



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

Chumania Cabrera, Noemi Karina y Rodríguez Cuasapaz, María José

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, PhD.

13 marzo del 2024

Reporte de verificación de contenido



Noemi-María Jose-Tesis_final_Corregi...

Scan details

Scan time:
March 13th, 2024 at 20:9 UTC

Total Pages:
66

Total Words:
16305

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1.8%	294
Minor Changes	0.6%	90
Paraphrased	0.2%	36
Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Firma:



Firmado electrónicamente por:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

Sánchez Llaguno, Sungey Naynee PhD.

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: **“Evaluación de la factibilidad de conservación de distintos tipos de bacterias ácido lácticas mediante liofilización.”** fue realizado por las señoritas **Chumania Cabrera, Noemi Karina y Rodríguez Cuasapaz, María José**, 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, 13 marzo del 2024

Firma:



.....

Sánchez Llaguno, Sungey Naynee PhD.

C.C 1205348873



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Nosotros, **Chumania Cabrera, Noemi Karina y Rodríguez Cuasapaz, María José**, con cédulas de ciudadanía N.º 2350503013 y N.º 1724797335, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "Evaluación de la factibilidad de conservación de distintos tipos de bacterias ácido lácticas mediante liofilización." es de nuestra 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, 13 marzo del 2024

Firmas

Chumania Cabrera, Noemi Karina

C.C.: 2350503013

Rodríguez Cuasapaz, María José

C.C.: 1724797335



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Nosotros, **Chumania Cabrera, Noemi Karina y Rodríguez Cuasapaz, María José**, con cédulas de ciudadanía N.º 2350503013 y N.º 1724797335, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Evaluación de la factibilidad de conservación de distintos tipos de bacterias ácido lácticas mediante liofilización.”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 13 marzo del 2024

Firmas:

Chumania Cabrera, Noemi Karina

C.C.: 2350503013

Rodríguez Cuasapaz, María José

C.C.: 1724797335

Dedicatoria

Quisiera dedicar este proyecto de integración curricular a mí misma, por haber logrado continuar con dedicación y perseverancia en este camino a pesar de todas las dificultades. También, quiero dedicar este escrito a mi hermano Santiago, quien ha sido mi inspiración y motivación para superarme más cada día.

Chumania Cabrera Noemi Karina

Dedicatoria

Dedico el presente proyecto de titulación a mi madre, mi inspiración constante, y a mí misma por mi perseverancia y determinación para alcanzar mis metas académicas. Que este logro sea un testimonio de mi esfuerzo y un estímulo para seguir adelante con valentía y determinación en los desafíos futuros.

Rodríguez Cuasapaz María José

Agradecimiento

Primero que todo, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, Leonardo y Lucía, quienes han brindado un apoyo incondicional y económico para que pueda realizar mis estudios. Su apoyo y ejemplo han sido fundamentales en mi camino académico. También quiero agradecer a Dios por permitirme seguir de pie y a mi hermano Santiago, quien ha sido mi mayor inspiración y motivación para seguir adelante con mis estudios.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a mis compañeros de clase y amigos de la universidad, en especial a Nathaly, por su apoyo incondicional y sus constantes palabras de aliento. También quiero agradecer a mis amigos más cercanos, los LCL, por todos los buenos momentos que compartimos juntos. En particular, agradezco a Marco y Antonio, quienes han sido mis más grandes confidentes y me han acompañado en mi trayectoria académica. Su amistad y apoyo han sido invaluable para mí.

Agradezco sinceramente a mi pareja, Bryan Noboa, por ser un pilar fundamental en estos últimos períodos de mi vida. Su apoyo incondicional, comprensión y amor han sido esenciales para mí, y estoy profundamente agradecida por tenerlo a mi lado.

Expreso también mi agradecimiento a mi tutora, Sungey Sánchez, y a la laboratorista, Katty Medina, por ser mis guías en este proyecto y por darme la oportunidad de trabajar con ellas.

También quiero expresar mi agradecimiento a la música, que me ha permitido mantener la paz y la cordura durante el proceso de elaboración y redacción de este escrito. Sus melodías han sido mi compañía constante y mi fuente de inspiración, brindándome calma y motivación en cada paso del camino.

Agradecimiento

En primer lugar, quiero expresar mi profunda gratitud a mis padres, Rosario y César, así como a mis hermanos, Katty y Santiago, y mis sobrinas, Stefany y Samantha. Su amor incondicional, apoyo constante y paciencia han sido el pilar fundamental durante toda mi travesía universitaria. Especialmente, quiero agradecer a mi incansable y querida madre, Rosario, por guiarme y acompañarme en cada paso de este camino.

Agradezco de corazón a mis compañeros de estudio, quienes han compartido conmigo este viaje y han sido una fuente de inspiración y enriquecimiento personal. Los momentos compartidos y las conversaciones gratificantes han sido importantes para mi desarrollo tanto académico como personal.

Quiero expresar mi reconocimiento a mi tutora, Sungey Sánchez, y a la laboratorista, Katty Medina, por su valioso apoyo y orientación durante el proceso de investigación. Sus consejos expertos y su asistencia en el manejo de los equipos de laboratorio fueron fundamentales para el éxito de este proyecto.

Por último, agradezco a Fernando Parrado por ser la inspiración y el estándar de una generación. En momentos de adversidad y desmotivación, su ejemplo nos impulsa a preguntarnos: '¿Qué habría hecho Nando en mi situación?' y seguir adelante, recordando que cada uno tiene su propia cordillera.

Rodríguez Cuasapaz María José

Índice de contenidos

Dedicatoria	I
Agradecimiento	III
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Capítulo I: Introducción y Estado del Arte	3
Introducción	3
Estado del arte:	4
Objetivos	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Hipótesis.....	8
Hipótesis para factor A (Bacterias ácido lácticas liofilizadas):	8
Hipótesis para el factor B (Frutas):	8
Interacción A*B (Tipo de bacteria * Tipo de fruta):	8
Capítulo II: Marco teórico/Marco Conceptual	9
Bacterias ácido lácticas (BAL)	9
Metabolismo de las BAL	9
Compuestos antimicrobianos de las BAL.....	10
Bacteriocinas	10
Clasificación de las Bacteriocinas.	11
Clase I.	12

Clase II.	12
Clase III.	12
Clase IV.	12
Conservación de los microorganismos	13
Liofilización como método de conservación.....	13
Efectos de la liofilización en microorganismos	15
Ventajas y Desventajas de la Liofilización.....	15
Frutas mínimamente procesadas (MPF).....	15
Arándanos (<i>Vaccinium corymbosum</i>).....	16
Uvas (<i>Vitis vinífera</i> L.)	17
Capítulo III: Metodología/Técnicas/Diseño	18
Ubicación del área de investigación	18
Ubicación Política	18
Ubicación Ecológica.....	18
Ubicación Geográfica	18
Materiales	19
Cultivo de bacterias ácido lácticas.....	19
Comprobación de la activación de bacterias ácido lácticas	20
Liofilización de bacterias ácido lácticas	20
Envasado de Bacterias ácido lácticas liofilizadas	20
Acondicionamiento de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	21
Determinación de pH	21

Determinación de acidez titulante	21
Determinación de cenizas	22
Preparación de solución bacteriana	22
Bioconservación de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	22
Análisis microbiológico de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	23
Métodos	23
Cultivo de bacterias ácido lácticas.....	23
Comprobación de la activación de bacterias ácido lácticas	24
Liofilización y envasado de bacterias ácido lácticas	24
Acondicionamiento de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	25
Preparación de soluciones bacterianas	25
Bioconservación Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	25
Análisis Físicoquímico de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	26
Determinación de pH.	26
Determinación de acidez titulante.	26
Determinación de cenizas.	27
Análisis Microbiológico de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	27
Análisis Sensorial de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	28
Diseño Experimental	29
Análisis del rendimiento de la liofilización de bacterias ácido lácticas	29
Factores y niveles para el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas.....	29
Interacción de los tratamientos a evaluar	30

Tipo de diseño experimental	30
Repeticiones	30
Análisis estadístico	30
Análisis funcional.....	31
Variables a medir.....	31
Capítulo IV: Resultados y Discusiones.....	32
Determinación de la eficacia de la liofilización para la conservación de BAL	32
Evaluación del rendimiento de la liofilización de las BAL	32
Viabilidad de la liofilización de BAL	33
Análisis estadísticos de la bioconservación de productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	37
Resultados de los parámetros fisicoquímico	37
Resultados de la comparación de las 5 BAL (Tukey $p < 0.05$) para los parámetros fisicoquímicos	39
Análisis sensorial	46
Olor	46
Sabor	46
Textura	47
Color.....	48
Análisis de componentes principales	49
Análisis microbiológico.....	52
Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones.....	55

Determinación de la eficacia de la liofilización para la conservación de BAL	55
Respecto al Factor A (Tipos de BAL)	55
Respecto al Factor B (MPF)	56
Respecto a la interacción A*B (Tipos de BAL* MPF).....	56
Recomendaciones	57
Referencias bibliográficas	58

Índice de tablas

Tabla 1.	Taxonomía del arándano.....	16
Tabla 2.	Taxonomía de la uva	17
Tabla 3.	Equipos e insumos para el cultivo de bacterias ácido lácticas.....	19
Tabla 4.	Recursos necesarios para la comprobación de la activación de bacterias ácido lácticas	20
Tabla 5.	Recursos necesarios para la liofilización de bacterias ácido lácticas.	20
Tabla 6.	Equipos e insumos necesarios para el almacenamiento y envasado de los liofilizados	20
Tabla 7.	Equipos e insumos necesarios para el acondicionamiento de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF).....	21
Tabla 8.	Equipos e insumos necesarios para determinar el pH en Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	21
Tabla 9.	Equipos e insumos necesarios para determinar de acidez titulante en Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF).....	21
Tabla 10.	Equipos e insumos necesarios para determinación de cenizas titulante en Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF).....	22
Tabla 11.	Recursos necesarios para la preparación de las soluciones bacterianas	22
Tabla 12.	Recursos necesarios para la bioconservación de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	22
Tabla 13.	Equipos e insumos necesarios para el análisis microbiológico de los MPF	23
Tabla 14.	Escala de puntuación numérica para análisis sensorial de los MPF	28
Tabla 15.	Análisis del rendimiento de la liofilización de bacterias ácido lácticas.....	29
Tabla 16.	Factores y niveles para el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas.....	29
Tabla 17.	Interacción de los tratamientos a evaluar.....	30

Tabla 18. Análisis de grados de libertad del diseño AxB para el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas.	31
Tabla 19. Rendimiento de la liofilización de las cinco BAL.....	32
Tabla 20. Absorbancia de las BAL antes de la liofilización	33
Tabla 21. Absorbancia de las BAL después de la liofilización.....	33
Tabla 22. Concentración en UFC/mL de las BAL antes y después de la liofilización.....	35
Tabla 23. Análisis de varianza para el pH en la bioconservación de MPF	37
Tabla 24. Análisis de varianza para la acidez titulante en la bioconservación de MPF	38
Tabla 25. Análisis de varianza para el % de cenizas en la bioconservación de MPF.....	38
Tabla 26. Prueba de significancia de Tukey del Factor A: Tipo de BAL.....	39
Tabla 27. Prueba de significancia de Tukey del Factor B: MPF	41
Tabla 28. Prueba de significancia de Tukey de la interacción AB (Tipo de BAL x MPF).....	43
Tabla 29. Matriz de correlaciones de los componentes principales evaluados	49
Tabla 30. Porcentajes de la varianza total explicada	49
Tabla 31. Matriz de componentes rotados mediante Quartimax.....	50

Índice de figuras

Figura 1.	Diagrama de las fases del agua	14
Figura 2.	Etapas del proceso de liofilización en función de la temperatura y el tiempo	14
Figura 3.	Ubicación geográfica dónde se desarrolló la investigación	19
Figura 4.	Comparación del rendimiento de liofilización de cada bacteria.....	32
Figura 5.	Curva de calibración Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de <i>P. fluorescens</i> . Utilizado como Referencia para el cálculo de concentración de UFC.	34
Figura 6.	Concentración (UFC/mL) de las bacterias antes y después de la liofilización.....	35
Figura 7.	Crecimiento de colonias en placas Petrifilm para BAL antes de la liofilización	36
Figura 8.	Crecimiento de colonias en placas Petrifilm para BAL después de la liofilización	37
Figura 9.	Prueba de significación de Tukey de las variables fisicoquímicos para el Factor A: Tipos de BAL.....	39
Figura 10.	Prueba de significación de Tukey de las variables fisicoquímicos para el Factor B: MPF	41
Figura 11.	Prueba de significación de Tukey de las variables fisicoquímicos para la Interacción AB	43
Figura 12.	Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Olor)	46
Figura 13.	Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Sabor)	46
Figura 14.	Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Textura) ..	47
Figura 15.	Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Color).....	48
Figura 16.	Gráfico de sedimentación de los componentes principales	50
Figura 17.	Gráfico de componentes en espacio rotado mediante Quartimax	51
Figura 18.	Cultivos en placas Petrifiml de diferentes tipos del tratamiento <i>Limosilactobacillus Reuteri</i> + arándano.....	53
Figura 19.	Cultivos en placas Petrifiml de diferentes tipos del tratamiento <i>Weissella Confusa</i> + uva	53

Resumen

El objetivo del estudio es evaluar la conservación de bacterias ácido lácticas (BAL) mediante liofilización y posteriormente comprobar la viabilidad en dos frutas mínimamente procesadas (MPF). Se utilizaron 5 cepas de BAL: *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri*, las cuales se inocularon en caldo MRS y posteriormente se liofilizaron durante 4 días para obtener un producto deshidratado que se envasó al vacío. Las BAL liofilizadas se rehidrataron en agua peptona y solución tampón, luego se aplicaron mediante rociado a arándanos y uvas. Después de 10 días del tratamiento se evaluaron pH, acidez, cenizas, parámetros sensoriales y el control microbiológico de Enterobacterias, Coliformes totales, *Salmonella* y *E. Coli*. Se determinaron que los tratamientos más efectivos fueron *Limosilactobacillus Reuteri* para el arándano y *Weissella Confusa* para la uva, ambos con valores óptimos de pH, acidez y cenizas, y con ausencia de microorganismos patógenos.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, Liofilización, Productos agrícolas mínimamente procesados, Bioconservación.

Abstract

The aim of the study is to evaluate the preservation of lactic acid bacteria (LAB) by freeze-drying and subsequently test the viability in two minimally processed fruits (MPF). Five LAB strains were used: *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* and *Limosilactobacillus Reuteri*, which were inoculated in MRS broth and then freeze-dried for 4 days to obtain a dehydrated product that was vacuum packed. The freeze-dried LAB were rehydrated in peptone water and buffer solution, then spray-applied to blueberries and grapes. After 10 days of treatment, pH, acidity, ash, sensory parameters, and microbiological control of Enterobacteriaceae, total Coliforms, *Salmonella* and *E. Coli*. It was determined that the most effective treatments were *Limosilactobacillus Reuteri* for blueberries and *Weissella Confusa* for grapes, both with optimal pH, acidity, and ash values, and with absence of pathogenic microorganisms.

Keywords: Lactic acid bacteria, Freeze-drying, minimally processed agricultural products, Bio-preservation.

Capítulo I: Introducción y Estado del Arte

Introducción

La conservación de bacterias ácido lácticas (BAL) mediante la liofilización es un método de deshidratación con el fin último de obtener una formulación sólida y estable capaz de mantener la viabilidad y la estabilidad de estas bacterias a largo plazo. Esto permite su almacenamiento y posterior utilización en la bioconservación de productos agrícolas MPF (Carvalho et al., 2004).

El uso de BAL conservadas por liofilización tiene un gran potencial en las industrias de alimentos fermentados, productos farmacéuticos y en la biopreservación de alimentos. Este último busca desarrollar alimentos más seguros y duraderos, lo que contribuye significativamente a la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. Además, al garantizar la calidad y extender la durabilidad de los productos, fomenta el consumo de alimentos saludables y frescos.

En los últimos años, el mercado de frutas frescas y mínimamente procesadas (MPF) ha experimentado un rápido crecimiento debido a los cambios en los hábitos de consumo, que se inclinan hacia alimentos frescos y saludables. Sin embargo, durante el procesamiento de las frutas, la manipulación y las operaciones de corte y pelado pueden inducir lesiones en el fruto y la liberación de contenido celular, lo que a su vez provoca el crecimiento de microorganismos dañinos (De Corato, 2020).

Para contrarrestar este problema, se ha investigado el uso de BAL en frutas MPF como un método para mejorar su calidad y prolongar su vida útil. Las BAL han demostrado su capacidad de reducir e inhibir la acción de patógenos transmitidos por los alimentos, debido a su efecto antibacteriano por parte de las bacteriocinas que tienen acción competitiva contra muchos microorganismos (Agriopoulou et al., 2020).

El objetivo de este proyecto de titulación es evaluar la factibilidad de conservar distintos tipos de BAL mediante liofilización y el efecto de su aplicación para la bioprotección de productos agrícolas MPF. Esto se llevará a cabo mediante análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales.

La metodología empleada en esta investigación fue de tipo experimental, con un diseño cuasiexperimental de dos factores: A (Bacterias ácido lácticas) y B (Arándanos y Uvas). Se utilizaron cinco tipos de BAL (*Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa*, *Limosilactobacillus Reuteri*), las cuales se conservaron mediante liofilización y posteriormente aplicaron a arándanos y uvas. Se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales a los productos, antes y después de la aplicación de las BAL, para evaluar la eficacia de conservación y de bioprotección en las frutas.

Estado del arte:

En el campo de la conservación de BAL mediante liofilización, se ha observado un avance considerable en los últimos años. El proceso de liofilización ha sido ampliamente investigado para aumentar la eficacia de este método y prolongar la vida útil de las bacterias, lo que a su vez contribuye a la bioconservación de productos agrícolas MPF protegidos con BAL.

La liofilización es un proceso efectivo siempre y cuando los microorganismos logren mantener su viabilidad por un periodo de tiempo. No obstante, las tasas de supervivencia post-liofilización están sujetas a factores como el género y la especie del microorganismo, así como también los parámetros específicos de la liofilización, el estado fisiológico de las células y las condiciones bajo las cuales se rehidrata el líofilo (Grauer Liurner et al., 2015).

Actualmente, la liofilización es la técnica más apropiada y ampliamente utilizada para la conservación de BAL (Carvalho, et al., 2004). Sin embargo, durante el proceso, se somete a las células a un estrés ambiental debido a los procesos congelación, secado y rehidratación. La supervivencia microbiana depende de varios factores como la resistencia de las cepas, la concentración inicial de los

cultivos, las condiciones de crecimiento, el medio de secado, los agentes crioprotectores, la velocidad de congelación, las condiciones de almacenamiento como la temperatura, la atmósfera, la humedad relativa y la rehidratación (Edward et al., 2011).

Los parámetros de liofilización se pueden optimizar mediante el uso de crioprotectores garantizando una mayor recuperación y menor pérdida de las BAL. Estudios han demostrado que la conservación de BAL a través de una liofilización con crioprotectores como el almidón, goma de tara, maltodextrina, puede alcanzar un porcentaje de viabilidad de aproximadamente un 88% (Fernandez Lichame & Romero Paucar, 2020).

Aún faltan estudios sobre los efectos de la liofilización en diferentes tipos de BAL, siendo las más utilizadas para la conservación de alimentos las del género *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Pediococcus damnosus* y *Leuconostoc mesenteroides* (Fuochi et al., 2021).

Algunos de los productos comerciales que se han elaborado mediante la técnica de liofilización son los cultivos de microorganismos y probióticos. Se espera que las BAL, una vez aisladas y conservadas por medio de la liofilización, se utilicen como cultivos iniciadores para la fermentación. Su aplicación más común es en los derivados lácteos fermentados, como la crema de leche, el kéfir, el kumis, la mantequilla, el queso y el yogur (Rodríguez Villanueva, 2007).

Los cultivos iniciadores son una mezcla de bacterias ácido lácticas, que al ser liofilizadas están concentradas y se utilizan para la inoculación directa por ejemplo en leche de cuba; esto tiene un interés para la investigación y la industria, debido a sus ventajas como la alta concentración celular, una alta actividad funcional y una larga vida útil de almacenamiento (Huang et al., 2006).

La bioconservación prolonga la vida útil de las frutas y verduras recién cortadas a través del uso de microorganismos seguros y compuestos biológicamente activos no tóxicos, mejorando su seguridad y calidad. El uso de BAL en la biopreservación ha demostrado ser un método efectivo que puede ayudar

en la seguridad alimentaria de la producción de frutas y verduras, manteniendo el valor nutricional, el aroma y el sabor (Agriopoulou et al., 2020)

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la factibilidad de conservación de distintos tipos de bacterias ácido lácticas mediante liofilización.

Objetivos Específicos

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

Hipótesis***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.

Capítulo II: Marco teórico/Marco Conceptual

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL en su mayoría son gram-positivas, no producen esporas, las células se presentan en forma de cocos o bacilos, son anaerobias facultativos, es decir, realizan su metabolismo en ausencia de oxígeno y producen ácido láctico en mayor parte como un producto final de la fermentación de los carbohidratos (Rodríguez Zamora, 2003). Según (Rodríguez Villanueva, 2007), otras características distintivas del metabolismo de las BAL son que no reducen nitratos, no producen catalasa y no son capaces de metabolizar hidratos de carbono complejos.

La clasificación de las BAL resulta complicada debido a diferentes parámetros que se toman en cuenta, como la morfología, la vía de fermentación de la glucosa que puede ser homoláctica o heteroláctica, dependiendo de los productos finales de la fermentación del azúcar, así como la configuración isomérica (L o D) del ácido láctico producido al final, además se toma en cuenta la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas, concentraciones de sal y su tolerancia frente a un medio ácido o básico (Rodríguez Zamora, 2003).

La taxonomía de las BAL se encuentran 6 familias, 38 géneros, y todas pertenecen al orden Lactobacillales, clase Bacilli y filo Firmicutes (Agriopoulou et al., 2020). Los géneros de BAL que se presentan mayormente en alimentos son el *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococeus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (García Ibarra, 2007).

Metabolismo de las BAL

Existen dos rutas de fermentación de azúcares distintivas en las BAL. La primera es la glucólisis o también denominada la ruta de Embden-Meyerhof, que da como resultado casi en su totalidad ácido láctico bajo condiciones, es decir es una fermentación homoláctica. La segunda ruta es la de 6-

fosfogluconato/fosfocetolasa, que da como productos finales el ácido láctico y cantidades significativas de acetato, CO₂ y etanol, es decir es una fermentación heteroláctica (Rodríguez Zamora, 2003).

Cabe resaltar que los productos resultantes de la fermentación dependen de varios factores como las condiciones de crecimiento, alteración del metabolismo del piruvato y el uso del oxígeno o componentes orgánicos como aceptores de electrones (Rodríguez Zamora, 2003).

Compuestos antimicrobianos de las BAL

Las BAL presentan sistemas de inhibición microbiana que impiden el crecimiento de otros microorganismos y así asegurar su supervivencia (Rodríguez Zamora, 2003). Es importante señalar que estos compuestos no son el único mecanismo antimicrobiano, sino que las BAL también ejercen un efecto de competencia por los nutrientes contra los microorganismos patógenos (Agriopoulou et al., 2020).

La conservación de alimentos perecederos se logra mediante los metabolitos antimicrobianos producidos por las BAL, los cuales exhiben una fuerte actividad antagonista frente a otros microorganismos. Estos compuestos incluyen ácidos orgánicos como el ácido láctico, cítrico, acético, fumárico y málico, así como bacteriocinas, etanol, CO₂, diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, amoníaco, acetoína, reuterina y sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas (BLIS), entre otros metabolitos (Agriopoulou et al., 2020).

Bacteriocinas

Son péptidos con un tamaño de entre 20 y 60 aminoácidos y se caracterizan por tener un elevado punto isoeléctrico y propiedades anfipáticas (Barbosa et al., 2018). Son compuestos bioactivos de origen ribosomal, liberados al medio extracelular con la capacidad de inhibir la actividad o el crecimiento de otras bacterias (Beshkova & Frengova, 2012). Sin embargo, las bacterias productoras de bacteriocinas se protegen a sí mismas mediante proteínas de inmunidad específicas. La producción de bacteriocinas puede ser de manera natural como metabolitos primarios o secundarios, o puede ser

estimulada y regulada por la detección de quórum, es decir, mediante la comunicación de la población bacteriana (Barbosa et al., 2018).

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobianos que varían en su modo de acción, su espectro de actividad y en sus propiedades moleculares, genéticas y bioquímicas (Barbosa et al., 2018). Estos péptidos actúan de manera diferente según el tipo de bacteria que los produce: las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas suelen permeabilizar la membrana o interrumpir la síntesis de la pared celular, afectando la funcionalidad de la envoltura celular, mientras que las bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram negativas afectan principalmente a los procesos intracelulares (Martínez et al., 2019).

Algunos de los microorganismos contaminantes y patogénicos que son inhibidos por estos mecanismos son la Clostridium, Escherichia coli, Listeria, Pseudomonas, Salmonella, Staphylococcus, como también hongos y levaduras (Rodríguez Zamora, 2003).

Las bacteriocinas como un aditivo alimenticio se encuentran en la lista de compuestos que son generalmente reconocidos como seguros (GRAS); esta es una categorización realizada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) que especifica los límites permisibles de los aditivos en los alimentos. En otras palabras, las BAL no presentan riesgos para la salud de las personas, mientras no superen las concentraciones permitidas en los alimentos. Además, las bacterias que han sido modificadas genéticamente se excluyen de la lista de GRAS y necesitan previa aprobación para comercializar (O'Bryan et al., 2018).

Clasificación de las Bacteriocinas. La clasificación no es definitiva y está sujeta a continuas revisiones, debido a que se siguen descubriendo nuevas bacteriocinas (Beshkova & Frengova, 2012). Sin embargo, la siguiente clasificación es la aceptada por la comunidad científica, donde las bacteriocinas se han agrupado en 4 clases según varios criterios de clasificación, como las masas moleculares,

propiedades físicas, estructuras químicas, el modo de acción y las características genéticas y bioquímicas.

Clase I. Son antibióticos de estructuras peptídicas pequeñas con masas moleculares menores a 5kDa, con características catiónicas e hidrofóbicas. Los aminoácidos tienen modificaciones postraduccionales, entre los cuales se incluyen la dehidrobutirina, dehidroalanina, lantionina y metilantionina. La bacteriocina más destacada del grupo es la nisina, la cual es un aditivo alimentario utilizado como bioconservante y reconocido en varios países (Beshkova & Frengova, 2012).

Esta clase I se divide a su vez en dos tipos. El tipo A agrupa a las moléculas alargadas y cargadas positivamente, mientras que el tipo B agrupa moléculas globulares y no cargadas (Beshkova & Frengova, 2012).

Clase II. Son de estructuras pequeñas con masas moleculares menores a 10kDa, con características termoestables, catiónicas e hidrofóbicas. Los péptidos no tienen modificaciones. En esta clase se incluyen las bacteriocinas de las BAL, entre las cuales se encuentran las ácidocinas, enterocinas, lactococinas, pediocinas y plantaricinas (Beshkova & Frengova, 2012).

Esta clase II se subdivide en tres subclases. La subclase II a incluye a las bacteriocinas similares a la pediocina y los péptidos son activos contra la *Listeria*. La subclase II b comprende a las bacteriocinas de dos péptidos, la subclase II c son las bacteriocinas dependientes y la subclase II d son los péptidos antimicrobianos derivados de proteínas más grandes (Beshkova & Frengova, 2012).

Clase III. Son las bacteriocinas compuestas por proteínas grandes con masas moleculares de más de 30kDa, con características hidrófilas y termolábiles (Beshkova & Frengova, 2012).

Clase IV. Son las bacteriocinas estructuradas de macromoléculas cíclicas con características catiónicas e hidrófobas (Beshkova & Frengova, 2012).

Conservación de los microorganismos

Las tecnologías de concentración y conservación de microorganismos se utilizan, por ejemplo, en cultivos iniciadores de BAL dentro de la manufactura de alimentos para mantener los cultivos viables y funcionales por largos períodos de tiempo (Carvalho et al., 2004).

La conservación de cultivos no solo es de interés industrial, sino también investigativo. Por ello, se han desarrollado varios métodos cuya selección depende del tiempo que se requiera almacenar los microorganismos (Rodríguez Villanueva, 2007), así como de la naturaleza de estos, con el fin de mantener su viabilidad, pureza, estabilidad y características fenotípicas (Rodríguez Zamora, 2003).

Anteriormente, los cultivos iniciadores utilizados en el mercado eran viales conservados en nitrógeno líquido, los cuales se sembraban directamente en tanques de fermentación, evitando así la necesidad de resiembra sistemática que tiene como propósito la preservación de los microorganismos en cultivos de reserva y evita la contaminación (García Ibarra, 2007).

A nivel industrial, las BAL se someten a procesos de conservación para obtener suspensiones líquidas o polvos mediante pulverización, congelación y liofilización. Estos dos últimos métodos garantizan la estabilidad de los cultivos con alta viabilidad y actividad celular (Carvalho et al., 2004).

Liofilización como método de conservación

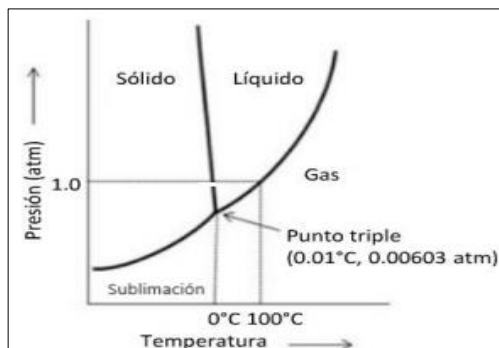
Un producto liofilizado es la forma más destacada para comercializar los cultivos. Este proceso resulta en productos de mayor calidad y, al eliminar la necesidad de mantener las cepas en congelación, se obtienen productos con una vida útil prolongada (García Ibarra, 2007).

La liofilización es un método efectivo de deshidratación o secado basado en el principio de sublimación del hielo, donde el agua pasa del estado sólido al vapor sin pasar por el estado líquido. El proceso de liofilización consta de tres etapas: la primera es la ultracongelación rápida del agua, la segunda es la sublimación o secado primario, donde el contenido acuoso se elimina en forma de vapor en vacío (Perry, 1998), como podemos ver en la Figura 1, existe un punto triple donde coexisten los tres

estados del agua, lo que indica que a presiones subatmosféricas el hielo se convierte directamente en vapor (Grauer Liurner et al., 2015).

Figura 1.

Diagrama de las fases del agua

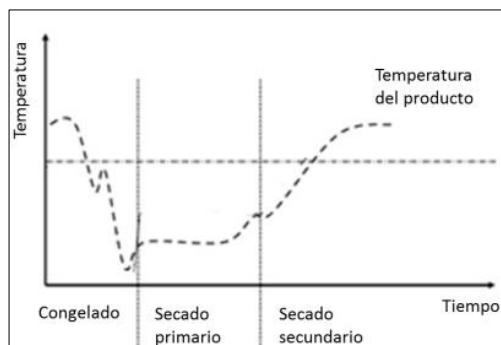


Nota. Adaptado de (Grauer Liurner et al., 2015)

La tercera etapa es la del secado secundario o desorción isotérmica del agua no congelada (Grauer Liurner et al., 2015), que generalmente es entre los 25 y 30 g de agua por cada 100 g de sólido (Perry, 1998). El agua residual no congelada está fuertemente unida al sólido, por lo que requiere una mayor energía para eliminarla. Como podemos ver en la Figura 2, este proceso ocurre durante la desorción cuando aumenta la temperatura en condiciones de vacío. La remoción de los restos de agua resulta en un producto estable (Grauer Liurner et al., 2015).

Figura 2.

Etapas del proceso de liofilización en función de la temperatura y el tiempo



Nota. Adaptado de (Grauer Liurner et al., 2015)

Efectos de la liofilización en microorganismos

La viabilidad de los microorganismos se ve reducida por el daño en la pared y membrana celular, la oxidación de los lípidos de membrana (Carvalho et al., 2004), la formación de hielo, la alta osmolaridad debido a la concentración de solutos intracelulares, la desnaturalización de macromoléculas e incluso la pérdida de agua afecta a los compuestos hidrofílicos de las células (Huang et al., 2006). Sin embargo, es posible mejorar la supervivencia celular teniendo en cuenta las condiciones de rehidratación de los cultivos secos, ya que una rehidratación lenta aumenta las posibilidades de supervivencia de los microorganismos (Carvalho et al., 2004).

Ventajas y Desventajas de la Liofilización

La liofilización presenta múltiples ventajas, como la baja temperatura de operación que evita la alteración de productos termolábiles, la ausencia de aire durante el proceso elimina el riesgo de oxidación, la eliminación de agua que previene la hidrólisis y crecimiento de otros microorganismos, y la rápida rehidratación del liofilizado. Además, el producto resultante tiene baja humedad residual, larga vida útil y poco peso, lo que elimina la necesidad de cadenas de refrigeración para su distribución (Rodríguez Zamora, 2003).

Entre las desventajas se encuentran los altos costos de las instalaciones y equipos de liofilización, los gastos de energía y la lentitud del proceso, que en ciertos casos requiere varios días de liofilización dependiendo del tipo de muestra (Rodríguez Zamora, 2003).

Frutas mínimamente procesadas (MPF)

Son los alimentos de IV gama que han experimentado un procesamiento mínimo, es decir las frutas son frescas, limpias, troceadas y envasadas, listas para el consumo. Tienen una vida útil de aproximadamente 5 a 7 días bajo condiciones de frío entre 1 y 4°C, lo que garantiza la conservación de su calidad nutricional y sensorial (Alegre Vilas et al., 2020).

Durante la manipulación de los alimentos, existe la probabilidad de contaminación cruzada. Por esta razón, se aplican medidas para disminuir el desarrollo de microorganismos que producen sustancias tóxicas y que afectan la calidad del producto. Para esto, se utiliza el envasado en atmósfera modificada y la refrigeración, que no solo retarda la senescencia de las frutas, sino que también aumenta su vida útil. Además, se emplean alternativas de bioconservación mediante microorganismos o sus metabolitos (Alegre Vilas et al., 2020).

Arándanos (*Vaccinium corymbosum*)

El consumo diario de arándanos puede reducir hasta en un 20% el daño provocado al ADN por el estrés oxidativo, lo que resulta en una debilitación del sistema inmunológico y aumenta la susceptibilidad a enfermedades degenerativas debido al daño celular causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) (García Gargatt & Alejandro Santos, 2021). La capacidad antioxidante de los arándanos puede prevenir enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso el cáncer (Kraft et al., 2006).

Estos beneficios para la salud se atribuyen al contenido de compuestos polifenólicos, como el ácido gálico y el resveratrol, que contrarrestan el daño oxidativo causado por las ROS (García Gargatt & Alejandro Santos, 2021), así como a las antocianinas como el 3-O-galactósido, 3-O-arabinósido de cianidina, 3-O-glucósido de cianidina y peonidina (Kraft et al., 2006).

Tabla 1.

Taxonomía del arándano

Taxon	
Reino	Plantae
División	Traqueofita
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	Vaccinium
Especie	<i>Vaccinium corymbosum</i>

Nota. Recuperado [febrero, 27, 2024] de la (Información Taxonómica Integrada Base de datos en línea del Sistema (ITIS), www.itis.gov, CC0 <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>, 2024)

Uvas (Vitis vinífera L.)

La uva contiene compuestos aromáticos, pectinas, sustancias nitrogenadas, compuestos fenólicos, fibra, azúcares, ácido fólico, vitamina A y pequeñas cantidades de vitamina B1, B2, B3, B6 y vitamina C, además de ácidos orgánicos como el ácido tartárico y el málico, que constituyen más del 90% de su composición. También contiene ácido cítrico y fosfórico, minerales como el calcio, el magnesio, el fósforo en cantidades moderadas y el potasio, siendo este último el más abundante (Carranza Concha, 2009).

Las antocianinas y sus derivados, sintetizados por las uvas, poseen múltiples funciones biológicas con efectos beneficiosos para la salud humana. Se ha mencionado su capacidad antioxidante para eliminar radicales libres, así como su actividad antimicrobiana, antiviral, anticancerígena y antimutagénica. Además, se ha observado que ayudan a prevenir enfermedades cardíacas y hepáticas (He et al., 2010).

Tabla 2.

Taxonomía de la uva

Taxon	
Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Vitales Juss.
Familia	Vitaceae Juss.
Género	Vitis L.
Especie	<i>Vitis vinífera L.</i>

Nota. Recuperado [febrero, 27, 2024] del (Catalogue of Life (COL),

<https://www.catalogueoflife.org/data/browse>, 2024)

Capítulo III: Metodología/Técnicas/Diseño

Ubicación del área de investigación

Ubicación Política

País:	Ecuador
Provincia:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón:	Santo Domingo
Parroquia:	Luz de América
Sector:	Vía Quevedo, Km 24

Ubicación Ecológica

Zona de vida:	Bosque húmedo tropical
Altitud:	224 msnm
Temperatura media:	24,6 °C
Precipitación:	2860 mm año
Humedad relativa:	85 %
Heliofanía:	680 horas luz año
Suelos:	Franco Arenoso

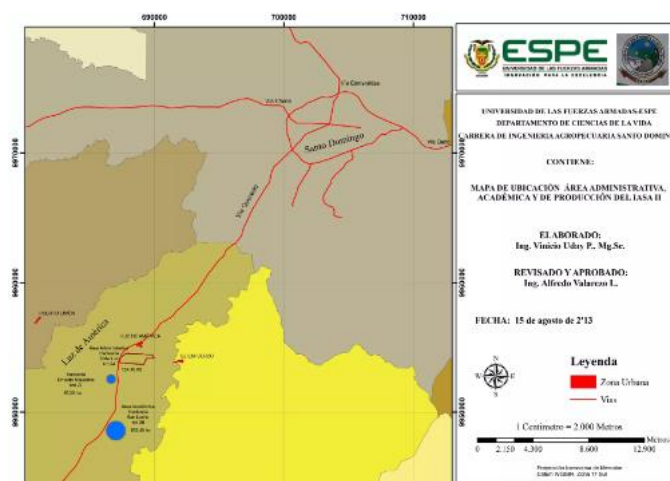
Fuente: Estación Agro Meteorológica "Puerto Ila" Vía Quevedo km 34

Ubicación Geográfica

El presente trabajo de integración curricular se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sede Santo Domingo; Hacienda Zoila Luz km 24 Vía Quevedo, en el Laboratorio de Bromatología y Biociencia y Laboratorio de Microbiología de los Alimentos.

Latitud:	00° 24' 36"
Longitud:	79° 18' 43"
Altitud:	270 msnm

Figura 3.

Ubicación geográfica dónde se desarrolló la investigación

Nota. Tomada de Mapa ubicación ESPE Santo Domingo, por V. Uday, 2014.

Materiales**Cultivo de bacterias ácido lácticas****Tabla 3.****Equipos e insumos para el cultivo de bacterias ácido lácticas**

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Matraz Erlenmeyer	Caldo MRS	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>
Incubadora	Mechero de alcohol	Agua destilada	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
Autoclave	Asa bacteriológica	Alcohol	<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
Estufa	Papel Parafilm		<i>Weissella Confusa</i>
Balanza analítica	Algodón		<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>
Plato agitador	Agitador magnético		
	Gasas		

Nota. Se utilizaron los distintos tipos de bacterias ácido lácticas conservadas en glicerol

Comprobación de la activación de bacterias ácido lácticas

Tabla 4.

Recursos necesarios para la comprobación de la activación de bacterias ácido lácticas

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Micropipeta	Alcohol	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>
Espectrofotómetro	Espátula		<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
Incubadora	Mechero de alcohol		<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
	Puntas para micropipeta		<i>Weissella Confusa</i>
	Celdas de cuarzo		<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>
	Petrifilm de BAL		

Nota. Se utilizaron los distintos tipos de bacterias ácido lácticas previamente cultivadas en caldo MRS

Liofilización de bacterias ácido lácticas

Tabla 5.

Recursos necesarios para la liofilización de bacterias ácido lácticas.

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Liofilizador	Frascos de muestra de orina	Alcohol	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>
Congelador	Espátula		<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
Bomba de vacío	Mechero de alcohol		<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
Cámara de flujo laminar			<i>Weissella Confusa</i>
Liofilizador			<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>

Nota. Se utilizaron los distintos tipos de bacterias ácido lácticas previamente cultivadas en caldo MRS

Envasado de Bacterias ácido lácticas liofilizadas

Tabla 6.

Equipos e insumos necesarios para el almacenamiento y envasado de los liofilizados

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Espátula	Alcohol	<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>
	Mechero de alcohol		<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>
	Fundas ziploc		<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>
			<i>Weissella Confusa</i>
			<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>

Acondicionamiento de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Tabla 7.

Equipos e insumos necesarios para el acondicionamiento de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Balanza analítica	Vaso de precipitación	Agua destilada	Uvas
	Pinzas	Ácido Cítrico	Arándanos
	Varilla de agitación		

Nota. Autoría propia

Determinación de pH

Tabla 8.

Equipos e insumos necesarios para determinar el pH en Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Potenciómetro	Vaso de precipitación	Agua destilada	Uvas
Balanza analítica	Pipeta		Arándanos
	Embudo		
	Papel filtro		
	Varilla de agitación		

Nota. Autoría propia

Determinación de acidez titulante

Tabla 9.

Equipos e insumos necesarios para determinar de acidez titulante en Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Balanza Analítica	Vaso de precipitación	Agua destilada	Uvas
Potenciómetro	Probeta	NaOH (0,05 N)	Arándanos
	Balón de aforo (250 ml)	Fenolftaleína	
	Soporte universal		
	Varilla de agitación		

Nota. Autoría propia

Determinación de cenizas**Tabla 10.**

Equipos e insumos necesarios para determinación de cenizas titulante en Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Balanza Analítica	Mortero	Agua destilada	Arándanos
Mufla	Crisol		Uvas
Desecador	Pinza		
	Espátula		

Nota. Autoría propia

Preparación de solución bacteriana**Tabla 11.**

Recursos necesarios para la preparación de las soluciones bacterianas

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Balanza analítica	Vasos de precipitación	Ácido cítrico	Bacterias liofilizadas
Cámara de flujo laminar	Varilla de agitación	Citrato de sodio	
	Frasco ámbar		
	Pistola de aspersor plástico		

Nota. Las bacterias liofilizadas utilizadas fueron: *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis*

subsp. Lactis, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri*.

Bioconservación de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)**Tabla 12.**

Recursos necesarios para la bioconservación de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Vasos de precipitación	Agua destilada	Uvas
	Pinza		Arándanos
	Placas Petri		Soluciones bacterianas
	Papel Parafilm		
	Papel film		

Nota. Autoría propia

Análisis microbiológico de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Tabla 13.

Equipos e insumos necesarios para el análisis microbiológico de los MPF

Equipos	Materiales/ insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Petrifilm de Enterobacterias	Agua destilada	Uvas y arándanos antes y después de la aplicación de las soluciones bacterianas
Incubadora	Petrifilm de Coliformes	Agua de peptona	
	Petrifilm de <i>E. Coli</i>	Alcohol	
	Petrifilm de <i>Salmonella</i>		
	Micropipeta		
	Puntas de micropipeta		
	Tubos de ensayo		
	Mechero de alcohol		

Nota. Autoría propia

Métodos

Cultivo de bacterias ácido lácticas

En lo que refiere a la preparación de los cultivos de los diferentes tipos de bacterias ácido lácticas, se tomaron muestras de *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri* conservadas en glicerol.

Se preparó un caldo de cultivo en un matraz de 1L, para lo cual se añadieron 55,15 gramos de caldo MRS a un litro de agua destilada (se preparó un litro de medio de cultivo MRS para cada bacteria). Posteriormente, se calentó en el plato agitador de calentamiento y se revolvió constantemente con ayuda de un agitador magnético hasta que se disolvió totalmente; luego se esterilizó en la autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Mientras tanto, se realizó la activación de las bacterias colocando las muestras conservadas en la estufa a 37°C durante 4 horas.

Finalmente, en la cámara de flujo laminar se llevó a cabo la inoculación de los 5 tipos de bacterias ácido lácticas en los medios correspondientes y se colocaron en la incubadora a 37°C durante 48 horas.

Comprobación de la activación de bacterias ácido lácticas

Una vez terminado el proceso de incubación de las bacterias, se verificó la activación de las bacterias, para esto, dentro de la cámara de flujo, con ayuda de una micropipeta se tomó 1 mL de muestra de cada caldo de cultivo y se inóculo en placas Petrifilm de bacterias ácido lácticas.

Posteriormente, se tomó una muestra en diferentes celdas de cuarzo y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600nm para posteriormente calcular su concentración.

Liofilización y envasado de bacterias ácido lácticas

En el proceso de liofilización de las bacterias ácido lácticas, se dividió el medio de cultivo con las bacterias en 4 frascos de orina previamente esterilizados y pesados. Una vez colocada la muestra, se volvió a pesar. Previamente al proceso de liofilización, los frascos se congelaron durante 24 horas a -20°C, seguido de una ultracongelación a -60°C en la trampa fría del liofilizador durante 4 horas. Una vez finalizado este proceso, se pesaron nuevamente las muestras. Luego del proceso de ultracongelación, se colocaron las muestras en la cámara de vacío del liofilizador y se procedió con la liofilización de las bacterias.

Durante la liofilización de las bacterias, se siguió el protocolo descrito en el manual de funcionamiento y uso del equipo Bk-F10PT Liofilizador. Una vez colocadas las muestras en la cámara de vacío, se selló correctamente la cubierta y se encendió el medidor de vacío hasta alcanzar una presión de 110KPa. Posteriormente, se encendió la bomba de vacío, logrando una presión menor o igual a 10 Pa a -60°C. Se dejó el proceso de secado durante un periodo de 3 a 4 días, realizando un control continuo del proceso y los niveles de aceite de la bomba de vacío.

Una vez terminado el proceso de liofilización, se apagó la bomba al vacío y el medidor de vacío, luego se abrió la válvula de drenaje de vacío, una vez sacada la presión se abrió la cubierta y se llevaron las muestras cuidadosamente a la cámara de flujo laminar, se procedió a pesar previo al envasado. Las muestras liofilizadas se colocaron en fundas ziploc cerradas al vacío para conservar la muestra intacta para su posterior almacenamiento en el congelador a -20°C .

Este proceso se realizó para los 5 tipos de bacterias.

Acondicionamiento de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

En lo que respecta al acondicionamiento de las MPF, los cuales fueron arándanos y uvas, se realizó una solución de 500 mL de ácido cítrico al 2%, la cual se aplicó en las frutas y se dejó reposar durante 15 min para desinfectarlas. Luego las frutas fueron enjuagadas con agua destilada y se procedió a secarlas. Las 10 muestras preparadas se etiquetaron y se colocaron en cajas Petri para la posterior aplicación de los tratamientos con bacterias ácido lácticas.

Preparación de soluciones bacterianas

Para la preparación de las soluciones bacterianas, se preparó una solución tampón de ácido cítrico-Citrato de sodio con un pH de 3.8 y una concentración de 0.1M. Para ello, se pesaron 12.2 gramos de ácido cítrico y se disolvieron en 635 mL de agua destilada, y 9.17 gramos de citrato de sodio se disolvieron en 365 mL de agua destilada. Luego, se colocó un sobre de cada tipo de liofilizado de bacterias en 200 mL de la solución tampón respectiva. Posteriormente, estas soluciones se transfirieron a frascos ámbar previamente esterilizados y se cerraron con aspersiones. Las soluciones se mantuvieron en refrigeración.

Bioconservación Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

En lo referente al proceso de bioconservación de los productos agrícolas, se aplicaron las diferentes soluciones bacterianas en diversas muestras de arándanos y uvas previamente desinfectadas. Además, se colocaron otras muestras sin tratamiento como control. Estas muestras se dispusieron en

placas Petri y se envolvieron con papel film respectivamente. Después, se almacenaron en refrigeración durante aproximadamente 10 a 15 días. Posteriormente, se evaluó la capacidad de bioconservación de las soluciones bacterianas mediante análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales.

Análisis Fisicoquímico de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

Determinación de pH. Para determinar el pH de las muestras de uva y arándanos, se tomó una cantidad inicial de las mismas y se machacaron en un mortero. Luego, se añadieron 20 mL de agua destilada, y utilizando un potenciómetro, se realizó la medición del pH. Este procedimiento se llevó a cabo tanto en las muestras antes como después de la aplicación de la solución bacteriana, tanto en la muestra control como en las muestras de los tratamientos.

Determinación de acidez titulante. En la determinación de la acidez titulable de las muestras, se pesaron y machacaron en un mortero. Luego, se colocaron en un balón de aforo de 100 mL, se completaron con agua destilada y se transfirieron 50 mL de la solución a un vaso de precipitación, donde se agregaron 5 gotas de fenolftaleína. Se preparó una bureta con hidróxido de sodio (NaOH) 0.05N y se tituló la muestra gota a gota hasta alcanzar el punto de equilibrio, registrando el volumen de NaOH utilizado (V_1 en mL). Utilizando el volumen de NaOH, la normalidad de la solución (N_1), el peso molecular del ácido (M) y el peso en gramos de la muestra (P), se calculó el porcentaje de acidez titulable con la fórmula:

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

Donde:

- %A, es el porcentaje de acidez en la muestra.
- V_1 , es el volumen de NaOH en mL.
- N_1 , es la normalidad de la solución de NaOH.
- M , es el peso molecular del ácido (ácido cítrico para arándano, ácido tartárico para uva).
- P , es el peso en gramos de la muestra.

Este procedimiento se repitió para las muestras control, antes y después de los 15 días posterior a la aplicación de las soluciones bacterianas en los tratamientos.

Determinación de cenizas. Para determinar la cantidad de cenizas en las muestras de arándano y uvas, se pesó una cantidad determinada de cada tratamiento en un crisol de porcelana previamente desecado y pesado (m_0). Luego, los crisoles con las muestras se colocaron en la mufla a una temperatura de $600^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 3 horas. Después de la calcinación, se sacaron las muestras de la mufla y se dejaron enfriar dentro del desecador. Una vez que las muestras estuvieron frías, se pesaron nuevamente (m_2).

El contenido de sólidos totales se calculó mediante la ecuación siguiente:

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

Donde:

- %C, porcentaje de cenizas
- m_0 , peso de la muestra
- m_1 , Peso del crisol vacío.
- m_2 , Peso del crisol más la muestra calcinada

Este procedimiento se repitió para las muestras control, antes y después de los 15 días posteriores a la aplicación de las soluciones bacterianas en los tratamientos.

Análisis Microbiológico de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

En el análisis microbiológico de las frutas después de los tratamientos aplicados, se seleccionaron las muestras con mejores características fisicoquímicas y sensoriales. Para esto se preparó agua de peptona, añadiendo 0,3 gramos por 20 mL de agua destilada. Se trasvaso 2mL de agua de peptona en 10 tubos de ensayo, se autoclavó a 121° durante 15 minutos y se dejó enfriar.

Una vez lista el agua de peptona, se suspendieron las frutas con los tratamientos aplicados en el agua de peptona y con ayuda de una micropipeta se tomó 1mL del agua con las muestras y se colocó en

placas Petrifiml de Enterobacterias, Coliformes totales, *Salmonella* y *Escherichia coli*. Finalmente se incubaron las placas en la estufa a una temperatura de 37° durante 48h.

Análisis Sensorial de Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)

En lo que respecta al análisis sensorial de las muestras, se tomaron en cuenta parámetros como el olor, sabor, textura, color después de la aplicación de los tratamientos con las soluciones bacterianas. Para esto se estableció una escala de puntuación numérica y se realizó la prueba con 5 personas las cuales evaluaron cada uno de los parámetros establecidos para cada tratamiento.

Tabla 14.

Escala de puntuación numérica para análisis sensorial de los MPF

Parámetros	1	2	3	4	5
Olor	Aroma desagradable	Débil o apenas perceptible	Moderado y agradable	Pronunciado y agradable	Olor fuerte y muy agradable
Sabor	Sabor desagradable	Débil o apenas perceptible	Moderado y agradable	Pronunciado y agradable	Sabor fuerte y muy agradable
Textura	Extremadamente blanda o marchita	Blanda y poco jugosa	Firme, jugosa y agradable	Textura crujiente y jugosa	Firme, crujiente y jugosa
Color	Muy desagradable, con signos de deterioro	Desagradable, con algunas imperfecciones	Aceptable, con leves imperfecciones	Color agradable, con aspecto fresco	Color muy agradable, sin imperfecciones visibles

Nota. Esta escala de puntuación permitió evaluar cada aspecto del producto de manera cuantitativa en una escala del 1 al 5, donde 1 representa la peor calidad y 5 la mejor calidad.

Diseño Experimental

Análisis del rendimiento de la liofilización de bacterias ácido lácticas

Tabla 15.

Análisis del rendimiento de la liofilización de bacterias ácido lácticas

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>

Factores y niveles para el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas

Tabla 16.

Factores y niveles para el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas 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>
	A4	<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>
B. Productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)	B0	Arándano
	B1	Uva

Interacción de los tratamientos a evaluar**Tabla 17.****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 experimental

Para evaluar la factibilidad de la bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas, se llevó a cabo un diseño factorial AxB para los parámetros evaluados. Obteniendo un total de 10 tratamientos.

Repeticiones

Para el presente estudio, se realizaron 3 repeticiones el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas, obteniendo un total de 30 unidades experimentales.

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, primero se evaluó los grados de libertad de cada factor y sus interacciones.

Tabla 18.

Análisis de grados de libertad del diseño AxB para el estudio de la factibilidad de bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Bacterias	$a - 1$	4
MPF	$b - 1$	1
Bacterias x MPF	$(a-1) (b-1)$	4
Réplicas	$R-1$	2
Error experimental	$gt - \sum g!$	18
Total		29

Análisis funcional

Para evaluar la diferencia significativa en los análisis estadísticos se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5% ($p < 0,05$).

Variables a medir

- pH
- Acidez
- Cenizas

Capítulo IV: Resultados y Discusiones

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

Para evaluar la eficacia de la liofilización como método de conservación de las bacterias *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella Confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri*, se calculó el rendimiento y la viabilidad del proceso.

Evaluación del rendimiento de la liofilización de las BAL

Para el cálculo del rendimiento, se llevaron a cabo pesajes de las bacterias antes y después de la liofilización. Es decir, se registró el peso de las bacterias en los caldos de cultivo antes de su liofilización y luego se pesó el liofilizado obtenido después del proceso.

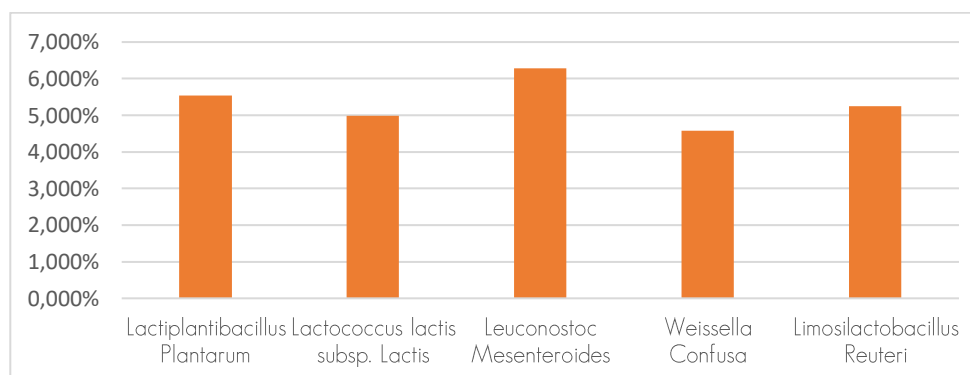
Tabla 19.

Rendimiento de la liofilización de las cinco BAL

Bacterias	R1	R2	R3	Promedio
<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	5,656%	5,421%	5,539%	5,539%
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	5,028%	4,939%	4,984%	4,984%
<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	6,440%	6,126%	6,284%	6,283%
<i>Weissella Confusa</i>	4,345%	4,792%	4,577%	4,571%
<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	5,359%	5,132%	5,246%	5,246%

Figura 4.

Comparación del rendimiento de liofilización de cada bacteria



Nota. El gráfico representa el promedio del rendimiento.

En la Tabla 19 y la Figura 4, se puede observar que 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%.

Viabilidad de la liofilización de BAL

En la evaluación de la viabilidad de la liofilización de las BAL: *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella Confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri*, se comparó la actividad bacteriana antes del proceso de liofilización con la actividad posterior a la reactivación de las bacterias liofilizadas. Para ello, se midió la absorbancia de las bacterias y se sembraron los cultivos bacterianos en placas Petrifilm de BAL.

Tabla 20.

Absorbancia de las BAL antes de la liofilización

Bacterias	M1	M2	M3	Promedio
<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	1,601	1,606	1,604	1,604
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	1,208	1,798	1,503	1,503
<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	2,179	2,470	2,325	2,325
<i>Weissella Confusa</i>	1,157	1,541	1,349	1,349
<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	1,304	1,121	1,213	1,213

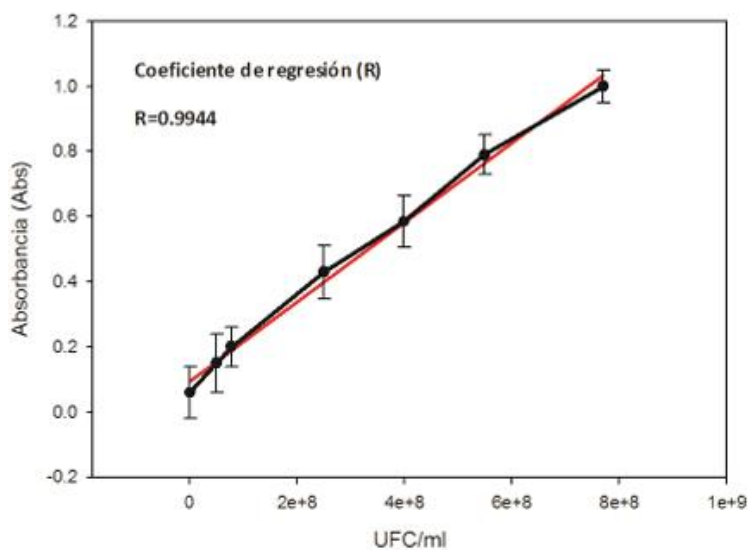
Tabla 21.

Absorbancia de las BAL después de la liofilización

Bacterias	M1	M2	M3	Promedio
<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	0,803	0,863	0,833	0,833
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	0,540	0,601	0,571	0,571
<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	0,840	0,904	0,872	0,872
<i>Weissella Confusa</i>	0,742	0,798	0,770	0,770
<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	0,752	0,827	0,790	0,790

Figura 5.

Curva de calibración Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de *P. fluorescens*. Utilizado como Referencia para el cálculo de concentración de UFC.



Nota. Adaptado de (Diaz, 2011)

A partir de los datos obtenidos de las tablas 20 y 21, que muestran la absorbancia registrada de las bacterias *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella Confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri* antes y después de la liofilización y la Figura 5, que corresponde la curva de calibración de Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de *P. fluorescens* (Diaz, 2011), se calculó la concentración (UFC/ml) a partir del promedio de las 3 mediciones de la absorbancia de cada bacteria.

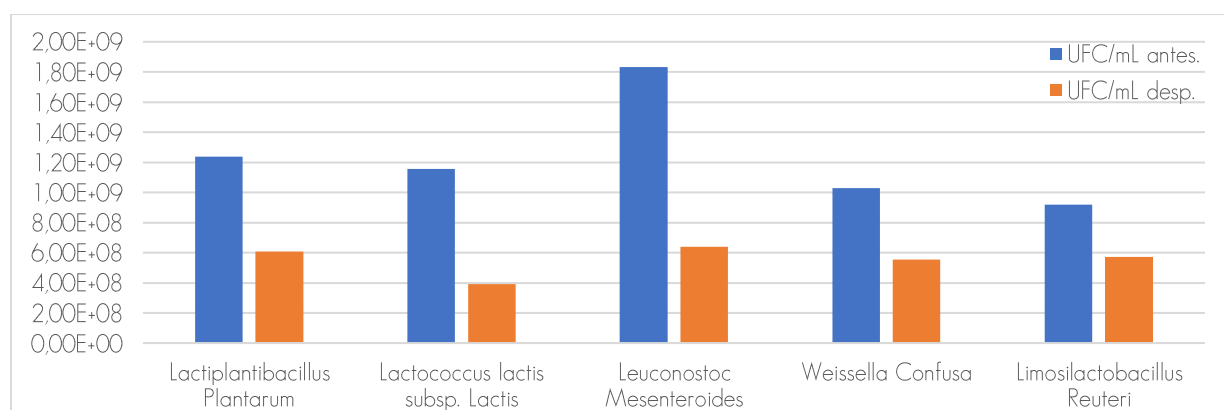
Tabla 22.

Concentración en UFC/mL de las BAL antes y después de la liofilización

Bacterias	UFC/mL antes.	UFC/mL después.
<i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	1,24E+09	6,07E+08
<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	1,16E+09	3,91E+08
<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	1,83E+09	6,39E+08
<i>Weissella Confusa</i>	1,03E+09	5,55E+08
<i>Limosilactobacillus Reuteri</i>	9,18E+08	5,71E+08

Figura 6.

Concentración (UFC/mL) de las bacterias antes y después de la liofilización



En la tabla 22 y la figura 6, se observa que la bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* presentó una mayor actividad bacteriana en comparación con las otras muestras antes y desde del proceso de liofilización. Antes del proceso, tuvo una concentración aproximada de 1.83E+09 UFC/mL, mientras que después del proceso de liofilización y reactivación, su valor fue de 6,39E+08 UFC/mL.

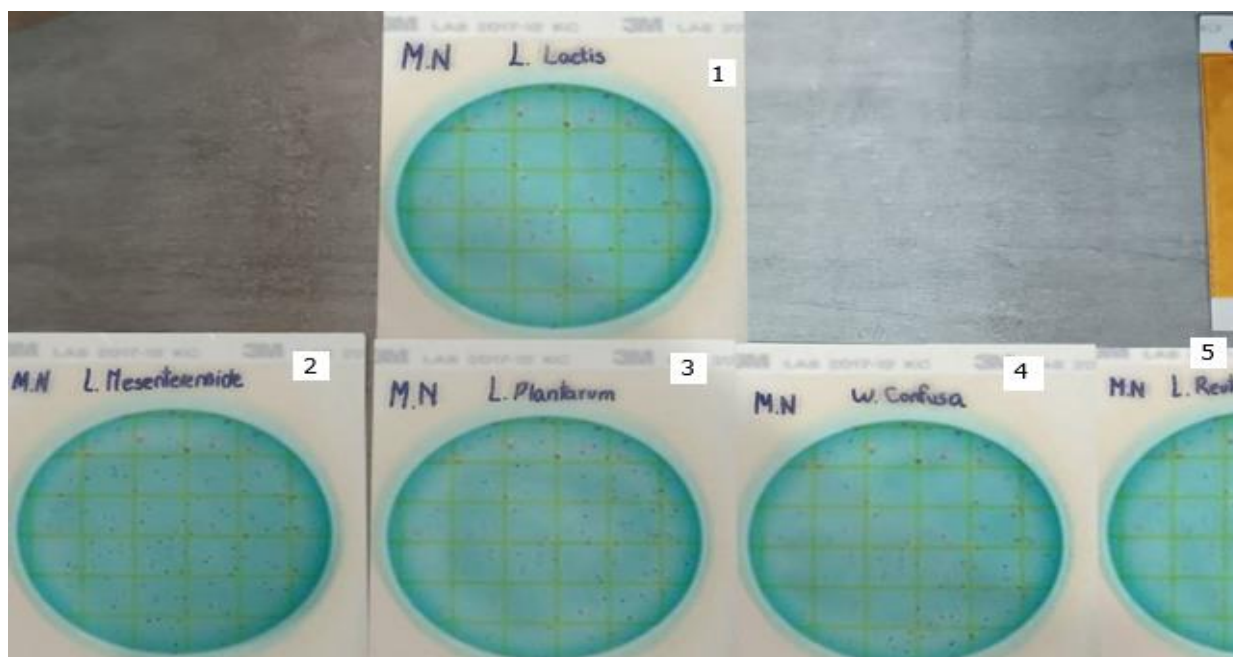
Para evaluar la viabilidad de la liofilización de las BAL, se comparó la concentración inicial de las bacterias en el medio de cultivo líquido, y la concentración final de las bacterias liofilizadas y posteriormente resuspendidas. A partir de esto, se observó una notable disminución en la concentración y, por lo tanto, en la viabilidad bacteriana. Según (Fonseca et al., 2014), la deshidratación puede ocasionar daños permanentes en las células bacterianas, como modificaciones en la estructura

física de los lípidos de membrana y la conformación de las proteínas sensibles, lo que resulta en una notable disminución de la viabilidad bacteriana.

En cuanto al crecimiento bacteriano de las muestras en placas Petrifilm para BAL, se observó la formación de colonias bacterianas en todas las muestras cultivadas (*Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella Confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri*). Además, se determinó que la bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* presentó una mayor formación de colonias bacterianas en comparación con las otras muestras, tanto antes como después del proceso de la liofilización, como se muestra en la figura 7 y 8.

Figura 7.

Crecimiento de colonias en placas Petrifilm para BAL antes de la liofilización



Nota. Bacterias *Lactiplantibacillus Plantarum* (3), *Lactococcus lactis* subsp (1). *Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides* (2), *Weissella Confusa* (4) y *Limosilactobacillus Reuteri* (5)

Figura 8.

Crecimiento de colonias en placas Petrifilm para BAL después de la liofilización

Nota. Bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* resuspendida después de la liofilización

Análisis estadísticos de la bioconservación de productos agrícolas mínimamente procesados (MPF)**Resultados de los parámetros fisicoquímico**

Para evaluar las variables de pH, acidez y %cenizas, se realizó un ANOVA para cada uno de estos.

Tabla 23.

Análisis de varianza para el pH en la bioconservación de MPF

Fuente	SC	Gl	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			

Nota. Los valores en rojo representan la diferencia significativa

En la tabla 23, se puede observar que existió diferencia significativa en el tipo de bacterias ácido lácticas (Factor A) y en los productos agrícolas mínimamente procesados (Factor B), así como en la interacción de estos dos factores (Tipo de bacteria ácido láctica x Productos agrícolas mínimamente

procesados). Mientras que no se observó diferencia significativa en las réplicas, lo que sugiere una normalidad en la toma de los datos.

Tabla 24.

Análisis de varianza para la acidez titulante en la bioconservación de MPF

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			

Nota. Los valores en rojo representar la diferencia significativa

En la tabla 24, se puede observar que existió diferencia significativa en el tipo de bacterias ácido láctica (Factor A) y en las frutas mínimamente procesados (Factor B), así como en la interacción de estos dos factores (Tipo de bacteria ácido láctica x Frutas mínimamente procesados). Mientras que no se observó diferencia significativa en las réplicas, lo que sugiere una normalidad en la toma de los datos.

Tabla 25.

Análisis de varianza para el % de cenizas en la bioconservación de MPF

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			

Nota. Los valores en rojo representar la diferencia significativa

En la tabla 25, se puede observar que existió diferencia significativa en el tipo de bacterias ácido láctica (Factor A) y en los productos agrícolas mínimamente procesados (Factor B), así como en la interacción de estos dos factores (Tipo de bacteria ácido láctica x Productos agrícolas mínimamente

procesados). Mientras que no se observó diferencia significativa en las réplicas, lo que sugiere una normalidad en la toma de los datos.

Resultados de la comparación de las 5 BAL (Tukey $p < 0.05$) para los parámetros fisicoquímicos

En el análisis de los resultados se realizaron las pruebas de significancia de Tukey de las variables fisicoquímicas (pH, % de acidez y % de cenizas) para las bacterias *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri* (Factor A).

Tabla 26.

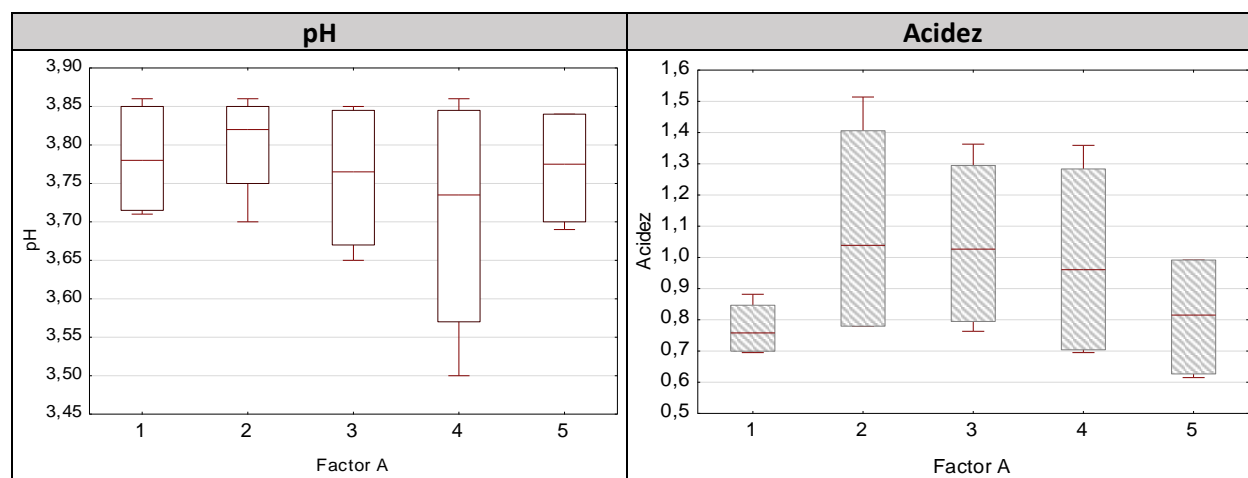
Prueba de significancia de Tukey del Factor A: Tipo de BAL

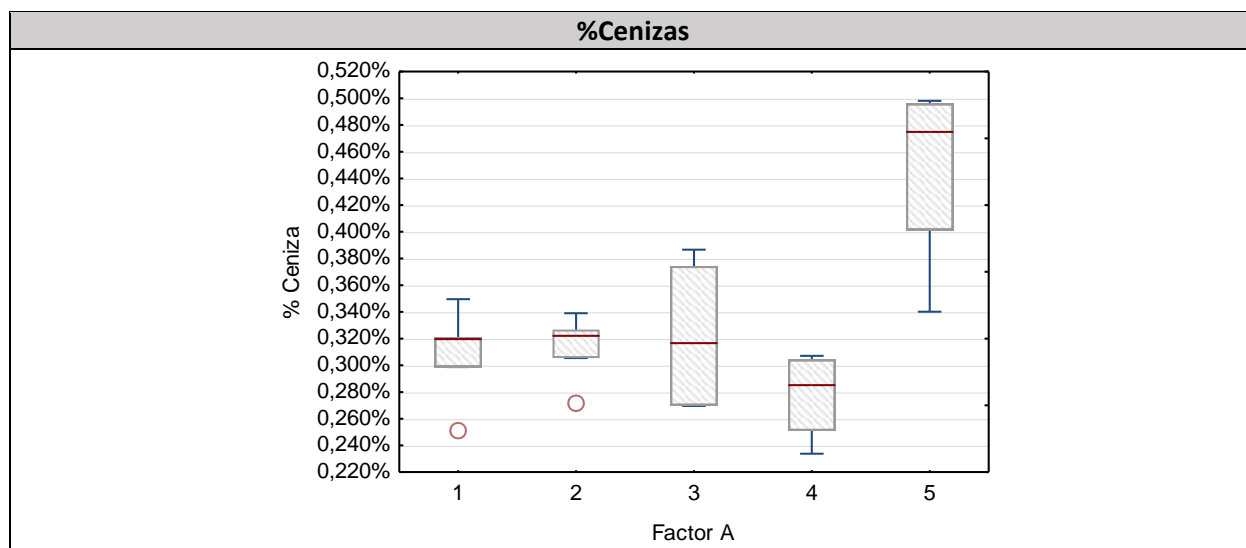
Factor A: Tipo de BAL	pH	%Acidez	%Cenizas
A0: <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i>	3,783 a	0,773 a	0,310% a
A1: <i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	3,800 a	1,093 c	0,315% a
A2: <i>Leuconostoc Mesenteroides</i>	3,758 ab	1,045 b	0,322% a
A3: <i>Weissella Confusa</i>	3,708 b	0,994 b	0,278% a
A4: <i>Limosilactobacillus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

Figura 9.

Prueba de significación de Tukey de las variables fisicoquímicos para el Factor A: Tipos de BAL





En lo que respecta a la tabla 26 correspondiente a la prueba de significancia de Tukey se observa diferencia significativa en las bacterias ácido lácticas (Factor A). En cuanto al pH, se identifican 2 grupos independientes: el grupo a (*Lactiplantibacillus Plantarum* (A0), *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (A1), *Leuconostoc Mesenteroides* (A2) y *Limosilactobacillus Reuteri* (A4)) y el grupo b (*Leuconostoc mesenteroides* (A2) y *Weissella confusa* (A3)). El grupo b mostró los valores más bajos de pH, registrando 3,708 (A3) y 3,758 (A2), mientras que el grupo a presentó valores ligeramente más altos con 3,770 (A4), 3,783 (A0) y 3,800 (A1). Estos resultados son consistentes con lo mencionado por (Ibarra, 2007), quien señala que las BAL se desarrollan en un rango de pH de 3.2 a 4.5. Estos bajos valores de pH se atribuyen al ácido láctico, el cual se encuentra en mayor cantidad en su forma no disociada en pH bajos. Esta forma no disociada exhibe propiedades tóxicas para muchas bacterias, hongos y levaduras, lo que genera un efecto antagonista microbiano.

Respecto a la acidez titulable, se establecieron 3 grupos independientes: grupo a (*Lactiplantibacillus plantarum* (A0) y *Limosilactobacillus Reuteri* (A4)), grupo b (*Leuconostoc Mesenteroides* (A2) y *Weissella Confusa* (A3)) y grupo C (*Lactococcus lactis subsp. Lactis* (A1)). En el grupo a, se observó un menor % de acidez con 0,773 (A0) y 0,809 (A4), seguido por el grupo b con 0,994 (A3) y 1,045 (A2), mientras que el grupo c mostró el mayor valor, con 1,093 (A1). Estas variaciones en la

acidez se atribuyen a la producción de ácido láctico, el cual, según (Melia et al., 2021), se origina a partir de la hidrólisis de la lactosa durante la fermentación, siendo el primer metabolito generado por las BAL.

En cuanto al % de cenizas, se establecieron 2 grupos independientes: grupo a (*Weissella Confusa* (A3), *Lactiplantibacillus Plantarum* (A0), *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (A1) y *Leuconostoc Mesenteroides* (A2)) y grupo b (*Limosilactobacillus Reuteri* (A4)). En el grupo a, se observó % de cenizas de 0,278 (A3), 0,310 (A0), 0,315 (A1) y 0,322 (A2), mientras que para el grupo b mostró el mayor valor, con 0,448 (A4). Según estos valores, se encuentran dentro del rango establecido para el % de cenizas en 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).

Tabla 27.

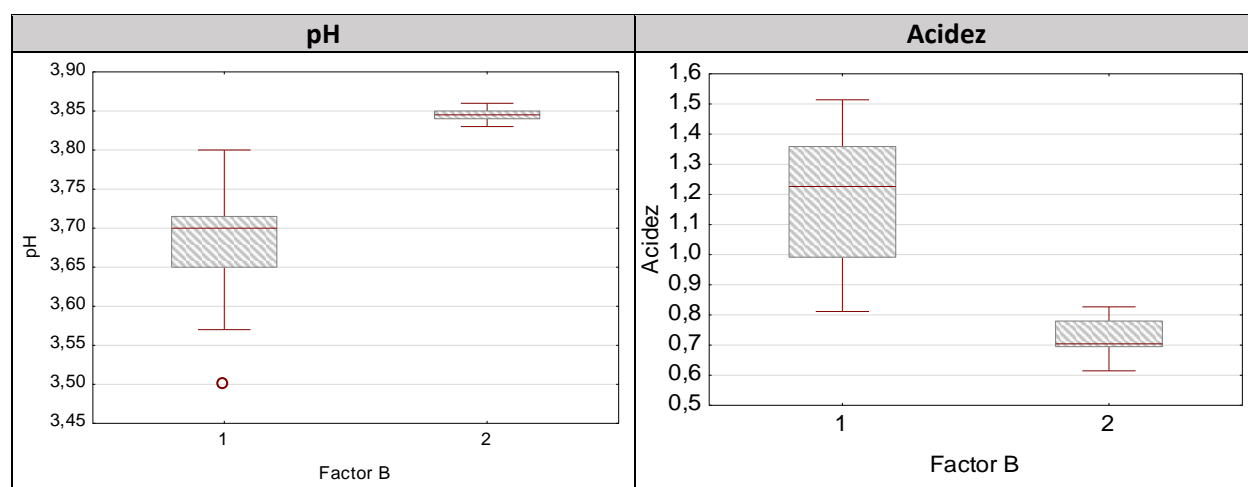
Prueba de significancia de Tukey del Factor B: MPF

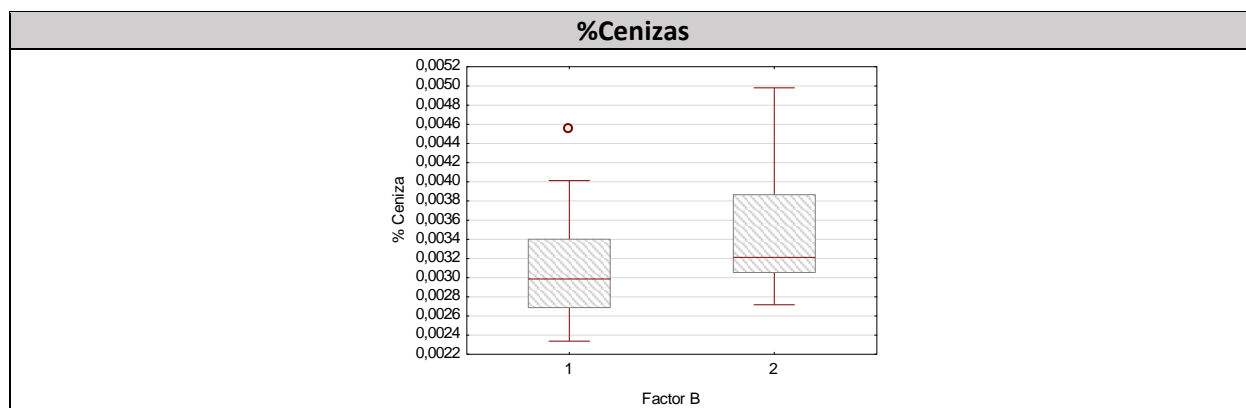
Factor B: MPF	pH	%Acidez	%Cenizas
B0: Arándano	3,681 a	1,164 b	0,309% a
B1: Uva	3,846 b	0,72 a	0,360% b

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

Figura 10.

Prueba de significación de Tukey de las variables fisicoquímicas para el Factor B: MPF





En la tabla 27, correspondiente al Factor B (MPF) se observa diferencia significativa. En cuanto al parámetro de pH, se identificaron 2 grupos. El grupo a: (B0) Arándano mostró el pH más bajo con una media de 3,681, y el grupo b: (B1) Uva presentó el pH más alto con una media de 3,846. Basado en los resultados obtenidos, el pH de los arándanos (3,681) se encuentra por encima del rango reportado (Sapers et al., 1984) para bayas maduras, que va de 2,85 a 3,49. Por otro lado, el pH de las uvas (3,846), superó el rango de 3,14 a 3,49 correspondiente a las frutas hasta 47 días de maduración (Ausejo, 2019). Según (Colombo et al., 2021), el aumento del pH de las bayas se debió a la maduración de estas.

Con respecto a la acidez titulable, se establecieron 2 grupos. El grupo a: (B1) Uva y el grupo b: (B0) Arándano. Se observó que la acidez de los arándanos dio como resultado 1,164%, comparable con la acidez de bayas maduras que oscila entre 0,4% y 1,31%, considerando el ácido cítrico predominante en la fruta (Sapers et al., 1984). Mientras que, para las uvas se registró un % de acidez de 0,721 con respecto al ácido tartárico. Según (Jayasena & Cameron, 2008) este valor se encuentra dentro del rango que varía entre el 0,51 y 0,88 %.

Por otro lado, en el % de ceniza se establecieron 2 grupos. El grupo a: (B0) Arandano y el grupo b: (B1) Uva. El % de cenizas en los arándanos fue de 0,309, mientras que para las uvas fue de 0,360. Estos valores se sitúan dentro de los rangos reportados, para los arándanos de entre 0,12% (Lazarte Bedoya, 2018) a 0,81% (USDA, 2022) y para las uvas de 0,3% a 0,5% según (Kamil Alsaed, 1996).

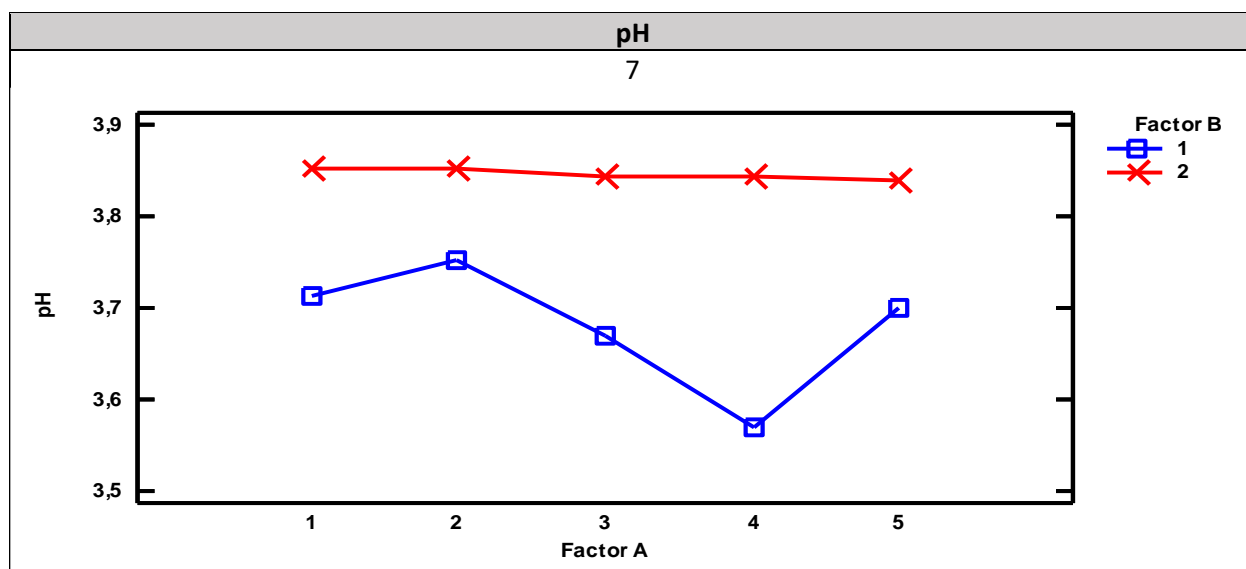
Tabla 28.

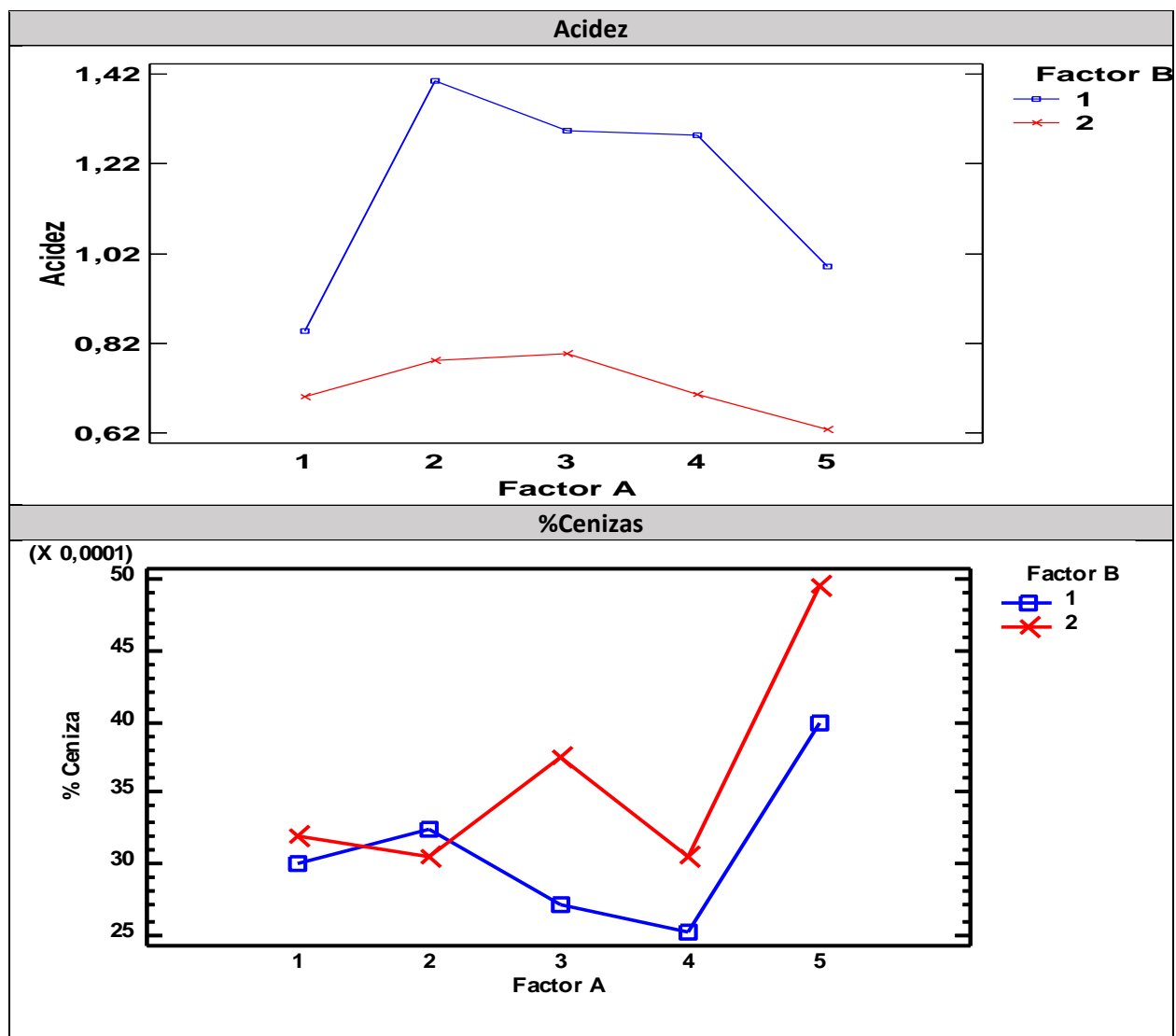
Prueba de significancia de Tukey de la interacción AB (Tipo de BAL x MPF)

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

Figura 11.

Prueba de significación de Tukey de las variables fisicoquímicos para la Interacción AB





En la tabla 28, que corresponde a la interacción AB (Tipo de bacteria ácido láctico x Productos agrícolas mínimamente procesados) y su efecto en los parámetros de pH, acidez titulable y % de cenizas, se observó una diferencia significativa y se formaron los respectivos grupos. Para el pH, se determinó que en el grupo a (*Lactiplantibacillus Plantarum* + Uva (A0B1), *Lactococcus lactis subsp. Lactis* + Uva (A1B1), *Leuconostoc Mesenteroides* + Uva (A1B1), *Weissella Confusa* + Uva (A3B1) y *Limosilactobacillus Reuteri* + Uva (A4B1)), el tratamiento (A1B1) *Lactococcus lactis subsp. Lactis* + Uva presentó el mayor pH, con una media de 3,85. Mientras que en el grupo c: (A3B0) *Weissella Confusa* + Arándano presentó el menor pH, siendo este de 3,57. En cuanto a la acidez titulable, en el grupo a (*Limosilactobacillus*

Reuteri + Uva(A4B1), *Lactiplantibacillus Plantarum* + Uva (A0B1), *Weissella Confusa* + Uva (A3B1)), el tratamiento (A4B1) *Limosilactobacillus Reuteri* + Uva presento la menor acidez, con un valor de 0,627. Mientras que en el grupo e (*Weissella Confusa* + Arándano (A3B0), *Leuconostoc Mesenteroides* + Arándano (A2B0), *Lactococcus lactis subsp. Lactis* + Arándano (A1B0)), el tratamiento (A1B0) *Lactococcus lactis subsp. Lactis* + Arándano, obtuvo el mayor valor con 1,406. Mientras que en él % de ceniza, en el grupo a: ((A3B0) *Weissella Confusa* + Arándano, (A2B0) *Leuconostoc Mesenteroides* + Arándano, (A0B0) *Lactiplantibacillus Plantarum* + Arándano, (A3B1) *Weissella Confusa* + Uva, (A1B1) *Lactococcus lactis subsp. Lactis* + Uva, (A0B1) *Lactiplantibacillus Plantarum* + Uva y (A1B0) *Lactococcus lactis subsp. Lactis* + Arándano), el tratamiento (A3B0) *Weissella Confusa* + Arándano, obtuvo el menor valor con 0,251% de cenizas, mientras que en el grupo d el tratamiento (A4B1) *Limosilactobacillus Reuteri* + Uva registró el mayor valor con 0,496% de cenizas.

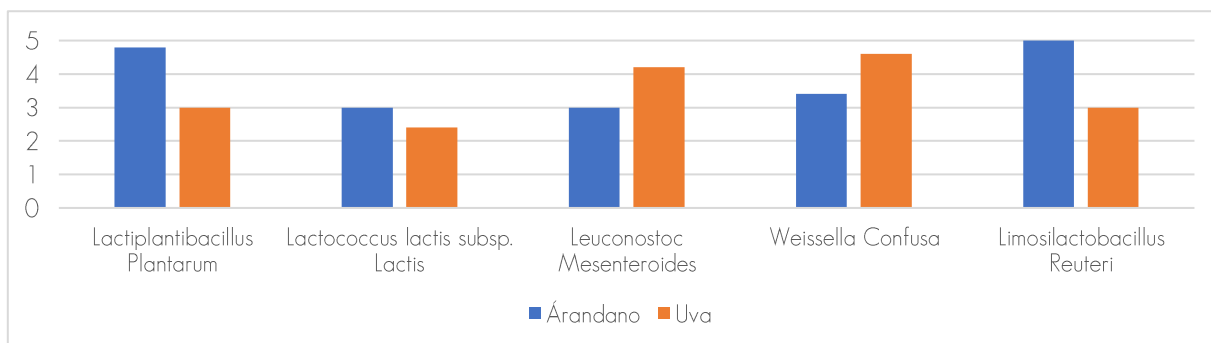
Se seleccionaron los mejores tratamientos en base a los resultados obtenidos de los parámetros de acidez y cenizas. En el caso de los arándanos, se seleccionó el tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0), con una acidez de 0,992% y 0,399% de cenizas. En el caso de las uvas, se seleccionó 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.

Análisis sensorial

Olor

Figura 12.

Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Olor)



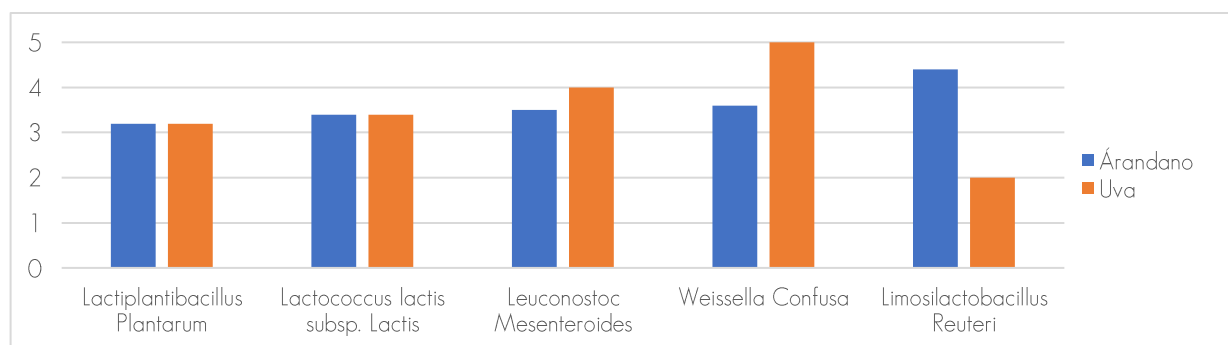
Nota. Gráfico de comparación de medias

En cuanto la figura 12, correspondiente al olor, se observa la interacción entre las bacterias ácido lácticas (Factor A) y el tipo de fruta: arándano (Factor B0) y uva (Factor B1). Respecto al arándano, el tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0) obtuvo una mayor puntuación en comparación con los otros tratamientos. Por otro lado, para la uva, el mejor tratamiento fue *Weissella Confusa* + uva (A3B1), con una mayor puntuación en comparación con los otros tratamientos.

Sabor

Figura 13.

Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Sabor)



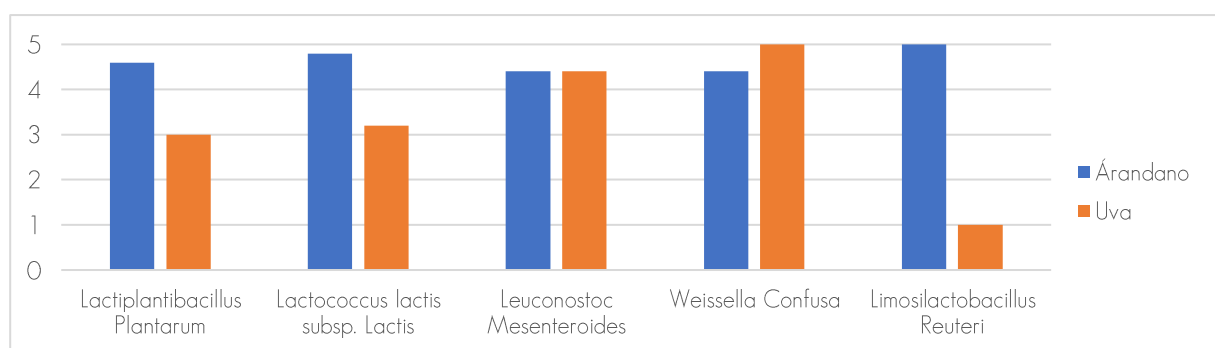
Nota. Gráfico de comparación de medias

De acuerdo con la figura 13, correspondiente al sabor, se observa la interacción entre las bacterias ácido lácticas (Factor A) y el tipo de fruta: arándano (Factor B0) y uva (Factor B1). Respecto al arándano, el tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0) presentó valores más altos en comparación con los otros tratamientos. Mientras que, para la uva, el mejor tratamiento fue *Weissella Confusa* + uva (A3B1).

Textura

Figura 14.

Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Textura)



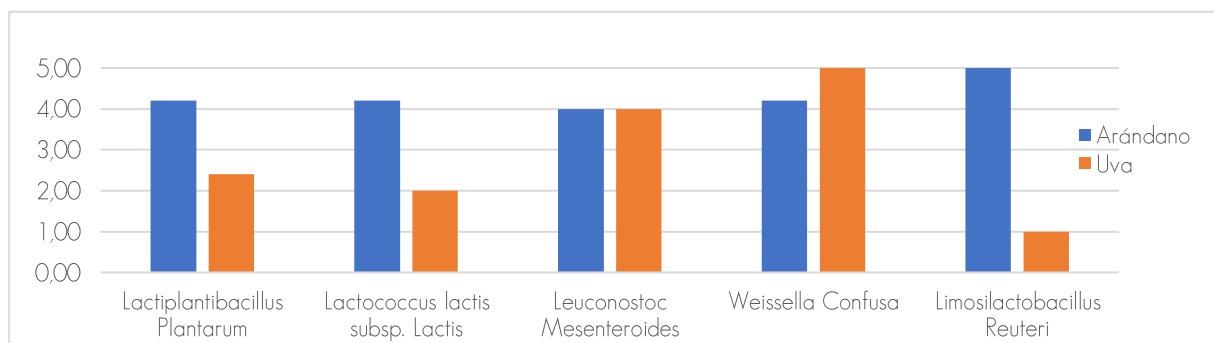
Nota. Gráfico de comparación de medias

De acuerdo con la figura 14, correspondiente a la textura, se observa la interacción entre las bacterias ácido lácticas (Factor A) y el tipo de fruta: arándano (Factor B0) y uva (Factor B1). Respecto al arándano, el tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0) obtuvo valores más altos en comparación con los otros tratamientos. Mientras que, para la uva, el tratamiento fue *Weissella Confusa* + uva (A3B1) obtuvo valores más altos.

Color

Figura 15.

Comparación del análisis sensorial de las frutas con los diferentes tratamientos (Color)



Nota. Gráfico de comparación de medias

De acuerdo con la figura 15, correspondiente al color, se observa la interacción entre las bacterias ácido lácticas (Factor A) y el tipo de fruta: arándano (Factor B0) y uva (Factor B1). Respecto al arándano, el tratamiento *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0) obtuvo valores más altos en comparación con los otros tratamientos. Mientras que, para la uva, el tratamiento fue *Weissella Confusa* + uva (A3B1) obtuvo valores más altos.

La experiencia multisensorial de un producto alimenticio está asociada a varios factores, tanto los factores intrínsecos y extrínsecos del alimento, como su valor interno y los factores externos, como envoltura o apariencia, pueden desempeñar un papel en la percepción de los alimentos y esto, a su vez, determina nuestra aceptación de los alimentos que se seleccionan para el consumo (Nanjundappa y otros, 2023).

Análisis de componentes principales

Tabla 29.

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

La Tabla 29 presenta el análisis de componentes principales realizado utilizando los parámetros fisicoquímicos (pH, la acidez y el % de cenizas) y los parámetros sensoriales (olor, color, sabor y textura).

A partir de este análisis, 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.

Tabla 30.

Porcentajes de la varianza total explicada

Componente	Total	Autovalores iniciales	
		% de varianza	% acumulado
1	3,437	49,105	49,105
2	1,741	24,869	73,974
3	0,973	13,903	87,877
4	0,411	5,877	93,754
5	0,291	4,151	97,906
6	0,107	1,528	99,433
7	0,040	0,567	100,000

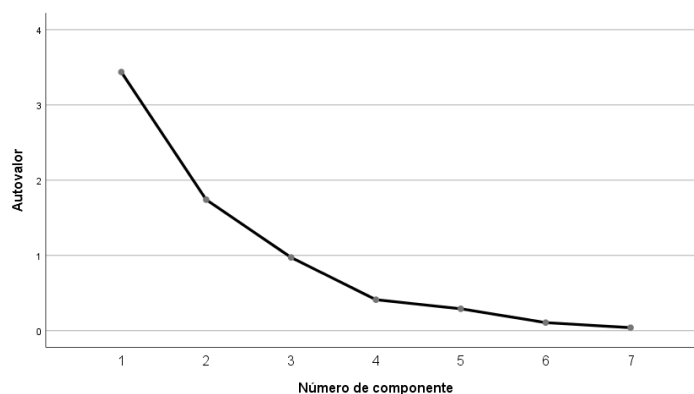
Nota. Método de extracción: análisis de componentes principales.

En la tabla 30 se puede observar los porcentajes de varianza de los 7 componentes, de los cuales solo dos componentes presentan un autovalor mayor que 1 y un componente con un valor cercano. El

componente 1 presenta mayor variabilidad y un mayor porcentaje de varianza, teniendo un valor de 49,105, seguido del componente 2 con un valor de 24,869 y el componente 3 con un valor de 13,903, dando un total acumulado del 87,877%. Es decir que estos 3 componentes aportan la mayor parte de información de los datos proporcionados.

Figura 16.

Gráfico de sedimentación de los componentes principales



En la figura 16, que representa la sedimentación de los componentes principales, se puede observar que de los 7 componentes principales, solo 3 está contribuyendo significativamente a la variabilidad de los datos, con un autovalor de 3,437, 1,741 y 0,973 respectivamente.

Tabla 31.

Matriz de componentes rotados mediante Quartimax

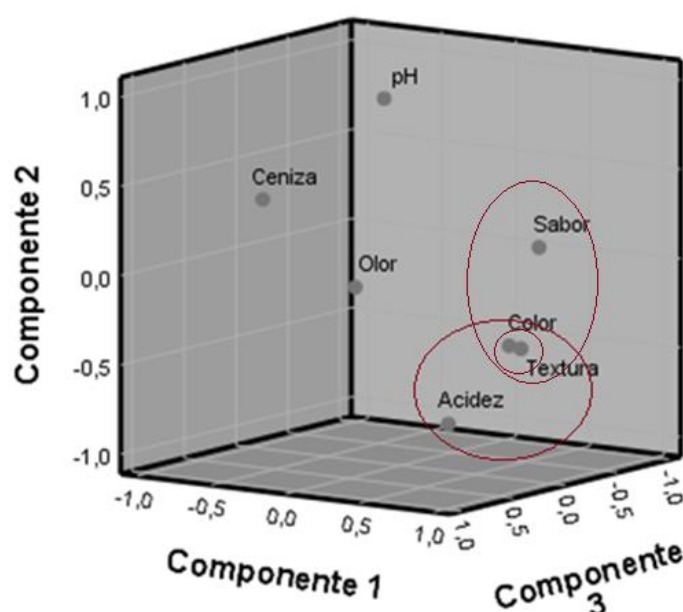
Rotación a	Componente		
	1	2	3
pH	-0,163	0,917	-0,072
Acidez	0,170	-0,894	-0,216
% Ceniza	-0,526	0,409	0,578
olor	0,322	0,049	0,896
sabor	0,915	0,199	-0,024
textura	0,870	-0,357	0,085
color	0,891	-0,319	0,228

Nota. a. La rotación ha convergido en 4 iteraciones.

En la tabla 31, se pudo observar que los parámetros del sabor, textura y color presentan una mayor carga en el componente 1, demostrando de esta manera una asociación fuerte con este componente. En cuanto al componente 2, solo los parámetros del pH y la acidez poseen una alta carga, mientras que el componente 3, solo el parámetro del olor posee una alta carga y una fuerte asociación con este.

Figura 17.

Gráfico de componentes en espacio rotado mediante Quartimax



La figura 17 muestra la relación que existen entre las 7 variables y los 3 componentes, en el cual en el componente 1 se observa 2 grupos positivos y negativos relacionados, en el cual el sabor, el color y la textura, siendo el grupo del color y la textura el de mayor correlación, mientras que en el componente 3, se encontró un grupo positivo relacionado, en el cual la acidez, el color y la textura tienen una correlación. El color es influenciado por los pigmentos naturales de las frutas y verduras, muchos de los cuales cambian a medida que la planta avanza en su proceso de maduración, mientras que la textura está relacionada con la presión de turgencia y la composición de las paredes celulares de las plantas

individuales, las cuales tienden a degradarse con la maduración. De manera similar, el sabor es un factor que se intensifica con el proceso de maduración (Barrett y otros, 2010).

Con respecto al componente 2 no se encontró correlación. Además se puede observar que la acidez y pH representan una correlación negativa en el componente 3, cuyos valores representan una relación inversamente proporcional, es decir, que mientras el pH tiende a aumentar, la acidez tiende a disminuir, por esta razón esas variables se encuentran en extremos opuestos en este componente. La acidez titulable se refiere a la cantidad de ácidos orgánicos presentes en la fruta, y disminuye a medida que está madura, por otro lado, el pH, el contenido de sólidos solubles, la relación SS/AT y el peso de la baya aumentan durante el proceso de maduración. Esta disminución en la acidez titulable se debe a la conversión de ácidos orgánicos en azúcares a través de la gluconeogénesis, lo que se confirma mediante la relación inversa entre el pH y la acidez titulable (García-Pacheco & Cabrera, 2023).

Análisis microbiológico

En cuanto al análisis microbiológico, se eligió los mejores tratamientos previamente analizados, por medio de sus parámetros fisicoquímicos y sensoriales. A partir de estos se eligió los tratamientos *Limosilactobacillus Reuteri* + arándano (A4B0) y *Weissella Confusa* + uva (A3B1). Como resultado del cultivo en placas Petrifiml de *Enterobacterias*, Coliformes totales, *Salmonella* y *Escherichia coli* se obtuvo lo siguiente:

Figura 18.

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



Nota. La figura muestra los cultivos realizados en Petrifiml para diferentes microorganismos.

En la figura 18, se pudo observar que no hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las placas de cultivo, lo que sugiere el efecto antimicrobiano del *Limosilactobacillus Reuteri*. Este efecto contribuye a proteger el producto de la contaminación y a mantenerlo fresco durante el proceso de conservación.

Figura 19.

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



Nota. La figura muestra los cultivos realizados en Petrifiml para diferentes microorganismos.

De igual manera, en la figura 19, que corresponde al tratamiento *Weissella Confusa* + uva (A3B1), se pudo observar que tampoco hubo crecimiento bacteriano en ninguna de las placas de cultivo. Este resultado sugiere el efecto antimicrobiano que posee *Weissella Confusa*, el cual contribuye a proteger el producto de la contaminación y a mantenerlo fresco durante el proceso de conservación. Esto se debe a que las bacterias del ácido láctico suelen exhibir la capacidad de inhibir otros microorganismos, lo que les permite mejorar continuamente la seguridad y calidad de diversos productos alimenticios. Estas bacterias producen bacteriocinas, proteínas naturales de calidad alimentaria que son ampliamente aceptadas y utilizadas en la conservación de alimentos (Akbar y otros, 2016).

Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

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

En cuanto a la eficacia de la conservación de los 5 tipos de BAL: *Lactiplantibacillus Plantarum*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Leuconostoc Mesenteroides*, *Weissella confusa* y *Limosilactobacillus Reuteri* mediante el método de liofilización, los resultados demostraron que la bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* obtuvo el mayor rendimiento con un valor de 6,283%, mientras que *Weissella Confusa* presentó el menor rendimiento, con un valor de 4,571%. Además, se observó que la bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* tuvo mayor actividad bacteriana en comparación con las otras muestras, tanto antes como después del proceso de liofilización, con una concentración inicial aproximada de $1.83E+09$ UFC/mL y una concentración final de $6,39E+08$ después del proceso de liofilización y reactivación, así como una mayor formación de colonias bacterianas en comparación con las otras muestras. Estos resultados demuestran la capacidad de *Leuconostoc Mesenteroides* para mantener su viabilidad incluso después de la liofilización.

Respecto al Factor A (Tipos de BAL)

Los resultados del análisis del efecto de la aplicación de las BAL conservadas mediante liofilización para la bioprotección de productos agrícolas mínimamente procesados (MPF) muestran un impacto positivo en la conservación de los arándanos y las uvas. Se observó una reducción significativa en la carga microbiana y una prolongación en la vida útil de las frutas, las cuales mantuvieron sus características organolépticas después de 10 días de almacenamiento tras la aplicación de las soluciones bacterianas.

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 bajos de pH son óptimos para que las BAL actúen como bioconservante.

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%.

En base a los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el tipo de BAL si influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

Respecto al Factor B (MPF)

En base a los distintos análisis físico-químicos realizados a las frutas durante los 10 días de bioconservación, se determinó que 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.

Con base en los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el tipo de fruta influye en la eficacia de la bioconservación con bacterias ácido lácticas liofilizadas.

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

Mediante los análisis de pH, porcentaje de acidez y de cenizas, se determinó que 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%). Mientras que para las uvas, el tratamiento más adecuado fue *Weissella Confusa* + uva (A3B1), con valores similares de pH (3,845), acidez (0,704%) y cenizas (0,304%). Además, los análisis microbiológicos realizados demostraron la ausencia de crecimiento de microorganismos como Enterobacterias, Coliformes totales, *Salmonella* y *Escherichia coli* en los cultivos

derivados de los tratamientos seleccionados. Asimismo, los análisis sensoriales confirmaron que los tratamientos conservaron un buen sabor, olor, textura y color de las frutas.

En base a los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el efecto de las interacciones entre el tipo de bacteria ácido láctica liofilizada y el tipo de fruta influye en la bioconservación.

Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos, en cuanto a la factibilidad y viabilidad de la conservación de los 5 tipos de BAL mediante liofilización, se recomienda el uso de la bacteria *Leuconostoc Mesenteroides* para la liofilización, dado que demostró el mayor rendimiento y actividad bacteriana.

Basándose en los hallazgos sobre la efectividad de diferentes tratamientos para arándanos y uvas en términos de pH, acidez, contenido de cenizas y seguridad microbiológica, se recomienda utilizar las bacterias *Limosilactobacillus Reuteri* y *Weissella Confusa* para su aplicación como bioconservantes en frutas mínimamente procesadas (MPF).

Referencias bibliográficas

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects. *Microorganisms*, 8(6), 952.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
- Akbar, A., Ali, I., & Anal, A. (2016). INDUSTRIAL PERSPECTIVES OF LACTIC ACID BACTERIA FOR BIOPRESERVATION AND FOOD SAFETY. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 938-948.
<https://www.thejaps.org.pk/docs/v-26-04/09.pdf>
- Alegre Vilas, I., Abadias Seró, M., Colás Medà, P., Collazo Cordero, C., & Viñas Almenar, I. (2020). Bioconservación frente a patógenos de transmisión alimentaria en frutas y hortalizas mínimamente procesadas. *Arbor*, 196(795), 543. <https://doi.org/10.3989/arbor.2020.795n1007>
- Ausejo, M. P. (2019). *Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Burgos].
https://riubu.ubu.es/bitstream/handle/10259/5121/Perez_Ausejo.pdf;jsessionid=BD81F081CACD6616BC776796B710F3F9?sequence=1
- Barbosa, M. S., Jurkiewicz, C., Landgraf, M., Todorov, S. D., & Franco, B. D. (2018). Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in foods during storage at 4 °C: Tests in food models. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie [Food science and technology]*, 95, 167-171.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.082>
- Barrett, D., Beaulieu, J., & Shewfelt, R. (2010). Color, Flavor, Texture, and Nutritional Quality of Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Desirable Levels, Instrumental and Sensory Measurement, and the Effects of Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(5), 369-389.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/10408391003626322>

- Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in life sciences*, 12(4), 419-432.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201100127>
- Carranza Concha, J. (2009). *Influencia del procesado en el valor*. [Tesis de Doctorado, Universidad Politecnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/6960/tesisUPV3198.pdf>
- Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International dairy journal*, 14(10), 835-847.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.001>
- Catalogue of Life (COL)*, <https://www.catalogueoflife.org/data/browse>. (24 de enero de 2024).
<https://www.catalogueoflife.org/data/browse>
- Colombo, R. C., Roberto, S. R., da Cruz, M. A., de Carvalho, D. U., Yamamoto, L. Y., Nixdorf, S. L., Pérez-Navarro, J., Gómez-Alonso, S., Shahab, M., Ahmed, S., & Gonçalves, L. S. (2021). Characterization of the phenolic ripening development of 'BRS Vitoria' seedless table grapes using HPLC–DAD–ESI-MS/MS. *Journal of food composition and analysis: an official publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 95(103693), 103693.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103693>
- De Corato, U. (2020). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(6), 940-975. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1553025>
- Díaz, C. (2011). Caracterización Microbiológica. En C. Díaz, *Adherencia y colonización de Pseudomonas fluorescens sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie* (págs. 99-112). Universidad Nacional de La Plata (UNLP).
<https://doi.org/https://doi.org/10.35537/10915/2685>

- Edward, V. A., Huch, M., Dortu, C., Thonart, P., Egounlety, M., Van Zyl, P. J., Singh, S., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. (2011). Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food control*, 22(3-4), 389-395.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.008>
- Fernandez Lichame, A., & Romero Paucar, J. (2020). *Evolución de las bacterias ácido lácticas durante la elaboración del tococh fresco, aislamiento y concentración por liofilización*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional del Centro del Perú]. Repositorio Institucional.
https://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/6774/T010_47600005_T.pdf?sequence=1
- Fonseca, F., Cenard, S., & Passot, S. (2014). Freeze-Drying of Lactic Acid Bacteria. *Methods in Molecular Biology*, 1257, 477- 488. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_24
- Fuochi, V., Emma, R., & Furneri, P. M. (2021). Bacteriocins, A natural weapon against bacterial contamination for greater safety and preservation of food: A review. *Current pharmaceutical biotechnology*, 22(2), 216-231. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200704145427>
- García Gargatt, N. N., & Alejandro Santos, Y. M. (2021). *Aceptabilidad y actividad antioxidante de jalea de betarraga (beta vulgaris), arándanos (vaccinium myrtillus) y cúrcuma (curcuma longa), fortificado con omega- 3*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Jose Faustino Sánchez Carrión].
<https://doi.org/https://repositorio.unjfsc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14067/5093/ALEJANDRO%20y%20Garc%c3%ada.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García Ibarra, J. A. (2007). *Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. Repositorio Institucional.

- Garcia-Pacheco, Y., & Cabrera, D. (2023). Determinación de los grados de maduración de la ciruela (*Spondias purpurea* L.) cultivada en Baranoa-Colombia. *Prospectiva*, 21(1), 7-13.
<https://doi.org/https://doi.org/10.15665/rp.v21i1.2971>
- Grauer Liurner, A., Grunberg Eskenazi, K., & Zardo Vila, S. I. (2015). *Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos*. [Trabajo Final de Carrera, Universidad ORT Uruguay]. Repositorio Institucional. <https://sisbibliotecas.ort.edu.uy/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=81392/file/1920>
- He, F., Mu, L., Yan, G.-L., Liang, N.-N., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 9057-9091. <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>
- Huang, L., Lu, Z., Yuan, Y., Lü, F., & Bie, X. (2006). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on response surface methodology. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 33(1), 55-61.
<https://doi.org/10.1007/s10295-005-0041-8>
- Ibarra, J. A. (2007). *Identificación de bacterias ácido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]. Repositorio Institucional.
- Información Taxonómica Integrada Base de datos en línea del Sistema (ITIS)*, www.itis.gov, CCO <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>. (27 de Febrero de 2024).
- Jayasena, V., & Cameron, I. (2008). °brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of Crimson Seedless table grapes. *Journal of food quality*, 31(6), 736-750.
- Kamil Alsaed, A. (1996). Physico-chemical properties of some grape cultivars grown in Jordan. *Dirasat, Agricultural Sciences*, 24(1), 47-52. https://www.researchgate.net/profile/Ali-Alsaed-2/publication/293175257_32_Yousif_A_K_Physico-

chemical_properties_of_some_grape_cultivars_grown_in_Jordan_Dirasat_Agricultural_Sciences
_24_1_47-52_1997/links/56c166e108aee5caccf684a2/32-Yousif-A-K-Physico-ch

Kraft, T. F., Schmidt, B. M., Yousef, G. G., Knight, C. T., Cuendet, M., Kang, Y.-H., Pezzuto, J. M., Seigler, D. S., & Lila, M. A. (2006). Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *70*(3), S159-S166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07151.x>

Lazarte Bedoya, R. R. (2018). *Determinación de parámetros tecnológicos para la obtención de una jalea de arándanos (vaccinium cormbosum), edulcorada con miel de abeja*. [Tesis de Pregrado, Universidad Católica de Santa María], Repositorio Institucional. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/7456>

Martínez, B., García, P., & Rodríguez, A. (2019). Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, *56*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.007>

Melia, S., Juliyarsi, I., Kurnia, Y. F., Pratama, Y. E., & Azahra, H. (2021). Examination of Titratable Acidity, pH, Total Lactic Acid Bacteria and Sensory Properties in Whey Fermented with Probiotic *Pediococcus acidilactic* BK01. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, *10*(1), 114-119. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2022/10.1.114.119>

Nanjundappa, N., Umadevi, B., Jayasimha, R., & Thennarasu, K. (2023). The influence of color on taste perception. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, *13*(9), 1945-1951. <https://doi.org/https://doi.org/10.5455/njppp.2023.13.02083202316022023>

O'Bryan, C. A., Koo, O. K., Sostrin, M. L., Ricke, S. C., Crandall, P. G., & Johnson, M. G. (2018). Characteristics of bacteriocins and use as food antimicrobials in the United States. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis* (pp. 273-286). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811835-1.00015-4>

Perry, S. F. (1998). Freeze-drying and cryopreservation of bacteria. *Molecular biotechnology*, 9(1), 59-64.

<https://doi.org/10.1007/bf02752697>

Rodríguez Villanueva, G. L. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyaca)*. [Trabajo de Grado, Universidad de la Salle]. Repositorio institucional.

<https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1161&context=zootecnia>

Rodríguez Zamora, L. M. (2003). *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero*. [Tesis de Doctorado, Universitat de Girona].

<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/7925/TlZr.pdf?sequence=4>

Sapers, G. M., Burgher, A. M., Phillips, J. G., Jones, S. B., & Stone, E. G. (1984). Color and composition of highbush blueberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science*, 109(1), 105-111. <https://doi.org/10.21273/jashs.109.1.105>

USDA. (2022, 10 28). *U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2346411/nutrients>