	Mechero	Ácido cítrico	
Balanza Analítica	Rotulador		
Centrífuga	Frasco graduado (1Lt)		
Espectrofotómetro	Papel aluminio		
	Algodón		
	Gradilla		
	Tubos de ensayo (10 ml)		
	Frasco ámbar (250 ml)		
	Atomizador		

**Tabla 16**

*Recursos utilizados para la aplicación de la solución bioconservante en las muestras vegetales.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Cámara de flujo laminar	Vaso de precipitación (2 Lt)	Ácido cítrico	Tomate cherry
Freezer	Vaso de precipitación (1 Lt)	Agua destilada	Uvilla
	Tarrina transparente		
	Rotulador		

***Determinación de humedad***

**Tabla 17**

*Recursos utilizados para la determinación de la pérdida de humedad de las muestras vegetales.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Muestras</b>
Estufa	Mortero	Tomate cherry
Balanza Analítica	Crisol	Uvilla
Desecador	Espátula	
	Pinzas	

**Determinación de cenizas****Tabla 18***Recursos utilizados para la determinación de cenizas de las muestras secas vegetales.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/insumos</b>	<b>Muestras</b>
Mufla	Mortero	Tomate cherry
Balanza Analítica	Crisol	Uvilla
Desecador	Espátula	
	Pinzas	

**Determinación de dureza****Tabla 19***Recursos utilizados para la determinación de la dureza de las muestras vegetales.*

<b>Equipos</b>	<b>Muestras</b>
Penetrómetro	Tomate cherry
	Uvilla

**Métodos****Obtención de materia prima**

Las dos variedades de cacao (Nacional y CCN-51) se recolectaron de la finca “Santana”, ubicada en el recinto Tahuasa, en la parroquia puerto limón, km. 5 vía Al Poste, provincia de Santo Domingo de

los Tsáchilas. Se escogieron 20 mazorcas de cada variedad, considerando el aspecto y la madurez, así como que se encuentren libres de agentes extraños y plagas.

En el caso de la uvilla y el tomate cherry, se obtuvieron del mercado de Santo Domingo de los Tsáchilas.

### ***Fermentación de la placenta del cacao***

Una vez recolectadas las mazorcas, se procedieron a lavar con agua hervida, seguido de agua clorada y nuevamente con agua hervida, luego con guantes quirúrgicos se cortaron y abrieron las mazorcas, sacando los granos, pulpa y la placenta de la mazorca, colocando todo el contenido en baldes, se los tapó con una trampa de agua para la salida de CO<sub>2</sub>. El mucílago de cada variedad de cacao se dejó fermentar a temperatura ambiente durante 72 horas.

### ***Características microbiológicas y fisicoquímicas del mucílago fermentado***

Se recogieron datos de pH, acidez, grados brix y grados alcohólicos del mucílago en base a la metodología de (Morocho, 2018). Para la toma de pH, se filtró el mucílago fermentado, y se vertieron 25 ml en un vaso de precipitación para obtener el dato mediante el potenciómetro. Para la acidez titulable se aforaron 25 ml del mucílago en un balón de 250 ml, se tomó 25 ml de la solución y se agregó gota a gota (con ayuda de la bureta) Hidróxido de potasio al 0,1 N hasta llegar a un pH de 8,1. Para los grados alcohólicos se tomó 50 ml del mucílago y se vertió en el alcoholímetro y se tomó datos. Para la toma de grados brix, se colocó 1 gota de la muestra en el refractómetro. En el caso de la caracterización microbiológica se tomó 1 ml de mucílago de cada variedad, y se realizaron 4 diluciones seriadas, se colocó 1 ml de la cuarta dilución en petrifilms (aerobios, BAL, mohos y levaduras) y se dejó incubar durante 72 horas a 37°C.

### ***Aislamiento de Bacterias ácido lácticas***

Pasadas las 72 horas de fermentación, se extrajo aproximadamente 25 ml del mucílago de cacao, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  en tubos de ensayo, para ello se tomó 1 ml de la muestra y se diluyó en 9 ml de agua peptona al 1,5 %, hasta la cuarta dilución, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  y se colocó en cajas Petri con medio Agar MRS mediante el método de extensión, este proceso se lo realizó por duplicado para las dos variedades de cacao. Se dejó incubar en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas. Después de las 2 horas, se realizaron nuevas siembras para aislar y purificar las colonias de BAL (Quintana & Verdezoto, 2017).

### ***Identificación de Bacterias ácido lácticas***

**Tinción gram.** Para identificar las BAL mediante la tinción gram se tomó como base la metodología de (Quintana & Verdezoto, 2017), para ello se realizó un frotis con el asa bacteriológica de las colonias aisladas en un portaobjetos, se dejó secar la muestra, posterior a eso, se agregó 1 ml de cristal violeta durante 1 minuto, se lavó y se agregó 1 ml de lugol durante 1 minuto, se lavó y se agregó 1ml de alcohol acetona durante 30 segundos, finalmente se agregó 1 ml de safranina. Se dejó secar la muestra acercándola al mechero, y se procedió a visualizar e identificar las BAL en el microscopio en el lente 100x.

**Prueba de catalasa.** Para la prueba de catalasa se colocó una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjeto, luego se añadió con el asa bacteriológica la muestra de colonia aislada, y se extendió toda la muestra en el portaobjeto, se observó los resultados, de acuerdo a los estudios, si aparece la formación de burbujas antes de los 20 segundos de aplicada la muestra, da positivo para el ensayo de catalasa, caso contrario, sería negativo (Bergey et al., 1957).

**Caracterización molecular.** Para identificar a que especie pertenece la BAL aislada, se envió una muestra de las bacterias aisladas en cajas Petri para su respectiva secuenciación a la empresa Macrogen

Inc. Una vez obtenidos los resultados en formato fasta, se utilizó el programa MEGA X para realizar el alineamiento de las secuencias con el algoritmo Clustal W, y para la posterior filogenia se usó el método de “Neighbor joining” con 1000 réplicas de bootstrap.

### ***Bioconservación de vegetales mínimamente procesados (IV Gama)***

**Solución bacteriana.** Para ello se tomó como base la metodología de (López Paredes, 2021) con algunas modificaciones. Se preparó 27,57 gramos de medio Agar MRS Broth en 500 ml de agua destilada, se procedió a calentar el caldo en un matraz, se autoclavó y se dejó enfriar para llevar a la cámara de flujo laminar, allí se inoculó las colonias de BAL ya identificadas y purificadas en el caldo, se tapó con algodón, parafilm y papel aluminio, se dejó incubar durante 24 horas a 37°C.

Después de las 24 horas en incubación, se tomó el dato de la absorbancia. Luego, se realizó un lavado de la solución bacteriana con un buffer tampón de ácido cítrico-citrato de sodio para separar las BAL del caldo y sedimentos, para ello se colocó en tubos de ensayo de 10 ml, 5 ml de la solución bacteriana con 5 ml del buffer, se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, una vez centrifugado, se bota el sobrenadante quedándose solo con el sedimento, este proceso se repite de 2 a 3 veces, hasta que se obtenga un sedimento blanquecino, finalmente se resuspendió las bacterias lavadas en el buffer tampón (López Paredes, 2021).

**Preparación de la muestra.** Las uvas y tomates se lavaron con una solución de ácido cítrico al 2% durante 3 minutos, luego se lavó con agua hervida y se escurrió. Se colocó los vegetales en envases plásticos y se roció el bioconservante con un atomizador.

## Diseño experimental

### Factores y niveles de experimento

**Tabla 20**

*Factores y niveles a probar en el estudio de la bioconservación del tomate y la uvilla en diferentes concentraciones de la solución bacteriana.*

Factores	Simbología	Niveles
Concentraciones Bioconservante (A)	a <sub>0</sub>	Concentración 1 (1,00E+15 UFC/ml)
	a <sub>1</sub>	Concentración 2 (1,00E+8 UFC/ml)
Productos IV Gama (B)	b <sub>0</sub>	Tomate cherry
	b <sub>1</sub>	Uvilla
Acondicionamiento (C)	c <sub>0</sub>	Refrigeración
	c <sub>1</sub>	Sin refrigeración

### Tratamientos a comparar

**Tabla 21**

*Tratamientos a comparar en el estudio de la bioconservación de vegetales mínimamente procesados con bacterias ácido lácticas provenientes de la placenta del cacao, en distintas concentraciones y acondicionamientos.*

N°	Interacciones	Niveles
T1	a <sub>0</sub> b <sub>0</sub> c <sub>0</sub>	Concentración 1 + Tomate cherry + refrigeración

N°	Interacciones	Niveles
T2	$a_0 b_0 c_1$	Concentración 1 + Tomate cherry + sin refrigeración
T3	$a_0 b_1 c_0$	Concentración 1 + Uvilla + refrigeración
T4	$a_0 b_1 c_1$	Concentración 1 + Uvilla + sin refrigeración
T5	$a_1 b_0 c_0$	Concentración 2 + Tomate cherry + refrigeración
T6	$a_1 b_0 c_1$	Concentración 2 + Tomate cherry + sin refrigeración
T7	$a_1 b_1 c_0$	Concentración 2 + Uvilla + refrigeración
T8	$a_1 b_1 c_1$	Concentración 2 + Uvilla + sin refrigeración

### ***Tipo de diseño experimental***

Para el análisis estadístico del presente estudio se aplicó un ANOVA DBCA (Diseño de bloques completos al azar) con un arreglo factorial AXBXC (2x2x2).

### ***Repeticiones***

El diseño experimental se realizó con 3 réplicas por cada tratamiento, teniendo un total de 24 unidades experimentales.

## Análisis estadístico

**Tabla 22**

*Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de la bioconservación de los productos IV Gama con bacterias ácido lácticas a partir de la placenta de cacao y con diferentes concentraciones del bioconservante.*

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Concentración bioconservante	$a - 1$	1
Producto IV Gama	$b - 1$	1
Acondicionamiento	$c - 1$	1
Concentración bioconservante x Producto IV Gama	$(a-1)(b-1)$	1
Concentración bioconservante x Acondicionamiento	$(a-1)(c-1)$	1
Producto IV Gama x Acondicionamiento	$(b-1)(c-1)$	1
Concentraciones x Producto IV Gama x Acondicionamiento	$(a-1)(b-1)(c-1)$	1
Réplicas	$R-1$	2
Error experimental	$gt - \sum gl$	14
Total		23

## Análisis funcional

Para las variables que presentaron diferencia significativa se les realizó una prueba de significancia Tukey ( $p < 0,05$ ).

## **Variables evaluadas**

### ***pH***

El potencial de hidrógeno se midió siguiendo el procedimiento sugerido por la norma INEN 389 correspondiente a conservas vegetales. Para ello se trituró 25 gr de la muestra, se agregó agua destilada en proporción 1:1, es decir 25 ml, se llevó a hervir durante 30 minutos hasta homogeneizar completamente la muestra, se dejó enfriar, se filtró con un colador, y se tomó el dato del pH con el potenciómetro (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1985).

### ***Determinación de acidez titulable***

Para determinar la acidez, se tomó como referencia la norma INEN 0381. Para las muestras líquidas (mosto fermentado) se tomó 25 ml de la muestra, aforándose a 250 ml, se homogeneizó, y se vertió 25 ml de la solución en un vaso de precipitación. Por otra parte, para las muestras sólidas (vegetales) se trituró 25 gramos de la muestra, se colocó en un vaso con 50 ml de agua destilada, se dejó hervir durante 30 minutos, luego se dejó enfriar y se filtró la solución. Se aforó la muestra filtrada a 250 ml, se cogió 25 de la solución aforada en un vaso.

Para la toma de datos, se cogió los 25 ml de cada muestra y con ayuda de la bureta y soporte universal se agregó Hidróxido de Sodio (NaOH) al 0,1 N hasta llegar a un pH de 7, a partir de este punto se agregó el NaOH gota a gota hasta llegar a un pH de 8,3. Este procedimiento se realizó tanto para la muestra líquida y sólida. Usando interpolación, se estableció el volumen exacto para llegar a un pH de 8,1. Cabe recalcar que el ácido utilizado como referencia fue el ácido cítrico monohidratado (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1985).

Se utilizó la siguiente fórmula para medir la acidez en productos sólidos:

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

Siendo:

A= valor de la acidez en gramos

V1= ml de NaOH usados para la titulación de la alícuota

N1= Normalidad de la solución de NaOH

M= peso molecular del ácido considerado como referencia

V2= Volumen de la alícuota utilizada para la titulación

### ***Determinación de humedad***

Para determinar el porcentaje de humedad se calentó el crisol en la estufa durante 30 minutos, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. Por otro lado, la muestra vegetal se trituró y se pesó aproximadamente 2 gramos en el crisol. Se llevaron las muestras con el crisol a la estufa donde se dejó por dos horas a 130 °C, se utilizó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de humedad:

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

Siendo:

W<sub>0</sub>= Peso de la muestra en gramos

W<sub>1</sub>= Peso del crisol más la muestra después del secado

W<sub>2</sub>= Peso del crisol más la muestra antes del secado

### ***Ceniza***

Para la determinación de ceniza se tomó como base la metodología de la norma INEN 401 (2013). Para el procedimiento se lavó y secó los crisoles en la estufa a 100 °C durante 30 minutos, se dejó enfriar en el desecador. Luego la muestra vegetal se trituró y se pesó aproximadamente 2 gramos,

se colocó en una hornilla y se quemó totalmente la muestra. Una vez secada y quemada la muestra se llevó a la mufla a 600 °C durante aproximadamente 3 horas, hasta que la muestra se convierta en ceniza, luego se dejó enfriar en el desecador, y se pesó la ceniza (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2013).

Para determinar la ceniza se utilizó la siguiente fórmula:

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

Siendo:

$W_0$ = Peso de la muestra en gramos

$W_1$ = Peso del crisol vacío

$W_2$ = Peso del crisol más la muestra calcinada

### ***Dureza***

Para la determinación de la dureza de los vegetales IV Gama se utilizó el penetrómetro, tomándose el dato de dureza en 3 zonas diferentes de la baya (tomate y uvilla) y se sacó un promedio.

### ***Recuento microbiano en petrifilm™***

Para el recuento de colonias de microorganismos, se trituró 2 gramos de la muestra vegetal. En la cámara de flujo laminar se realizó diluciones seriadas hasta  $10^{-5}$  con agua de peptona, poniendo en la primera dilución 18 ml de agua peptona y en el resto de tubos 9 ml. Se colocó 1 ml de la quinta dilución en petrifilms de aerobios, mohos y levaduras. Se llevó a incubar a 37° C durante 72 horas en el caso de los aerobios, y a 21°C durante 72 horas en mohos y lavaduras y se aplicó la siguiente fórmula para el recuento de microbiano:

$$\left(\frac{\text{UFC}}{\text{ml}}\right) = \frac{n * f}{v}$$

Siendo:

N= número de colonias por placa

F= factor de dilución

V= volumen inoculado en la placa

## Capítulo IV

### Resultados

#### Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la placenta del cacao

**Tabla 23**

*Resultados de los parámetros fisicoquímicos de la placenta del cacao Nacional y CCN-51.*

Parámetros analizados	Unidad	Fresco		Fermentado	
		Nacional	CCN-51	Nacional	CCN-51
pH	–	3,51	3,55	3,98	3,87
Acidez titulable	%	1,15	1,22	1,86	1,72
Sólidos solubles	° Brix	14	11,5	7	8
Grados alcohólicos	°GL	NA	NA	<4° alcohólicos	<4° alcohólicos
Bacterias Aerobias	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	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$

En la tabla 23 se puede ver que existe diferencia significativa en la caracterización fisicoquímica entre las dos variedades de cacao, así como la placenta antes y después de la fermentación. En el parámetro a medir de pH, el valor aumentó durante la fermentación, pasando de un 3,51 a 3,98 en el caso de la variedad Nacional, y aumentó de 3,55 a 3,87 en el caso de la variedad CCN-51, esto era de

esperarse por el hecho de que el ácido cítrico disminuye durante la fermentación, y por el aumento de etanol, lo cual entre más días se deje fermentar la placenta, un pH mayor debe dar.

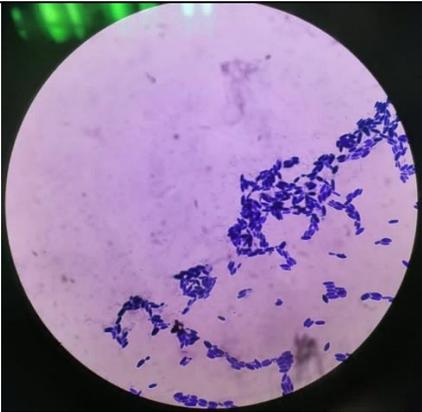
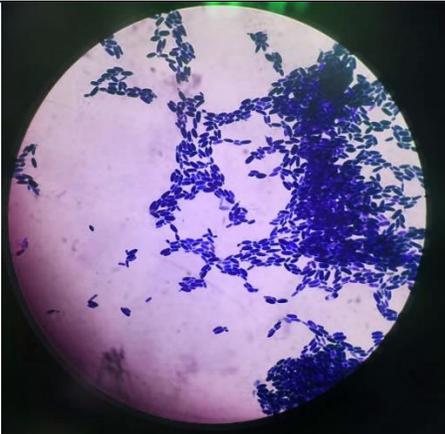
En el caso de la acidez, el porcentaje de ésta aumento al fermentarse la placenta, de 1,15 % a 1,86 % en el caso del cacao Nacional, y 1,22 % a 1,72 % en el caso de la variedad CCN-51. Es de esperarse un aumento en la acidez debido a factores como la producción de ciertos ácidos orgánicos durante la fermentación. En el caso de los grados alcohólicos, tanto la placenta fresca como la fermentada presentaron menos de 4 grados alcohólicos.

En el caso de recuento de población microbiana, la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos que se obtuvo en el mosto fermentado de placenta, fue mayor en la variedad CCN-51 con  $4,3 \times 10^{-3}$  UFC/ml en comparación a la variedad Nacional que se obtuvo  $3,2 \times 10^{-3}$  UFC/ml. En el caso de las Bacterias ácido lácticas, se obtuvo mayor cantidad de colonias en la variedad CCN-51 que en la variedad nacional. En el recuento de mohos y levaduras, en la variedad CNN-51 hubo mayor presencia con  $2,1 \times 10^{-3}$  a comparación de la variedad nacional, donde se obtuvo  $1,8 \times 10^{-3}$ .

## Identificación de BAL presentes en la fermentación de la placenta de cacao

**Tabla 24**

*Resultados de las pruebas microbiológicas que se realizó para la identificación de BAL.*

Origen	Características	Tinción gram
Cacao, variedad Nacional (cepa 1)	Gram positivo  Bacilo  Catalasa negativa	
Cacao, variedad CCN-51 (cepa 1)	Gram positivo  Bacilo  Catalasa negativa	

En la tabla 24 se observan los resultados de las pruebas microbiológicas realizadas a las dos variedades de cacao, de cada cepa aislada se realizó la tinción gram y se observó en el lente 100x, obteniéndose en la cepa 1 de la variedad Nacional, bacterias gram positivas, y con forma de bacilos, aunque algunas pocas presentaban forma de cocos. Las bacterias se encontraban agrupadas en cadenas cortas. En cuanto a la prueba de catalasa, al agregar el peróxido de hidrógeno a la muestra, no se produjeron burbujas, dando resultado negativo, justificando una vez más que eran BAL. En la cepa 1 de



Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
D:Replicas	0,001825	2	0,0009125	1,31	0,3017
INTERACCIONES					
AB	0,0322667	1	0,0322667	46,21	0,0000
AC	0,0104167	1	0,0104167	14,92	0,0017
BC	0,000816667	1	0,000816667	1,17	0,2978
ABC	0,0266667	1	0,0266667	38,19	0,0000
RESIDUOS	0,009775	14	0,000698214		
TOTAL (CORREGIDO)	0,7958	23			

En la tabla 25 se observa diferencia significativa en el factor A, B y C y las interacciones entre los factores A\*B, A\*C y A\*B\*C. Por otro lado, la interacción de factores B\*C y las réplicas no presentaron diferencia significativa.

### **Análisis de varianza para la acidez**

**Tabla 26**

*Análisis de varianza para la variable acidez en el día 7 de la bioconservación.*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración UFC/ml	0,7776	1	0,7776	31,13	0,0001
B:Tipo de fruta	25,174	1	25,174	1007,66	0,0000
C:Acondicionamiento	0,0816667	1	0,0816667	3,27	0,0921
D:Replicas	0,098775	2	0,0493875	1,98	0,1753
INTERACCIONES					
AB	0,0160167	1	0,0160167	0,64	0,4367
AC	6,82667	1	6,82667	273,26	0,0000
BC	0,22815	1	0,22815	9,13	0,0091
ABC	5,02335	1	5,02335	201,07	0,0000
RESIDUOS	0,349758	14	0,0249827		
TOTAL (CORREGIDO)	38,576	23			

En la tabla 26 se observa diferencia significativa en el factor A (concentración del bioconservante), y Factor B (Tipo de vegetal); Así mismo, se encontró diferencia significativa en la interacción A\*C, B\*C y A\*B\*C. En la interacción A\*B no existe diferencia significativa.

**Análisis de varianza para la pérdida de humedad (%)**

**Tabla 27**

*Análisis de varianza para la variable humedad en el día 7 de la bioconservación.*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Concentración UFC/ml	358,208	1	358,208	27,46	0,0001
B:Tipo de fruta	639,014	1	639,014	48,99	0,0000
C:Acondicionamiento	182,822	1	182,822	14,02	0,0022
D:Replicas	0,0452083	2	0,0226042	0,00	0,9983
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	38,2537	1	38,2537	2,93	0,1089
AC	52,7474	1	52,7474	4,04	0,0640
BC	203,118	1	203,118	15,57	0,0015
ABC	0,00326667	1	0,00326667	0,00	0,9876
RESIDUOS	182,621	14	13,0444		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>1656,83</b>	<b>23</b>			

En la tabla 27 se observa diferencia significativa en el factor A, B y C. En cuanto a las interacciones, se encontró una diferencia significativa en la interacción B\*C. No se encontró diferencia significativa.

**Análisis de varianza para la ceniza**

**Tabla 28**

*Análisis de varianza para la variable ceniza en el día 7 de la bioconservación.*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Concentración UFC/ml	2,71354	1	2,71354	163,35	0,0000
B:Tipo de fruta	0,490204	1	0,490204	29,51	0,0001
C:Acondicionamiento	3,3227	1	3,3227	200,02	0,0000
D:Replicas	0,0387	2	0,01935	1,16	0,3405
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1,6172	1	1,6172	97,35	0,0000
AC	2,413	1	2,413	145,26	0,0000
BC	6,2526	1	6,2526	376,39	0,0000
ABC	4,41184	1	4,41184	265,58	0,0000
RESIDUOS	0,232567	14	0,0166119		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>21,4924</b>	<b>23</b>			

En la tabla 28 existe diferencia significativa en el factor A, factor B y factor C. En el caso de las interacciones, se obtuvo una diferencia considerable en las interacciones A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C, no se encontró diferencia significativa en las réplicas.

### **Análisis de varianza para la dureza**

**Tabla 29**

*Análisis de varianza para la variable dureza en el día 7 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Concentración UFC/ml	5,4245	1	5,4245	3,22	0,0942
B:Tipo de fruta	942,632	1	942,632	560,03	0,0000
C:Acondicionamiento	1142,78	1	1142,78	678,94	0,0000
D:Replicas	1,01601	2	0,508004	0,30	0,7442
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	696,927	1	696,927	414,05	0,0000
AC	24,543	1	24,543	14,58	0,0019
BC	160,012	1	160,012	95,06	0,0000
ABC	17,6645	1	17,6645	10,49	0,0059
RESIDUOS	23,5646	14	1,68319		
TOTAL (CORREGIDO)	3014,56	23			

En la tabla 29 se observa diferencia significativa en el factor B y factor C, se encontró diferencia significativa en las interacciones A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C. No se obtuvo diferencia en las réplicas.

### **Pruebas de significación**

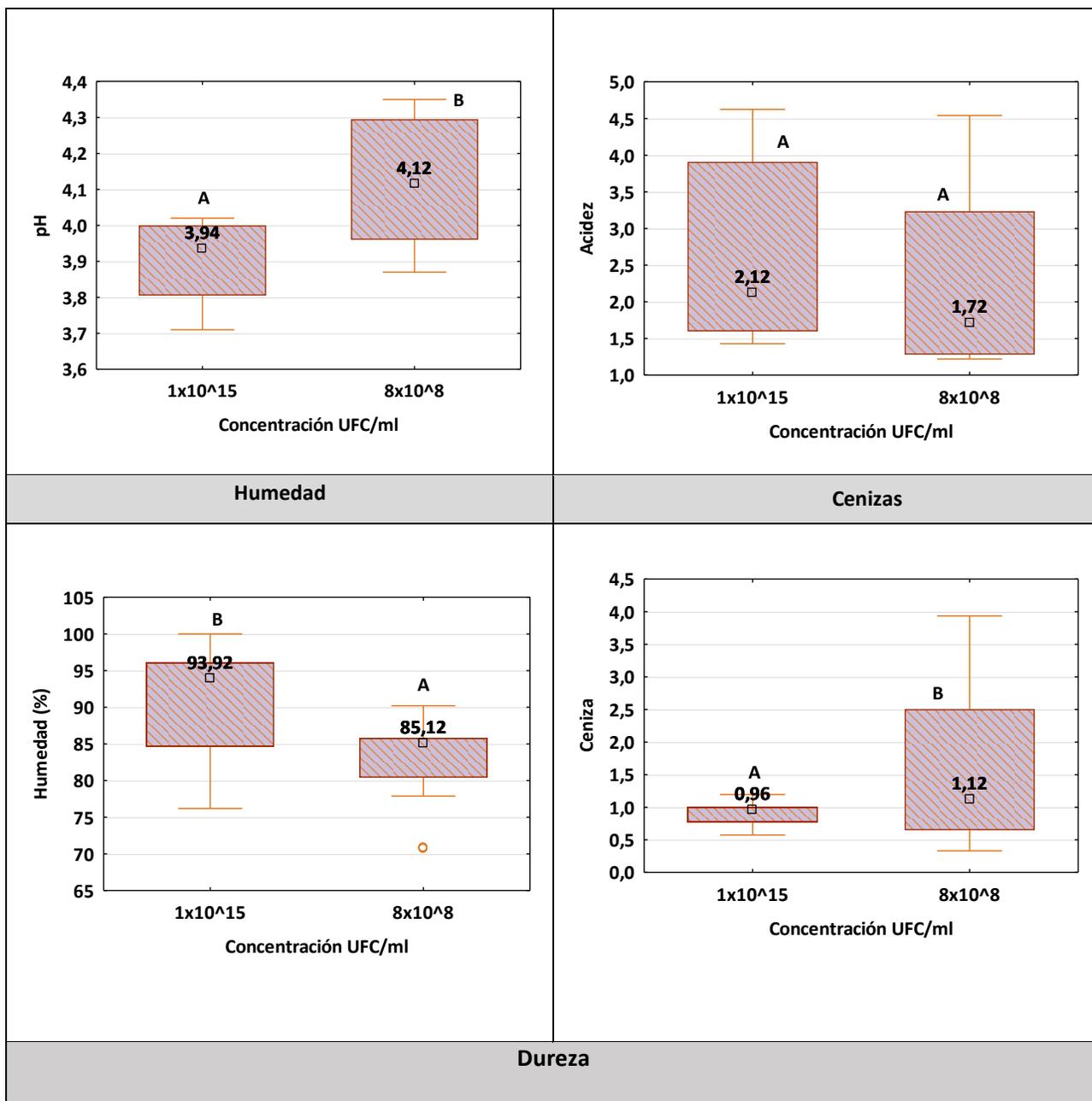
**Resultados del estudio de dos concentraciones de Bioconservante (Factor A). Prueba de significación**

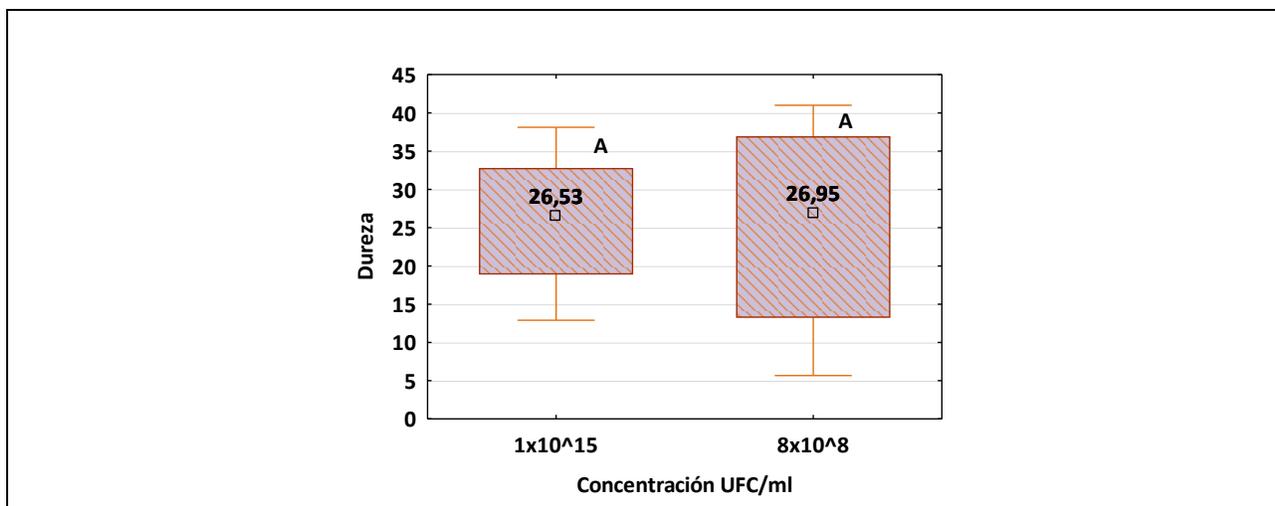
**(Tukey  $p < 0,05$ )**

### **Figura 4**

*Prueba de significación de Tukey para la concentración de la solución bacteriana (Factor A).*

<b>Ph</b>	<b>Acidez</b>
-----------	---------------





En la figura 4 se muestran los valores de Tukey ( $p < 0,05$ ) resumidos de acuerdo a las variables evaluadas, se encontró diferencia significativa en el pH, siendo la concentración  $8 \times 10^8$  (B) la que se obtuvo un valor más alto de la media (4,12) y la concentración  $1 \times 10^{15}$  (A) el menor valor evaluado (3,92).

En el caso de la variable de acidez, no se encontró diferencia significativa en las medias de las variables del factor A, a pesar de no existir diferencia significativa, se obtuvo un valor de 2,12 en la concentración  $1 \times 10^{15}$ , mientras que la concentración  $8 \times 10^8$  tuvo un valor de 1,72.

En la variable de porcentaje de pérdida de peso (humedad), la prueba de Tukey arrojó un valor mayor a los tratamientos con solución bacteriana de  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml con un valor de 93,92 (B), mientras que el valor menor corresponde a los tratamientos con solución bacteriana de concentración  $8 \times 10^8$  (A), demostrándose que existe diferencia significativa entre las medias. Además, se observó un valor atípico en el caso de los tratamientos con concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml que se aproxima a un valor de 70.

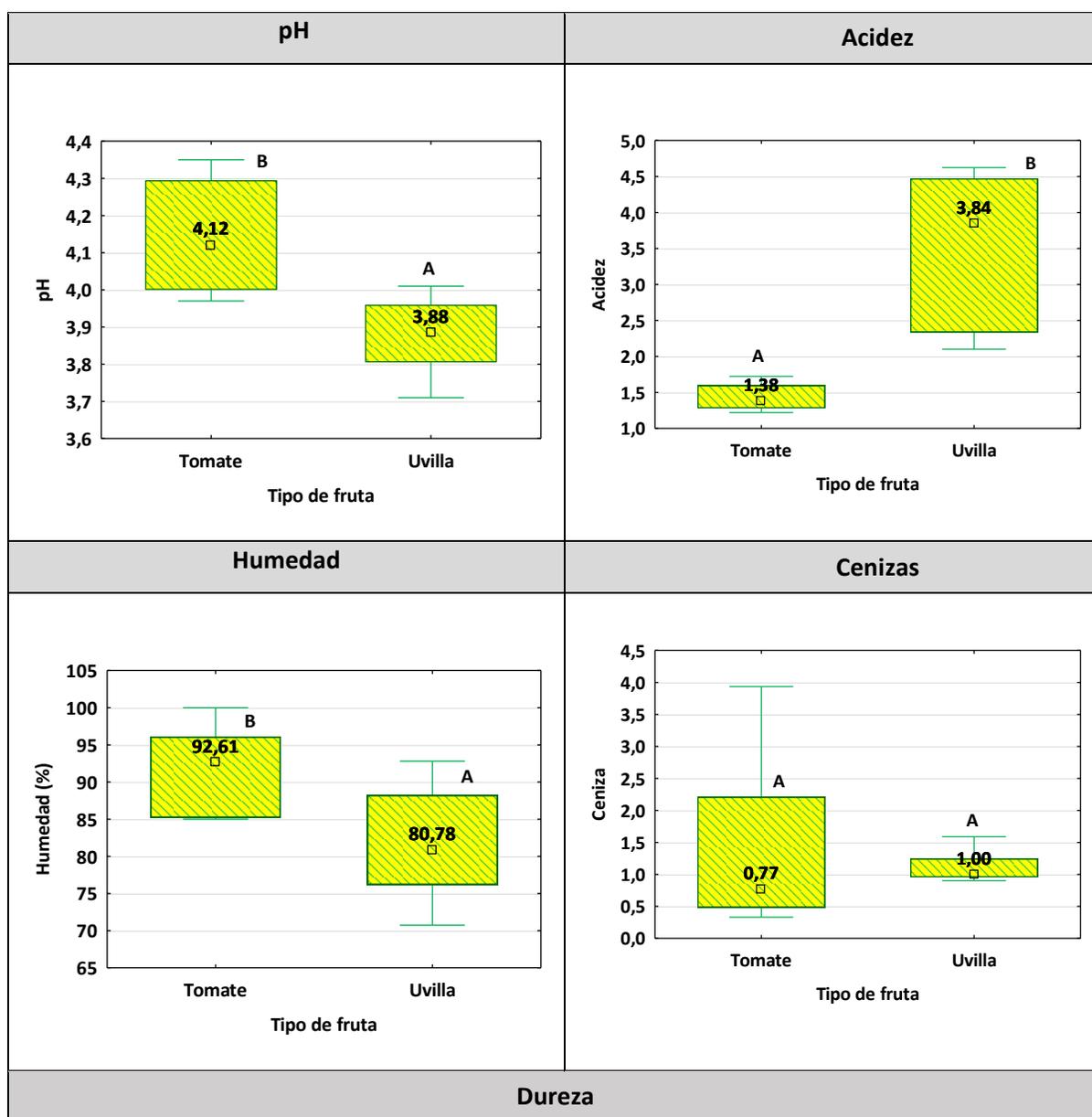
En cuanto a la variable de ceniza, se obtuvo un valor de media mayor en los tratamientos con solución bacteriana con concentración  $8 \times 10^8$  con un valor de 1,12 (B), mientras que los tratamientos con solución bacteriana  $1 \times 10^{15}$  (A) obtuvieron un valor menor de 0,96, por ende, si se encontró diferencia significativa.

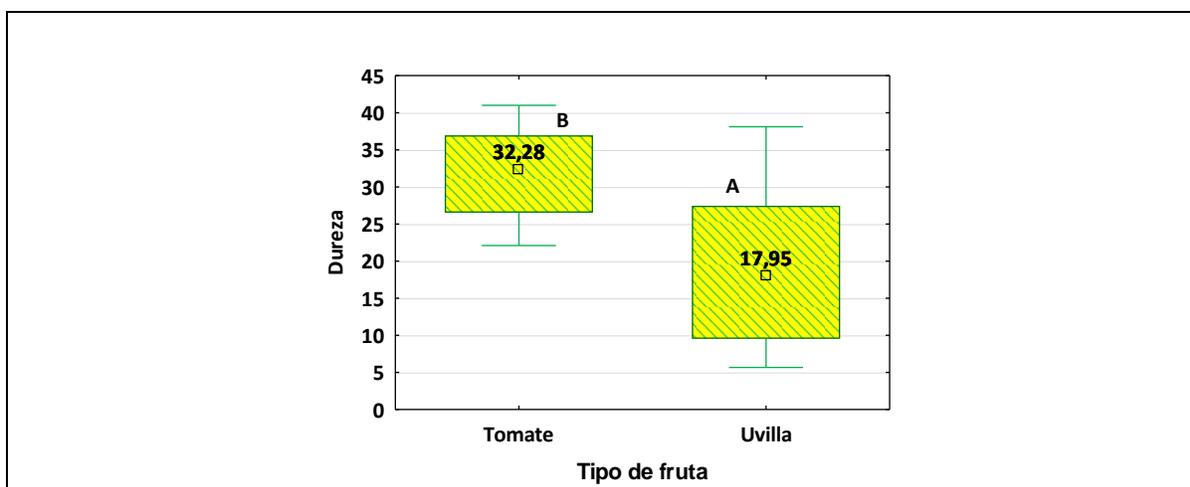
En la variable de dureza, los tratamientos con concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml obtuvieron un valor de 26,53 y los de la concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml obtuvieron un valor de 26,91, no se encontró diferencia significativa, por eso se muestra la misma letra (A) en las dos barras.

**Resultados del estudio de dos Tipo de fruta. Prueba de significación (Tukey  $p < 0,05$ ).**

**Figura 5**

*Prueba de significación de Tukey para el tipo de vegetal (Factor B).*





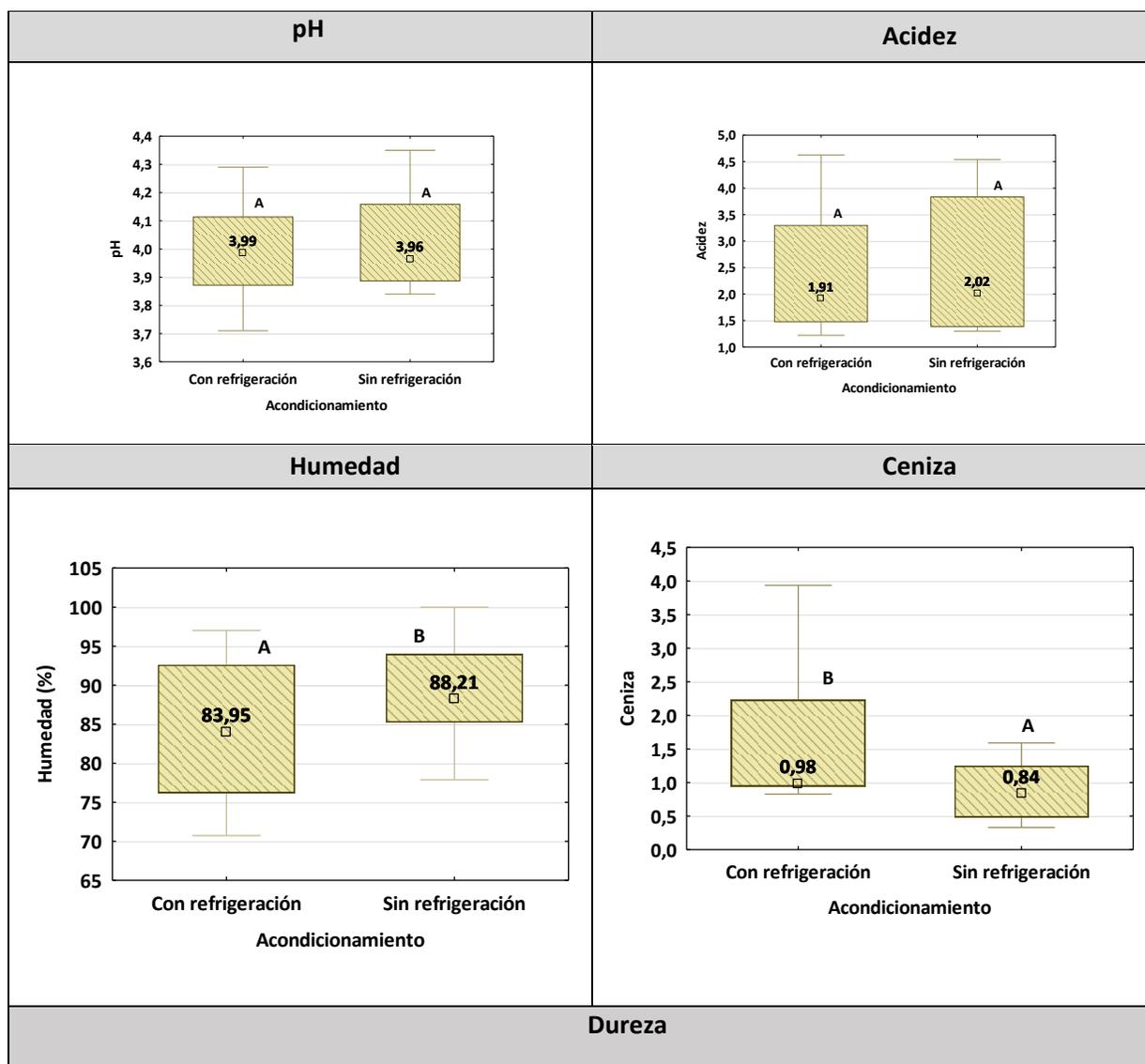
En la figura 5 se observa de manera resumida las medias de las dos variables del factor B en cada parámetro evaluado donde se encontró diferencia significativa. En el caso del pH, se encontró una media mayor de 4,12 (**B**) en el grupo de tratamientos con tomate, y una media menor en el grupo con uvilla con una media de 3,88 (**A**).

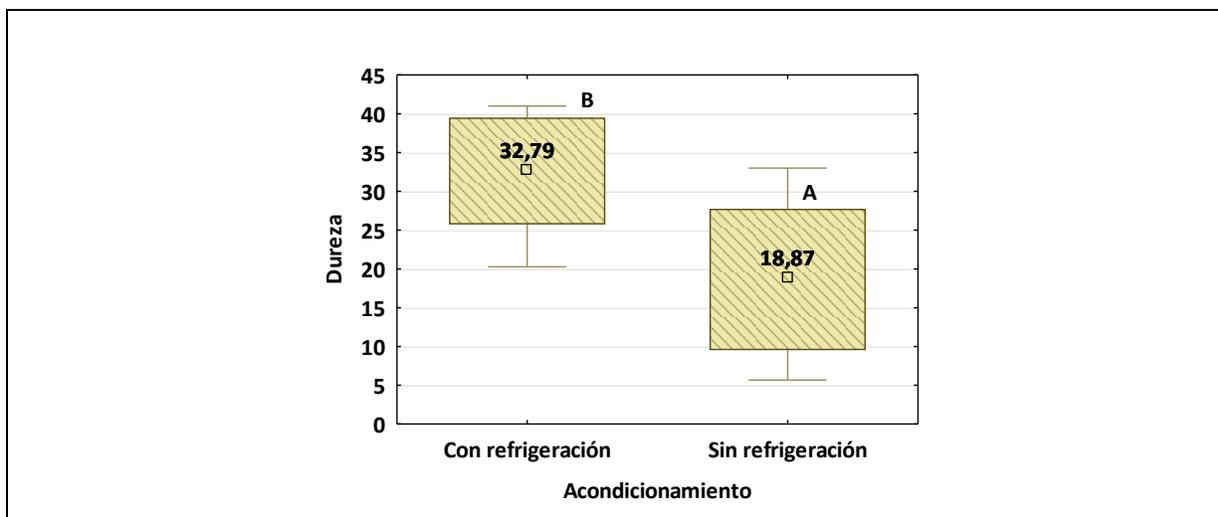
En el parámetro de acidez, los tratamientos con uvilla obtuvieron una mayor media con un valor de 3,84 (**B**), mientras que los tratamientos con tomate obtuvieron un valor muy bajo de media de 1,38 (**A**), observándose claramente la diferencia significativa en el gráfico de cajas.

Para la pérdida de humedad, los tratamientos con la variable tomate obtuvieron una media de 92,61 (**B**) mientras que el grupo de uvilla obtuvo una media promedio de 80,78 (**A**) encontrándose diferencia significativa.

En el caso del parámetro de ceniza, el grupo con la variable tomate obtuvo una media de 0,77 mientras que el grupo con uvilla obtuvo un valor de 1,00 y no se encontró diferencia significativa.

Para la dureza, se obtuvo un valor promedio mayor (**B**) en los tratamientos en lo que se usó tomate (32,28) y el valor más bajo de media fue para los tratamientos en los que se usó la uvilla (**A**), con un valor de 17,95, obteniéndose una diferencia significativa.

**Resultados del estudio de dos acondicionamientos (Factor C). Prueba de significación (Tukey  $p < 0,05$ )****Figura 6***Prueba de significación de Tukey para el acondicionamiento (Factor C).*



En la figura 6 se resume, diferencia significativa de las medias de los tratamientos con y sin refrigeración en cada parámetro evaluado. En el parámetro de pH, no se obtuvo diferencia significativa, sin embargo, los valores fueron de 3,99 y 3,96 respectivamente.

En acidez, no se encontró diferencia significativa, los tratamientos a los que se aplicó refrigeración obtuvieron un valor de 1,91, mientras que a los tratamientos sin refrigeración obtuvieron una media de 2,03, ambos tratamientos tienen la letra **A**.

En el caso de la pérdida de peso (humedad), se obtuvo un valor mayor en los tratamientos sin refrigeración, obteniéndose un valor de 88,21 (**B**), mientras que se obtuvo un valor menor de media de 83,95 (**A**) para los tratamientos en los que se aplicó refrigeración encontrándose diferencia significativa entre los dos casos.

Para la ceniza, el grupo de tratamientos con refrigeración arrojaron un valor mayor de media de 0,98 (**B**), mientras que los tratamientos con la variable sin refrigeración dieron un valor menor de 0,84 (**A**), por lo tanto, si se encontró diferencia significativa.

En el parámetro de dureza, se encontró diferencia significativa dando un valor mayor (32,79) al grupo de tratamientos en los que se aplicó refrigeración (B), y un valor de media de 18,87 (A) siendo este el grupo con una media menor.

**Resultados del estudio de interacción entre dos concentraciones, dos tipos de vegetal y dos acondicionamientos (Interacción A\*B\*C). Prueba de significación (Tukey  $p<0,05$ )**

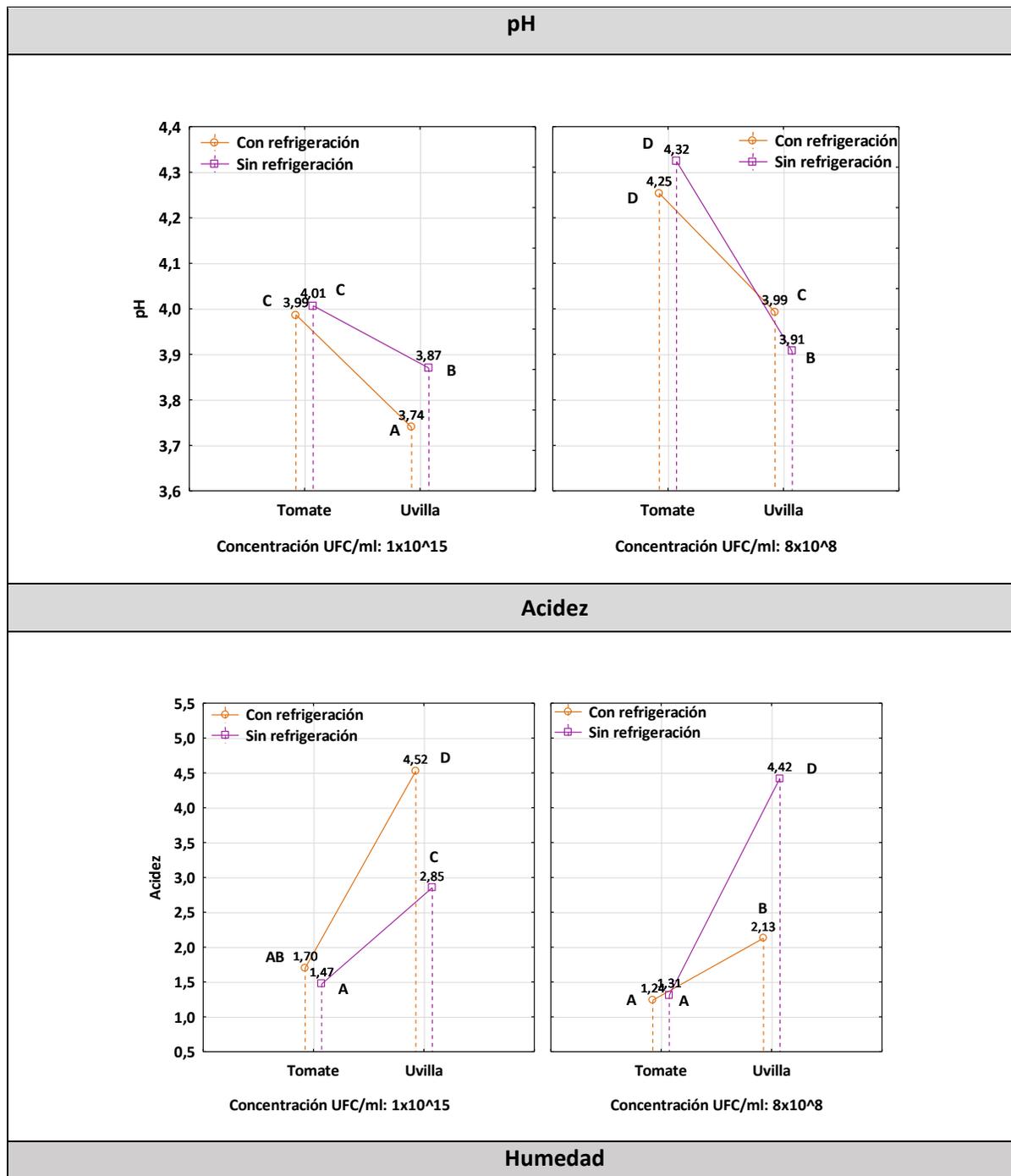
**Tabla 30**

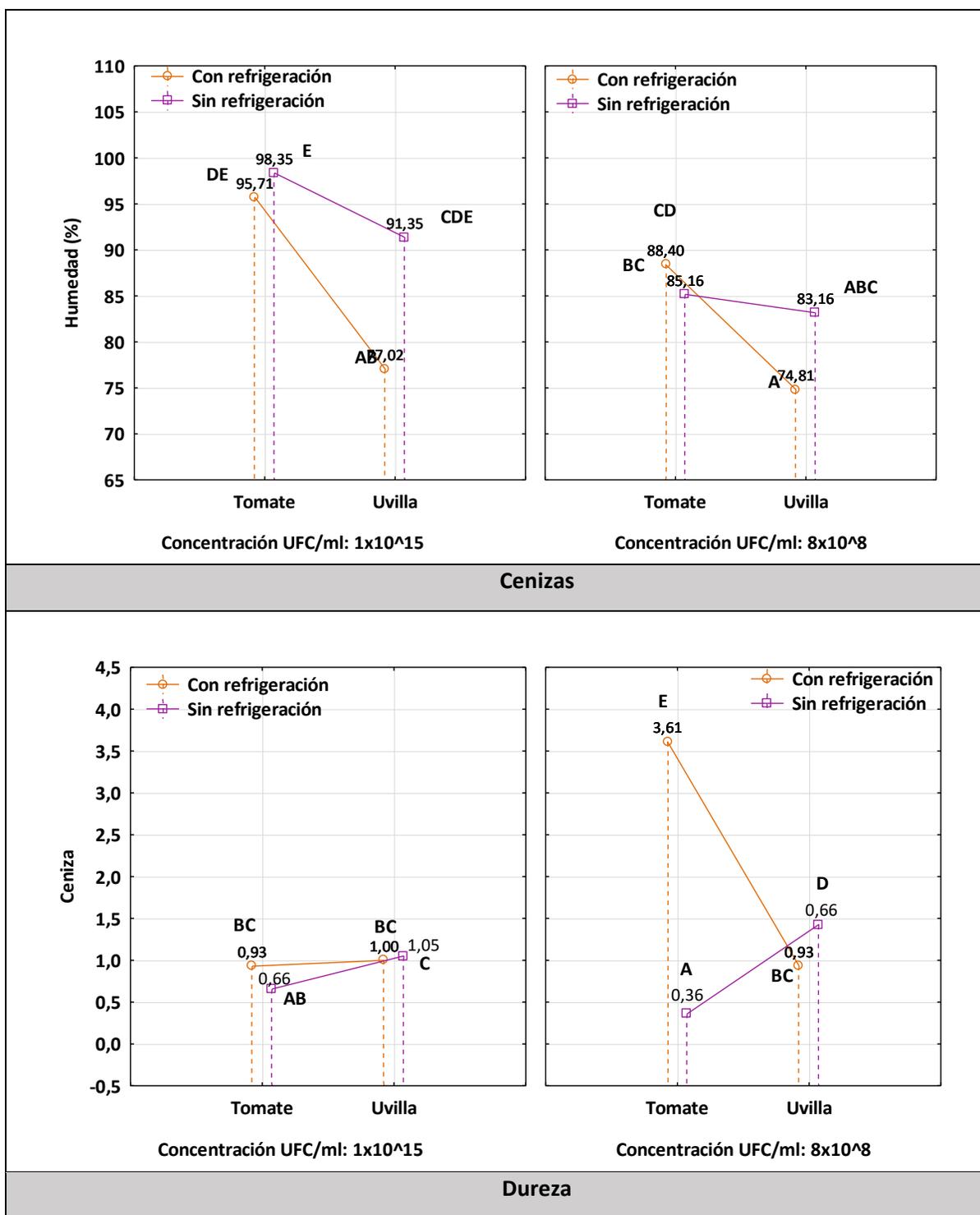
*Prueba de significación de Tukey para la interacción de factores (A\*B\*C).*

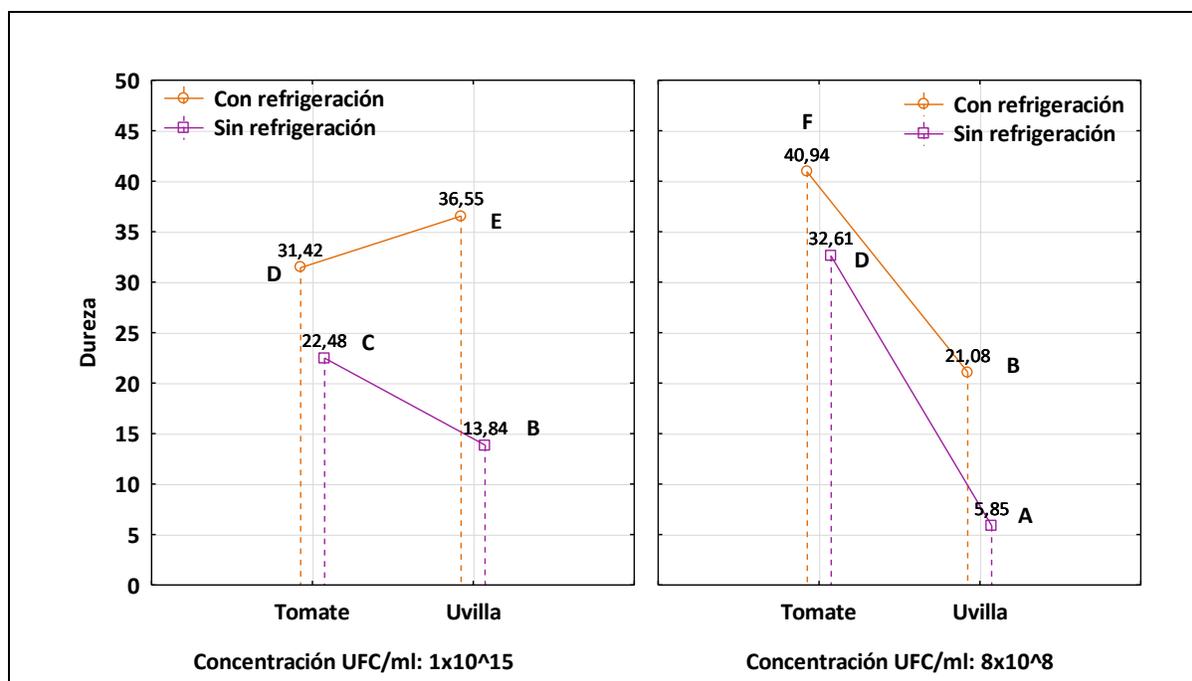
Interacciones	pH	Acidez	Humedad	Ceniza	Dureza
<b>a0b0c0:</b> $1 \times 10^{15}$ UFC/ml + tomate + refrigeración	3,99 <sup>C</sup>	1,70 <sup>AB</sup>	95,71 <sup>DE</sup>	0,93 <sup>BC</sup>	31,42 <sup>D</sup>
<b>a0b0c1:</b> $1 \times 10^{15}$ UFC/ml + tomate + sin refrigeración	4,01 <sup>C</sup>	1,47 <sup>A</sup>	98,35 <sup>E</sup>	0,66 <sup>AB</sup>	22,48 <sup>C</sup>
<b>a0b1c0:</b> $1 \times 10^{15}$ UFC/ml + uvilla + refrigeración	3,74 <sup>A</sup>	4,52 <sup>D</sup>	87,02 <sup>AB</sup>	1,00 <sup>BC</sup>	36,55 <sup>E</sup>
<b>a0b1c1:</b> $1 \times 10^{15}$ UFC/ml + uvilla + sin refrigeración	3,87 <sup>B</sup>	2,85 <sup>C</sup>	91,35 <sup>CDE</sup>	1,05 <sup>C</sup>	13,84 <sup>B</sup>
<b>a1b0c0:</b> $8 \times 10^8$ UFC/ml + tomate + refrigeración	4,25 <sup>D</sup>	1,24 <sup>A</sup>	88,40 <sup>CD</sup>	3,61 <sup>E</sup>	40,94 <sup>F</sup>
<b>a1b0c1:</b> $8 \times 10^8$ UFC/ml + tomate + sin refrigeración	4,32 <sup>D</sup>	1,31 <sup>A</sup>	85,16 <sup>BC</sup>	0,36 <sup>A</sup>	32,61 <sup>D</sup>
<b>a1b1c0:</b> $8 \times 10^8$ UFC/ml + uvilla + refrigeración	3,99 <sup>C</sup>	2,13 <sup>B</sup>	74,81 <sup>A</sup>	0,93 <sup>BC</sup>	21,08 <sup>B</sup>
<b>a1b1c1:</b> $8 \times 10^8$ UFC/ml + uvilla + sin refrigeración	3,91 <sup>B</sup>	4,42 <sup>D</sup>	83,16 <sup>ABC</sup>	0,66 <sup>D</sup>	5,85 <sup>A</sup>

Figura 7

Prueba de significación de Tukey para Concentración\*Tipo de vegetal\*Acondicionamiento (Interacción A\*B\*C).







En la figura 7 se observa los resultados de diferencia significativa en las medias de la interacción entre los factores A\*B\*C. En el parámetro evaluado de pH se obtuvo un valor mayor en el tratamiento con solución bacteriana de concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado en tomate sin refrigeración (**a1b0c1**) con un valor de media de 4,32 (D), mientras que el menor valor se lo llevó el tratamiento de concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml aplicado a la uvilla y con refrigeración (**a0b1c0**) con un valor de 3,74 (A). Se encontró una mayor homogeneidad entre el tratamiento **a0b0c0** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + refrigeración) con **a0b0c1** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + sin refrigeración) y **a1b1c0** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + refrigeración), por ende, contienen la letra C.

En el caso de la acidez, el tratamiento con solución bioconservante de concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml aplicado a la uvilla y con refrigeración (**a0b1c0**) obtuvo el valor más alto de la media con 4,52 (D); mientras que el tratamiento de solución bioconservante de  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado al tomate y con refrigeración (**a1b0c0**) se llevó el valor menor de media con un 1,24 (A). Se encontró homogeneidad entre los tratamientos **a1b0c0** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + tomate + refrigeración) junto con **a1b0c1** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + tomate + sin refrigeración), **a0b0c1** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + sin refrigeración) y **a0b0c0** ( $1 \times 10^{15}$

UFC/ml + tomate + refrigeración), por ende, contienen la letra **A** en común. El tratamiento **a0b1c1** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + uvilla + sin refrigeración) es el único que tiene diferencia significativa con todos los tratamientos restantes (nótese la letra **C**).

En el caso de la pérdida de peso, el tratamiento con solución bacteriana de concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml aplicado al tomate y sin refrigeración (**a0b0c1**) se llevó el valor más alto de media, con un estimado de 98,35 (**E**). Por otro lado, el tratamiento con solución bacteriana de  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado a la uvilla y con refrigeración (**a1b1c0**) arrojó el menor valor de media con un 74,81 (**A**). Los tratamientos **a0b1c1** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + uvilla + sin refrigeración) y **a1b1c1** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + sin refrigeración) son los tratamientos que más homogeneidad tienen con el resto de tratamientos. En el caso del tratamiento **a1b1c1** forma parte de 3 grupos homogéneos (nótese las letras **ABC**) el mismo caso sucede para el tratamiento **a0b1c1** (nótese las letras **CDE**).

Para el parámetro de las cenizas, la prueba de Tukey arrojó un valor de 3,61 al tratamiento con solución bacteriana de  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado en el tomate y con refrigeración (**a1b0c0**) siendo este el valor más alto para este parámetro (**E**), en cambio el valor más bajo correspondió al tratamiento de solución bioconservante de  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado en el tomate y sin refrigeración (**a1b0c1**) con 0,36 (**A**). Se encontró mayor homogeneidad en los tratamientos **a0b0c0** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + refrigeración) con **a0b1c0** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + uvilla + refrigeración) y **a1b1c0** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + refrigeración) estando cercanos entre sí dentro de 2 grupos diferentes (nótese las letras **BC**) además estos 3 tratamientos tienen en común el acondicionamiento, estando los 3 casos en refrigeración.

Por último, en el caso de la dureza, el valor más alto se lo llevó el tratamiento con concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado en el tomate y con refrigeración (**a1b0c0**) con 40,94 (**F**), mientras que el menor valor fue para el tratamiento con concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado en la uvilla y sin refrigeración (**a1b1c1**) con 5,85 (**A**). En esta variable se encontraron diferencia significativa entre casi

todos los tratamientos, los únicos grupos donde se encontró homogeneidad fueron entre el tratamiento **a0b1c1** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + uvilla + sin refrigeración) y **a1b1c0** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + refrigeración) que contienen la letra **C** y los tratamientos **a0b0c0** ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + refrigeración) con **a1b0c1** ( $8 \times 10^8$  UFC/ml + tomate + sin refrigeración) que contienen la letra **D**.

### Análisis microbiológico

#### *Recuento de microorganismos aerobios mesófilos*

**Tabla 31**

*Recuento de microorganismos aerobios en los tratamientos al día 7 de la bioconservación.*

Tratamiento	UFC/ml
T1	8,20E+04
T2	3,10E+03
T3	1,05E+03
T4	4,00E+04
T5	6,70E+02
T6	1,40E+04
T7	1,05E+03
T8	2,40E+04

En la tabla 30 se observa el número de microorganismos presentes en las muestras vegetales al día 7 de la bioconservación y en la dilución  $10^{-5}$ . Mediante el conteo se pudo determinar que el mejor tratamiento fue el Tratamiento 1 que corresponde a la solución bacteriana con concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml aplicado en el tomate cherry y con refrigeración con una cantidad de  **$8,20 \times 10^4$  UFC/ml**, mientras que el tratamiento con menos aerobios fue el tratamiento 5 que corresponde a la solución bioconservante con concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado al tomate cherry y con refrigeración, con una cantidad de  **$6,70 \times 10^2$  UFC/ml**.

### Recuento de Mohos y Levaduras

**Tabla 32**

Recuento de mohos y levaduras en los tratamientos en el día 7 de la bioconservación.

Tratamiento	UFC/ml
T1	2,00E-05
T2	5,00E-05
T3	1,40E-03
T4	1,00E-04
T5	4,50E-03
T6	6,00E-05
T7	3,00E-05
T8	3,00E-05

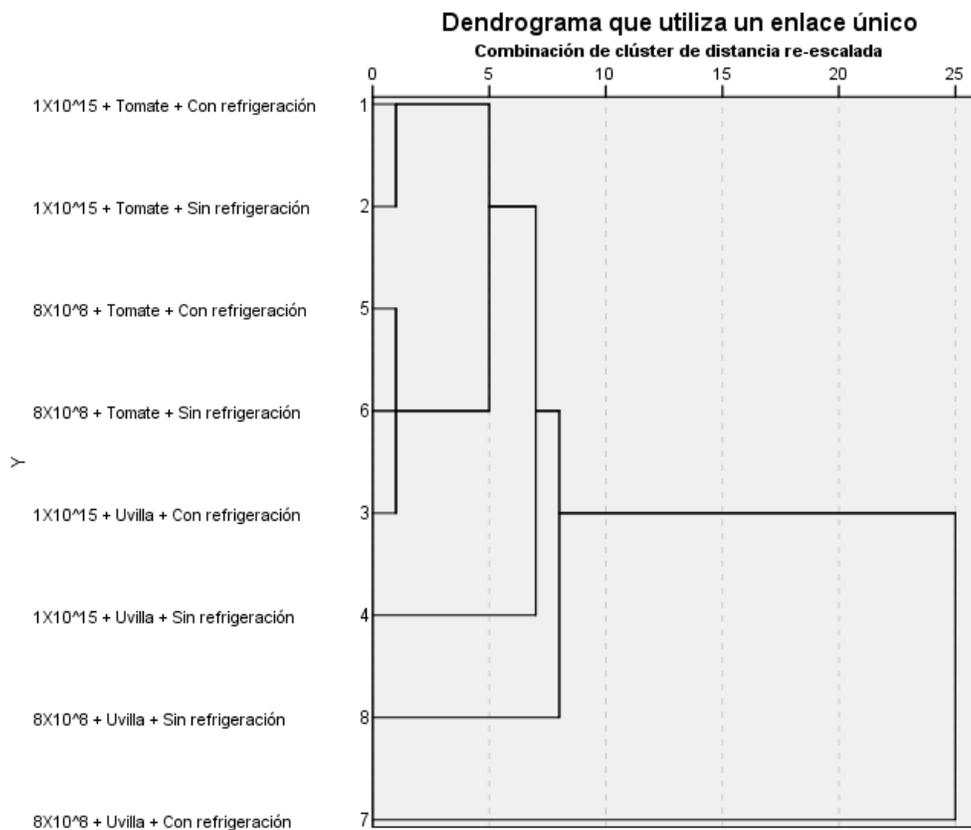
En la tabla 31 se muestran los resultados del crecimiento de mohos y levaduras en el día 7 de la bioconservación, el conteo se lo realizó en la dilución  $10^{-5}$  donde se obtuvo que el mejor tratamiento fue el tratamiento 6, que corresponde a la solución bioconservante de concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml aplicado al tomate cherry y sin refrigeración, que es donde menor cantidad de unidades formadoras de colonias se encontró, con un total de  **$6,00 \times 10^{-5}$  UFC/ml**.

Al mejor tratamiento (**Tratamiento 1**) también se le realizó un recuento microbiano para *E. coli*, salmonella y enterobacterias, obteniéndose un total de  **$3 \times 10^5$  UFC/ml** de *e. coli*,  **$4 \times 10^5$  UFC/ml** para salmonella y  **$2 \times 10^5$  UFC/ml**.

## Análisis de conglomerados

**Figura 8**

*Dendrograma para los factores de estudio.*



En la figura 8 se observa el dendrograma de vecinos más próximos que se aplicó a los tratamientos de estudio con respecto a los parámetros físico-químicos evaluados (pH, acidez, pérdida de humedad, ceniza, dureza) y se agruparon los tratamientos de acuerdo a su nivel de similitud, se encontraron 6 conglomerados o agrupaciones; Se obtuvo una estrecha relación entre el tratamiento de concentración 1x10<sup>15</sup> UFC/ml + tomate + con refrigeración (**Tratamiento 1**) y el tratamiento 1x10<sup>15</sup> UFC/ml + tomate + sin refrigeración (**Tratamiento 2**), llegando a tener una diferencia <5 %, esta similitud se debe a que estos 2 tratamientos tienen los niveles de concentración y tipo de vegetal en común (1x10<sup>15</sup> UFC/ml + tomate). Se encontró también 3 tratamientos relacionados estrechamente, se trata de los tratamientos 5 (8x10<sup>8</sup> UFC/ml + tomate + refrigeración), 6 (8x10<sup>8</sup> UFC/ml + tomate + sin

refrigeración) y 3 ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + uvilla + refrigeración). Cabe recalcar que esta estrecha relación entre estos tratamientos se debe a que tienen niveles de factores en común entre sí. Por otro lado, los tratamientos con solución bioconservante de  $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + con refrigeración (**Tratamiento 7**) y el de concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + sin refrigeración (**Tratamiento 8**) son los grupos que menor relación presentaron, esto se puede ver en el gráfico siendo la longitud de línea de unión de los tratamientos 7 y 8 es la más larga (llegando a una distancia de 25).

### Análisis de componentes principales

**Tabla 33**

*Matriz de correlación de los componentes principales de la bioconservación.*

	pH	Acidez	Humedad	Ceniza	Dureza	
Correlación	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

En la tabla 32 se observa la matriz de correlaciones multivariable, en donde se obtuvo que la variable de pH tiene una correlación negativa con la acidez, es decir están relacionados de manera inversamente proporcional, mientras el pH aumenta, la acidez baja. En el caso de la humedad con la ceniza, no existió correlación de 0,004 es decir, una variable no influye en nada a la otra, es decir, son variables independientes entre sí. Así mismo se encontró una correlación negativa de -0,503 entre la variable humedad y acidez, es decir, mientras la humedad aumenta, la acidez disminuye.

**Tabla 34**

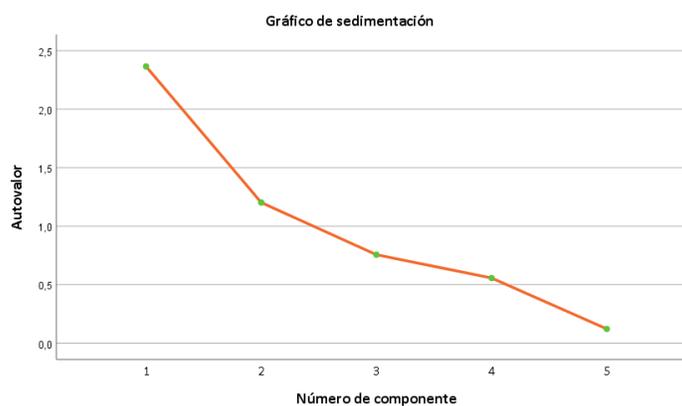
*Porcentajes de la varianza total explicada.*

Componentes			
Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de varianza	% acumulado
1	2,365	47,302	47,302
2	1,202	24,033	71,335
3	,756	15,111	86,445
4	,557	11,135	97,580
5	,121	2,420	100,000

En la tabla 34 se observan los porcentajes de varianza de los 5 componentes, teniendo como principales componentes el 1 y 2 que son los que mayor variabilidad presentan del conjunto de datos obtenidos de los tratamientos. En el caso del componente 1 se obtuvo un 47,302 % de varianza, siendo el componente que más variabilidad presentó, le sigue el componente 2 con un 24,033 % de varianza.

**Figura 9**

*Gráfico de sedimentación de los componentes principales.*

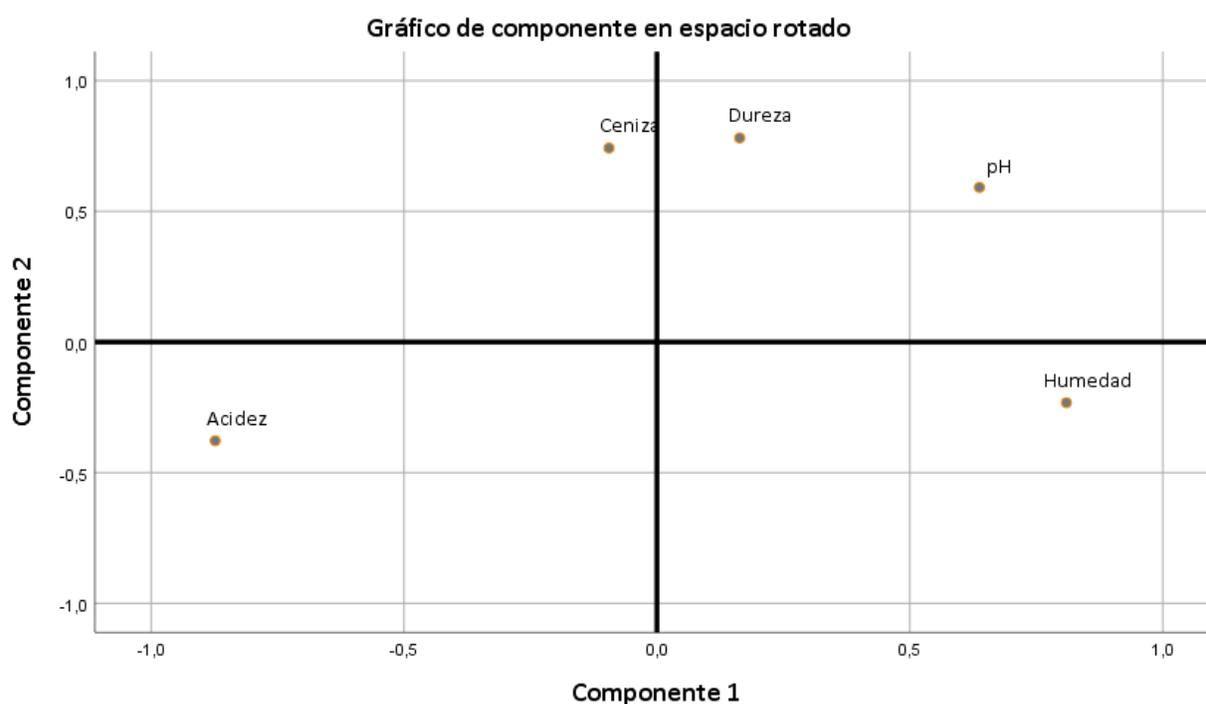


En la figura 9 se observa la pendiente correspondiente al nivel de variabilidad de las variables que conforman cada componente, teniendo que el componente 1 y 2 son los que más contribuyen a la

variabilidad de datos de todas las variables, con un autovalor de 2,36 y 1,20 respectivamente; Mientras que el componente 5 es donde menos variabilidad entre variables existe, es decir los datos de variables que conforman estos componentes están mayormente correlacionados, están estrechamente relacionados ya sea de manera positiva o negativa.

**Figura 10**

*Gráfico de componentes en espacio rotado.*



En la figura 10 se observan el nivel de cercanía o que tan correlacionados están las variables, aquí se demuestra gráficamente la correlación inversamente proporcional entre el pH y la acidez, con un valor de -0,792 como se explica en la tabla 33. En el caso de acidez y humedad existe cierta correlación negativa (-0,503) entre el resto de variables no existe correlación alguna.

## Capítulo V

### Discusión

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos que suelen estar presentes en ambientes y medios que contengan bastantes nutrientes, es decir, medios complejos, este grupo de bacterias están constituidas por alrededor de 530 especies y subespecies. En base al estudio de (Thayná et al., 2021) que dice que las bacterias ácido lácticas generalmente se presentan en forma de cocos y bacilos, suelen estar agrupados en cadenas cortas, son gram positivas, al visualizar en el microscopio se observan de color violeta, y en la prueba de catalasa da negativo, por ende, los resultados del estudio presente se determinaron que las bacterias aisladas y purificadas si son ácido lácticas, esto se corroboró con la identificación de la especie mediante secuenciación, en donde se obtuvo que la bacteria presente pertenece a la especie *Lactobacillus plantarum*, y según el estudio de (Seddik et al., 2017) esta especie es capaz de producir bacteriocinas y son de las especies más estudiadas para el uso en la conservación de alimentos, y estas bacteriocinas producidas por *L. plantarum* son denominadas plantaricinas y pertenecen a la clase IIB (bacteriocinas de 2 péptidos).

#### **Respecto a la caracterización físico química de la placenta de cacao**

En cuanto a los resultados de la caracterización físico-química de la placenta de las 2 especies de cacao, el pH del mosto fresco fue de 3,51 para la variedad Nacional y 3,55 para CCN-51, en el mosto fermentado el pH de las 2 variedades de cacao aumentó a 3,98 en cacao Nacional y 3,87 en CCN-51, esto se debe al aumento de etanol durante la fermentación y al consumo del ácido cítrico como parte del metabolismo de los microorganismos presentes en la placenta y mucílago de cacao como indica el estudio de (García González et al., 2019) donde el pH del mosto fermentado también aumentó de 3,61 a 4,24 valores parecidos a los obtenidos en el presente estudio pero con un ligero aumento en el pH final, esta diferencia de valores en los 2 estudios realizados se debe al tiempo de fermentación, siendo que en nuestro estudio se tomó los datos a las 72 horas de fermentación.

Respecto a la acidez titulable, ésta aumentó en el mosto de cacao fermentado, pasando de 1,15 en fresco a 1,86 en fermentado en la variedad Nacional y de 1,22 de mosto fresco a 1,72 de mosto fermentado en la variedad CCN-51. Estos valores son cercanos a los obtenidos en el estudio de (Jordan Cobos & Parra, 2020) donde la acidez obtuvo un valor promedio de 1,15. Además el aumento de la acidez durante la fermentación se debe a la producción de ácidos orgánicos a causa de los microorganismos presentes durante la fermentación, siendo este el caso del ácido láctico producido por las BAL y el ácido acético producido por las BAA, entre más horas de fermentación, mayor será la acidez titulable (Ortiz et al., 2009).

Los resultados de los sólidos solubles, se encontró una disminución de los grados brix, pasando de 14 en el mosto fresco a 7 en el mosto fermentado en el caso de la variedad Nacional, y de 11,5 en fresco a un valor de 8 en el mosto fermentado en el caso de CCN-51, esta disminución se debe principalmente a la transformación de los azúcares en etanol y CO<sub>2</sub>, estos valores difieren un tanto con los correspondientes al estudio de (Vera et al., 2018) donde se obtuvo un valor de 7,2 grados brix, y en donde además en varias repeticiones y combinaciones los resultados variaron entre 7 y 9 ° brix, esto es un indicativo de que la fermentación fue un éxito.

En el caso de los grados alcohólicos, en el mosto fresco de las 2 variedades se obtuvo un valor menor a 4 GL. Después de las 72 horas de fermentación, se obtuvo un valor menor a 4°GL en las 2 variedades de cacao, estos valores difieren con los del estudio de (Marcillo & Meza, 2012) en cual los valores promedio del mucílago del cacao fermentado se encuentra entre los 7 y 13 °GL. Los valores obtenidos en el presente estudio se encuentran por debajo del rango aceptable para bebidas alcohólicas según la norma INEN NTE 0374:87 (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2016), sin embargo, como el objetivo del presente estudio no es realizar una bebida alcohólica, no afecta en el resultado.

### Respecto al Factor A (Concentración de la solución bioconservante)

Con respecto a los resultados de la caracterización físico-química y bromatológica de las muestras bioconservadas, se observó un valor mayor de 4,12 para la concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml y un valor menor de 3,94 para la concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml. Algunos de los valores obtenidos se encuentran fuera de las especificaciones para conservas vegetales según la norma INEN 430 donde el pH máximo permitido es de 3,9. Se encontró un pH mayor en el caso de la concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml y un pH menor en la concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml en el día 7 de la bioconservación. Estos valores ácidos se deben a la producción de ácido láctico por parte de las BAL, debido a una mayor concentración de BAL existe una mayor producción de ácido láctico, sin embargo, al ser *L. plantarum* una bacteria heterofermentativa, no producirá tanto ácido láctico como otras BAL que son homofermentativas (Siezen & Hylckama, 2011), esta diferencia de valores es parecida al estudio de (Tipan, 2022) donde en la solución más concentrada del bioconservante aplicada en lechuga y col arrojó valores menores de pH (6,23 y 6,10) en comparación con la solución menos conservada aplicada en lechuga y col (6,72 y 6,51) en el día 5 de la conservación. En los resultados del presente estudio se obtuvieron valores relativamente ácidos, variando entre 3 y 4, esto también puede ser por la cantidad de ácidos presentes en la uvilla, especialmente el cítrico y málico (Brito et al., 2008).

En cuanto a la acidez, los valores no varían entre las 2 concentraciones, los tratamientos aplicados con la solución más concentrada ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml) dieron un valor de 2,12 para la concentración  $8 \times 10^8$  UFC/m un valor de 1,72, nuevamente, recalcando una mayor producción de ácido láctico por parte de las BAL, teniendo una relación proporcional entre la concentración del bioconservante y el nivel de acidez, a mayor concentración, mayor acidez, esto se debe a que las BAL al producir ácido láctico, acidifican el entorno, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos como *salmonella* y hongos como *fusarium oxysporum* que crecen en ambientes de pH un poco más neutro (Gutiérrez et al., 2000).

En cuanto a la pérdida de peso (humedad), los tratamientos con la concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml obtuvo un mayor porcentaje de humedad, con un 93,92 en comparación que los tratamientos con concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml que dieron un 85,12, se encontró diferencia significativa. La presencia de mayor humedad en los tratamientos con la solución más concentrada se debe a que existe mayor presencia de líquidos en la muestra, las BAL en la muestra no solo tuvieron un efecto antimicrobiano, sino que generaron más productos como diacetilo o etanol, estos compuestos generados afectan la cantidad de líquido presente en la superficie de los vegetales, y la solución más concentrada, por ende, tendrá un efecto mayor en la humedad de la muestra (Ramírez & Vélez, 2016). Los valores obtenidos en el presente estudio fueron de 93,92 % para la solución más concentrada y 85,12% para la menos concentrada, valores que difieren mucho de los obtenidos en el estudio de (Muñoz Guzmán, 2022) donde se obtuvo un 37% de humedad en la solución más concentrada y 29% en la menos concentrada en el día 5 de la bioconservación, cabe acotar que la diferencia de estos valores se debe a la cantidad bacteriana en los bioconservantes, en nuestro estudio la población de BAL en la solución era mayor en las variables ( $1 \times 10^{15}$  UFC/ml y  $8 \times 10^8$  UFC/ml) mientras que en el estudio de Muñoz las concentraciones fueron de  $2 \times 10^7$  UFC/ml y  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

En el caso de la ceniza, se encontró diferencia significativa, encontrándose mayor cantidad de ceniza en los tratamientos con concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml con un valor de 1,12 y una cantidad menor de ceniza en los tratamientos con  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml dando un 1,12, esto quiere decir que existe mayor cantidad de minerales y residuos inorgánicos en estos tratamientos. Sin embargo, no existe evidencia o estudios suficientes de la influencia o relación que tenga la cantidad bacteriana con la cantidad de minerales presentes en una muestra, a pesar de ello, en el estudio de (Wegkamp et al., 2010) donde se estudia los requerimientos mínimos para el crecimiento de *L. plantarum*, se concluye que existe varios componentes que tienen azufre o nitrógeno en su composición (ácido aminobenzoico) que *L. plantarum* consume para su metabolismo, esto puede afectar la cantidad de estos minerales (N, S) presentes en los

vegetales, entonces al existir mayor concentración de BAL en los vegetales, mayor consumo de estos minerales, esto conlleva a una reducción de ceniza.

En el caso de la dureza, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con las 2 concentraciones, con un valor promedio de 26. Esta semejanza en los valores demuestra que la concentración de la solución no afecta la dureza y firmeza de las muestras, cabe recalcar que las BAL inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos que suelen descomponer y romper los tejidos externos de los vegetales (Brito et al., 2008).

### **Respecto al Factor B (Tipo de vegetal)**

En cuanto a los resultados de los parámetros físico químicos y bromatológicos de los tratamientos, se obtuvo en el caso del pH, una diferencia significativa, con un valor mayor en los tratamientos que se usaron tomate, con un promedio de 4,12 y un valor menor en los tratamientos con uvilla, con un promedio de 3,88. Estos valores se deben principalmente a los contenidos de cada vegetal, siendo la uvilla más ácida. Los valores obtenidos de la uvilla son semejantes a los del estudio de (Mendoza et al., 2012) donde se obtuvieron resultados de pH de 3,72. En el caso del tomate los valores obtenidos en el presente estudio son semejantes a los del estudio de (Hernández, 2013) donde se obtuvieron valores de pH de 4,06 aproximadamente.

Para la variable de acidez, se encontró diferencia significativa entre los tipos de vegetal, obteniéndose que en la uvilla existe una mayor acidez (3,84) mientras que en el tomate se obtuvo poca acidez (1,38). Estos resultados se relacionan de manera inversa con los resultados del pH, en este caso un menor pH significa una mayor acidez, mientras que un mayor pH significa una menor acidez. Estos valores van de la mano con el hecho de que al existir mayor cantidad de ácido cítrico en la uvilla que en el tomate, las BAL lo metabolizan de manera efectiva, esto conduce consecuentemente a una mayor producción de ácido láctico por parte de las mismas (De Porrata & Miranda, 2012). Los valores obtenidos de acidez en la uvilla no entran dentro de los parámetros permitidos de la norma INEN 2485

correspondiente a las frutas frescas (uvilla) donde el máximo permitido es 2,50, este es un parámetro a tomar en cuenta si se quiere comercializar o exportar el producto bioconservado, sin embargo, hay que tener en cuenta los días de bioconservación, que aumentarán la producción de ácido láctico por las bacterias. Además, (Tumbariski et al., 2019) menciona que los ácidos orgánicos presentes en las frutas y vegetales son consumidos en la respiración vegetal, disminuyendo así la cantidad de ácidos con el tiempo.

En cuanto al porcentaje de humedad, se obtuvo mayor porcentaje de humedad en el tomate (92,61) que en la uvilla (80,78) encontrándose diferencia significativa. Esta diferencia en la humedad se debe principalmente a la cantidad de agua presente en cada tipo de vegetal y los días que se mantengan conservados los mismos. De acuerdo con el estudio de (López et al., 2017) el tomate posee un 93,6 % de agua en el tomate, mientras que según (Arias & Brito, 2008) la uvilla posee un 20,46 % de agua.

Con respecto a la ceniza, no se encontró diferencia significativa entre los dos tipos de vegetal, teniendo en la uvilla un valor de 1,00 y en el tomate un 0,77. Esto demuestra que la cantidad de residuos inorgánicos y minerales no varía entre los vegetales al aplicar la solución bioconservante. Aunque si bien se reportó un rango más amplio obtenido en los tratamientos con tomate, esto se debe principalmente a factores externos a los correspondientes de la bioconservación, uno de ellos es la cantidad de minerales presentes en cada baya de tomate.

En cuanto a la dureza, se encontró diferencia significativa entre el tomate y uvilla, dando una mayor dureza al tomate (32,28) que a la uvilla (17,95). Este parámetro es un determinante en la calidad de la bioconservación del producto, y demuestra que la bioconservación puede afectar la calidad de los vegetales, esto se debe a que el ácido láctico puede afectar a los tejidos externos de los vegetales, y según (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.

### **Respecto al Factor C (Acondicionamiento)**

Con respecto a las características físico químicas y bromatológicas de los tratamientos, se obtuvo un mayor pH en los tratamientos en los que se aplicó refrigeración (3,99) y un menor pH para aquellos que no se aplicó refrigeración (3,96), sin embargo, al ser poca la diferencia, no se obtuvo diferencia significativa. Sin embargo, la temperatura es un factor que puede afectar el pH de las muestras conservadas, esto debido a que la BAL necesita una temperatura óptima de 18°C a 45 °C (Clima, 1955), y los tratamientos con refrigeración fueron sometidos a temperaturas de entre 6 y 7 °C, sin embargo, esta variación no es tan marcada como para afectar la efectividad del bioconservante.

En cuanto a la acidez, no se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos con y sin refrigeración, obteniéndose una mayor acidez en los tratamientos sin refrigeración con un valor de 2,02, esto se debe precisamente a el mejor metabolismo en inhibición de las BAL a temperaturas óptimas para su supervivencia, claro que la diferencia no es notable, además esta disminución de acidez en los tratamientos con refrigeración 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). El menor valor fue para los tratamientos con refrigeración (1,91)

Respecto a la pérdida de peso (% humedad) se obtuvo diferencia significativa, encontrándose menor pérdida de peso en los tratamientos con refrigeración (83,95%) en comparación con los tratamientos a temperatura ambiente (88,21%). Estos resultados difieren de los encontrados en el estudio de (Estrada et al., 2010) donde se obtuvieron pérdidas de peso de 2,3 % y 3,5 % a una temperatura de 12 °C, siendo ésta la óptima para obtener la menor pérdida de peso, esto concuerda con nuestros resultados donde la temperatura ambiente acelera la pérdida de peso. Además (Estrada et al., 2010) menciona que los tomates pueden almacenarse desde los 9 °C a los 12 °C durante 14 días sin presentar pérdidas de peso significativas.

En cuanto a la ceniza, se obtuvo diferencia significativa con un valor mayor para los tratamientos con refrigeración (0,98) con respecto a los tratamientos sin refrigeración (0,84). 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, esto en consecuencia significa que las muestras se conservarán mejor sin afectar su contenido de minerales y compuestos orgánicos, en comparación con los tratamientos expuestos a temperatura ambiente (Wegkamp et al., 2010).

En la dureza, se encontró diferencia significativa teniendo a los tratamientos con refrigeración con un 32,79 dureza, siendo este el valor mayor, y un 18,87 a los tratamientos sin refrigeración. 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) y al efecto inhibitor de las BAL sobre los microorganismos patógenos, estas dos causas evitan que los microorganismos debiliten y rompan los tejidos de la piel de los vegetales.

#### **Respecto a la interacción del Factor A\*B\*C (Concentración de la solución bioconservante\*Tipo de vegetal\*Acondicionamiento)**

De acuerdo a los resultados obtenidos, se obtuvieron valores menores en los tratamientos con  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml en la variable de pH, específicamente en los tratamientos con uvilla: **a0b1c0** con un 3,74 y el tratamiento **a0b1c1** con un 3,87, mientras que los valores más altos se dieron en los tratamientos con  $8 \times 10^8$  UFC/ml con tomate con y sin refrigeración (**a1b0c1** y **a1b0c0**) con un valor de 4,32 y 4,25 respectivamente y donde además se obtuvo homogeneidad entre esos dos tratamientos (**D**) se obtuvo que entre mayor concentración de solución bacteriana los valores de pH bajan, es decir, se da una mayor producción de ácido láctico por parte de las BAL, esto junto con la refrigeración aplicada dieron los valores más bajos (3,74 y 3,79) en los tratamientos en las 2 concentraciones, ya que como se dijo, la refrigeración ralentiza el proceso de metabolismo de los ácidos orgánicos de las frutas, manteniendo así su pH bajo, así mismo, si no se aplica refrigeración a las muestras, los valores de pH

subirán gradualmente entre más días se deje a la muestra ya que las BAL dejan de producir el ácido láctico y cumplen su ciclo de vida (Plank, 1984), esto se refleja en el estudio de (Tipan, 2022) donde se obtuvo un aumento del pH del día 5 al día 10 de la bioconservación en la col. Se determinó que el pH es una de las variables que mayor variabilidad presentó en todos los tratamientos y combinaciones, sugiriendo así entonces, que el pH va a variar mucho dependiendo de la combinación que se tenga, y que existe únicamente una relación inversamente proporcional solo con la acidez.

En la variable de acidez, se obtuvieron valores inversos a los del pH, obteniéndose valores mayores en los tratamientos con  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + uvilla + refrigeración (4,52) y  $8 \times 10^8$  UFC/ml + uvilla + sin refrigeración (4,42), valores mayores de acidez representan una mayor presencia de ácido láctico en las muestras, esto a su vez significa una mayor efectividad de inhibición de las BAL. Claro que también afectan los ácidos orgánicos propios de cada fruta. Así mismo, se observó una correlación inversa entre los valores de pH y la acidez, esto se puede observar mejor en la **Tabla 33** donde estas dos variables tienen una correlación negativa.

En la variable de humedad, se obtuvieron mejores resultados en los tratamientos con la concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml aplicado al tomate con y sin refrigeración (95,71 y 98,35), donde se obtuvo una mayor humedad, es decir, menor pérdida de peso. 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, esto ayuda a preservar la calidad del producto y evitar la deshidratación (Ruíz et al., 2006), un factor clave que influye en los valores de humedad es el acondicionamiento, esto debido al microambiente que se genera al conservar las muestras dentro del recipiente a bajas temperaturas, evitando la migración de vapor de agua hacia el exterior (Quiroz, 2016).

En el caso de la ceniza, se obtuvieron valores mayores para los tratamientos con concentración de  $8 \times 10^8$  UFC/ml y específicamente en el tomate con refrigeración (3,61), este tratamiento se puede

decir que es el mejor 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). El tratamiento que menos valores obtuvo fue de la concentración  $8 \times 10^8$  UFC/ml + tomate + sin refrigeración con un valor de 0,36. Este parámetro permite determinar la calidad de la conservación de las frutas y ver si no existe pérdida de ciertos compuestos inorgánicos como los minerales.

En la variable de dureza, se obtuvieron valores mayores en los tratamientos con refrigeración y en la concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml y  $8 \times 10^8$  UFC/ml, con un valor de 40,94 en el tratamiento **a1b0c0** y 36,55 para el tratamiento **a0b1c0**, esto demuestra que el acondicionamiento si afecta la calidad de las muestras, teniendo una mayor preservación en buen estado de las frutas, 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).

### **Respecto al análisis microbiológico**

Se obtuvo una mayor cantidad de BAL en el tratamiento 1 correspondiente a  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + refrigeración, con una cantidad de  **$8,20 \times 10^4$  UFC/ml**, este valor es semejante a los obtenidos en el estudio de (Tipan, 2022) donde se obtuvieron valores de entre 1,90 y  $3,74 \times 10^5$  UFC/ml en el quinto día de conservación, esta diferencia de valores se deben a los días transcurridos de la conservación, y se demuestra que entre más días se conservan las muestras, el crecimiento de las BAL cesa y posteriormente empiezan a morir. En cuanto al recuento de mohos y levaduras, se encontró que el mejor tratamiento fue igualmente el tratamiento 1 correspondiente a  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml + tomate + refrigeración con una cantidad de  **$2,00 \times 10^{-5}$  UFC/ml**, este valor fue el menor de entre todos los tratamientos, eso demuestra la efectividad del bioconservante.

## Capítulo VI

### Conclusiones

#### Factor A (Concentración de la solución bioconservante)

Se obtuvo en el caso del pH, 3,94 en concentración 1x10<sup>15</sup> UFC/ml y 4,12 en 8x10<sup>8</sup> UFC/ml, estos valores difieren a investigaciones encontradas en trabajos semejantes. En el caso de la acidez, para la concentración 1x10<sup>15</sup> UFC/ml se tiene 2,12 y para 8x10<sup>8</sup> UFC/ml 1,72, esto debido a una mayor producción de ácido láctico por parte de las BAL, según investigaciones similares en otros vegetales. En la humedad se tiene 93,92 en 1x10<sup>15</sup> UFC/ml y 85,12 en 8x10<sup>8</sup> UFC/ml, valores que difieren a los encontrados en estudios semejantes, esto debido a que una mayor concentración de BAL genera más productos que afectan la humedad de acuerdo a investigaciones bibliográficas. Para la ceniza se tiene 0,96 en concentración de 1x10<sup>15</sup> UFC/ml y 1,12 en 8x10<sup>8</sup> UFC/ml, valores que reflejan una mayor cantidad de minerales y residuos inorgánicos según las investigaciones encontradas. Para la dureza, se tiene 26,53 para 1x10<sup>5</sup> UFC/ml y 26,95 en 8x10<sup>8</sup> UFC/ml teniendo valores homogéneos, una baja dureza se debió a un debilitamiento en los tejidos exteriores de los vegetales, según investigaciones similares. Por los valores obtenidos y comparados, así como por la diferencia significativa, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que la concentración del bioconservante influye en la conservación de los vegetales.

#### Factor B (Tipo de vegetal)

En cuanto a los resultados de los parámetros físico químicos y bromatológicos de los tratamientos, se obtuvo en el caso del pH, 4,12 en tomate y 3,88 en uvilla, estos valores estarían cercanos a resultados obtenidos en trabajos similares. En el caso de la acidez, se obtuvo 3,84 en la uvilla y 1,38 en el tomate, valores que difieren entre sí por la cantidad de ácido cítrico presente en la composición de cada vegetal. La acidez del tomate se encuentra dentro de los parámetros de la norma INEN 2485. En la humedad, se tiene 92,61 en tomate y 80,78 en uvilla, valores que difieren a los

obtenidos en investigaciones similares: la humedad se relaciona también con el contenido de agua propio de cada fruta, esto según investigaciones bibliográficas. Para la ceniza se tiene 0,77 en el tomate y 1,00 en la uvilla, valores que demuestran una cantidad similar de minerales entre los 2 vegetales, para la dureza dio un valor de 32,28 en el tomate y 17,95 en la uvilla, valores que se dieron debido a la cantidad de ácido láctico que afectan los tejidos de la piel de la fruta según investigaciones encontradas. Debido a la diferencia de valores entre las variables y a la comparación con otros estudios, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el tipo de vegetal influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

### **Factor C (Acondicionamiento)**

Los valores de pH en los tratamientos que se aplicó refrigeración es 3,99 y 3,96 para aquellos que no se aplicó refrigeración, la temperatura es un factor que afecta el pH de los tratamientos, porque las BAL necesitan una temperatura óptima de 18°C a 45 °C según investigaciones similares. En cuanto a la acidez, Los tratamientos sin refrigeración tienen un valor de 2,02 y los tratamientos con refrigeración tienen 1,91. Esto se debe a la ralentización de los cambios metabólicos naturales del tomate y frutilla según investigaciones en trabajos parecidos.

Respecto a la humedad, los tratamientos con refrigeración tienen 83,95% y los tratamientos a temperatura ambiente tienen 88,21%, valores que son diferentes a los encontrados en trabajos parecidos. En cuanto a la ceniza, se obtuvo 0,98 en tratamientos con refrigeración y 0,84 en tratamientos sin refrigeración, esto por el consumo más lento de minerales según estudios encontrados. En el caso de la dureza, los tratamientos con refrigeración tienen 32,79 de dureza y aquellos sin refrigeración tienen 18,87. De acuerdo a los datos analizados, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el acondicionamiento influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

**Interacción A\*B\*C (concentración de la solución bioconservante\*tipo de vegetal\*condicionamiento)**

En el pH se tiene valores de 3,74 para la uvilla en concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml con refrigeración, y 3,87 en la uvilla con concentración  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml sin refrigeración, estos valores difieren de los obtenidos en otra investigación similar, el pH aumenta entras más días de conservación debido a la muerte de las BAL y la refrigeración ralentiza este proceso. En la acidez se tiene un valor de 4,52 en la uvilla con  $1 \times 10^{15}$  UFC/ml y con refrigeración, siendo este el mejor valor obtenido en todos los tratamientos. En la humedad dio un 74,81 en la uvilla con  $8 \times 10^8$  UFC/ml con refrigeración, considerándose este el mejor resultado arrojado debido al menor porcentaje de pérdida de peso. En la ceniza se tiene 3,61 en la uvilla con  $8 \times 10^8$  UFC/ml y con refrigeración, en la humedad dio un 40,94 en el tomate con  $8 \times 10^8$  UFC/ml y con refrigeración, siendo este el valor más alto de dureza y considerándose entonces el que mejor calidad y menos debilitamiento de los tejidos de los vegetales. Debido a la existencia de diferencia significativa entre todos los tratamientos, y de acuerdo a los valores arrojados por las variables, especialmente las de pH, acidez y humedad que son las que más variabilidad presentan, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que la interacción entre los tres factores influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

**Recomendaciones**

En 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  $1 \times 10^{15}$  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. Una mayor concentración de bacterias ácido lácticas dará una mayor inhibición de microorganismos patógenos en los vegetales, esto a su vez alterará las variables de pH, acidez y humedad. Además, se recomienda utilizar la solución bioconservante concentrada en complemento con una refrigeración para tener una mayor conservación de los vegetales.

En cuanto al tipo de vegetal, se recomienda 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. Es recomendable también a utilizar vegetales previamente lavados con solución de ácido cítrico u otro ácido orgánico que inhiba el crecimiento de microorganismos patógenos.

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, esto se puede observar de acuerdo a los resultados donde la refrigeración dio valores menores de pH en la uvilla y tomate (3,74 y 3,99 respectivamente), valores mayores de acidez (1,70 en tomate y 4,52 en uvilla) valores mayores de ceniza (3,61 en tomate) y una mayor dureza (40,94 en tomate). Se recomienda además una refrigeración a temperaturas de 9 a 12°C que es el rango óptimo para una mejor conservación de los vegetales sin alterar la calidad o humedad del producto.

## Capítulo VIII

### Bibliografía

Abad, G., Acuña, C., & Naranjo, K. (2020). El cacao en la Costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica (Estudios). *Estudios de la Gestión: revista internacional de administración*, (7), 59-83. ISSN 2550-6641

Agurto, T., & Ramos, J. (2008). bacterias ácido lácticas: biopreservante de los alimentos. *Biotempo*, 8, 54-64. <https://doi.org/10.31381/biotempo.v8i0.865>

Andrade-Almeida, J., Rivera-García, J., Chire-Fajardo, G., & Ureña-Peralta, M. (2019, 11 15). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 10(4), 1-12. [10.29019/enfoque.v10n4.462](https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.462)

Anzules-Toala, V., Borja-Ventura, R., Castro-Cepero, V., & Julca-Otiniano, A. (2018, 12 11). Caracterización de fincas productoras de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *Bosques Latitud Cero*, 8(2), 39-50. <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/493>

Arias, J., Villacrés, E., & Brito, B. (2008). Aprovechamiento agroindustrial de la uvilla (*physalis* peruviana l.) para la obtención de un producto cristalizado [Tesis]. INIAP. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1404>

Bergey, D. H., Holt, J. G., & Breed, R. S. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (7th ed.). Williams & Wilkins.

Bhattacharjee, R., & Akoroda, M. (2018). Taxonomía y clasificación del cacao. In Cultivo sostenible del cacao (pp. 3-18). Burleigh Dodds Science Publishing.

<https://doi.org/10.19103/as.2017.0021.01>

Brito, B., Espín, S., Villacrés, E., Vaillant, F., Medina, G., & Arias, J. (2008). *Uvilla (Physalis peruviana L.). Características físicas y nutricionales de la fruta importantes en la investigación y desarrollo de productos deshidratados, cristalizados y chips* [Boletín]. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2624>

Clima, D. (1955). Las características de *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* y *L. casei*. *Microbiology Society*, 12(1), 133-139. <https://doi.org/10.1099/00221287-12-1-133>

Criollo, H., Lagos, T., Criollo, C., & Guerrero, M. (2001). Caracterización de materiales de uvilla (*physalis peruviana l.*) por sus características de calidad. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 18(2), 168-180. ISSN 0120-0135

De Fariñas, L., De Bertorelli, L., Angulo, J., & Parra, P. (2002, 09). Características físicas del fruto de cacao tipos criollo, forastero y trinitario de la localidad de cumboto, venezuela. *Agronomía Tropical*, 52(3), 343-362. ISSN 0002-192X

De la Fuente, N., & Barboza, J. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, 20(1), 43-52. ISSN: 0188-6266

De Porrata, A., & Miranda, C. (2012). Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica. *ACE: Revista de enología*, 140(4).

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5368166>

De Souza, P., Moreira, L., Sarmiento, D., & Da Costa, F. (2018). Cacao— *Theobroma cacao*. *Exotic Fruits*, 69-76. 10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1

Ekinci, F., & Gurel, M. (2008). Effect of Using Propionic Acid Bacteria as an Adjunct Culture in Yogurt Production. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 892-899. 10.3168/jds.2007-0244

Enriquez, G. (1985). *Curso sobre el cultivo del Cacao* (1st ed.). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. ISBN 9977-951-52-7

Enriquez, G., & Paredes, A. (1987). *El cultivo del cacao* (2nd ed.). Editorial EUNED. ISBN 9977-64-228-1

Escobar, H., & Lee, R. (2010). *Manual de producción de tomate bajo invernadero* (1st ed.). Universidad Jorge Tadeo Lozano. ISBN 978-958-725-025-1

Espinosa Gómez, R. (2004). *Comparación del contenido de licopeno, características físicas y químicas en siete variedades de tomate (Lycopersicon esculentum) cultivado en el Estado de Veracruz México* [Tesis]. Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias Básicas. Región Xalapa.  
<http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46766>

Estrada, M., Osorio, R., Brito, N., & Sánchez, R. (2010). *Tópicos Selectos en Agronomía Tropical* (1st ed.) [1er. CONGRESO INTERNACIONAL DE AGRONOMÍA TROPICAL 2do. SIMPOSIO NACIONAL AGROALIMENTARIO].

Fernández-Salguero, J., & Wiley, R. C. (1997). *Frutas y Hortalizas Mínimamente Procesadas y Refrigeradas* (R. C. Wiley, Ed.; J. Fernández-Salguero Carretero, Trans.). Acribia, Editorial, S.A. ISBN 9788420008318

Fornaris, G. (2010). *Tomate: características de la planta* [Boletín]. Universidad de Puerto Rico

Gaviola, J. (2020). *Producción de semillas hortícolas* [Tabla] (1st ed.). Ediciones INTA. ISBN 978-987-8333-46-5

García González, E., Serna Murillo, A., Córdoba Pantoja, D., Marín Aricapa, J., Montalvo Rodríguez, C., & Ordoñez Narváez, G. (2019). Estudio de la fermentación espontánea de cacao (*Theobroma cacao* L.) y evaluación de la calidad de los granos en una unidad productiva a pequeña escala. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 41-51.  
<https://doi.org/10.23850/24220582.1635>

Gómez, P., Artés Hernández, F., Aguayo, E., Escalona, V., & Artés, F. (2007). Problemática de los alimentos vegetales mínimamente procesados en fresco. *PHYTOMA*, 4(189), 124-130.  
<http://hdl.handle.net/10317/297>

Gutiérrez, L., Montiel, E., Aguilera, P., & González, M. (2000). Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública Mex*, 42(6), 490-495.

Hernández, A., Robles, V., Angulo, J., Cruz, J., & García, H. (2007). Preparación de un producto probiótico a base de suero de leche con *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium bifidum*. *Food Technology and Biotechnology*, 45(1), 27-31. ISSN 1330-9862

Hernández, J. (2013). *Caracterización físico-química y microbiológica del tomate margariteño (Lycopersicon esculentum var. España) y evaluación de la efectividad de tratamientos de pre-ensado para el incremento de su vida comercial a temperatura ambiente* [Tesis Doctoral]. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. <http://hdl.handle.net/10396/9925>

Hernansaez, P., & Pastor, J. (1957). El Tomate, su cultivo y sus enfermedades. *Anales de la Universidad de Murcia (Ciencias)*, XV(3-4), 235-305.  
<https://revistas.um.es/analesumciencias/article/view/101151>

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2016). *Bebidas alcohólicas. Vino de frutas. Requisitos* (3rd ed.) [NTE INEN 374].

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2013). *Conservas Vegetales: Determinación de cenizas* (2) [NTE INEN 401].

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1985). *Conservas Vegetales: Determinación de acidez titulable método potenciómetro de referencia* (1) [NTE INEN 381].

Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1985). *Conservas Vegetales: Determinación de la concentración del ion hidrógeno ( pH)* [INEN 389-1].

INTAGRI. (2017). Tipos y Especialidades de tomate. Serie Hortalizas, 4(13), 1-4.

Jaimez, R., Tezara, W., Coronel, I., & Urich, R. (2008, 11 30). Ecofisiología del cacao (*Theobroma cacao*): su manejo en el sistema agroforestal. Sugerencias para su mejoramiento en Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 52(2), 253-258.

[https://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30291/1/nota\\_tecnica2.pdf](https://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30291/1/nota_tecnica2.pdf)

Jordan Cobos, K., & Parra, M. (2020). *Evaluación del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la obtención de etanol de segunda generación* [Tesis]. Machala.

<http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/15494>

Leon, J. (1968). *Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales* [Tabla] (1st ed.). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <http://repositorio.iica.int/handle/11324/7769>

León-Villamar, F., Calderón-Salazar, J., & Mayorga-Quinteros, E. (2016, Junio 18). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. *Revista Ciencia Unemi*, 9(18), 45-55. ISSN 2528-7737

López, L., Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, San José (Costa Rica) (INTA), Programa Regional de Investigación e Innovación por Cadenas de Valor Agrícola

(PRIICA), & Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2017). Manual técnico del cultivo del tomate *Solanum lycopersicum*. IICA. ISBN 978-9968-586-27-6

López Paredes, J. M. (2021). *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (Carica papaya) y naranjilla (Solanum quitoense)* [Tesis].

Marcillo, M., & Meza, R. (2012). Vino a partir del mucilago de cacao en los laboratorios de la ESPAM-MFL.

Mendoza, J., Rodríguez, A., & Millán, P. (2012). Caracterización físico química de la uchuva (*Physalis peruviana*) en la región de Silvia Cauca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(2), 188-196. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612012000200022&lng=en&tlng=](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000200022&lng=en&tlng=).

Mondragón, G., Escalante, P., Osuna, J., Ibarra, V., Morlett, J., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64-70. ISSN 1665-4412

Moreno, C., Basanta, E., & Toasa, E. (2021). *Manual del cultivo de uvilla (physalis peruviana L.)* [Tabla]. Fundación Humana Pueblo a Pueblo Ecuador

Morocho, K. M. (2018). *Hidrólisis enzimática del mucílago de cacao CCN-51 (Theobroma cacao L.) para incrementar la concentración de azúcares fermentables* [Tesis]. Machala.

Morton, J. F. (2013). *Fruits of Warm Climates* [Tabla]. Echo Point Books and Media. ISBN 9781626549722

Motomayor, J., Risterucci, A., & Heath, M. (2003). Domesticación del cacao II: germoplasma progenitor del cultivar de cacao Trinitario. *Heredity*, 91, 322-330. 10.1038/sj.hdy.6800298

Muñoz Guzman, J. (2022, 08). *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de la fermentación discontinua de quinua blanca y roja (Chenopodium quinoa) para la bioconservación de brócoli (Brassica oleracea var. italica) y calabacín (Cucurbita pepo)* [Tesis]. Santo Domingo.

<http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/32556>

Ortiz, L., Graziani, L., & Rovedas, G. (2009). Evaluación de varios factores sobre características químicas del grano de cacao en fermentación. *Agronomía tropical*, 59(1), 73-79.

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2009000100007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000100007&lng=es&tlng=es)

Orús, A. (2021). *Tomate fresco: producción en el mundo 2012-2020*. Statista. Retrieved January 11, 2023, from <https://es.statista.com/estadisticas/529413/produccion-de-tomates-frescos-en-el-mundo/>

Palacio, A., & Cambra, M. (2014). *El fuego bacteriano de las rosáceas (Erwinia amylovora)*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. ISBN: 978-84-491-0962-1

Parra Huertas, R. (2003). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105. ISSN 1692-3561

Pefaur, J. (2014). *IV Gama, una industria alimentaria en crecimiento* [Tabla]. *Diciembre de 2014*. ODEPA. Retrieved January 8, 2023, from <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/articulos/iv-gama-una-industria-alimentaria-en-crecimiento-diciembre-de-2014>

Plank, R. (1984). *El empleo del frío en la industria de la alimentación* (R. Usón, Trans.; 2nd ed.). Reverté. ISBN: 84-291-8010-9

Ponce, A. R. (2020). *Desarrollo de un recubrimiento comestible con cera carnauba, cera de abeja, y manteca de cacao en la uvilla (physalis peruviana)* [Tesis]. Guayaquil.

Quintana, J. G., & Verdezoto, D. C. (2017). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) preentes en el mucílago de cacao (Theobroma cacao L.) trinitario y nacional* [Tesis]. Quevedo.

<http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/2285>

Quintero, M., & Díaz, K. (2004, 01). El mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria*, 9(18), 47-59. ISSN 1316-0354

Quiroz, J. A. (2016). *Dinámica de la pérdida de peso en hortalizas de hoja durante el almacenamiento* [Tesis]. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/10235>

Ramírez, C., & Vélez, J. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información tecnológica*, 27(6), 115-128.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>

Ramírez, J., Rosas, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias Lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 1-16. ISSN 2007-0713

Rivera, V. M., & Drider, D. (2016). *Bacterias ácido lácticas: fundamentos y aplicaciones*. AlfaOmega. ISBN 978-607-622-628-5

Rosales, M. (2008). *Producción y calidad nutricional en frutos de tomate cherry cultivados en dos invernaderos mediterráneos experimentales: respuestas metabólicas y fisiológicas* [Tesis]. Editorial de la Universidad de Granada. ISBN 978-84-691-4849-5

Ruíz, S., Luo, Y., González, R., Tao, Y., & Gonzalez, G. (2006). Clorito de sodio acidificado como alternativa al cloro para controlar el crecimiento microbiano en zanahorias ralladas manteniendo la calidad. *Journal of the Science of food and agriculture*, 86(12), 1887-1893.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.2550>

Saavedra, G. (2019). El tomate. In *Hortalizas para Procesamiento Agroindustrial* (1st ed., pp. 7-70). Centro Regional de Investigación Carillanca. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6818>

Santana, P., Vera, J., Vallejo, C., & Alvarez, A. (2019). Mucílago de cacao Nacional y Trinitario para la obtención de una bebida hidratante. *Universidad, Ciencia y Tecnología*, 4, 179-189. <https://uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/24>

Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics & Antimicro. Prot.*, 9. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>

Siezen, R., & Hylckama, J. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb Cell Fact*, 10(1). 10.1186/1475-2859-10-S1-S3

Stanbury, P. F., Hall, S. J., & Whitaker, A. (2016). *Principles of Fermentation Technology* (3rd ed.). Elsevier Science. ISBN 9780444634085

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70. <https://doi.org/10.1007/BF00395940>

Teneda Llerena, W. (2016). *Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (Theobroma cacao L.)*. (2nd ed.). Universidad Internacional de Andalucía. ISBN 978-84-7993-319-7

Thayná, T., Tolentino, A., Oliveira, B., & Dos Santos, T. (2021). Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. *Research Society and Development*, 10(11). 10.33448/rsd-v10i11.19964

Tipan, J. (2022). *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)* [Tesis]. Santo Domingo. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/32551>

Torres, A. (2017). *Manual del cultivo del tomate al aire libre* [Boletín]. Instituto de Desarrollo Agropecuario. ISSN 0717-4829

Tumbariski, Y., Nikolova, R., Petkova, N., Ivanov, I., & Lante, A. (2019). Bioconservación de fresas frescas mediante recubrimientos comestibles de carboximetilcelulosa enriquecidos con una bacteriocina de *Bacillus methylotrophicus* BM47. *Food Technology & Biotechnology*, 57(2), 230-237.

10.17113/ftb.57.02.19.6128

Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae. (2008). In J. Prohens & F. Nuez (Eds.), *Handbook of Plant Breeding* (pp. 249-326). Springer New York. ISBN 978-0-387-74110-9

Vera Chang, J., & Tapia García, K. (2016). Evaluación del mucílago y la placenta de dos variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) aplicando dos métodos conservantes en la obtención de mermelada [Tabla]. (Ingeniería). Universidad Técnica Estatal de Quevedo

Vera, J. E., Mera, S. A., Morales, C. A., & Loor, J. D. (2018). Obtención de vinagre de vino a partir del mucílago y exudado de cacao criollo (*Theobroma Cacao* L.). *Revista Científica INGENIAR*, 1(2), 2-12. ISSN: 2737-6249

Vera, J., Jiménez, W., Naula, M., Villa, U., Zaruma, F., Montecé, G., Cabrera, W., Zambrano, F., & Astudillo, C. (2021, 04). Residuos de la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) como alternativa alimenticia para rumiantes. *Revista Colombiana De Ciencia Animal - RECIA*, 13(2), 1-6. <https://doi.org/10.24188/recia.v13.n2.2021.839>

Vilaplana, M. (2004). Verduras y Hortalizas: fuentes naturales de antioxidantes [Tabla]. *Offarm*, 23(2), 120-132. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-verduras-hortalizas-13057699>

Wegkamp, A., Teusink, B., De Vos, W., & Smid, E. (2010). Desarrollo de un medio de crecimiento mínimo para *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 57-64.

<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02752.x>

Wheatly, J. (2022). *E.coli Bacteria Outbreak: What You Need To Know About E.coli Infection Outbreak, Treatment Methods And How You Can Protect Yourself*. Independently published