



Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (Mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de carne de dos especies de tilapia: Negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) considerando distintas concentraciones de cloruro de sodio

Granja Cedeño, Angie 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


Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, Ph.D.

17 de febrero del 2022


Reporte de verificación de contenido




Tesis final-Granja2.docx
Scanned on: 20:46 February 15, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

| Identical Words | 180 |
|--------------------------|------|
| Words with Minor Changes | 23 |
| Paraphrased Words | 190 |
| Omitted Words | 3393 |

Results

The results contain any sources we have found that include words with identical, minor changes, and paraphrased text in your submitted document.

| | | |
|---|------|--|
| <p>001 https://www.normalizacion.gub.uy/bases/norma/001.pdf</p> | 100% | <div style="background-color: #f06292; padding: 5px; border: 1px solid #f06292; border-radius: 4px;"> IDENTICAL </div> |
| <p>MENDOZA LAGOS GIAN MANUEL https://pt.scribd.com/document/468261468/mendoza-lagos-gian-manuel</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> IDENTICAL MATCHES ARE TOO CLOSE TO BE WORKING IN THE TOOL </div> |
| <p>Documento de Trabajo de Situación https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/21000/2329107_234923_00301</p> | 100% | <div style="background-color: #f06292; padding: 5px; border: 1px solid #f06292; border-radius: 4px;"> MINOR CHANGES </div> |
| <p>Alimentación, QuevedoChaya, Karri.pdf[sequence=1&Allow... https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2300/1152967</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> HEAVY OVERLAP WITH DIFFERENT FORM OR "HEAVY" REPHRASING </div> |
| <p>UPS-QT13697.pdf https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/23438/789/143344/UPS-QT13697.pdf</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> PARAPHRASING </div> |
| <p>C2_en_construccion.pdf https://www.unj.edu.ar/revistas/publicaciones/revistas/revistas/revistas/revistas</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> THOSE HAVING THE DIFFERENT WORDS USED TO CONVEY THE SAME MESSAGE </div> |
| <p>ADRIAN FABRICIO FERRIN GILER - ppt descargar https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/1489448/</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>(PDF) Control del desarrollo microbiológico de platos de labo... https://www.researchgate.net/publication/344254393_Control_del_desarrollo</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> THE RESULTS HAVE BEEN FOUND AFTER COMPARING YOUR SUBMITTED TEXT TO OTHER SOURCES, OPEN SOURCES, AND THE COPYLEAKS INTERNAL DATABASE. FOR ANY QUESTIONS ABOUT THE RESULT CONTACT US ON support@copyleaks.com </div> |
| <p>ANEXO 1_181120220121102863482200996180.pdf[sequence=3 https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2311987442863482200996180/23112022</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>4178_85.pdf https://www.repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2311987442863482200996180/23112022</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>Palacios_Pedro y Diaz Bayron, 2019.pdf[sequence=1 https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2300/127464</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>Alimentación e identificación de bacterias ácido lácticas e ps... https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2300/127464</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>Grupos y ácidos grasos en nutrición humana https://www.fao.org/3/i7936/i7936.pdf</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>T-UC36-FRG-FEC-AGRO-111.pdf https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2300/127464</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |
| <p>Estudio del efecto de las concentraciones de cloruro de sodio... https://repositorio.unj.edu.ar/bitstream/handle/document/2300/127464</p> | 100% | <div style="background-color: #ffc107; padding: 5px; border: 1px solid #ffc107; border-radius: 4px;"> UNSURE ABOUT YOUR RESULT? </div> |

Firma:



ESTADO: 04/07/2022 08:07:00
SUNGEY NAYNEE SANCHEZ LLAGUNO

Sánchez Llaguno, Sungey Naynee, Ph.D.
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 carne de dos especies de tilapia: Negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) considerando distintas concentraciones de cloruro de sodio" fue realizado por la señorita Granja Cedeño **Angie 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, 17 de febrero del 2022

Firma:



SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

Sánchez Liaguno 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, Granja Cedeño Angie Mishell, con cédula de ciudadanía n° 1724954779, 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 carne de dos especies de tilapia: Negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) considerando distintas concentraciones de cloruro de sodio" 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, 17 de febrero del 2022

Firma:

Granja Cedeño Angie Mishell

C.C.: 1724954779



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Granja Cedeño Angie Mishell, con cédula de ciudadanía n° 1724954779, 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 (Mucilago), Nacional y CCN-S1, para la bioconservación de carne de dos especies de tilapia: Negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) considerando distintas concentraciones de cloruro de sodio" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 17 de febrero del 2022

Firma:

Granja Cedeño Angie Mishell

C.C.: 1724954779

Dedicatoria

Dedico este trabajo, principalmente, a Dios, por su amor incondicional y por haberme permitido llegar hasta este momento tan importante en mi formación profesional.

A mi familia, mi madre Yuri Cedeño y mi padre Marcelo Granja, por brindarme todo su apoyo, esfuerzo y sacrificio para permitirme culminar mis estudios.

A mis queridos hermanos Jeremy y Jegner, y a Tomy, por brindarme su apoyo incondicional y momentos de alegría.

A mi Yaya, por brindarme su amor, ánimo, confianza y consejos, que me han permitido centrarme y continuar adelante en todo este largo camino hasta el día de hoy.

A mis amigos y a todos quienes han estado para mí, y formaron parte de mi crecimiento personal.

Gracias infinitamente, los quiero.

Agradecimiento

Extiendo mis agradecimientos, especialmente, a Dios por permitirme cumplir una meta más dentro de mi formación académica.

A mi familia, principalmente a mis padres, por su apoyo y sacrificio en mi carrera universitaria, y mis hermanos, por alegrarme con sus ocurrencias.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por los conocimientos que me impartieron los docentes durante toda la etapa de mi desarrollo profesional.

A la directora del presente proyecto de investigación, la Dra. Sungey Sánchez, por ser una inspiración, por compartir sus conocimientos durante toda mi trayectoria académica y por su compromiso durante el desarrollo del presente trabajo, de la misma manera al Dr. Juan Neira, en especial, por su ayuda en aclarar cualquier tipo de duda que surgiera en mi trayectoria universitaria.

A la Ing. Katty Medina por su colaboración y su grata amistad durante el proyecto de investigación.

A mis queridos amigos, que aparte de brindarme su amistad también me ayudaron impartiendo sus conocimientos en los momentos que más lo necesité, de igual manera a Josselyn L., por su ayuda en el transcurso del presente proyecto.

Al Instituto de investigación INIAP- Pichilingue por ayudarme en la obtención del material vegetal necesario para el presente trabajo de investigación.

Y a todas las personas, quienes, de alguna manera, pusieron su granito de arena para que este proyecto de investigación se desarrolle de la mejor manera.

Muchas gracias de todo corazón a todas las personas mencionadas anteriormente.

Índice de Contenido

| | |
|---|----|
| Caratula..... | 1 |
| Reporte de verificación de contenido | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de auditoría | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria..... | 6 |
| Agradecimiento..... | 7 |
| Resumen | 17 |
| Abstract..... | 18 |
| Capítulo I..... | 19 |
| Introducción..... | 19 |
| Objetivos | 21 |
| Objetivo general | 21 |
| Objetivos específicos | 21 |
| Hipótesis | 22 |
| Hipótesis para el Factor A (Especies de tilapia) | 22 |
| Hipótesis para el Factor B (Concentraciones de cloruro de sodio + BAL)..... | 22 |
| Capítulo II..... | 23 |
| Revisión de Literatura | 23 |
| Cacao | 23 |
| Generalidades | 23 |
| Taxonomía..... | 23 |
| Variedades..... | 24 |
| Composición del fruto del cacao | 26 |

| | |
|---|----|
| Mucílago de cacao..... | 26 |
| Fermentación del mucilago de cacao | 27 |
| Bacterias Acido lácticas..... | 28 |
| Generalidades | 28 |
| Taxonomía y Características | 29 |
| Capacidad antimicrobiana | 31 |
| Identificación molecular | 32 |
| Efecto de las BAL como conservante en productos alimenticios..... | 32 |
| Tilapia | 33 |
| Clasificación Taxonómica..... | 33 |
| Produccion de la tilapia | 34 |
| Causas y efectos del deterioro en pescado fresco..... | 35 |
| Composición química | 35 |
| Efecto del pH en el pescado | 36 |
| Bioconservación..... | 37 |
| Cloruro de sodio | 38 |
| Capítulo III..... | 39 |
| Metodología..... | 39 |
| Ubicación del área de investigación | 39 |
| Ubicación política | 39 |
| Ubicación Ecológica..... | 39 |
| Ubicación Geográfica..... | 40 |
| Materiales..... | 41 |
| Determinación de pH | 41 |
| Determinación de Acidez | 41 |
| Determinación de Sólidos Solubles | 42 |

| | |
|--|----|
| | 10 |
| Aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas | 42 |
| Tinción Gram | 43 |
| Ensayo de catalasa | 43 |
| Enriquecimiento selectivo de las bacterias ácido lácticas | 44 |
| Bioconservación de la carne de tilapia | 44 |
| Recuento de poblaciones microbianas | 45 |
| Determinación de proteína bruta..... | 45 |
| Determinación de humedad..... | 46 |
| Determinación de grasas totales | 47 |
| Determinación de cenizas | 47 |
| Métodos | 48 |
| Obtención de la materia prima..... | 48 |
| Fermentación del mucilago de cacao | 48 |
| Siembra y Aislamiento de las bacterias ácido lácticas | 48 |
| Identificación microbiana | 49 |
| Tinción Gram..... | 49 |
| Prueba de catalasa. | 49 |
| Secuenciación y análisis filogenético..... | 49 |
| Bioconservación de las carnes de tilapia | 50 |
| Solución bacteriana..... | 50 |
| Preparación de la muestra. | 51 |
| Análisis Sensorial | 51 |
| Diseño Experimental | 52 |
| Factores del experimento | 52 |
| Tratamientos a comparar | 52 |
| Tipo de diseño | 53 |

| | |
|---|----|
| | 11 |
| Repeticiones | 53 |
| Análisis Estadístico..... | 53 |
| Análisis funcional..... | 54 |
| VARIABLES EVALUADAS | 54 |
| pH..... | 54 |
| Acidez Titulable | 54 |
| Sólidos Solubles..... | 56 |
| Proteína bruta | 56 |
| Humedad..... | 57 |
| Grasa total..... | 58 |
| Cenizas | 59 |
| Recuento de poblaciones microbianas | 60 |
| Capítulo IV..... | 61 |
| Resultados..... | 61 |
| Caracterización físico-química del mucílago de cacao | 61 |
| Identificación de las BAL aisladas del mucílago de cacao fermentado | 63 |
| Análisis de varianza..... | 66 |
| Análisis de varianza para la variable pH..... | 66 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable..... | 68 |
| Análisis de varianza para la variable humedad | 70 |
| Análisis de varianza para la variable grasa total | 71 |
| Análisis de varianza para la variable cenizas | 73 |
| Análisis de varianza para la variable proteína bruta | 74 |
| Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio..... | 76 |
| Resultados del estudio para las especies de tilapia (Factor A) | 76 |

| | |
|---|-----|
| Resultados del estudio para las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL (Factor B) | 79 |
| Prueba de Tukey para la interacción significativa en la bioconservación | 82 |
| Análisis de Tukey en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL) | 82 |
| Parámetro microbiológico de las carnes de tilapia | 89 |
| Recuento de bacterias aerobias | 89 |
| Recuento de Enterobacterias, mohos y levaduras | 90 |
| Análisis de conglomerados | 91 |
| Análisis de componentes principales | 92 |
| Análisis sensorial..... | 96 |
| Capítulo V..... | 98 |
| Discusión..... | 98 |
| Respecto a las especies de tilapia (Factor A) | 99 |
| Respecto a las distintas concentraciones de cloruro de sodio con las bacterias ácido lácticas (Factor B) | 100 |
| Respecto a la interacción A*B (Especie de Tilapia + Concentración de cloruro de sodio con BAL) | 102 |
| Calidad microbiológica..... | 104 |
| Capítulo VI..... | 106 |
| Conclusiones | 106 |
| Factor A (Especie de tilapia)..... | 106 |
| Factor B (Concentración de cloruro de sodio con BAL)..... | 107 |
| Interacción A*B (Especie de tilapia + Concentración de NaCl con BAL) | 108 |
| Recomendaciones | 109 |
| Capítulo VII..... | 110 |
| Bibliografía | 110 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Taxonomía del Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) | 24 |
| Tabla 2. Taxonomía de la tilapia. | 33 |
| Tabla 3. Composición química de la carne de la tilapia. | 36 |
| Tabla 4. Recursos necesarios para la determinación de pH..... | 41 |
| Tabla 5. Recursos necesarios para la determinación de acidez. | 41 |
| Tabla 6. Recursos necesarios para la determinación de sólidos solubles. | 42 |
| Tabla 7. Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en el mucilago de cacao fermentado. | 42 |
| Tabla 8. Recursos necesarios para la tinción Gram..... | 43 |
| Tabla 9. Recursos necesarios para el ensayo de catalasa. | 43 |
| Tabla 10. Recursos necesarios para el enriquecimiento de las BAL..... | 44 |
| Tabla 11. Recursos necesarios para la preparación de la solución probiótica. | 44 |
| Tabla 12. Recursos necesarios para el recuento microbiológico. | 45 |
| Tabla 13. Recursos necesarios para la determinación de proteína bruta en las carnes de tilapia. | 45 |
| Tabla 14. Recursos necesarios para la determinación de humedad en las carnes de tilapia. | 46 |
| Tabla 15. Recursos necesarios para la determinación de grasa total en las carnes de tilapia. | 47 |
| Tabla 16. Recursos necesarios para la determinación de ceniza en las carnes de tilapia. | 47 |
| Tabla 17. Factores y Niveles a probar en el estudio de la bioconservación de carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao y distintas concentraciones de cloruro de sodio. | 52 |
| Tabla 18. Tratamientos a comparar en el estudio de la bioconservación de carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao y distintas concentraciones de cloruro de sodio. | 52 |
| Tabla 19. Esquema de análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de la bioconservación de las carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao y diferentes concentraciones de cloruro de sodio. | 53 |
| Tabla 20. Caracterización físico-química del mucilago de cacao fresco y fermentado. | 61 |
| Tabla 21. Resultados de las pruebas microbiológicas de identificación bacteriana. | 63 |
| Tabla 22. Análisis de varianza para la variable pH en el día 0 de la bioconservación..... | 66 |
| Tabla 23. Análisis de varianza para la variable pH en el día 5 de la bioconservación..... | 67 |

| | |
|--|----|
| Tabla 24. Análisis de varianza para la variable pH en el día 10 de la bioconservación. | 67 |
| Tabla 25. Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 0 de la bioconservación. | 68 |
| Tabla 26. Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 5 de la bioconservación. | 69 |
| Tabla 27. Análisis de varianza para la variable acidez titulable en el día 10 de la bioconservación. | 69 |
| Tabla 28. Análisis de varianza para la variable humedad en el día 0 de la bioconservación. | 70 |
| Tabla 29. Análisis de varianza para la variable humedad en el día 10 de la bioconservación. | 71 |
| Tabla 30. Análisis de varianza para la variable grasa total en el día 0 de la bioconservación. | 71 |
| Tabla 31. Análisis de varianza para la variable grasa total en el día 10 de la bioconservación. ... | 72 |
| Tabla 32. Análisis de varianza para la variable cenizas en el día 0 de la bioconservación. | 73 |
| Tabla 33. Análisis de varianza para la variable cenizas en el día 10 de la bioconservación. | 74 |
| Tabla 34. Análisis de varianza para la variable proteína bruta en el día 0 de la bioconservación. | 74 |
| Tabla 35. Análisis de varianza para la variable proteína bruta en el día 10 de la bioconservación. | 75 |
| Tabla 36. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables físico- químicas. | 76 |
| Tabla 37. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables bromatológicas. | 76 |
| Tabla 38. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables físico- químicas. | 79 |
| Tabla 39. Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables bromatológicas. | 79 |
| Tabla 40. Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables físico-químicas. | 82 |
| Tabla 41. Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables bromatológicas. | 82 |
| Tabla 42. Recuento de Enterobacterias, mohos y levaduras en el día 10 de bioconservación de las carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas en distintas concentraciones de cloruro de sodio. | 90 |
| Tabla 43. Matriz de correlación de componentes principales. | 92 |

| | |
|--|----|
| Tabla 44. Matriz de componentes. | 93 |
| Tabla 45. Porcentajes de varianza total explica. | 93 |
| Tabla 46. Análisis sensoriales de las carnes de tilapia (<i>O. mossambicus</i> y <i>O. niloticus</i>) bioconservadas con cloruro de sodio y BAL, durante 10 días. | 96 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación | 40 |
| Figura 2. Árbol filogenético basado en las secuencias 16S ARNr de las BAL. | 64 |
| Figura 3. Estudio del efecto de las especies de tilapia (Factor A) en las variables de estudio..... | 77 |
| Figura 4. Estudio del efecto de las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL (Factor B) en las variables de estudio..... | 80 |
| Figura 5. Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable pH. | 83 |
| Figura 6. Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable acidez titulable..... | 84 |
| Figura 7. Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable humedad..... | 85 |
| Figura 8. Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable grasa total. | 86 |
| Figura 9. Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable cenizas. | 87 |
| Figura 10. Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable proteína bruta. | 88 |
| Figura 11. Recuento de bacterias aerobias durante el tiempo de bioconservación de las carnes de tilapia con bacterias lácticas en distintas concentraciones de cloruro de sodio. | 89 |
| Figura 12. Dendograma para los factores en estudio. | 91 |
| Figura 13. Gráfica de sedimentación. | 94 |
| Figura 14. Gráfica de componentes principales..... | 95 |

Resumen

En el presente estudio tuvo la finalidad de aislar y caracterizar las bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (Mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de carne de dos especies de tilapia: Negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) considerando distintas concentraciones de cloruro de sodio, siendo una idea innovadora para extender la vida útil del pescado que son afectas por microorganismos no deseados. La investigación fue realizada en los laboratorios de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. El aislamiento de las bacterias ácido lácticas se realizó del mucílago fermentado del cacao durante 72 horas, y luego se cultivó en un medio MRS agar y caldo MRS, suspendiéndolas en una solución ácido cítrico-citrato de sodio. El diseño experimental se basó en un modelo bifactorial (Especies de Tilapia: *O. mossambicus* y *O. niloticus*; Concentraciones de cloruro de sodio con bacterias lácticas: 10, 15 y 20%) en un diseño de bloques completamente al azar, con 6 tratamientos y 3 repeticiones; para la separación de medias se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Las bacterias ácido lácticas obtenidas pertenecieron a la especie *Lactobacillus plantarum*. Además, los resultados de los análisis físico-químicos (pH, acidez, humedad, grasa, ceniza y proteína) y microbiológico evaluados en la tilapia presentaron diferencias significativas. Al bioconservarlas en refrigeración por 10 días, se logró extender su vida útil. Los tratamientos en la especie *O. niloticus* presentaron mayor acidez, humedad, grasa, ceniza y proteína, en comparación a la especie *O. mossambicus* que obtuvo mayor pH. Además, no se presentó crecimiento de hongos, levaduras y enterobacterias por la presencia de las bacterias ácido lácticas.

Palabras claves:

- **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**
- **BIOCONSERVACIÓN**
- **CLORURO DE SODIO**
- **MUCÍLAGO**
- **TILAPIA**

Abstract

In the present study it had the purpose of isolating and characterizing lactic acid bacteria in two varieties of cocoa (Mucilage), National and CCN-51, for the bioconservation of meat of two species of tilapia: Black (*Oreochromis mossambicus*) and red (*Oreochromis niloticus*) considering different concentrations of sodium chloride, being an innovative idea to extend the shelf life of fish that are affected by unwanted microorganisms. The research was carried out in the laboratories of the University of the Armed Forces ESPE headquarters Santo Domingo. The isolation of the lactic acid bacteria was performed from the fermented mucilage of cocoa for 72 hours, and then grown in an MRS agar medium and MRS broth, suspending them in a citric acid-sodium citrate solution. The experimental design was based on a bifactorial model (Tilapia species: *O. mossambicus* and *O. niloticus*; Sodium chloride concentrations with lactic acid bacteria: 10, 15 and 20%) in a completely random block design, with 6 treatments and 3 repetitions; for the separation of means, the Tukey ($p < 0.05$) test was applied. The lactic acid bacteria obtained belonged to the species *Lactobacillus plantarum*. In addition, the results of the physico-chemical analyses (pH, acidity, humidity, fat, ash and protein) and microbiological analyses evaluated in tilapia presented significant differences. By bioconserving them in refrigeration for 10 days, it was possible to extend their useful life. The treatments in the species *O. niloticus* presented greater acidity, humidity, fat, ash and protein, compared to the species *O. mossambicus* that obtained higher pH. In addition, there was no growth of fungi, yeasts and enterobacteria due to the presence of lactic acid bacteria.

Keywords:

- **LACTIC ACID BACTERIA**
- **BIOPRESERVATION**
- **SODIUM CHLORIDE**
- **MUCILAGE**
- **TILAPIA**

Capítulo I

Introducción

La producción piscícola en el Ecuador presenta una gran importancia económica, su incidencia en la historia como un país dedicado a la actividad acuícola, entre los cuales destaca el cultivo de tilapia y camarón, induce a un incremento competitivo a nivel nacional. Los procedimientos de manipulación y conservación se basan en la refrigeración o congelación demostrando ser muy eficaces debido que permiten la conservación de la carne por un tiempo prolongado; a pesar de ello, sus ventas directas al consumidor comúnmente son realizados en mercados populares y a menudo se encuentran en condiciones precarias y exhibidas a la contaminación microbiana alterando sus propiedades organolépticas (Mera, 2015). El abordar este sector pesquero como desarrollo sostenible del país y su alta demanda de consumo, exige cumplir con varios parámetros de calidad que garanticen la seguridad y calidad del producto (Capelo, 2021).

El pescado es uno de los alimentos más inestables, debido que sus tejidos se degradan rápidamente. Algunas técnicas que tienen lugar durante la pesca, incluso antes, favorecen su descomposición; la cual continúa con la muerte y los procesos bioquímicos del músculo que podrían ser alterados por condiciones biofísicas. Existen pocas investigaciones técnicas sobre la aplicación de agentes antimicrobianos en la conservación de productos perecederos, y sobre todo en la conservación de pescado (Mera, 2015).

Actualmente, en Ecuador utilizan algunos métodos capaces de prolongar la conservación de alimentos, los métodos principalmente empleados son térmicos y conservantes químicos, estas técnicas pueden intervenir en las características sensoriales de la carne y tienen menor

aceptación por los efectos adversos que causan en el entorno y en la salud humana. Por esta razón se han implementado alternativas, como el uso de bioconservantes para la conservación de carnes, en otros países este método ya tiene mayor aceptación por parte del consumidor, debido a que controlan las propiedades organolépticas de los alimentos y garantizan la salud del consumidor inhibiendo el crecimiento de microorganismos indeseables (Mera, 2015).

Entre las alternativas de origen natural, se encuentran las bacterias ácido láctico (BAL) que permite prevenir el deterioro de los alimentos, mantener una buena calidad de carne, reducir e inhibir la acción de importantes patógenos, a través de sus capacidades de producir compuestos antimicrobianos, incluido bacteriocinas (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 se encuentran en alimentos para humanos y productos fermentados. Uno de esos productos es el mucílago de cacao fermentado, el cual a menudo es desperdiciado y no tiene aplicación en el campo industrial en Ecuador (Vallejo et al. 2016). La diversidad de especies de BAL obtenidas de la fermentación del mucilago cacao es bastante limitada, debido a que aparecen en las fases media y tardía del proceso de fermentación, encontrando principalmente *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* por las capacidades de utilizar la glucosa, fructosa y ácido cítrico (De Vuyst y Leroy, 2020).

Objetivos

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (Mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de carne de dos especies de tilapia: Negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) considerando distintas concentraciones de cloruro de sodio.

Objetivos específicos

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

Evaluar la diferencia entre la carne de tilapia negra (*Oreochromis mossambicus*) y roja (*Oreochromis niloticus*) en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

Evaluar el efecto de la aplicación de las bacterias ácido lácticas con distintas concentraciones de cloruro de sodio al 10%, 15% y 20% para la bioconservación de la carne de tilapia.

Determinar mediante análisis físico-químicos y microbiológicos la influencia del bioconservante aplicado en las características en la carne de tilapia.

Hipótesis

Hipótesis para el Factor A (Especies de tilapia)

Ho: La especie de tilapia no influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

Ha: La especie de tilapia influye en la bioconservación con bacterias ácido lácticas.

Hipótesis para el Factor B (Concentraciones de cloruro de sodio + BAL)

Ho: La aplicación de las bacterias ácido lácticas con distintas concentraciones de cloruro de sodio no influyen en la bioconservación de la carne de tilapia.

Ha: La aplicación de las bacterias ácido lácticas con distintas concentraciones de cloruro de sodio influyen en la bioconservación de la carne de tilapia.

Capítulo II

Revisión de Literatura

Cacao

Generalidades

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta tropical perteneciente al orden Malvales, a la familia Esterculiáceas, genero *Theobroma*, y especie *cacao*. La especie proviene de los bosques húmedos tropicales de Suramérica, en las regiones de Amazonas y Orinoco. La siembra desde la semilla hasta la primera flor se produce dos años después de la germinación, según el genotipo. Los frutos tardan de 4 a 7 meses en madurar y oscilan entre cero a 200 frutos por árbol debido al porcentaje de frutos que florecen varía entre el 0,5% y el 5%, donde los insectos proporcionan la polinización natural (Batista, 2009).

Su fruto es una mazorca cuya forma y color varían según su fenotipo y genotipo. Cada uno contiene de 20 a 60 semillas de forma de almendras incrustadas en una pulpa blanca, una epidermis pigmentada, un epicarpio grueso de dureza variable, un mesocarpio leñoso delgado y duro y un endocarpio. El endocarpio consta de grandes células tubulares con espacios intercelulares que hacen que las semillas maduras colapsen y formen pulpa (Cerri et al. 2019).

Taxonomía

La taxonomía es una rama de la ciencia en la que permite clasificar diferencias entre distintos grupos de organismos. La taxonomía del cacao se detalla más adelante en la tabla 1.

Tabla 1*Taxonomía del Cacao (Theobroma cacao L.)*

| | |
|-------------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Filo | Spermatophyta |
| Subfilo | Angiospermae |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Dilleniidae |
| Orden | Malvales |
| Familia | Malvaceae |
| Subfamilia | Sterculioideae |
| Genero | <i>Theobroma</i> |
| Especie | <i>cacao</i> L. |

Fuente: Dostert et al. 2017.

Variedades

El cacao representa una gran variedad genética, aproximadamente más de 14 000 variedades. Las principales variedades de cacao utilizados comercialmente para la producción de chocolate son: Forastero, Nacional, Trinitario y el Criollo; que se diferencian por sus propiedades morfológicas (Aprotosoie et al. 2016).

Forastero. La variedad Forastero es de origen de la Amazonía, siendo cultivado en Brasil, África Occidental y el Sureste Asiático y, debido a su alta variabilidad genética en la producción, representa el 95% de la producción mundial de cacao, que es más vigorosa y menos susceptible a enfermedades y plagas, en comparación con la variedad Criollo. Sus frutos son duros, amarillos y redondos y contienen más de 30 semillas, que varían en color desde el violeta claro al violeta oscuro (Bhattacharjee y Akoroda, 2018).

Nacional. El Nacional es originario de Ecuador, posee diferentes propiedades de sabor y aroma, sus mazorcas son amelonadas, semillas medianamente gruesas y de color violeta claro a morado, sus árboles son robusto y altos. Actualmente, esta variedad se encuentra en peligro de extinción debido a la introducción de un externo germoplasma no relacionado por lo cual quedan pocas plantaciones en estado puro por lo tanto se han realizado plantaciones híbridas (Nacional y Trinitarios) para mantenerlos en comercialización (Bhattacharjee y Akoroda, 2018).

Trinitario. La variedad Trinitario es un híbrido de las variedades Forastero y Criollo, obteniendo un gran rendimiento y menor susceptibilidad a enfermedades. Es originaria de la cuenca baja del Amazonas y se cultiva en las Indias Occidentales, Sudamérica y Centroamérica. Las mazorcas son duras y de color variable, y generalmente contienen más de 30 semillas (Bhattacharjee y Akoroda, 2018).

El cacao CCN-51 (Colección Castro Naranjal) pertenece a la variedad Trinitario y se cultiva ampliamente en Ecuador. El CCN-51 es un híbrido con una productividad mayor en comparación con las otras variedades. Además, posee alta calidad de fermentación, mayor cantidad de grasas, peso, homogeneidad (Del Águila Flores y Zegarra, 2016).

Criollo. La variedad Criollo fue domesticado por la civilización maya en América central. En la actualidad, se encuentran en Venezuela, Madagascar, centro América, Samoa y Sri Lanka debido a su productividad baja y susceptibilidad alta a enfermedades, plagas y estrés. Las plántulas de esta variedad jóvenes presentan cotiledones verdes y tallos de las hojas con orientaciones horizontales opuestas. Su fruto contiene una cascara suave y fina con una superficie texturizada y una ligera pigmentación rojiza. Las semillas, por otro lado, son redondas con cotiledones de color blanco pálido o púrpura claro (Bhattacharjee y Akoroda, 2018).

Composición del fruto del cacao

El fruto del cacao está conformado por una cascara dura y la placenta que sobra cuando se rompe el fruto para la extracción de los granos, que representan menos del 75% del peso total de las mazorcas descartadas, es decir, como máximo el 21% de lo cosechado. El producto se deriva de semillas o granos extraídos utilizados con fines de lucro. Actualmente, la producción de cacao se centra principalmente en el uso y comercialización del cacao en grano, sin tener en cuenta el alto valor nutricional de la pulpa que contiene (Yugcha y Largo, 2016).

Mucílago de cacao

El mucílago de cacao es la pulpa mucilaginoso de aspecto líquido viscoso de color amarillo pálido que se usa, generalmente, para la producción de jalea y bebidas alcohólicas, y cuenta con un alto valor nutricional. El mucílago se encuentra rodeando las semillas de cacao y está compuesta principalmente por parénquima, 82-88% de agua, 10-15% de azúcar, 1-2% de ácido cítrico y 1% de pectina. Asimismo, tiene minerales, aminoácidos libres, vitaminas y proteínas. Además, el mucílago es un medio enriquecido para el crecimiento bacteriano, pero al estar dentro de las mazorcas son microbiológicamente estériles (Sánchez et al. 2019).

El mucílago de cacao es necesario para la fermentación, por lo general hay más mucílago de lo necesario. Por lo cual el exceso de mucílago ha sido utilizado para hacer diversos productos como vinagre, jalea de cacao, nata y pulpa procesada. Generalmente, 20 litros de mucílago de cacao se puede obtener aproximadamente 400 kilos de semillas frescas de cacao (Torres et al. 2016).

Fermentación del mucilago de cacao

La fermentación del mucílago de cacao es un proceso microbiológico que ocurre en la pulpa que recubre a la semilla, la cual es rica en glucosa, fructosa y sacarosa. Su pH inicial se debe a la alta concentración de ácido cítrico (1 a 3%), la cual está bajo de 3.2 a 4. Los microorganismos que inician la fermentación son las levaduras debido al alto contenido de azúcar, bajo valor de pH y limitación de oxígeno del mucílago (López et al. 2019).

Las levaduras en el proceso de fermentación tienen la función de producir etanol a partir de carbohidratos, absorber ácido cítrico y romper la pectina para generar CO₂, lo que favorece las condiciones anaeróbicas en el desarrollo de las BAL, rompe el azúcar y produce ácido láctico, manitol y ácido acético, y consumir ácido cítrico. Las bacterias anaeróbicas cuando no hay mucha presencia de oxígeno o buena aireación producen una fermentación butírica generando una putrefacción de las semillas (López et al. 2019).

De acuerdo con Aprotosoai et al. (2016), la fermentación dura de 48 a 96 horas y provoca el desarrollo de bacterias del ácido láctico. Posteriormente, estas bacterias son reemplazadas por bacterias acéticas (BAA), que permiten la oxidación del etanol producido por la levadura en ácido acético, eliminando el sabor amargo de las semillas al mezclar polifenoles y las membranas

lipídicas de las vacuolas celulares. por diversas reacciones enzimáticas y el contenido celular se mezcla (López et al. 2019).

Varios factores influyen en la fermentación, como la técnica, el tiempo, la velocidad, la conservación de la mazorca y el genotipo del cacao, lo que genera diferencias en la calidad del cacao. Los métodos de fermentación más utilizados son plataformas, cestas, montones, bandejas y cajas. Las BALs se asocian sistemáticamente con la fermentación de los granos de cacao, aumentando las poblaciones microbianas de 10^6 a 10^8 UFC / g durante las primeras 35-49 horas del proceso. Entre la diversidad de especies de BAL, se aislaron de estos ecosistemas *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*, que son las dominantes con mayor frecuencia (Aprotosoai et al. 2016).

Las actividades metabólicas y las posibles funciones de las BAL en la fermentación del cacao se deben a tres principales actividades: fermentación de los azúcares (glucosa y fructosa) en ácido láctico y, en menor medida, en alcohol etílico y ácido acético; usando el ácido cítrico de la pulpa para producir ácido acético, ácido láctico, diacetilo, acetaldehído, 2,3-butanodiol y acetoína; además algunas de las BAL pueden disminuir la fructosa del mucilago a manitol (Ho et al. 2015).

Bacterias Acido lácticas

Generalidades

Las bacterias ácido láctico (BAL) se utilizan en la industria de alimentos como cultivos iniciales para obtener productos fermentados, y sus metabolitos se han utilizado como bioconservantes naturales, ya que pueden controlar el crecimiento de bacterias patógenas en los alimentos. Entre sus metabolitos incluyen bacteriocinas, que son estables a pH bajo, sensibles a

la proteasa y péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular termoestables. Son precisamente estas propiedades las que los caracterizan como compuestos ideales para suplantar parcialmente el uso de principios activos químicos en los alimentos (Ramirez et al. 2011).

La principal función de las BAL es la producción de ácido láctico (acidificación de los alimentos) y contribuyen a la textura, al sabor y al valor nutricional de los alimentos fermentados a través de componentes de sabor, producción o descomposición de lípidos, exopolisacáridos y proteínas, produciendo nutrientes como cultivos funcionales y tienen un efecto terapéutico, inhibiendo el deterioro y los microorganismos patógenos. Vieco et al. (2019) menciona que los mecanismos de inhibición a microorganismos patógenos por bacterias probióticas del ácido láctico implican la elaboración de compuestos inhibidores, prevención de la adhesión de patógenos, competencia por nutrientes, modulación del sistema inmunológico del huésped, mejorar la digestibilidad de nutrientes, conversión de alimentos, y la reducción de la biodisponibilidad de toxinas (Vieco et al. 2019).

Taxonomía y Características

Las BAL son perteneciente al filo Firmicutes y a la clase Bacilli, son bacterias, generalmente, Gram-positivas pertenecientes a un grupo heterogéneo que comprende aproximadamente 20 géneros, que incluyen *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Weissela*, *Carnobacterium* y *Aerococcus*; las cuales estas son los más influyentes en la alimentación. Tienen un bajo contenido de citosina + guanina, son tolerantes a los ácidos, no esporulantes, generalmente inmóviles, tienen forma de bacilos o cocos de longitud variable y grosor de 0,5-0,8 μm . Además, constituyen un grupo de bacterias anaerobias facultativas o microaerofilicas fisiológicamente uniformes y no tienen

actividad respiratoria debido a la ausencia de la enzima citocromo catalasa, si bien son tolerantes al oxígeno (Parra, 2010).

Las BAL tienen características metabólicas y ecológicas importantes en la economía y en la tecnología en los alimentos, se clasifican en base a la morfología, los métodos de fermentación de la glucosa, su desarrollo a diversas temperaturas y la configuración del ácido láctico producido. Debido a las características de estos microorganismos, cuando se procesan y propagan para uso en grupo, forman un caldo de bacterias productoras y fermentadoras de ácido láctico, función para la cual se utilizan en la industria alimentaria, permitiendo características únicas a varios alimentos, además, los protege contra la actividad de algunos patógenos (Londoño et al. 2015).

Las BAL han sido empleadas para la fermentación o para crear cultivos de alimentos en los últimos años. El uso más común de las BAL es en la industria láctea, se utilizan en productos como queso, yogur, nata y mantequilla. Sin embargo, sin comprender la base científica detrás de los efectos de estas bacterias, muchos pueblos antiguos utilizaron estas bacterias para producir alimentos modificados que tenían una vida útil mucho más larga debido a los efectos de estas bacterias y que estaban dotados de sabor, textura y calidad únicas que estas bacterias proporcionaron al producto original. La actividad de estas bacterias conduce a un proceso microbiano en el que lactosa se convierte en ácido láctico. El enriquecimiento con ácido láctico modifica la estructura de las proteínas de la leche, lo mismo ocurre con la consistencia del producto, también existen otras variables: la composición de la leche y la temperatura, que intervienen en las propiedades particulares de los productos lácteos (Londoño et al. 2015).

Las BAL presenta varios factores que modifican su crecimiento en medio de fermentación, tales como: temperatura (mesófila y termófila), condiciones ambientales y requerimientos nutricionales al crecer en medios complejos. Estos tipos necesitan aminoácidos, carbohidratos

fermentables, vitaminas del grupo B y alcoholes como fuente de energía para la formación de ácido láctico, ya que se dividen en homofermentativos (capacidad de producir el ácido láctico) y heterofermentativos (capacidad de producir el ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, CO₂ y etanol) (Parra, 2010).

Capacidad antimicrobiana

Las BAL tiene la capacidad de producir compuestos antimicrobianos además de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos de diacetilo de una proteína o péptido. Los péptidos antimicrobianos son sustancias multifacéticas con mecanismos de acción complejos, pero similares a las hormonas de los animales, ya que interactúan a través de su membrana con células patógenas o con dianas internas vinculadas a la síntesis de ADN, ARN o proteínas (Lopez, 2021).

Existen distintos modelos de los mecanismos de acción de los péptidos antimicrobianos en el metabolismo de las BAL, incluida la interacción inicial entre los péptidos antimicrobianos y la célula microbiana, a causa a la atracción entre el péptido catiónico y la envoltura bacteriana cargada negativamente que forma los poros de la membrana; o la inhibición de la síntesis de macromoléculas por un efecto sinérgico con los mecanismos inmunes innatos del huésped. Por lo tanto, los compuestos antimicrobianos no actúan de forma aislada, por esta razón, las estrategias multifactoriales son más efectivas en la conservación de alimentos (Linares et al. 2018).

Identificación molecular

La amplificación y secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) se usa ampliamente para la taxonomía y filogenia bacteriana, lo que lo convierte en el "temporizador molecular definitivo". De hecho, está presente en todas las bacterias y existe en forma de familia multigénica o de operón. Su función también era inmutable, por lo que es probable que los cambios aleatorios en la secuencia reflejen un cambio microbiano evolutivo (filogenia); y el gen de ARNr 16S es bastante grande, alrededor de 1 500 pb para propósitos computacionales (Idris et al. 2020).

La identificación genotípica de las BAL permite la determinación de forma precisa y fiable su identidad. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis filogenético basado en la secuencia del gen del ARNr 16S se utilizaron para identificar aislamientos de varios productos fermentados. Este enfoque molecular, por lo tanto, permite la identificación confiable de especies de *Lactobacillus* (Lawalata et al. 2020).

Efecto de las BAL como conservante en productos alimenticios

Las BAL tienen la capacidad de producir una gran variedad de compuestos antimicrobianos, tales como ácidos orgánicos (ácido cítrico, fumárico, málico, acético y láctico), CO₂, amoníaco, acetaldehídos, diacetilo, acetoína, etanol, reuterina, diacetilo, bacteriocinas, y otros metabolitos, que cuentan con una fuerte actividad antagónica contra muchos microorganismos patógenos (Agriopoulou et al., 2020).

Actualmente, las BAL son aplicadas para la bioconservación de productos alimenticios, como frutos, carnes y pescados, que han ayudado a controlar la producción de microorganismos

patógenos, de manera que afirma la liberación segura y gradual de las bacteriocinas presentes en los alimentos. Esto evita la inactivación de todo ello por la interacción que se produce entre los componentes del alimento (Guerra et al., 2005). Las bacteriocinas producidas por las BAL se caracterizan por su gran potencial para ser aplicadas en procesos de bioconservación, debido a su capacidad antimicrobiana inhibiendo la producción de microorganismos no deseados, del mismo modo, por su falta de toxicidad al ser consumido (Alvarez et al., 2016).

Tilapia

La tilapia es un tipo de pez de origen africano, perteneciente a la familia Cichlidae y al género *Oreochromis*, y consta de varias especies, algunas con fines económicos. Este tipo de pez presenta varias propiedades aptas para la domesticación y reproducción. Esto incluye la buena calidad y el sabor de su carne, su alta tolerancia a diversos ambientes, y la resistencia a varias enfermedades comunes de los peces. En Ecuador, las tilapias son la más representativa de los cultivos acuícolas de agua dulce (Mera, 2015).

Clasificación Taxonómica

Tabla 2

Taxonomía de la tilapia

| | |
|----------------|----------------|
| Reino | Animalia |
| Filo | Chordata |
| Clase | Actinopterygij |
| Orden | Perciformes |
| Familia | Cichlidae |

Subfamilia Pseudocrenilabrinae

Género *Oreochromis*

Existen una gran variedad de especies de tilapia que abarcan varios géneros, tales como: *Oreochromis*, *Iranocichla*, *Alcolapia*, *Steatocranus* y *Danakilia*. Las especies más conocidas y utilizadas en la acuicultura son pertenecientes al género *Oreochromis*. De estas podemos destacar la tilapia roja y la tilapia negra cuyo nombre científico es *Oreochromis mossambicus* y *Oreochromis niloticus*, respectivamente (Wang y Lu, 2016).

La tilapia roja es el resultado del cruzamiento de cuatro especies del género *Oreochromis* (*O. mossambica*, *O. aureus*, *O. homnorum*, y *O. niloticus*), tres de ellas son de origen africano y una de israelita. Por otro lado, la tilapia negra o también conocida como tilapia del Nilo, es originaria del norte de África e Israel, habita en cuerpos de agua lacustres, estanques y ríos. Esta especie es capaz de superar el tamaño de sus parientes lo que la convierte en una especie muy atractiva para su cultivo (Mera, 2015).

Produccion de la tilapia

En Ecuador se ha logrado alcanzar una posición muy importante como uno de los principales productores y exportadores de tilapia roja del mundo y ocupa el primer lugar en América Latina. Los principales clientes son Estados Unidos, pero la demanda está aumentando en los países europeos (Mera, 2015). Según un estudio de Corpei, 2001, cada año se producen más de 18 millones de toneladas, lo que corresponde al 20% de la demanda mundial de pescado.

Causas y efectos del deterioro en pescado fresco

El pescado fresco es aquel que no ha sufrido ninguna medida de conservación desde su captura, salvo la adición de hielo picado, puro o mezclado con sal. El descabezado, el desangrado, eviscerado y el mantenimiento en refrigeración no se considera un proceso conservante. Los elementos notorios de deterioro en el pescado incluyen: detección de sabores y olores desagradables, producción de gases, formación de exudados, pérdida de color y cambios en la textura (Salazar et al. 2011).

Existen dos tipos principales de deterioro en el pescado fresco: microbiológico y no microbiológico. Su pérdida inicial de frescura en su estado natural, en refrigeración o no, es debido a los cambios autolíticos, mientras que el deterioro es provocado principalmente por bacterias (Mera, 2015).

Composición química

La composición química de los peces cambia notoriamente entre especies, e incluso entre individuos de la misma especie, dependiendo del sexo, edad, ambiente y estación. Como muchos otros productos animales, el pescado y los productos pesqueros contienen agua, proteínas y otros compuestos nitrogenados, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Los lípidos o grasas y las proteínas son los componentes principales del pescado. Los micronutrientes y minerales esenciales en el pescado que carecen de alimentos básicos son las vitaminas B, las vitaminas A y D, el fósforo, el calcio, el hierro, el magnesio y el selenio, y el yodo en el pescado marino (FAO, 2001).

Tabla 3*Composición química de la carne de la tilapia*

| | Contenido (g/100g) | |
|----------------|--------------------|--------|
| | Mínimo | Máximo |
| Proteína total | 18 | 21 |
| Grasa total | 0,4 | 2,0 |
| Cenizas | 1,0 | 1,5 |
| Humedad | 72,3 | 76,9 |

Fuente: FAO, 2001; Perea et al. 2015.

Hasta el 40% de los lípidos del pescado son ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados que, si bien son buenos para la salud, plantean un problema técnico porque se degradan rápidamente. Todas las proteínas de pescado están compuestas por proteínas sarcoplásmicas, estructurales y del tejido conectivo, que contienen aminoácidos esenciales y son excelentes fuentes de lisina, cisteína y metionina. Varios procesos químicos y biológicos importantes tienen lugar en peces muertos y, si no se capturan con las medidas adecuadas, pueden descomponerse (FAO, 2001).

Efecto del pH en el pescado

El pH es definido como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno. El pH de un alimento es un elemento esencial que permite determinar la supervivencia de los microorganismos. La carne de pescado es ligeramente ácida en su estado natural. Tras la muerte del animal, el glucógeno se transforma en ácido láctico, lo que causa una disminución del valor de pH, que desciende a valores de 6.7, lo que conduce a una tendencia al cambio, este valor de pH

no permite la inhibición de la proliferación bacteriana. La carne de tilapia tiene un valor de pH aproximadamente 6,126 (Mera, 2015).

La levadura, los hongos y las bacterias pueden vivir a niveles máximos de pH similares. Además, las levaduras y hongos, generalmente, pueden crecer a valores de pH mucho más bajos a comparación de las bacterias ($\text{pH} < 4$). Por otro lado, el ácido libre o acidez titulable representa los ácidos orgánicos libremente presentes en una muestra; el ácido láctico predomina en el pescado. Estos factores son importantes debido a que indican el nivel de calidad o deterioro de un producto. La acidez de la carne de cachama (*Piaractus brachypomus*) es aproximadamente 0.39% de ácido láctico (Asap, 2015).

Bioconservación

La bioconservación es una aplicación biotecnológica que permite el aumento de la vida útil y seguridad de un alimento debido a la acción de una microbiota natural y controlada, y sus compuestos antimicrobianos (Cortés et al. 2018). Durante el almacenamiento y transporte de alimentos, la calidad sensorial y nutricional suelen disminuir debido al alto contenido de humedad, el crecimiento microbiano, las influencias ambientales, la madurez y el envejecimiento; debido a que tienen una vida útil corta, requieren cuidados especiales (Linares et al. 2018).

Los métodos más comunes de la conservación dependen del control de la transpiración, la respiración y el deterioro microbiano, pero los métodos tradicionales son generalmente vulnerables (Linares et al. 2018). Por lo tanto, las BAL es una alternativa ecológica que, por su consumo seguro, tiene un gran potencial de uso en los procesos de producción y bioconservación de alimentos, pudiendo contribuir a las propiedades organolépticas (textura, aroma y sabor) y valor nutricional (Cortés et al. 2018).

Cloruro de sodio

El cloruro de sodio (NaCl) es un excelente agente osmótico, su bajo peso molecular (58,44 g/gmol) permite una gran pérdida de agua del producto y una alta solubilidad, además provoca un alto índice de impregnación en el tejido animal. El NaCl no solo es un agente osmótico, sino también un agente antimicrobiano (conservante), en gran parte debido a su efecto amortiguador sobre la actividad del agua. Los alimentos con 0,7 a 5% de sal añadida requieren un método de almacenamiento diferente para garantizar la estabilidad microbiológica. El NaCl se ha utilizado para estabilizar ciertos alimentos, incluido el pescado, con 0,7 a 3% de sal en su fase acuosa (Mera, 2015).

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: | Vía Quevedo, Km 24 |

Ubicación Ecológica

| | |
|--------------------|------------------------|
| Zona de vida: | Bosque húmedo tropical |
| Altitud: | 224 msnm |
| Temperatura media: | 24.6 ° C |
| Precipitación: | 2860 mm/año |
| Humedad relativa: | 85% |
| Heliofanía: | 680 horas luz/año |
| Suelo: | Francos Arenoso |

Fuente: Estación Agro-meteorológica "Puerto Ila", Vía Quevedo Km 34.

Ubicación Geográfica

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de los Alimentos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Santo Domingo, ubicado en la Vía Santo Domingo - Quevedo Km. 24, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

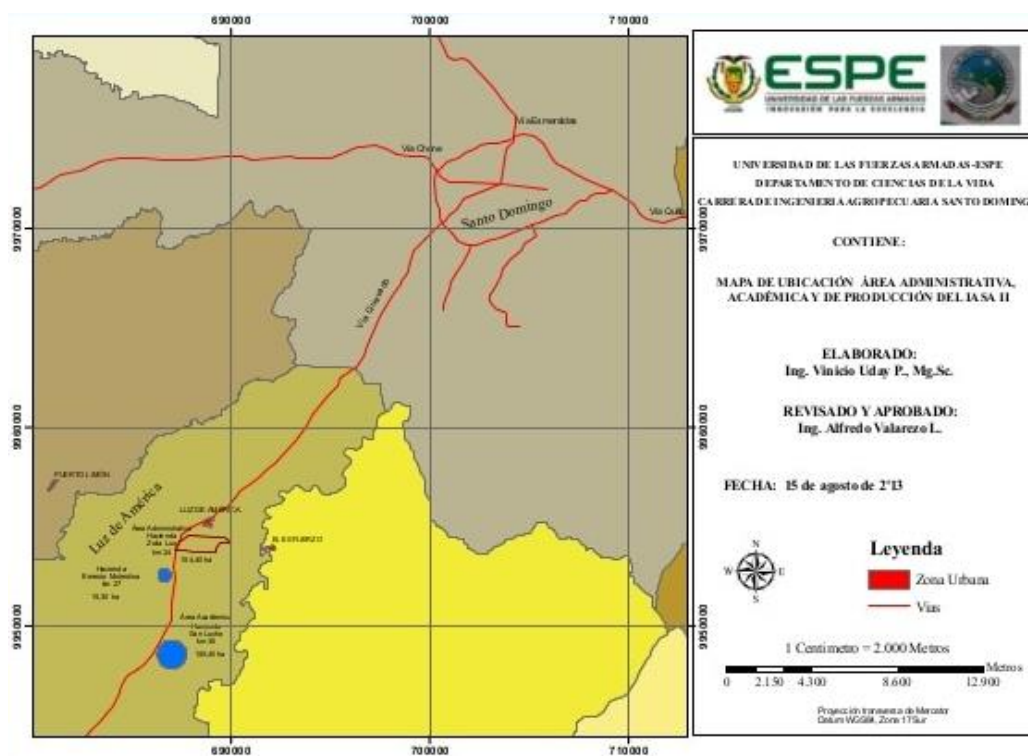
Latitud: 00° 24' 36''

Longitud: 79° 18' 43''

Altitud: 270 msnm

Figura 1

Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación



Materiales

Determinación de pH

Tabla 4

Recursos necesarios para la determinación de pH

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------|-------------------------------|------------------|------------------|
| Potenciómetro | Vaso de precipitación (250mL) | Agua destilada | Mucilago de |
| Balanza analítica | Probeta (100mL) | | cacao |
| | Pipeta (10mL) | | Carne de tilapia |
| | Varilla de vidrio | | |
| | Mortero y pistilo | | |

Determinación de Acidez

Tabla 5

Recursos necesarios para la determinación de acidez

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------|---------------------------|--------------------|------------------|
| Balanza analítica | Vaso de precipitación | Hidróxido de Sodio | Mucilago de |
| Potenciómetro | (250mL) | (NaOH) 0.1 N | cacao |
| | Agitador de vidrio | | |
| | Soporte universal | Fenolftaleína | Carne de tilapia |
| | Bureta graduada (25mL) | Agua destilada | |
| | Probeta (100mL) | | |

Determinación de Sólidos Solubles

Tabla 6

Recursos necesarios para la determinación de sólidos solubles

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|----------------|----------------------------------|------------------|-------------------|
| Refractómetro | Vaso de precipitación (250mL) | Agua destilada | Mucilago de cacao |

Aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas

Tabla 7

Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en el mucilago de cacao fermentado

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|
| Incubadora | Tubos de ensayo | MRS Agar | Mucilago de |
| Cámara de flujo laminar | Mechero de alcohol | Aceite de inversión | cacao |
| Autoclave | Asa drigalski | Agua peptona | fermentado |
| Microscopio | Asa bacteriológica | Agua destilada | |
| Balanza analítica | Placas Petri | Alcohol potable 96% | |
| Plancha térmica | Portaobjetos | | |
| magnética | Micropipeta | | |
| | Frascos para medios | | |

Tinción Gram**Tabla 8***Recursos necesarios para la tinción Gram*

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos |
|--------------------|--------------------------------|---------------------|
| Microscopio óptico | Portaobjetos | Agua destilada |
| | Asa bacteriológica | Cristal Violeta |
| | Mechero de alcohol | Lugol |
| | Vaso de precipitación (100 mL) | Alcohol acetona |
| | | Safranina |
| | | Aceite de inmersión |

Ensayo de catalasa**Tabla 9***Recursos necesarios para el ensayo de catalasa.*

| Materiales/Insumos | Reactivos |
|-------------------------------|------------------------------|
| Vaso de precipitado | Peróxido de hidrogeno al 30% |
| Portaobjetos | |
| Gotero | |
| Asa bacteriológica | |
| Vaso de precipitación (50 mL) | |

Enriquecimiento selectivo de las bacterias ácido lácticas

Tabla 10

Recursos necesarios para el enriquecimiento de las BAL

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------------|----------------------------|------------------|--------------------|
| Incubadora | Tubos de ensayo | Caldo MRS | Bacterias aisladas |
| Cámara de flujo laminar | Asa bacteriológica | | |
| Autoclave | Micropipeta | | |
| Balanza | Matraz Erlenmeyer (500 mL) | | |
| | Frasco autoclavable | | |

Bioconservación de la carne de tilapia

Tabla 11

Recursos necesarios para la preparación de la solución probiótica

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|
| Incubadora | Tubos de ensayo | Caldo MRS | Aislamiento |
| Cámara de flujo laminar | Mechero de alcohol | Ácido cítrico | de las BAL |
| Autoclave | Asa bacteriológica | Citrato de sodio | |
| Balanza analítica | Frascos para medios | Alcohol potable 96% | |
| Potenciómetro | Micropipeta | | |
| Centrífuga | Vaso de precipitación | | |
| Espectrofotómetro | Probeta | | |

Recuento de poblaciones microbianas**Tabla 12***Recursos necesarios para el recuento microbiológico*

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------|
| Incubadora | Tubos de ensayo | Agua de peptona | Carne de |
| Cámara de flujo laminar | Mechero de alcohol Micropipeta | Láminas de Petrifilm | Tilapia |
| Autoclave | Matraz Erlenmeyer | Alcohol potable 96% | Cultivo de |
| Balanza analítica | Vaso de precipitación | | BAL |
| Vortex | | | |
| Contador de colonias | Probeta | | |

Determinación de proteína bruta**Tabla 13***Recursos necesarios para la determinación de proteína bruta en las carnes de tilapia*

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|---|---------------------------------|--|---------------------|
| Balanza analítica | Tubos de destilación (100mL) | Ácido sulfúrico concentrado 96% | Carne de pescado |
| Unidad digestora | Matraz Erlenmeyer (250mL) | Solución de Hidróxido de Sodio al 40% | |
| Sorbona o colector /extractor de humos | Gotero | Solución de Ácido Bórico al 2% | |

| | | |
|---|-----------------|--|
| Unidad de Destilación | Bureta graduada | Solución de Ácido Clorhídrico 0. 1N |
| Plancha de calentamiento con agitador magnético | Espátula | Tabletas Catalizadoras |
| Termómetro | Gradilla | Indicador Kjeldahl |
| Equipo de titulación | Mortero | Agua destilada |

Determinación de humedad

Tabla 14

Recursos necesarios para la determinación de humedad en las carnes de tilapia

| Equipos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------|---------------------------|------------------|
| Balanza analítica | Crisoles de porcelana | Carne de pescado |
| Estufa | Espátula | |
| Desecador | Pinzas | |
| | Guantes | |

Determinación de grasas totales**Tabla 15***Recursos necesarios para la determinación de grasa total en las carnes de tilapia*

| Equipos | Materiales/Insumos | Reactivos | Muestras |
|-------------------|---|------------------|---------------------|
| Balanza analítica | Vasos Beacker para grasa | Éter de Petróleo | Carne de pescado |
| Aparato Golfish | Dedales de Extracción | | |
| Estufa | Portadedales | | |
| Desecador | Vasos para recuperación del solvente Espátula Pinza Universal Algodón Liofilizado e Hidrolizados | | |

Determinación de cenizas**Tabla 16***Recursos necesarios para la determinación de ceniza en las carnes de tilapia.*

| Equipos | Materiales/Insumos | Muestras |
|-------------------|---------------------------|------------------|
| Balanza analítica | Crisoles de porcelana | Carne de pescado |
| Estufa | Espátula | |
| Desecador | Pinzas | |
| Mufla | Guantes | |

Métodos

Obtención de la materia prima

Para la obtención del mucilago de cacao, de la variedad Nacional y CCN-51 se recolectó mazorcas de cacao maduras sin enfermedades y libres de agentes extraños en la Estación Experimental Tropical Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicado en el Km 5 vía a El Empalme – Quevedo, cantón Mocache, Provincia Los Ríos.

Por otro lado, las tilapias fueron obtenidas de la Hacienda “El encanto” ubicado en el recinto el Manantial en la parroquia Alluriquín – Santo Domingo, Ecuador.

Fermentación del mucilago de cacao

Para la fermentación, se desinfectó previamente las mazorcas de cacao mediante agua clorada (100 ppm) y luego con agua potable. Se retiró manualmente las almendras de cacao de la cáscara para posteriormente extraer el mucílago mediante un lienzo para filtrar.

Se fermentó 1000 mL del mucílago obtenido de la variedad CCN-51 y Nacional en una botella de plástico, cubierto con una funda negra y tapándolo con un globo, a temperatura ambiente en un periodo de 72 horas (Lopez, 2021).

Siembra y Aislamiento de las bacterias ácido lácticas

Se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-6} , utilizando 1 mL del mucilago de cacao fermentado en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptona (1,5%) y posteriormente se sembró 0,1 mL de cada dilución (10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}) en un medio MRS agar mediante el método de extensión, por duplicado, inoculando a una temperatura de 35°C - 37°C en un periodo de 48 horas (Lopez, 2021).

Las colonias formadas, se aislaron en un nuevo medio de MRS agar y se sembró mediante el método de estrías para la obtención de colonias puras (Lopez, 2021).

Identificación microbiana

Tinción Gram.

Se recogió una pequeña muestra de las colonias bacterianas obtenidas con un asa bacteriológica condiciones asépticas y se colocó en un portaobjeto con una gota de agua, posteriormente se fijó la muestra con calor (flameando 2-3 veces).

Luego se añadió el colorante cristal violeta durante 1 minuto, después lugol durante 30 segundos, luego una o dos de alcohol acetona durante 15 segundos, y safranina durante 1 minuto. Después de cada tinción, se retiró el exceso con agua destilada. Finalmente, se ocupó lente y aceite de inmersión para su observación en el microscopio óptico (Salazar, 2017).

Prueba de catalasa.

Se recogió una colonia bacteriana con un asa bacteriológica y se colocó en un portaobjeto estéril con una gota de peróxido de hidrógeno (3% de solución) y luego se extendió la muestra. Posteriormente, se observó la reacción.

En el caso que se detecte formación de burbujas antes de los 20 segundos este indicaría positivo a la prueba (Salazar, 2017).

Secuenciación y análisis filogenético.

Las bacterias aisladas en la caja Petri con medio de agar MRS se enviaron a Macrogen Inc. de Corea del Sur para la realización de la secuencia del ARNr 16S. Las secuencias realizadas se compararon con el programa BLASTn.

Se realizó un análisis filogenético en el programa MEGA X, luego se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con el algoritmo ClustalW, además, se elaboró un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joining utilizando la distancia genética de Tamura-Nei basada en 1000 réplicas Bootstrap. La bacteria *Bacillus aerius* se utilizó como un grupo externo del árbol filogenético (Lopez, 2021).

Bioconservación de las carnes de tilapia

Solución bacteriana.

Se añadió 55,15 gramos de caldo MRS en 1 litro de agua destilada para inocular las colonias bacterias aisladas a 37 °C durante 24 horas, y luego se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Lopez, 2021).

Posteriormente, se realizó un lavado a la solución bacteriana con tampón de ácido cítrico – citrato de sodio (0,1M; pH 3,8) mediante centrifugación a 5 000 rpm durante 15 minutos, este proceso se repitió hasta obtener el sobrenadante claro, aproximadamente 2-3 veces). Finalmente, se resuspendió las baterías lavadas en el mismo tampón de ácido cítrico – citrato de sodio (1:1 v/v) (Russo et al. 2014).

Preparación de la muestra.

Los filetes de tilapia, lavadas previamente, se rociaron con la solución bacteriana con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (10%, 15%, 20%), que fueron preparadas con agua destilada. Se conservaron en fundas herméticas y en refrigeración a 4-5°C durante 10 días.

Análisis Sensorial

Para este tipo de análisis, se realizó un panel de 10 jurados no expertos mediante una prueba hedónica, donde se evaluaron los siguientes parámetros: color, olor, y textura, a la carne de pescado según la norma del Codex alimentario CPE INEN-CODEX CAC/GL 31.

Diseño Experimental

Factores del experimento

Tabla 17

Factores y Niveles a probar en el estudio de la bioconservación de carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao y distintas concentraciones de cloruro de sodio

| Factores | Simbología | Niveles |
|---|------------|-----------------------|
| Especies de tilapia (A) | a_0 | <i>O. mossambicus</i> |
| | a_1 | <i>O. niloticus</i> |
| Concentraciones de cloruro de sodio con bacterias ácido lácticas (B) | b_0 | 10% + BAL |
| | b_1 | 15% + BAL |
| | b_2 | 20% + BAL |

Tratamientos a comparar

Tabla 18

Tratamientos a comparar en el estudio de la bioconservación de carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao y distintas concentraciones de cloruro de sodio

| N° | Interacciones | Unidades experimentales |
|----|---------------|-------------------------------------|
| T1 | a_0b_0 | <i>O. mossambicus</i> con 10% + BAL |
| T2 | a_0b_1 | <i>O. mossambicus</i> con 15% + BAL |
| T3 | a_0b_2 | <i>O. mossambicus</i> con 20% + BAL |
| T4 | a_1b_0 | <i>O. niloticus</i> con 10% + BAL |
| T5 | a_1b_1 | <i>O. niloticus</i> con 15% + BAL |
| T6 | a_1b_2 | <i>O. niloticus</i> con 20% + BAL |

Tipo de diseño

Para el análisis estadístico de este estudio, se aplicó un ANOVA DBCA con arreglo factorial AXB, donde el factor A corresponde a las especies de tilapia utilizadas y el factor B a las concentraciones de cloruro de sodio con BAL.

Repeticiones

El diseño del experimento se realizó con 3 repeticiones por cada tratamiento, con un total de 18 unidades experimentales.

Análisis Estadístico

Tabla 19

Esquema de análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de la bioconservación de las carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas provenientes de mucilago de cacao y diferentes concentraciones de cloruro de sodio

| Fuente de variación | | Grados de libertad |
|--|------------|---------------------------|
| Especie de tilapia | a-1 | 1 |
| Concentraciones de NaCl + BAL | b-1 | 2 |
| Especie de tilapia x concentraciones de NaCl + BAL | (a-1)(b-1) | 2 |
| Replicas | r-1 | 2 |
| Error Experimental | | 10 |
| Total | | 17 |

Análisis funcional

Se aplicó una prueba de significancia de Tukey ($p < 0.05$) para las variables evaluadas con resultados significativos en el análisis de varianza.

Variables evaluadas

La determinación de cada variable se realizó por triplicado sobre la misma muestra preparada.

pH

Para la determinación de pH del mucilago de cacao, se basó en el procedimiento de la norma INEN 389 (1985):

Se añadió 10 mL de la muestra preparada en un vaso de precipitación con 100 mL de agua destilada, y se mezcló la muestra. Luego, se filtró la muestra para retirar cualquier partícula en suspensión.

Para la muestra cárnica, se realizó basándose en el procedimiento de la norma INEN 183 (2013):

Se pesó 10 gramos de la muestra preparada y se añadió 100 mL de agua destilada, posteriormente se licuó durante 1 minuto. Luego, se filtró la mezcla con un lienzo para la eliminación del tejido conectivo. Finalmente, se procedió con la medición con el potenciómetro.

Acidez Titulable

Para los productos líquidos se realizó mediante el procedimiento de la norma INEN 0381 (1985):

Se añadió 25 mL de la muestra preparada en un matraz de 250 mL y se disolvió a volumen con agua destilada, mezclando la solución. Posteriormente, se colocó 25 mL de la solución en vaso de precipitación y se midió el pH. Se tituló la solución lentamente con hidróxido de sodio al 0,1N, hasta llegar a un pH de 7, luego se siguió titulando hasta llegar un pH de 8,3 aproximadamente. Se registró el volumen del hidróxido de sodio ocupado y el pH obtenido después de cada adición. Después, se estableció el volumen exacto de solución con el hidróxido de sodio añadido mediante por interpolación, a un pH de 8,1.

En cambio, para productos cárnicos, se pesó 10 gramos de la muestra preparada y se licuó con 50 mL de agua destilada. Posteriormente, se añadió 5 gotas de fenolftaleína y se tituló con solución de hidróxido de sodio al 0,1N. Finalmente, se registró el volumen consumido de la solución.

La acidez titulable se determinó mediante la siguiente ecuación:

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

Siendo:

A = Valor de la acidez en gramos.

V_1 = mL de NaOH ocupados en la titulación.

N_1 = Normalidad de la solución de NaOH.

M = Masa molar expresada en g/mmol. Para el ácido láctico = 0.090.

V_2 = Volumen en mL o masa en gramos de la muestra tomada para el análisis.

Sólidos Solubles

Se añadió unas gotas de la muestra sobre el prisma del refractómetro y se leyó la cantidad de sólidos solubles totales en grados Brix.

Proteína bruta

La determinación de proteína bruta fue realizada según la norma INEN 781 (1985), mediante el método de Kjeldahl:

Digestión

Se pesó aproximadamente 0,3 gramos de la muestra prepara en un papel exento de nitrógeno y se colocó en un microtubo digestor. Luego, se añadió una tableta catalizadora y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado al microtubo. Se colocó los tubos de digestión con la muestra en el block-digest con el colector de humos. Se realizó la digestión a 350 °C a 400 °C durante 1-2 horas. Después, se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente. El líquido obtenido varía entre un color verde o azul transparente según el catalizador utilizado.

Destilación

Se adicionó 15 mL de agua destilada en cada microtubo y 50 mL de ácido bórico al 2% en un matraz. Luego, se colocó el microtubo y el matraz en el sistema de destilación kjeltec. Se adicionó 30 mL de hidróxido de sodio al 40% al sistema, cuidando que no exista un flujo anormal de agua. Posteriormente, se recogió aproximadamente 200 mL de destilado.

Titulación

Del destilado recogido se colocó 3 gotas de indicador, y se tituló con ácido clorhídrico al 0,1N utilizando un agitador mecánico. Finalmente, se registró el volumen consumido de ácido clorhídrico.

La cantidad de proteína bruta se determinó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\%N = \frac{(V_{HCl} - V_b)(14,0067)N_{HCl}}{g} \times 100$$

$$\%PB = \%N \times \frac{100}{16}$$

Donde:

V_{HCl} = Volumen consumido del ácido clorhídrico en la titulación

V_b = Volumen del blanco (0,3)

N_{HCl} = Normalidad de ácido clorhídrico (0,1N)

g = Peso de la muestra en gramos

14,0067 = Peso atómico del nitrógeno

Humedad

Para la determinación de humedad, se basó en el procedimiento de la norma INEN 777 (1985):

Se calentó el crisol de porcelana en la estufa durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó. La muestra preparada se secó en la estufa a 105 °C durante 12 horas. Luego, se dejó enfriar la muestra en el desecador por 30 minutos, y se pesó en la balanza analítica.

Para la determinación de humedad se aplicó la siguiente ecuación:

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

Donde:

%H = Porcentaje de humedad

W_0 = Peso de la muestra en gramos

W_1 = Peso del crisol con la muestra después del secado

W_2 = Peso del crisol con la muestra antes del secado

Grasa total

Para la determinación de la grasa total, se basó en el procedimiento de la norma INEN 778 (1985):

Se secó los vasos beakers en una estufa a 100 °C durante 60 minutos. Luego, se transfirió al desecador y se dejó secar a temperatura ambiente. Se pesó los vasos con aproximación al 0,1 mg.

Se pesó 2 gramos de la muestra preparada sobre un papel filtro y se colocó en el interior del dedal, taponando con suficiente algodón hidrófilo, luego se introdujo en el portadetal. Se colocó el dedal y su contenido en el vaso beaker, y se llevó a los ganchos metálicos del aparato de Golfish. Después, se adicionó 40 mL de solvente en el vaso beaker. Se colocó el anillo en el vaso y se llevó a la hornilla del aparato Golfish, y se ajustó al tubo refrigerante del extractor. Terminada la extracción mediante el aparato de Golfish, se retiró los beaker con el residuo de la grasa, con la precaución adecuada. El vaso con la grasa se lo llevó a la estufa a 105 °C durante 30 minutos

hasta obtener una completa evaporación del solvente. Luego, se dejó enfriar los vasos a temperatura ambiente en el desecador. Finalmente, se pesó los vasos con la grasa y se registró.

El contenido de grasa total de la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$G = \frac{W_2 - W_1}{W_0}$$

Donde:

W_0 = Peso de la muestra

W_1 = Peso del vaso beaker vacío

W_2 = Peso del vaso más la grasa

Cenizas

Para la determinación de cenizas, se basó en el procedimiento de la norma INEN 786 (1985):

Se secó el crisol de porcelana limpia en la estufa a 100 °C durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar en el desecador y se pesó con aproximación al 0,1 mg. Sobre el crisol se pesó con 2 gramos de la muestra preparada y se calentó durante algunos minutos, hasta obtener la muestra quemada. Después, se introdujo el crisol en la mufla a 550 °C hasta obtener cenizas libres de partículas de carbón (durante 8 horas aproximadamente). Se secó el crisol con las cenizas, y se dejó enfriar en el desecador, después se pesó con precisión.

El contenido de cenizas de la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$C = \frac{W_2 - W_1}{W_0}$$

Donde:

W_0 = Peso de la muestra

W_1 = Peso del crisol vacío

W_2 = Peso del crisol más la muestra calcinada

Recuento de poblaciones microbianas

Para la determinación de las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL) se desarrolló basándose en la norma INEN 1529-5 (2006):

Se homogenizó 5 gramos de agua de peptona en 1000 mL de agua destilada. Luego, se colocó 9 mL de la solución en tubos de ensayos para la preparación de las diluciones seriadas, hasta 10^{-8} . Posteriormente, se esterilizó los tubos con la solución en la autoclave. Después, en la cámara de flujo laminar, se preparó las diluciones con 1 gramo de la muestra, y se inoculó 1 mL de la dilución cuidadosamente, evitando la presencia de burbujas de aire, en el centro de la película cuadrículada inferior de las láminas de Petrifilm.

Los Petrifilm de bacterias se incubaron a una temperatura de 37-38°C durante 48 horas y los Petrifilm de mohos y levaduras durante 72 horas a temperatura ambiente. Luego, el conteo se realizó con el contador de colonias Colony Counter ISOLAB, y se determinó mediante el empleo de 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 mucílago de cacao

Tabla 20

Caracterización físico-química del mucílago de cacao fresco y fermentado

| Parámetros analizados | Unidad | Fresco | | Fermentado | |
|-----------------------|--------|----------|--------|------------|----------|
| | | Nacional | CCN-51 | Nacional | CCN-51 |
| pH | | 3,63 | 3,52 | 4,02 | 3,97 |
| Acidez titulable | % | 1,11 | 1,24 | 1,84 | 1,57 |
| Sólidos solubles | °Brix | 17 | 19,5 | 12,5 | 15,5 |
| Bacterias aerobias | UFC/mL | - | - | 1,48E+08 | 1,19E+08 |
| Hongos/levaduras | UFC/mL | - | - | 5,2E+05 | 4,1E+05 |

En la tabla 20, se demuestra que hubo diferencia significativa en la caracterización físico-química del mucílago de cacao entre las dos variedades, antes y después de las 72 horas de fermentación. El pH del mucílago aumentó durante la fermentación, pasando de 3,63 a 4,02 para la variedad Nacional y de 3,52 a 3,97 para la variedad CCN-51. Este comportamiento es debido al consumo del ácido cítrico por parte de los microorganismos presentes en el mucílago (Gonzalez et al. 2019). Según Vallejo et al. (2016) y Lopez, J. (2021) demuestran en sus estudios que el pH del mucílago del cacao Nacional es similar a 3,69, y de la variedad CCN-51 es superior a 3,52.

Asimismo, el porcentaje de acidez titulable del mucílago aumentó durante la fermentación, cambiando de 1,11% a 1,84% para la variedad Nacional y de 1,24% a 1,57% para la variedad CCN-51. Este cambio de acidez se debe al efecto de la formación de ácidos orgánicos, como el ácido láctico producido por las BAL y el ácido acético por las BAA (Gonzalez et al. 2019).

Estos valores obtenidos son similares a los que presentó el estudio de Lopez, J. (2021), teniendo 1,86% en la variedad Nacional y 1,16% en la variedad CCN-51.


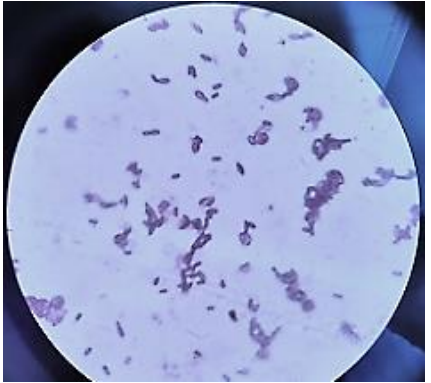
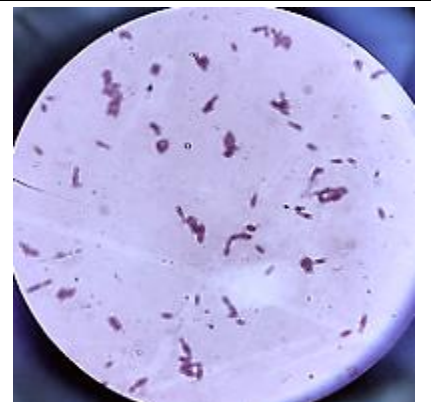
En cambio, el contenido de sólidos solubles disminuyó durante la fermentación: de 17°Brix a 12,5°Brix en la variedad Nacional y 19,5°Brix a 15,5°Brix en la variedad CCN-51. Esta disminución se debe a la producción de ácido acético en la fase de fermentación (Otárola, 2018). De igual manera, en el estudio de Vallejo et al. (2016), los datos obtenidos de sólidos solubles de las dos variedades de cacao fueron inferiores a lo obtenido, 15°Brix en la variedad Nacional y 16°Brix en la variedad CCN-51.

Con respecto a la población bacteriana del mucílago fermentado, se obtuvo $1,48E+08$ UFC/mL en la variedad Nacional y $1,19E+08$ UFC/mL en la variedad CCN-51. En cuanto a la población de levaduras y hongos, se obtuvo $5,2E+05$ UFC/mL en la variedad Nacional y $4,1E+05$ UFC/mL en la variedad CCN-51.

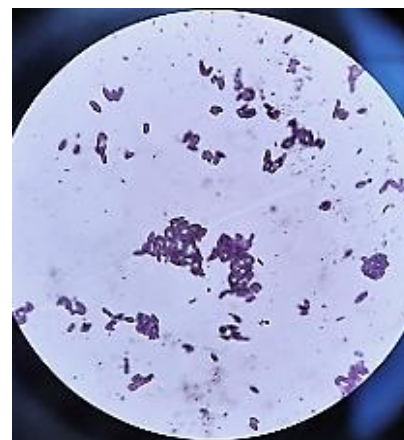
Identificación de las BAL aisladas del mucílago de caco fermentado

Tabla 21

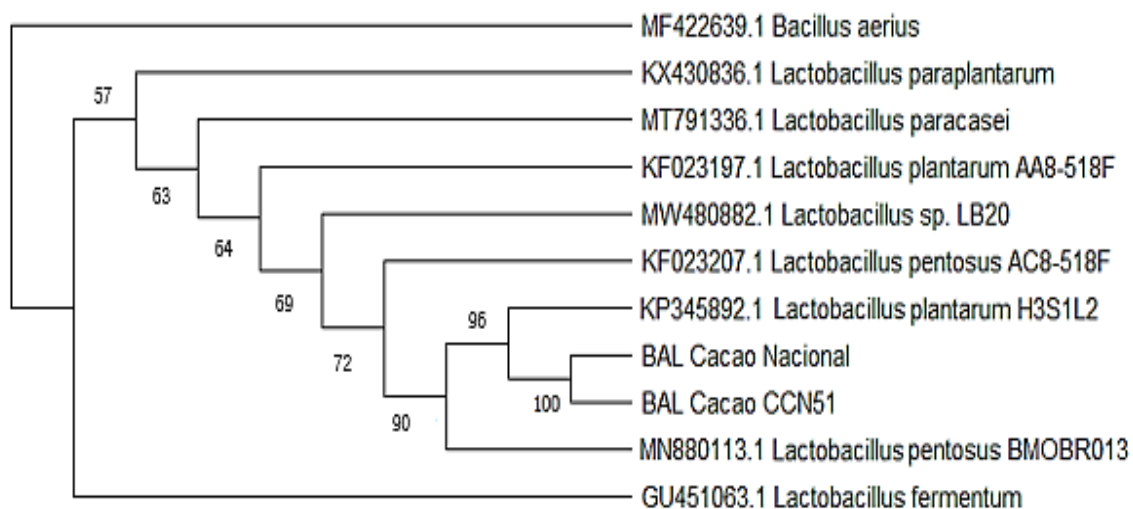
Resultados de las pruebas microbiológicas de identificación bacteriana

| Muestra | Características | Tinción Gram |
|-------------------------|--|--|
| Cacao Nacional (cepa 1) | Gram positivo Bacilo Catalasa negativa |  |
| Cacao Nacional (cepa 2) | Gram positivo Bacilo Catalasa negativa |  |
| Cacao CCN-51 (cepa 1) | Gram positivo Bacilo Catalasa negativa |  |

Cacao CCN-51 (cepa 2)

Gram positivo
Bacilo
Catalasa negativa**Figura 2**

Árbol filogenético basado en las secuencias 16S ARNr de las BAL



Nota. Árbol filogenético de las BAL aisladas del mucílago fermentado de las dos variedades, Nacional y CCN-51, de cacao; con la Bacteria *Bacillus aerius* como grupo externo.

Los resultados presentados en la tabla 21, corresponde a las bacterias aisladas del medio selectivo (MRS agar) resultantes de la fermentación del mucílago de las dos variedades cacao, las cuales resultaron ser bacilos, gram positivos y catalasa negativos. Según en el estudio de Huang et al. (2018), la mayoría de los *Lactobacillus* son bacterias gram-positivas, con forma de bacilo,

negativas a la catalasa, anaeróbicas facultativas o microaerófilas, no formadoras de esporas y tolerantes a los ácidos, como el ácido cítrico.

En la figura 2, se muestra el árbol filogenético de las 2 muestras enviadas a secuenciar (BAL Cacao Nacional y BAL Cacao CCN51), en el cual, se formó un clado para las bacterias aisladas con el *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus plantarum*, con un valor de Bootstrap de 85% y 79%, respectivamente. Según De Vuyst y Leroy (2020), la especie *L. plantarum* junto con otras bacterias fructófilas se encuentran presentes en las primeras fases de la fermentación del mucílago de cacao, mientras que en la fase media y tardía prevalecen algunas especies de BAL heterofermentativas, como la bacteria *Lactobacillus fermentum*.

Por lo tanto, las BAL presentes en el mucílago de cacao fermentado tienen una similitud al *L. plantarum*, debido que son bacilos con extremos redondos y rectos entre 0,9-1,2 μm de ancho y de 3-8 μm de largo, presentándose en pares, en cadenas cortas o en forma lineal (Lopez, 2021), coincidiendo con los resultados de la tabla 21.

Análisis de varianza

Análisis de varianza para la variable pH

Tabla 22

Análisis de varianza para el pH en el día 0 de la bioconservación

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tilapia | 0,062 | 1 | 0,062 | 497,168 | 0,0000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,001 | 2 | 0,000 | 2,699 | 0,116 |
| C:Repetición | 0,000 | 2 | 0,000 | 0,841 | 0,460 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,001 | 2 | 0,000 | 2,699 | 0,116 |
| RESIDUOS | 0,001 | 10 | 0,000 | | |
| TOTAL | 0,065 | 17 | | | |

En la tabla 22, se muestra el análisis de varianza del pH en el día 0 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencia significativa en el factor A (Tilapia). Mientras que en el factor B (Concentración de NaCl+BAL), interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL) y en las repeticiones no presentaron diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 23*Análisis de varianza para el pH en el día 5 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tilapia | 0,130 | 1 | 0,130 | 1648,521 | 0,0000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,035 | 2 | 0,018 | 224,225 | 0,0000 |
| C:Repetición | 0,001 | 2 | 0,000 | 3,451 | 0,073 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,011 | 2 | 0,005 | 68,451 | 0,000 |
| RESIDUOS | 0,001 | 10 | 7,889E-5 | | |
| TOTAL | 0,178 | 17 | | | |

En la tabla 23, se muestra el análisis de varianza del pH en el día 5 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), factor B (Concentración de NaCl+BAL) y la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL). Mientras que en las repeticiones no presentaron diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 24*Análisis de varianza para el pH en el día 10 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tilapia | 0,236 | 1 | 0,236 | 2020,762 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,069 | 2 | 0,035 | 296,714 | 0,000 |
| C:Repetición | 0,001 | 2 | 0,000 | 3,571 | 0,068 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,002 | 2 | 0,001 | 9,476 | 0,005 |
| RESIDUOS | 0,001 | 10 | 0,000 | | |
| TOTAL | 0,309 | 17 | | | |

En la tabla 24, se muestra el análisis de varianza del pH en el día 10 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), factor B (Concentración de NaCl+BAL) y la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL). Mientras que en las repeticiones no presentaron diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Análisis de varianza para la variable acidez titulable

Tabla 25

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

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Tilapia | 0,009 | 1 | 0,009 | 115,942 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,000 | 2 | 0,000 | 2,609 | 0,123 |
| C:Repetición | 3,333E-5 | 2 | 1,667E-5 | 0,217 | 0,808 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,000 | 2 | 0,000 | 2,029 | 0,182 |
| RESIDUOS | 0,001 | 10 | 7,667E-5 | | |
| TOTAL | 0,010 | 17 | | | |

En la tabla 25, se muestra el análisis de varianza de la acidez titulable en el día 0 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia). Mientras que en el factor B (Concentración de NaCl+BAL), interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL) y en las repeticiones no presentaron diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 26*Análisis de varianza para la acidez titulable en el día 5 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 0,008 | 1 | 0,008 | 166,951 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,005 | 2 | 0,002 | 52,073 | 0,000 |
| C:Repetición | 7,778E-5 | 2 | 3,889E-5 | 0,854 | 0,455 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,001 | 2 | 0,001 | 15,488 | 0,001 |
| RESIDUOS | 0,000 | 10 | 4,556E-5 | | |
| TOTAL | 0,014 | 17 | | | |

En la tabla 26, se muestra el análisis de varianza de la acidez titulable en el día 5 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), en el factor B (Concentración de NaCl+BAL) y en la interacción A*B (Tilapia*Concentración de NaCl+BAL), excepto en las repeticiones, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 27*Análisis de varianza para la acidez titulable en el día 10 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 0,007 | 1 | 0,007 | 93,913 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,005 | 2 | 0,005 | 31,957 | 0,000 |
| C:Repetición | 3,33E-5 | 2 | 1,667E-5 | 0,217 | 0,808 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,001 | 2 | 0,001 | 8,478 | 0,007 |
| RESIDUOS | 0,001 | 10 | 7,667E-5 | | |
| TOTAL | 0,014 | 17 | | | |

En la tabla 27, se muestra el análisis de varianza de la acidez titulable en el día 10 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se observó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), en el factor B (Concentración de NaCl+BAL) y en la interacción A*B (Tilapia*Concentración de NaCl+BAL), excepto en las repeticiones, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Análisis de varianza para la variable humedad

Tabla 28

Análisis de varianza para la humedad en el día 0 de la bioconservación

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 5,046 | 1 | 5,046 | 151,768 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,271 | 2 | 0,135 | 4,072 | 0,051 |
| C:Repetición | 0,049 | 2 | 0,025 | 0,742 | 0,501 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,084 | 2 | 0,042 | 1,263 | 0,324 |
| RESIDUOS | 0,332 | 10 | 0,033 | | |
| TOTAL | 5,782 | 17 | | | |

En la tabla 28, se muestra el análisis de varianza de la humedad en el día 0 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia). Mientras que en el factor B (Concentración de NaCl+BAL), en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL) y en las repeticiones no presentaron diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 29*Análisis de varianza para la humedad en el día 10 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 9,527 | 1 | 9,527 | 318,571 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 7,789 | 2 | 3,894 | 130,229 | 0,000 |
| C:Repetición | 0,147 | 2 | 0,074 | 2,465 | 0,135 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 1,783 | 2 | 0,891 | 29,806 | 0,000 |
| RESIDUOS | 0,299 | 10 | 0,030 | | |
| TOTAL | 19,545 | 17 | | | |

En la tabla 29, se muestra el análisis de varianza de la humedad en el día 10 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), en el factor B (Concentración de NaCl+BAL) y en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL), excepto en las repeticiones, mostrando normalidad en la toma de resultados.

*Análisis de varianza para la variable grasa total***Tabla 30***Análisis de varianza para la grasa total en el día 0 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 3,920 | 1 | 3,920 | 117,365 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,270 | 2 | 0,135 | 4,043 | 0,052 |
| C:Repetición | 0,048 | 2 | 0,024 | 0,725 | 0,508 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,088 | 2 | 0,044 | 1,322 | 0,309 |
| RESIDUOS | 0,334 | 10 | 0,033 | | |
| TOTAL | 4,661 | 17 | | | |

En la tabla 30, se muestra el análisis de varianza de la humedad en el día 0 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se observó diferencias significativas en el factor A (Tilapia). Mientras que en el factor B (Concentración de NaCl+BAL), en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL) y en las repeticiones no se observó diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 31

Análisis de varianza para la grasa total en el día 10 de la bioconservación

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 4,550 | 1 | 4,550 | 1518,400 | 0,000 |
| B:Concentraci3n de NaCl+BAL | 1,057 | 2 | 0,529 | 176,368 | 0,000 |
| C:Repetici3n | 0,007 | 2 | 0,004 | 1,174 | 0,348 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,168 | 2 | 0,084 | 28,044 | 0,020 |
| RESIDUOS | 0,030 | 10 | 0,003 | | |
| TOTAL | 5,812 | 17 | | | |

En la tabla 31, se muestra el análisis de varianza de grasa total en el día 10 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), en el factor B (Concentraci3n de NaCl+BAL) y en la interacci3n A*B (Tilapia+Concentraci3n de NaCl con BAL). Excepto en las repeticiones, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Análisis de varianza para la variable cenizas**Tabla 32***Análisis de varianza para la variable cenizas en el día 0 de la bioconservación*

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 0,052 | 1 | 0,052 | 15,631 | 0,003 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,019 | 2 | 0,009 | 2,833 | 0,106 |
| C:Repetición | 0,002 | 2 | 0,001 | 0,320 | 0,733 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,021 | 2 | 0,011 | 3,228 | 0,083 |
| RESIDUOS | 0,033 | 10 | 0,003 | | |
| TOTAL | 0,127 | 17 | | | |

En la tabla 32, se muestra el análisis de varianza de cenizas en el día 0 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se observó diferencias significativas en el factor A (Tilapia). Mientras que en el factor B (Concentración de NaCl+BAL), en la interacción A*B (Tilapia*Concentración de NaCl+BAL) y en las repeticiones no se observó diferencias significativas, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 33

Análisis de varianza para la variable cenizas en el día 10 de la bioconservación

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 0,285 | 1 | 0,285 | 289,598 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,547 | 2 | 0,274 | 277,938 | 0,000 |
| C:Repetición | 0,002 | 2 | 0,001 | 1,224 | 0,335 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,039 | 2 | 0,020 | 20,055 | 0,000 |
| RESIDUOS | 0,010 | 10 | 0,001 | | |
| TOTAL | 0,884 | 17 | | | |

En la tabla 33, se muestra el análisis de varianza de cenizas en el día 10 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), en el factor B (Concentración de NaCl+BAL) y en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL), excepto en las repeticiones, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Análisis de varianza para la variable proteína bruta

Tabla 34

Análisis de varianza para la proteína bruta en el día 0 de la bioconservación

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 6,414 | 1 | 6,414 | 182,311 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 0,227 | 2 | 0,113 | 3,224 | 0,083 |
| C:Repetición | 0,005 | 2 | 0,002 | 0,065 | 0,938 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,285 | 2 | 0,143 | 4,057 | 0,051 |
| RESIDUOS | 0,352 | 10 | 0,035 | | |
| TOTAL | 7,283 | 17 | | | |

En la tabla 34, se muestra el análisis de varianza de proteína bruta en el día 0 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia). Mientras que en el factor B (Concentración de NaCl+BAL), en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL) y en las repeticiones no se presentó diferencia significativa, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Tabla 35

Análisis de varianza para la proteína bruta en el día 10 de la bioconservación

| Fuente | Suma de Cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Tilapia | 33,293 | 1 | 33,293 | 13607,411 | 0,000 |
| B:Concentracion de NaCl+BAL | 47,958 | 2 | 23,979 | 9800,717 | 0,000 |
| C:Repetición | 0,002 | 2 | 0,001 | 0,436 | 0,658 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| A*B | 0,511 | 2 | 0,255 | 104,423 | 0,000 |
| RESIDUOS | 0,024 | 10 | 0,002 | | |
| TOTAL | 81,789 | 17 | | | |

En la tabla 35, se muestra el análisis de varianza de proteína bruta en el día 10 de la bioconservación de las carnes de tilapia con BAL en diferentes concentraciones de cloruro de sodio; se presentó diferencias significativas en el factor A (Tilapia), en el factor B (Concentración de NaCl+BAL) y en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL), excepto en las repeticiones, mostrando normalidad en la toma de resultados.

Prueba de significancia de Tukey para los factores de estudio

Resultados del estudio para las especies de tilapia (Factor A)

Tabla 36

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

| Factor A (Tilapia) | pH | Acidez titulable | pH | Acidez titulable | pH | Acidez titulable |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | | | | | |
| <i>O. mossambicus</i> | 6,43 ^A | 0,20 ^B | 6,33 ^A | 0,26 ^B | 6,28 ^A | 0,36 ^B |
| <i>O. niloticus</i> | 6,32 ^B | 0,24 ^A | 6,20 ^B | 0,29 ^A | 6,07 ^B | 0,39 ^A |

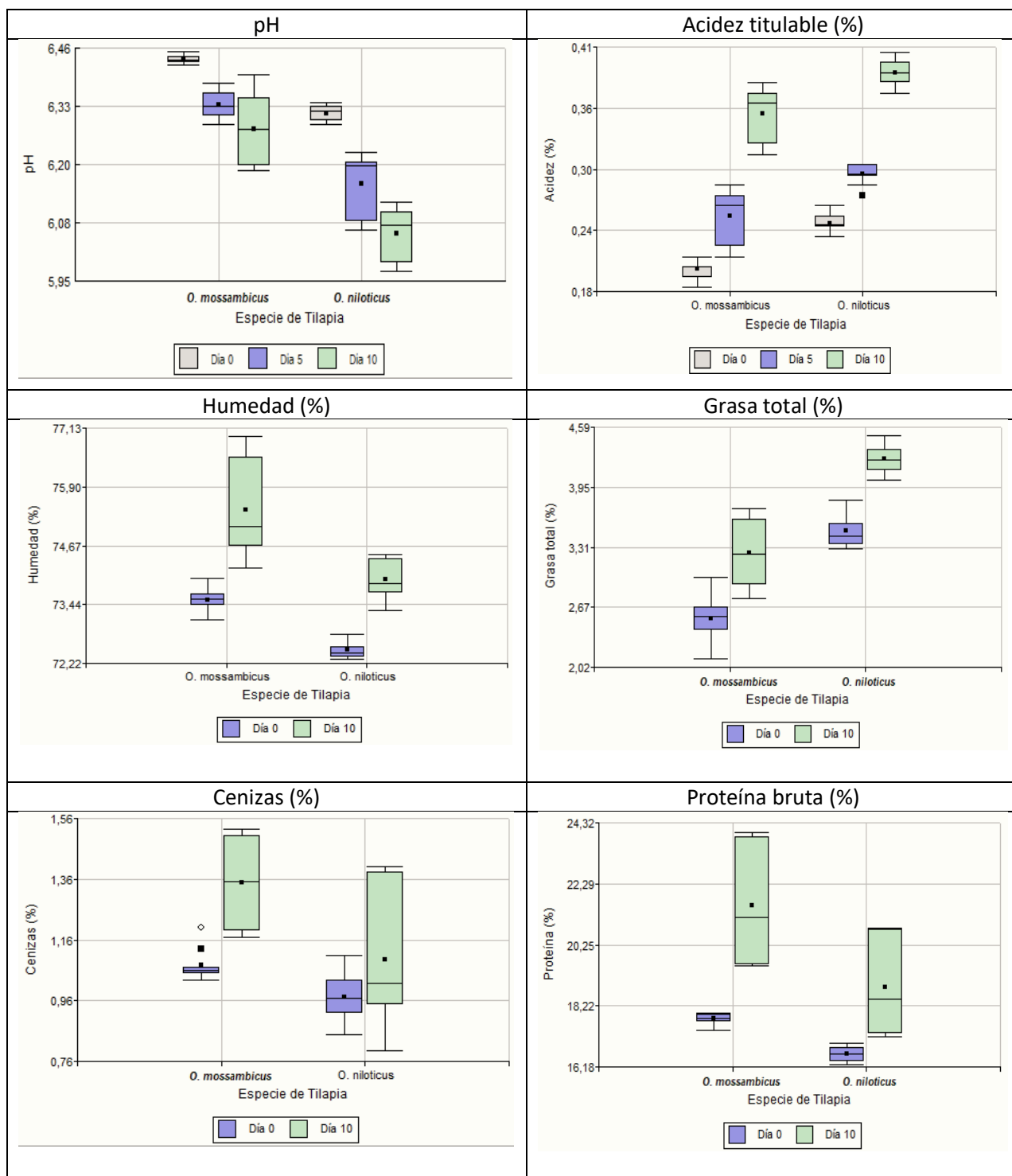
Tabla 37

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor A en las variables bromatológicas

| Factor A (Tilapia) | Humedad | Grasa total | Cenizas | Proteína bruta | Humedad | Grasa total | Cenizas | Proteína bruta |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | | | | | | | | |
| <i>O. mossambicus</i> | 73,55 ^A | 2,57 ^B | 0,97 ^B | 16,60 ^B | 75,08 ^A | 3,23 ^B | 1,02 ^B | 18,46 ^B |
| <i>O. niloticus</i> | 72,44 ^B | 3,42 ^A | 1,06 ^A | 17,81 ^A | 73,88 ^B | 4,24 ^A | 1,35 ^A | 21,16 ^A |

Figura 3

Estudio del efecto de las especies de tilapia (Factor A) en las variables de estudio



En la tabla 36 y 37, se observa que la especie *O. mossambicus* presentó mayor valor de pH y humedad, mientras que la especie *O. niloticus* presentó mayor valor en acidez, grasa total, cenizas y proteína bruta en el día 0, 5 y 10 de bioconservación.

En el pH, las dos especies de tilapia *O. mossambicus* y *O. niloticus* disminuyeron en los tres tiempos de bioconservación, desde un pH de 6,43 a 6,33 en el día 5 y 6,28 en el día 10, y de 6,32 a 6,20 en el día 5 y 6,07 en el día 10 de la bioconservación, respectivamente.

Para la acidez, en ambas especies de tilapia *O. mossambicus* y *O. niloticus* aumentaron en los tres tiempos de bioconservación. Con la especie *O. mossambicus*, la acidez aumentó de 0,20% a 0,26% en el día 5 y 0,36% en el día 10, y con la especie *O. niloticus* aumentó de 0,24% a 0,29% en el día 5 y 0,39% en el día 10 de bioconservación.

En la humedad, la especie *O. mossambicus* aumentó desde 73,55% a 75,08% en el día 10 de la bioconservación. En la especie *O. niloticus* sucede lo mismo, hubo un incremento desde 72,44% a 73,88% en el día 10 de la bioconservación.

En la grasa total, en ambas especies *O. mossambicus* y *O. niloticus* se observó un incremento desde 2,57% a 3,23% y 3,42% a 4,24%, respectivamente, en el día 10 de bioconservación.

En cenizas, en la especie *O. mossambicus* y *O. niloticus* se observó un incremento desde 0,97% a 1,02% y 1,06% a 1,35%, respectivamente, en los 10 días de bioconservación.

En la proteína bruta, la especie *O. mossambicus* aumentó desde 16,60% a 18,46% en el día 10 de la bioconservación, y en la especie *O. niloticus* hubo un incremento desde 17,81% a 21,16% en el día 10 de la bioconservación.

Resultados del estudio para las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL (Factor B)

Tabla 38

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

| Factor B (Concentración de NaCl+BAL) | Día 5 | | Día 10 | |
|--------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | pH | Acidez titulable | pH | Acidez titulable |
| 10% de NaCl+BAL | 6,19 ^B | 0,24 ^B | 6,09 ^C | 0,34 ^C |
| 15% de NaCl+BAL | 6,28 ^A | 0,28 ^A | 6,17 ^B | 0,37 ^B |
| 20% de NaCl+BAL | 6,29 ^A | 0,29 ^A | 6,23 ^A | 0,39 ^A |

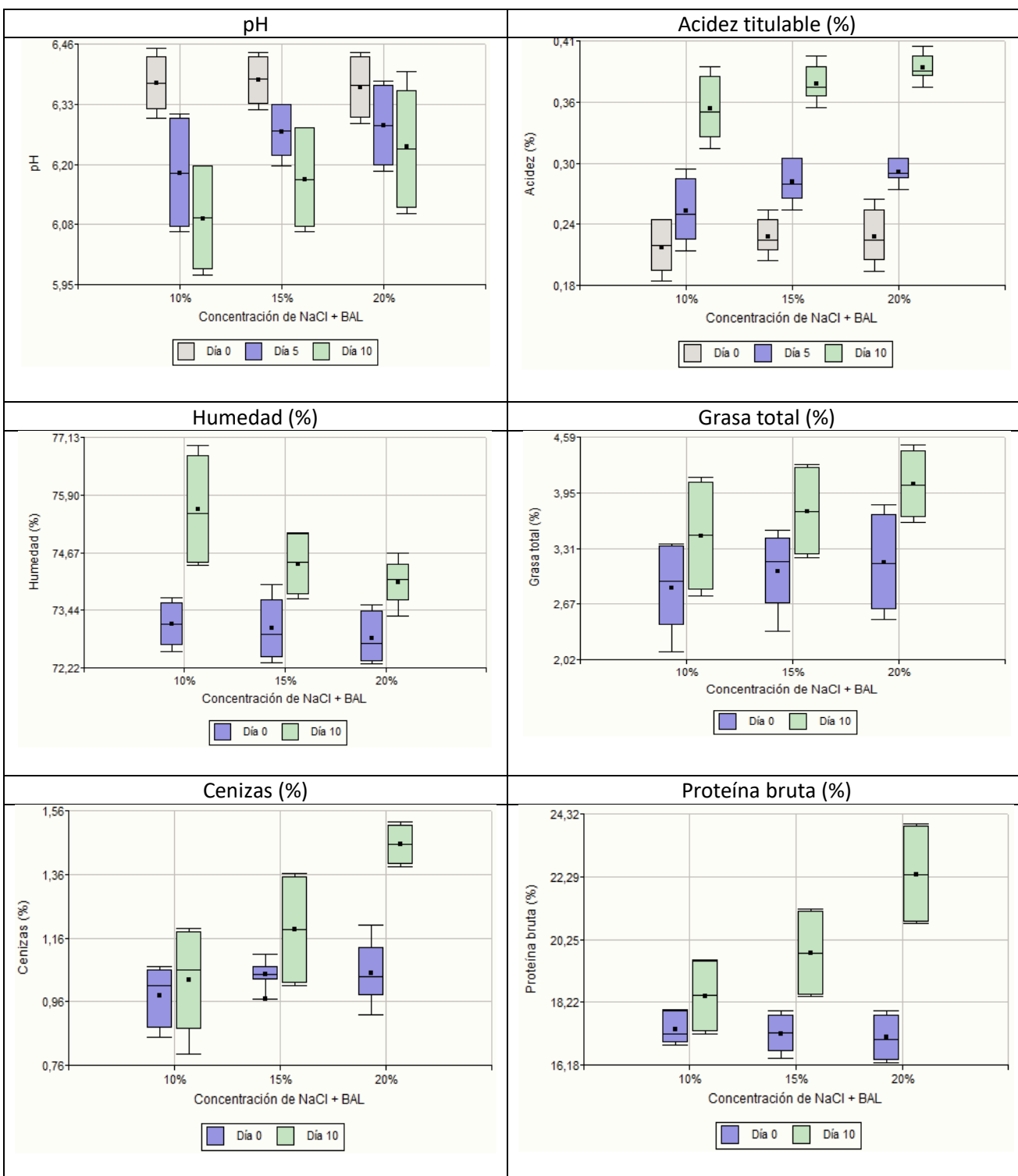
Tabla 39

Resultados del análisis de la prueba Tukey para el factor B en las variables bromatológicas

| Factor B (Concentración de NaCl+BAL) | Humedad | Grasa total | Cenizas | Proteína bruta |
|--------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | | | | |
| 10% de NaCl+BAL | 75,51 ^A | 3,46 ^C | 1,06 ^C | 18,43 ^C |
| 15% de NaCl+BAL | 74,47 ^B | 3,73 ^B | 1,19 ^B | 19,80 ^B |
| 20% de NaCl+BAL | 74,09 ^C | 4,04 ^A | 1,45 ^A | 22,34 ^A |

Figura 4

Estudio del efecto de las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL (Factor B) en las variables de estudio



En la tabla 38 y 39, se observa que la mayor concentración de cloruro de sodio (20%) con BAL presentó mayor valor de pH, acidez, grasa total, cenizas y proteína bruta en el día 10 de bioconservación, mientras que la menor concentración de cloruro de sodio (10%) con BAL presentó mayor valor en humedad.

En el pH, los tratamientos tratados con 10, 15 y 20% de cloruro de sodio con BAL presentaron una disminución de pH, desde 6,38 a 6,19 en el día 5 y a 6,09 en el día 10, de 6,38 a 6,28 en el día 5 y a 6,17 en el día 10, y de 6,37 a 6,29 en el día 5 y a 6,23 en el día 10 de bioconservación, respectivamente.

En la acidez, los tratamientos con 10%, 15% y 20% de cloruro de sodio con BAL presentaron un aumento de 0,22% a 0,24% en el día 5 y a 0,34% en el día 10, de 0,22% a 0,28% en el día 5 y a 0,37% en el día 10, y de 0,22% a 0,29% en el día 5 y a 0,39% en el día 10, respectivamente.

En la humedad, se observó un aumento con el tiempo en las tres concentraciones de cloruro de sodio con BAL. A 10% de cloruro de sodio con BAL presentó desde 73,16% a 75,51%, a 15% desde 72,94% a 74,47% y a 20% desde 72,75% a 74,09%.

En la grasa total se observó, de igual manera, un aumento con el tiempo en las tres concentraciones de cloruro de sodio con BAL. A 10% de cloruro de sodio con BAL presentó desde 2,93% a 3,46%, a 15% desde 3,15% a 3,73% y a 20% desde 3,13% a 4,04%.

En cenizas, se observó un incremento con el tiempo en las tres concentraciones de cloruro de sodio con BAL. A 10% de cloruro de sodio con BAL presentó desde 1,01% a 1,06%, a 15% desde 1,04% a 1,19% y a 20% desde 1,04% a 1,45%.

En la proteína bruta, se observó un aumento con el tiempo en las tres concentraciones de cloruro de sodio con BAL. A 10% de cloruro de sodio con BAL presentó desde 17,20% a 18,43%, a 15% desde 17,23% a 19,80% y a 20% desde 17,02% a 22,34%.

Prueba de Tukey para la interacción significativa en la bioconservación

Análisis de Tukey en la interacción A*B (Tilapia+Concentración de NaCl con BAL)

Tabla 40

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

| Factor A (Tilapia) | Factor B (Concentración de NaCl+BAL) | Día 5 | | Día 10 | |
|-----------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | pH | Acidez titulable | pH | Acidez titulable |
| <i>O. mossambicus</i> | 10% de NaCl+BAL | 6,30 ^C | 0,22 ^D | 6,20 ^C | 0,32 ^D |
| <i>O. mossambicus</i> | 15% de NaCl+BAL | 6,33 ^B | 0,26 ^C | 6,28 ^B | 0,35 ^C |
| <i>O. mossambicus</i> | 20% de NaCl+BAL | 6,37 ^A | 0,28 ^B | 6,37 ^A | 0,37 ^B |
| <i>O. niloticus</i> | 10% de NaCl+BAL | 6,07 ^E | 0,28 ^B | 5,98 ^F | 0,37 ^B |
| <i>O. niloticus</i> | 15% de NaCl+BAL | 6,22 ^D | 0,30 ^A | 6,07 ^E | 0,39 ^A |
| <i>O. niloticus</i> | 20% de NaCl+BAL | 6,20 ^D | 0,30 ^A | 6,11 ^D | 0,40 ^A |

Tabla 41

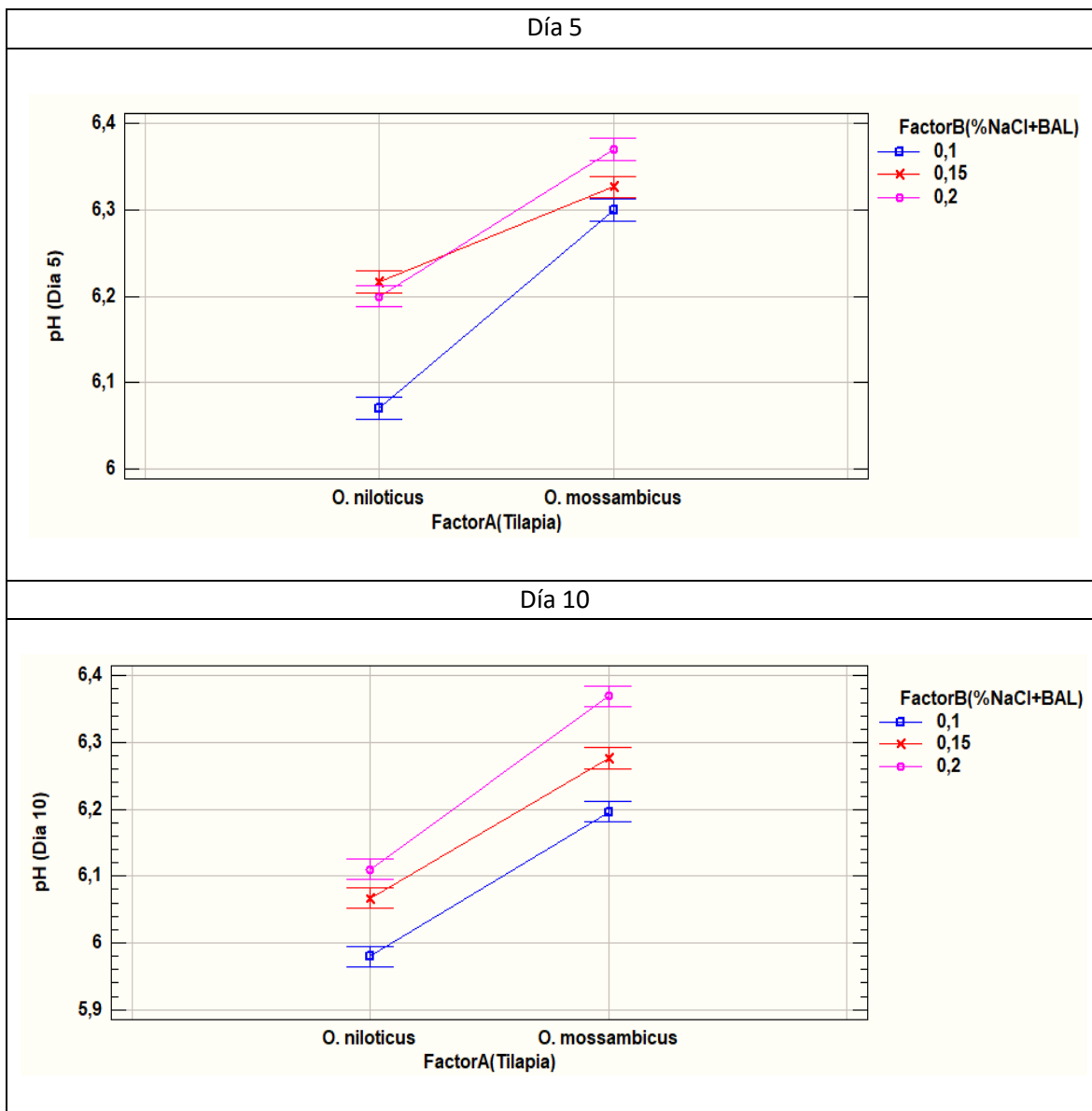
*Resultados del análisis de la prueba Tukey para la interacción A*B en las variables*

bromatológicas

| Factor A (Tilapia) | Factor B (Concentración de NaCl+BAL) | Humedad | Día 10 | | |
|-----------------------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | | | Grasa total | Cenizas | Proteína bruta |
| <i>O. mossambicus</i> | 10% de NaCl+BAL | 76,74 ^A | 2,83 ^F | 0,88 ^E | 17,26 ^F |
| <i>O. mossambicus</i> | 15% de NaCl+BAL | 75,08 ^B | 3,23 ^E | 1,02 ^D | 18,46 ^E |
| <i>O. mossambicus</i> | 20% de NaCl+BAL | 74,44 ^C | 3,66 ^D | 1,39 ^B | 20,79 ^C |
| <i>O. niloticus</i> | 10% de NaCl+BAL | 74,45 ^C | 4,07 ^C | 1,18 ^C | 19,57 ^D |
| <i>O. niloticus</i> | 15% de NaCl+BAL | 73,79 ^D | 4,24 ^B | 1,35 ^B | 21,16 ^B |
| <i>O. niloticus</i> | 20% de NaCl+BAL | 73,66 ^D | 4,43 ^A | 1,51 ^A | 23,93 ^A |

Figura 5

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

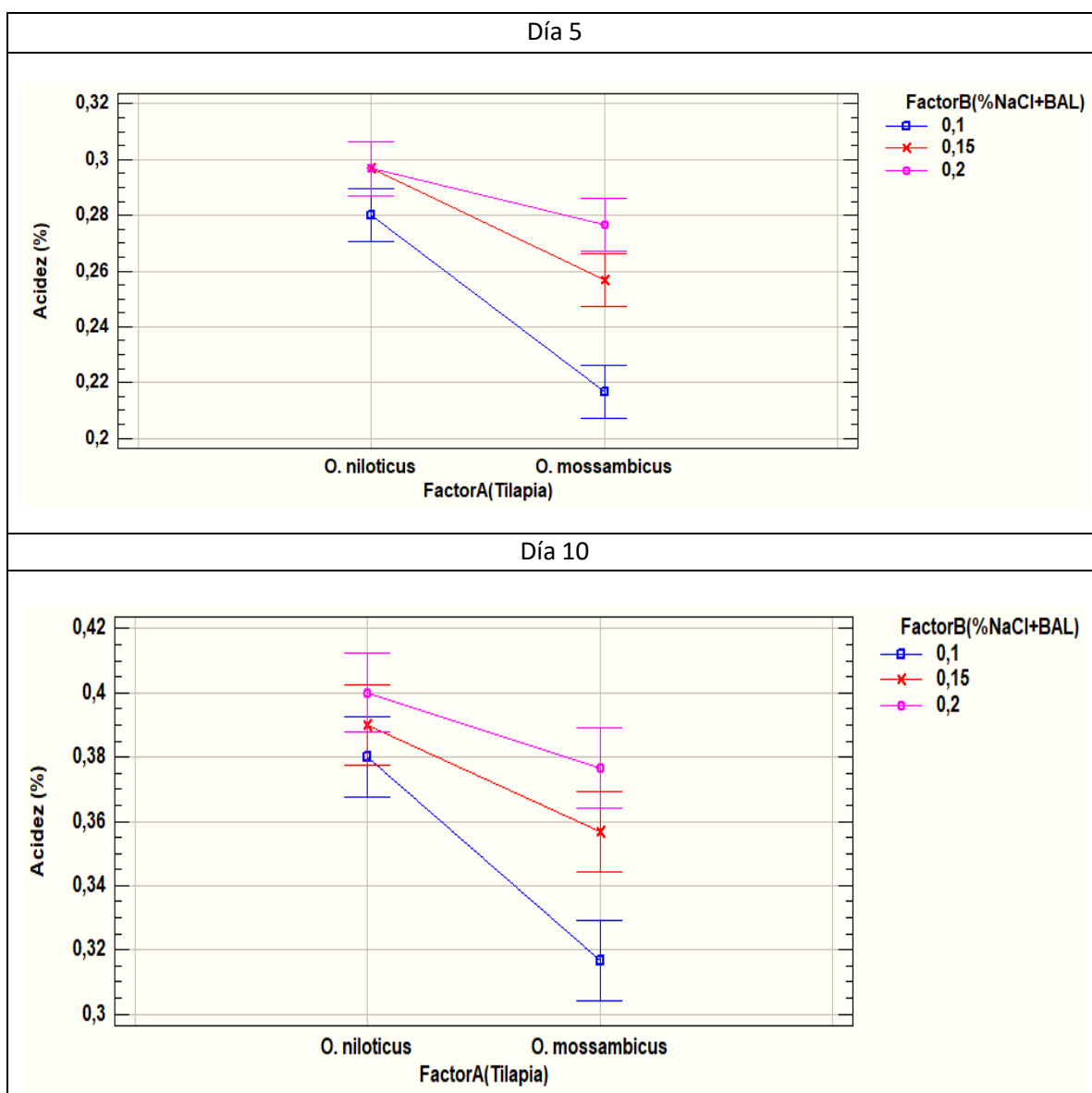


En la figura 5, se observa que en la interacción A*B del pH existe diferencia respecto a las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en el cual, la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* bioconservada con 20% de cloruro de sodio y BAL proveniente de la fermentación del mucílago de ambas variedades de cacao, presentó valores

mayores de pH en comparación a la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* con 10% de cloruro de sodio y BAL.

Figura 6

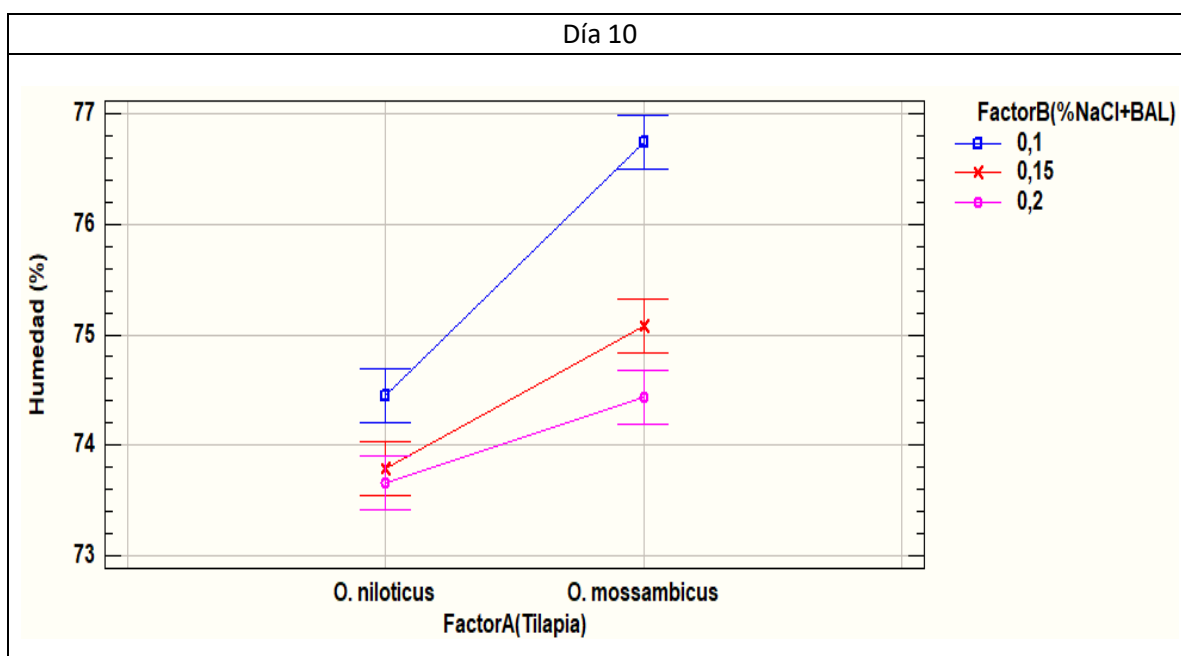
*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable acidez titulable*



En la figura 6, se observa que en la interacción A*B de la acidez titulable existe diferencia respecto a las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en el cual, la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* bioconservada con 20% de cloruro de sodio y BAL proveniente de la fermentación del mucílago de ambas variedades de cacao, presentó valores mayores de acidez en comparación a la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* con 10% de cloruro de sodio y BAL.

Figura 7

*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable humedad*

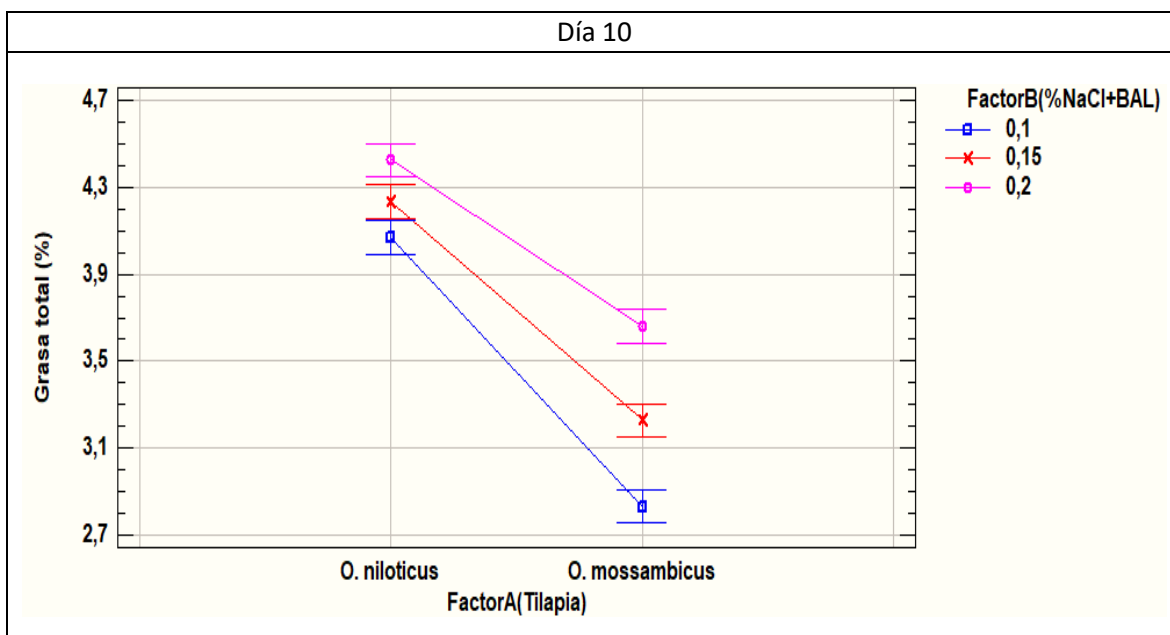


En la figura 7, se observa que en la interacción A*B de la humedad existe diferencia respecto a las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en el cual, la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* bioconservada con 10% de cloruro de sodio y BAL proveniente de la fermentación del mucílago de ambas variedades de cacao, presentó

valores mayores de humedad en comparación a la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* con 20% de cloruro de sodio y BAL.

Figura 8

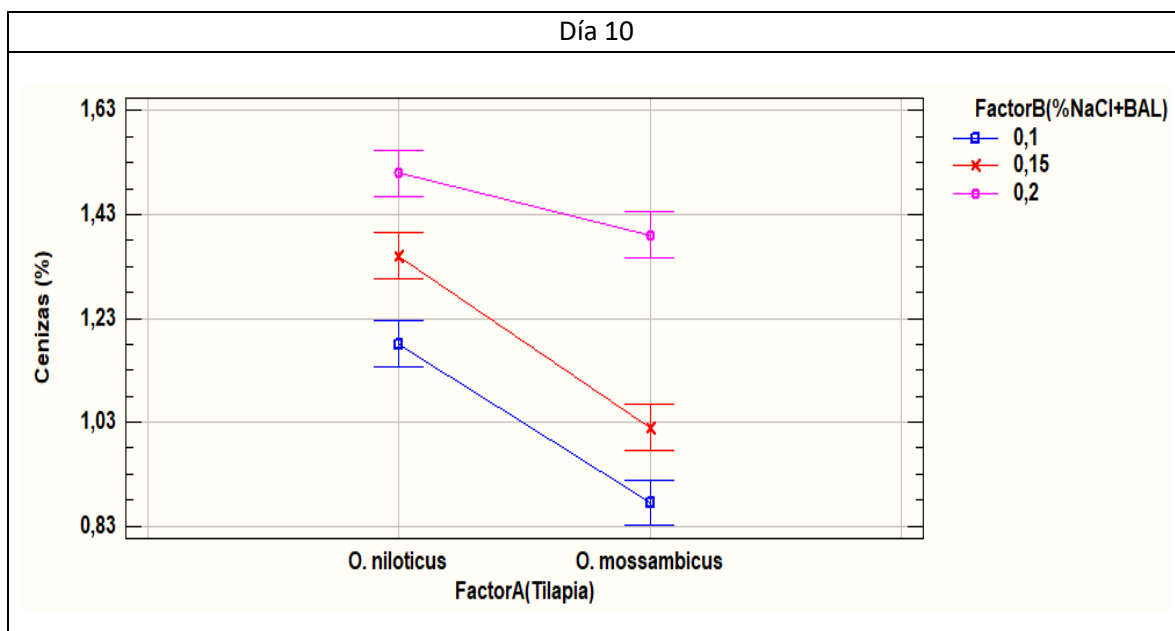
*Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable grasa total*



En la figura 8, se observa que en la interacción A*B de la grasa total existe diferencia respecto a las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en el cual, la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* bioconservada con 20% de cloruro de sodio y BAL proveniente de la fermentación del mucílago de ambas variedades de cacao, presentó valores mayores de grasa total en comparación a la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* con 10% de cloruro de sodio y BAL.

Figura 9

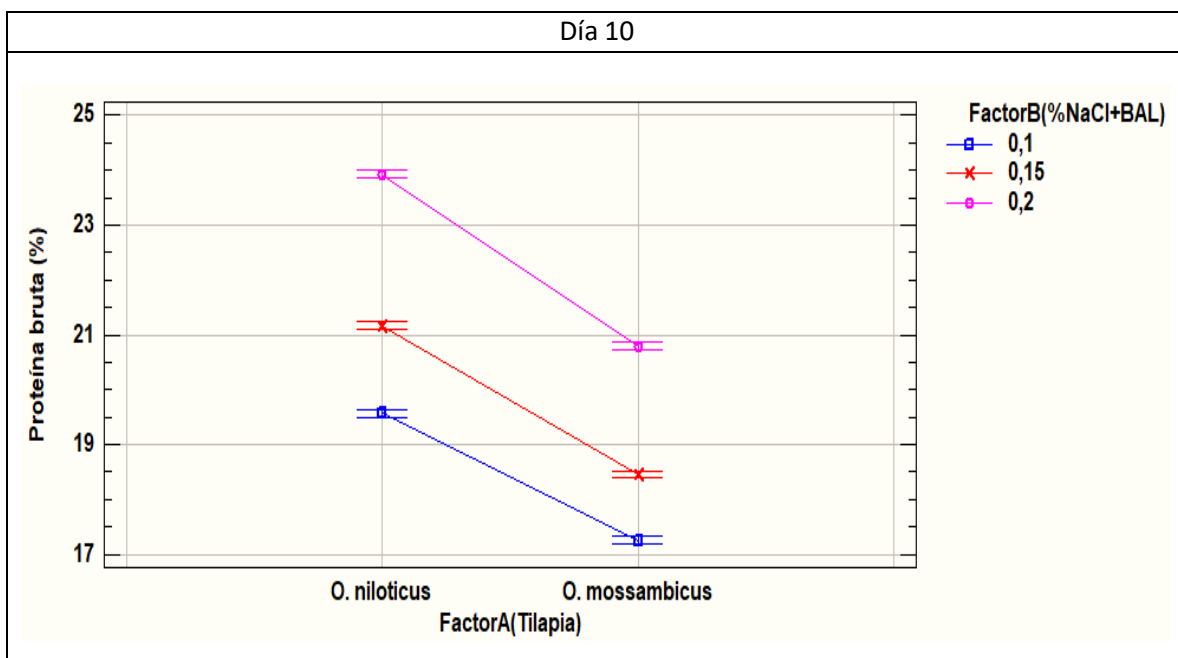
Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable cenizas



En la figura 9, se observa que en la interacción A*B de cenizas existe diferencia respecto a las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en el cual, la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* bioconservada con 20% de cloruro de sodio y BAL proveniente de la fermentación del mucílago de ambas variedades de cacao, presentó valores mayores de cenizas en comparación a la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* con 10% de cloruro de sodio y BAL.

Figura 10

Estudio del efecto de la interacción A*B en la variable proteína bruta



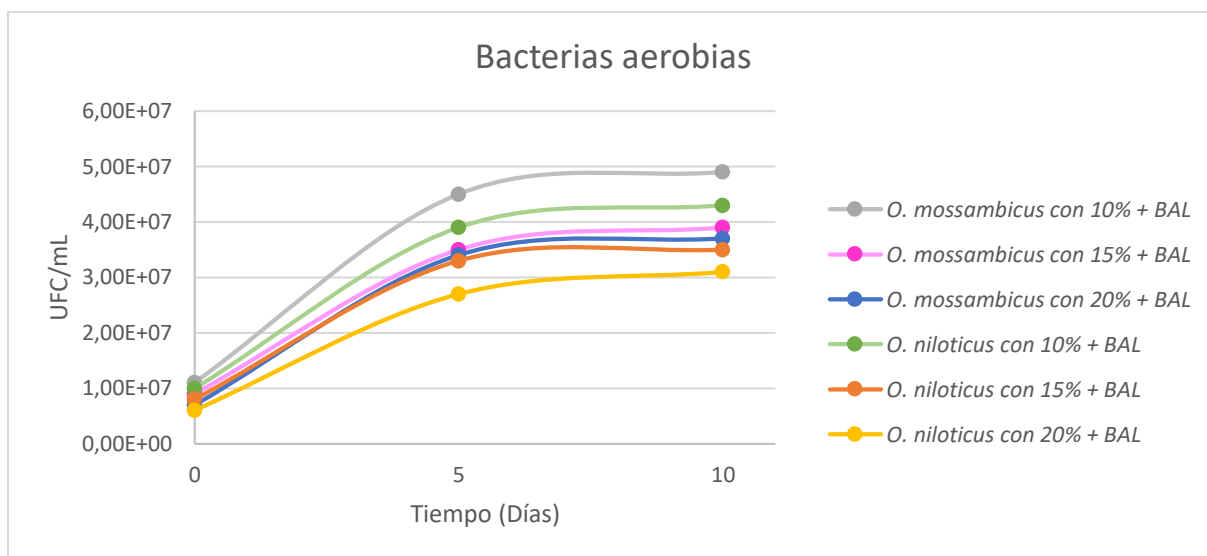
En la figura 10, se observa que en la interacción A*B de proteína bruta existe diferencia respecto a las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en el cual, la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* bioconservada con 20% de cloruro de sodio y BAL proveniente de la fermentación del mucílago de ambas variedades de cacao, presentó valores mayores de proteína en comparación a la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* con 10% de cloruro de sodio y BAL.

Parámetro microbiológico de las carnes de tilapia

Recuento de bacterias aerobias

Figura 11

Recuento de bacterias aerobias durante el tiempo de bioconservación de las carnes de tilapia con bacterias lácticas en distintas concentraciones de cloruro de sodio



Fuente: Elaboración propia.

En la figura 11, se demuestra la curva de crecimiento de las bacterias aerobias presentes en las carnes de tilapia bioconservadas con BAL y cloruro de sodio. En el día 0 se observa un valor máximo de $1,10E+07$ UFC/mL en la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus* con 10% de NaCl con BAL, mientras tanto, en la carne de tilapia de la especie *O. niloticus* con 20% de NaCl con BAL presentó un valor mínimo de bacterias aerobias ($6,0E+06$ UFC/mL). En el día 5, se determinó un mayor crecimiento de bacterias en los tratamientos tratados con 10% de NaCl+BAL, con un valor de superior de $3,5E+07$ UFC/mL, en comparación de los tratamientos tratados con 15% y 20% de NaCl+BAL. Y en el día 10, se observó un crecimiento ligero de las bacterias aerobias, en donde el tratamiento tratado con 10% de NaCl+ BAL en la carne de tilapia *O. mossambicus* presentó el valor

mayor de bacterias ($4,9E+07$ UFC/mL), en tanto el tratamiento con carne de tilapia *O. niloticus* tratada con 20% de cloruro de sodio presentó el valor mínimo de bacterias ($3,1E+07$).

Recuento de Enterobacterias, mohos y levaduras

Tabla 42

Recuento de Enterobacterias, mohos y levaduras en el día 10 de bioconservación de las carnes de tilapia con bacterias ácido lácticas en distintas concentraciones de cloruro de sodio

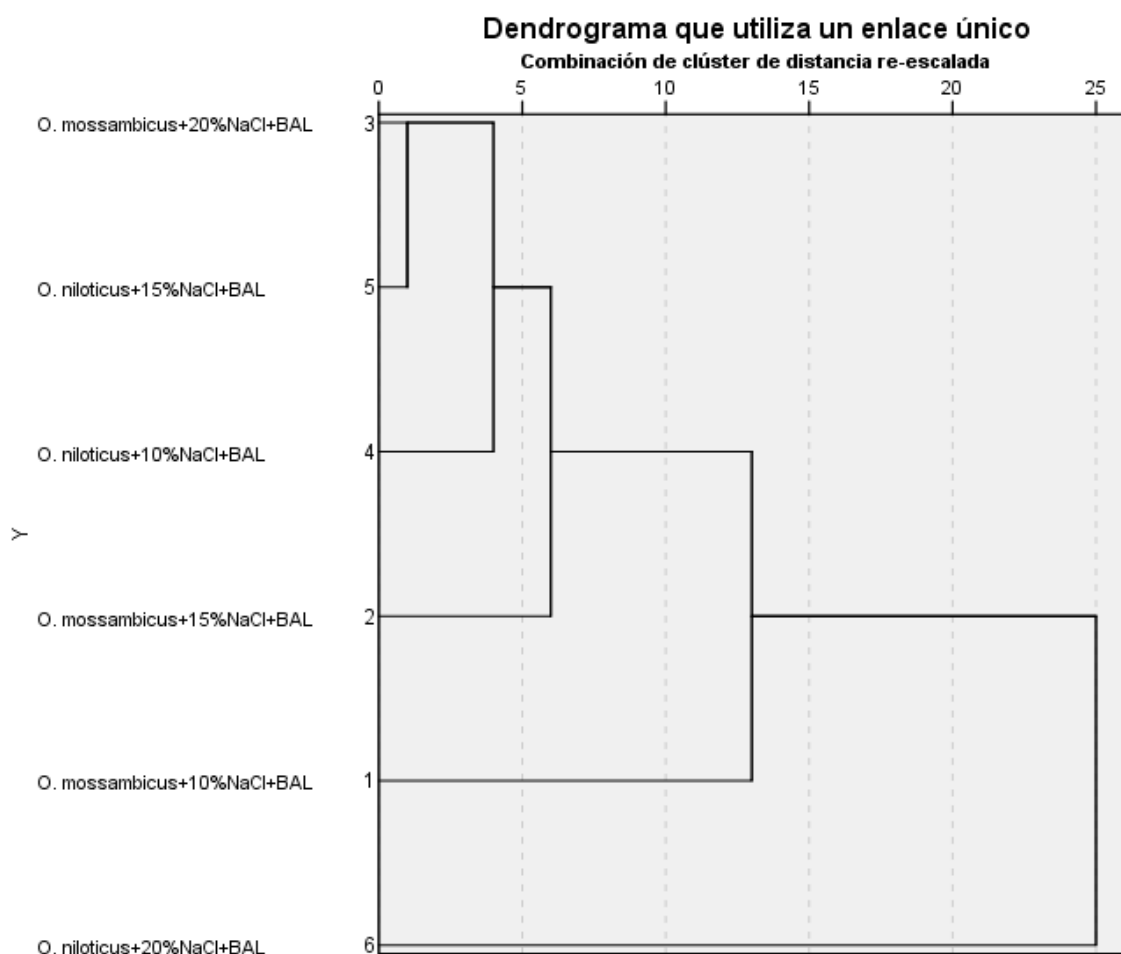
| Tratamientos | Enterobacterias | Mohos y levaduras |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>O. mossambicus</i> con 10% + BAL | 2,0E+03 | 0 |
| <i>O. mossambicus</i> con 15% + BAL | 0 | 0 |
| <i>O. mossambicus</i> con 20% + BAL | 0 | 0 |
| <i>O. niloticus</i> con 10% + BAL | 1,0E+03 | 0 |
| <i>O. niloticus</i> con 15% + BAL | 0 | 0 |
| <i>O. niloticus</i> con 20% + BAL | 0 | 0 |

En la tabla 41, se demuestra el conteo de enterobacterias, mohos y levaduras de los diferentes tratamientos estudiados en el día 10 de bioconservación, en la cual se encontró un ligero crecimiento de enterobacterias en los tratamientos tratados con 10% de cloruro de sodio con BAL, con un valor de $1,0E+03$ UFC/mL en la especie *O. niloticus* y $2,0E+03$ UFC/mL en la especie *O. mossambicus*, mientras que no se observó crecimiento de mohos y levaduras en los mismos tratamientos.

Análisis de conglomerados

Figura 12

Dendrograma para los factores en estudio



En la figura 12, se presenta un dendrograma de grupos de vecinos más cercanos aplicados en los tratamientos de estudio con las variables físico-químicas y bromatológicas (pH, acidez, humedad, grasa total, cenizas y proteína bruta), en el cual se observa grupos formados según la especie de pescado bioconservada con BAL. Existe una estrecha similitud entre el tratamiento *O. mossambicus* + 20% NaCl con BAL y *O. niloticus* + 15% NaCl con BAL. Por otro lado, los tratamientos con menor relación son *O. niloticus* + 20% NaCl con BAL y *O. mossambicus* + 10% NaCl con BAL.

Análisis de componentes principales

Tabla 43

Matriz de correlación de componentes principales

| | | pH | pH Dia | pH Dia | acidez | acidez | acidez | Humedad | Humedad | Grasa | Grasa | Cenizas | Cenizas | Proteína | Proteína |
|-------------|-------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|-------|--------|---------|---------|----------|----------|
| | | Dia 0 | 5 | 10 | Dia 0 | Dia 5 | Dia 10 | Dia 0 | Dia 10 | Dia 0 | Dia 10 | Dia 0 | Dia 10 | Dia 0 | Dia 10 |
| Correlacion | pH (Dia 0) | 1,000 | ,835 | ,840 | -,941 | -,715 | -,710 | ,921 | ,690 | -,905 | -,881 | -,664 | -,583 | -,904 | -,683 |
| | pH (Dia 5) | ,835 | 1,000 | ,946 | -,735 | -,414 | -,416 | ,681 | ,367 | -,698 | -,600 | -,444 | -,182 | -,854 | -,249 |
| | pH (Dia 10) | ,840 | ,946 | 1,000 | -,734 | -,345 | -,321 | ,723 | ,295 | -,696 | -,560 | -,391 | -,116 | -,913 | -,209 |
| | acidez (Dia 0) | -,941 | -,735 | -,734 | 1,000 | ,779 | ,782 | -,841 | -,752 | ,912 | ,874 | ,768 | ,608 | ,850 | ,712 |
| | acidez (Dia 5) | -,715 | -,414 | -,345 | ,779 | 1,000 | ,962 | -,763 | -,976 | ,786 | ,923 | ,670 | ,874 | ,536 | ,839 |
| | acidez (Dia 10) | -,710 | -,416 | -,321 | ,782 | ,962 | 1,000 | -,763 | -,950 | ,757 | ,920 | ,723 | ,877 | ,540 | ,862 |
| | Humedad (Dia 0) | ,921 | ,681 | ,723 | -,841 | -,763 | -,763 | 1,000 | ,748 | -,860 | -,916 | -,575 | -,710 | -,867 | -,763 |
| | Humedad (Dia 10) | ,690 | ,367 | ,295 | -,752 | -,976 | -,950 | ,748 | 1,000 | -,795 | -,923 | -,725 | -,886 | -,479 | -,857 |
| | Grasa (Dia 0) | -,905 | -,698 | -,696 | ,912 | ,786 | ,757 | -,860 | -,795 | 1,000 | ,909 | ,798 | ,672 | ,808 | ,762 |
| | Grasa (Dia 10) | -,881 | -,600 | -,560 | ,874 | ,923 | ,920 | -,916 | -,923 | ,909 | 1,000 | ,734 | ,867 | ,718 | ,874 |
| | Cenizas (Dia 0) | -,664 | -,444 | -,391 | ,768 | ,670 | ,723 | -,575 | -,725 | ,798 | ,734 | 1,000 | ,538 | ,510 | ,650 |
| | Cenizas (Dia 10) | -,583 | -,182 | -,116 | ,608 | ,874 | ,877 | -,710 | -,886 | ,672 | ,867 | ,538 | 1,000 | ,360 | ,950 |
| | Proteína (Dia 0) | -,904 | -,854 | -,913 | ,850 | ,536 | ,540 | -,867 | -,479 | ,808 | ,718 | ,510 | ,360 | 1,000 | ,480 |
| | Proteína (Dia 10) | -,683 | -,249 | -,209 | ,712 | ,839 | ,862 | -,763 | -,857 | ,762 | ,874 | ,650 | ,950 | ,480 | 1,000 |

En la tabla 43, se puede observar una matriz de correlación de los componentes principales, donde la variable pH en los tres tiempos de bioconservación están correlacionados entre sí, con más de 0,84, y la variable proteína está correlacionado con la variable cenizas con un valor de 0,95 en el día 10 de bioconservación. Además, la variable acidez tiene una correlación con la grasa total en el día 10 con un valor de 0,92. Con respecto a la humedad, se puede observar una correlación baja con el pH en el día 10 de bioconservación (0,295).

Tabla 44

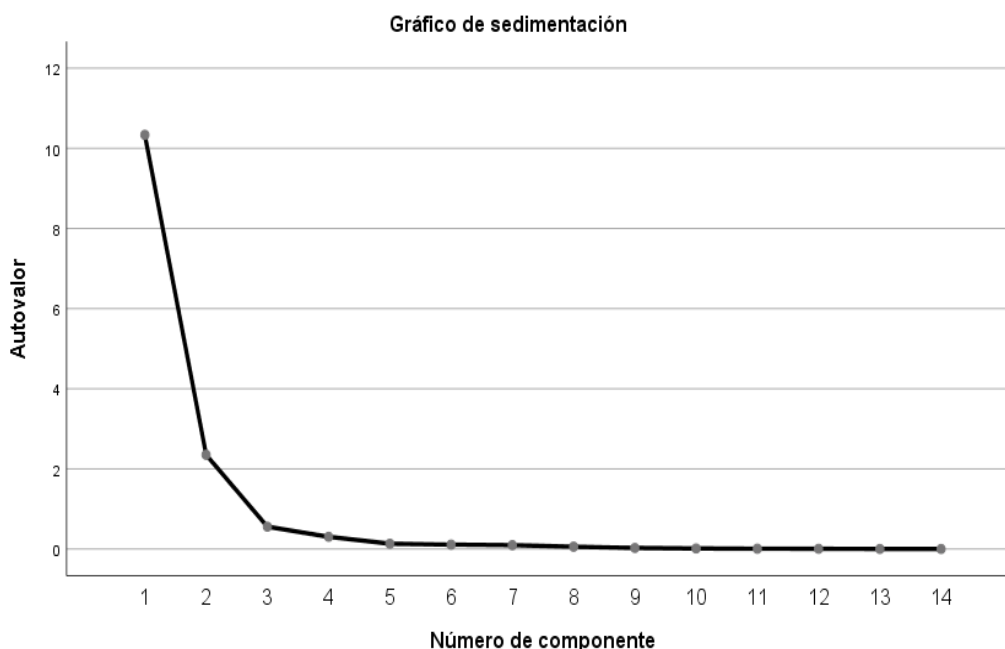
Matriz de componentes

| Nº | | Componente | | |
|----|------------------|------------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | pH (Dia 0) | -,937 | ,298 | ,047 |
| 2 | pH (Dia 5) | -,689 | ,658 | -,009 |
| 3 | pH (Dia 10) | -,661 | ,741 | ,054 |
| 4 | acidez (Dia 0) | ,941 | -,170 | ,131 |
| 5 | acidez (Dia 5) | ,893 | ,350 | -,034 |
| 6 | acidez (Dia 10) | ,892 | ,361 | ,016 |
| 7 | Humedad(Dia 0) | -,930 | ,127 | ,259 |
| 8 | Humedad(Dia 10) | -,882 | -,405 | -,042 |
| 9 | Grasa(Dia 0) | ,948 | -,100 | ,133 |
| 10 | Grasa(Dia 10) | ,981 | ,134 | -,066 |
| 11 | Cenizas(Dia 0) | ,769 | ,110 | ,607 |
| 12 | Cenizas(Dia 10) | ,783 | ,557 | -,222 |
| 13 | Proteína(Dia 0) | ,811 | -,519 | -,113 |
| 14 | Proteína(Dia 10) | ,837 | ,447 | -,110 |

Tabla 45

Porcentajes de varianza total explica

| Componente | Varianza total explicada | | | | | |
|------------|--------------------------|---------------|-------------|--|---------------|-------------|
| | Autovalores iniciales | | | Sumas de cargas al cuadrado de la extracción | | |
| | Total | % de varianza | % acumulado | Total | % de varianza | % acumulado |
| 1 | 10,336 | 73,829 | 73,829 | 10,336 | 73,829 | 73,829 |
| 2 | 2,351 | 16,794 | 90,623 | 2,351 | 16,794 | 90,623 |
| 3 | ,557 | 3,981 | 94,604 | ,557 | 3,981 | 94,604 |
| 4 | ,304 | 2,172 | 96,776 | | | |
| 5 | ,133 | ,950 | 97,726 | | | |
| 6 | ,109 | ,782 | 98,508 | | | |
| 7 | ,097 | ,692 | 99,200 | | | |
| 8 | ,058 | ,413 | 99,613 | | | |
| 9 | ,026 | ,183 | 99,796 | | | |
| 10 | ,013 | ,093 | 99,889 | | | |
| 11 | ,008 | ,061 | 99,950 | | | |
| 12 | ,004 | ,031 | 99,981 | | | |
| 13 | ,002 | ,017 | 99,998 | | | |
| 14 | ,000 | ,002 | 100,000 | | | |

Figura 13*Gráfica de sedimentación*

En la figura 13, se presenta el gráfico de sedimentación donde se evaluó las 14 variables, de las cuales, según la varianza total explicada se identificó 4 componentes con mayor porcentaje de varianza (>1%). El pH en el día 0 (componente 1) obtuvo mayor porcentaje (73,83%) a comparación de las otras variables. En cambio, el pH del día 5 (componente 2), el pH del día 10 (componente 3) y la acidez del día 0 (componente 4), el porcentaje de varianza fue de 16,79% 3,98% y 2,17% respectivamente. Con respecto a los demás componentes, sus porcentajes de varianza son inferiores a 1, siendo probablemente menos relevantes en el estudio.

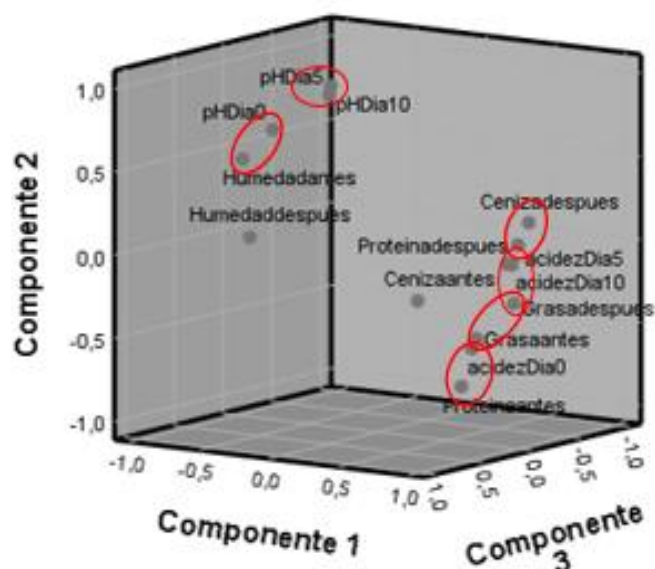
Por lo general, los factores principales que influyen en la conservación de alimentos es el pH y la acidez, sin embargo, algunos expertos en la conservación de alimentos determinan la acidez en función al pH (Rushing, 2010), debido que influyen en el crecimiento microbiano, con un pH óptimo de 8,5 para los hongos y levaduras y 6-8 para bacterias (Cervantes et al. 2017). No obstante, ciertas bacterias crecen en rangos de pH más bajos como las BAL, que crecen en la

mayoría de alimentos, bajando el pH a 3 para impedir el crecimiento de competidores (Bordons et al. 2018).

Figura 14

Gráfica de componentes principales

Gráfico de componente en espacio rotado



En la figura 14, se muestra los resultados de componentes principales de las 14 variables de estudio, donde el componente 2 se obtuvo dos grupos relacionados, el pH del día 5 y día 10 y el otro grupo de pH y humedad del día 0 de bioconservación. En el componente 3 se formaron cuatro grupos relacionados, siendo el más grande con correlación alta, el de cenizas, proteína en el día 10 de bioconservación, en este mismo componente se correlaciona la acidez del día 5, grasa total y acidez del día 10, y esta a su vez se correlaciona con la grasa total del día 0 de bioconservación. Finalmente, la acidez del día 0 se correlaciona con la proteína del día 0.

Análisis sensorial

Tabla 46

Análisis sensoriales de las carnes de tilapia (O. mossambicus y O. niloticus) bioconservadas con cloruro de sodio y BAL, durante 10 días

| Atributo | Tratamiento | Día 10 |
|----------|-------------------------------------|-------------------|
| Color | <i>O. mossambicus</i> +10% NaCl+BAL | 2,04 ^D |
| | <i>O. mossambicus</i> +15% NaCl+BAL | 2,54 ^D |
| | <i>O. mossambicus</i> +20% NaCl+BAL | 3,50 ^B |
| | <i>O. niloticus</i> +10% NaCl+BAL | 2,93 ^C |
| | <i>O. niloticus</i> +15% NaCl+BAL | 2,82 ^C |
| | <i>O. niloticus</i> +20% NaCl+BAL | 3,79 ^A |
| Aroma | <i>O. mossambicus</i> +10% NaCl+BAL | 2,85 ^B |
| | <i>O. mossambicus</i> +15% NaCl+BAL | 2,89 ^B |
| | <i>O. mossambicus</i> +20% NaCl+BAL | 3,68 ^A |
| | <i>O. niloticus</i> +10% NaCl+BAL | 3 ^B |
| | <i>O. niloticus</i> +15% NaCl+BAL | 3,21 ^A |
| | <i>O. niloticus</i> +20% NaCl+BAL | 3,71 ^A |
| Textura | <i>O. mossambicus</i> +10% NaCl+BAL | 2,57 ^B |
| | <i>O. mossambicus</i> +15% NaCl+BAL | 2,75 ^B |
| | <i>O. mossambicus</i> +20% NaCl+BAL | 3,36 ^A |
| | <i>O. niloticus</i> +10% NaCl+BAL | 2,75 ^B |
| | <i>O. niloticus</i> +15% NaCl+BAL | 3,29 ^A |
| | <i>O. niloticus</i> +20% NaCl+BAL | 3,65 ^A |

Nota: La escala de valores establecida fue 4 Excelente, 3 Bueno, 2 Regular, 1 Malo.

En la Tabla 46, se muestra los resultados del análisis sensorial donde se puede determinar que el mejor tratamiento de las carnes de tilapia bioconservadas con cloruro de sodio y BAL durante los 10 días a 3-4°C es *O. niloticus*+20% NaCl+BAL, debido que obtuvo mayor puntaje en

los tres atributos establecido (valores mayores a 3). Además, se puede incidir que a mayor concentración de cloruro de sodio con BAL se obtuvo mejores resultados (superior a 3). Aunque es importante destacar que los valores reportados por parte de los catadores siempre estuvieron por encima del límite de aceptabilidad establecido para el presente estudio que fue superior a 2. Sin embargo, los tratamientos con 10 y 15% de NaCl + BAL en la carne de tilapia de la especie *O. mossambicus*, por lo general, tuvieron menor aceptación.

Capítulo V

Discusión

Las bacterias del ácido láctico, especialmente *L. plantarum*, provenientes del mucílago fermentado de las dos variedades de cacao (Nacional y CCN-51), tienen un gran potencial para su uso en la bioconservación de alimentos, debido que son seguras para el consumo, y durante la conservación dominan de forma natural la microflora de muchos alimentos (De Vuyst y Leroy, 2020). En carnes y pescados crudos que se conservan en frío, las bacterias del ácido láctico se convierten en la población dominante y conservan la carne en un perfecto estado (Barcenilla et al. 2022). Sin embargo, en la actualidad el uso de estas bacterias como agentes de bioconservación todavía están subutilizados a pesar de los prometedores resultados antes mencionados.

Según Kim et al. (2020), mencionan que las bacterias ácido lácticas tienen un gran potencial antimicrobiano que inhibe o retrasa el crecimiento de microorganismos patógenos en productos cárnicos y en frutos, como *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter*, entre otros. Asimismo, en el trabajo de Barcenilla et al. (2022), mencionan que la utilización de bacterias ácido lácticas como estrategia biológica en la conservación para los productos cárnicos controlan la proliferación de microorganismos indeseables debido a sus metabolitos antimicrobianos, logrando una vida útil más larga o inhibiendo el deterioro y las bacterias patógenas, en especial cuando se combinan con otras aplicaciones tecnológicas para lograr un efecto sinérgico.

Respecto a las especies de tilapia (Factor A)

Con respecto a los resultados físico-químicos y bromatológicos de las carnes de tilapia, se observó valores de pH entre 6,05 a 6,44 los cuales están acorde a lo establecido por la norma técnica ecuatoriana INEN 183. Las carnes de tilapia conservadas con BAL y cloruro de sodio presentaron una disminución de pH al transcurrir el tiempo, tanto en la especie *O. niloticus* como en la especie *O. mossambicus*, este resultado es consistente al estudio reportado por Talledo et al. (2020). Además, Vásquez et al. (2009) mencionan que la disminución de pH en productos cárnicos tratados con las bacterias ácido lácticas, se debe a la producción de ácidos orgánicos por las mismas bacterias.

En cuanto a la acidez, se observó valores de 0,20% a 0,36% en la especie *O. mossambicus* y 0,24% a 0,39% en la especie *O. niloticus*, presentando un incremento de acidez con el transcurso de tiempo, estos valores son similares al estudio de Mera (2015). Según Cao et al. (2015) el aumento de la acidez se explica por la formación de ácido láctico y ácido acético por las bacterias lácticas, favoreciendo el crecimiento de las BAL y a la vez impidiendo el crecimiento de microorganismos indeseables que afectan a la calidad del pescado.

En la humedad, se obtuvo 73,55% a 75,08% en la especie *O. mossambicus* y 72,44% a 73,88% en la especie *O. niloticus*, estos valores se encuentran dentro de los parámetros (67-80%) reportados por Valls (2007). Por otra parte, Silva et al. (2017), establecen que estos rangos de humedad permiten conservar la calidad del pescado y sus propiedades nutricionales, impidiendo a su vez el deterioro proteolítico del músculo.

En cenizas, se obtuvo 0,97% a 1,02% en la especie *O. mossambicus* y 1,06% a 1,35% en la especie *O. niloticus*, estos valores se encuentran dentro del parámetro (1,10-1,5%) establecido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2001).

En grasa total, se observó valores de 2,57% a 3,23% en la especie *O. mossambicus* y 3,42% a 4,24% en la especie *O. niloticus*, los cuales se encuentra dentro de los parametros (0,2-25%) establecido por Valls (2007).

En proteína, se obtuvo 16,60% a 18,46% en la especie *O. mossambicus* y 17,81% a 21,16% en la especie *O. niloticus*, estos valores se encuentra dentro del rango de valores (15-27%) reportado por Valls (2007). De acuerdo con el estudio de Talledo et al. (2020) el incremento de algunas variables bromatológicas, como la proteína, a lo largo del tiempo de conservación se deben influenciadas por la interrelación de las bacteriocinas de las bacterias ácido lácticas y las bacterias propias del pescado.

Respecto a las distintas concentraciones de cloruro de sodio con las bacterias ácido lácticas

(Factor B)

En el factor B, se analizó el efecto de las distintas concentraciones de cloruro de sodio con las bacterias ácido lácticas en la bioconservación de la carne de pescado, analizando cada parámetro físico-químico y microbiológicos aplicados.

En la variable pH, la mayor concentración (20%) de cloruro de sodio con BAL presentó un valor mayor a comparación de las dos inferiores (10 y 15%), sin embargo, se presentó una ligera disminución de 6,38 a 6,23, estos resultados se encuentran dentro de los valores reportados por Mera (2015) y por la norma técnica ecuatoriana (NTE INEN 183, 2013).

En cuanto a la acidez, la mayor concentración (20%) de cloruro de sodio con BAL presentó un valor mayor a comparación de las dos inferiores (10 y 15%), el cual aumenta de 0,22% a 0,39%, siendo resultados inferiores al estudio de Suárez et al. (2008) que obtuvieron 0,39-0,41%. Según

Cao et al. (2015) el aumento de la acidez se explica por la formación de ácido láctico y ácido acético por las bacterias lácticas, impidiendo el crecimiento de bacterias indeseables que afectan a la calidad del pescado. De acuerdo con el estudio de Rodríguez et al. (2009), la determinación de acidez o del pH permite determinar el grado de deterioro del pescado, a menor acidez mayor rancidez.

Con respecto a la humedad, el 10% de cloruro de sodio con BAL presentó un valor mayor (75,59%) a las otras dos (15-20%) concentraciones de cloruro de sodio (74,43 y 74,05%, respectivamente). Estos valores se encuentran en el rango establecido por Perea et al. (2015) donde menciona que estos valores representa buena calidad del pescado. Además, estos resultados concuerdan con los valores reportados por Rodríguez et al. (2009) en el estudio de evaluación física y química de filetes de bagre salados en salmuera, donde menciona que a menor concentración de cloruro de sodio se obtiene mayor contenido de humedad.

En grasa total, se obtuvo mayor valor a mayor concentración presentando un valor de 4,04% de grasa a 20% de cloruro de sodio con BAL, mientras que a 10% y 15% presentó 3,45% y 3,73%, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los parámetros establecido por Valls (2007) que va de 0,2% a 25% de grasa, indicando un valor nutritivo aceptable del pescado.

En la variable cenizas, se presentó valores de 1,03 a 1,45%, siendo valores que se encuentran en el rango establecido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2001) que va de 1,02 a 1,5%. De acuerdo al estudio de Rodríguez et al. (2009), el incremento de cenizas se debe al aumento de cloruro de sodio en el músculo del pescado, ya que el compuesto inorgánico del NaCl se ve cuantificado en la determinación de cenizas. Esto coincide también con lo reportado por Martínez y Gómez (2006).

Con respecto a la proteína bruta, se obtuvo valores de 18,41% a 22,36%, estos resultados son superiores al rango de valor (16,5-18,4%) reportado por Contreras y Cardiles (2013), sin embargo, se encuentra dentro del parámetro establecido por Valls (2007) que va de 15% a 27%, indicando los valores aceptables de proteína bruta en los filetes de pescado. Además, Perez (2013) menciona que la adición de NaCl activa y solubiliza las proteínas miofibrilares de la carne. Al disminuir la concentración de NaCl podrían afectar la solubilidad y funcionalidad de estas proteínas en el sistema cárnico de la tilapia, afectando su calidad.

Respecto a la interacción A*B (Especie de Tilapia + Concentración de cloruro de sodio con BAL)

La bioconservación de las carnes de pescado con bacterias ácido lácticas provenientes de la fermentación del mucilago de cacao en distintas concentraciones de cloruro de sodio presentó diferencias significativas entre las especies de tilapia y en las distintas concentraciones de cloruro de sodio, debido a que la carne de la especie *O. niloticus* se caracteriza por ser más ácida que la especie *O. mossambicus* (Mera, 2015).

Con respecto al pH, los tratamientos *O. mossambicus*+20% de NaCl+BAL y *O. mossambicus*+15% de NaCl+BAL, registraron valores mayores, con 6,43 en el día 0 a 6,37 en el día 10, y 6,45 en el día 0 a 6,37 en el día 10 de bioconservación, respectivamente. En cambio, las interacciones *O. niloticus*+10% de NaCl+BAL y *O. niloticus*+15% de NaCl+BAL obtuvieron pH menores de 6,3 en el día 0 a 5,98 en el día 10, y 6,33 en el día 0 a 6,07 en el día 10, respectivamente. Según Sulistiani y Handayani (2018), la disminución de pH tratados con las bacterias ácido lácticas en el transcurso de tiempo, se debe a la producción de ácido láctico de las BAL en la carne de pescado, este ácido se disocia en el citoplasma celular, permitiendo la disminución de pH del citoplasma en la célula diana. Por consiguiente, se demuestra, mediante la

gráfica de sedimentación (figura 13), que el pH es un componente principal que influye en la bioconservación del pescado.

En base a la acidez titulable, la interacción de *O. niloticus*+20% de NaCl+BAL y *O. niloticus*+15% de NaCl+BAL obtuvieron mayor porcentaje de acidez con 0,26% en el día 0 a 0,40% en el día 10, y 0,24% en el día 0 a 0,39% en el día 10, respectivamente. En cambio, en las interacciones que involucran a la especie *O. mossambicus* presentaron el menor porcentaje de acidez, teniendo entre 0,26-0,21% en el día 0 a 0,3-0,36% en el día 10. Según Parra (2010), el aumento de acidez se debe a la formación de ácido orgánicos, como el ácido láctico y el ácido acético por parte de las bacterias lácticas. De igual forma, en el trabajo de Mera (2015), presentó resultados similares donde obtuvo 0,36% en la especie *O. niloticus* y 0,28% en la especie *O. mossambicus*.

En los resultados de humedad, se observaron un ligero incremento con el avance de los días de bioconservación. El tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL presentó mayor humedad con 73,49% en el día 0 y 76,74% en el día 10, en comparación a los tratamientos de *O. niloticus*+15% de NaCl+BAL con 72,5% en el día 0 a 73,79% y *O. niloticus*+ 20% de NaCl+BAL con 72,32% en el día 0 a 73,66% en el día 10. De igual forma, en el trabajo de Mera (2015) presentó resultados similares a los obtenidos de hasta 76,09% en la especie *O. mossambicus* y 74,20% en la especie *O. niloticus*.

En la variable de grasa total, el tratamiento *O. niloticus*+20% de NaCl+BAL presentó el porcentaje más alto de grasa con 3,56 en el día 0 a 4,43% en el día 10 y el tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL obtuvo el porcentaje menor de grasa con 2,57% en el día 0 a 2,83% en el día 10. Estos resultados son superiores a los valores obtenidos en el trabajo de Cesar

(2015), sin embargo, se encuentran dentro de rango aceptable por Contreras y Cardiles (2013) donde evalúa la calidad de los filetes de tilapia.

Con respecto a la ceniza, el tratamiento *O. niloticus*+20% de NaCl+BAL presentó el porcentaje más alto con 1,2% en el día 0 a 1,51% en el día 10, y el tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL obtuvo el porcentaje menor con 0,8% en el día 0 a 0,88% en el día 10. Estos resultados se encuentran dentro de rango aceptable por Cesar (2015) y Contreras et al. (2013).

En cuanto a la proteína, el tratamiento *O. niloticus*+20% de NaCl+BAL presentó el porcentaje más alto con 17,94% en el día 0 a 23,93% en el día 10, y el tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL obtuvo el porcentaje menor con 16,98% en el día 0 a 17,26% en el día 10 de bioconservación. Estos resultados se encuentran, de igual manera, dentro del rango aceptable en los trabajos de Cesar (2015) y Contreras, et al. (2013), por lo que se puede aumentar los días de conservación con las bacterias ácido lácticas (Talledo et al. 2020).

Calidad microbiológica

Con respecto al crecimiento de las bacterias aerobias, el tratamiento *O. mossambicus* + 10% de NaCl + BAL presentó mayor población bacteriana ($4,8E+07$ UFC/mL) en comparación al tratamiento *O. niloticus* + 20% de NaCl + BAL que obtuvo una población microbiana menor ($3,1E+07$ UFC/mL), estos resultados son similares a los valores reportados por Mera (2015) donde obtuvo $4,6E+06$ UFC/mL en la especie *O. mossambicus* y $3E+06$ UFC/mL en la especie *O. niloticus*. Además, no se presenció población de mohos y levaduras. Esto indica que las bacterias de ácido láctico tienen una alta capacidad antifúngica (Rather et al. 2014). En cuanto a las enterobacterias, se observó un ligero crecimiento ($1,5E+03$ UFC/mL) en la especie *O. mossambicus*. Estos

resultados son similares a los reportados por Mera (2015) y Castillo et al. (2017), donde observaron mayor recuento de bacterias aerobias en la especie *O. mossambicus* y menor recuento en la especie *O. niloticus*, y ninguna presencia de mohos y levaduras.

Los filetes frescos de tilapia contienen una gran diversidad de comunidad bacteriana, como *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Vibrios*. Esto puede verse influida por varios factores, según Talledo et al. (2020), la población microbiana en los filetes de tilapia se debe al período estacional, a la manipulación antes de su conservación, es decir las prácticas pesqueras, condiciones de pesca, procesamiento y almacenamiento, debido que pueden favorecer el crecimiento de microorganismos de descomposición. De tal motivo Cao et al. (2015), mencionan el uso de las bacterias ácido láctico por su efecto inhibitorio contra estas bacterias no deseadas, incluida *E. coli* y *Salmonella*. Con respecto a las bacterias de deterioro, como *Pseudomonas*, las bacterias lácticas solo puede tener una actividad antibacteriana muy limitada.

Capítulo VI

Conclusiones

Factor A (Especie de tilapia)

Con respecto a los resultados físico-químicos y bromatológicos de las carnes de tilapia, se concluye que en la especie *O. mossambicus* y *O. niloticus* presentaron valores acordes a lo establecido por la norma técnica ecuatoriana INEN 183.

Las carnes de tilapia conservadas con BAL y cloruro de sodio presentaron una disminución de pH al transcurrir el tiempo, tanto en la especie *O. niloticus* como en la especie *O. mossambicus*. En cuanto a los resultados de acidez, humedad, grasa, cenizas y proteína, presentaron un aumento en las dos especies de tilapia, desde el día 0 al día 10 de bioconservación.

En la especie *O. mossambicus* presentó valores mayores de pH, humedad y crecimiento de bacterias aerobias. Mientras que en la especie *O. niloticus* presentó valores mayores de acidez, grasa, cenizas y proteína.

Por lo tanto, teniendo en consideración que entre las especies de tilapia donde se encontraron diferencias significativas en las variables analizadas, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el uso de las BAL si influyen en la bioconservación de las carnes de tilapia.

Factor B (Concentración de cloruro de sodio con BAL)

En base a los resultados físico-químico y bromatológicos, se concluye que se presentó diferencias significativas en las distintas concentraciones de cloruro de sodio con BAL, presentando una disminución en el pH y un aumento en la acidez, humedad, cenizas, grasa, proteína y la población bacteriana en el transcurso del tiempo.

La bioconservación a 20 y 15% de cloruro de sodio presentaron valores más alto en pH, acidez, grasa, cenizas y proteína, a comparación al 10% de cloruro de sodio con BAL. Sin embargo, la concentración que presentó mayor valor de humedad fue el de 10% de cloruro de sodio.

La bioconservación a 20% influye menos en el pH y humedad, mientras que a 10% influye menos en la acidez, cenizas y proteína en las carnes de tilapia en el proceso de bioconservación.

Con respecto al conteo de microorganismos, las concentraciones 15 y 20% de cloruro de sodio no presentaron población de enterobacterias a comparación de la concentración 10%. Mientras que a 10% de cloruro de sodio presentó mayor población bacteriana.

Por lo tanto, considerando los datos obtenidos se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que la aplicación de las bacterias ácido lácticas con distintas concentraciones de cloruro de sodio influye en la bioconservación de la carne de tilapia.

Interacción A*B (Especie de tilapia + Concentración de NaCl con BAL)

Considerando los datos obtenidos de las variables analizadas, se concluye los tratamientos *O. niloticus*+20% de NaCl+BAL y *O. niloticus*+15% de NaCl+BAL presentaron resultados mayores en cuanto a la acidez, grasa, cenizas y proteína. Mientras que el tratamiento *O. mossambicus*+20% de NaCl+BAL obtuvo resultados mayores en cuanto al pH y el tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL en humedad y crecimiento bacteriano.

El tratamiento *O. niloticus*+10% de NaCl+BAL presentó resultados menores de pH, mientras que el tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL presentó resultados menores en la acidez, grasa, cenizas y proteína, y los tratamientos *O. niloticus*+15% de NaCl+BAL y *O. niloticus*+20% de NaCl+BAL en la humedad, al día 10 de finalizar la bioconservación.

Con respecto al conteo de microorganismos, el tratamiento *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL presentó mayor población de bacterias aerobias. Mientras que en los tratamientos *O. mossambicus*+10% de NaCl+BAL y *O. niloticus*+10% de NaCl+BAL presentaron una pequeña población de Enterobacterias, a diferencia de los demás tratamientos que no hubo presencia de las mismas.

Recomendaciones

Con respecto a la utilización de las especies de tilapia, en relación al contenido de pH, acidez, humedad, proteína bruta, y UFC aerobios y de Enterobacterias, se recomienda el empleo de la especie *O. niloticus*. En cuanto al contenido de grasa total y cenizas se recomienda utilizar la especie *O. mossambicus*.

En referente a las concentraciones de cloruro de sodio con BAL, en relación al contenido del pH y humedad, se recomienda emplear la mayor concentración (20%), debido que no hay mucha influencia en sus valores. En cuanto al acidez, cenizas y proteína se recomienda la utilización de la concentración del 10% de NaCl. En cuanto al contenido de grasa total se recomienda el empleo de las tres concentraciones de (10, 15 o 20%) de NaCl. Mientras que la inhibición de UFC de enterobacterias se recomienda el empleo de la concentración de 15 y 20% de NaCl con BAL.

A partir de los resultados, se recomienda a futuras investigaciones en alimentos la bioconservación con las bacterias ácido lácticas en las carnes de tilapia con cloruro de sodio, debido a que los valores obtenidos se encuentran entre los parámetros de calidad del pescado, al igual que el crecimiento de patógenos microbianos. También de aumentar el tiempo de bioconservación para estimar la vida útil del pescado en base a los parámetros de calidad del pescado.

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>.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(7), 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>

Aprotosoiaie, 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>.

Asap. (2015). Asap Laboratorio: <http://www.asaplaboratorio.com>.

Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, *183*, 108661. doi:10.1016/j.meatsci.2021.108661.

Batista, L. (2009). *El cultivo de cacao*. Santo Domingo.: Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal.

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>.

- Bordons, A., Bautista-Gallego, J., Portillo, M. C., & Mas, A. (2018). *Nuevas tendencias en microbiología de alimentos: XXI Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos (SEM)*. Tarragona: Publicacions Universitat Rovira i Virgili.
- Cao, R., Liu, Q., Chen, S., Yang, X., & Li, L. (2015). Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in freshness keeping of tilapia fillets as sashimi. *Journal of Ocean University of China*, 14(4), 675–680. doi:10.1007/s11802-015-2682-1.
- Capelo, J. (2021). *Análisis de producción y económico de camarón Penaeus vannamei y Tilapia Oreochromis spp. en Ecuador, 2009-2018*. Santa Elena, Ecuador: Bachelor's thesis, La Libertad: Universidad Estatal Península de Santa Elena.
- Castillo, A., Montalvo, C., Ramirez, C., & Bolívar, G. (2017). Control Microbiological Deterioration of Tilapia Fillets by the Application of Lactic Acid Bacteria. *ORINOQUIA*, vol. 21, núm. 2, pp. 30-37.
- Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite Storage in Theobroma cacao L. Seed: Cytological and Phytochemical Analyses. *Frontiers in Plant Science*, 10, (1–11). Obtenido de <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>.
- Contreras, O., & Cardiles, C. (2013). EVALUACIÓN DE LA CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA Y SENSORIAL DE FILETES DE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) MARINADOS EN FRÍO (4°C). *UNIVERSIDAD DE CARTAGENA. CARTAGENA DE INDIAS*.
- Corpei. (2001). Tilapia: Perfil del Producto. CBI Proyect.

- 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>.
- CPE INEN-CODEX CAC/GL 31. (2013). Directrices del Codex para la Evaluación sensorial del pescado y los mariscos en laboratorio (CAC/GL 31- 1999, ldt). Quito, Ecuador. https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/cpe_inen_codex_cac_gl_31.pdf
- De Vuyst L., & Leroy F. (2020). Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiol Rev*, 44(4):432-453. doi: 10.1093/femsre/fuaa014. PMID: 32420601.
- 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 Águila Flores, D., & Zegarra Jumanga, D. A. (2016). *Extracción de pectina por hidrólisis ácida y precipitación alcohólica a partir de las cáscaras de cacao híbrido CCN51 (Theobroma cacao L.) para la fabricación de un prototipo de empaque alimentario*. Pucallpa, Peru.: Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia.
- 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>.
- Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre M, & Weigend M. (2017). Hoja botánica: Cacao. Lima., Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.: Report No.: 1ed.
- FAO. (27 de Septiembre de 2001). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. www.fao.org: <http://www.fao.org/fishery/topic/12253/es>.

- 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.
<http://revistas.sena.edu.co/index.php/recia/article/view/1635/2523>.
- Guerra, N., Macias, C., Agrasar, A., & Castro, L. (2005). Development of a bioactive packaging cellophane using NisaplinR as biopreservative agent. *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), 106–110. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2004.01649.x>
- 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., Eltahir, S. M., Idris, L. B., Altayb, H. N., Abass, A. M., Ibrahim, M., Ibrahim, E. A., & Hassan, M. (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*, <https://doi.org/10.1155/2020/8825718>.
- Jácome, J., Quezada Abad, C., Sánchez Romero, O., Pérez, J. E., & Nirchio, M. (2019). Tilapia en Ecuador: paradoja entre la producción acuícola y la protección de la biodiversidad ecuatoriana. *Revista peruana de biología*, 26(4), 543-550.

- Kim, S. W., Kang, S. I., Shin, D. H., Oh, S. Y., Lee, C. W., Yang, Y., & Bang, Y. (2020). Potential of Cell-Free Supernatant from *Lactobacillus plantarum* NIBR97, Including Novel Bacteriocins, as a Natural Alternative to Chemical Disinfectants. *Productos farmacéuticos*, 13(10), 266. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/ph13100266>.
- 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-langsats-fruit-lans-60442.html>.
- 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>.
- Londoño, A., Taborda, T., López, A., & Acosta, V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, 23(36), 186-205.
- Lopez, J. (2021). *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (Carica papaya) y naranjilla (Solanum quitoense)*. Santo Domingo, Ecuador: Tesis.
- 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>.

Martínez, O., & Gómez, G. (2006). Effect of brine salting at different pHs on the functional properties of cod muscle proteins after subsequent dry salting . *Fd. Chem.*, 94:123-129.

Mera, C. (2015). *Efecto del aceite esencial de orégano (Oreganum vulgare L.) como agente antimicrobiano en la conservación de la carne de dos especies de tilapia: negra (Oreochromis mossambicus) y roja (Oreochromis niloticus)*. Quevedo, Ecuador: Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

NTE INEN 0777:85. (1985). Carne y productos cárnicos. Determinación de la pérdida por calentamiento. Norma Técnica Ecuatoriana.
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/777.pdf>

NTE INEN 0786:85. (1985). Carne y productos cárnicos. Determinación de cenizas. Norma Técnica Ecuatoriana. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/786.pdf>

NTE INEN 1529-5. (2006). Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Norma Técnica Ecuatoriana.
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>.

NTE INEN 183. (2013). Requisitos para pescado fresco, refrigerado y congelado. *Determinación del pH*. Norma Técnica Ecuatoriana.
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/183.pdf>.

NTE INEN 381. (1985). Determinación de acidez titulable en conservas vegetales y juegos de frutas. Norma Técnica Ecuatoriana.
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.pdf>.

- NTE INEN 389. (1985). Conservas vegetales. Determinación de ion hidrogeno (pH). Norma Técnica Ecuatoriana. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/389.pdf>.
- NTE INEN 778. (1985). Determinación de la grasa total. Carnes y productos cárnicos. Norma Técnica Ecuatoriana. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/778.pdf>.
- NTE INEN 781. (1985). Determinación de Nitrógeno. Norma Técnica Ecuatoriana. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/781.pdf>.
- 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.
- Parra, R. (2010). Bacterias acido lacticas: papel funcional en los alimentos (Review). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.
- Perea, A., Gómez, E., Mayorga, Y., & Triana, Y. (2015). Caracterizacion nutricional del pescado. http://alanrevista.org/ediciones/2008-1/caracterizacion_nutricional_pescados.asp.
- Perez, M. (2013). Meat Technology. Edith Ponce Alquicira. Metropolitan Autonomous University, Mexico.
- Ramirez, J., Rosas, P., Velasquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias Lacticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *ARAMARA*, ISSN: 2007-0713. URI: <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/436>.
- Rather, I. A., Seo, B. J., Kumar, V. J., Choi, U. H., Choi, K. H., Lim, J., & Park, Y. H. (2014). Biopreservative potential of *Lactobacillus plantarum* YML007 and efficacy as a

replacement for chemical preservatives in animal feed. *Food Science and Biotechnology*, 23(1), 195-200.

Rodríguez, D., Barrero, M., & Kodaira, M. (2009). Evaluación física y química de filetes de bagre (*Pseudoplatystoma* sp.) salados en salmuera empacados al vacío y almacenados en refrigeración. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(2), 206-213.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222009000200014&lng=es&tling=es.

Rushing, J. (2010). *Formulating Dressings, Sauces and Marinades*. Obtenido de https://fbns.ncsu.edu//extension_program/documents/acidified_formulating_dressings.pdf

Russo, P., Valeria, M., Vernile, A., Amodio, M., Arena, M., Capozzi, V., Salvatore M., & Spano, G. (2014). Fresh-Cut Pineapple as a New Carrier of Probiotic Acid Lctic Bacteria. *BioMed Research International*, Pp 9. DOI: <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: Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Salazar, S., Uribe, E., Aguilar, C., & Klotz, B. (2011). Bioconservación de pescado fresco empacado al vacío mediante la utilización de extractos antimicrobianos de bacterias ácido lácticas. *Alimentos Hoy*, 20(24), 8-22.

Sánchez, D., Rodríguez, W., Castro, D., & Trujillo, E. (2019). Ciencia en Desarrollo. *Respuesta agronómica de mucilago de cacao (*Theobroma cacao* L.) en cultivo de maíz (*Zea mays* L.)*, 10(2), 43-58. <https://doi.org/10.19053/01217488.v10.n2.2019.7958>.

- Silva, A., Rocha, P., Fonseca, F., Costa, C., dos Santos, J., & Carvalho, N. (2017). Alterações microbianas dos produtos de pescados curados. *Revisão PUBVET*, 11, 646 -743.
- Suárez, H., Pardo, S., & Cortés, M. (2008). Calidad físico-química y atributos sensoriales de filetes de sajados biopreservados de cachama, empacados al vacío bajo refrigeración. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 330-339.
- Sulistiani, & Handayani, R. (2018). AIP Conference Proceedings [Author(s) INVENTING PROSPEROUS FUTURE THROUGH BIOLOGICAL RESEARCH AND TROPICAL BIODIVERSITY MANAGEMENT: Proceedings of the 5th International Conference on Biological Science - Yogyakarta, Indonesia (2017)]. *Application biopreservatives produced by lactic acid bacteria (LAB) for preservation boiled-salted (pindang) tuna (Euthynnus affinis Cantor, 1849)*, doi:10.1063/1.5050156.
- Talledo, V., Chavarría, L., Zambrano, S., & Cuenca, G. (2020). Effect of the use of lactic acid bacteria on the inhibition of microbiological deterioration of red tilapia fillets (*Oreochromis sp.*). *JOURNAL OF SCIENCE AND RESEARCH*, Vol. 5, Núm. E-ISSN: 2528-8083. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4434700>.
- Torres, A., Ocampo, D., Rodríguez, W., Velasco, R., Chang, F., & Cedeño, C. (2016). Utilización del mucílago de cacao, tipo nacional y trinitario, en la obtención de jalea. *Revista ESPAMCIENCIA*, 7(1), 51-58. ISSN 1390-8103.
- 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>.

- Valls, J. (2007). Métodos Físicos y Químicos para la Evaluación de la Calidad y Frescura de los Recursos y Productos Marinos. *Sección Tecnología de Productos Pesqueros*, https://www.researchgate.net/publication/307634229_Metodos_Fisicos_y_Quimicos_para_la_Evaluacion_de_la_Calidad_y_Frescura_de_los_Recursos_y_Productos_Marinos.
- Vásquez, S., Suárez, H., & Zapata, S. (2009). UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>.
- 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)1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>.
- Wang, M., & Lu, M. (2016). Tilapia polyculture: a global review. *Aquaculture research*, 47(8), 2363-2374.
- Yugcha, V. & Largo, S. (2016). *Elaboración de Néctar Natural de Cacao a Partir del Mucílago*. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica Del Litoral.