



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA

“Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional.

Autora: Bosquez Zambrano, Johanna Carolina

Directora: PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

Santo Domingo, 2024



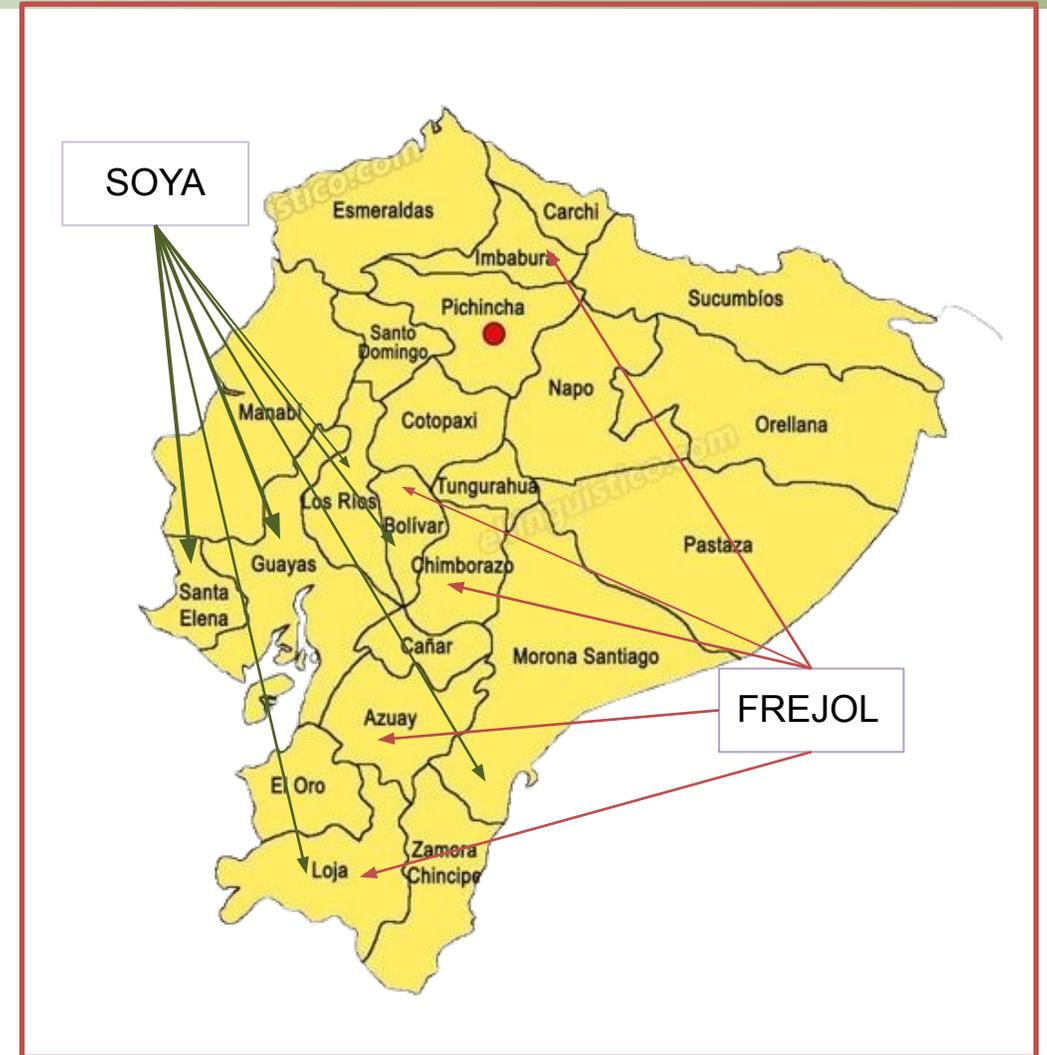
INTRODUCCIÓN

Leguminosas cumplen un papel fundamental en la dieta y la agricultura. Destacándose por su valor nutricional ya que aportan minerales, proteínas y fibras (Margier, et al., 2018).

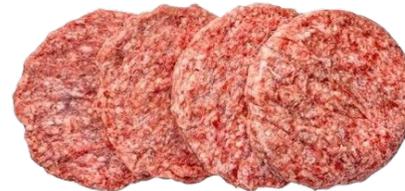
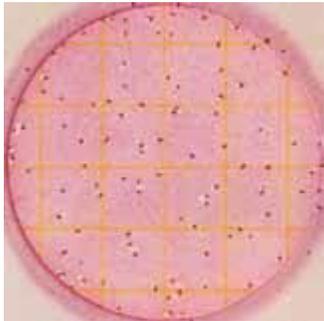
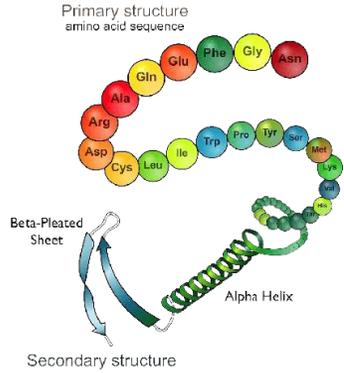
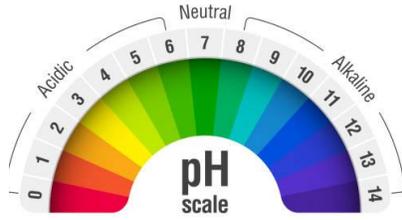
El proceso de liofilización, que implica la congelación del producto seguida de su sublimación para eliminar el contenido de agua (Bhatta, Stevanovic, & Ratti, 2020). Se reconoce que esta técnica ofrece la ventaja de conservar de manera óptima los nutrientes y las propiedades originales de las leguminosas (Oyinloye & Yoon, 2020).

Bacterias ácido lácticas, se pueden lograr alimentos con mejores percepciones sensoriales y nutricionales.

- Descomponen compuestos de difícil digestión.
- Mejoran el pH
- Funcionan como probióticos (Wang, et al., 2021)..



OBJETIVOS



1 Determinar el proceso tecnológico para la obtención de distintas leguminosas liofilizadas a partir de Soya amarilla y frijol calima rojo a escala de laboratorio

Evaluar mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional

2 Analizar la incorporación de distintas bacterias ácido lácticas (*Limosilactobacillus reuteri*, y *Lactiplantibacillus plantarum*) en las distintas leguminosas liofilizadas para la obtención de un alimento funcional.

3 Evaluar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del alimento funcional.



HIPÓTESIS

Evaluación mediante análisis fisicoquímico y microbiológico de distintas leguminosas liofilizadas, considerando la incorporación de bacterias ácido lácticas para la obtención de un alimento funcional.

Hipótesis de Factor A (Tipo de leguminosa)

H₀ (Hipótesis Nula): El tipo de leguminosa no tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas.

H₁ (Hipótesis Alternativa): El tipo de leguminosa tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional mediante la incorporación de bacterias ácido lácticas.

Hipótesis de Factor B (bacterias ácido lácticas)

H₀ (Hipótesis Nula): La cepa BAL no tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional con distintas leguminosas liofilizadas.

H₁ (Hipótesis Alternativa): La cepa BAL tiene un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional con distintas leguminosas liofilizadas.

Hipótesis de la interacción Factores AXB (Tipo de leguminosa, bacterias)

H₀ (Hipótesis Nula): Los efectos de la interacción entre tipo de leguminosa, y la cepa BAL no tienen un efecto significativo en los parámetros físico-químicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional.

H₁ (Hipótesis Alternativa): Los efectos de la interacción entre tipo de leguminosa, y la cepa BAL tienen un efecto significativo en los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos asociados con la obtención de un alimento funcional.



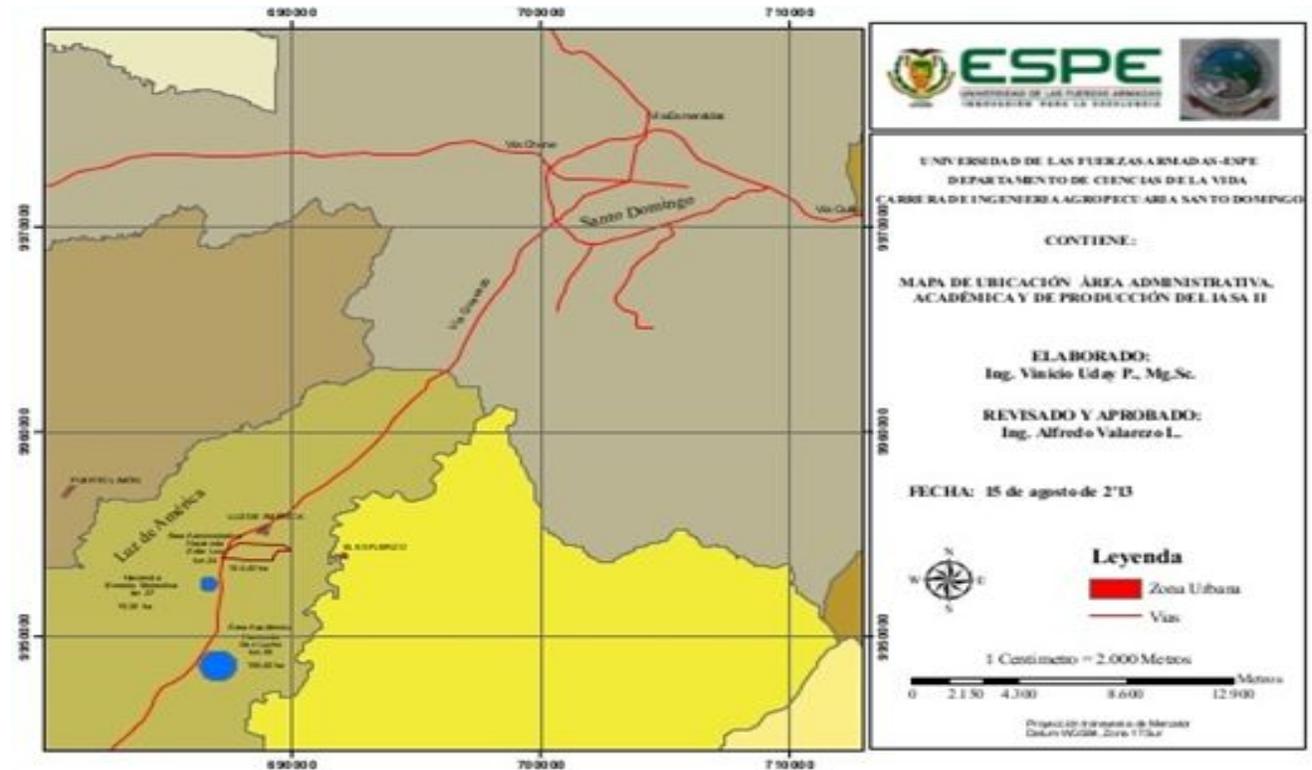
MATERIALES Y MÉTODOS

Laboratorio de Bromatología y Biociencias.

- Campus IASA II de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, Extensión Santo Domingo.
- Parroquia Luz de América, Hacienda Zoila Luz, vía Quevedo km. 24 margen izquierdo

Figura 1

Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación.



MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

→ Prueba de Tukey al 5%

Modelo Matemático del Modelo Experimental Bifactorial (A*B)

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Factores y Niveles para el Estudio

Factores	Niveles
Tipo de leguminosa (A)	A1: Frijol calima rojo A2: Soya Amarilla
Tipo de cepa de bacterias ácido lácticas (B)	B1: <i>Lactobacillus reuteri</i> B2: <i>Lactobacillus plantarum</i> B3: Sin Microorganismos

Tratamientos a comparar

Tratamiento	Interacción	Combinación
T1	A1B1	Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus reuteri</i>
T2	A1B2	Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus plantarum</i>
T3	A1B3	Frijol calima rojo + Sin Microorganismos
T4	A2B1	Soya amarilla + <i>Lactobacillus reuteri</i>
T5	A2B2	Soya amarilla + <i>Lactobacillus plantarum</i>
T6	A2B3	Soya amarilla + Sin Microorganismos

Análisis de varianza (AxB)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Tipo de leguminosa (A)	1
Cepas de bacterias ácido lácticas (B)	2
Interacción A*B	2
Réplicas	2
Error experimental	12
Total	19

Repeticiones: crecimiento de microorganismos tres repeticiones.

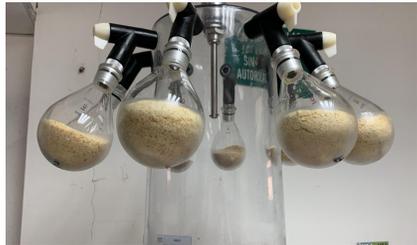


MATERIALES Y MÉTODOS

Liofilización de las Leguminosas



Molienda



Liofilización
Frejol rojo
Soja amarilla



Caldo MRS 110,3 gr
+ 2L agua destilada



Reposar: 5 minutos
Agitación: 2 minutos.



Autoclave : 121 °C
durante 15 minutos



100 g harina liofilizada
Con MO + 15 ml de
bioconservante
Reposar: 24 horas



Resuspensión: 1:1 v/v.



Liofilizar

Preparación del Bioconservante

1 Preparación de Inóculo Inicial y Obtención de la Solución Bacteriana



Viales aislados de *L. reuteri* y *L. plantarum*



Inocular 3
veces



Estufa a 37°C, 24 horas



Lavado 3x con solución tampón
1270 ml de agua destilada y
24,40 g de ácido cítrico, así
como 730 ml de agua destilada
y 18,34 g de citrato de sodio



Centrifugación
10000 rpm durante 15
minuto



L. reuteri y
L. plantarum



MATERIALES Y MÉTODOS

Alimento Funcional: Hamburguesa

Evaluación de las Propiedades Microbiológicas de las Hamburguesas

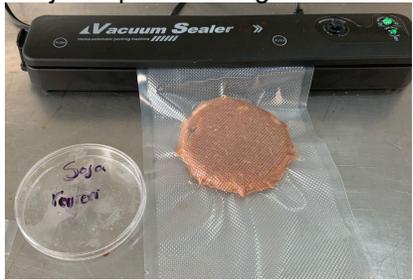
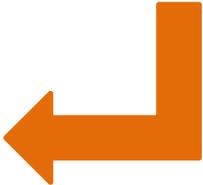


Procesador de alimentos

Homogenizado



Modelado



Empacado y congelado

Recepción y pesado

- Carne de res: 225 g
- Tocino: 112.5 g,
- Proteína : Harinas de leguminosa liofilizadas con bacterias ácido lácticas o sin bacterias ácido lácticas: 7.5 g**
- Condimento: 7.5 g
- Sal: 1.87 g
- Agua: 60 g
- Miga de pan: 5.25 g
- Humo líquido: 1 g
- Almidón de yuca: 15 g
- Cebolla en rama: 7.5 g
- Ajo en polvo: 2.25 g

Aerobios mesófilos

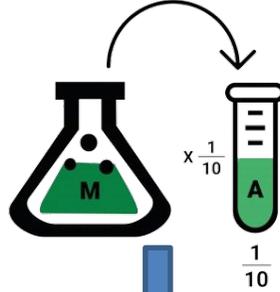


2 g hamburguesa proteína + leguminosas con y sin bacterias lácticas



18 mL de solución Peptonada

mezcló en el vórtex



72 horas a 38°C

Enterobacterias y coliformes

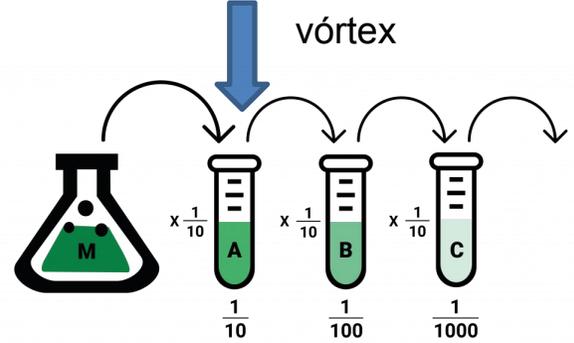


2 gr de proteína + leguminosas con y sin bacterias lácticas



18 mL de solución Peptonada

vórtex



Estufa 38°C 48 horas

PETRIFILM 3M



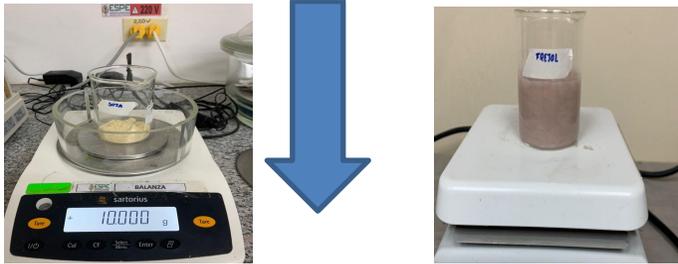
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

MATERIALES Y MÉTODOS:

Análisis Físicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y Producto Final

Análisis del pH

10 g de muestra preparada + 100 mL de agua destilada



Agitación: 30 minutos a 25°C



Líquido se decante.
pH lectura directa

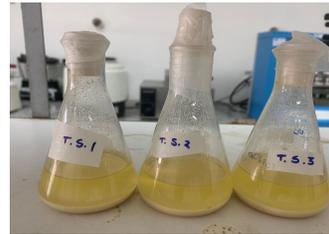


Harina

5 g harina



50 ml de alcohol 90%



Reposo:
24 horas

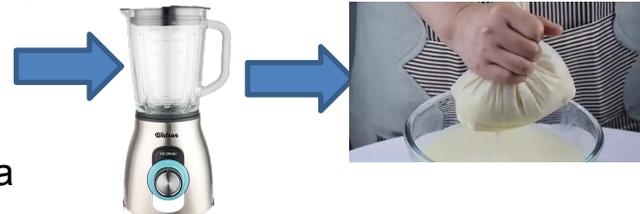


Hamburguesa

10 gr hamburguesa



200 ml de agua
destilada



Evaluación de la Acidez

Alícuota: 10 ml del
líquido + 2 ml
fenolftaleína.

0,02 N de NaOH



25 ml solución
75 ml de agua
destilada
fenolftaleína

titulación
con NaOH
0.01 N

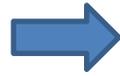


MATERIALES Y MÉTODOS:

Análisis Fisicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y Producto Final

Determinación de la Humedad.

30 minutos



2 gr harina
o 10 gr carne



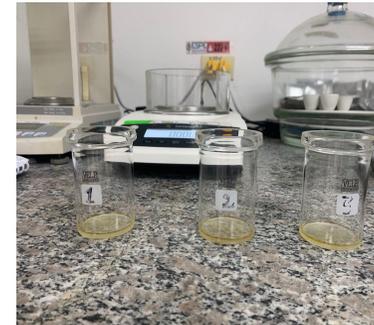
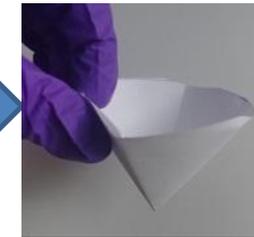
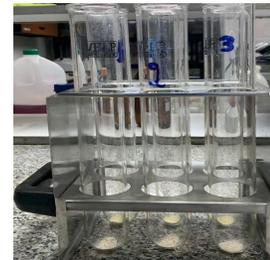
130°C 2 h



Desecador: 30
minutos

Evaluación del Porcentaje de Grasa

4 gr muestra



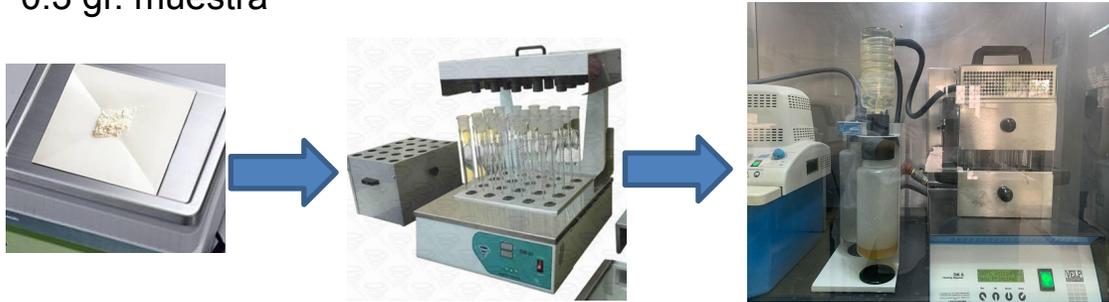
MATERIALES Y MÉTODOS:

Análisis Fisicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas y Producto Final

Determinación del Porcentaje de Proteína

1 DIGESTIÓN

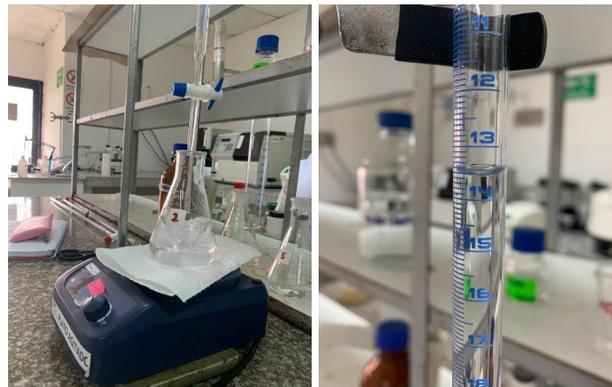
0.3 gr. muestra



2 DESTILACIÓN



3 TITULACIÓN



Determinación de la Ceniza

1

Secar: estufa 1000 C
30 minutos



2

Dejar enfriar



2

2 g de muestra



3

Mufla: 6000 ± 20 C
aprox. 3 horas



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Fisicoquímicos de las Leguminosas Liofilizadas

Jiménez (2007)
Frejol: 20 a 25%
de proteína, grasa
5% y 60 a 70% de
carbohidratos

Soya:40%
proteína, 18%
grasa y 20%
carbohidratos

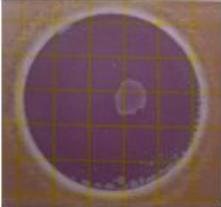
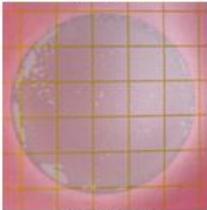
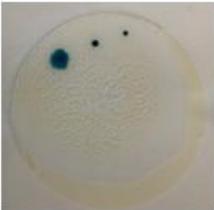


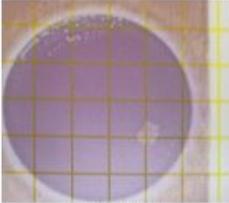
Leguminosa	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
Frijol calima rojo	6,54	0,228	0,617	2,77	84,41	5,23
Soya Amarilla	6,61	0,301	2,95	48,4	83,85	5,85
	Norma Técnica Colombiana 1241 (2007) : máximo es de 9	NTE INEN 616:2015: mínimo 0,02	NTE INEN 616:2015: máximo de 14,50	NTE INEN 616:2015: máximo de 2,00	NTE INEN 616:2015: valor mínimo de proteína es de 7	NTE INEN 616:2015: máximo de 0,80



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Microbiológico del Alimento Funcional: Hamburguesa

Tratamiento	Análisis	Recuento
Frijol calima roja + L. <i>Plantarum</i>	Enterobacteria	 0 UFC/ml
	Coliformes	 0 UFC/ml
	Aerobios	 3E+3 UFC/ml

Soya amarilla + L. <i>Plantarum</i>	Enterobacteria	 0 UFC/ml
	Coliformes	 0 UFC/ml
	Aerobios	 6E+3 UFC/ml

Park & Kim (2013)
Aeróbicas mesófilas: contaminación cruzada



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factibilidad para la utilización de dos variedades de leguminosas (Frijol calima rojo y soja Amarilla)

Tipo de leguminosa	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
A1:Frijol calima rojo	6,18 ^A	0,0303 ^A	71,0078 ^A	8,9889 ^A	85,6799 ^A	5,7665 ^A
A2:Soja Amarilla	6,22 ^B	0,0338 ^B	64,4796 ^B	6,3789 ^B	85,5499 ^B	6,3191 ^B

NTE INEN ISO
2917:2013 : Max 7
NTE INEN 1338: Max
6,2

Velásquez (2015):
0,027% y 0,065%

NTE INEN: Max: 64%
Ayavaca, (2020)
Soya: 61,4%
Frijol: 55,24 %

NTE INEN 1346:
máximo del 15%.
(Mejia, 2023),
hamb.harina de
garbanzo 3,7%

INEN 338: Min 14%
Ayavaca,(2020)
Soya: 80,13%
Felker et al., (2023)
Frijol: 78,21%

NTE INEN: Max 5%
Ayavaca,(2020)
Soya: 3,31%
Felker et al., (2023)
Frijol: 2,54%



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Factibilidad para la utilización de Tipos de Bacteria (*Limosilactobacillus reuteri* y *Lactiplantibacillus plantarum*)

Tipo de bacteria	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
B1: <i>L. Reuteri</i>	6,2017 ^A	0,035 ^A	66,5833 ^A	10,3167 ^A	85,5705 ^A	6,1317 ^A
B2: <i>L. Plantarum</i>	6,1617 ^B	0,0295 ^B	65,5523 ^B	5,3833 ^B	85,6361 ^B	5,9719 ^B
B3: SM	6,235 ^C	0,0317 ^C	71,0955 ^C	7,3517 ^C	85,6381 ^C	6,0247 ^C

↓

Khalili Sadaghiani et al.,(2019).
Carne molida
L.reuteri: 5,3
L:plantarum: 5,1
SM: 5,7

NTE INEN 783:
Max 6,2

↓

NTE INEN: Max: 64%
El-Ghorab et al. (2014)
SM: **73,15%** ± 1,22%
Bacterias: **66,13%** ± 0,65%

NTE INEN 778: Max 15%
Rech de Marins et al.(2022)
L. plantarum: 8,74 Otra: 12,7

↓

INEN 781: Min 12%
Rech de Marins et al., (2022)
SM: 22,07 e
Bacterias: 21,07

↓

NTE INEN 1 338:
máximo de 5%,



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tipo de leguminosa*Tipo de Bacteria (Interacción AB)

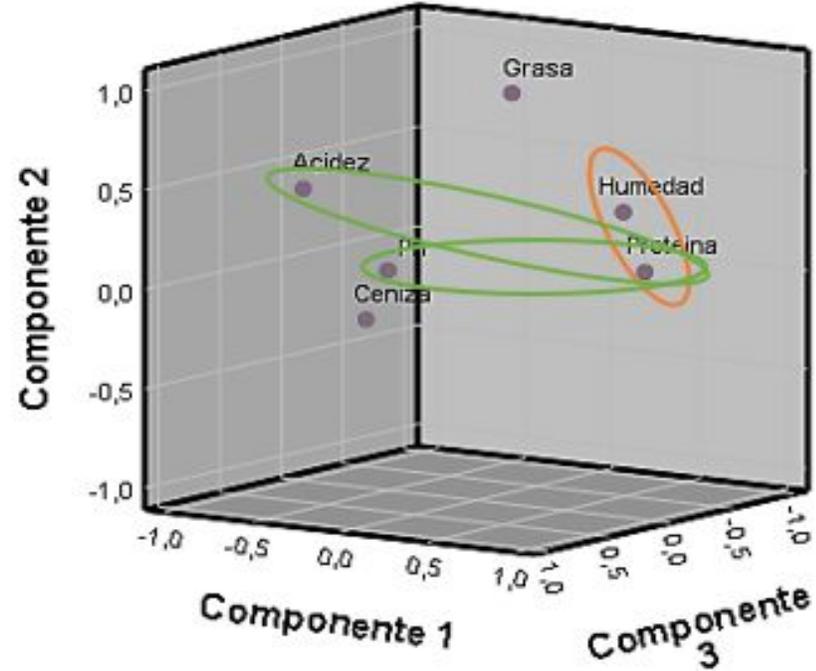
Interacciones	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
A1B1: Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus reuteri</i>	6,18 ^B	0,04 ^C	67,95 ^B	11,33 ^E	85,60 ^C	5,65 ^B
A1B2: Frijol calima rojo + <i>Lactobacillus plantarum</i>	6,20 ^{BC}	0,03 ^A	66,04 ^{AB}	6,27 ^C	85,64 ^C	5,47 ^A
A1B3: Frijol calima rojo + Sin Microorganismos	6,14 ^A	0,03 ^A	63,15 ^C	9,37 ^D	85,80 ^D	6,17 ^D
A2B1: Soya amarilla + <i>Lactobacillus reuteri</i>	6,22 ^C	0,03 ^B	65,22 ^{AB}	9,30 ^D	85,54 ^B	6,61 ^F
A2B2: Soya amarilla + <i>Lactobacillus plantarum</i>	6,12 ^A	0,03 ^B	2 65,07 ^{AB}	4,50 ^A	3 85,63 ^C	6,47 ^E
A2B3: Soya amarilla + Sin Microorganismos	6,33 ^D	0,04 ^{BC}	63,15 ^A	5,34 ^B	85,47 ^A	5,88 ^C



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Componentes Principales

Gráfico de componente en espacio rotado



Matriz de correlaciones

	pH	Acidez	Humedad	Grasa	Proteína	Ceniza
pH	1,00	,337	-,525	-,180	-,754	-,264
Acidez	,337	1,00	-,425	,181	-,612	,184
Humedad	-,525	-,425	1,00	,474	,870	,040
Grasa	-,180	,181	,474	1,00	,249	-,075
Proteína	-,754	-,612	,870	,249	1,00	,024
Ceniza	-,264	,184	,040	-,075	,024	1,00

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1

Los resultados obtenidos demuestran la eficacia de la liofilización como método de conservación, preservando las propiedades físico-químicas y microbiológicas de las leguminosas.



3

Se observó que al evaluar las características fisicoquímicas y microbiológicas del alimento funcional estas mejoraron de acuerdo a los estándares



2

Se confirmó que la incorporación de bacterias ácido lácticas no solo puede contribuir a mejorar la calidad nutricional y sensorial del producto final, sino que también puede garantizar su seguridad microbiológica, cumpliendo con los estándares de calidad y seguridad alimentaria.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

FACTORES

Leguminosa

Textura, suavidad, valor nutricional: Harina de frijol calima rojo con mejor humedad (71,0078) y proteína (85,6799) y grasa (8,9889).

Mejor conservación y minerales: Harina de soja amarilla valores de pH (6,22), acidez (0,0338) y ceniza (6,3191)

Bacterias ácido lácticas

Textura, suavidad y minerales: *L. Reuteri*, favorece las características de acidez (0,035), contenido de grasa (10,3167), y ceniza (6,1317)

Mayor conservación: *L. Plantarum* reduce los valores de pH a 6.1617, así como también disminuye la humedad a 65.5523% y valor un mayor valor nutricional menor porcentaje de grasa (5,3833) y mayor proteína (85,6361)

Interacción entre las leguminosas y bacterias

Mejor jugosidad y suavidad: Frijol Calima Rojo y *L. reuteri* aumentan la humedad de 63,15% a 67,95%

Minerales: soja amarilla y *L.reuteri* presentan el mayor porcentaje de ceniza, alcanzando un valor de 6,61%

Conservación: Soya amarilla + *L. plantarum* con el pH más bajo 6,12



AGRADECIMIENTOS



Dra. Sungey Sánchez,
Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Santo Domingo – ESPE

Dr. Juan Neira,
Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Santo Domingo- ESPE

Ing. Ing. Kathy Medina.
Técnica del laboratorio de bromatología
Santo Domingo- ESPE

DOCENTES, FAMILIA Y AMIGOS

