



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Proyecto de Integración curricular

Ingeniería en Biotecnología

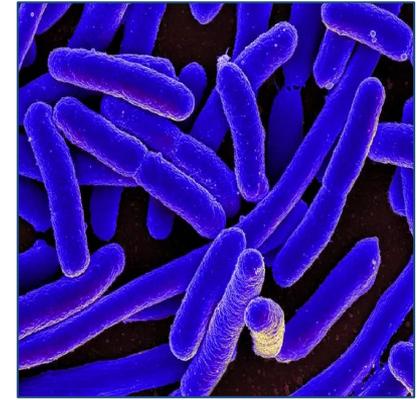
Evaluación de la factibilidad de conservación de distintos tipos de bacterias ácido lácticas mediante liofilización

Integrantes

- Noemi Karina Chumania Cabrera
- Rodriguez Cuasapaz Maria Jose



Introducción



Bacterias Liofilizadas

Alto interés comercial debido a:

- Baja humedad
- Estabilidad
- Alta viabilidad y actividad
- Larga vida útil
- No requieren congelación

Uso como bioconservantes

Prolongan la vida útil de productos agrícolas mínimamente procesados (MPF), preservando su valor nutricional y propiedades organolépticas.

Efecto antagonista microbiano

Inhibe la proliferación de microorganismos patógenos.



Objetivos

General

- Evaluar la factibilidad de conservación de distintos tipos de bacterias ácido lácticas (BAL) mediante liofilización.

Específicos

- Determinar la eficacia de la liofilización en la conservación de 5 BAL (*Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri*).
- Evaluar el efecto de la aplicación de las 5 BAL liofilizadas para la bioconservación de dos frutas mínimamente procesadas (MPF): arándano y uva.
- Determinar mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos, la eficacia de las 5 BAL liofilizadas como bioconservante en las frutas MPF.



Hipotesis

Hipótesis para factor A (Bacterias ácido lácticas liofilizadas):

H0: El tipo de bacteria ácido láctica liofilizada no influye en la bioconservación de las frutas.

H1: El tipo de bacteria ácido láctica liofilizada influye en la bioconservación de las frutas.

Hipótesis para el factor B (Frutas):

H0: El tipo de fruta no influye en la eficacia de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas.

H1: El tipo de fruta influye en la eficacia de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizada.

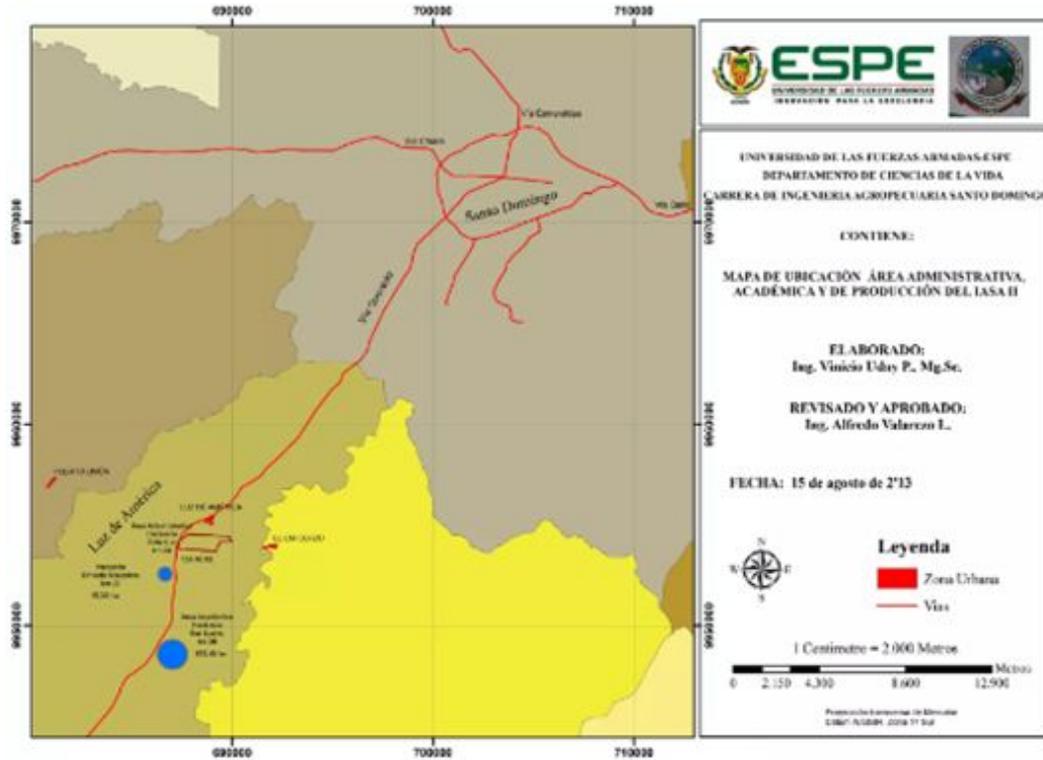
Interacción A*B (Tipo de bacteria * Tipo de fruta):

H0: El efecto de las interacciones entre el tipo de bacteria ácido láctica liofilizada y el tipo de fruta no influye en la bioconservación.

H1: El efecto de las interacciones entre el tipo de bacteria ácido láctica liofilizada y el tipo de fruta influye en la bioconservación.



Ubicación del área de investigación



- Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE - Santo Domingo
- Laboratorio de Bromatología y Biociencia
- Laboratorio de Microbiología de los Alimentos

Diseño Experimental

Análisis de la eficacia de la liofilización de BAL

Factores	Simbología	Niveles
A. Bacterias ácido lácticas	A0	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>
	A1	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
	A2	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
	A3	<i>Weissella Confusa</i>
	A4	<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>

Estudio de la factibilidad de bioconservación con BAL liofilizadas

Factores	Simbología	Niveles
A. Bacterias ácido lácticas	A0	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>
	A1	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
	A2	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
	A3	<i>Weissella Confusa</i>
B. Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	B0	Arándano
	B1	Uva

Interacción de los tratamientos a evaluar

N.º	Interacciones	Niveles
T1	A0B0	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> + Arándano
T2	A0B1	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> + Uva
T3	A1B0	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i> + Arándano
T4	A1B1	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i> + Uva
T5	A2B0	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i> + Arándano
T6	A2B1	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i> + Uva
T7	A3B0	<i>Weissella Confusa</i> + Arándano
T8	A3B1	<i>Weissella Confusa</i> + Uva
T9	A4B0	<i>Limosilactobacillus Reuteri</i> + Arándano
T10	A4B1	<i>Limosilactobacillus Reuteri</i> + Uva

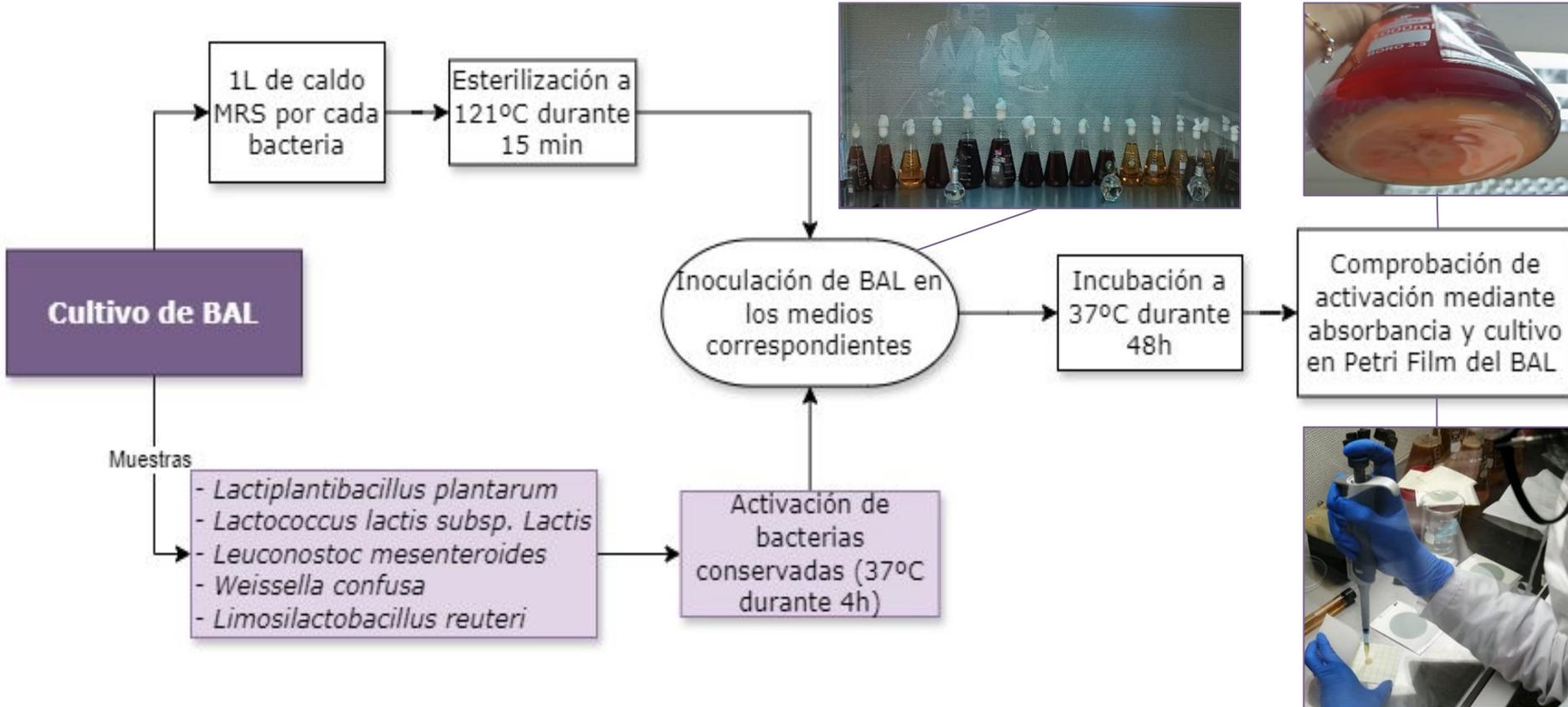
Tipo de diseño: Modelo bifactorial AxB

Repeticiones: 3 repeticiones por cada tratamiento con 30 U.E.

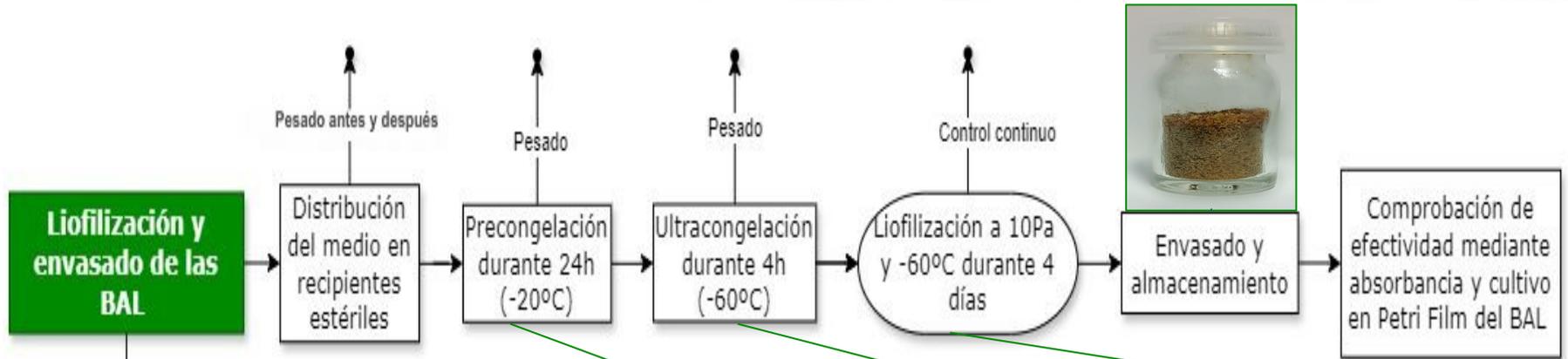
Análisis funcional: Prueba de significancia de Tukey al 5% ($p < 0,05$).



Metodología

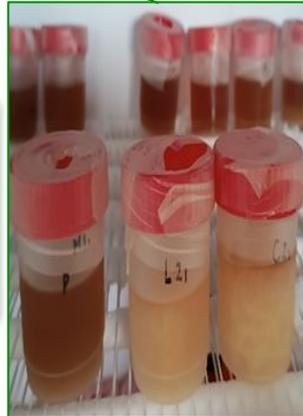


Metodología

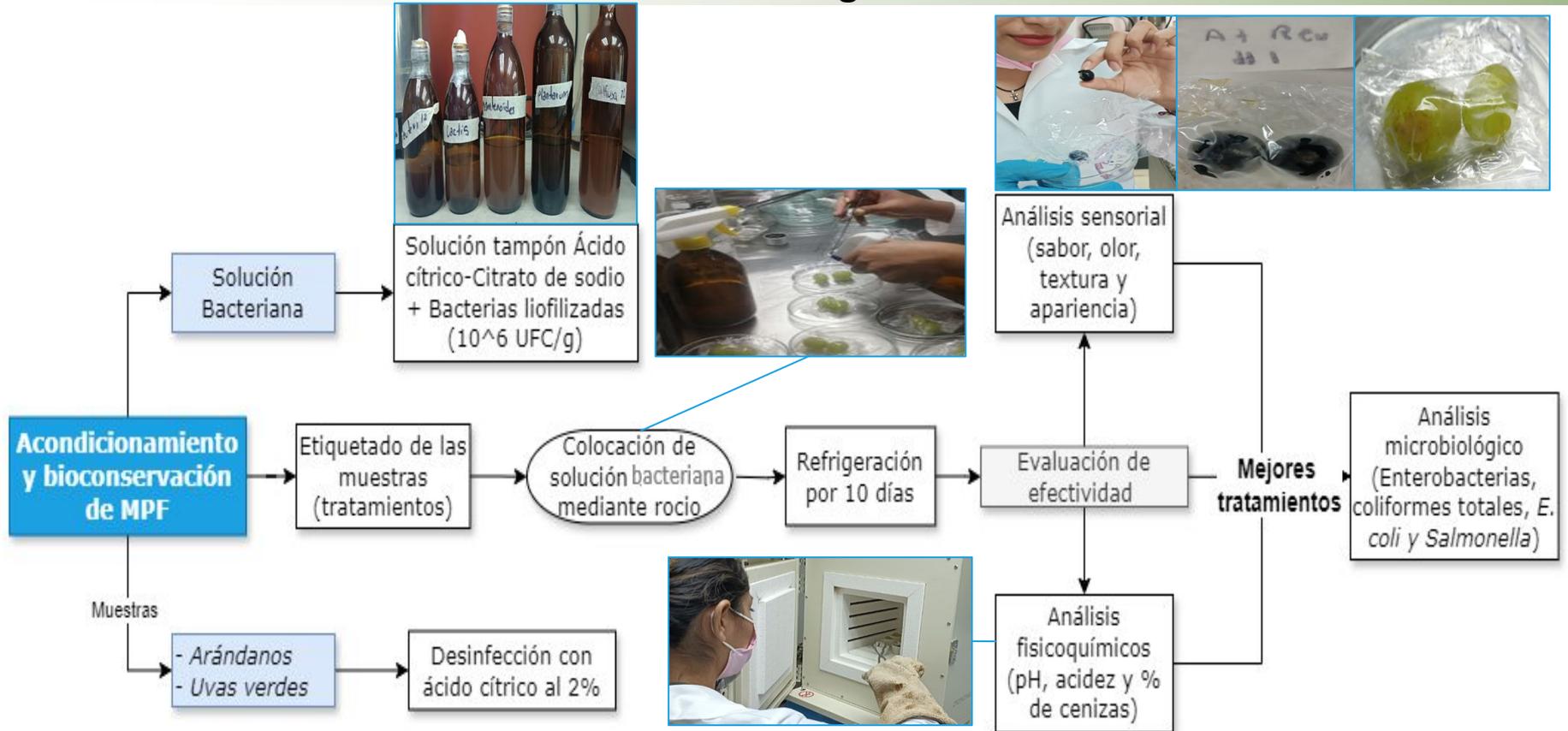


Muestras

- *Lactiplantibacillus plantarum*
- *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*
- *Leuconostoc mesenteroides*
- *Weissella confusa*
- *Limosilactobacillus reuteri*



Metodología



Variables a evaluar

pH



% acidez

$$\%A = \frac{(V_1 \times N_1 \times M) \times 10}{P}$$



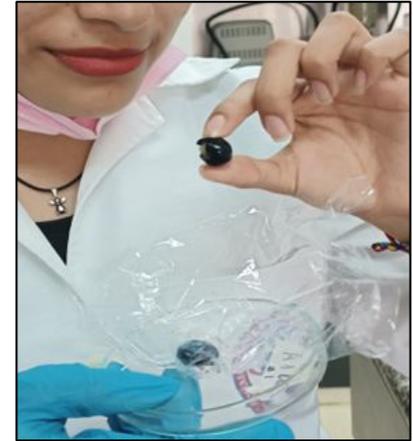
% cenizas

$$\%C = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$



Analisis sensorial

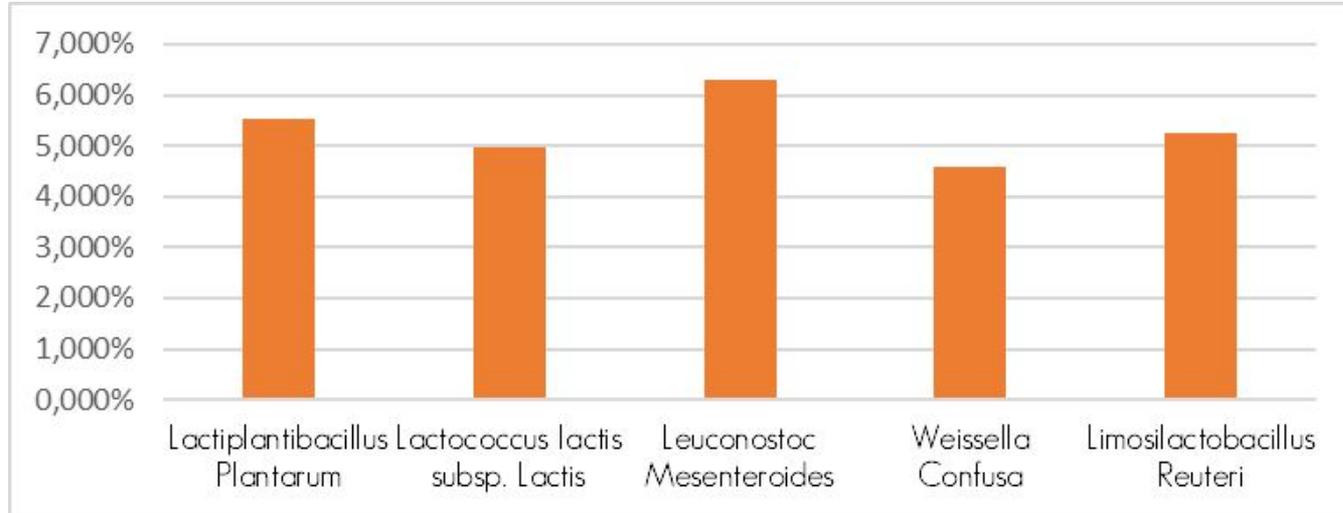
Sabor, color, olor y textura.



Resultados

Determinación de la eficacia de la liofilización para la conservación de BAL

Rendimiento de la liofilización de las BAL



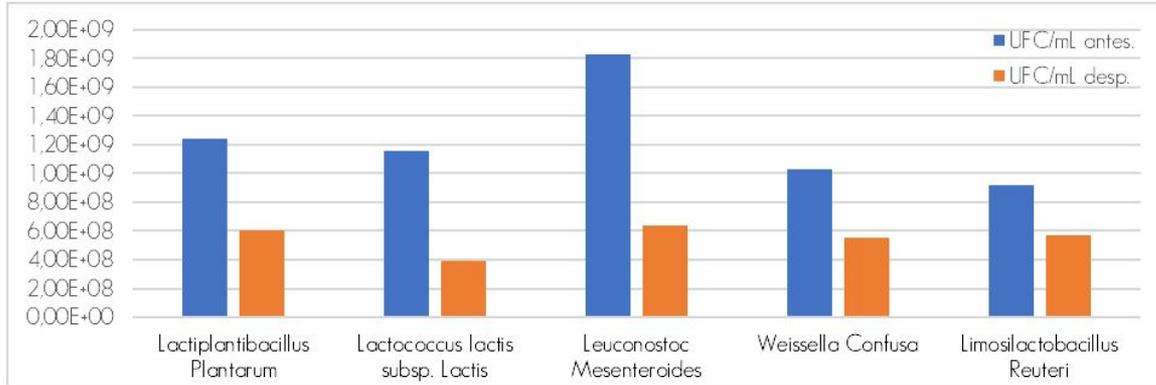
La bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* obtuvo el mayor rendimiento con un valor de 6,283%, en comparación con las demás bacterias. Por otro lado, *Weissella Confusa* presentó el menor rendimiento con un valor de 4,571%.



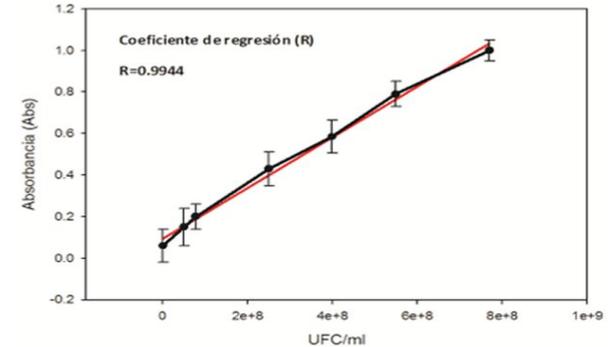
Resultados

Determinación de la eficacia de la liofilización para la conservación de BAL

Viabilidad de la liofilización de BAL



Concentración en UFC/ml de las bacterias



Curva de calibración Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de *P. fluorescens* (Diaz, 2011).

La bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* presentó una mayor actividad bacteriana, teniendo una concentración aproximada de $1.83E+09$ UFC/mL y un valor de $6,39E+08$ después del proceso de liofilizado y de la reactivación de la misma.

Según Fonseca, et al (2014), la deshidratación puede ocasionar daños permanentes en las células bacterianas, como modificaciones en la estructura física de lípidos de membrana y la conformación de las proteínas sensibles lo que resulta en una notable disminución de la viabilidad bacteriana.



Resultados

Análisis estadísticos de la bioconservación de frutas MPF: Análisis fisicoquímico

Análisis de varianza para pH.

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	0,029445	4	0,00736125	8,11	0,0006
Factor B	0,204187	1	0,204187	224,86	0,0000
Replicas	0,000405	2	0,0002025	0,22	0,8023
INTERACCIONES					
AB	0,026925	4	0,00673125	7,41	0,0010
RESIDUOS	0,016345	18	0,000908056		
TOTAL (CORREGIDO)	0,277307	29			

Análisis de varianza para el % de acidez.

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	0,4951	4	0,123775	54,85	0,0000
Factor B	1,48296	1	1,48296	657,15	0,0000
Replicas	0,00684667	2	0,00342333	1,52	0,2461
INTERACCIONES					
AB	0,223287	4	0,0558217	24,74	0,0000
RESIDUOS	0,04062	18	0,00225667		
TOTAL (CORREGIDO)	2,24882	29			

Análisis de varianza para el % de cenizas.

Fuente	SC	GI	CM	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	0,104687	4	0,0261717	29,43	0,0000
Factor B	0,0197633	1	0,0197633	22,22	0,0002
Replicas	0,000126667	2	0,0000633333	0,07	0,9315
INTERACCIONES					
AB	0,0155533	4	0,00388833	4,37	0,0121
RESIDUOS	0,0160067	18	0,000889259		
TOTAL (CORREGIDO)	0,156137	29			

En las 3 variables, se observó diferencia significativa en el tipo de Bacterias ácido lácticas (Factor A), los MPF (Factor B) y la interacción AxB (Tipo de bacteria ácido láctica x Productos agrícolas mínimamente procesados)

No se observó diferencia significativa en las réplicas, lo que sugiere una normalidad en la toma de los datos.



Resultados

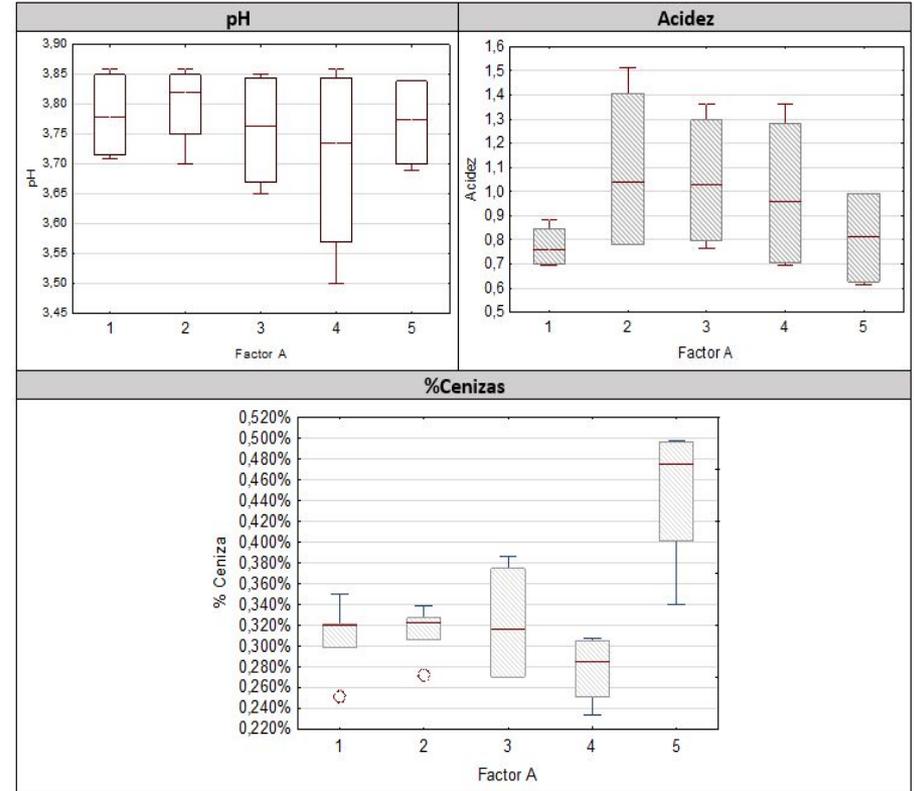
Factor A

Prueba de significancia de Tukey: Tipo de BAL

Factor A: Tipo de BAL	pH	%Acidez	%Cenizas
A0: <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	3,783 a	0,773 a ●	0,310% a
A1: <i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	3,800 a ●	1,093 c ●	0,315% a
A2: <i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	3,758 ab	1,045 b	0,322% a
A3: <i>Weissella Confusa</i>	3,708 b ●	0,994 b	0,278% a ●
A4: <i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	3,770 a	0,809 a	0,448% b ●

Nota. Las letras "a", "b" y "c" representan el grupo al que pertenece el factor

- (Ibarra, 2007) señala que las BAL se desarrollan en pH de 3.2 a 4.5. El bajo pH se atribuye al ácido láctico en su forma no disociada que tiene propiedades tóxicas para muchas bacterias, hongos y levaduras (efecto antagonista microbiano).
- La acidez se atribuye a la producción de ácido láctico, el cual, según (Melia et al., 2021), se origina durante la fermentación, siendo el primer metabolito generado por las BAL.
- Los valores de ceniza se encuentran dentro del rango establecido para arándanos, que oscila entre 0,12% (Lazarte Bedoya, 2018) y 0,81% (USDA, 2022) y para las uvas, que varía entre 0,3 a 0,5% (Kamil Alsaed, 1996).



Resultados

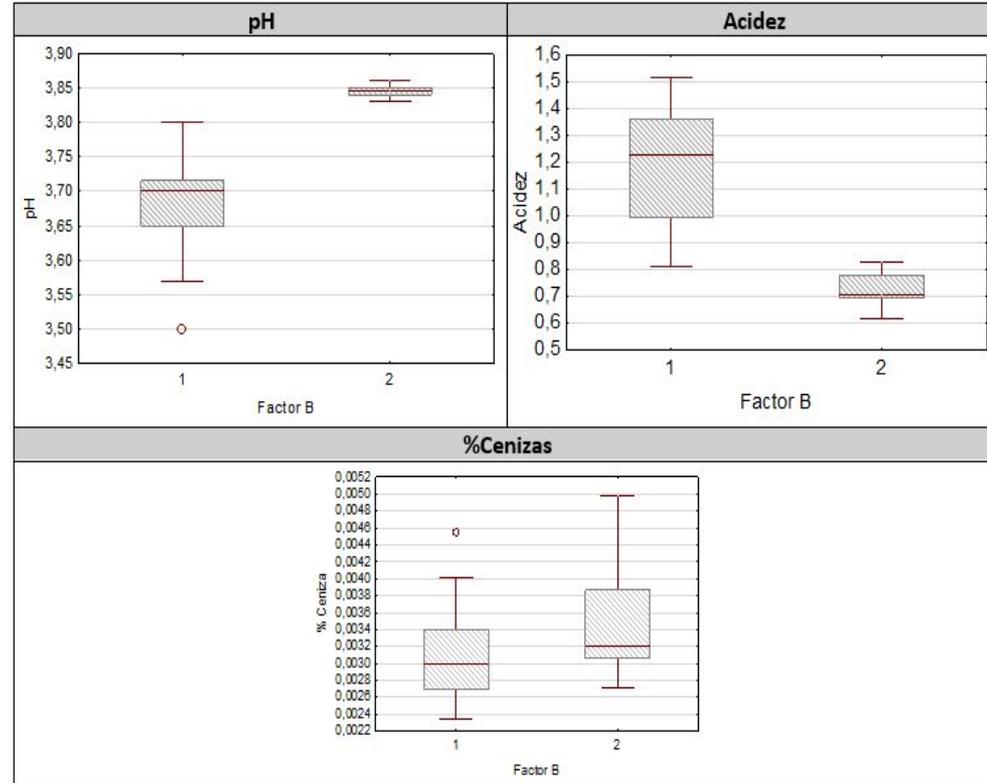
Factor B

Prueba de significancia de Tukey: Frutas MPF

Factor B: MPF	pH	%Acidez	%Cenizas
B0: Arándano	3,681 a	1,164 b	0,309% a
B1: Uva	3,846 b	0,72 a	0,360% b

Nota. Las letras "a" y "b" representan el grupo al que pertenece el factor

- El pH de arándanos reportado para bayas maduras, va de 2,85 a 3,49 (Sapers et al., 1984), mientras que para las uvas va de 3,14 a 3,49 (Ausejo, 2019). Según (Colombo et al., 2021), el aumento del pH de las frutas se debe a la maduración.
- La acidez de arándanos oscila entre 0,4% y 1,31% (Sapers et al., 1984), mientras que para las uvas va de 0,51 y 0,88 % (Jayasena & Cameron, 2008).
- El % cenizas en arándanos oscila entre 0,12% (Lazarte Bedoya, 2018) y 0,81% (USDA, 2022). En la uva, el %cenizas varía entre 0,3 a 0,5% (Kamil Alsaed, 1996).

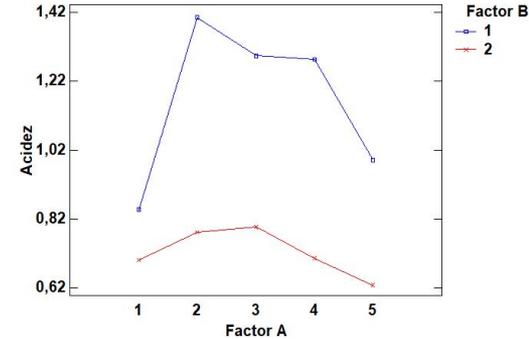
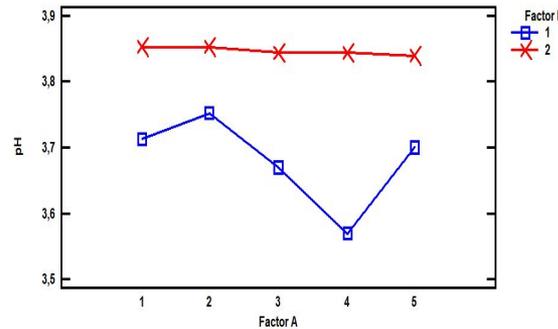


Resultados

Factor A*B

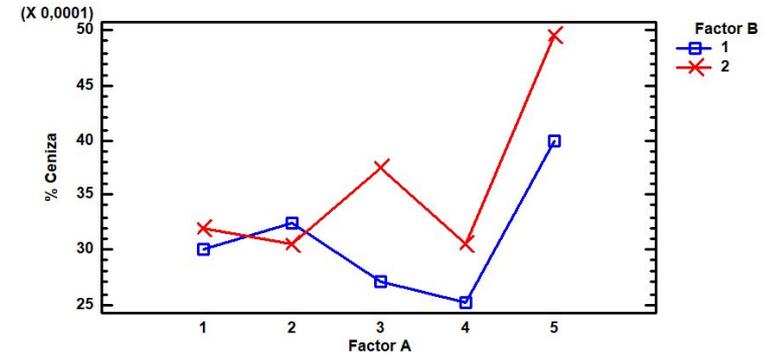
Prueba de significancia de Tukey de la interacción AB

Factor A: Tipo de BAL	Factor B: MPF	pH	%Acidez	%Cenizas
A0: <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	B0: arándano	3,715 b	0,847 c	0,300% ab
A0: <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	B1: Uva	3,850 a	0,699 ab	0,320% abc
A1: <i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	B0: arándano	3,750 b	1,406 e	0,324% abc
A1: <i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	B1: Uva	3,850 a	0,780 bc	0,305% ab
A2: <i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	B0: arándano	3,670 b	1,295 e	0,270% a
A2: <i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	B1: Uva	3,845 a	0,795 bc	0,375% bc
A3: <i>Weissella Confusa</i>	B0: arándano	3,570 c	1,283 e	0,251% a
A3: <i>Weissella Confusa</i>	B1: Uva	3,845 a	0,704 abc	0,304% ab
A4: <i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	B0: arándano	3,700 b	0,992 d	0,399% c
A4: <i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	B1: Uva	3,840 a	0,627 a	0,496% d



Se seleccionaron los tratamientos óptimos en base a los resultados obtenidos de los parámetros de acidez y cenizas.

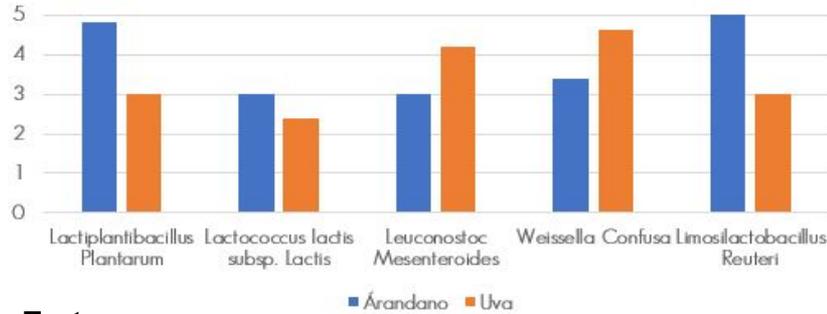
- En el caso de los arándanos, se seleccionó el tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0), con una acidez de 0,992% y 0,399% de cenizas.
- En el caso de las uvas, se seleccionó el tratamiento *Weissella Confusa* + uva (A3B1), cuya acidez fue del 0,704% y 0,304% de cenizas. Estos valores se encuentran dentro de los parámetros correspondientes.



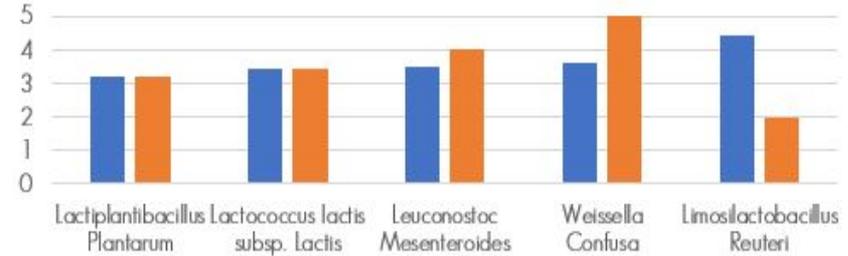
Resultados

Análisis Sensorial

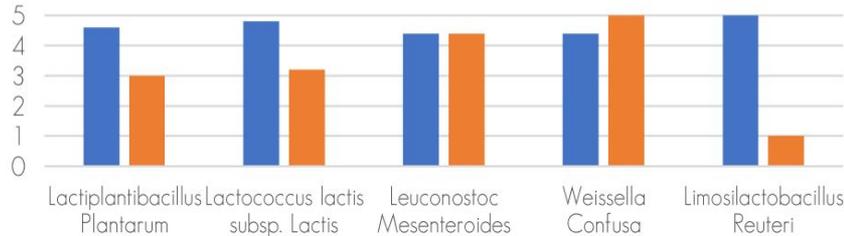
Olor



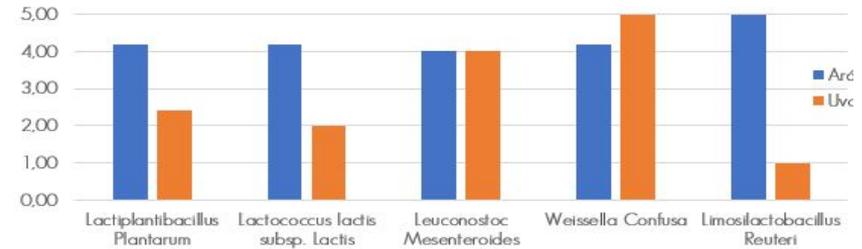
Sabor



Textura



Color



Los tratamientos *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0) y *Weissella Confusa* + uva (A3B1) obtuvieron la puntuación más alta en comparación a los demás.

La experiencia multisensorial de un producto alimenticio está asociada a factores intrínsecos y extrínsecos del alimento, que desempeñan un papel en la percepción y aceptación de los alimentos que se seleccionan para el consumo (Nanjundappa y otros, 2023).



Resultados

Análisis de componentes principales

Matriz de correlaciones de los componentes principales evaluados

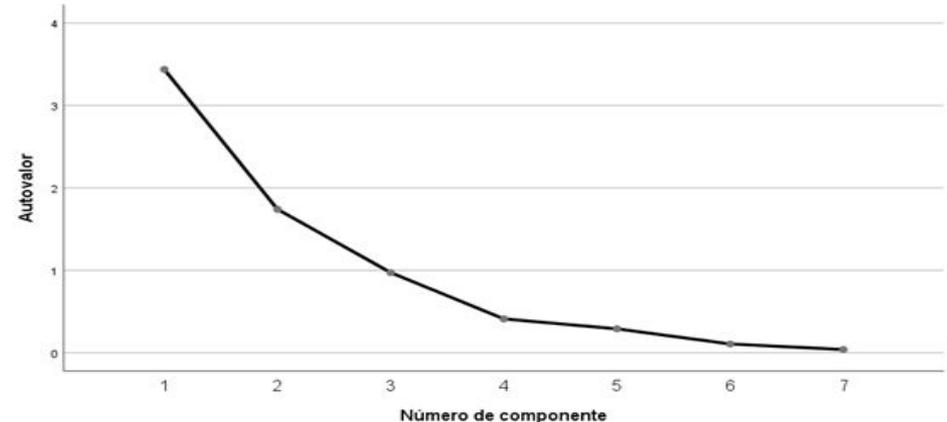
Correlación ^a	pH	Acidez	% Ceniza	olor	sabor	textura	color
pH	1,000	-0,743	0,438	-0,065	-0,035	-0,400	-0,440
Acidez	-0,743	1,000	-0,477	-0,219	0,006	0,467	0,413
% Ceniza	0,438	-0,477	1,000	0,236	-0,332	-0,546	-0,396
olor	-0,065	-0,219	0,236	1,000	0,240	0,331	0,423
sabor	-0,035	0,006	-0,332	0,240	1,000	0,637	0,750
textura	-0,400	0,467	-0,546	0,331	0,637	1,000	0,909
color	-0,440	0,413	-0,396	0,423	0,750	0,909	1,000

Nota. a. Determinante = ,003

Se observó una correlación negativa entre el pH y la acidez, con un valor de -0,743. Esta relación indica una proporción inversa; es decir, a medida que la acidez de la fruta disminuye, el pH tiende a aumentar. También se observaron dos correlaciones positivas entre el color, sabor y textura, es decir que estos valores aumentan o disminuyen juntos.

De los 7 componentes principales, solo 3 están contribuyendo significativamente a la variabilidad de los datos, con un autovalor de 3,437, 1,741 y 0,973 respectivamente.

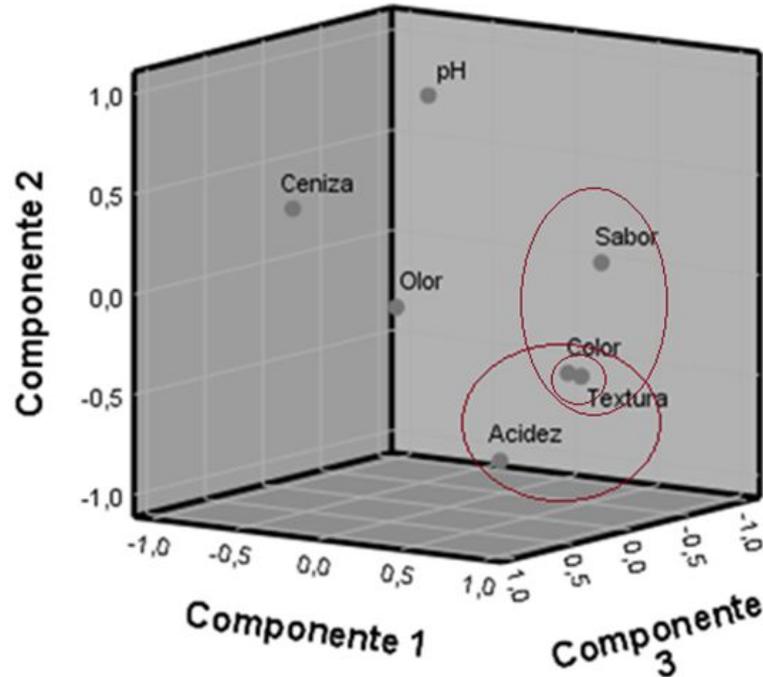
Gráfico de Sedimentación



Resultados

Análisis de componentes principales

Gráfico de componentes en espacio rotado mediante Quartimax



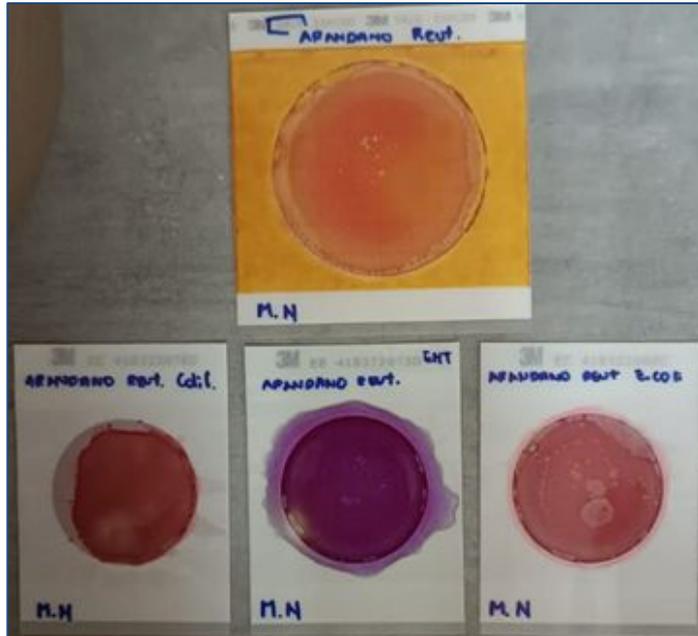
- En el componente 1, se observan 2 grupos, siendo color-textura los de mayor correlación. En el componente 3, se encontró un grupo donde la acidez, el color y la textura tienen correlación.
- El color, textura, sabor y acidez son factores que se ven afectados, por la maduración, siendo que estos tienden a disminuir mientras más se madura la fruta (Barrett y otros, 2010). Además se observa una correlación negativa entre acidez y pH en el componente 3.
- La disminución en la acidez se debe a la conversión de ácidos orgánicos en azúcares durante la gluconeogénesis, lo cual aumenta el pH de la fruta (García-Pacheco & Cabrera, 2023).



Resultados

Análisis microbiológico

Cultivos en placas Petrifiml de diferentes tipos del tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano



No existió crecimiento bacteriano en ninguna de las placas de cultivo.

Esto se debe a que las BAL tienen la capacidad de inhibir otros microorganismos, lo que les permite mejorar la seguridad y calidad de diversos productos alimenticios (Akbar et al., 2016).

Cultivos en placas Petrifiml de diferentes tipos del tratamiento *Weissella Confusa* + uva



Conclusiones

Determinación de la eficacia de la liofilización para la conservación de BAL

- La bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* obtuvo mayor rendimiento 6,283%, mientras que *Weissella Confusa* presentó el menor rendimiento 4,571%.
- *Leuconostoc mesenteroides* demostró mayor actividad bacteriana tanto antes como después del proceso de liofilización. Su concentración inicial fue 1.83E+09 UFC/mL, y tras el proceso de liofilización y reactivación, esta se redujo a 6,39E+08 UFC/mL. Además, se observó mayor formación de colonias bacterianas. Estos resultados evidencian la capacidad de *Leuconostoc mesenteroides* para mantener su viabilidad después de la liofilización.

Respecto a los tipos de BAL (Factor A)

- En cuanto al pH, se registraron valores más bajos para la bacteria *Weissella confusa*, con un pH de 3,708, mientras que *Limosilactobacillus Reuteri* mostró un pH más alto, con 3,770. Estos valores de pH son óptimos para que las BAL actúen como bioconservantes.
- En relación con la acidez, *Lactiplantibacillus plantarum* tuvo menor acidez, con un 0,773%, mientras que *Lactococcus lactis subsp. Lactis* presentó mayor acidez, con un 1,093%.
- En cuanto al porcentaje de cenizas, *Weissella Confusa* mostró el menor valor, con un 0,278%, mientras que *Limosilactobacillus Reuteri* tuvo el mayor porcentaje, con un 0,448%.



Conclusiones

Respecto a las frutas MPF (Factor B)

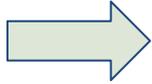
- Tanto el arándano como la uva superaron los valores típicos de pH de las bayas maduras, con un pH de 3,681 para los arándanos y 3,846 para las uvas, lo que indica un proceso de maduración. Sin embargo, el porcentaje de acidez de ambas frutas se mantuvo dentro de los rangos típicos, con un 1,164% para los arándanos y un 0,721% para las uvas.
- En cuanto al porcentaje de cenizas, también se mantuvieron dentro de los rangos reportados, siendo del 0,309% para los arándanos y del 0,360% para las uvas. Estos resultados indican que las frutas permanecen dentro de los estándares de calidad.

Respecto a la interacción A*B (Tipos de BAL* MPF)

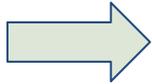
- El tratamiento más efectivo para arándanos fue *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0), con valores óptimos de pH (3,70), acidez (0,992%) y cenizas (0,399%).
- El tratamiento más efectivo para uvas fue *Weissella Confusa* + uva (A3B1), con valores similares de pH (3,845), acidez (0,704%) y cenizas (0,304%).
- Los análisis sensoriales confirmaron que los tratamientos conservaron un buen sabor, olor, textura y color de las frutas, siendo los mejores tratamientos: *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano y *Weissella Confusa* + uva.
- Los análisis microbiológicos demostraron ausencia de crecimiento de Enterobacterias, Coliformes totales, *Salmonella* y *E. coli*.



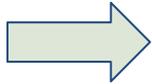
Recomendaciones



Se recomienda el uso de la bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* para la liofilización, dado que demostró el mayor rendimiento y actividad bacteriana.



Se recomienda utilizar las bacterias *Limosilactobacillus Reuteri* y *Weissella Confusa* para su aplicación como bioconservantes en frutas mínimamente procesadas (MPF).



Se recomienda tener un mayor control y atención a la correlación entre estas variables, ya que pueden proporcionar información valiosa sobre la calidad y el estado de maduración de los productos agrícolas.



GRACIAS POR SU ATENCIÓN



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACION PARA LA EXCELENCIA