



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS “ESPE” DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA

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

"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (Mucílago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*)"

Autores: Cueva Tipán, Jairo Roberto

Tutor: Sanchez Llaguno, Sungey Naynee , PhD.



INTRODUCCIÓN



- En el país, los primeros ejemplares de café aparecen en 1830, en la provincia de Manabí.
- Producción de impacto destacable en los ámbitos: ambiental, social, económico, institucional y salud humana.
- Ecuador posee una gran producción cafetera debido a sus diferentes ecosistemas presentes y su ubicación geográfica favorable



*Coffea
canephora*

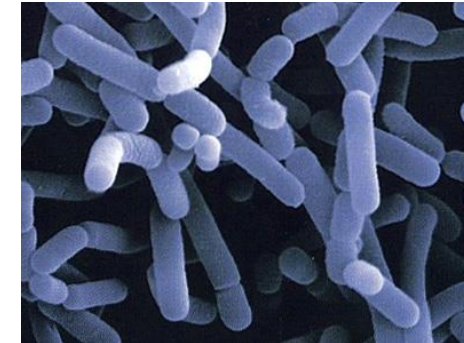


*Coffea
arabica*



A partir de mucílago de café se obtiene bacterias ácidas lácticas.

Bacterias ácido lácticas (BAL)



Alargan la vida de productos

Inhiben algunos patógenos

Propiedades organolépticas



OBJETIVOS

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas en dos variedades de café (Mucílago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*, para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*).

Objetivos específicos



Aislar bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación dos variedades de café (Mucílago), *Coffea arábica* y *Coffea canephora*.



Evaluar el efecto de la aplicación de las bacterias ácido lácticas para la bioconservación de col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*).



Determinar mediante análisis fisicoquímicos y microbiológicos la influencia del bioconservante en las características de la col (*Brassica oleracea*) y lechuga (*Lactuca sativa*).



Hipótesis

Factor A (Hortalizas)

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

Factor B (Concentración de solución bacteriana)

- **Ho:** La aplicación de distintas concentraciones de solución bacteriana no incluye en la bioconservación de hortalizas.
- **Ha:** La aplicación de distintas concentraciones de solución bacteriana incluyen en la bioconservación de hortalizas



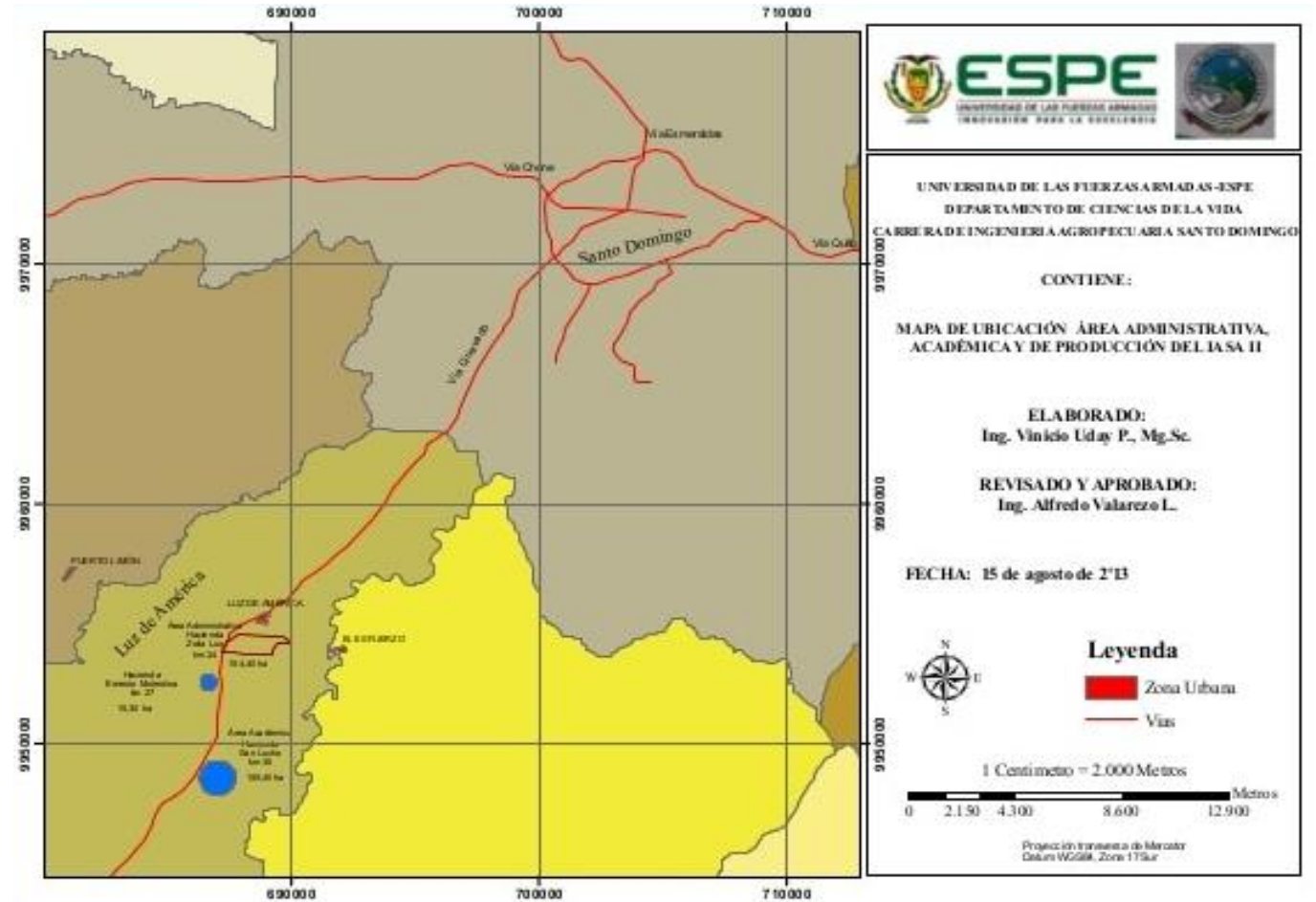
Metodología

Ubicación Política

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

Ubicación Ecológica

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



Diseño Experimental

- Factores y niveles del experimento

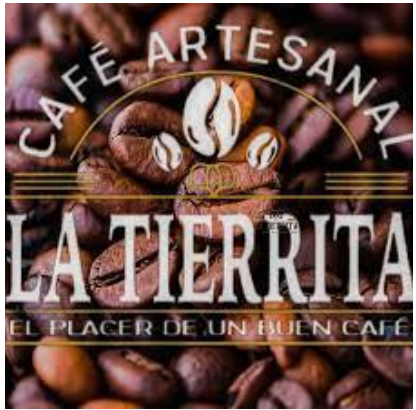
N°	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a_0b_0	O. mossambicus con 10% + BAL
T2	a_0b_1	O. mossambicus con 15% + BAL
T3	a_0b_2	O. mossambicus con 20% + BAL
T4	a_1b_0	O. niloticus con 10% + BAL
T5	a_1b_1	O. niloticus con 15% + BAL
T6	a_1b_2	O. niloticus con 20% + BAL

Factores	Simbología	Niveles
Hortalizas (A)	a_0 a_1	Lechuga Col
Concentración de solución bacteriana (B)	b_0 b_1	1% 2%



Metodología

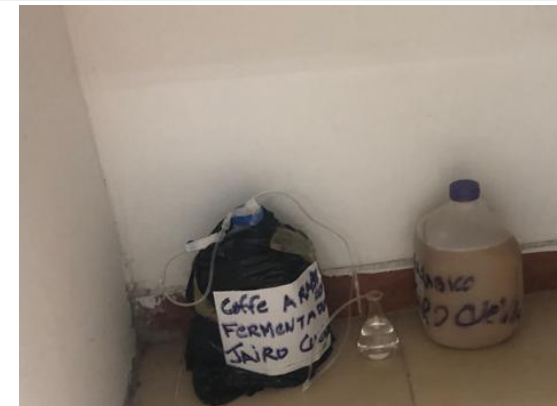
Obtención de materia prima



Extracción del mucilago de café



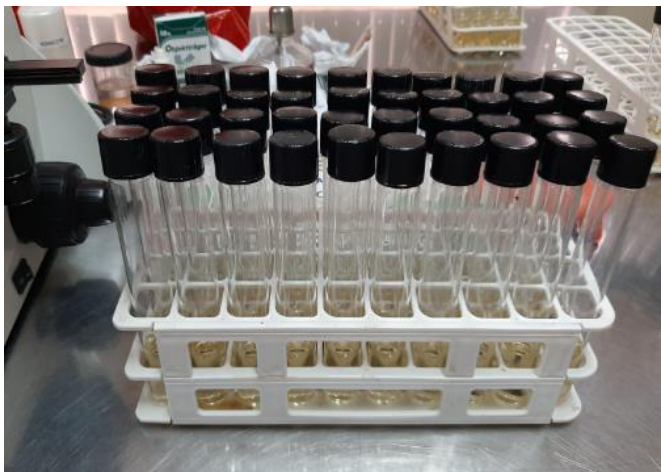
Fermentación del mucilago (72h)



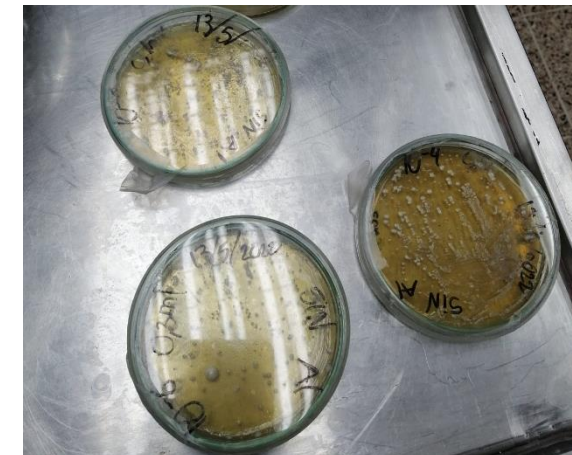
Metodología

Siembra y Aislamiento de las bacterias ácido lácticas

Diluciones seriadas (10-6) (agua peptona)



Siembra de las muestras



Preparación de los medios de cultivos Agar MRS



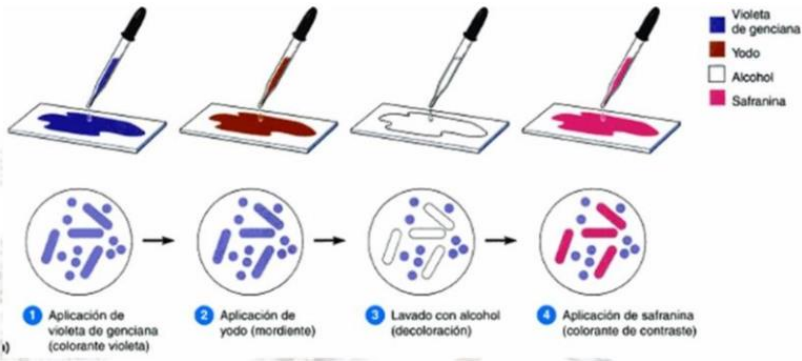
Aislamiento de las BAL



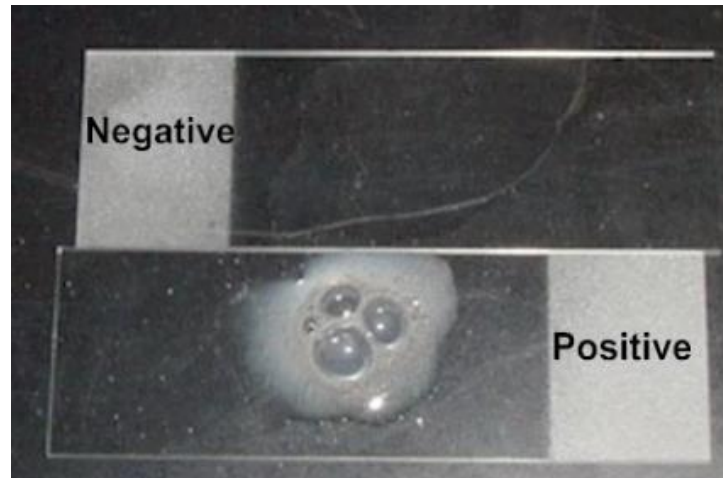
Metodología

Identificación microbiana

- Tinción Gram



- Prueba de catalasa



- Secuenciación
Análisis filogenético



Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) finds regions of similarity between biological sequences. It compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance.

Web BLAST



Molecular Evolutionary Genetics Analysis

File Analysis Help

ALIGN DATA MODELS DISTANCE DIVERSITY PHYLOGENY USER TREE ANCESTORS SELECTION RATES CLOCKS DIAGNOSE

MX: Tree Explorer: (Drosophila_Adh.meg)

File Search Image Subtree View Compute Caption Help

D. affinisjuncta
D. heteroneura
D. adiaistola
D. mimica

TraceEditor (C:\Users\gstecher\mydata\Documents\MEGA X\Examples\ABI01.abi)

Data Edit Search Display Help

10 20 30 40
AATAAACTCGACAAATGATTTTTCAA CAAATCATAA

SBL = 0.86146990

HELP DOCS EXAMPLES CITATION REPORT BUG UPDATES MEGA LINKS TOOLBAR PREFERENCES

ANALYZE PROTOTYPE

Metodología

Bioconservación de las hortalizas

Solución bacteriana



Preparación de la muestra



Metodología

Variables a medir

pH



Sólidos solubles
(°Brix)



Acidez titulable
(%)



Pérdida de peso

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

Conteo bacteriano
(UFC/mL)

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

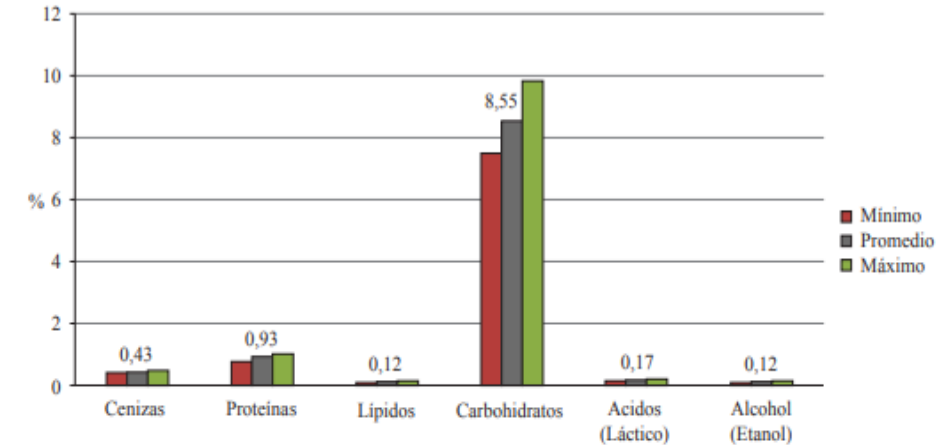
Análisis sensorial



Resultados y discusión

Caracterización fisicoquímica del mucilago de palmito sin fermentar y fermentado

Parámetro analizado	Unidad	Sin fermentar		Fermentado	
		Arábica	Robusta	Arábica	Robusta
pH		5,4	5,2	3,75	4,01
Acidez titulable	%	0,88	0,55	1,90	1,83
Sólidos solubles	°Bx	14	12	6	7
Bacterias	UFC/mL	-	-	$6,1 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
Hongos y levaduras	UFC/mL	-	-	$7,8 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$



Disminución de pH y aumento de acidez	Avallone et al., (2006)	Los polisacáridos presentes en el mucílago del café son descompuestos por la acidez del medio y no por enzimas, esto se puede deber a la producción de ácido láctico, ácido acético, etanol y otros compuestos
Reducción de SS	Puerta-Quintero & Ríos-Arias (2011)	Los carbohidratos se encuentran en el mucílago de café en porcentajes entre el 7,50% a 9,82% del peso fresco del mucílago.

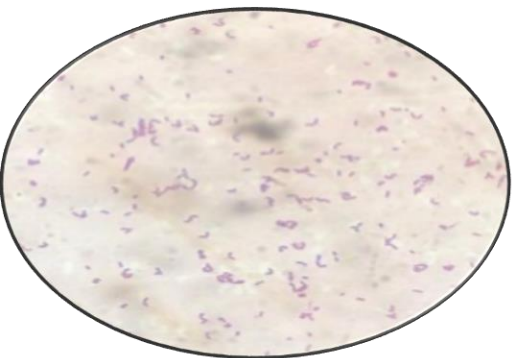


Resultados y discusión

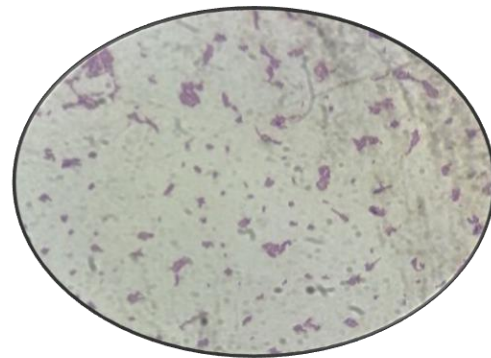
Identificación de las bacterias ácido lácticas

Pruebas microbiológicas

- ➔ Gram positivo
- ➔ Bacilos
- ➔ Catalasa negativa

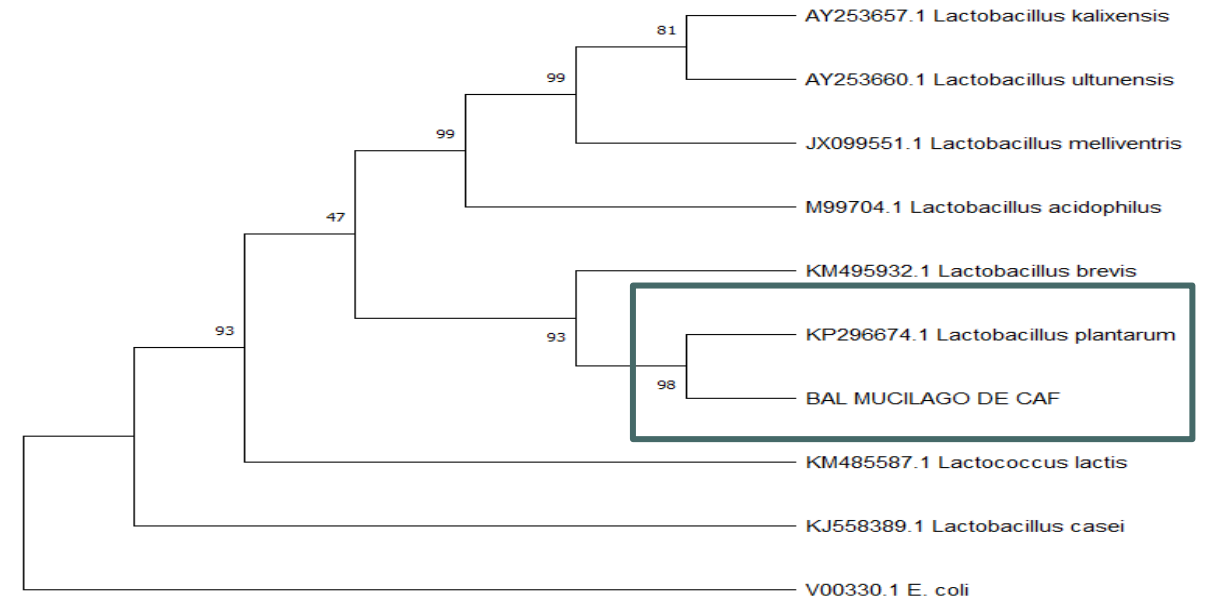


Variedad robusta



Variedad arábica

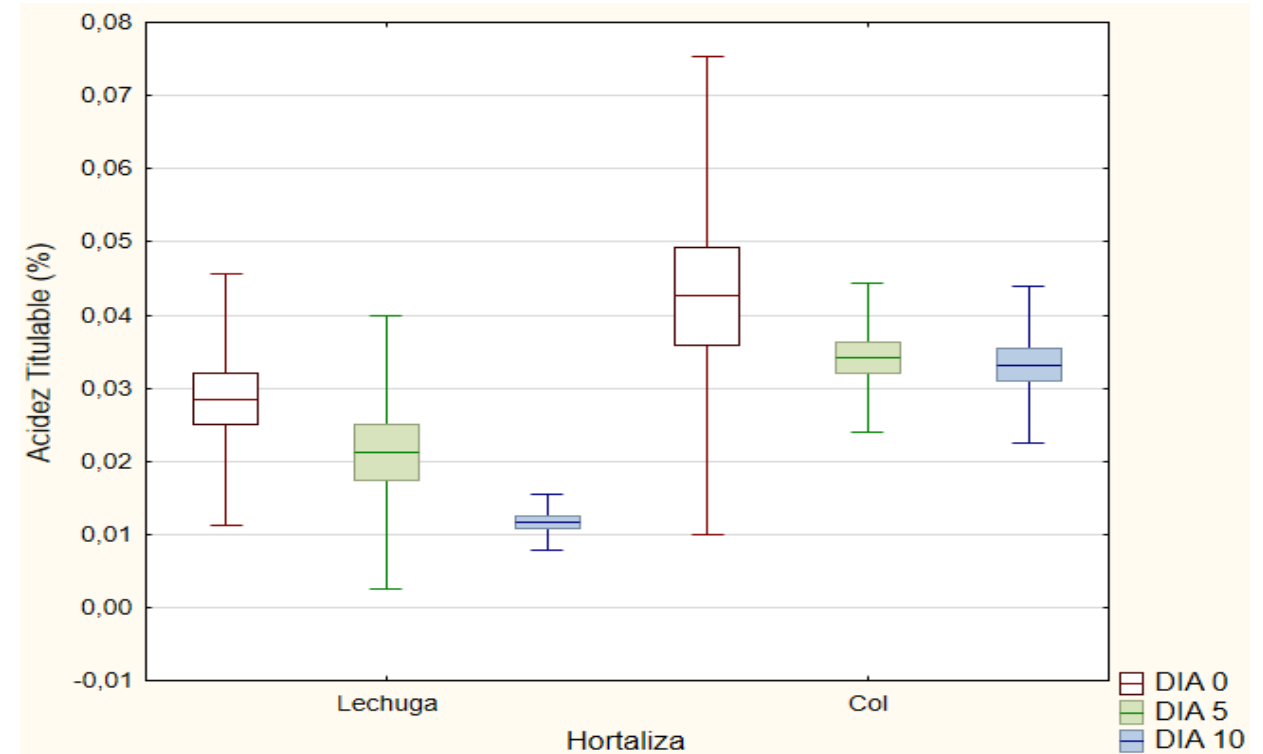
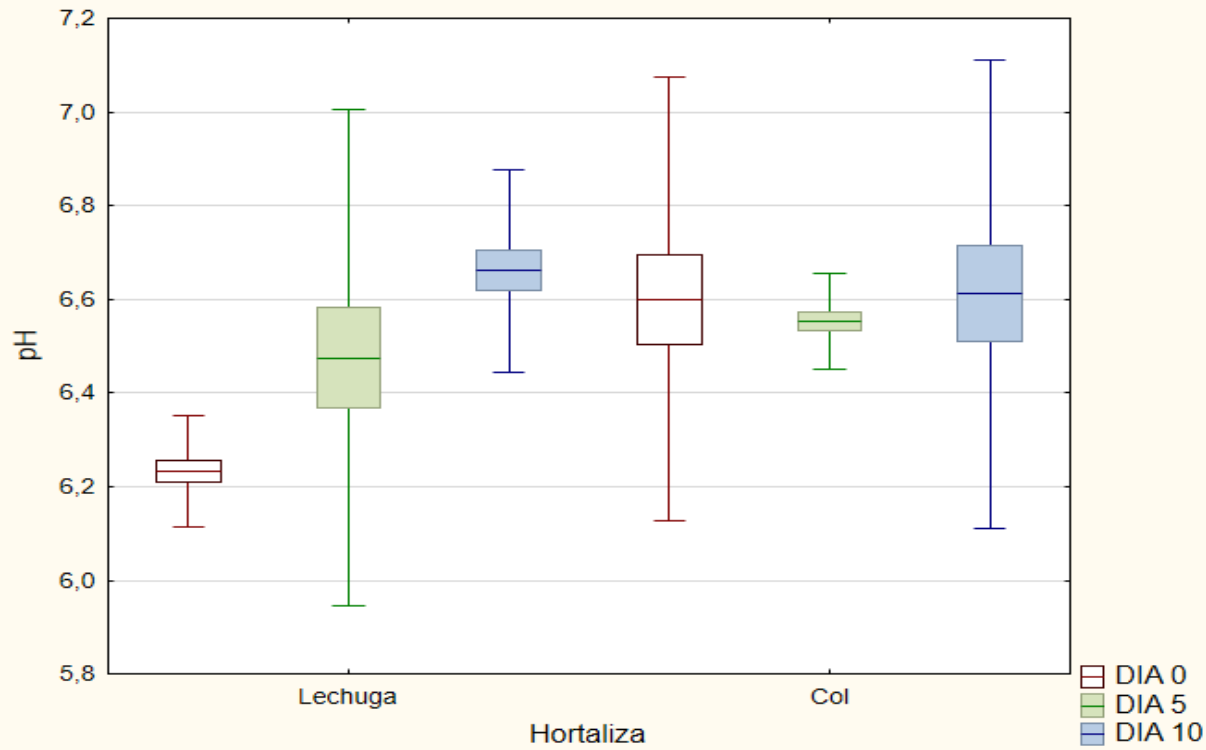
Árbol filogenético de secuencias 16S ARNr de las BAL



Al analizar los resultados de la secuenciación, realizar un BLAST y armar un árbol filogenético se pudo determinar que la bacteria ácido láctica presente en el mucílago de café fue *Lactobacillus plantarum*.

Resultados y discusión

FACTOR A (Hortaliza)



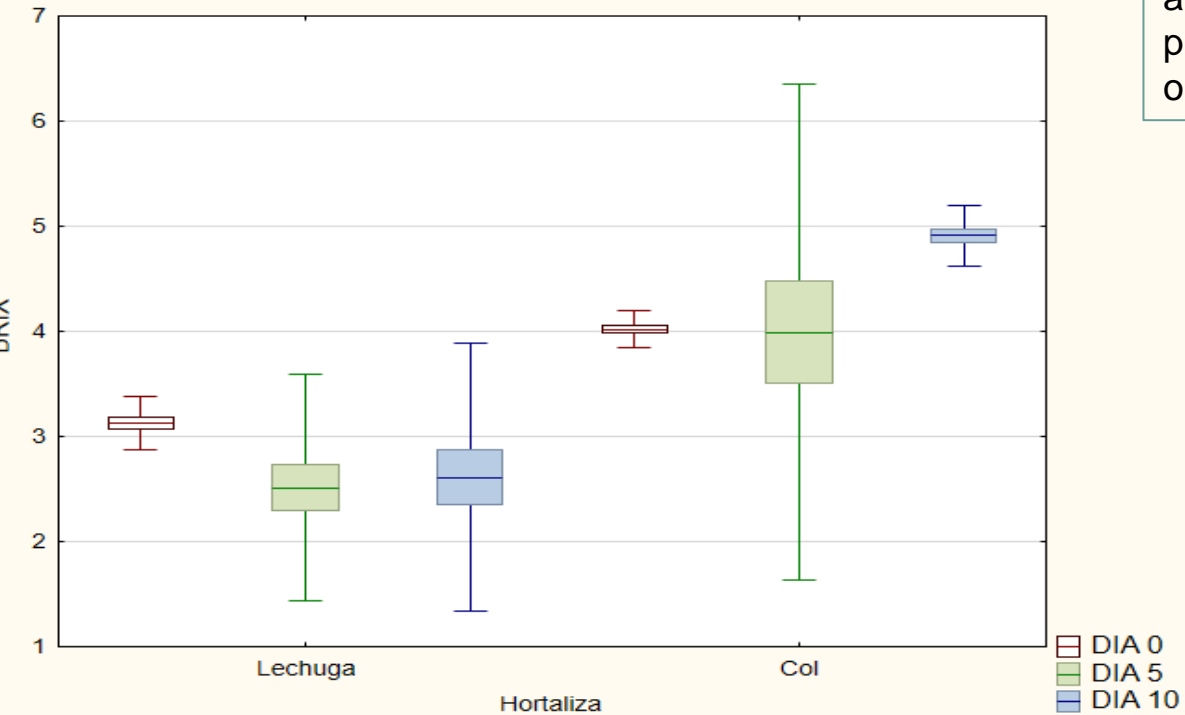
El aumento del pH en la lechuga en los días 0, 5 y 10, es posible por el consumo de los ácidos en el proceso respiratorio de la hortaliza (Galvis Vanegas et al., 2010).

Tumbariski et al, (2019), menciona que los ácidos pueden ser consumidos en el proceso respiratorio vegetal, por ende, pueden bajar esta variable con el tiempo

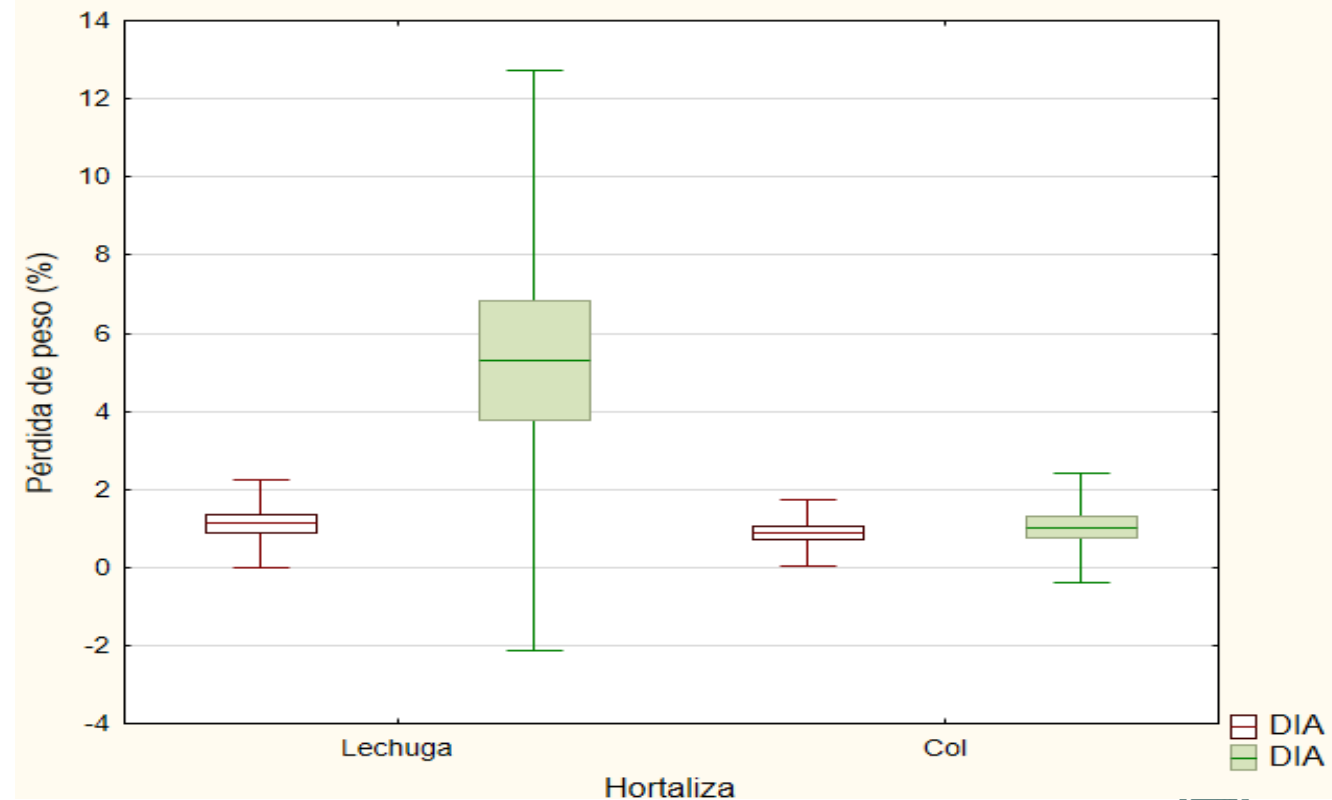


Resultados y discusión

FACTOR A (Hortaliza)



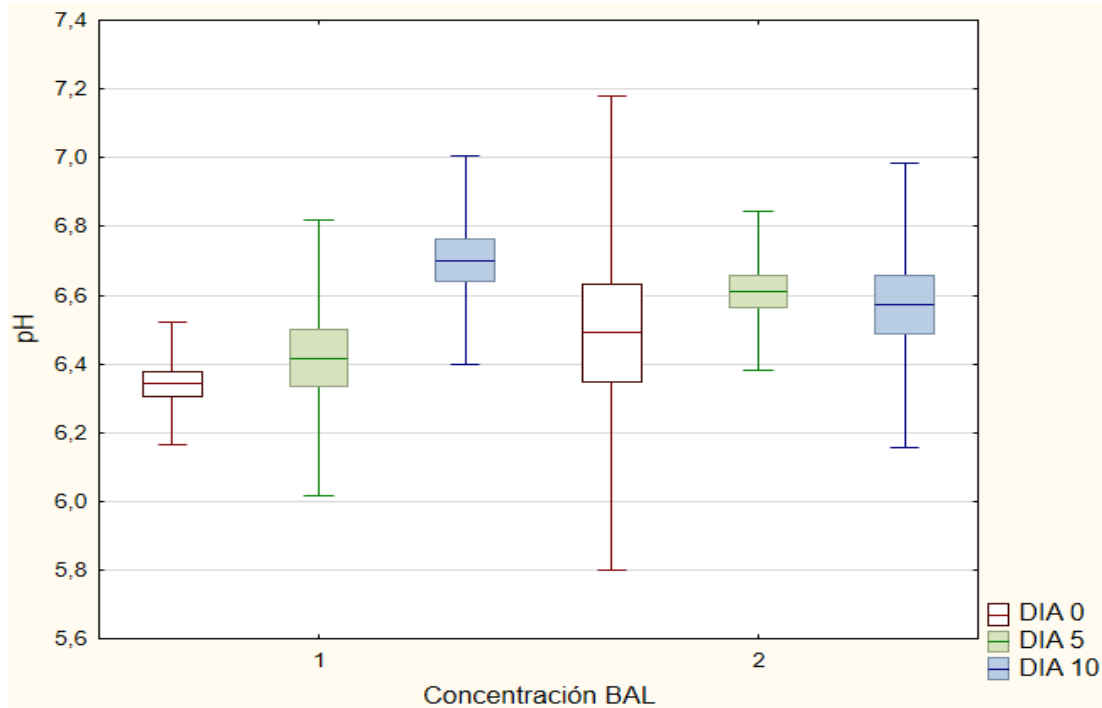
Sosa et al., (2022) mencionan que el comportamiento mencionado se debe a que las bacterias ácidos lácticas utilizan los hidratos de carbono que se presentan en el tejido de las hortalizas y lo transforma en compuestos orgánicos, disminuyendo los sólidos solubles



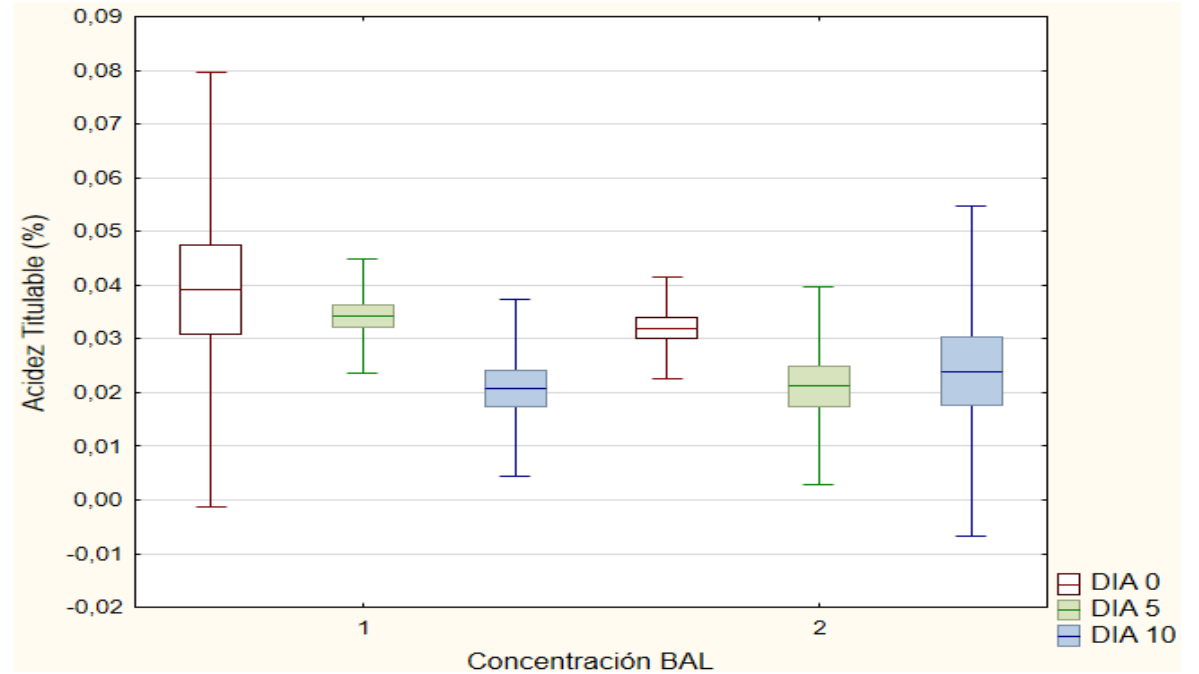
Rodríguez et al., (2018) describe que las lechugas tratadas con ácido láctico pueden afectar a sus tejidos, por lo que, puede que exista un relación entre la producción de ácido láctico por parte de las BAL y exista un deterioro de los tejidos, disminuyendo así su porcentaje de peso

Resultados y discusión

FACTOR B (Concentración de solución bacteriana)



Trias et al, (2009) la disminución del pH es consecuencia de la producción de ácido láctico por parte de las bacterias BAL, al existir mayor cantidad de BAL en una solución puede existir una disminución de pH

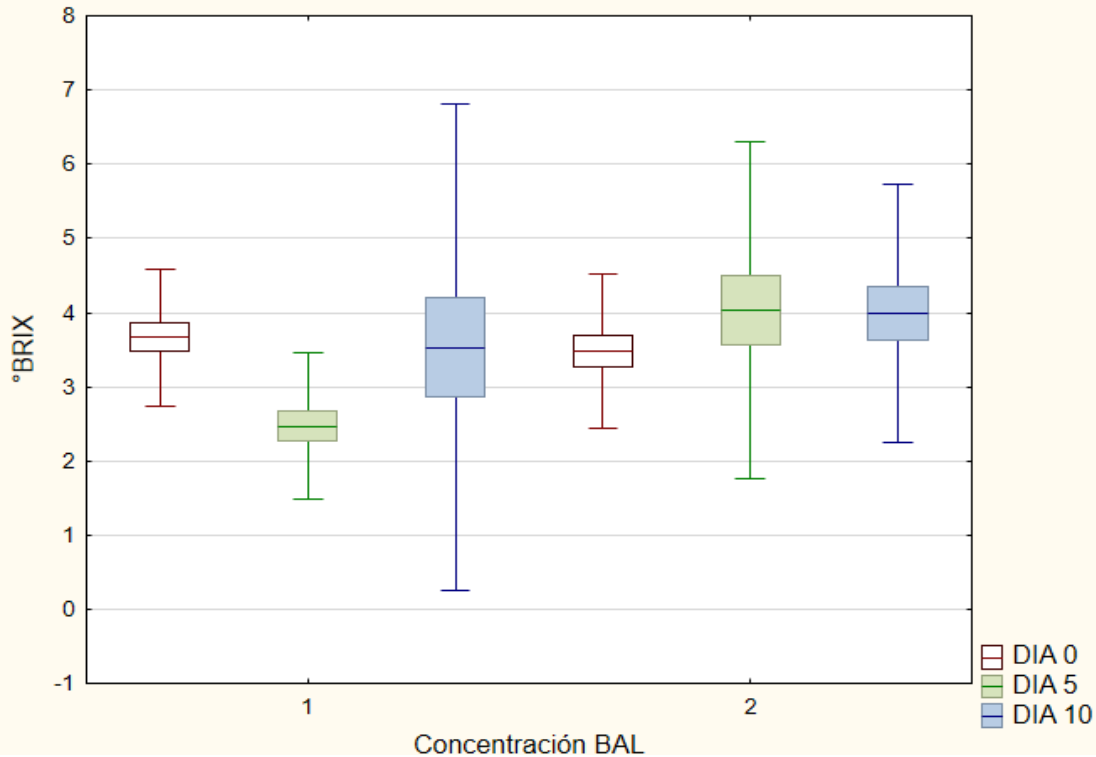


Höltzel et al. (2000) demostraron que una de las propiedades que utilizan las BAL para la bioconservación es la síntesis de compuestos orgánicos (ácido láctico), dióxido de carbono, etanol, entre otros.



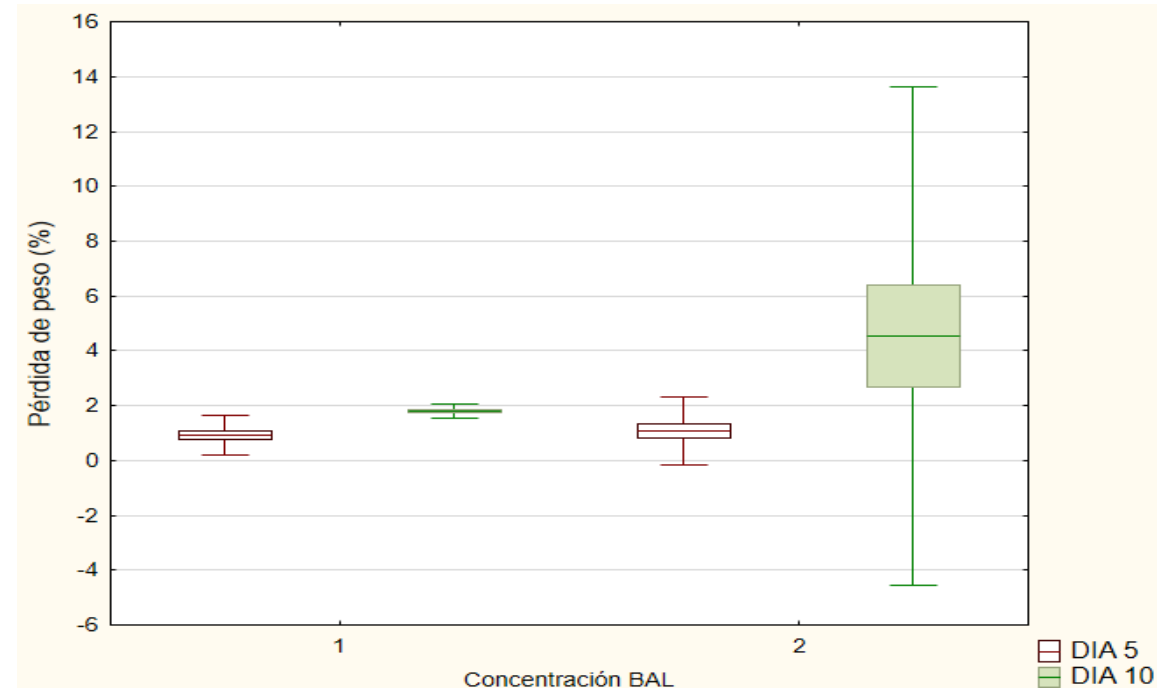
Resultados y discusión

FACTOR B (Concentración de solución bacteriana)



Mello et al, (2003) menciona que la lenta degradación de los polisacáridos puede afectar directamente al aumento de los grados Brix con el tiempo

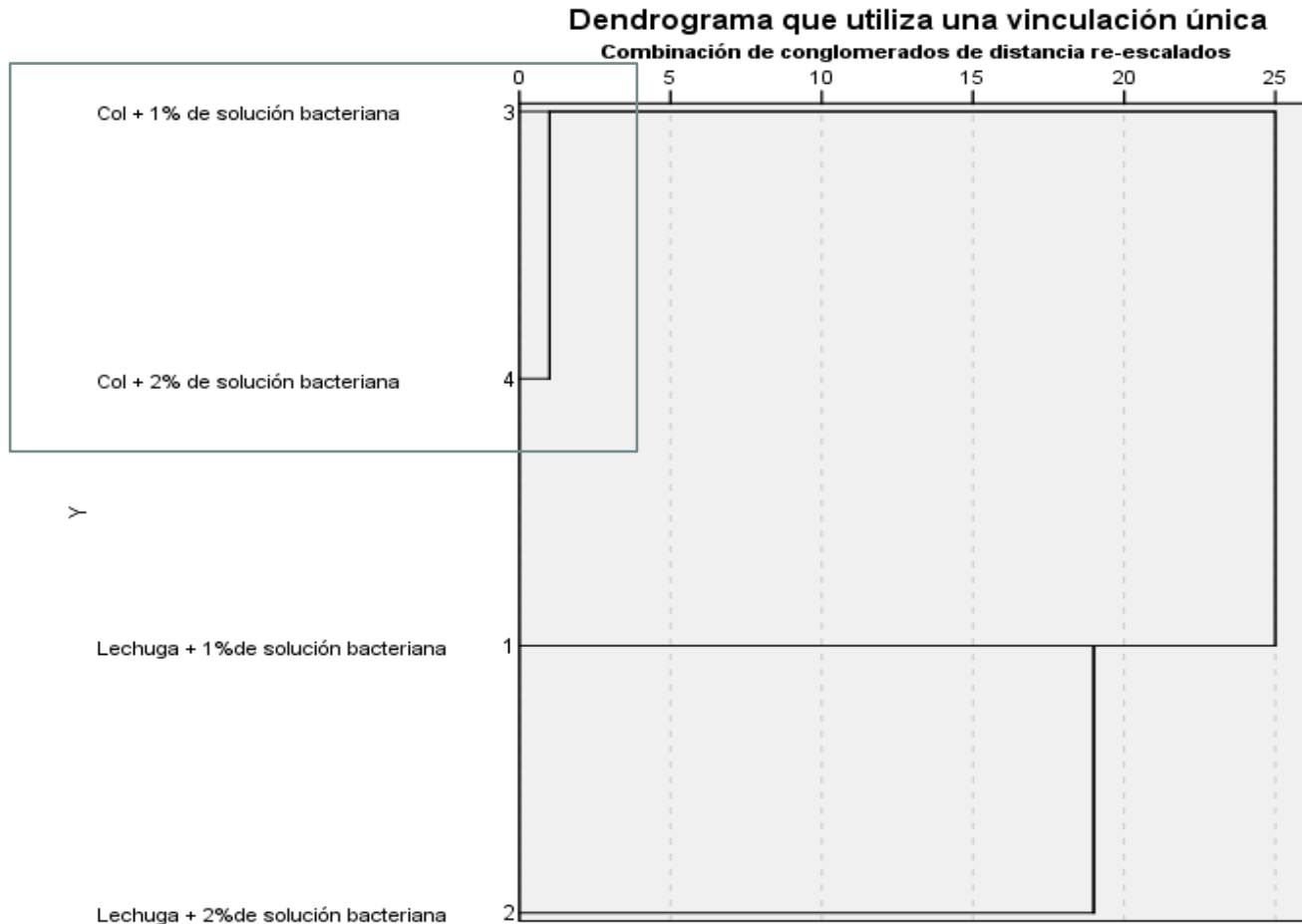
La pérdida de peso se puede dar por propiedades físicas en las verduras o por el daño que pueden causar en los tejidos las bacterias ácido lácticas al momento de sintetizar sus ácidos orgánicos (Sánchez-González et al., 2013)



DIA 5
DIA 10

Resultados y discusión

Interacción AxB (Hortaliza*Concentración de solución bacteriana)

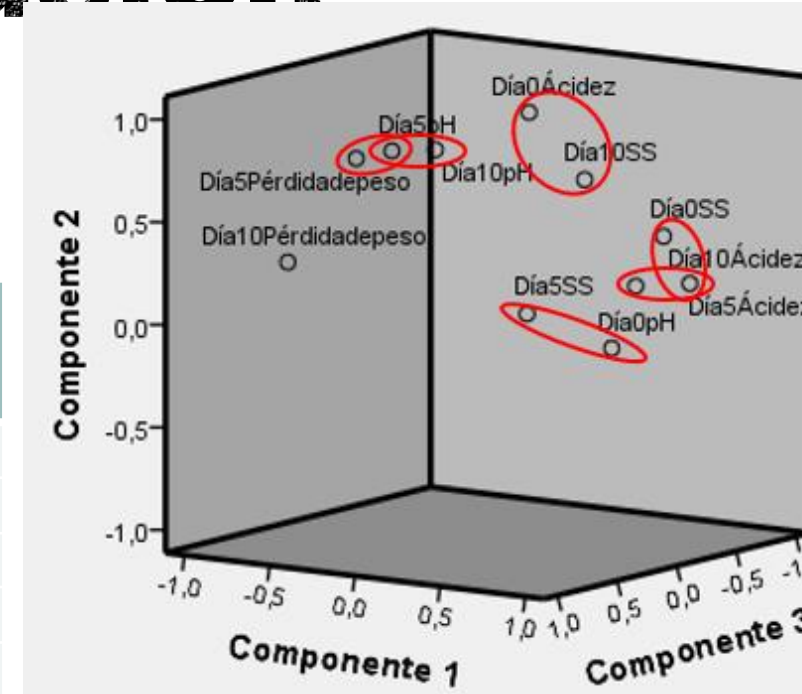


Se observó una relación entre los tratamientos col con 2% de solución bacteriana tiene una relación con el tratamiento de col con 1% de solución bacteriana, mientras que, el tratamiento de lechuga con 1% de solución bacteriana y lechuga con 2% de solución bacteriana se relacionaron y mostraron menos relación con los otros tratamientos.



Resultados y discusión

Interacción AxB (Hortaliza*Concentración de solución bacteriana)



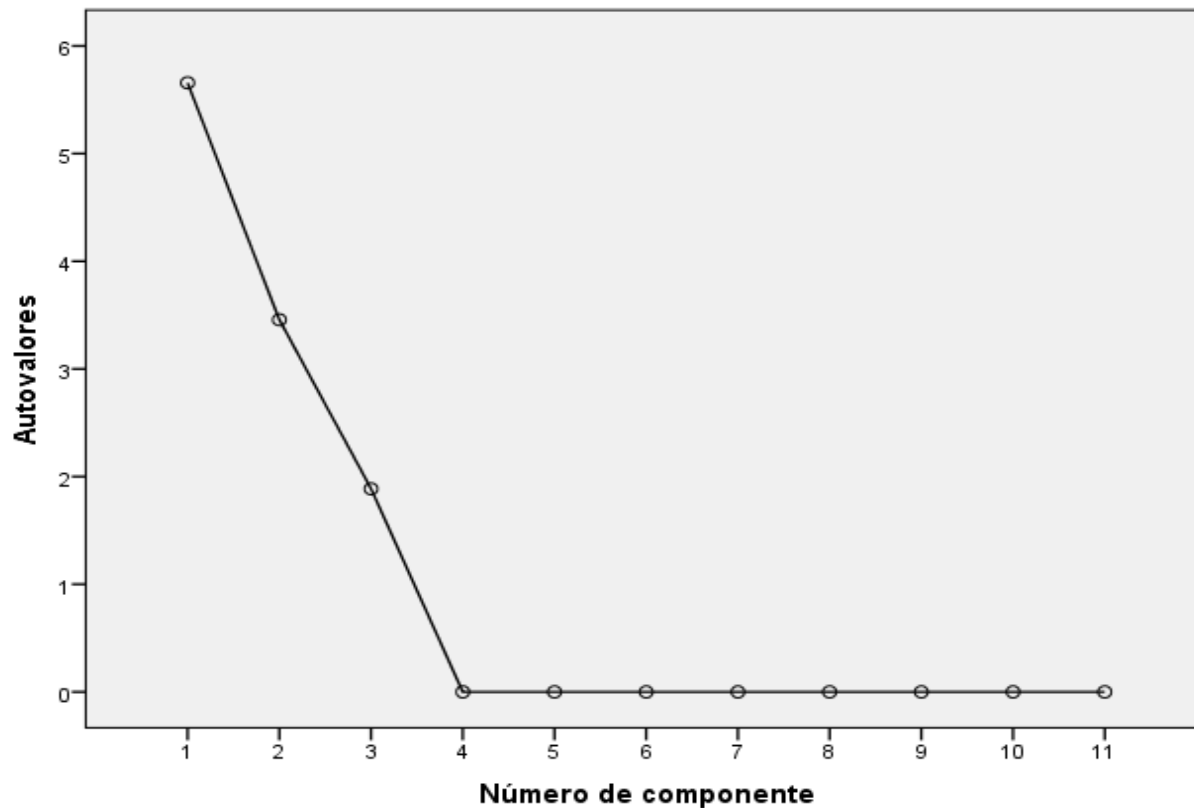
		pH (Día0)	pH (Día5)	pH (Día10)	SS (Día0)	SS (Día5)	SS (Día10)	Acidez (Día0)	Acidez (Día5)	Acidez (Día10)	Pérdida de peso (Día 5)	Pérdida de peso (Día 10)
Correlación	pH (Día0)	1,000	-0,76	-7,14	0,740	0,884	0,647	-0,137	0,419	0,944	-0,653	-0,713
	pH (Día5)	-0,076	1,000	0,508	0,063	0,322	0,544	0,619	-0,401	0,065	0,797	0,587
	pH (Día10)	-0,714	0,508	1,000	-0,123	-0,591	0,063	0,790	-0,026	-0,451	0,863	0,510
	SS (Día0)	0,740	0,063	-0,123	1,000	0,532	0,866	0,488	0,815	0,914	-0,326	-0,765
	SS (Día5)	0,884	0,322	-0,591	0,523	1,000	0,681	-0,083	0,014	0,811	-0,312	-0,303
	SS (Día10)	0,647	0,544	0,063	0,866	0,681	1,000	0,647	0,447	0,836	0,072	-0,361
	Acidez (Día0)	-0,137	0,619	0,790	0,488	-0,83	0,647	1,000	0,364	0,190	0,628	0,069
	Acidez (Día5)	0,419	-0,401	-0,026	0,815	0,014	0,447	0,364	1,000	0,594	-0,466	-0,873
	Acidez (Día10)	0,994	0,065	-0,451	0,914	0,811	0,836	0,190	0,594	1,000	-0,483	-0,736
	Pérdida de peso (Día 5)	-0,653	0,797	0,863	-0,326	-0,312	0,072	0,628	-0,466	-0,483	1,000	0,820
	Pérdida de peso (Día 10)	-0,713	0,587	0,510	-0,765	-0,305	-0,361	0,069	-0,873	-0,736	0,820	1,000



Resultados y discusión

Interacción AxB (Hortaliza*Concentración de solución bacteriana)

Gráfico de sedimentación



1	pH (Día 0)	73,83%
2	pH (Día 5)	16,79%
3	pH (Día 10)	3,98%

La varianza total explicada determinó 3 componentes con porcentajes mayores a 1, los cuales son: pH día 0 (componente 1), pH día 5 (componente 2), pH día 10 (componente 3). Para el pH día 0 se obtuvo un porcentaje mayor (51,427%), en comparación a los días 5 y 10, los cuales fueron 31,424% y 17,149%, respectivamente. El cuadro de porcentaje de varianza total explicada muestra que los demás componentes no presentan porcentajes significativos (>1), por tal razón, no son destacables para su análisis dentro del estudio.



Resultados y discusión

Recuento bacteriano

Tratamiento	Día 5 (Dilución -3)	Día 10 (Dilución -3)
Lechuga con 1% de solución bacteriana	2,32E+05	3,40E+05
Lechuga con 2% de solución bacteriana	1,90E+05	3,70E+05
Col con 1% de solución bacteriana	3,74E+05	1,78E+05
Col con 2% de solución bacteriana	2,45E+05	2,15E+05

Tratamiento	Día 5 (Dilución -3)	Día 10 (Dilución -3)
Lechuga con 1% de solución bacteriana	9,00E+03	0
Lechuga con 2% de solución bacteriana	1,50E+04	1,20E+04
Col con 1% de solución bacteriana	7,00E+03	0
Col con 2% de solución bacteriana	0	0



Resultados y discusión

Análisis sensorial

Atributo	Tratamiento	Día 10
Textura	Lechuga + Solución bacteriana al 1%	3,01 ^B
	Lechuga + Solución bacteriana al 2%	2,51 ^A
	Col + Solución bacteriana al 1%	3,44 ^C
	Col + Solución bacteriana al 2%	3,5 ^D
Color	Lechuga + Solución bacteriana al 1%	2,82 ^A
	Lechuga + Solución bacteriana al 2%	2,80 ^A
	Col + Solución bacteriana al 1%	3,72 ^B
	Col + Solución bacteriana al 2%	3,75 ^B
Aroma	Lechuga + Solución bacteriana al 1%	3,11 ^B
	Lechuga + Solución bacteriana al 2%	2,86 ^A
	Col + Solución bacteriana al 1%	3,52 ^C
	Col + Solución bacteriana al 2%	3,54 ^C



Conclusiones

Factor A (Hortalizas)

- En cuanto a las hortalizas conservadas con diferentes concentración de solución BAL se concluye que la Col presentó una disminución del pH hasta el día 5, mientras que, la lechuga aumentó sus valores en el transcurso del tiempo.
- En la variable pérdida de peso, la lechuga presentó mayor porcentaje de pérdida de peso en comparación a la col. Por tal razón, analizando la variables donde se encontró diferencia significativa

Factor B (Concentración de solución bacteriana)

- Analizando los resultados de las pruebas físico químicas, se concluye que existió diferencia significativa entre las dos concentraciones de solución bacteriana utilizada durante el estudio. El pH con la concentración bacteriana al 2% presentó una disminución del pH en el día 10 del estudio. En los sólidos solubles la concentración bacteriana al 1% presentó una disminución al día 5, mientras que, el porcentaje de acidez aumentó con la concentración al 2% en el día 5.
- Para el análisis microbiológico, se concluye que el tratamiento que utilizo solución bacteriana al 1% no presentó mohos y levaduras para el día 10.

Interacción A*B de (Hortalizas* solución bacteriana)

- Analizando los resultados, se concluye que los tratamiento de col con solución bacteriana al 2% y lechuga con solución bacteriana al 1% presentaron una disminución en sus valores de pH en el transcurso del tiempo.
- Para los sólidos solubles los mejores resultados los presentó el tratamiento de lechuga con solución bacteriana al 1% y col con solución bacteriana al 1%, con una disminución de sus sólidos solubles.
- Por otra parte, los tratamientos col con 2% de solución bacteriana, col con 1% de solución bacteriana, presentaron menor cantidad de aerobios en el día 10, mientras que, para mohos y levaduras los tratamientos, lechuga con 1% de solución bacteriana, col con 1% de solución bacteriana y col con 2% de solución bacteriana no presentaron colonias en el día 10.



Recomendaciones

Una vez aislado e identificado *Lactiplantibacillus plantarum* en el mucílago de café se recomienda realizar un análisis de flora microbiana que existe en el mucílago de café con la finalidad de encontrar otro tipo de bacteria u organismo.

Asimismo, realizar un estudio sobre la inhibición de *L. plantarum* frente a bacterias y hongos patógenos. Además, seguir recopilando información sobre las bacterias fermentadoras que puedan existir en frutas, verduras y carnes, esto para poder utilizar las BAL para la elaboración de bioproductos de gran impacto y poder beneficiar a los consumidores.

Con respecto a la hortalizas, mediante los resultados obtenidos en las variables físico-químicas y bacterianas, como pH, acidez, pérdida de peso y conteo bacteriano, se recomienda utilizar la solución bacteriana en la lechuga hasta el día 5 de conservación, mientras que, para la col se recomienda utilizar la solución bacteriana hasta el día 10.

En cuanto a las diferentes concentraciones de solución bacteriana, se recomienda utilizar la concentración al 1% de solución bacteriana, ya que esta permite una menor pérdida de peso y permite una mayor conservación de las propiedades de las hortalizas. Para el inhibición de mohos y levaduras se recomienda utilizar el tratamiento de lechuga con solución al 1% y col con solución bacteriana al 1% y 2% ya que hubo una disminución de colonias al día 10.

