



**Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*)**

López Paredes, Josselyn Mishell

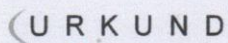
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

31 de agosto del 2021



### Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS - Josselyn López, final.docx (D111895559)  
 Submitted: 9/1/2021 1:56:00 AM  
 Submitted By: neiramosquera@uteq.edu.ec  
 Significance: 5 %

#### Sources included in the report:

TESIS DIANA SALAZAR - urkund.docx (D78135179)  
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5761081.pdf>  
<http://201.159.223.180/bitstream/3317/10203/1/T-UCSG-PRE-TEC-CIA-38.pdf>  
<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26604/1/AL%20648.pdf>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7044803/>  
<https://eujournal.org/index.php/esj/article/view/7757/7478>  
<https://core.ac.uk/download/pdf/232122765.pdf>  
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/5931/1/T-UTEQ-0079.pdf>  
<https://docplayer.es/41409903-Utilizacion-del-mucilago-de-cacao-tipo-nacional-y-trinitario-en-la-obtencion-de-jalea.html>  
[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/71305/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=yAndrade](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/71305/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=yAndrade),  
[http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/19276/1/6285\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/19276/1/6285_1.pdf)  
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/54278/Optimizacio%CC%81n%20de%20la%20fermentacio%CC%81n%20de%20cacao%20%28Theobroma%20cacao%29%20de%20especies%20cultivadas%20en%20los%20departamentos%20de%20Meta%20y%20GuaviareColombia.%20Revisio%CC%81n%20de%20literatura.%20Laura%20Rosero%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/10232/3/T-ESPE-002777.pdf>  
[http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/UNAP/4235/4/Condori\\_Mamani\\_Deysy\\_Yeny.pdf.txt](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/UNAP/4235/4/Condori_Mamani_Deysy_Yeny.pdf.txt)  
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2074/1/T-UTEQ-0061.pdf>  
<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3162/1/AL498.pdf>  
<https://docplayer.es/amp/86321355-Tesis-para-obtener-el-titulo-de-licenciado-en-biologialilian-gabriela-salazar-alvarez-lima-peru.html>  
<https://docplayer.es/136610161-Escuela-universitaria-de-posgrado.html>  
[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15494/1/T-3565\\_JORDAN%20COBOS%20KAREN%20PAMELA.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/15494/1/T-3565_JORDAN%20COBOS%20KAREN%20PAMELA.pdf)  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11985/1/AL%20577.pdf>

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
**SUNGEY NAYNEE**  
**SANCHEZ LLAGUNO**

**Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD.**

C. C.: 1205348673

**Directora del Proyecto de Investigación**



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

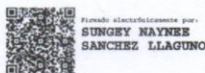
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

#### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: "Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucilago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*)" fue realizado por la señorita López Paredes Josselyn Mishell; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de 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, 31 de agosto del 2021

Firma:



Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD.

C. C.: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **López Paredes Josselyn Mishell**, con cédula de ciudadanía n° 2350621393, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Título "Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucilago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*)"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 31 de agosto del 2021**

Firma

**López Paredes Josselyn Mishell**

C.C.: 2350621393



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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Yo **López Paredes Josselyn Mishell**, con cédula de ciudadanía n° 2350621393, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Título: "Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 31 de agosto del 2021**

Firma

**López Paredes Josselyn Mishell**

C.C.: 2350621393

### **Dedicatoria**

Primeramente, este trabajo le dedico a Dios, por ser un guiador y permitirme alcanzar unas de mis metas de la vida junto a mi familia.

A mi madre Marleny, por brindarme todo su amor, sus sabios consejos, ser mi fuerza y darme todo su apoyo infinito para permitir cumplir unas de mis metas alcanzadas.

A mi padre Genaro, a pesar que ya no está con nosotras, se que desde el cielo estará feliz y orgulloso por mi esfuerzo logrado.

A mi hermana Lissett por su comprensión y apoyo en todo momento.

Gracias infinitamente, los amos.

Josselyn

## **Agradecimiento**

Agradezco a Dios por brindarme la sabiduría de terminar una etapa de mi vida junto a mi madre y hermana, que me brindaron su ayuda durante toda mi vida estudiantil.

A mi tutora, PhD. Sungey Sánchez, por compartir sus sabios conocimientos en todo el proceso del trabajo investigativo, al igual que el PhD. Juan Neira, se les agradece infinitamente.

Al sr. Aníbal Rivera y mi tía Sandra por su incondicional ayuda en facilitarme la materia prima del trabajo; y a Patricia Bravo por brindarme todo su apoyo y estar siempre conmigo.

A mis amigas Alisson, Carolina, Ivonne, Karen y Niccolly, que desde el inicio de la etapa universitaria me dieron todo su cariño.

De igual manera a Ariana por ayudarme en el proceso de laboratorio y a Haider por sus locuras y consejos.

Josselyn

## Índice de Contenido

Carátula.....	1
Análisis Urkund.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento .....	7
Índice de Contenido .....	8
Índice de Tablas.....	13
Índice de Figuras .....	16
Resumen.....	17
Abstract .....	18
Capítulo I.....	19
Introducción.....	19
Objetivos .....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis .....	21
Hipótesis para el Factor A (Variedades de mucílago de cacao) .....	21
Hipótesis para el Factor B (Frutas) .....	21
Hipótesis para el Factor C (Temperatura).....	21
Capítulo II.....	22
Revisión de Literatura.....	22
El Cacao.....	22
Generalidades.....	22
Producción .....	23



Variedades .....	24
Mucílago del cacao.....	25
Fermentación .....	26
Bacterias Acido lácticas.....	27
Generalidades.....	27
Taxonomía y Características.....	29
Péptidos antimicrobianos.....	29
Identificación molecular .....	30
Bioconservación.....	31
Papaya .....	31
Cambios en la postcosecha .....	32
Naranjilla .....	33
Cambios en la postcosecha .....	34
Capítulo III.....	35
Metodología .....	35
Ubicación del Área de Investigación .....	35
Ubicación Política .....	35
Ubicación Ecológica.....	35
Ubicación Geográfica .....	35
Materiales.....	37
Determinación de pH .....	37
Determinación de Acidez Titulable.....	37
Determinación de Sólidos Solubles.....	38
Aislamiento e identificación de las bacterias acido lácticas.....	38
Bioconservación de las frutas.....	39
Recuento de poblaciones microbianas .....	39
Conservación de las bacterias acido lácticas .....	40

Métodos .....	40
Obtención de la materia prima .....	40
Fermentación del mucilago de cacao.....	40
Aislamiento de las bacterias ácido lácticas .....	41
Identificación microbiana .....	41
Tinción Gram.....	41
Prueba de catalasa.....	41
Secuenciación y análisis filogenético.....	41
Bioconservación de las frutas.....	42
Solución bacteriana .....	42
Preparación de la muestra.....	42
Conservación de las bacterias ácido lácticas .....	42
Diseño Experimental.....	43
Factores del experimento .....	43
Tratamientos a comparar.....	43
Tipo de diseño .....	44
Repeticiones .....	44
Análisis Estadístico.....	44
Análisis funcional .....	44
Variables evaluadas.....	44
Determinación de pH .....	44
Determinación de Acidez Titulable.....	45
Determinación de Sólidos Solubles.....	46
Determinación de pérdida de peso .....	46
Recuento de poblaciones microbianas .....	46
Capítulo IV .....	48
Resultados .....	48

Caracterización físico-química del mucilago de cacao .....	48
Identificación de BAL presentes en la fermentación del mucílago de cacao .....	49
Análisis de varianza .....	52
Análisis de varianza para la variable acidez titulable.....	52
Análisis de varianza para la variable pH .....	54
Análisis de varianza para la variable sólidos solubles.....	57
Análisis de varianza para la variable pérdida de peso.....	59
Análisis de varianza para la variable de conteo bacteriano.....	61
Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio .....	61
Resultados del estudio para las variedades de mucílago de cacao (Factor A) .....	61
Resultados del estudio para las frutas bioconservadas (Factor B) .....	64
Resultados del estudio para la temperatura de bioconservación (Factor C) .....	66
Prueba de Tukey para las interacciones significativas en la bioconservación.....	69
Análisis de Tukey en la interacción A*B (Cacao*Fruta).....	69
Análisis de Tukey en la interacción A*B*C (Cacao*Fruta*Temperatura) .....	79
Análisis de conglomerados.....	89
Análisis de componentes principales .....	90
Capítulo V .....	94
Discusión.....	94
Respecto a las variedades de mucilago de cacao (Factor A) .....	94
Respecto a las frutas bioconservadas (Factor B) .....	95
Respecto a la temperatura de bioconservación (Factor C) .....	96
Respecto a la interacción A*B*C (Cacao-Fruta-Temperatura).....	98
Capítulo VI .....	100
Conclusiones.....	100
Factor A (Variedades).....	100
Factor B (Frutas).....	100

Factor C (Temperatura) .....	101
Interacción A*B*C (Variedades-Frutas-Temperatura) .....	101
Recomendaciones .....	102
Capítulo VII .....	103
Bibliografía .....	103

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1</b> Clasificación Taxonómica del Cacao.....	23
<b>Tabla 2</b> Clasificación Taxonómica de la papaya .....	32
<b>Tabla 3</b> Clasificación Taxonómica de la naranjilla.....	33
<b>Tabla 4</b> Recursos necesarios para la determinación de pH del mucilago de cacao, papaya y naranjilla.....	37
<b>Tabla 5</b> Recursos necesarios para la determinación de acidez titulable del mucilago de cacao, papaya y naranjilla. ....	37
<b>Tabla 6</b> .....	38
<b>Tabla 7</b> Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de la fermentación del mucilago de cacao.....	38
<b>Tabla 8</b> Recursos necesarios para la preparación de la solución probiótica y de la muestra .....	39
<b>Tabla 9</b> Recursos necesarios para el recuento microbiológico de las frutas.....	39
<b>Tabla 10</b> Recursos necesarios para conservar las bacterias ácido lácticas .....	40
<b>Tabla 11</b> Factores y Niveles a probar en la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao.....	43
<b>Tabla 12</b> Tratamientos a comparar en la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao.....	43
<b>Tabla 13</b> Esquema de análisis de varianza para el estudio de la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao.....	44
<b>Tabla 14</b> Caracterización físico-química del mucilago de cacao puro y fermentado .....	48
<b>Tabla 15</b> Resultados de pruebas de identificación bacteriana.....	49
<b>Tabla 16</b> Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 0 de la bioconservación.....	52
<b>Tabla 17</b> Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 5 de la bioconservación.....	53
<b>Tabla 18</b> Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 10 de la bioconservación.....	54
<b>Tabla 19</b> Análisis de varianza para la variable pH en el día 0 de la bioconservación....	54
<b>Tabla 20</b> Análisis de varianza para la variable pH en el día 5 de la bioconservación....	55
<b>Tabla 21</b> Análisis de varianza para la variable pH en el día 10 de la bioconservación..	56

<b>Tabla 22</b> Análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 0 de la bioconservación .....	57
<b>Tabla 23</b> Análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 5 de la bioconservación. ....	58
<b>Tabla 24</b> Análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 10 de la bioconservación. ....	58
<b>Tabla 25</b> Análisis de varianza para la variable pérdida de peso en el día 5 de la bioconservación. ....	59
<b>Tabla 26</b> Análisis de varianza para la variable pérdida de peso en el día 10 de la bioconservación. ....	60
<b>Tabla 27</b> Análisis de varianza para la variable de conteo bacteriano (UFC/ml). ....	61
<b>Tabla 28</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables físico-químicas .....	61
<b>Tabla 29</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en la variable microbiológica .....	62
<b>Tabla 30</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables físico-químicas .....	64
<b>Tabla 31</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en la variable microbiológica .....	64
<b>Tabla 32</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor C en las variables físico-químicas .....	66
<b>Tabla 33</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor C en la variable microbiológica .....	67
<b>Tabla 34</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico-químicas del día 0 .....	69
<b>Tabla 35</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico-químicas del día 5 .....	69
<b>Tabla 36</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico-químicas y microbiológica del día 10 .....	69
<b>Tabla 37</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*C en las variables físico-químicas del día 0 .....	73
<b>Tabla 38</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*C en las variables físico-químicas del día 5 .....	73

<b>Tabla 39</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*C en las variables físico-químicas y microbiológica del día 10.....	74
<b>Tabla 40</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción B*C en las variables físico-químicas del día 0 .....	76
<b>Tabla 41</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción B*C en las variables físico-químicas del día 5 .....	77
<b>Tabla 42</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción B*C en las variables físico-químicas y microbiológica del día 10.....	77
<b>Tabla 43</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B*C en las variables físico-químicas del día 0 .....	79
<b>Tabla 44</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B*C en las variables físico-químicas del día 5 .....	79
<b>Tabla 45</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B*C en las variables físico-químicas día 10 .....	80
<b>Tabla 46</b> Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B*C en la variable conteo bacteriano.....	80
<b>Tabla 47</b> Matriz de correlación de componentes principales .....	90
<b>Tabla 48</b> Matriz de componentes.....	91
<b>Tabla 49</b> Porcentajes de varianza total explica .....	91

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Mapa de ubicación geográfica del área de investigación.....	36
<b>Figura 2</b> Árbol filogenético basado en las secuencias 16S ARNr de bacterias ácido lácticas .....	50
<b>Figura 3</b> Estudio del efecto de las variedades del mucílago de cacao (Factor A) en las variables de estudio .....	62
<b>Figura 4</b> Estudio del efecto de las frutas (Factor B) en las variables de estudio .....	65
<b>Figura 5</b> Estudio del efecto de la temperatura (Factor B) en las variables de estudio...	67
<b>Figura 6</b> Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable acidez titulable .....	70
<b>Figura 7</b> Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pH.....	71
<b>Figura 8</b> Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable sólidos solubles .....	71
<b>Figura 9</b> Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pérdida de peso .....	72
<b>Figura 10</b> Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable conteo bacteriano ....	72
<b>Figura 11</b> Estudio del efecto de la interacción A*C en la variable acidez titulable.....	74
<b>Figura 12</b> Estudio del efecto de la interacción A*C en la variable sólidos solubles .....	75
<b>Figura 13</b> Estudio del efecto de la interacción A*C en la variable conteo bacteriano....	76
<b>Figura 14</b> Estudio del efecto de la interacción B*C en la variable acidez titulable.....	77
<b>Figura 15</b> Estudio del efecto de la interacción B*C en la variable pérdida de peso.....	78
<b>Figura 16</b> Estudio del efecto de la interacción B*C en la variable conteo bacteriano ....	78
<b>Figura 17</b> Estudio del efecto de la interacción A*B*C en la variable acidez titulable.....	81
<b>Figura 18</b> Estudio del efecto de la interacción A*B*C en la variable pH .....	83
<b>Figura 19</b> Estudio del efecto de la interacción A*B*C en la variable sólidos solubles ...	85
<b>Figura 20</b> Estudio del efecto de la interacción A*B*C en la variable pérdida de peso...	87
<b>Figura 21</b> Estudio del efecto de la interacción A*B*C en la variable conteo bacteriano	88
<b>Figura 22</b> Dendograma para los factores en estudio .....	89
<b>Figura 23</b> Gráfica de sedimentación.....	92
<b>Figura 24</b> Gráfica de componentes principales.....	93



## Resumen

El objetivo de la presente investigación fue aislar bacterias ácido lácticas en dos variedades de mucilago de cacao (Nacional y CCN-5), para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*), siendo un enfoque innovador para extender la vida útil de las frutas que son afectas por microorganismos patógenos. El aislamiento de las bacterias ácido lácticas se realizó fermentando el mucílago de cacao por 72 horas y posteriormente se cultivó en medio MRS agar y caldo MRS, resuspendiéndolas en tampón ácido cítrico-citrato de sodio. El diseño experimental consistió en un esquema trifactorial (Variedades: CCN-51 y Nacional; Frutas: Naranjilla y Papaya; Temperatura: Refrigeración y Sin refrigeración) en un D.BC.A. con 8 tratamientos y 3 repeticiones. Las bacterias ácido lácticas aisladas de la fermentación del mucilago de cacao pertenecieron a la especie *Lactobacillus plantarum*. En la evaluación físico-químico y microbiológico de las frutas presentaron diferencias significativas al ser la papaya una fruta dulce y la naranjilla agridulce, sin embargo, al bioconservarlas en refrigeración por un tiempo de 10 días, se logró extender mejor su vida útil. Los tratamientos con naranjilla presentaron mayor acidez y pérdida de peso, en comparación a la papaya que obtuvo mayor pH y sólidos solubles no se presentó crecimiento de hongos y levaduras por la alta población de bacterias ácido lácticas.

Palabras claves:

- **CACAO**
- **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**
- **BIOCONSERVACIÓN**
- **PAPAYA**
- **NARANJILLA**

### Abstract

The objective of the present investigation was to isolate lactic acid bacteria into two varieties of cocoa mucilago (National and CCN-5), for papaya bioconservation (*Carica papaya*) and naranjilla (*Solanum quitoense*), being an innovative approach to extend life useful of fruits that are affected by pathogenic microorganisms. The isolation of the lactic acid bacteria was carried out by fermenting the cocoa mucilage by 72 hours and subsequently cultured in half MRS agar and MRS broth, resuspending them in citric acid-sodium citrate buffer. The experimental design consisted of a trifactorial scheme (varieties: CCN-51 and National; fruits: naranjilla and papaya; temperature: refrigeration and without refrigeration) in a D.B.C.A. with 8 treatments and 3 repetitions. Lactic acid bacteria isolated from cocoa mucilage fermentation belonged to the *Lactobacillus plantarum* species. In the physical-chemical and microbiological evaluation of the fruits, they showed significant differences as the papaya is a sweet fruit and the bittersweet naranjilla, however, when bio-preserving them in refrigeration for a period of 10 days, it was possible to extend their useful life better. The naranjilla treatments show greater acidity and weight loss, compared to papaya, which obtained higher pH and soluble solids, there was no growth of fungi and yeasts due to the high population of lactic acid bacteria.

Keywords:

- **COCOA**
- **LACTIC ACID BACTERIA**
- **BIOCONSERVATION**
- **PAPAYA**
- **NARANJILLA**

## Capítulo I

### Introducción

Ecuador exporta más de 69 tipos de frutas, pero la competencia de mercados internacionales exige productos de excelente calidad. La papaya y naranjilla tienen una vida corta por su elevado contenido de humedad, textura susceptibles a daños mecánicos, alta tasa respiratoria y producción de calor, provocando pérdidas considerables de producción por el ataque de plagas y enfermedades (Miranda et al., 2016).

Reducir las pérdidas de frutas e incluso hortalizas se requiere de nuevas medidas de adopción en la cosecha, manipuleo, almacenamiento, envasado y procesamiento de frutas y hortalizas frescas para obtener productos adecuados con mejores propiedades de almacenamiento. (Erazo et al., 2020)

Actualmente, se han buscado alternativas para la bioconservación de las frutas para que interactúen aditiva y sinérgicamente en el control de poblaciones microbianas (Erazo et al., 2020). Entre las alternativas ecológicas, las bacterias ácido láctico (BAL) presentan capacidades antagonistas, siendo un agente eficaz en el control biológico de productos (Russo et al., 2014).

La utilización de BAL en las frutas y verduras ayudan a mantener mejor su calidad al extender su vida útil, reduciendo e inhibiendo la acción de importantes patógenos transmitidos por los alimentos, a través de sus capacidades de producir compuestos antimicrobianos, incluido las bacteriocinas. El uso de estos compuestos antimicrobianos posee un enfoque prometedor para la calidad microbiológica y la seguridad para el almacenamiento postcosecha de frutas y verduras crudas y mínimamente procesadas. (Agriopoulou et al., 2020)

Además, las BAL son seguras de consumir y durante el almacenamiento en frío o en un ambiente con una concentración elevada de dióxido de carbono, se convierten en la población dominante y conservan el alimento (Dhundale et al., 2018). Las BAL al tener una amplia aplicación como cultivos iniciadores, se encuentran en la alimentación del ser humano como en productos fermentados.

El mucílago de cacao es requerido para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras, sin embargo, el 5 a 7% drena como exudado, el cual es desperdiciado y en el Ecuador no existen usos industriales para el mucílago de cacao (Vallejo et al., 2016). La diversidad de especies de BAL obtenidas en la fermentación del mucilago cacao-grano es bastante restringida, debido a que aparecen en las fases media y tardía del proceso fermentativo, encontrando principalmente *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* por las capacidades de utilizar la glucosa, fructosa y ácido cítrico (De Vuyst & Leroy, 2020).

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas en dos variedades de mucilago de cacao, Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (*Carica papaya*) y naranjilla (*Solanum quitoense*).

### **Objetivos específicos**

Aislar bacterias ácido lácticas de la fermentación de dos variedades de mucílago de cacao.

Evaluar el efecto de la aplicación de las bacterias ácido lácticas obtenidas de la fermentación del mucilago de cacao en la bioconservación de papaya y naranjilla.

Establecer la influencia del control de temperatura en la bioconservación de la papaya y naranjilla, mediante la aplicación de bacterias ácido lácticas.

### **Hipótesis**

#### **Hipótesis para el Factor A (Variedades de mucílago de cacao)**

**Ho:** La obtención de bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación de mucílago de cacao influye como bioconservante protector.

**Ha:** La obtención de bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación de mucílago de cacao no influyen como bioconservante como bioconservante protector.

#### **Hipótesis para el Factor B (Frutas)**

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

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

#### **Hipótesis para el Factor C (Temperatura)**

**Ho:** El control de temperatura utilizadas para la bioconservación no influye en las propiedades de las frutas.

**Ha:** El control de temperatura utilizadas para la bioconservación influye en las propiedades de las frutas.

## Capítulo II

### Revisión de Literatura

#### El Cacao

##### *Generalidades*

El cacao (*Theobroma cacao L.*) tiene origen en los bosques tropicales húmedos de América del Sur, en las regiones del Amazonas y el Orinoco. Su plantación a partir de la semilla hasta las primeras flores es dos años después de la germinación, dependiendo de los genotipos. Las vainas necesitan de cuatro a siete meses para alcanzar la madurez, y va entre cero a 200 vainas por árbol, porque el porcentaje de vainas que florecen varía de 0,5% a 5% en que los insectos aseguran la polinización natural. (Rodríguez et al., 2019)

El fruto del árbol del cacao es una vaina que varía su forma y color entre los grupos morfogenéticos. Cada una posee de 20 a 60 semillas, incrustadas en una pulpa blanca, un epicarpio grueso, dureza variable, epidermis pigmentada, mesocarpio delgado y duro, leñoso, y finalmente el endocarpio. El endocarpio está constituido por grandes células tubulares con espacios intercelulares, colapsando las semillas maduras y formando la pulpa. (Cerri et al., 2019)

**Tabla 1***Clasificación Taxonómica del Cacao*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Filo</b>	Spermatophyta
<b>Subfilo</b>	Angiospermae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Dilleniidae
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Malvaceae
<b>Genero</b>	<i>Theobroma</i>
<b>Especie</b>	<i>cacao</i>

*Nota.* Recuperado de (Bhattacharjee & Akoroda, 2018).

***Producción***

El cacao es un cultivo de frutas tropicales de importancia económica, por ser la principal fuente de chocolate (Cerri et al., 2019), causando una demanda mundial en la búsqueda de una variedad de buena calidad, que está influenciada por el genotipo, la composición química del suelo, la edad del árbol y los procesos de postcosecha que realizan los productores (López et al., 2019).

El nivel de rendimiento de las variedades mejoradas es desafiado por la presión parasitaria de plagas, virus y enfermedades, teniendo un alto costo ambiental y económico (Rodríguez et al., 2019). Una de las estrategias de mejoramiento en varios países productores de cacao se basan en la selección masiva de clones e híbridos, a través de esquejes enraizados, injertos en árboles adultos o en plantas jóvenes de vivero (Rodríguez et al., 2019).

En el Ecuador, la producción cacaotera es el tercer rubro de exportación agrícola del país, debido a que empresas internacionales han observado la calidad del cacao de nuestro país, como su aroma y color sumamente apreciadas en la preparación de chocolates finos, revestimientos y coberturas. Por lo que, el país busca mejorar la producción de cacao tradicional, para satisfacer en un futuro la demanda. El cacao nacional del país desde la época de la colonia es conocido por su sabor y aroma especial, pero en la actualidad, presenta un deterioro en la calidad de su debido a la expansión del clon CCN-51 por su alto índice de productividad. (Teneda, 2016)

### ***Variedades***

El cacao presenta una gran diversidad genética, con más de 14 000 variedades, pero entre las principales variedades que se utilizan comercialmente para producir cacao y hacer chocolate son el Criollo, Forastero, Trinitario y Nacional; que se distinguen por las características morfológicas de la fruta, origen geográfico y el sabor (Aprotosoai et al., 2016).

**Criollo.** El criollo fue domesticado por la civilización maya en Centroamérica. Actualmente, solo se encuentra en plantaciones antiguas de Venezuela, Centroamérica, Madagascar, Sri Lanka y Samoa, porque tiene baja productividad y alta susceptibilidad a enfermedades, insectos y estrés. Las plántulas jóvenes se identifican por la presencia de cotiledones verdes y por los tallos de las hojas con orientación horizontal opuesta. Las frutas poseen una cáscara fina y suave con superficie texturizada y cierto grado de pigmentación roja. En cambio, las semillas son redondas con cotiledones de color blanco o púrpura pálido. (Bhattacharjee & Akoroda, 2018)

**Forastero.** El forastero es originario de la región amazónica, siendo cultivado en Brasil, África occidental y el sudeste asiático, constituyendo el 95% de la producción



mundial de cacao debido su alta variabilidad genética en rendimiento, más vigorosos y menos susceptibles a enfermedades y plagas que la variedad Criollo. Sus vainas con duras, amarillas y redondas, teniendo más de 30 semillas de color de pálido a morado oscuro. (Bhattacharjee & Akoroda, 2018)

**Trinitario.** Trinitario es un híbrido de las variedades Criollo y Forastero, teniendo mayor rendimiento y menos susceptible a las enfermedades. Se origina en la cuenca baja del río Amazonas y son cultivos en las Indias Occidentales, América del Sur y América Central (Aprotosoie et al., 2016). Las vainas son duras y de color variable, conteniendo 30 o más semillas (Bhattacharjee & Akoroda, 2018).

El cacao CCN51 (Colección Castro Naranjal) está clasificado dentro de la variedad Trinitario y es cultivada extensivamente en Ecuador. El CCN51 es una variedad híbrida con una productividad de casi seis veces mayor a las otras variedades del país y cuatro veces mayor a la media mundial. Además, posee una alta calidad en su fermentación, mayor peso, homogeneidad y contenido de grasas. (UTEPI, 2007)

**Nacional.** La variedad Nacional se origina y se cultiva solamente en Ecuador. Posee distintas características de aroma y sabor, pero sus árboles se encuentran en peligro de extinción por la introducción de un germoplasma externo no relacionado (Bhattacharjee & Akoroda, 2018).

### ***Mucílago del cacao***

La pulpa o mucílago de cacao tiene 82-87% de agua, 10-15% de mono- y disacáridos, 1-3% de ácido cítrico y 1-1,5% de pectina. Además, contiene aminoácidos libres, proteínas, minerales y vitaminas, pero la cantidad de azúcares como sacarosa, fructosa y glucosa varían con la edad de la vaina. La pulpa es un medio rico para el

crecimiento microbiano, pero al estar dentro de las vainas maduras son microbiológicamente estériles. (Lefeber et al., 2010)

Al abrir las vainas manualmente o mecánicamente y eliminar la pulpa del interior de las vainas, se inocula inmediatamente con la variedad de microorganismos presentes en el medio ambiente, de los cuales contribuyen al posterior proceso de fermentación espontánea de estas materias primas. (De Vuyst & Weckx, 2016)

En la fermentación de la semilla, la pulpa juega un papel importante al contribuir al desarrollo del sabor (Cerri et al., 2019). Pero entre las utilidades del exudado de cacao está la producción de nata, un producto parecido al agar, como postre (Asia), jugo o batido y al preservarla por congelación da sabor a helados y yogures (Teneda, 2016).

### ***Fermentación***

La fermentación del cacao es un proceso microbiológico espontáneo, que ocurre en la pulpa que rodea a la semilla, que es rica en glucosa, fructosa y sacarosa, su pH inicial es bajo de 3.3-4.0, por la alta concentración de ácido cítrico (1-3%). Los microorganismos que empiezan la fermentación son las levaduras por el alto contenido de azúcares, el bajo pH y la limitación de oxígeno en la pulpa. (López et al., 2019)

La función de las levaduras en el proceso de fermentación es la producción de etanol a partir de los carbohidratos, la asimilación del ácido cítrico y la degradación de la pectina para producir CO<sub>2</sub>, que favorece las condiciones anaeróbicas en el desarrollo de las bacterias del ácido láctico (BAL), descomponiendo el azúcar y producir ácido láctico, ácido acético y manitol y consumo de ácido cítrico. (López et al., 2019)

Según Aprotosoai et al. (2016), esta etapa dura de 48 a 96 horas ocasionando el crecimiento de las bacterias del ácido láctico. Luego, las BAL son reemplazadas por

las bacterias del ácido acético (BAA), que oxidan el etanol producido por las levaduras a ácido acético, eliminando el sabor amargo de la semilla, a través de la ruptura de polifenoles y membranas lipídicas de las vacuolas celulares por diversas reacciones enzimáticas y el contenido de las células se mezcla (López et al., 2019).

En la fermentación existen muchos factores que influyen en la fermentación, como el método, la duración, la velocidad, el almacenamiento de la vaina y el genotipo del cacao, obteniendo diferencias en la calidad del cacao. En los métodos de fermentación más utilizados están las plataformas, montones, cestas, bandejas y cajas. (Aprotosoie et al., 2016)

Las BAL están asociadas consistentemente con las fermentaciones de granos de cacao, creciendo poblaciones de  $10^7$ - $10^8$  UFC/g durante las primeras 36-48 horas del proceso. Entre la diversidad de especies de BAL, se han aislado de estos ecosistemas, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, que son los dominantes con mayor frecuencia. (Ho et al., 2015)

Las actividades metabólicas y los roles potenciales de las BAL en la fermentación de los granos de cacao se deben a tres actividades principales: fermentan los azúcares de pulpa (glucosa y fructosa) a ácido láctico y en cantidades menores a etanol y ácido acético; utilizan el ácido cítrico dentro de la pulpa para producir ácido láctico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo, acetoina y 2,3-butanodiol; y algunas de las BAL pueden reducir la fructosa de la pulpa a manitol. (Ho et al., 2015)

## **Bacterias Ácido lácticas**

### ***Generalidades***

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la obtención de productos fermentados y sus metabolitos

han sido empleados como bioconservantes naturales por la capacidad de controlar el crecimiento de bacterias patógenas de los alimentos. Entre sus metabolitos se encuentran las bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular, estables a pH bajo, sensibles a las proteasas y termoestables, siendo estas las propiedades que los caracterizan en compuestos ideales para sustituir parcialmente el uso de agentes químicos en alimentos. (Fuentes et al., 2017)

La función principal de BAL es la producción de ácido láctico (acidificación de los alimentos) y contribuyen al sabor, textura y valor nutricional de los alimentos fermentados por medio de componentes aromáticos, producción o degradación de exopolisacáridos, lípidos y proteínas, producción de componentes nutricionales, como cultivos funcionales o adjuntos y con efectos terapéuticos, al inhibir el deterioro y los microorganismos patógenos. (Bintsis, 2018)

Según Vieco et al. (2019), los mecanismos de inhibición de patógenos por las BAL probióticas incluyen:

- Producción de compuestos inhibidores
- Prevención de la adhesión de patógenos
- Competencia por nutrientes
- Modulación del sistema inmunológico del huésped
- Mejora de la digestibilidad de nutrientes
- Conversión alimenticia
- Reducción de la biodisponibilidad de la toxina

### ***Taxonomía y Características***

Las BAL pertenecen al filo Firmicutes que poseen alrededor de 20 géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*, que son los principales miembros de las BAL, pero *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros. (Parra, 2010)

Las BAL son bacterias Gram-positivas con un bajo contenido de guanina + citosina (G+C), tolerantes a los ácidos, no móviles, no formadoras de esporas (Bintsis, 2018), carencia de catalasa y forma de cocos o bacilos con longitud variable y un grosor de 0.5 -0.8  $\mu\text{m}$ . Además, son un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, anaerobias facultativas y carecen de actividad respiratoria porque la ausencia de la enzima citocromo catalasa. (Parra, 2010)

Presenta diferentes factores que alteran su crecimiento en un medio de fermentación, como la temperatura (mesófilos y termófilos), las condiciones ambientales y los requerimientos nutricionales al crecer en medios complejos. Estas especies requieren de aminoácidos, vitaminas del grupo B, carbohidratos fermentables y alcoholes como fuente de energía para formar el ácido láctico, debido a que se clasifican en homofermentativas (produce ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico, acético, propiónico, CO<sub>2</sub>, etanol). (Parra, 2010)

### ***Péptidos antimicrobianos***

Las BAL son capaces de producir otros compuestos antimicrobianos aparte de los ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos diacetilo de naturaleza proteica o peptídica. Los péptidos antimicrobianos son sustancias multifacéticas con complejos mecanismos de acción, pero similares a las hormonas de los animales,

porque interactúan con células patógenas a través de su membrana o interacción con dianas internas relacionadas con la síntesis de ADN, ARN o proteínas.

Existen varios modelos de mecanismos de acción para péptidos antimicrobianos del metabolismo de BAL, entre ellas la interacción inicial entre los péptidos antimicrobianos y la célula microbiana, debido a la atracción entre el péptido catiónico y la envoltura bacteriana cargada negativamente, formando poros en la membrana. O la inhibición de la síntesis de macromoléculas, por una acción sinérgica con los mecanismos inmunitarios innatos del huésped. En sí, los compuestos antimicrobianos no funcionan aislados por lo que, las estrategias multifactoriales, serán más efectivas en la conservación de alimentos. (Linares et al., 2018)

### ***Identificación molecular***

La amplificación y secuenciación de genes de ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) es utilizado ampliamente para la filogenia y taxonomía bacteriana, convirtiéndolo en el "cronómetro molecular definitivo". Esto se debe a que, está presente en todas las bacterias, existiendo como una familia multigén u operones. También, su función no ha sido cambiante, por lo que es probable que los cambios aleatorios en la secuencia reflejen el cambio evolutivo microbiano (filogenia); y el gen ARNr 16S es lo suficientemente grande, aproximadamente de 1 500 pb con fines informáticos. (Idris et al., 2020)

La identificación genotípica de las BAL permite determinar su identidad de forma precisa y fiable. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis filogenético a base de secuencias de genes de ARNr 16S se han utilizado para la identificación exitosa de aislados de diversos productos fermentados, por lo que este enfoque

molecular permite que las especies de *Lactobacillus* se identifiquen de forma fiable. (Lawalata et al., 2020)

### **Bioconservación**

La bioconservación es el aumento de la vida de anaquel y seguridad de un alimento utilizando microbiota natural, controlada y con sus compuestos antimicrobianos (Cortés et al., 2018). Posterior a la cosecha de frutas y verduras y durante el almacenamiento y transporte, la calidad sensorial y nutricional disminuye debido a su alto contenido de humedad, crecimiento microbiano, factores ambientales, madurez y senescencia; teniendo una corta vida útil, por lo que requieren de cuidados postcosecha (Linares et al., 2018).

Los métodos de conservación más comunes se basan en el control de la transpiración, respiración y deterioro microbiano, sin embargo, los métodos tradicionales suelen ser vulnerables (Linares et al., 2018). Por lo que una alternativa amigable al ambiente son las BAL, que tienen un gran potencial para su uso en procesos de producción y bioconservación de alimentos, debido a su seguridad en su consumo y pueden contribuir contribuyen a las características organolépticas (aroma, sabor, textura) y nutricionales (Cortés et al., 2018).

### **Papaya**

La papaya (*Carica papaya L.*) es un árbol tropical de crecimiento rápido y vida corta, cultivado por su fruta, papaína, pectina y sustancias antibacterianas (Chávez & Núñez, 2017); es originario del norte de Centroamérica y sur de México, teniendo alta variación morfológica en tamaño, forma, sabor, color de epidermis y sólidos solubles totales en el fruto (Hernández et al., 2019).

Los árboles de papaya crecen rápidamente y producen frutos maduros a los 9 y 12 meses posterior a la siembra. Además, es el tercer cultivo tropical más cultivado a nivel mundial, siendo México el principal exportador, pero Brasil e India son los mayores productores. Debido a que, la papaya ocupa el primer lugar en las puntuaciones nutricionales de las frutas comunes por el porcentaje de vitamina A, vitamina C, potasio, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, hierro, calcio y fibra. (Chávez & Núñez, 2017)

**Tabla 2**

*Clasificación Taxonómica de la papaya*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Brassicales
<b>Familia</b>	Caricaceae
<b>Genero</b>	<i>Carica</i>
<b>Especie</b>	<i>Papaya L.</i>

*Nota.* Recuperado de (Karunamoorthi et al., 2014).

### ***Cambios en la postcosecha***

La postcosecha de frutos de papaya presentan pérdidas causadas por enfermedades que se manifiestan durante su almacenamiento, transporte y comercialización (López, 2018), debido a que es una fruta tropical altamente climatérico, susceptible a daños mecánicos y hospedero de microorganismos como los hongos del género *Rhizopus*, *Fusarium*, *Penicillium* y la enfermedad antracnosis, provocada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* que producen pérdidas de 40 a 100% de la producción (Hernández et al., 2018).



La fruta es infectada en la precosecha y en su almacenamiento se produce los daños, por lo que se han aplicado controles antifúngico como glicerol, películas de recubrimiento biodegradables y ozono, teniendo buenos resultados para su protección y extender la vida de anaquel por la inhibición de los microorganismos (Hernández et al., 2018).

### Naranjilla

La naranjilla o lulo (*Solanum quitoense* Lam.) es nativa de la Cordillera de los Andes en Sudamérica, como los países de Colombia, Ecuador y Perú, Posee un valor hortofrutícola en regiones tropicales de América, África y Oceanía, en el cual, su rendimiento y calidad están definidas por la selección de semillas y el sitio de la plantación. El tiempo de cultivo es determinada por el grado de maduración del fruto con el 75% de color amarillo con pequeños puntos verdes y que el fruto alcance su tamaño completo (2 a 6 cm de diámetro). (Mejía et al., 2012)

### Tabla 3

#### Clasificación Taxonómica de la naranjilla

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Subreino</b>	Espermatofhyta
<b>División</b>	Espermatofhyta
<b>Subdivisión</b>	Dicotiledónea
<b>Clase</b>	Simpétala
<b>Subclase</b>	Pentacíclica
<b>Orden</b>	Tubiflorales
<b>Familia</b>	Solanácea
<b>Género</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especie</b>	<i>quitoense</i>

Nota. Recuperado de (Andrade, 2018).

### ***Cambios en la postcosecha***

Las pérdidas en la postcosecha de la naranjilla se deben al manejo inadecuado de los frutos desde la cosecha hasta las técnicas de conservación, provocando daños mecánicos, por insectos, exposición directa y excesiva con el sol, lluvia o de refrigeración no tolerantes, contaminación química y daño por frío. Además, entre las enfermedades postcosecha, la naranjilla es más afectada por hongos que bacterias, nemátodos y virus como la Podredumbre bacteriana (*Erwinia spp.*), Antracnosis (*Collectotrichum spp.*), Moho verde (*Penicillium spp.*), Candidiasis (*Candida spp.*), Pudrición amarga (*Geotrichum spp.*) y Pudrición blanda (*Rizhopus spp.*) (Andrade, 2018).

## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del Área de Investigación

##### *Ubicación Política*

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

##### *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:	Francos Arenoso

Fuente: Estación Agro Meteorológica "Puerto Ila" Vía Quevedo Km 34.

##### *Ubicación Geográfica*

El presente ensayo de investigación se desarrollará en los laboratorios de la

Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Santo Domingo en el Km 24 Vía Santo Domingo-Quevedo, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón Santo Domingo.

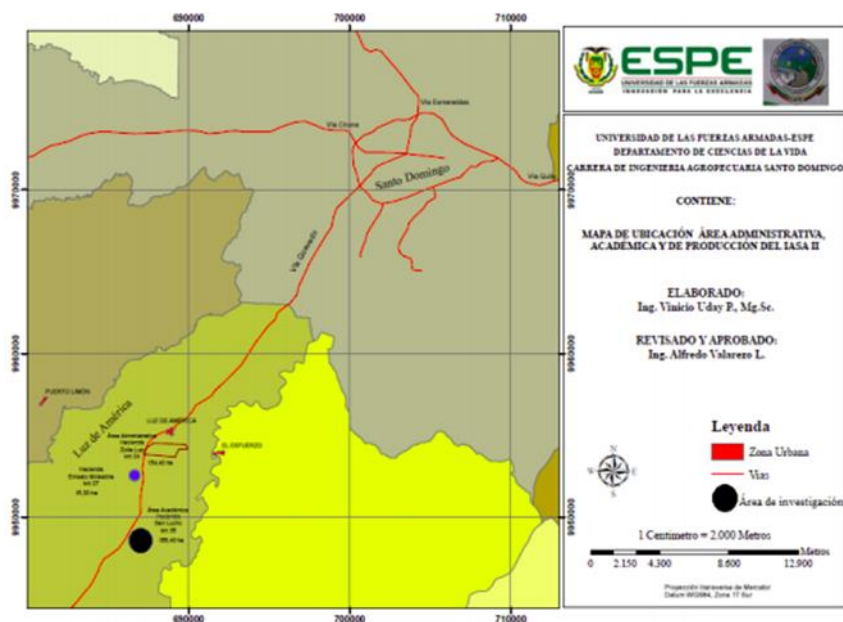
Latitud: 00° 24' 36''

Longitud: 79° 18' 43''

Altitud: 270 msnm

### Figura 1

*Mapa de ubicación geográfica del área de investigación*



## Materiales

### ***Determinación de pH***

**Tabla 4**

*Recursos necesarios para la determinación de pH del mucilago de cacao, papaya y naranjilla.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Muestras</b>
Potenciómetro	Probeta de 100 ml	Mucilago de cacao
Balanza	Pipeta de 10 ml	Papaya
	Vaso de precipitación de 200 ml	Naranjilla
	Varilla de vidrio	

### ***Determinación de Acidez Titulable***

**Tabla 5**

*Recursos necesarios para la determinación de acidez titulable del mucilago de cacao, papaya y naranjilla.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Potenciómetro	Probeta de 50 ml	NaOH 0,1N	Mucilago de cacao
Balanza	Pipeta de 10 ml		Papaya
Agitador	Vaso de precipitación 250 ml		Naranjilla
Kit de titulación	Mortero		

### ***Determinación de Sólidos Solubles***

**Tabla 6**

*Recursos necesarios para la determinación de sólidos solubles del mucilago de cacao, papaya y naranjilla.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Muestras</b>
Refractómetro	Vaso de precipitación de 200 ml	Mucilago de cacao Papaya Naranjilla

### ***Aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas***

**Tabla 7**

*Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de la fermentación del mucilago de cacao.*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Incubadora	Tubos de ensayo	MRS Agar	Mucilago de cacao fermentado
Cámara de flujo laminar	Mechero	Cristal violeta	
Autoclave	Asa drigalski	Lugol	
Microscopio	Asa bacteriológica	Alcohol acetona	
Balanza	Placas Petri	Safranina	
Plancha térmica magnética	Portaobjetos	Aceite de inversión	
	Frascos para medios	Peróxido de Hidrógeno	
	Micropipeta	Agua peptona	

**Bioconservación de las frutas****Tabla 8***Recursos necesarios para la preparación de la solución probiótica y de la muestra*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Incubadora	Tubos de ensayo	Caldo MRS	
Cámara de flujo laminar	Mechero	Ácido cítrico	Aislamiento de BAL
Autoclave	Asa bacteriológica	Citrato de sodio	
Balanza	Frascos para medios		
Potenciómetro	Micropipeta		
Centrífuga	Vaso de precipitación		
Espectrofotómetro	Probeta		

**Recuento de poblaciones microbianas****Tabla 9***Recursos necesarios para el recuento microbiológico de las frutas*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Incubadora	Tubos de ensayo	Agua de peptona	Papaya
Cámara de flujo laminar	Mechero	Petriefilm	Naranja
Autoclave	Micropipeta		
Balanza	Matraz Erlenmeyer		
Vortex	Vaso de precipitación		
Contador de colonias	Probeta		

## **Conservación de las bacterias ácido lácticas**

**Tabla 10**

*Recursos necesarios para conservar las bacterias ácido lácticas*

<b>Equipos</b>	<b>Materiales/Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestras</b>
Incubadora	Tubos de ensayo	Caldo MRS	Bacterias
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica	Glicerol 30%	
Autoclave	Micropipeta		
Balanza	Tubos eppendorf		
Refrigeradora			

## **Métodos**

### **Obtención de la materia prima**

Para la obtención de las mazorcas de cacao, la variedad CCN-51 se recolectó de la finca de la Familia Sánchez ubicado en Mocache, recinto Aguas Frías; y la variedad Nacional obtenido de la finca de la familia Tapia en Babahoyo, sector La Virginia.

En cambio, la papaya fue obtenida de la finca del señor Montoya ubicado en Luz de América y la naranjilla obtenidas del mercado Unión y Progreso de Santo Domingo.

### **Fermentación del mucilago de cacao**

Las mazorcas de cacao deben tener un buen estado de maduración, libre de agentes extraños y sin enfermedades, las cuales se lavaron con agua clorada (100 ppm) y después con agua potable.

Se separó manualmente las almendras de la cáscara para extraer el mucilago,



utilizando un lienzo para filtrar. Se fermentó un litro del mucílago obtenido en un recipiente de plástico, tapándolo con un globo y envuelto con funda negra, durante un periodo de 72 horas a temperatura ambiente.

### **Aislamiento de las bacterias ácido lácticas**

Se preparó diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ , utilizando 1 ml del fermento de cacao obtenido en 9 ml de agua peptona (1,5%) y se sembró 0,1 ml en agar MRS por el método de extensión, inoculando a  $35^{\circ}\text{C}$ - $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.

Las colonias formadas, se aislaron en un nuevo agar MRS por el método de estrías para tener colonias puras.

### **Identificación microbiana**

#### ***Tinción Gram***

La muestra bacteriana se recogió con un asa bacteriológica, fijándola con agua y calor sobre un portaobjetos (flameado 3 veces). Después, se agregó cristal violeta durante 60 segundos, luego se agregó lugol durante 60 segundos, una o dos gotas de alcohol acetona por 15 segundos y finalmente, safranina durante 60 segundos. Después de cada colorante, se enjuagaba con agua destilada (Salazar, 2017).

#### ***Prueba de catalasa***

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos y luego se extendió la muestra. Detectar la formación de burbujas antes de los 20 segundos (positivo) (Salazar, 2017).

#### ***Secuenciación y análisis filogenético***

Las bacterias aisladas en placas Petri con medio MRS Agar fueron enviadas a Macrogen Inc. de Corea del Sur para la secuenciación de ARNr 16S. Las secuencias

obtenidas fueron comparadas con el programa BLASTn.

El análisis filogenético se lo realizó en el programa MEGA X, alineando las secuencias con el algoritmo ClustalW, mientras que el árbol filogenético se lo elaboró con el método de Neighbor-Joining, empleando la distancia genética de Tamura-Nei basado con 1000 réplicas de Bootstrap. La bacteria *Bacillus aerius* se la empleó como grupo externo del árbol filogenético.

## **Bioconservación de las frutas**

### ***Solución bacteriana***

Se preparó 55,15 g de caldo MRS (TM Media) en 1 L de agua destilada para inocular las bacterias aisladas por 24 horas a 37°C, y posteriormente se midió la absorbancia. Para el conteo bacteriano, se lo realizó en Petrifilm determinando una concentración final  $10^{10}$  UFC/ml. Luego las bacterias se lavaron con tampón de ácido cítrico-citrato de sodio (pH 3,8: 0,1M) mediante centrifugación a 10000 rpm durante 15 min, repitiendo el proceso hasta que el sobrenadante esté claro (aproximadamente 2-3 veces). Finalmente, se resuspendieron las bacterias lavadas en el mismo tampón de ácido cítrico-citrato de sodio (1:1 v/v). (Russo et al., 2014)

### ***Preparación de la muestra***

Las frutas fueron lavadas con ácido cítrico al 2% y luego se roció en ellas la solución bacteriana. Las frutas fueron conservadas por 10 días a temperatura ambiente y en refrigeración.

### **Conservación de las bacterias ácido lácticas**

Las bacterias cultivadas en caldo MRS (TM Media) de 24 horas se suplementó con glicerol al 30% (v/v) en tubos eppendorf de 1,5 ml y fueron conservadas a -20°C.

## Diseño Experimental

### Factores del experimento

**Tabla 11**

*Factores y Niveles a probar en la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao.*

Factores	Simbología	Niveles
Variedad de mucilago de cacao (A)	a <sub>1</sub>	CCN-51
	a <sub>2</sub>	Nacional
Fruta (B)	b <sub>1</sub>	Naranja
	b <sub>2</sub>	Papaya
Temperatura (C)	c <sub>1</sub>	Refrigeración
	c <sub>2</sub>	Sin refrigeración

### Tratamientos a comparar

**Tabla 12**

*Tratamientos a comparar en la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao.*

N°	TRATAMIENTOS	COMBINACION
T1	a1b1c1	CCN-51 + Naranja + Refrigeración
T2	a1b1c2	CCN-51 + Naranja + Sin refrigeración
T3	a1b2c1	CCN-51 + Papaya + Refrigeración
T4	a1b2c2	CCN-51 + Papaya + Sin refrigeración
T5	a2b1c1	Nacional + Naranja + Refrigeración
T6	a2b1c2	Nacional + Naranja + Sin refrigeración
T7	a2b2c1	Nacional + Papaya + Refrigeración
T8	a2b2c2	Nacional + Papaya + Sin refrigeración

### **Tipo de diseño**

Modelo trifactorial (2x2x2), conducido en un diseño de bloques completamente al azar.

### **Repeticiones**

Tres repeticiones por tratamiento, con un total de 24 unidades experimentales.

### **Análisis Estadístico**

**Tabla 13**

*Esquema de análisis de varianza para el estudio de la bioconservación de frutas con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao*

<b>Fuente de variación</b>		<b>Grados de libertad</b>
Variedad de cacao	a-1	1
Fruta	b-1	1
Temperatura	c-1	1
Variedad de mucilago x Fruta	(a-1)(b-1)	1
Variedad de mucilago x Temperatura	(a-1)(c-1)	1
Fruta x Temperatura	(b-1)(c-1)	1
Variedad mucilago x Fruta x Temperatura	(a-1)(b-1)(c-1)	1
Replicas	r-1	2
Error Experimental		14
Total		23

### **Análisis funcional**

Las variables con resultados significativos en el análisis de varianza se aplicó la prueba de significancia de Tukey ( $p < 0,05$ ) para tomar una decisión.

### **Variables evaluadas**

### **Determinación de pH**

Para determinar el pH se utilizó el procedimiento de la norma INEN 389 (1985):

En un vaso de precipitación se colocó 10 g o 10 ml de la muestra y se añadió 100 ml de agua destilada, agitando la muestra. En caso de existir partículas en suspensión se dejó en reposo el recipiente para que el líquido o sólidos se decante.

### ***Determinación de Acidez Titulable***

La determinación de acidez titulable se basó en el procedimiento de la norma INEN 0381 (1985):

Para preparar la muestra, como los productos líquidos, se colocó 25 ml de la muestra en un matraz volumétrico de 250 ml y se diluyó a volumen con agua destilada previamente hervida y enfriada, mezclando luego perfectamente la solución.

En cambio, para productos sólidos, se trituró 25 g en un mortero y se transfirió a un matraz Erlenmeyer añadiendo 50 ml de agua destilada caliente. Posteriormente, se calentó la muestra a baño maría hirviendo durante 30 minutos; se enfrió y se transfirió el contenido a un matraz volumétrico de 250 ml, diluyendo a volumen con agua destilada previamente hervida y enfriada.

Para medir la acidez, se colocó 25 a 100 ml de la muestra preparada en un matraz volumétrico y se sumergió los electrodos en la muestra. Se añadió lentamente 0,1N de hidróxido de sodio, hasta obtener un pH 7, luego se siguió añadiendo en cuatro gotas a por vez, registrando el volumen de la misma y el pH obtenido después de cada adición, hasta alcanzar pH 8,3 aproximadamente.

Mediante por interpolación se estableció el volumen exacto de solución 0,1 N de hidróxido de sodio añadido, correspondiente al pH 8,1.

La acidez titulable se determinó mediante la ecuación siguiente:

$$A = \frac{(V_1 N_1 M) 10}{V_2}$$

Siendo:

A = g de ácido en 1000 ml de producto.

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

N1 = normalidad de la solución de NaOH.

M = peso molecular del ácido de referencia (0,064 de ácido cítrico).

V2 = volumen de la alícuota tomada para el análisis.

### ***Determinación de Sólidos Solubles***

Se colocó unas gotas de la muestra en el prisma del refractómetro y se procedió a leer la cantidad de sólidos solubles totales en grados Brix.

### ***Determinación de pérdida de peso***

La determinación de peso se midió mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso final}} * 100$$

### ***Recuento de poblaciones microbianas***

Se homogenizó 5 gr de agua de peptona (TM Media) en 1 L de agua destilada. Luego se colocó 90 ml en matraz volumétrico o 9 ml en tubos de ensayos para preparar diluciones de 10-8 o 10-12 y se esterilizó en el autoclave por 15 minutos. En la cámara de flujo laminar, las diluciones fueron preparadas con 10 g o 1 ml de la muestra. Para la inoculación en las láminas de Petrifilm, transfirió 1 ml de las diluciones 10-8 cuidadosamente, evitando la presencia de burbujas de aire.

Los Petrifilm de bacterias se incubaron a 38°C por 48 horas y los hongos a temperatura ambiente por 72 horas.

La determinación de unidades formadoras de colonias (UFC), se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Recuento} \left( \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Número de colonias} * \text{Inverso del factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado}}$$

## Capítulo IV

### Resultados

#### Caracterización físico-química del mucilago de cacao

**Tabla 14**

*Caracterización físico-química del mucilago de cacao puro y fermentado*

Parámetro analizado	Unidad	Puro		Fermentado	
		Nacional	CCN-51	Nacional	CCN-51
pH		3,69	3,59	4,05	4,03
Sólidos solubles	°Brix	16,8	18	11,3	15
Acidez titulable	%	1,14	1,31	1,86	1,16

La caracterización físico-química del mucilago de cacao presentó diferencias entre las dos variedades antes y después de ser fermentado por 72 horas. El pH del mucilago al ser fermentado aumenta, cambiando de 3,69 a 4,05 en la variedad Nacional y 3,59 a 4,03 en la variedad CCN-51, este comportamiento se debe al consumo del ácido cítrico por los microorganismos (Gonzalez et al., 2019). En el estudio de Vallejo et al. (2016), el pH de la variedad Nacional es similar con un valor de 3,7; mientras que el de la variedad CCN-51 es mayor, 3,87.

En cambio, el contenido de sólidos solubles disminuye al ser fermentado: 16,8°Brix a 11,3°Brix en la variedad Nacional y 18°Brix a 15°Brix en la variedad CCN-51, debido a la producción de ácido acético en la siguiente etapa de la fermentación (Otárola, 2018). Igualmente, en el estudio de Vallejo et al. (2016), los sólidos solubles de las dos variedades de cacao fueron menores a lo obtenido, 15°Brix en la variedad Nacional y 16°Brix en la variedad CCN-51.



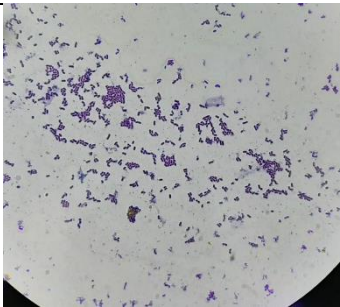
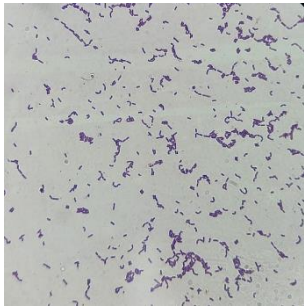
En la acidez titulable, la variedad Nacional aumenta de 1,14% a 1,86% en la fermentación, pero la variedad CCN-51 disminuye de 1,31% a 1,16%. Estos valores son mayores a los que presentó el estudio de Vallejo et al. (2016), teniendo 0,71% en la variedad Nacional y 0,91% en la variedad CCN-51.

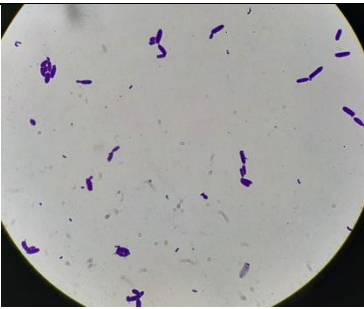
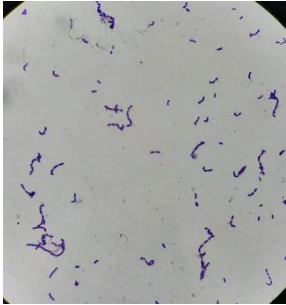
Entre las 48 y 96 horas de fermentación, las BAL tienen un crecimiento exponencial, aumentando el pH y disminuyendo la acidez entre las 48 y 72 horas, provocando la producción de ácido láctico y la oxidación por bacterias acéticas (Gonzalez et al., 2019).

### Identificación de BAL presentes en la fermentación del mucílago de cacao

**Tabla 15**

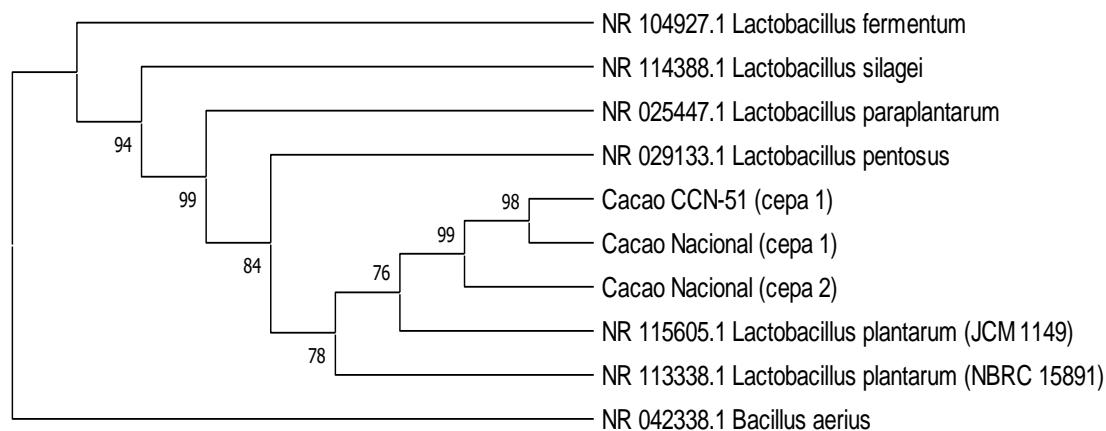
*Resultados de pruebas microbiológicas de identificación bacteriana*

Procedencia	Características	Tinción Gran
Cacao CC-51 (cepa 1)	Gran positivo Bacilo Catalasa negativa	
Cacao CC-51 (cepa 2)	Gran positivo Bacilo Catalasa negativa	

Procedencia	Características	Tinción Gran
Cacao Nacional (cepa 1)	Gran positivo Bacilo Catalasa negativa	
Cacao Nacional (cepa 2)	Gran positivo Bacilo Catalasa negativa	

**Figura 2**

Árbol filogenético basado en las secuencias 16S ARNr de bacterias ácido lácticas



*Nota.* Árbol filogenético de bacterias ácido lácticas aisladas de la fermentación de mucilago de cacao. Bacteria *Bacillus aerius* como grupo externo del árbol.

La información presentada en la tabla 15, corresponden a las bacterias aisladas en medio selectivo (MRS Agar) a partir de la fermentación de mucilago de cacao, siendo Gran positivas, bacilos con catalasa negativa. Según Huang et al. (2018), los

*Lactobacillus* son bacterias grampositivas, negativas a catalasa, en forma de bacilo, facultativamente anaeróbicas o microaerófilas, no formadores de esporas y tolerantes al ácido. Debido a esta última capacidad de los lactobacilos, la solución bacteriana aplicada en la bioconservación de las futas, contenía ácido cítrico.

De los 4 aislados enviados a secuenciar, solo se obtuvo resultados de 3 muestras (cepa 1 – CCN51; cepa 1 – Nacional; cepa 2 – Nacional). La figura 2 representa el árbol filogenético, en el cual, se formó un clado para las bacterias aisladas con el *Lactobacillus plantarum*, con un valor de Bootstrap de 76% a 78%. Según De Vuyst & Leroy (2020) en las primeras etapas del proceso fermentativo del cacao se encuentra *Lactobacillus plantarum*, mientras que en la fase medía y tardía del proceso fermentativo están representadas principalmente por *Lactobacillus fermentum*.

Por lo tanto, las bacterias ácido lácticas aisladas del mucilago de cacao tienen similitud al *Lactobacillus plantarum*, siendo bacilos con extremos redondeados y rectos de 0,9 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho y de 3 a 8  $\mu\text{m}$  de largo, presentándose en forma lineal, en pares o en cadenas cortas (Landete et al., 2010), coincidiendo con los resultados de la tabla 15.

## Análisis de varianza

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

**Tabla 16**

*Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 0 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,00889856	1	0,00889856	14,35	0,0020
B:Fruta	18,0212	1	18,0212	29055,38	0,0000
C:Temperatura	0,00137126	1	0,00137126	2,21	0,1592
D:Repetición	0,000138734	2	0,0000693668	0,11	0,8950
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,00944118	1	0,00944118	15,22	0,0016
AC	0,00751367	1	0,00751367	12,11	0,0037
BC	0,00293607	1	0,00293607	4,73	0,0472
ABC	0,00682049	1	0,00682049	11,00	0,0051
RESIDUOS	0,00868333	14	0,000620238		
TOTAL	18,0671	23			

En la tabla 16 del análisis de varianza de acidez titulable en el día 0 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en el factor A (Cacao), factor B (Fruta), interacción A\*B (Cacao\*Fruta), interacción A\*C (Cacao\*Temperatura), interacción B\*C (Fruta\*Temperatura) e interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura). Mientras que en el factor C (Temperatura) y repeticiones no presentaron diferencias significativas.

**Tabla 17**

*Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 5 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,26882	1	0,26882	634,79	0,0000
B:Fruta	25,5777	1	25,5777	60399,00	0,0000
C:Temperatura	0,00000204743	1	0,00000204743	0,00	0,9455
D:Repetición	0,0029818	2	0,0014909	3,52	0,0577
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,270496	1	0,270496	638,75	0,0000
AC	0,00404842	1	0,00404842	9,56	0,0080
BC	0,000130781	1	0,000130781	0,31	0,5872
ABC	0,00243547	1	0,00243547	5,75	0,0310
RESIDUOS	0,0059287	14	0,000423478		
TOTAL	26,1325	23			

En la tabla 17 del análisis de varianza de acidez titulable en el día 5 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en el factor A (Cacao), factor B (Fruta), interacción A\*B (Cacao\*Fruta), interacción A\*C (Cacao\*Temperatura) e interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura). Mientras que en el factor C (Temperatura), interacción B\*C (Fruta\*Temperatura) y repeticiones no presentaron diferencias significativas.

**Tabla 18**

*Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 10 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,00746916	1	0,00746916	35,90	0,0000
B:Fruta	23,1097	1	23,1097	111082,04	0,0000
C:Temperatura	0,0355721	1	0,0355721	170,99	0,0000
D:Repetición	0,00000894728	2	0,00000447364	0,02	0,9788
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,00644416	1	0,00644416	30,98	0,0001
AC	0,0118321	1	0,0118321	56,87	0,0000
BC	0,0338328	1	0,0338328	162,63	0,0000
ABC	0,012594	1	0,012594	60,54	0,0000
RESIDUOS	0,00291258	14	0,000208041		
TOTAL	23,2203	23			

En la tabla 18 del análisis de varianza de acidez titulable en el día 10 de la bioconservación de las frutas con BAL, se presentó diferencias significativas en todos los factores e interacciones, excepto en las repeticiones.

### ***Análisis de varianza para la variable pH***

**Tabla 19**

*Análisis de varianza para la variable pH en el día 0 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	2,26935	1	2,26935	1088,98	0,0000
B:Fruta	33,915	1	33,915	16274,57	0,0000
C:Temperatura	0,0003375	1	0,0003375	0,16	0,6934
D:Repetición	0,000225	2	0,0001125	0,05	0,9476
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,367537	1	0,367537	176,37	0,0000
AC	0,0009375	1	0,0009375	0,45	0,5133
BC	0,0024	1	0,0024	1,15	0,3013
ABC	0,0024	1	0,0024	1,15	0,3013
RESIDUOS	0,029175	14	0,00208393		
TOTAL	36,5874	23			

En la tabla 19 del análisis de varianza de pH en el día 0 de la bioconservación de las frutas con BAL, se presentó diferencias significativas en el factor A (Cacao), factor B (Fruta) y la interacción A\*B (Cacao\*Fruta). Mientras que en el factor C (Temperatura), interacción A\*C (Cacao\*Temperatura), interacción B\*C (Fruta\*Temperatura), interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura) y repeticiones no presentaron diferencias significativas.

**Tabla 20**

*Análisis de varianza para la variable pH en el día 5 de la bioconservación.*

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,0527344	1	0,0527344	28,13	0,0001
B:Fruta	40,4431	1	40,4431	21574,78	0,0000
C:Temperatura	0,0585094	1	0,0585094	31,21	0,0001
D:Repetición	0,00000625	2	0,000003125	0,00	0,9983
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0189844	1	0,0189844	10,13	0,0066
AC	0,000459375	1	0,000459375	0,25	0,6283
BC	0,00270937	1	0,00270937	1,45	0,2492
ABC	0,00158437	1	0,00158437	0,85	0,3735
RESIDUOS	0,0262438	14	0,00187455		
TOTAL	40,6043	23			

En la tabla 20 del análisis de varianza de pH en el día 5 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en el factor A (Cacao), factor B (Fruta), factor C (Temperatura) y la interacción A\*B (Cacao\*Fruta). Mientras que en la interacción A\*C (Cacao\*Temperatura), interacción B\*C (Fruta\*Temperatura), interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura) y repeticiones no presentaron diferencias significativas.

**Tabla 21**

*Análisis de varianza para la variable pH en el día 10 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,18375	1	0,18375	171,50	0,0000
B:Fruta	50,1993	1	50,1993	46852,71	0,0000
C:Temperatura	0,03375	1	0,03375	31,50	0,0001
D:Repetición	0,0009	2	0,00045	0,42	0,6651
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0018375	1	0,0018375	1,71	0,2114
AC	0,0024	1	0,0024	2,24	0,1567
BC	0,0003375	1	0,0003375	0,31	0,5835
ABC	0,0234375	1	0,0234375	21,87	0,0004
RESIDUOS	0,015	14	0,00107143		
TOTAL (CORREGIDO)	50,4607	23			

En la tabla 21 del análisis de varianza de pH en el día 10 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en el factor A (Cacao), factor B (Fruta), factor C (Temperatura) y la interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura). Mientras que en la interacción A\*B (Cacao\*Fruta), interacción A\*C (Cacao\*Temperatura), interacción B\*C (Fruta\*Temperatura) y repeticiones no presentaron diferencias significativas.



**Análisis de varianza para la variable sólidos solubles**

**Tabla 22**

*Análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 0 de la bioconservación*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,0704167	1	0,0704167	3,73	0,0739
B:Fruta	30,6004	1	30,6004	1621,73	0,0000
C:Temperatura	0,770417	1	0,770417	40,83	0,0000
D:Repetición	0,0758333	2	0,0379167	2,01	0,1709
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,0504167	1	0,0504167	2,67	0,1244
AC	0,09375	1	0,09375	4,97	0,0427
BC	0,0504167	1	0,0504167	2,67	0,1244
ABC	0,09375	1	0,09375	4,97	0,0427
RESIDUOS	0,264167	14	0,018869		
TOTAL	32,0696	23			

En la tabla 22 del análisis de varianza de sólidos solubles en el día 0 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en el factor B (Fruta), factor C (Temperatura), interacción A\*C (Cacao\*Temperatura) y la interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura). Mientras que en el factor A (Cacao), interacción A\*B (Cacao\*Fruta), interacción B\*C (Fruta\*Temperatura) y repeticiones no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 23**

*Análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 5 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,96	1	0,96	22,53	0,0003
B:Fruta	32,6667	1	32,6667	766,48	0,0000
C:Temperatura	0,96	1	0,96	22,53	0,0003
D:Repetición	0,123333	2	0,0616667	1,45	0,2684
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,00666667	1	0,00666667	0,16	0,6984
AC	0,00666667	1	0,00666667	0,16	0,6984
BC	0,166667	1	0,166667	3,91	0,0680
ABC	0,106667	1	0,106667	2,50	0,1360
RESIDUOS	0,596667	14	0,042619		
<b>TOTAL</b>	<b>35,5933</b>	<b>23</b>			

En la tabla 23 del análisis de varianza de sólidos solubles en el día 5 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en los factores: A (Cacao), B (Fruta) y C (Temperatura). Mientras que en las interacciones y repeticiones no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 24**

*Análisis de varianza para la variable sólidos solubles en el día 10 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	0,24	1	0,24	9,25	0,0088
B:Fruta	44,8267	1	44,8267	1727,27	0,0000
C:Temperatura	1,12667	1	1,12667	43,41	0,0000
D:Repetición	0,0633333	2	0,0316667	1,22	0,3247
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1,5	1	1,5	57,80	0,0000
AC	0,106667	1	0,106667	4,11	0,0621
BC	0,0266667	1	0,0266667	1,03	0,3279
ABC	0,06	1	0,06	2,31	0,1506
RESIDUOS	0,363333	14	0,0259524		
<b>TOTAL</b>	<b>48,3133</b>	<b>23</b>			

En la tabla 24 del análisis de varianza de sólidos solubles en el día 10 de la bioconservación de las frutas con BAL, se presentó diferencias significativas en el factor A (Cacao), factor B (Fruta), factor C (Temperatura) y la interacción A\*B (Cacao\*Fruta). Mientras que en las interacciones A\*C (Cacao\*Temperatura), B\*C (Fruta\*Temperatura), A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura) y repeticiones no se observaron diferencias significativas.

***Análisis de varianza para la variable pérdida de peso***

**Tabla 25**

*Análisis de varianza para la variable pérdida de peso en el día 5 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	2,41835	1	2,41835	5,52	0,0340
B:Fruta	11,7601	1	11,7601	26,83	0,0001
C:Temperatura	7,71915	1	7,71915	17,61	0,0009
D:Repetición	0,351235	2	0,175618	0,40	0,6773
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	3,57216	1	3,57216	8,15	0,0127
AC	1,31389	1	1,31389	3,00	0,1054
BC	3,24127	1	3,24127	7,39	0,0166
ABC	2,10867	1	2,10867	4,81	0,0457
RESIDUOS	6,13659	14	0,438328		
TOTAL	38,6214	23			

En la tabla 25 del análisis de varianza de pérdida de peso en el día 5 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en los factores A (Cacao), B (Fruta), C (Temperatura) y las interacciones A\*B (Cacao\*Fruta), B\*C (Fruta\*Temperatura) y A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura). Mientras que en la interacción A\*C (Cacao\*Temperatura) y repeticiones no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 26**

*Análisis de varianza para la variable pérdida de peso en el día 10 de la bioconservación.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	3,157	1	3,157	10,97	0,0051
B:Fruta	32,9846	1	32,9846	114,63	0,0000
C:Temperatura	29,6527	1	29,6527	103,05	0,0000
D:Repetición	0,26259	2	0,131295	0,46	0,6427
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	3,66848	1	3,66848	12,75	0,0031
AC	0,206935	1	0,206935	0,72	0,4107
BC	5,0391	1	5,0391	17,51	0,0009
ABC	0,669477	1	0,669477	2,33	0,1494
RESIDUOS	4,02845	14	0,287746		
TOTAL	79,6694	23			

En la tabla 26 del análisis de varianza de pérdida de peso en el día 10 de la bioconservación de las frutas con BAL, presentó diferencias significativas en los factores A (Cacao), B (Fruta), C (Temperatura) y las interacciones A\*B (Cacao\*Fruta) y B\*C (Fruta\*Temperatura). Mientras que en la interacción A\*C (Cacao\*Temperatura), interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura) y repeticiones no se observaron diferencias significativas.

**Análisis de varianza para la variable de conteo bacteriano.**

**Tabla 27**

*Análisis de varianza para la variable de conteo bacteriano (UFC/ml).*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Cacao	1,13326E25	1	1,13326E25	65,18	0,0000
B:Fruta	1,13207E25	1	1,13207E25	65,11	0,0000
C:Temperatura	2,54085E24	1	2,54085E24	14,61	0,0019
D:Repetición	6,64093E22	2	3,32046E22	0,19	0,8283
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	1,08062E25	1	1,08062E25	62,15	0,0000
AC	2,39294E24	1	2,39294E24	13,76	0,0023
BC	2,30714E24	1	2,30714E24	13,27	0,0027
ABC	2,14293E24	1	2,14293E24	12,33	0,0035
RESIDUOS	2,43404E24	14	1,7386E23		
TOTAL	4,53438E25	23			

En la tabla 27 del análisis de varianza del conteo de bacterias aerobias presentes en las frutas bioconservadas con BAL, se observa diferencias significativas en todos los factores e interacciones, excepto en las repeticiones.

**Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio**

**Resultados del estudio para las variedades de mucílago de cacao (Factor A)**

**Tabla 28**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables físico-químicas*

Factor A (Cacao)	Acidez titulable	pH	Sólidos solubles	Acidez titulable	pH	Sólidos solubles	Pérdida de peso	Acidez titulable	pH	Sólidos solubles	Pérdida de peso
	Día 0			Día 5			Día 10				
CCN-51	0,95 <sup>B</sup>	4,63 <sup>B</sup>	6,98 <sup>A</sup>	1,21 <sup>B</sup>	4,44 <sup>B</sup>	7,68 <sup>A</sup>	1,74 <sup>B</sup>	1,08 <sup>B</sup>	4,65 <sup>B</sup>	8,08 <sup>A</sup>	2,97 <sup>B</sup>
Nacional	0,91 <sup>A</sup>	4,01 <sup>A</sup>	7,08 <sup>A</sup>	1,0 <sup>A</sup>	4,34 <sup>A</sup>	8,08 <sup>B</sup>	1,11 <sup>A</sup>	1,04 <sup>A</sup>	4,48 <sup>A</sup>	8,28 <sup>B</sup>	2,24 <sup>A</sup>

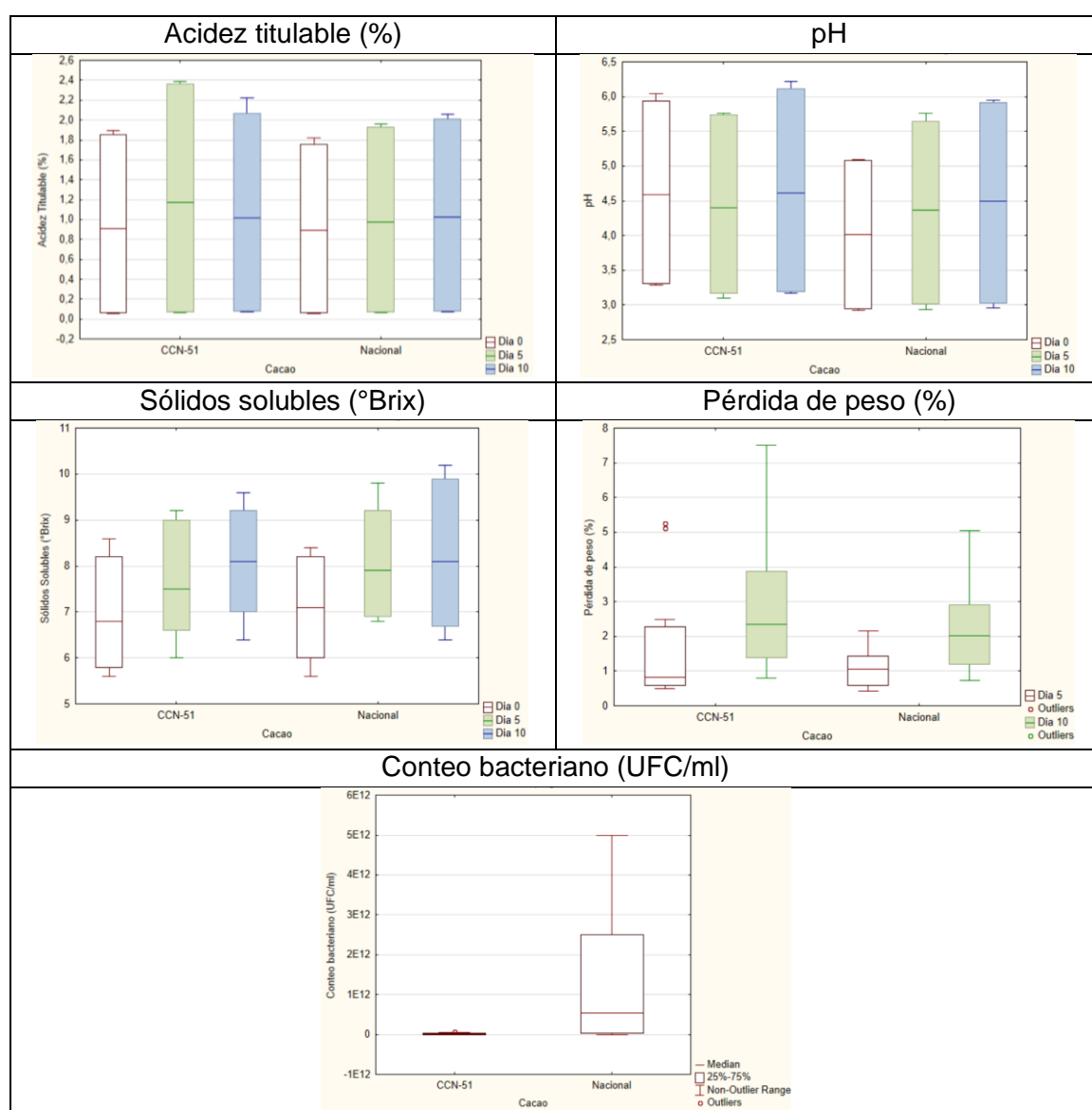
Tabla 29

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en la variable microbiológica

Factor A (Cacao)	Conteo bacteriano
CCN-51	$1,78625 \times 10^{10}$ (A)
Nacional	$1,3921875 \times 10^{12}$ (B)

Figura 3

Estudio del efecto de las variedades del mucílago de cacao (Factor A) en las variables de estudio



En la tabla 28, se observa que la variedad de cacao CCN-51 presentó mayor acidez, pH y pérdida de peso que la variedad de cacao Nacional en los tres tiempos de bioconservación; en cambio, los sólidos solubles son mayores en la variedad Nacional y en ambas variedades aumentan con el tiempo.

La acidez de la variedad CCN-51 aumenta de 0,95% a 1,21% en el día 5 pero disminuye a 1,08% al día 10. En la variedad Nacional, la acidez aumenta en los tres tiempos de bioconservación de 0,91% a 1,0% al día 5 y 1,04 al día 10.

En el pH, la variedad CCN-51 disminuye de 4,63 a 4,44 al día 5 pero aumenta al día 10 a 4,65. En cambio, el pH de la variedad Nacional aumenta con el tiempo, es decir, 4,01 a 4,34 al día 5 y 4,48 al día 10.

En la pérdida de peso, la variedad CCN-51 aumenta de 1,74% del día 5 a 2,97% al día 10. En la variedad Nacional ocurre lo mismo, aumenta de 1,11% del día 5 a 2,24% al día 10.

En el análisis microbiológico de conteo bacteriano en el día 10 de la bioconservación, el cacao Nacional presenta mayor población de bacterias con un valor de  $1,3921875 \times 10^{12}$  UFC/ml, en comparación a la variedad CCN-51 con  $1,78625 \times 10^{10}$  UFC/ml.

**Resultados del estudio para las frutas bioconservadas (Factor B)**

**Tabla 30**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables físico-químicas*

Factor B (Frutas)	Acidez titulable	pH	Día 0			Día 5			Día 10		
			Solidos solubles	Acidez titulable	pH	Solidos solubles	pH	Pérdida de peso	Acidez titulable	pH	Solidos solubles
Naranja	1,80 <sup>B</sup>	3,13 <sup>A</sup>	5,90 <sup>A</sup>	2,14 <sup>B</sup>	3,09 <sup>A</sup>	6,72 <sup>A</sup>	2,12 <sup>B</sup>	2,04 <sup>B</sup>	3,12 <sup>A</sup>	6,82 <sup>A</sup>	3,78 <sup>B</sup>
Papaya	0,07 <sup>A</sup>	5,51 <sup>B</sup>	8,16 <sup>B</sup>	0,07 <sup>A</sup>	5,69 <sup>B</sup>	9,05 <sup>B</sup>	0,72 <sup>A</sup>	0,08 <sup>A</sup>	6,01 <sup>B</sup>	9,55 <sup>B</sup>	1,43 <sup>A</sup>

**Tabla 31**

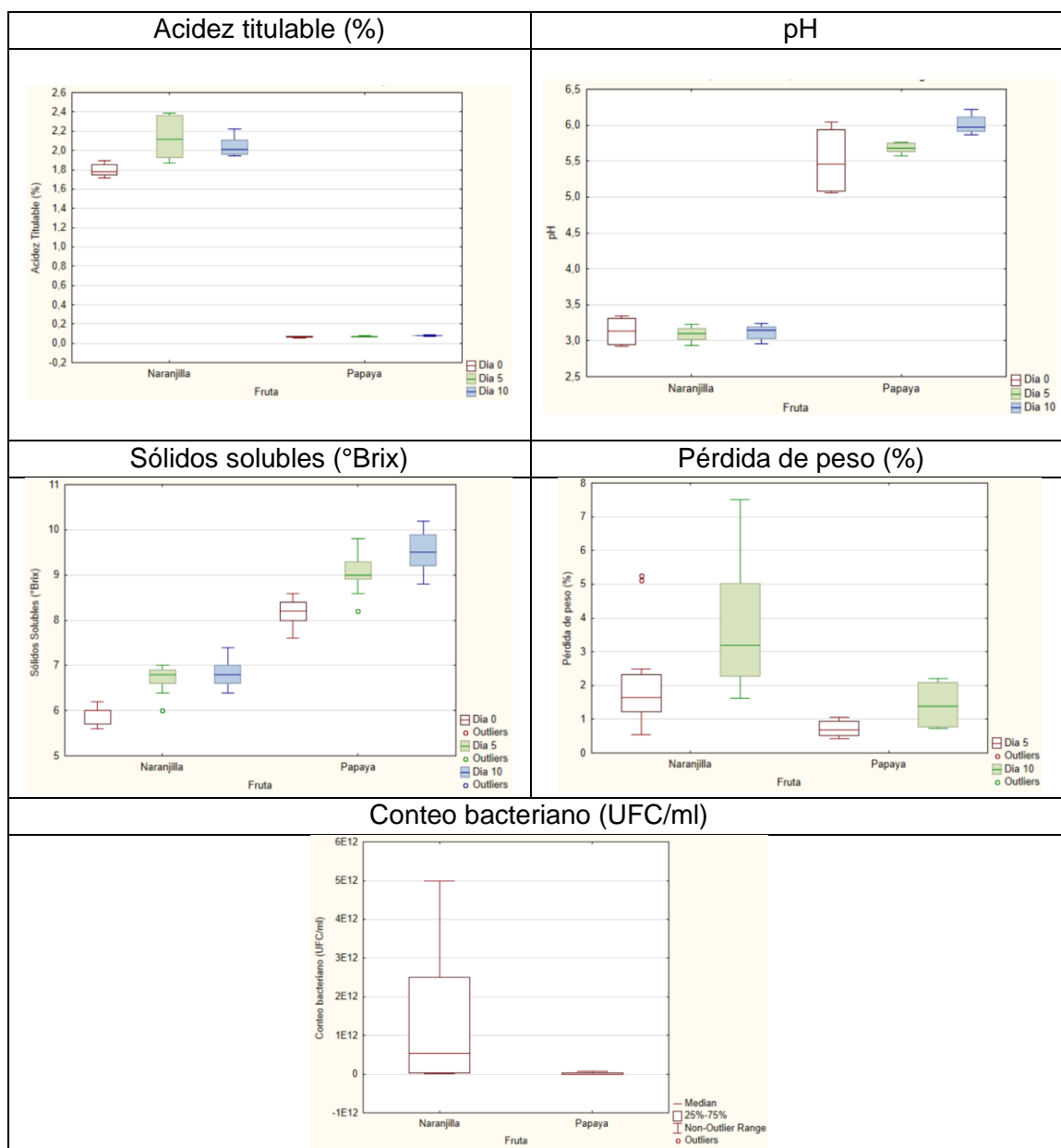
*Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en la variable microbiológica*

Factor B (Frutas)	Conteo bacteriano
Naranja	$1,391825 \times 10^{12}$ (B)
Papaya	$1,8225 \times 10^{10}$ (A)



Figura 4

Estudio del efecto de las frutas (Factor B) en las variables de estudio



En la tabla 30, se observa que la naranja presentó mayor acidez y pérdida de peso que la papaya, pero en pH y sólidos solubles la papaya presentó valores mayores que la naranja; esto en los tres tiempos de bioconservación.

La acidez de la naranjilla aumenta de 1,80% a 2,1% al día 5 y 2,04% al día 10. En la papaya, la acidez se mantiene desde día 0 al día 5 con 0,07% y aumenta a 0,08% al día 10.

En el pH, la naranjilla disminuye de 3,13 a 3,09 al día 5 y aumenta a 3,12 al día 10, siendo menor al día 0. En cambio, en la papaya, el pH aumenta con el tiempo, de 5,51 a 5,69 al día 5 y 6,01 al día 10.

En los sólidos solubles aumenta con el tiempo en las dos frutas. La naranjilla presentó 5,90°Brix a 6,72°Brix al día 5 y 6,82°Brix al día 10. La papaya aumentó de 8,16°Brix a 9,05°Brix al día 5 y 9,55°Brix al día 10.

Lo mismo sucedió con la pérdida de peso, este aumenta con el tiempo. La naranjilla aumentó de 2,12% en el día 5 a 3,78% al día 10. La papaya en el día 5 presentó 0,72% y aumentó a 1,43% al día 10.

En el análisis microbiológico de conteo bacteriano en el día 10 de la bioconservación, la naranjilla presentó mayor población de bacterias con un valor de  $1,391825 \times 10^{12}$  UFC/ml, en comparación a la papaya,  $1,8225 \times 10^{10}$  UFC/ml.

### **Resultados del estudio para la temperatura de bioconservación (Factor C)**

**Tabla 32**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor C en las variables físico-químicas*

Factor C (Temp.)	Acidez titulable	pH	Sólidos solubles	Acidez titulable	pH	Sólidos solubles	Pérdida de peso	Acidez titulable	pH	Sólidos solubles	Pérdida de peso
Refrigeración	0,94 <sup>B</sup>	4,32 <sup>A</sup>	6,85 <sup>A</sup>	1,10 <sup>A</sup>	4,34 <sup>A</sup>	7,68 <sup>A</sup>	0,86 <sup>A</sup>	1,10 <sup>B</sup>	4,53 <sup>A</sup>	7,97 <sup>A</sup>	1,5 <sup>A</sup>
Sin refrigeración	0,92 <sup>A</sup>	4,32 <sup>A</sup>	7,21 <sup>B</sup>	1,10 <sup>A</sup>	4,44 <sup>B</sup>	8,08 <sup>B</sup>	1,99 <sup>B</sup>	1,02 <sup>A</sup>	4,60 <sup>B</sup>	8,40 <sup>B</sup>	3,72 <sup>B</sup>

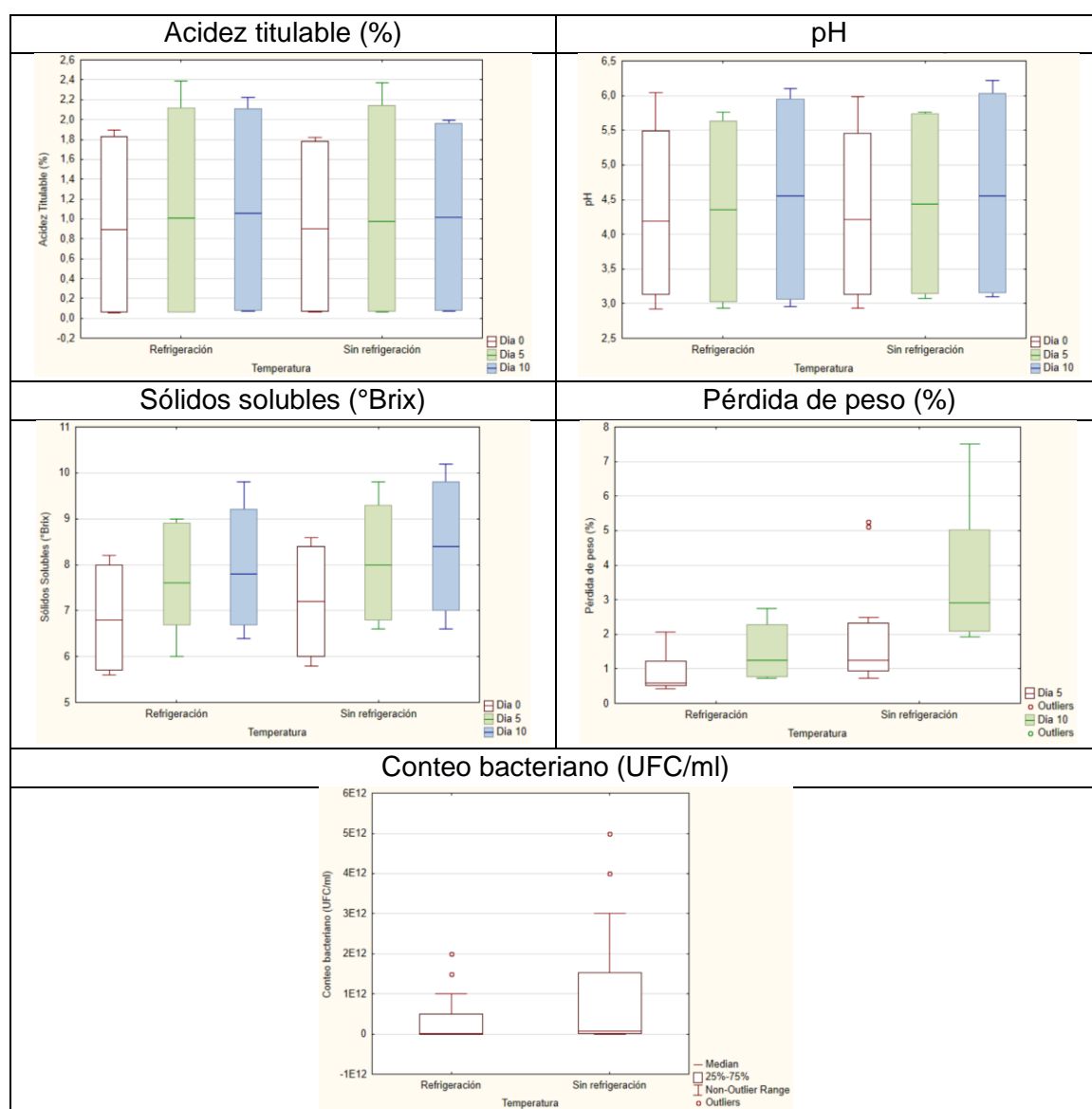
Tabla 33

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor C en la variable microbiológica

Factor C (Temperatura)	Conteo bacteriano
Refrigeración	$3,7965 \times 10^{11}$ (A)
Sin refrigeración	$1,0304 \times 10^{12}$ (B)

Figura 5

Estudio del efecto de la temperatura (Factor B) en las variables de estudio



En la tabla 32, la acidez en la bioconservación a refrigeración (0,94%) fue mayor que la bioconservación sin refrigeración (0,92%) en el día 0. Al día 5, la acidez en ambas temperaturas son iguales y aumentaron (1,10%). Al día 10, la bioconservación en refrigeración presentó nuevamente mayor acidez (1,10%) que la bioconservación sin refrigeración (1,02%).

El pH del día 0 fueron iguales en las dos temperaturas de bioconservación (4,32). Pero al día 5, la bioconservación sin refrigeración (4,44) presentó valores mayores a la bioconservación en refrigeración (4,34); sucediendo lo mismo al día 10, la bioconservación sin refrigeración con 4,60 y la de en refrigeración con 4,53.

Los sólidos solubles en las dos temperaturas de bioconservación aumentan con el tiempo, siendo mayor el de sin refrigeración. La bioconservación en refrigeración aumentó de 6,85°Brix a 7,68°Brix al día 5 y 7,97°Brix al día 10. La bioconservación sin refrigeración aumentó de 7,72°Brix a 8,08°Brix al día 5 y 8,40°Brix al día 10

Lo mismo sucedió en la pérdida de peso, la bioconservación en refrigeración del día 5 aumentó de 0,86% a 1,5% en el día 10; y la bioconservación sin refrigeración aumentó de 1,99% del día 5 a 3,72% en el día 10.

En el análisis microbiológico de conteo bacteriano en el día 10 de la bioconservación sin refrigeración presentó mayor población de bacterias ( $1,0304 \times 10^{12}$  UFC/ml) que la bioconservación en refrigeración ( $3,7965 \times 10^{11}$  UFC/ml).

**Prueba de Tukey para las interacciones significativas en la bioconservación.**

**Análisis de Tukey en la interacción A\*B (Cacao\*Fruta)**

**Tabla 34**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B en las variables físico-químicas del día 0*

Factor A (Cacao)	Factor B (Fruta)	Acidez titulable	pH
Día 0			
CCN-51	Naranja	1,84 <sup>C</sup>	3,32 <sup>B</sup>
CCN-51	Papaya	0,07 <sup>A</sup>	5,94 <sup>D</sup>
Nacional	Naranja	1,76 <sup>B</sup>	2,95 <sup>A</sup>
Nacional	Papaya	0,07 <sup>A</sup>	5,08 <sup>C</sup>

**Tabla 35**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B en las variables físico-químicas del día 5*

Factor A (Cacao)	Factor B (Fruta)	Acidez titulable	pH	Pérdida de peso
Día 5				
CCN-51	Naranja	2,35 <sup>C</sup>	3,17 <sup>B</sup>	2,83 <sup>B</sup>
CCN-51	Papaya	0,07 <sup>A</sup>	5,71 <sup>C</sup>	0,65 <sup>A</sup>
Nacional	Naranja	1,92 <sup>B</sup>	3,02 <sup>A</sup>	1,42 <sup>A</sup>
Nacional	Papaya	0,07 <sup>A</sup>	5,67 <sup>C</sup>	0,79 <sup>A</sup>

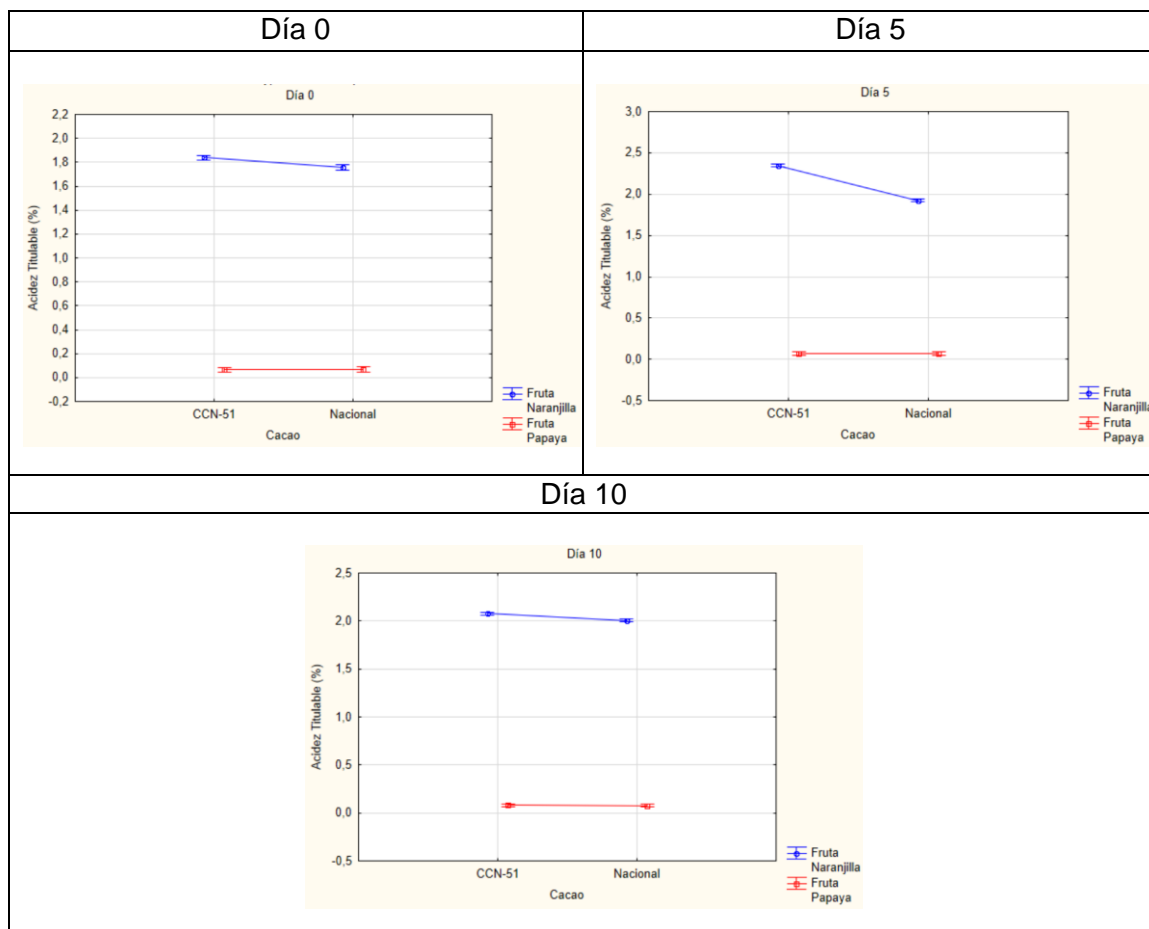
**Tabla 36**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B en las variables físico-químicas y microbiológica del día 10*

Factor A (Cacao)	Factor B (Fruta)	Acidez titulable	Sólidos solubles	Pérdida de peso	Conteo bacteriano
Día 10					
CCN-51	Naranja	2,08 <sup>C</sup>	6,97 <sup>B</sup>	4,53 <sup>C</sup>	3,365×10 <sup>10</sup> (A)
CCN-51	Papaya	0,08 <sup>A</sup>	9,20 <sup>C</sup>	1,41 <sup>A</sup>	2,075×10 <sup>9</sup> (A)
Nacional	Naranja	2,01 <sup>B</sup>	6,67 <sup>A</sup>	3,03 <sup>B</sup>	2,75×10 <sup>12</sup> (B)
Nacional	Papaya	0,08 <sup>A</sup>	9,90 <sup>D</sup>	1,46 <sup>A</sup>	3,4375×10 <sup>10</sup> (A)

Figura 6

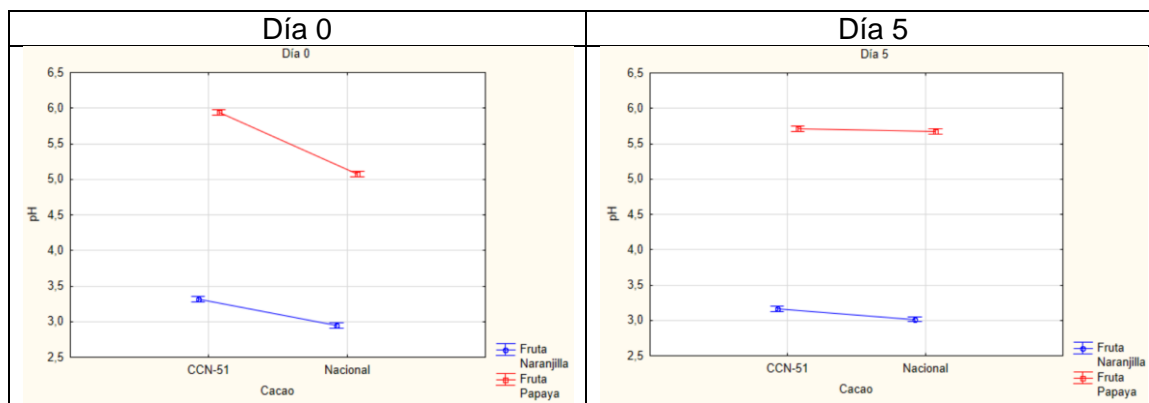
*Estudio del efecto de la interacción A\*B en la variable acidez titulable*



En la figura 6 (interacción A\*B de acidez titulable), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades de mucilago de cacao y las frutas, en el cual, la naranja bioconservada con BAL proveniente de la fermentación de ambas variedades de cacao, presentaron valores mayores de acidez en comparación a la papaya, en los tres tiempos de bioconservación.

**Figura 7**

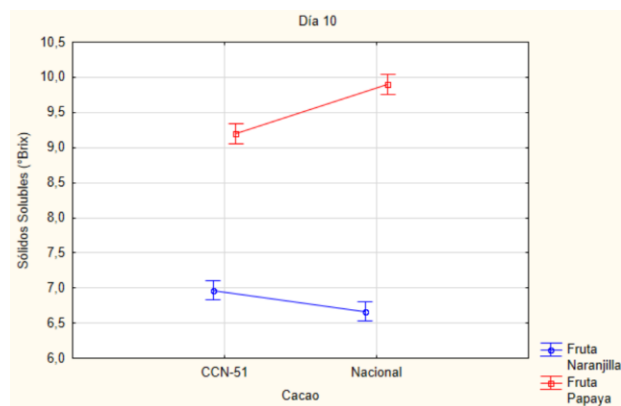
*Estudio del efecto de la interacción A\*B en la variable pH*



En la figura 7 (interacción A\*B del pH), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades de mucilago de cacao y las frutas, en el cual, la papaya bioconservada con BAL proveniente de la fermentación de ambas variedades de cacao, presentaron valores mayores de pH en comparación a la naranjilla, desde el día 0 hasta el día 5 de bioconservación.

**Figura 8**

*Estudio del efecto de la interacción A\*B en la variable sólidos solubles*

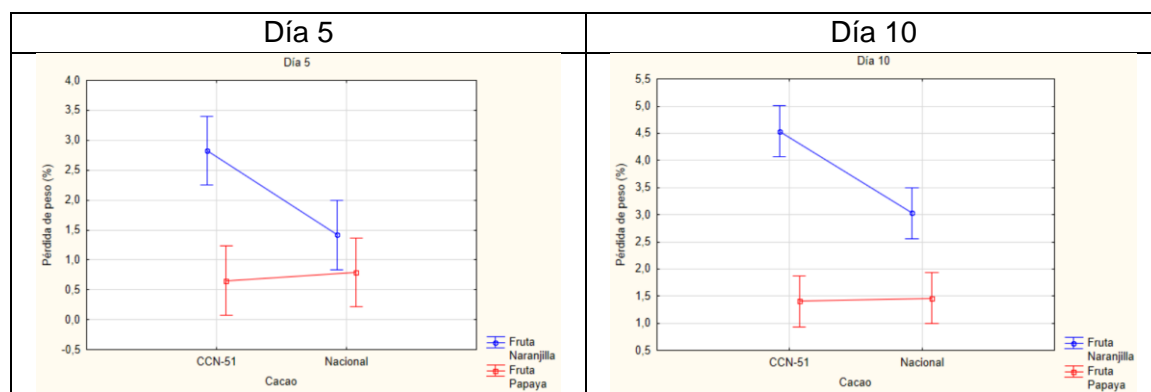


En la figura 8 (interacción A\*B de sólidos solubles), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades mucilago de cacao y las frutas, en el

cual, la papaya bioconservada con BAL proveniente de la fermentación de ambas variedades de cacao, presentaron valores mayores de grados Brix en comparación a la naranjilla, al día 10 de bioconservación.

### Figura 9

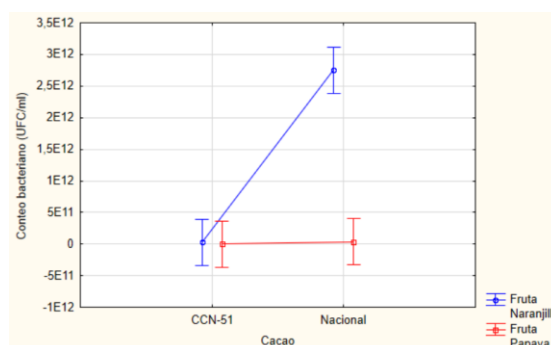
*Estudio del efecto de la interacción A\*B en la variable pérdida de peso*



En la figura 9 (interacción A\*B de pérdida de peso), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades mucilago de cacao y las frutas, en el cual, la naranjilla bioconservada con BAL proveniente de la fermentación de ambas variedades de cacao, presentaron valores mayores de pérdida de peso en comparación a la papaya, a los días 5 y 10 de bioconservación.

### Figura 10

*Estudio del efecto de la interacción A\*B en la variable conteo bacteriano*





En la figura 10 (interacción A\*B de conteo bacteriano), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades mucilago de cacao y las frutas, en el cual, la naranjilla bioconservada con BAL proveniente de la fermentación de la variedad Nacional, presentó mayor población de bacterias en comparación a la variedad CCN-51 y la papaya.

#### **Análisis de Tukey en la interacción A\*C (Cacao\*Temperatura)**

**Tabla 37**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*C en las variables físico-químicas del día 0*

<b>Factor A (Cacao)</b>	<b>Factor C (Temperatura)</b>	<b>Acidez titulable</b>	<b>Solidos solubles</b>
Día 0			
CCN-51	Refrigeración	0,98 <sup>B</sup>	6,73 <sup>A</sup>
CCN-51	Sin refrigeración	0,93 <sup>A</sup>	7,22 <sup>C</sup>
Nacional	Refrigeración	0,90 <sup>A</sup>	6,97 <sup>B</sup>
Nacional	Sin refrigeración	0,92 <sup>A</sup>	7,20 <sup>C</sup>

**Tabla 38**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*C en las variables físico-químicas del día 5*

<b>Factor A (Cacao)</b>	<b>Factor C (Temperatura)</b>	<b>Acidez titulable</b>
Día 5		
CCN-51	Refrigeración	1,20 <sup>B</sup>
CCN-51	Sin refrigeración	1,22 <sup>B</sup>
Nacional	Refrigeración	1,01 <sup>A</sup>
Nacional	Sin refrigeración	0,98 <sup>A</sup>

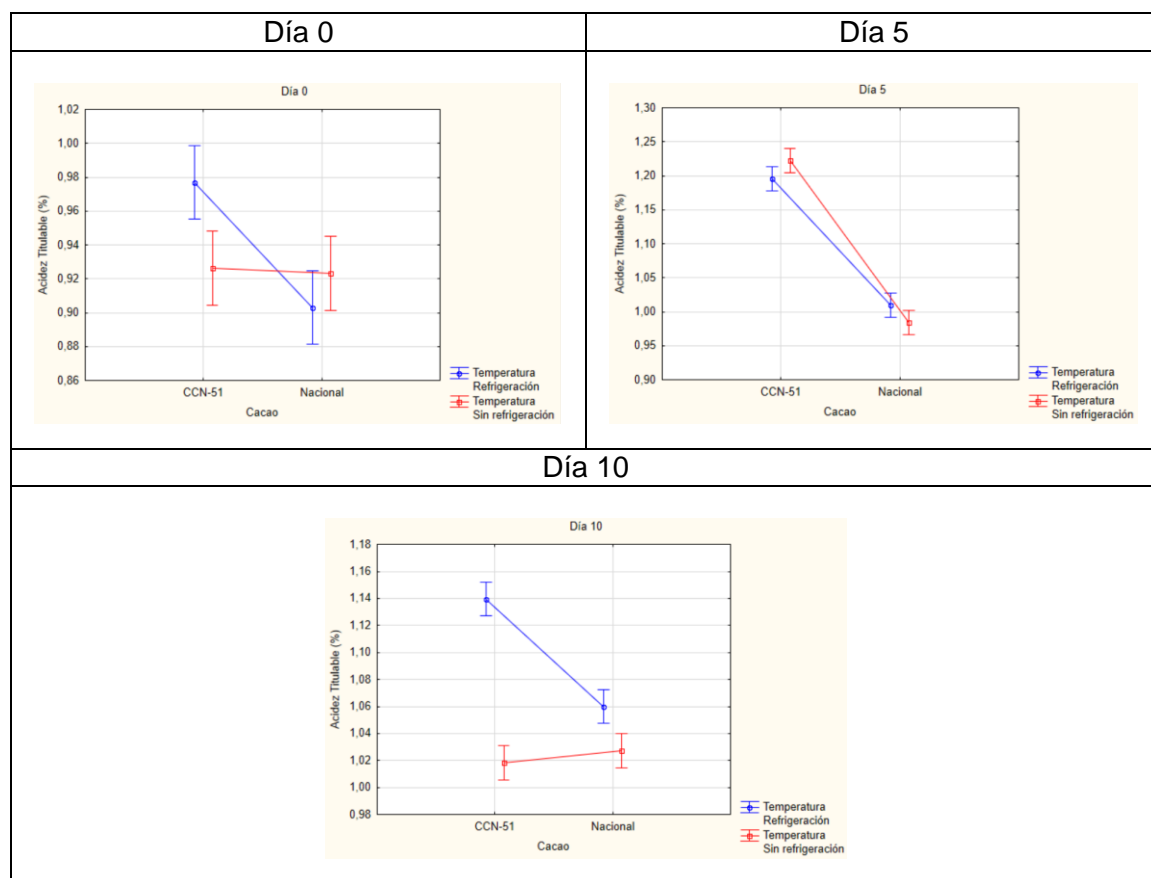
Tabla 39

Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*C en las variables físico-químicas y microbiológica del día 10

Factor A (Cacao)	Factor C (Temperatura)	Acidez titulable	Conteo bacteriano
Día 10			
CCN-51	Refrigeración	1,14 <sup>C</sup>	8,25×10 <sup>9</sup> (A)
CCN-51	Sin refrigeración	1,02 <sup>A</sup>	2,7475×10 <sup>10</sup> (A)
Nacional	Refrigeración	1,06 <sup>B</sup>	7,5105×10 <sup>11</sup> (B)
Nacional	Sin refrigeración	1,03 <sup>A</sup>	2.033325×10 <sup>12</sup> (C)

Figura 11

Estudio del efecto de la interacción A\*C en la variable acidez titulable

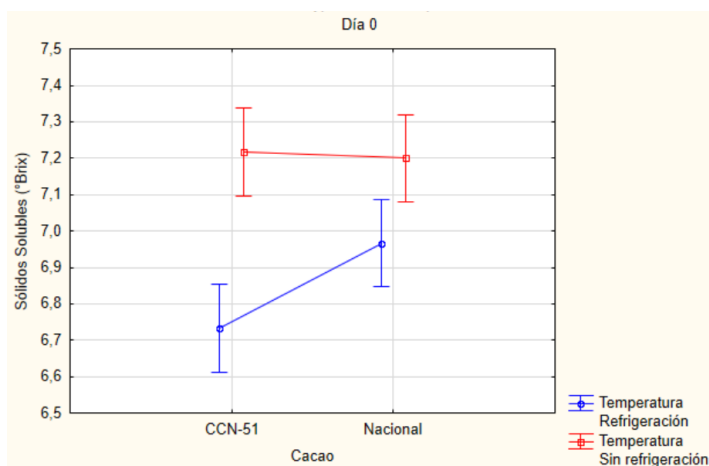


En la figura 11 (interacción A\*C de acidez titulable), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades de mucilago de cacao y la temperatura de bioconservación.

Al día 0, la bioconservación con las BAL proveniente de la fermentación de la variedad CCN-51 y en refrigeración, presentó mayor acidez en comparación a la bioconservación sin refrigeración y con la variedad Nacional. En cambio, al día 5, la bioconservación con la variedad CCN-51 y las dos temperaturas presentaron mayor acidez. Y en el día 10, la bioconservación con la variedad CCN-51 y en refrigeración fue el que mayor valor de acidez presentó.

### Figura 12

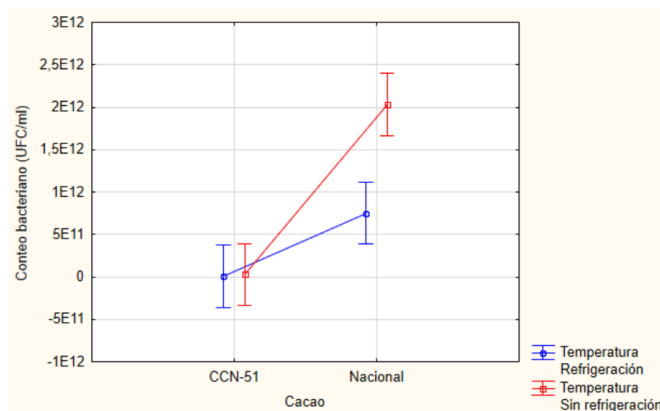
*Estudio del efecto de la interacción A\*C en la variable sólidos solubles*



En la figura 12 (interacción A\*C), se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades de mucilago de cacao y la temperatura, presentando mayor sólidos solubles en la bioconservación con las dos variedades y sin refrigeración, en comparación a la bioconservación en refrigeración.

**Figura 13**

Estudio del efecto de la interacción A\*C en la variable conteo bacteriano



En la figura 13 (interacción A\*C) en el día 10 de bioconservación, se observa que existe diferencia significativa respecto a las variedades de mucilago de cacao y la temperatura, presentando poblaciones bacterianas mayores en la bioconservación de las BAL proveniente de la fermentación del mucílago de cacao Nacional y las dos temperaturas.

#### Análisis de Tukey en la interacción B\*C (Fruta\*Temperatura)

**Tabla 40**

Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción B\*C en las variables físico-químicas del día 0

Factor B (Fruta)	Factor C (Temperatura)	Acidez titulable
Dia 0		
Naranja	Refrigeración	1,82 <sup>B</sup>
Naranja	Sin refrigeración	1,78 <sup>B</sup>
Papaya	Refrigeración	0,06 <sup>A</sup>
Papaya	Sin refrigeración	0,07 <sup>A</sup>

**Tabla 41**

Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción B\*C en las variables físico-químicas del día 5

Factor B (Fruta)	Factor C (Temperatura)	Pérdida de peso
Día 5		
Naranja	Refrigeración	1,19 <sup>A</sup>
Naranja	Sin refrigeración	3,06 <sup>B</sup>
Papaya	Refrigeración	0,52 <sup>A</sup>
Papaya	Sin refrigeración	0,92 <sup>A</sup>

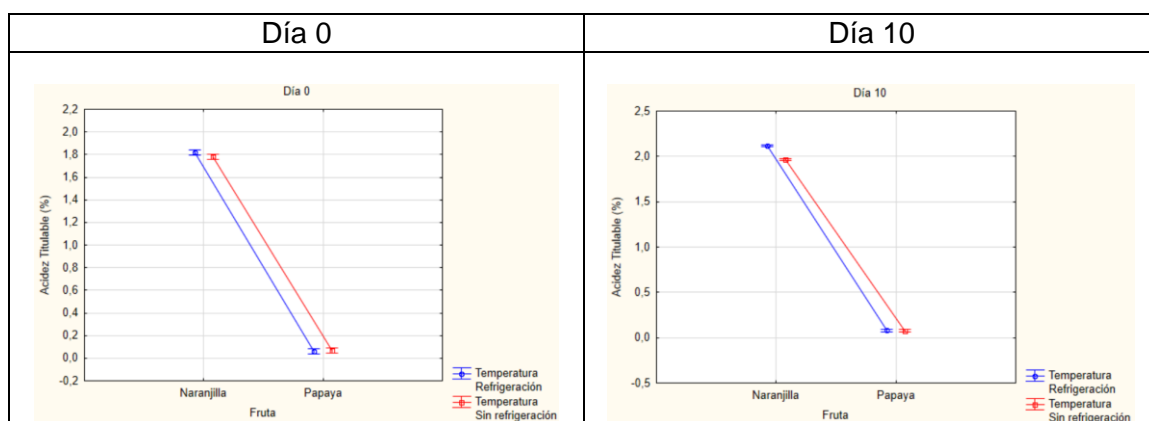
**Tabla 42**

Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción B\*C en las variables físico-químicas y microbiológica del día 10

Factor B (Fruta)	Factor C (Temperatura)	Acidez titulable	Pérdida de peso	Conteo bacteriano
Día 10				
Naranja	Refrigeración	2,12 <sup>C</sup>	2,21 <sup>B</sup>	7,564×10 <sup>11</sup> (B)
Naranja	Sin refrigeración	1,97 <sup>B</sup>	5,53 <sup>C</sup>	2,02725×10 <sup>12</sup> (C)
Papaya	Refrigeración	0,08 <sup>A</sup>	0,78 <sup>A</sup>	2,9×10 <sup>9</sup> (A)
Papaya	Sin refrigeración	0,08 <sup>A</sup>	2,09 <sup>B</sup>	3,355×10 <sup>10</sup> (A)

**Figura 14**

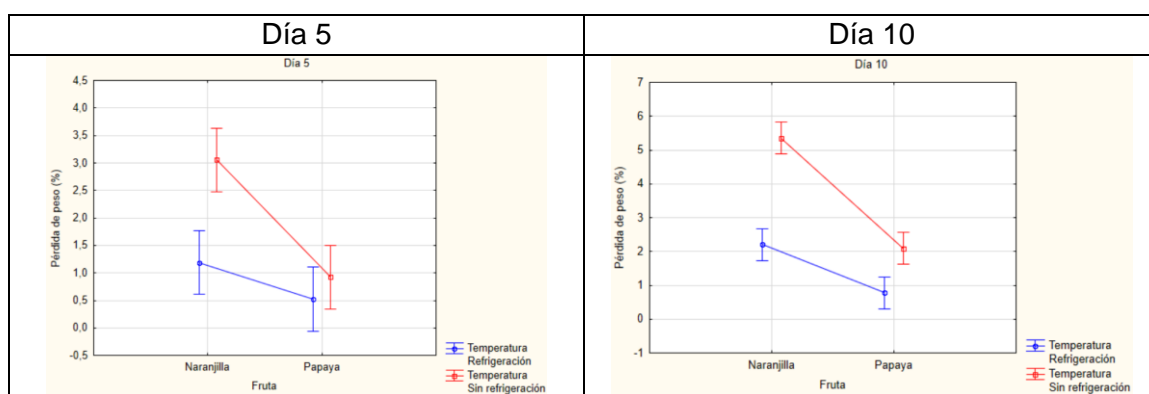
Estudio del efecto de la interacción B\*C en la variable acidez titulable



En la figura 14 (interacción B\*C), se observa que existe diferencia significativa respecto a la bioconservación de las frutas y la temperatura en el día 0 y día 10, el cual, presentó mayor acidez la naranjilla bioconservada en las dos temperaturas en comparación a la papaya que fue menor.

### Figura 15

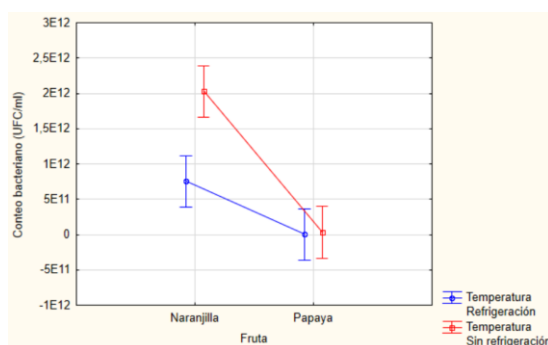
*Estudio del efecto de la interacción B\*C en la variable pérdida de peso*



En la figura 15 (interacción B\*C), se observa que existe diferencia significativa en las frutas y la temperatura de bioconservación en el día 5 y día 10, en el cual, la naranjilla bioconservada sin refrigeración presentó mayor pérdida de peso, en comparación a la papaya bioconservada con las dos temperaturas utilizadas.

### Figura 16

*Estudio del efecto de la interacción B\*C en la variable conteo bacteriano*



En la figura 16 (interacción B\*C), se observa que existe diferencia significativa respecto a las frutas y temperatura de bioconservación, en el cual, presentó poblaciones bacterianas mayores en la naranjilla bioconservada sin refrigeración, en comparación a la papaya bioconservada en refrigeración, que presentó menos población bacteriana.

#### **Análisis de Tukey en la interacción A\*B\*C (Cacao\*Fruta\*Temperatura)**

**Tabla 43**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B\*C en las variables físico-químicas del día 0*

<b>Factor A (Cacao)</b>	<b>Factor B (Fruta)</b>	<b>Factor C (Temperatura)</b>	<b>Acidez titulable</b>	<b>pH</b>	<b>Solidos solubles</b>
Día 0					
CCN-51	Naranjilla	Refrigeración	1,89 <sup>C</sup>	3,31 <sup>B</sup>	5,67 <sup>A</sup>
CCN-51	Naranjilla	Sin refrigeración	1,78 <sup>B</sup>	3,33 <sup>B</sup>	5,93 <sup>AB</sup>
CCN-51	Papaya	Refrigeración	0,06 <sup>A</sup>	5,97 <sup>D</sup>	7,80 <sup>C</sup>
CCN-51	Papaya	Sin refrigeración	0,07 <sup>A</sup>	5,91 <sup>D</sup>	8,50 <sup>E</sup>
Nacional	Naranjilla	Refrigeración	1,74 <sup>B</sup>	2,95 <sup>A</sup>	5,87 <sup>AB</sup>
Nacional	Naranjilla	Sin refrigeración	1,78 <sup>B</sup>	2,95 <sup>A</sup>	6,13 <sup>B</sup>
Nacional	Papaya	Refrigeración	0,06 <sup>A</sup>	5,08 <sup>C</sup>	8,07 <sup>CD</sup>
Nacional	Papaya	Sin refrigeración	0,07 <sup>A</sup>	5,08 <sup>C</sup>	8,27 <sup>DE</sup>

**Tabla 44**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B\*C en las variables físico-químicas del día 5*

<b>Factor A (Cacao)</b>	<b>Factor B (Fruta)</b>	<b>Factor C (Temperatura)</b>	<b>Acidez titulable</b>	<b>pH</b>	<b>Solidos solubles</b>	<b>Pérdida de peso</b>
Día 5						
CCN-51	Naranjilla	Refrigeración	2,33 <sup>C</sup>	3,12 <sup>BC</sup>	6,33 <sup>A</sup>	1,36 <sup>A</sup>
CCN-51	Naranjilla	Sin refrigeración	2,37 <sup>C</sup>	3,22 <sup>C</sup>	6,73 <sup>AB</sup>	4,29 <sup>B</sup>
CCN-51	Papaya	Refrigeración	0,06 <sup>A</sup>	5,67 <sup>D</sup>	8,60 <sup>C</sup>	0,52 <sup>A</sup>
CCN-51	Papaya	Sin refrigeración	0,07 <sup>A</sup>	5,75 <sup>D</sup>	9,07 <sup>CD</sup>	0,79 <sup>A</sup>
Nacional	Naranjilla	Refrigeración	1,95 <sup>B</sup>	2,95 <sup>A</sup>	6,87 <sup>AB</sup>	1,02 <sup>A</sup>
Nacional	Naranjilla	Sin refrigeración	1,90 <sup>B</sup>	3,09 <sup>B</sup>	6,93 <sup>B</sup>	1,82 <sup>A</sup>
Nacional	Papaya	Refrigeración	0,07 <sup>A</sup>	5,64 <sup>D</sup>	8,93 <sup>C</sup>	0,53 <sup>A</sup>
Nacional	Papaya	Sin refrigeración	0,07 <sup>A</sup>	5,71 <sup>D</sup>	9,60 <sup>D</sup>	1,05 <sup>A</sup>

**Tabla 45**

*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B\*C en las variables físico-químicas día 10*

<b>Factor A (Cacao)</b>	<b>Factor B (Fruta)</b>	<b>Factor C (Temperatura)</b>	<b>Acidez titulable</b>	<b>pH</b>	<b>Solidos solubles</b>	<b>Pérdida de peso</b>
Día 10						
CCN-51	Naranja	Refrigeración	2,20 <sup>D</sup>	3,21 <sup>B</sup>	6,67 <sup>A</sup>	2,70 <sup>B</sup>
CCN-51	Naranja	Sin refrigeración	1,96 <sup>B</sup>	3,19 <sup>B</sup>	7,27 <sup>B</sup>	6,36 <sup>D</sup>
CCN-51	Papaya	Refrigeración	0,08 <sup>A</sup>	6,05 <sup>D</sup>	8,93 <sup>C</sup>	0,83 <sup>A</sup>
CCN-51	Papaya	Sin refrigeración	0,08 <sup>A</sup>	6,17 <sup>E</sup>	9,47 <sup>D</sup>	1,99 <sup>AB</sup>
Nacional	Naranja	Refrigeración	2,04 <sup>C</sup>	2,97 <sup>A</sup>	6,60 <sup>A</sup>	1,72 <sup>AB</sup>
Nacional	Naranja	Sin refrigeración	1,98 <sup>B</sup>	3,12 <sup>B</sup>	6,73 <sup>A</sup>	4,34 <sup>C</sup>
Nacional	Papaya	Refrigeración	0,08 <sup>A</sup>	5,90 <sup>C</sup>	9,67 <sup>D</sup>	0,74 <sup>A</sup>
Nacional	Papaya	Sin refrigeración	0,08 <sup>A</sup>	5,94 <sup>C</sup>	10,13 <sup>E</sup>	2,19 <sup>AB</sup>

**Tabla 46**

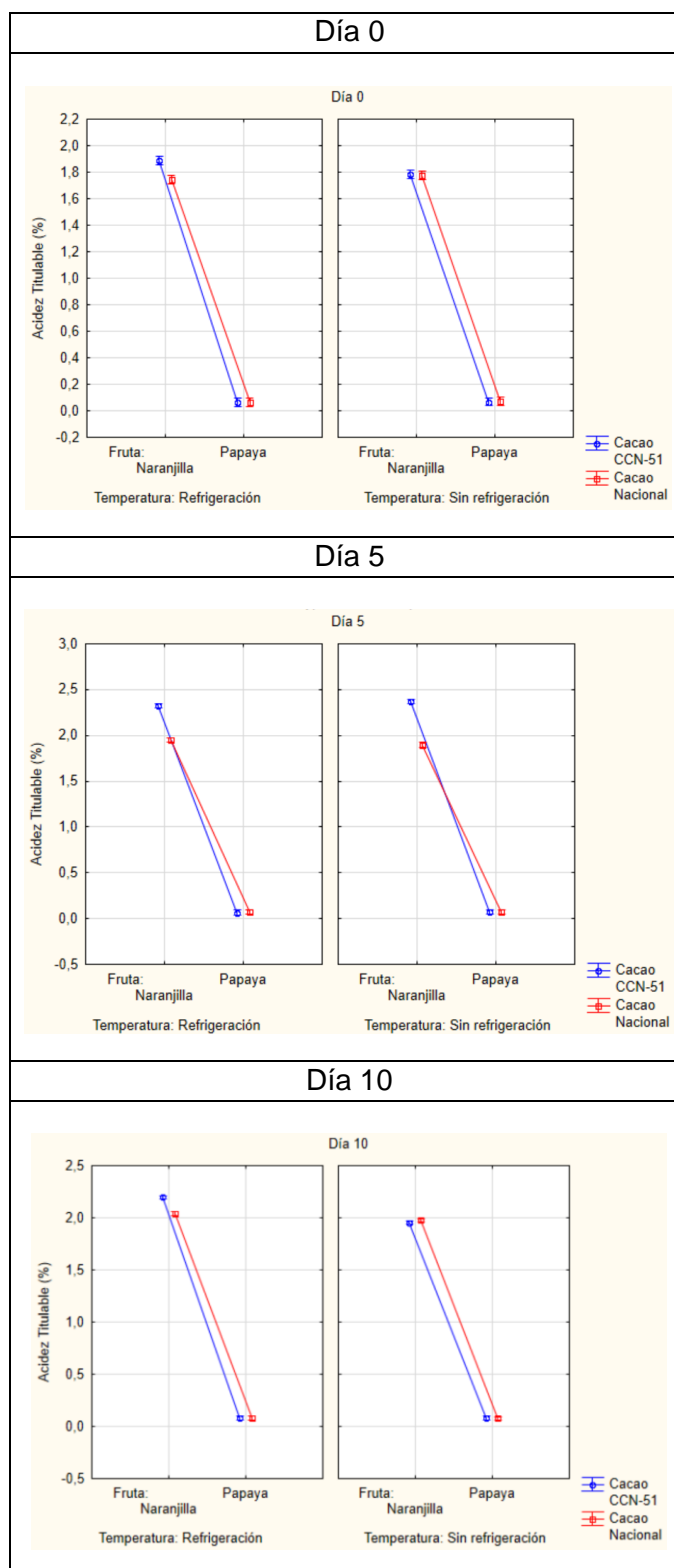
*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A\*B\*C en la variable conteo bacteriano*

<b>Factor A (Cacao)</b>	<b>Factor B (Fruta)</b>	<b>Factor C (Temperatura)</b>	<b>Conteo bacteriano</b>
CCN-51	Naranja	Refrigeración	1,28×10 <sup>10</sup> (A)
CCN-51	Naranja	Sin refrigeración	5,45×10 <sup>10</sup> (A)
CCN-51	Papaya	Refrigeración	3,7×10 <sup>9</sup> (A)
CCN-51	Papaya	Sin refrigeración	4,5×10 <sup>8</sup> (A)
Nacional	Naranja	Refrigeración	1,5×10 <sup>12</sup> (B)
Nacional	Naranja	Sin refrigeración	4×10 <sup>12</sup> (C)
Nacional	Papaya	Refrigeración	2,1×10 <sup>9</sup> (A)
Nacional	Papaya	Sin refrigeración	6,665×10 <sup>10</sup> (A)



Figura 17

Estudio del efecto de la interacción A\*B\*C en la variable acidez titulable



Los resultados obtenidos de la acidez titulable en la figura 17, se observa que en los tres tiempos de bioconservación, los tratamientos en el que intervienen la naranjilla presentaron valores mayores en comparación a la papaya.

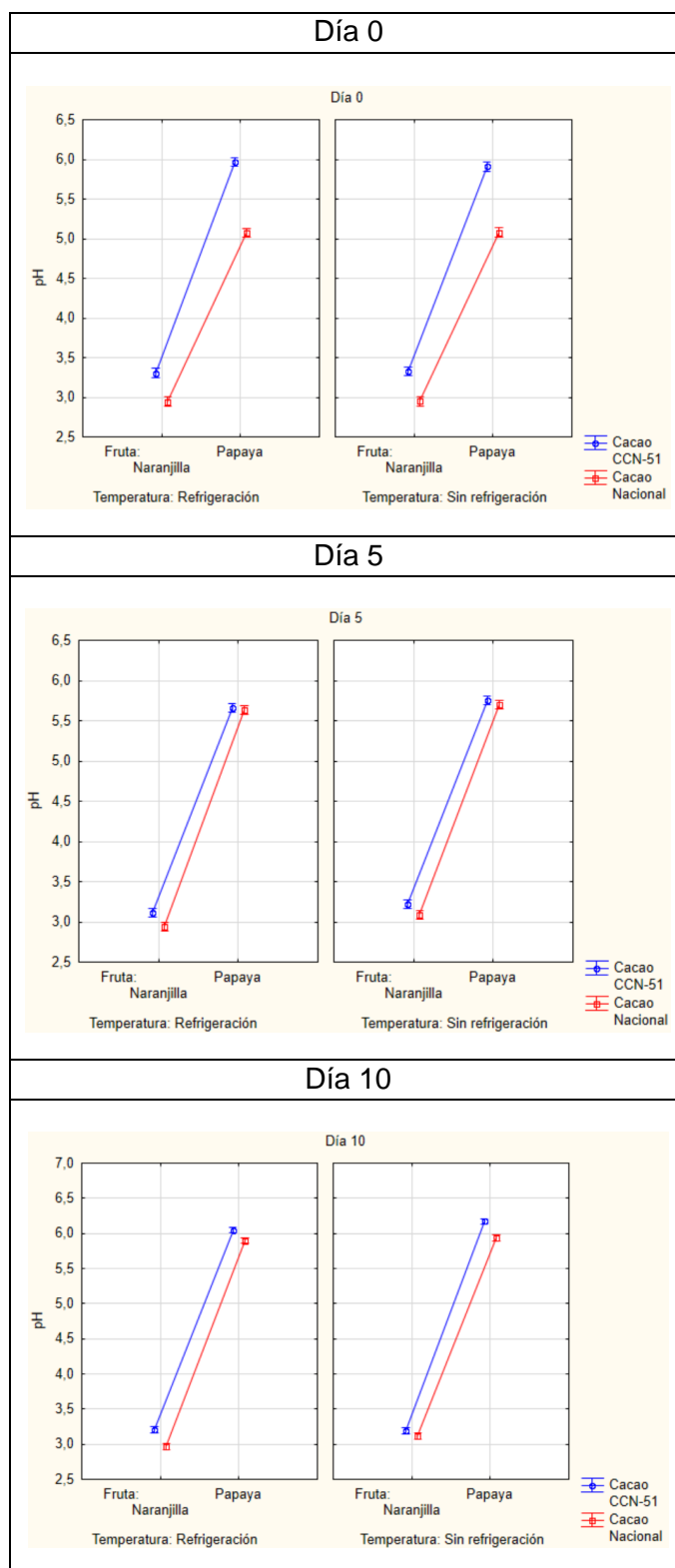
En el día 0, la bioconservación de la naranjilla aplicando BAL de la variedad de cacao CCC-51 en refrigeración obtuvo el mayor porcentaje de acidez de 1,89%, e igual forma, los tratamientos de la naranjilla bioconservada con la variedad CCN-51 sin refrigeración, la variedad Nacional sin refrigeración y en refrigeración con una media de 1,18%, 1,74% y 1,78% respectivamente. Mientras que la papaya bioconservada con CCN-51 y Nacional en refrigeración y sin refrigeración presentaron valores similares de 0,06% y 0,07% respectivamente.

De igual forma, sucedió al día 5, la bioconservación de la naranjilla aplicando BAL de la variedad de cacao CCC-51 en refrigeración y sin refrigeración, obtuvieron el mayor porcentaje de acidez de 2,33% y 2,37% respectivamente; de igual forma, la variedad Nacional en refrigeración y sin refrigeración con valores de 1,95% y 1,90% respectivamente. Mientras que la papaya bioconservada con CCN-51 en refrigeración presentó la acidez más baja de 0,06%, siendo similares a 0,07% de los tratamientos con la variedad CCN-51 sin refrigeración y la variedad Nacional con las dos temperaturas de bioconservación.

De acuerdo al día 10, la bioconservación de la naranjilla aplicando BAL de la variedad de cacao CCC-51 en refrigeración obtuvo el mayor porcentaje de acidez de 2,20%, seguido del tratamiento con la variedad de Nacional con 2,04%. En cambio, la bioconservación de la naranjilla sin refrigeración con la variedad CCN-51 y Nacional fueron de 1,96% y 1,98% respectivamente. En cambio, los tratamientos aplicados en la para la bioconservación de la papaya, presentaron todos 0,08%.

Figura 18

Estudio del efecto de la interacción A\*B\*C en la variable pH



De acuerdo a la figura 18 sobre el pH, se observa que en los tres tiempos de bioconservación, los tratamientos en el que participa la papaya presentaron valores mayores que a la naranjilla.

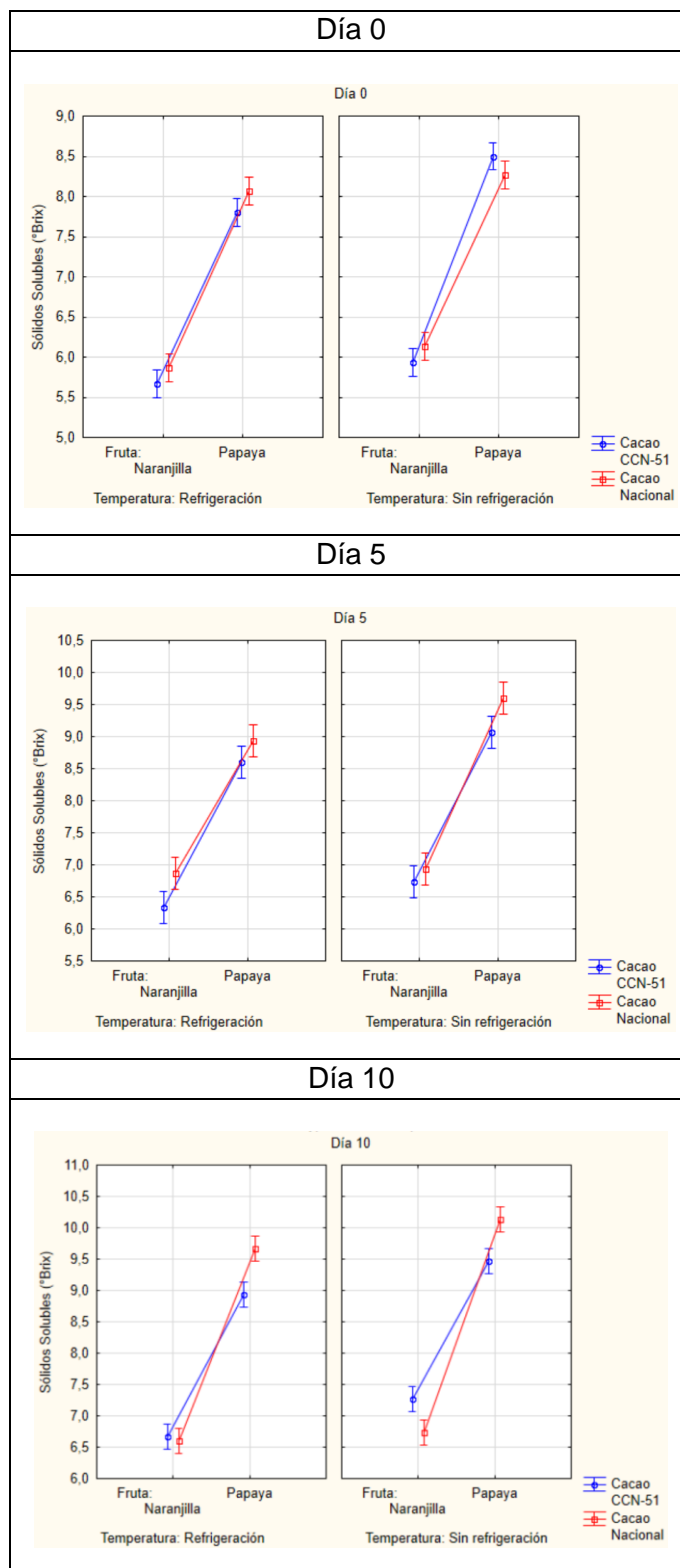
En el día 0, la bioconservación de la papaya con BAL de la variedad de cacao CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración presentaron pH mayores de 5,97 y 5,91 respectivamente; seguido de la variedad Nacional con 5,08. Mientras que la bioconservación con naranjilla fueron pH menores, como la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración de 3,31 y 3,3 respectivamente, seguido de la variedad Nacional con 2,95.

De la misma manera, al día 5, la bioconservación de la papaya con BAL de la variedad de cacao CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración presentaron pH mayores de 5,67 y 5,75 respectivamente, siendo similares en la variedad Nacional con 5,64 y 5,71. Mientras que la bioconservación con naranjilla fueron pH menores, como la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración de 3,12 y 3,22 respectivamente, seguido de la variedad nacional en refrigeración y sin refrigeración de 2,95 y 3,09 respectivamente.

Al día 10, la bioconservación de la papaya aplicando BAL de la variedad de cacao CCC-51 sin refrigeración obtuvo el mayor valor de 6,17, seguido del tratamiento en refrigeración con 6,07; y con la variedad Nacional en refrigeración y sin refrigeración presentó 5,90 y 5,94 respectivamente. En cambio, la bioconservación de la naranjilla con la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración presentaron 3,21 y 3,19 respectivamente; seguido de la variedad Nacional en refrigeración y sin refrigeración que obtuvieron 2,97 y 3,12; siendo valores de pH menores a la papaya.

Figura 19

Estudio del efecto de la interacción A\*B\*C en la variable sólidos solubles



Los datos obtenidos en la figura 19 sobre los sólidos solubles, se observa que los tratamientos con papaya presentaron valores mayores que a la naranjilla en los tres tiempos de bioconservación.

En el día 0, la bioconservación de la papaya aplicando BAL de la variedad de cacao Nacional sin refrigeración presentó los valores más altos de sólidos solubles con una media de 8,50°Brix; seguido de la variedad Nacional en refrigeración y sin refrigeración con 8,07°Brix y 8,27°Brix respectivamente; y en la variedad CCN-51 en refrigeración con 7,80°Brix. Mientras que la bioconservación con naranjilla fueron valores menores, como la variedad Nacional en refrigeración y sin refrigeración con 5,87°Brix y 6,13°Brix respectivamente, seguido de la variedad CCN-51 con 5,67°Brix y 5,93°Brix en refrigeración y sin refrigeración respectivamente.

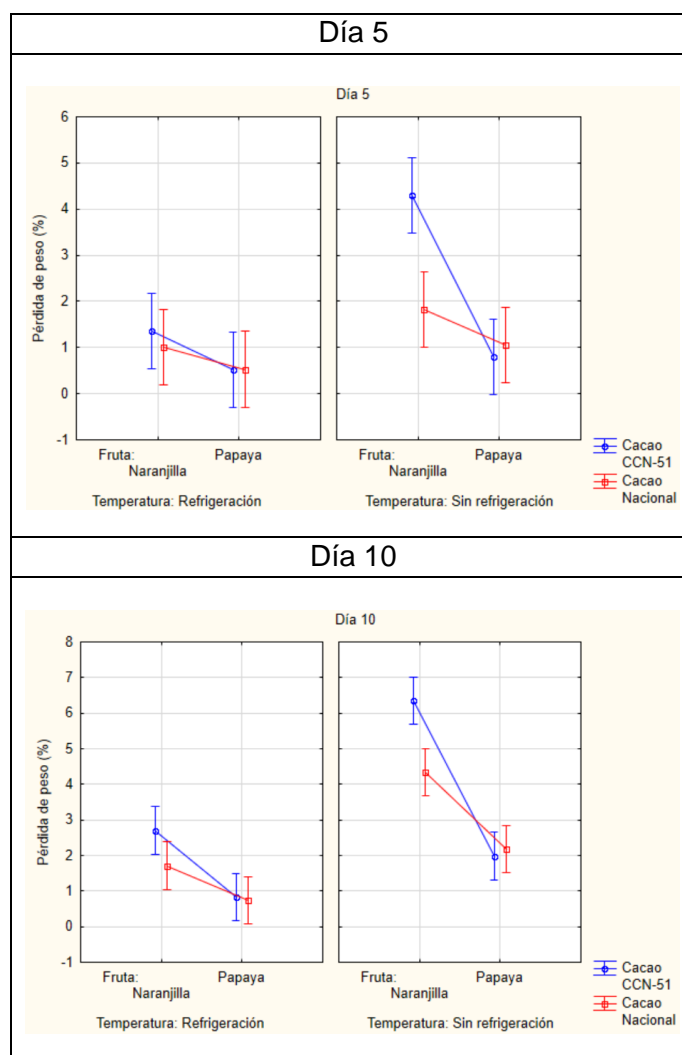
Al día 5, igualmente la bioconservación de la papaya con la variedad Nacional sin refrigeración presentó el valor más alto de sólidos solubles con una media de 9,60°Brix; seguido de la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración con 8,60°Brix y 9,07°Brix respectivamente; y en la variedad Nacional en refrigeración con 8,93°Brix. En cambio, la bioconservación con naranjilla fueron valores menores, la variedad Nacional en refrigeración y sin refrigeración con 6,87°Brix y 6,93°Brix respectivamente, seguido de la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración con 6,33°Brix y 6,73°Brix respectivamente.

En el día 10, la bioconservación de la papaya con la variedad Nacional sin refrigeración presentó el valor más alto de sólidos solubles con una media de 10,13°Brix; seguido de la variedad Nacional en refrigeración y CCN51 sin refrigeración con 9,77°Brix y 9,47°Brix respectivamente; y en la variedad CCN-51 en refrigeración con 8,93°Brix. Mientras que la bioconservación con naranjilla fueron valores menores, como la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración con 6,67°Brix y 7,27°Brix

respectivamente, seguido de la variedad Nacional-51 en refrigeración y sin refrigeración con 6,60°Brix y 6,73°Brix en refrigeración y sin refrigeración respectivamente.

## Figura 20

*Estudio del efecto de la interacción A\*B\*C en la variable pérdida de peso*



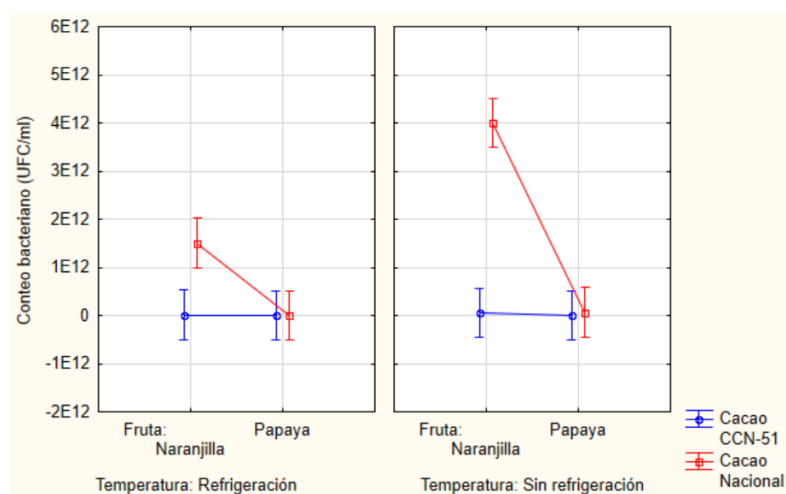
De acuerdo a la figura 20 sobre la pérdida de peso, se observa que los tratamientos en el que interviene la naranja presentaron valores mayores que a la papaya a los días 5 y 10 de bioconservación.

Al día 5, la bioconservación de la naranjilla aplicando BAL de la variedad de cacao CCN-51 sin refrigeración presentó el valor más alto de pérdida de peso, siendo de 4,29% en comparación a misma variedad de cacao aplicado a la papaya en refrigeración que presentó el valor más bajo de 0,52%.

De igual manera, al día 10, el tratamiento de bioconservación de naranjilla con la variedad CCN-51 sin refrigeración, obtuvo el valor más alto de 6,36%; mientras que el tratamiento de la papaya con la variedad Nacional en refrigeración obtuvo el valor más bajo de 0,74%.

### Figura 21

*Estudio del efecto de la interacción A\*B\*C en la variable conteo bacteriano*



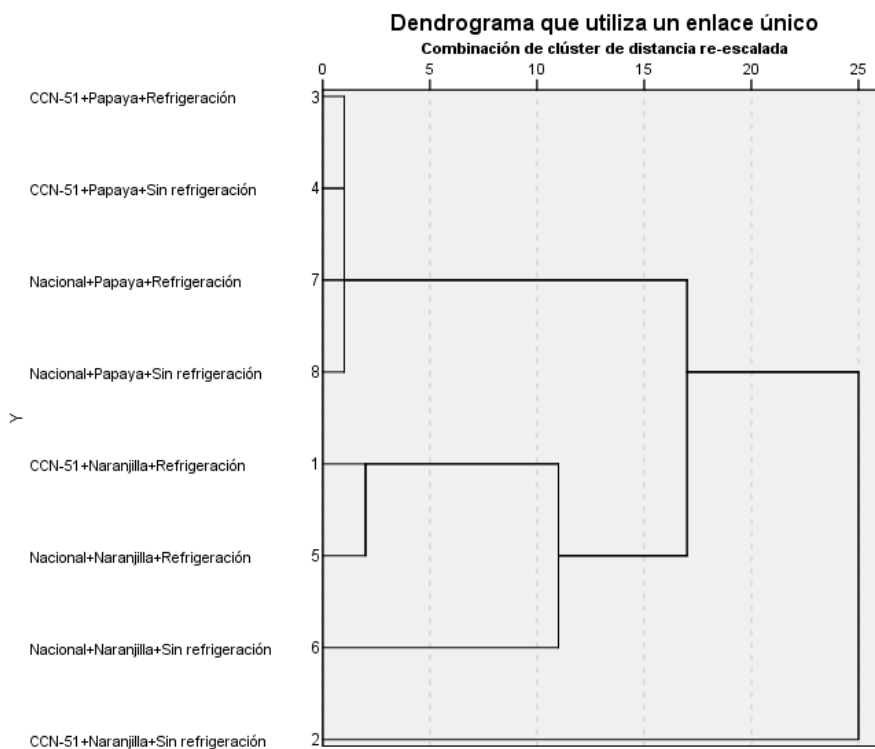
En la figura 21, se observa que el tratamiento de naranjilla con BAL de la variedad de mucílago de cacao y sin refrigeración presentó mayor presencia de bacterias con una media de  $4 \times 10^{12}$  UFC/ml, seguido del mismo tratamiento, pero en refrigeración con  $1,5 \times 10^{12}$  UFC/ml. Mientras que el tratamiento de papaya con la variedad CCN-51 en refrigeración y sin refrigeración presentaron menos población bacteria con una media de  $3,7 \times 10^9$  UFC/ml y  $4,8 \times 10^8$  UFC/ml respectivamente.



## Análisis de conglomerados

**Figura 22**

*Dendrograma para los factores en estudio*



La figura 22 presenta un dendrograma de grupos de vecinos más cercanos aplicados en los tratamientos de estudio con las variables físico químicas (acidez, pH, sólidos solubles y pérdida de peso), en el cual se observa grupos formados según la fruta bioconservada del estudio. Existe una estrecha similitud entre CCN-51+Papaya+Refrigeración, CCN-51+Papaya+Sin refrigeración, Nacional+Papaya+Refrigeración y Nacional+Papaya+Sin refrigeración. Por otro lado, los tratamientos con menor relación son de la naranjilla bioconservada, ya que solo existe relación CCN-51+Naranja+Refrigeración y Nacional+Naranja+Refrigeración, pero a su vez estas se relaciona con Nacional+Naranja+Sin refrigeración.

## Análisis de componentes principales

**Tabla 47**

*Matriz de correlación de componentes principales*

		Acidez (día 0)	Acidez (día 5)	Acidez (día 10)	pH (día 0)	pH (día 10)	Sólidos solubles (día 0)	Sólidos solubles (día 5)	pH (día 5)	Sólidos solubles (día 10)	Pérdida de peso (día 5)	Pérdida de peso (día 10)	Conteo Bacteriano
Correlación	Acidez (día 0)	1,000	0,993	0,999	-0,959	-0,995	-0,984	-0,972	-0,996	-0,967	0,601	0,659	0,495
	Acidez (día 5)	0,993	1,000	0,990	-0,938	-0,982	-0,980	-0,972	-0,982	-0,946	0,665	0,699	0,400
	Acidez (día 10)	0,999	0,990	1,000	-0,958	-0,995	-0,986	-0,974	-0,997	-0,971	0,572	0,630	0,487
	pH (día 0)	-0,959	-0,938	-0,958	1,000	0,976	0,937	0,889	0,968	0,896	-0,546	-0,608	-0,572
	pH (día 10)	-0,995	-0,982	-0,995	0,976	1,000	0,982	0,959	0,999	0,963	-0,584	-0,636	-0,529
	Sólidos solubles (día 0)	-0,984	-0,980	-0,986	0,937	0,982	1,000	0,984	0,984	0,972	-0,560	-0,583	-0,433
	Sólidos solubles (día 5)	-0,972	-0,972	-0,974	0,889	0,959	0,984	1,000	0,966	0,980	-0,550	-0,579	-0,410
	pH (día 5)	-0,996	-0,982	-0,997	0,968	0,999	0,984	0,966	1,000	0,972	-0,568	-0,623	-0,529
	Sólidos solubles (día 10)	-0,967	-0,946	-0,971	0,896	0,963	0,972	0,980	0,972	1,000	-0,459	-0,520	-0,537
	Pérdida de peso (día 5)	0,601	0,665	0,572	-0,546	-0,584	-0,560	-0,550	-0,568	-0,459	1,000	0,954	0,090
	Pérdida de peso (día 10)	0,659	0,699	0,630	-0,608	-0,636	-0,583	-0,579	-0,623	-0,520	0,954	1,000	0,303
	Conteo Bacteriano	0,495	0,400	0,487	-0,572	-0,529	-0,433	-0,410	-0,529	-0,537	0,090	0,303	1,000

En la tabla 47, se puede observar que la variable acidez en los tres tiempos de bioconservación están correlacionados entre sí, con más de 0,99. Además, la variable pH está correlacionado con la de sólidos solubles en los distintos tiempos de bioconservación con más de 0,9. Con respecto al conteo bacteriano, se puede observar una correlación baja con la acidez en los tres días de bioconservación (0,495; 0,4; 0,487) y la pérdida de peso en el día 10 (0,303).

**Tabla 48***Matriz de componentes*

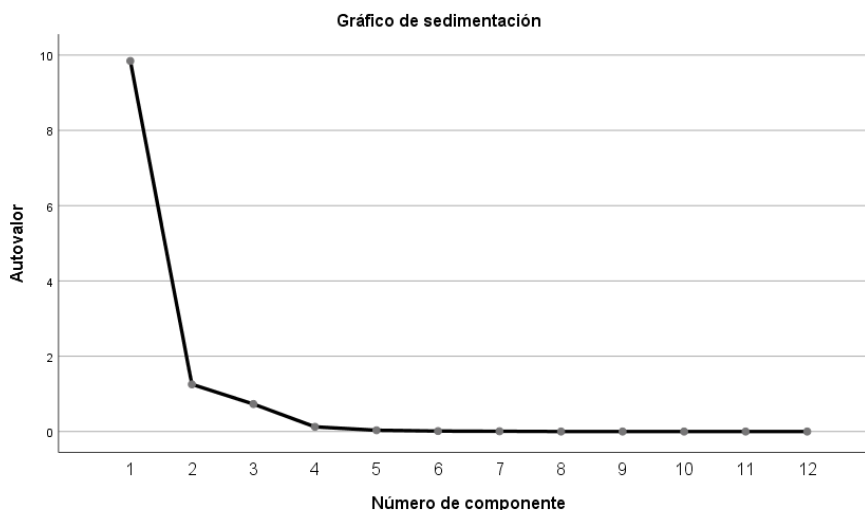
	<b>Componente</b>		
	1	2	3
Acidez (día 0)	-,996	-,045	-,053
Acidez (día 5)	-,990	,056	-,119
Acidez (día 10)	-,992	-,075	-,078
pH (día 0)	,959	,110	-,055
pH (día 10)	,994	,079	,024
Sólidos solubles (día 0)	,979	,084	,157
Sólidos solubles (día 5)	,966	,077	,182
pH (día 5)	,993	,096	,036
Sólidos solubles (día 10)	,959	,210	,084
Pérdida de peso (día 5)	-,648	,746	,114
Pérdida de peso (día 10)	-,702	,636	,303
Conteo Bacteriano	-,518	-,443	,730

**Tabla 49***Porcentajes de varianza total explicada*

Componente	<b>Varianza total explicada</b>					
	Autovalores iniciales			Sumas de cargas al cuadrado de la extracción		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	9,843	82,027	82,027	9,843	82,027	82,027
2	1,252	10,435	92,462	1,252	10,435	92,462
3	,730	6,081	98,543	,730	6,081	98,543
4	,125	1,038	99,581			
5	,033	,276	99,857			
6	,011	,093	99,950			
7	,006	,050	100,000			
8	6,395E-16	5,329E-15	100,000			
9	2,236E-16	1,863E-15	100,000			
10	-1,679E-16	-1,399E-15	100,000			
11	-3,286E-16	-2,738E-15	100,000			
12	-6,729E-16	-5,607E-15	100,000			

## Figura 23

### Gráfica de sedimentación

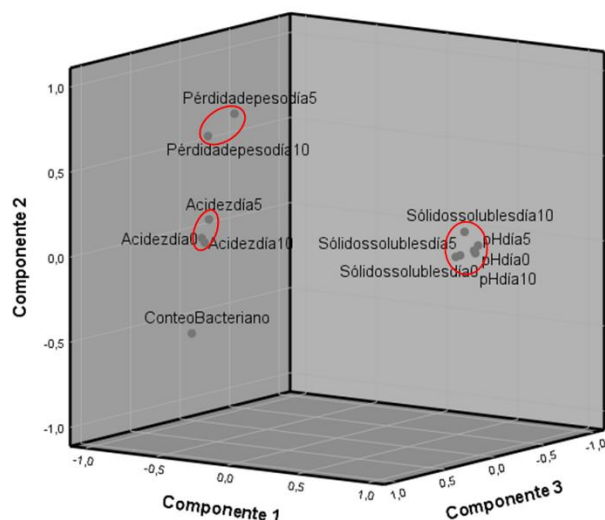


En la figura 23 se evaluó las 12 variables, de las cuales, según la varianza total explicada, la acidez en el día 0 obtuvo mayor porcentaje de 82,02%. En cambio, para la acidez del día 5 (componente 2) y acidez del día 10 (componente 3), el porcentaje de varianza fue de 10,43% y 6,08% respectivamente. Con respecto a los demás componentes, sus porcentajes de varianza son menores a 1, siendo probablemente menos importantes.

Los principales factores que influyen en la conservación de alimentos es la acidez y pH, pero los científicos de alimentos miden la acidez en función al pH (Rushing, 2010), porque intervienen en el crecimiento de los microorganismos, con un rango óptimo de 6 a 8,5 para bacterias y los hongos hasta 8,5 (Cervantes et al., 2017). Sin embargo, algunas bacterias crecen en rangos menores de pH como las BAL, que crecen en la mayoría de los alimentos y bajan el pH a 3,5 para evitar el crecimiento de competidores (Fermented et al., 1992).

## Figura 24

Gráfica de componentes principales



En la figura 24 se presenta los resultados de componentes principales de las variables de estudio, en el cual, el componente 2 se formaron dos grupos relacionados, la pérdida de peso del día 5 con el de día 10 y el otro grupo de acidez en los tres días de bioconservación. En el componente 3 obtuvo tres grupos positivos relacionados, siendo el más grande con correlación alta el de los sólidos solubles y pH en los tres días de conservación. Pero en este mismo el grupo, el pH de los tres días de bioconservación se correlacionan, al igual que los sólidos solubles del día 0 y 5.

La vida útil de los alimentos se define desde el momento de producción y el control de almacenamiento, porque afectan a las propiedades físico-químicas y sensoriales con presencias microbiológicas. Por lo que, se debe aplicar un control en los factores intrínsecos como pH, acidez, sólidos solubles, nutrientes y en los factores extrínsecos como temperatura y tiempo. (Carrillo & Reyes, 2014)

## Capítulo V

### Discusión

#### Respecto a las variedades de mucilago de cacao (Factor A)

La utilización de bacterias ácido lácticas provenientes de la fermentación del mucilago de cacao es una idea innovadora para la conservación e inoculación de los alimentos agrícolas, al tener péptidos antimicrobianos con los patógenos presentes en los alimentos sin causar efectos tóxicos o adversos en el consumo humano (Dhundale et al., 2018).

En el cacao Nacional, se observó un aumento de acidez con respecto al avance de los días de bioconservación, mientras que el cacao CCN-51 en el lapso del día 5 al día 10 disminuyó (1,21% a 1,08%). Según Marín et al. (2019), esto se debe al retraso de la degradación de los ácidos, disminuyendo en el metabolismo de la respiración de la fruta.

En el pH, las dos variedades de mucilago de cacao presentaron aumento del día 0 al día 10, con una media de 4,63 a 4,65 en el cacao CCN-51 y 4,01 a 4,48 en el cacao Nacional, ya que las bacterias ácido lácticas al tener un crecimiento exponencial, aumentan el pH, disminuyendo la acidez (Gonzalez et al., 2019), porque descomponen el ácido en productos como ácido láctico y acético (Viallate, 2012).

Con respecto a los sólidos solubles, se observó un aumento mientras avanza los días de bioconservación, teniendo una media final de 6,98°Brix a 8,08°Brix para la variedad CCN.51 y 7,08 a 8,28°Brix en la variedad Nacional, siendo el que generó mayor valor de sólidos solubles. Según Norberto et al. (2018), cuando hay un aumento de ácido láctico por las BAL, existe un consumo de carbohidratos por los

microrganismos, resultando la disminución del contenido de sólidos y aumento de la acidez. (Norberto et al., 2018)

La pérdida de peso en el cacao CCN-51, se observó mayor porcentaje de pérdida al día 5 (1,74%) y al día 10 (2,97%), por la descomposición de las pectinas y otros polisacáridos que causan ablandamiento progresivo de los tejidos y la pérdida de agua (Marín et al., 2019).

En el de conteo bacteriano, el cacao Nacional presentó mayor población bacteriana con una media de  $1,3921875 \times 10^{12}$  UFC/ml, mientras que la variedad CCN-51 obtuvo  $1,78625 \times 10^{10}$  UFC/ml. Las bacterias *Lactobacillus*, tienen la capacidad de colonizar primero el fruto, especialmente *L. plantarum*, asegurando una alta capacidad antagonista contra hongos patógenos y a su vez, para establecerse (Marín et al., 2019).

### **Respecto a las frutas bioconservadas (Factor B)**

En el factor B se analizó la bioconservación de naranjilla y papaya, evaluando cada caracterización físico-químico y microbiológicos aplicadas.

En la acidez, la naranjilla presentó un valor mayor a la papaya, el cual aumenta de 1,80% a 2,14% al día 5 y disminuye a 2,04% al día 10, siendo resultados inferiores al estudio de González et al. (2014) que obtuvieron 3,78% a 3,21%, dependiendo del estado de madurez de la fruta. En cambio, la papaya mantuvo la acidez hasta el día 5, con un valor de 0,07% y aumenta a 0,08% al día 10, siendo de igual manera, valores inferiores al estudio de Torres et al. (2013), de 0,15% a 0,09%.

Con respecto a la variable pH, la naranjilla presentó un valor menor a la papaya. Además, el pH disminuye de 3,13 del día 0 a 3,12 en el día 10; mientras que en la papaya aumentó de 5,51 a 6,01. En el estudio de González et al. (2014), el pH de la naranjilla fueron inferiores a los obtenidos, pero aumenta de 2,89 a 2,94. En cambio, en

el estudio de Torres et al. (2013), el pH de la papaya presentó valores similares de 5,65 a 5,97.

En la variable de sólidos solubles, la naranjilla presentó 5,90°Brix en el día 0 y aumenta a 6,82°Brix en el día , siendo valores inferiores a 6,57°Brix - 9,03°Brix del estudio de González et al. (2014). En cambio, la papaya presentó 8,16°Brix en el día 0, aumentando 9,55°Brix al día 10, valores que se encuentran en el rango obtenido por Torres et al. (2013) que va de 6,64°Brix a 11,56°Brix.

En la naranjilla, se observó mayor pérdida de peso que la papaya, siendo de 3,78% y 1,43% respectivamente para el día 10. Esta variable, se asocia con las condiciones ambientales, que aumentan la transpiración de la fruta y por un ligero descenso de su biomasa (Del Pilar et al., 2007).

En el conteo bacteriano, la naranjilla ( $1,391825 \times 10^{12}$ UFC/ml) presentó mayor población bacteriana que la papaya ( $1,8225 \times 10^{10}$ UFC/ml). Según Fan & Song (2008), la población microbiana de frutas es determinada por su origen, es decir las prácticas agrícolas, condiciones de recolección, procesamiento y almacenamiento, ya que pueden favorecer el crecimiento de microorganismos de descomposición.

### **Respecto a la temperatura de bioconservación (Factor C)**

En el factor B se evaluó el efecto de la temperatura de bioconservación (refrigeración y sin refrigeración) en cada variable fisicoquímico y microbiológico del presente trabajo.

La bioconservación en refrigeración, se observó un aumento de acidez de 0,94% al día 0 y 1,10% al día. En cambio, la bioconservación sin refrigeración, pasó de 0,92% a 1,10% al día 5 y disminuyó al día 10 a 1,02%. Sin embargo, según Castellano et al. (2016), mientras aumenta la temperatura, también aumenta el contenido de ácido cítrico



en el fruto, por el consumo de los ácidos orgánicos en el proceso de respiración de la fruta y según Botía et al. (2008), cuando disminuye la acidez se debe a la actividad de las deshidrogenasas y la utilización de los ácidos orgánicos como sustratos de la respiración para la síntesis de nuevos componentes en la maduración, coincidiendo con la acumulación de azúcar.

Los resultados de pH, demostró diferencias significativas entre la bioconservación en refrigeración y sin refrigeración, teniendo mayor valor el de sin refrigeración, pero estos aumentan con el tiempo de bioconservación, ya que, a menor temperatura, la variación del pH es menor, debido a la ralentización de las reacciones enzimáticas (Botía et al., 2008).

La variable de sólidos solubles, también presentó diferencias significativas en la bioconservación a refrigeración y sin refrigeración, siendo el de sin refrigeración con mayor cantidad de sólidos solubles y aumentan con el tiempo de bioconservación. Según Castellano et al. (2016), el aumento de la temperatura provoca también el de los sólidos solubles porque la concentración de azúcares es aumentada por la degradación de polisacáridos de las membranas celulares.

Con respecto a la pérdida de peso, la bioconservación sin refrigeración obtuvo mayor porcentaje en comparación al de bioconservación en refrigeración, siendo 1,99% del día 5 a 3,72% para el día 10; y 0,86% en el día 5 a 1,5% al día 10, respectivamente. La pérdida de peso ocurre por el contenido de materia seca, la respiración de sustancias orgánica, la pérdida de agua o la presencia de aire dentro del fruto por la desintegración de los tejidos (Botía et al., 2008), por lo tanto, a mayor temperatura existe una disminución del contenido de agua en la fruta y su calidad (Suárez et al., 2009).

El conteo bacteriano realizado, presentó diferencia significativa, teniendo mayor población bacteriana en la bioconservación sin refrigeración con  $1,0304 \times 10^{12}$  UFC/ml en comparación a la bioconservación en refrigeración con  $3,7965 \times 10^{11}$  UFC/ml. Esto se debe a que el almacenamiento de frutas a bajas temperaturas reduce el crecimiento microbiológico (Suárez et al., 2009).

### **Respecto a la interacción A\*B\*C (Cacao-Fruta-Temperatura)**

La bioconservación de papaya y naranjilla con bacterias ácido lácticas provenientes de la fermentación del mucilago de cacao en dos temperaturas presentó diferencias significativas en base a la fruta, debido a que la papaya se caracteriza por ser dulce y agradable (Zambrano, 2014), mientras que la naranjilla tienen un sabor agridulce (Andrade et al., 2015).

En base a la acidez titulable, la interacción de CCN51+Naranjilla+Refrigeración obtuvo el mayor porcentaje de acidez con 1,89% al día 0 a 2,20% al día 10 de bioconservación. En cambio, en las interacciones que involucran a la papaya presentaron el menor porcentaje de acidez, teniendo entre 0,06-0,07% en día 0 a 0,08% al día 10 de bioconservación. Según Erazo et al. (2020), el aumento de acidez se debe a la formación de ácido galacturónico en la degradación de la pared celular durante la maduración, obteniendo una media de 0,23% en la papaya, que es mayor a los resultados obtenidos. De igual forma, en el trabajo de Lara (2012) presentó resultados superiores a los obtenidos de hasta 2,65% en la naranjilla.

Con respecto a la variable de pH, los tratamientos CCN51-Papaya-Refrigeración y CCN51-Papaya-Sin refrigeración, registraron valores mayores, cambiando de 5,97 a 6,05 al día 10 y 5,91 a 6,17 al día 10 respectivamente. En cambio, las interacciones Nacional-Naranjilla-Refrigeración y Nacional-Naranjilla-Sin refrigeración obtuvieron pH

menores de 2,95 al día 0 y aumentaron a 2,97 y 3,12 al día 10 respectivamente. El aumento de pH se relaciona con el efecto tampón de los compuestos en respuesta a la mayor acidez que causan reacciones adversas a los frutos como el cambio de sabor (Erazo et al., 2020), demostrado en la gráfica de sedimentación que la acidez es un componente principal que influye en la conservación.

Los resultados de sólidos solubles se observaron un aumentando con el avance de los días de bioconservación. Los tratamientos de CCN-51-Papaya-Sin refrigeración (8,50°Brix - día 0 a 9,47°Brix - día 10) y Nacional-Papaya-Sin refrigeración (8,27°Brix - día 0 a 10,13°Brix – día 10) fueron los resultados mayores en comparación a los tratamientos de CCN-51-Naranja-Refrigeración (5,67°Brix – día 0 a 6,67°Brix – día 10) y Nacional-Naranja-Refrigeración que fueron menores (5,87°Brix – día 0 a 6,60°Brix – día 10). Según Marín et al. (2019), el aumento de sólidos solubles es el resultado de la hidrólisis del almidón convirtiéndose en azúcares por el proceso de maduración y aumento de temperatura, cambiando el sabor.

En la variable de pérdida de peso, el tratamiento CCN-51-Naranja-Sin refrigeración presentó el porcentaje más alto de 4,29% del día 5 a 6,36% al día 10 y el tratamiento Nacional-Papaya-Refrigeración obtuvo el porcentaje menor de 0,53% del día 5 a 0,74% al día 10. Estos resultados se encuentran dentro de rango aceptable (8%), por lo que se puede extender los días de bioconservación (Magaña et al., 2004).

En el conteo bacteriano de aerobios, el tratamiento Nacional-Naranja-Sin refrigeración presentó mayor población bacteriana ( $4 \times 10^{12}$  UFC/ml) en comparación al tratamiento de CCN-51-Papaya-Sin refrigeración que obtuvo una población microbiana menor ( $4,5 \times 10^8$  UFC/ml), ya que no se presenció población de mohos y levaduras. Esto se debe a que las bacterias ácido lácticas tienen capacidad antifúngica y colonizan la superficie de las frutas (Marín et al., 2019).

## Capítulo VI

### Conclusiones

#### ***Factor A (Variedades)***

La caracterización físico-químico del mucilago de cacao presentó diferencias al ser fermentado, porque el pH aumenta y los sólidos solubles disminuyen en las dos variedades. En cambio, en la acidez, la variedad nacional aumentó al ser fermentado, mientras que la variedad CCN-51 disminuyó.

La variedad de cacao Nacional, presentó mejores características en el pH de 4,48 y pérdida de peso de 2,24% al día 10, permitiendo conservar más tiempo y una población bacteriana de  $1,3921875 \times 10^{12}$  UFC/ml capaz de evitar el crecimiento de hongos patógenos.

Sin embargo, la variedad de cacao CCN-51 presentó mayor acidez de 1,08% y menos sólidos solubles de 8,08°Brix. Por lo tanto, la utilización de bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación de las dos variedades de mucílago de cacao si influyen como bioconservante protector y en días de bioconservación.

#### ***Factor B (Frutas)***

La bioconservación de naranjilla proporcionó mejores características físico-químicas y microbiológicas al finalizar la bioconservación (día 10), con una acidez de 2,04%, pH de 3,12; sólidos solubles de 6,82°Brix y población bacteriana de  $1,391825 \times 10^{12}$  UFC/ml. Sin embargo, el porcentaje de pérdida de peso de la naranjilla (3,78%) fue mayor a la papaya (1,43%).

Por lo tanto, el tipo de fruta si influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas, porque la papaya se caracteriza en ser una fruta dulce y la naranjilla agridulce, variando sus propiedades físico-químicas.

### ***Factor C (Temperatura)***

La bioconservación en refrigeración influye menos en las características físico-químico, permitiendo extender la vida útil de las frutas, con acidez de 1,10%, pH de 4,53; sólidos solubles de 7,97°Brix y pérdida de peso de 1,5% al día 10 de bioconservación.

En cambio, la bioconservación sin refrigeración presentó mayor población bacteriana de  $1,0304 \times 10^{12}$  UFC/ml que la bioconservación en refrigeración ( $3,7965 \times 10^{11}$  UFC/ml), porque reduce el crecimiento microbiano.

Por lo tanto, la utilización de la temperatura para la bioconservación si influyó en las propiedades físico-químicas y microbiológicas de las frutas, debido a que la temperatura influye en la madurez de las frutas y el crecimiento microbiano.

### ***Interacción A\*B\*C (Variedades-Frutas-Temperatura)***

El tratamiento CCN-51+Naranjilla+Refrigeración presentó mejores resultados en cuanto a acidez (2,20%), pH (3,21) y sólidos solubles (6,67°Brix). Sin embargo, el tratamiento Nacional+Naranjilla+Refrigeración obtuvo resultados similares en cuanto a pH (2,97) y sólidos solubles (6,60°Brix), debido a que se correlacionan estas dos variables.

En la variable pérdida de peso, el tratamiento Nacional-Papaya-Refrigeración presentó menos porcentaje de 0,74 al día 10 de finalizar la bioconservación.

En el conteo bacteriano, el tratamiento Nacional+Naranja+Sin refrigeración presentó mayor población de bacterias ácido lácticas ( $4 \times 10^{12}$  UFC/ml) aplicas como agente protector.

### **Recomendaciones**

Utilizar las bacterias ácido lácticas provenientes del mucilago de cacao Nacional, como bioconservante al influir mejor en las características físico-química y microbiológicas de las frutas.

Con respecto al análisis físico químico de la fruta, se recomienda bioconservar la naranja al tener mejor resultados en comparación a la papaya.

Se recomienda la bioconservación de las frutas en refrigeración para extender su vida útil, debido a que influye menos en sus propiedades físico-químicas de acidez, pH, sólidos solubles y peso, al igual que el crecimiento de poblaciones microbianas.

A partir de los resultados obtenidos, se recomienda a futuras investigaciones bioconservar distintas variedades de frutas de una misma especie y aumentar el tiempo de bioconservación para estimar la vida útil de la fruta en base a un rango óptimo de pérdida de peso.

## Capítulo VII

### Bibliografía

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn, 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), 1–23. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
- Andrade, M. (2018). *Calidad poscosecha de naranjilla (Solanum quitoense Lam) y alternativas tecnológicas para retrasar el deterioro. Elaboración de un producto panificado enriquecido con naranjilla* [Universidad Nacional de la Plata]. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/71305/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/71305/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Andrade, M., Moreno, C., Guijarro, M., & Concellón, A. (2015). Caracterización de la naranjilla (*Solanum quitoense*) comun en tres estados de madurez. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 215–221. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81343176010.pdf>
- Aprotosoai, A., Luca, S., & Miron, A. (2016). Flavor Chemistry of Cocoa and Cocoa Products—An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 73–91. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12180>
- Bhattacharjee, R., & Akoroda, M. (2018). Taxonomy and classification of cacao. In *Achieving sustainable cultivation of cacao* (Issue August, pp. 3–18). Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/as.2017.0021.01>
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

- Botía, Y., Almanza, P., & Balaguera, H. (2008). Efecto de la temperatura sobre la maduración complementaria en Curuba (*Passiflora mollissima* Bailey). *U.D.C.AA Actualidad & Divulgación Científica*, 11(2), 187–196.
- Carrillo, M. L., & Reyes, A. (2014). Vida útil de los alimentos. *CIBA Revista Iberoamericana de Las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3), 32.  
<https://doi.org/10.23913/ciba.v2i3.20>
- Castellano, G., Ramírez, R., Sindoni, M. J., Hidalgo, P. R., Burgos, M. E., Marín, C., Núñez, K., & Martínez, L. (2016). Efecto de la temperatura de almacenaje sobre las características organolépticas de frutos de limón persa (*Citrus Latifolia* Tanaka). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 17(1), 14.  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81346341002%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/813/81346341002.pdf>
- Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite Storage in *Theobroma cacao* L. Seed: Cyto-Histological and Phytochemical Analyses. *Frontiers in Plant Science*, 10(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01599>
- Cervantes, J., Orihuela, R., & Rutiaga, J. (2017). Acerca del Desarrollo y Control de Microorganismos en la Fabricación de Papel. *Conciencia Tecnológica*, 54, 54–58.  
<https://www.redalyc.org/jatsRepo/944/94454631001/html/index.html>
- Chávez, M., & Núñez, J. (2017). Domestication and genetics of papaya: A review. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5(DEC), 1–9.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00155>
- Cortés, A., Díaz, M., & Salgado, M. (2018). Bioconservación, Alimentos Y Pescado. *Agro Productividad*, 11(11), 11–16. <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1276>



- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*, *44*(4), 432–453. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa014>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, *121*(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>
- Del Pilar, I., Fischer, G., & Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.). *Agronomía Colombiana*, *25*(1), 83–95. <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v25n1/v25n1a10.pdf>
- Dhundale, V., Hemke, V., Desai, D., & Dhundale, P. (2018). Evaluation and Exploration of Lactic Acid Bacteria for Preservation and Extending the Shelf Life of Fruit. *International Journal of Fruit Science*, *18*(4), 355–368. <https://doi.org/10.1080/15538362.2018.1435331>
- Erazo, C., Salazar, D., Vera, J., & Tuárez, D. (2020). Aplicación de bacterias ácido-lácticas provenientes del mucilago de cacao como agente de conservación de la papaya. *Universidad Ciencia y Tecnología*, *24*(107), 41–47. <https://doi.org/10.47460/uct.v24i107.412>
- Fan, L., & Song, J. (2008). Microbial quality assessment methods for fresh-cut fruits and vegetables. *Stewart Postharvest Review*, *4*(3), 1–9. <https://doi.org/10.2212/spr.2008.3.10>
- Fermented, T., Panel, F., Foods, T. F., Isbn, C., Pdf, T., Press, N. A., Press, N. A., Academy, N., Academy, N., & Press, N. A. (1992). Applications of Biotechnology in Traditional Fermented Foods. In *Applications of Biotechnology in Traditional Fermented Foods*. <https://doi.org/10.17226/1939>

- Fuentes, M., Londoño, A., Durango, M., Gutiérrez, M., Ochoa, S., & Sepúlveda, J. (2017). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo Colombiano. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 45. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(15\)45-55](https://doi.org/10.18684/bsaa(15)45-55)
- González, D. I., Ordoñez, L. E., Vanegas, P., & Vásquez, H. D. (2014). Cambios en las propiedades fisicoquímicas de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) cosechados en tres grados de madurez. *Acta Agronomica*, 63(1), 11–17.
- Gonzalez, G., Serna, A. M., Córdoba, D., Marín, J. G., Montalvo, C., & Ordoñez, G. (2019). Estudio de la fermentación espontánea de cacao (*Theobroma Cacao* L.) y evaluación de la calidad de los granos en una unidad productiva a pequeña escala. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 41–51.
- Hernández, M., Guillén, J., Bautista, S., & Guillén, D. (2018). Evaluación de películas biodegradables en el control de hongos postcosecha de la papaya. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 52–60. <https://doi.org/10.1234/ct.v39i1.1422>
- Hernández, Soto, García, Pérez, Rocandio, & Córdova. (2019). Variación morfológica in situ de *Carica papaya* L. nativa de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 42(1), 47–55. <https://doi.org/10.35196/rfm.2019.1.47-55>
- Ho, V. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Huang, C. H., Li, S. W., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974>

- Idris, A. B., Hassan, H. G., Salaheldin Ali, M. A., Eltaher, S. M., Idris, L. B., Altayb, H. N., Abass, A. M., Ibrahim, M. M. A., Ibrahim, E. A. M., & Hassan, M. A. (2020). Molecular Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Sequences Identified Two Lineages of *Helicobacter pylori* Strains Detected from Different Regions in Sudan Suggestive of Differential Evolution. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8825718>
- INEN 0381. (1985). *Conservas Vegetales, Determinacion de Acidez Titulable, Metodo Potenciometrico de Referencia*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.pdf>
- INEN 389. (1985). *Conservas vegetales. Determinación de ion hidrogeno (pH)*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/389.pdf>
- Karunamoorthi, K., Kim, H.-M., Jegajeevanram, K., Xavier, J., & Vijayalakshmi, J. (2014). Papaya: A gifted nutraceutical plant - a critical review of recent human health research. *Tang [Humanitas Medicine]*, 4(1), 1–17. <https://doi.org/10.5667/tang.2013.0028>
- Landete, J. M., Rodriguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., de Felipe, F. L., & Muñoz, R. (2010). Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00043-7>
- Lara, M. (2012). *Uso combinado de la radiación UV-C y almacenamiento refrigerado sobre el tiempo de vida útil de la naranjilla (Solanum quitoense Lam.)* [Universidad Tecnológica Equinoccial]. [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4954/1/48012\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4954/1/48012_1.pdf)
- Lawalata, H., Rengkuan, M., & Satiman, U. (2020). Identification by 16S Ribosomal RNA

- Gene Sequencing of Lactic Acid Bacteria Producing Antibacterial Agents from Langsat Fruit ( *Lansium domesticum* ) in North Minahasa District, North Sulawesi. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 5, 1–4. <https://www.longdom.org/open-access/identification-by-16s-ribosomal-rna-gene-sequencing-of-lactic-acid-bacteria-producing-antibacterial-agents-from-langsat-fruit-lans-60442.html>
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., & De Vuyst, L. (2010). Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7708–7716. <https://doi.org/10.1128/AEM.01206-10>
- Linares, J. R., Gutiérrez, N., Rivera, B. E., Pérez, S. B., & Nevárez, G. V. (2018). Biocontrol Processes in Fruits and Fresh Produce, the Use of Lactic Acid Bacteria as a Sustainable Option. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2(August). <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00050>
- López, M. (2018). Uso de fungicidas para control de antracnosis en frutos papaya Maradol (Carica papaya). *Agro Productividad*, 4(3), 27–32. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/580>
- López, M., Criollo, J., Hernández, M., & Lozano, M. (2019). Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of the CCN51 cocoa material in three maturity stages. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(3), 13. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019010>
- Magaña, W., Balbín, M. I., Corrales, J., Rodríguez, A., Saucedo, C., & Sauri, E. C. E. (2004). Efecto de la frigoconservación en el comportamiento fisiológico de frutas de pitahaya. *Cultivos*, 25, 33–39. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193225911003>

- Marín, A., Plotto, A., Atarés, L., & Chiralt, A. (2019). Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience*, *54*(2), 337–343. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI113661-18>
- Mejía, C., Gaviria, D., Duque, A., Rengifo, L., Aguilar, E., & Alegría, A. (2012). Physicochemical characterization of the lulo (*Solanum quitoense* Lam.) Castilla variety in six ripening stages. *Vitae*, *19*(2), 157–165.
- Miranda, A., Alvis, A., & Arrazola, G. (2016). Efectos de dos recubrimientos sobre la calidad de la papaya (carga papaya) variedad tainung. *Temas Agrarios*, *19*(1), 7–18. <https://doi.org/10.21897/rta.v19i1.721>
- Norberto, A. P., Marmentini, R. P., Carvalho, P. H., Campagnollo, F. B., Takeda, H. H., Alberte, T. M., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Alvarenga, V. O., & Sant'Ana, A. S. (2018). Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. *Lwt*, *93*(December 2017), 491–498. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.070>
- Otárola, A. (2018). *Efecto de la enzima pectolítica y levadura (Saccharomyces cerevisiae) en la fermentación y calidad de cacao var. criollo (Theobroma cacao)* [Universidad Nacional Federico Villarreal]. [http://repositorio.unfv.edu.pe/bitstream/handle/UNFV/2412/OTAROLA\\_GAMARRA\\_ANTONIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unfv.edu.pe/bitstream/handle/UNFV/2412/OTAROLA_GAMARRA_ANTONIO.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Parra, R. (2010). Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, *8*(1), 93–105.
- Rodríguez, C., Caicedo, A., Sounigo, O., Argout, X., Alvarado, G., & Yockteng, R. (2019). Cacao breeding in Colombia, past, present and future. *Breeding Science*, *69*(3), 373–382. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.19011>

Rushing, J. (2010). *Formulating Dressings, Sauces and Marinades*.

[https://fbns.ncsu.edu//extension\\_program/documents/acidified\\_formulating\\_dressings.pdf](https://fbns.ncsu.edu//extension_program/documents/acidified_formulating_dressings.pdf)

Russo, P., De Chiara, M. L. V., Vernile, A., Amodio, M. L., Arena, M. P., Capozzi, V., Massa, S., & Spano, G. (2014). Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. *BioMed Research International*, 2014, 9.

<https://doi.org/10.1155/2014/309183>

Salazar, L. (2017). *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. de la variedad "Chuncho" obtenida en Cuzco, Perú* (Vol. 0, Issue 0) [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. [http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1436/Aislamiento\\_SalazarAlvarez\\_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/upch/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Suárez, J., Pérez, M., & Giménez, A. (2009). Efecto de la temperatura y estado de madurez sobre la calidad poscosecha de la fruta de guayaba (*Psidium guajava* L.) procedente de MERCABAR, estado Lara, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(1), 60–69.

Teneda, W. (2016). Mejoramiento del proceso de fermentación del cacao (*Theobroma cacao* L.). In *Variedad Nacional y Variedad CCN51* (Universida).

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=664426>

Torres, R., Montes, E. J., Pérez, O. A., & Andrade, R. D. (2013). Relación del color y del estado de madurez con las propiedades fisicoquímicas de frutas tropicales.

*Informacion Tecnologica*, 24(3), 51–56. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000300007>

UTEPI. (2007). *Cacao. Estudio Agroindustrial en el Ecuador: Competitividad de la*

*Cadena de Valor y Perspectivas de Mercado Ministerio* (José Hidal).

<https://www.unido.org/sites/default/files/2007->

[11/71789\\_TCB\\_No.16.Cacao\\_Estudio\\_Agroindustrial\\_en\\_el\\_Ecuador\\_0.pdf](#)

Vallejo, C., Díaz, R., Morales, W., Soria, R., Baren, C., & Vera, J. (2016). Utilización del mucílago de cacao, tipo Nacional y Trinitario, en la obtención de jalea. *Revista ESPAM CIENCIA*, 7(1), 51–58.

<http://investigacion.espam.edu.ec/index.php/Revista/article/view/204>

Viallate, M. (2012). Changes in Acidity after Fermentation. *Enological Chemistry*, 271–287. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00016-9>

Vieco, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., & Drider, D. (2019). Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>

Zambrano, A. (2014). *Bastones de papaya verde confitadas con cobertura de chocolate en Santo Domingo de los Tsáchilas, en el año 2012* [Univerdiad Tecnológica Equinoccial]. [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/19276/1/6285\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/19276/1/6285_1.pdf)