



Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de la fermentación discontinua de quinua blanca y roja (*Chenopodium quinoa*) para la bioconservación de brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*)

Muñoz Guzmán, Jean Pierre

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

24 de agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



MUÑOZ_JEAN PIERRE_1Aislamiento y caracterización de B...

Scanned on: 18:20 August 19, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Test

Identical Words	235
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	630
Omitted Words	4300

Firma:



Escaneo autorizado en:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLACTRO

Sánchez Laguno Sungey Naynee PhD.

C.C.: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: "Alisamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de la fermentación discontinua de quinua blanca y roja (*Chenopodium quinoa*) para la bioconservación de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*)" fue realizado por el señor Muñoz Guzmán Jean Pierre; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2022

Firma:



Sánchez Llaguno Sungay Naynee PhD.

C.C.: 1205348573



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Muñoz Guzmán Jean Pierre** con cédula de ciudadanía n° 1751202795, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de la fermentación discontinua de quinua blanca y roja (*Chenopodium quinoa*) para la bioconservación de brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*)** es de mi auditoria 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, 24 de agosto del 2022

Firma:

Muñoz Guzmán Jean Pierre

C.C.: 1751202795



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Muñoz Guzmán Jean Pierre**, con cédula de ciudadanía n° 1751202795, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas de la fermentación discontinua de quínoa blanca y roja (*Chenopodium quinoa*) para la bioconservación de brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*) en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.**

Santo Domingo de los Tsáchilas, 24 de agosto del 2022

Firma:

Muñoz Guzmán Jean Pierre

C.C.: 1751202795

Dedicatoria

Dedico este trabajo, principalmente a Dios, por ser un pilar fundamental en mi vida, además por darme la fortaleza necesaria para afrontar cada problema.

A mi madre Margarita Guzmán y a mi padre Jorge Muñoz, por su amor, dedicación y apoyo incondicional en mi formación académica.

A mis hermanos Paúl, Jorge y Margarita, por creer en mí y brindarme su compañía que me permitió aprender muchas cosas de cada uno de ustedes.

A mi cuñada y sobrinas por darle un toque de alegría a mi vida.

Gracias por todo, estoy infinitamente agradecido con cada uno de ustedes.

Jean Pierre

Agradecimiento

A Dios, por brindarme la capacidad y ayuda incondicional para alcanzar una meta más en mi formación académica.

A mi familia, especialmente a mi madre y padre por su arduo sacrificio y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, así también por cada consejo y palabras de alientos que supieron compartir conmigo.

A mis hermanos, cuñada y sobrinas, por darle alegría a mi vida y permitirme compartir con ustedes momentos maravillosos.

A mi tutora, la Dra. Sungey Sánchez y el Dr. Juan Neira, por compartir sus conocimientos para realizar de forma adecuada el presente proyecto de investigación.

A mis amigos, especialmente a María Paula B, por brindarme su amistad, así como sus conocimientos que aportaron en mi trayectoria universitaria.

Así también a cada persona que aportó en mi crecimiento personal y profesional.

Muchas gracias a todos por formar parte de mi vida y permitirme aprender de cada uno de ustedes.

Jean Pierre

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	19
Abstract.....	20
Capítulo I.....	21
Introducción.....	21
Objetivos.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
Hipótesis	24
Hipótesis del Factor A (Hortalizas)	24
Hipótesis para el Factor B (Concentraciones de BAL).....	24
Capitulo II.....	25
Revisión de Literatura	25

La quinua.....	25
Generalidades	25
Taxonomía	25
Variedades	26
Producción de quinua	26
Composición de las semillas de quinua	27
Germinación de semillas de quinua	28
Fermentación de semillas	29
Formulación de productos a base de quinua	29
Bacterias ácido lácticas	30
Generalidades	30
Taxonomía y Características.....	31
Actividad antimicrobiana	32
Identificación molecular.....	32
Efecto bioconservante de BAL en alimentos.....	33
Brócoli.....	34
Generalidades	34
Clasificación Taxonómica	34
Manejo Poscosecha del Brócoli.....	35
Calabacín.....	35

	10
Generalidades	35
Clasificación Taxonómica	36
Manejo poscosecha del calabacín	36
Bioconservación	37
Capitulo III.....	38
Materiales y Métodos	38
Ubicación del área de Investigación	38
Ubicación política.....	38
Ubicación Ecológica.....	38
Ubicación Geográfica	38
Materiales	40
Determinación de pH	40
Determinación de la acidez titulable.....	40
Determinación de sólidos solubles.....	41
Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas	41
Enriquecimiento selectivo de bacterias ácido lácticas	42
Bioconservación de las hortalizas	42
Recuento de poblaciones microbianas.....	43
Determinación de la pérdida de peso	43
Métodos.....	44

Obtención de la materia prima	44
Fermentación de quinua	44
Pesado.	45
Remojo.....	45
Germinación.....	45
Secado.....	45
Molienda.....	45
Cocción.	45
Fermentación.....	46
Siembras y Aislamiento de bacterias ácido lácticas	46
Identificación microbiana.....	46
Tinción Gram.....	46
Prueba de catalasa.....	47
Secuenciación y análisis filogenético.	47
Bioconservación de hortalizas.....	47
Solución bacteriana.....	47
Preparación de la muestra.	48
Análisis sensorial	48
Diseño Experimental	49
Factores del experimento	49
Tratamientos a comparar.....	49
Tipo de diseño.....	50
Repeticiones.....	50
Análisis Estadístico	50
Análisis funcional	50

	12
VARIABLES EVALUADAS	51
Determinación de pH	51
Determinación de la acidez	51
Determinación de sólidos solubles	52
Determinación de Pérdida de Peso	52
Recuento de poblaciones microbianas	52
Capítulo IV	54
Resultados	54
Comportamiento físico-químico de los mostos de quinua	54
Variable pH	54
Variable sólidos solubles	55
Variable acidez titulable	56
Identificación de BAL aisladas del mosto fermentado de quinua	59
Análisis de varianza	61
Análisis de varianza para la variable pH	61
Análisis de varianza para la variable sólidos solubles	62
Análisis de varianza para la variable acidez titulable	64
Análisis de varianza para la pérdida de peso	66
Prueba de significación de Tukey para los factores de estudio	67
Resultados de estudio para las hortalizas (Factor A)	67

Resultados de estudio para las distintas concentraciones de bacterias ácido lácticas (Factor B).....	69
Prueba de Tukey para la interacción significativa en la bioconservación.....	72
Análisis de Tukey en la interacción A*B (Hortalizas + Concentración de BAL)	72
Parámetro microbiológico en las hortalizas	76
Recuento de bacterias aerobias	76
Análisis de conglomerados.....	78
Análisis de componentes principales	79
Análisis sensorial	82
Capítulo V.....	84
Discusión.....	84
Respecto a las hortalizas (Factor A)	85
Respecto a las diferentes concentraciones de bacterias ácido lácticas (Factor B)	86
Respecto a la interacción A*B (Hortalizas + Concentración de BAL)	87
Capítulo VI.....	90
Conclusiones.....	90
Factor A (Hortalizas).....	90
Factor B (Concentración de bacterias ácido lácticas)	90
Interacción A*B (Hortalizas + Concentración de BAL)	91
Recomendaciones.....	92
Capítulo VII.....	93

Bibliografía..... 93

Índice de Tablas

Tabla 1	Clasificación Taxonómica de la Quinua	26
Tabla 2	Producción de Quinua en Ecuador	27
Tabla 3	Análisis proximal de las semillas de quinua	28
Tabla 4	Taxonomía del Brócoli	34
Tabla 5	Taxonomía del Calabacín	36
Tabla 6	Recursos necesarios para la determinación de pH	40
Tabla 7	Recursos necesarios para la determinación de acidez titulable	40
Tabla 8	Recursos necesarios para la determinación de sólidos solubles	41
Tabla 9	Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en los fermentados de quinua	41
Tabla 10	Recursos necesarios para el enriquecimiento de BAL	42
Tabla 11	Recursos necesarios para la bioconservación de la solución probiótica	42
Tabla 12	Recursos necesarios para el recuento microbiano	43
Tabla 13	Recursos necesarios para determinar la pérdida de peso	43
Tabla 14	Factores y Niveles a probar en el estudio de la bioconservación de brócoli y calabacín con bacterias ácido lácticas provenientes de quinua	49
Tabla 15	Tratamientos a comparar en el estudio de la bioconservación de brócoli y calabacín con bacterias ácido lácticas provenientes de quinua	49
Tabla 16	Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de la bioconservación de brócoli y calabacín con bacterias ácido lácticas provenientes de quinua	50

Tabla 17	Análisis microbiológico de la fermentación de quinua	58
Tabla 18	Resultados microbiológicos de la identificación bacteriana	59
Tabla 19	Análisis de varianza para el pH en el día 0 de la bioconservación	61
Tabla 20	Análisis de varianza para el pH en el día 5 de bioconservación	61
Tabla 21	Análisis de varianza para el pH en el día 10 de la bioconservación	62
Tabla 22	Análisis de varianza para los sólidos solubles en el día 0 de la bioconservación	62
Tabla 23	Análisis de varianza para los sólidos solubles en el día 5 de la bioconservación	63
Tabla 24	Análisis de varianza para los sólidos solubles en el día 10 de la bioconservación	64
Tabla 25	Análisis de varianza para la acidez en el día 0 de la bioconservación	64
Tabla 26	Análisis de varianza de la acidez para el día 5 de la bioconservación	65
Tabla 27	Análisis de varianza de la acidez en el día 10 de la bioconservación	66
Tabla 28	Análisis de varianza de la pérdida de peso en el día 5 de la bioconservación	66
Tabla 29	Análisis de varianza de la pérdida de peso en el día 10 de la bioconservación	67
Tabla 30	Resultados de la prueba de Tukey para el Factor A de las variables físico-químicas .	67
Tabla 31	Resultados de la prueba de Tukey para el Factor B en las variables físico-químicas .	69
Tabla 32	Resultados de la prueba de Tukey para la interacción A*B en las variables físico-químicas.....	72
Tabla 33	Recuento de bacterias aerobias y mohos/levaduras durante la bioconservación en las hortalizas.....	76
Tabla 34	Matriz de correlación de componentes principales	79
Tabla 35	Matriz de componentes	79

Tabla 36	Porcentajes de varianza total explica	80
Tabla 37	Análisis sensorial de las hortalizas en el día 10 de la bioconservación	82

Índice de figuras

Figura 1	Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación	39
Figura 2	Diagrama de flujo de la fermentación de quinua	44
Figura 3	Cinética de fermentación de función del pH	54
Figura 4	Cinética de fermentación en función de los sólidos solubles	55
Figura 5	Cinética de fermentación en función de la acidez	56
Figura 6	Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16s ARNr de las BAL	59
Figura 7	Estudio del efecto de las hortalizas (Factor A) en las variables de estudio.....	68
Figura 8	Estudio del efecto de las concentraciones de BAL (Factor B) en las variables de estudio	70
Figura 9	Estudio del efecto de la interacción A*B de la variable pH	72
Figura 10	Efecto de la interacción A*B de la variable acidez	73
Figura 11	Efecto de la interacción A*B en la variable sólidos solubles	74
Figura 12	Efecto de la interacción A*B en la variable pérdida de peso.....	75
Figura 13	Dendograma para los factores de estudio	78
Figura 14	Gráfica de sedimentación	80
Figura 15	Gráfica de componentes principales.....	81

Resumen

El presente estudio tuvo la finalidad de aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas de dos fenotipos de quinua (variedad Tunkahuan): blanca y roja, para la bioconservación de dos hortalizas: brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*) considerando diferentes concentraciones de solución probiótica, siendo una idea novedosa que da apertura a nuevas investigaciones para el desarrollo de métodos técnico ecológicos en la bioconservación de hortalizas mínimamente procesadas. La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de las Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. El aislamiento de bacterias probióticas se realizó de mostos fermentados de quinua a las 72 horas, y se sembró en agar MRS. La solución bacteriana se preparó con caldo MRS suspendiendo en un buffer de ácido cítrico/citrato de sodio y las concentraciones probióticas se determinaron por densidad óptica. El modelo estadístico utilizado fue un bifactorial con dos niveles (Hortalizas: brócoli, calabacín, Concentración de la solución probiótica: 1,0E+07 y 2,0E+07 UFC/mL) en un diseño de bloques completamente al azar con 4 tratamientos y 4 repeticiones. Las variables de respuesta del modelo fueron pH, acidez, sólidos solubles, pérdida de peso y conteo bacteriano, para los grupos de significancia se aplicó una prueba de Tukey ($p < 0,05$). La bacteria aislada del mosto fermentado correspondió a *Lactococcus lactis subsp. lactis*. Los resultados más destacables del estudio demuestran un incremento de la vida útil de las muestras tratadas, observándose la conservación de las variables evaluadas en los 10 días de bioconservación del calabacín y de 5 días para el brócoli sin refrigeración.

Palabras claves: *bacterias ácido lácticas, bioconservación, hortalizas, quinua, solución probiótica*

Abstract

The purpose of this study was to isolate and characterize lactic acid bacteria from two phenotypes of quinoa (Tunkahuan variety): white and red, for the biopreservation of two vegetables: broccoli (*Brassica oleracea var. Itálica*) and zucchini (*Cucurbita pepo*) considering different concentrations of probiotic solution, being a novel idea that opens new research for the development of ecological technical methods in the bioconservation of minimally processed vegetables. The research was carried out in the laboratories of the University of the Armed Forces ESPE in Santo Domingo. The isolation of probiotic bacteria was carried out from fermented musts of quinoa at 72 hours, and they were sown on MRS agar. Bacterial solution was prepared with MRS broth suspended in a citric acid/sodium citrate buffer and probiotic concentrations were determined by optical density. The statistical model used was a bifactorial with two levels (Vegetables: broccoli, zucchini, Concentration of the probiotic solution: 1,0E+07 and 2.0E+07 CFU/mL) in a completely randomized block design with 4 treatments and 4 repetitions. The response variables of the model were pH, acidity, soluble solids, weight loss and bacterial count, for the significance groups a Tukey test was applied ($p < 0.05$). The bacteria isolated from the fermented must corresponded to *Lactococcus lactis subsp. lactis*. The most notable results of the study show an increase in the useful life of the treated samples, observing the conservation of the variables evaluated in the 10 days of biopreservation of the zucchini and 5 days for the broccoli without refrigeration.

Keywords: lactic acid bacteria, biopreservation, vegetable, quinoa, probiotic solution

Capítulo I

Introducción

En la última década gran parte de los países han destinado sus recursos a potenciar la producción agrícola, sin embargo, un problema crítico que afrontan los agricultores son las pérdidas poscosechas que hasta la actualidad no han recibido la atención requerida. En este contexto, las pérdidas poscosechas incluye las pérdidas de alimentos en el proceso de distribución y almacenamiento, y en términos generales hacen referencia a la pérdida de la calidad y contenido nutricional de los mismos (Kumar & Kalita, 2017).

En Ecuador, este problema no es ajeno a la realidad ya que las pérdidas poscosecha ascienden al 40%; esto es debido a la falta de conocimiento, tecnología inadecuada e infraestructura deficiente para el proceso de almacenamiento, lo que sugiere pérdidas abismales en especial para los productos hortícolas y frutícolas del país, los cuales son más susceptibles al deterioro por almacenamiento debido a que parámetros específicos como temperatura y humedad incrementan su tasa de deterioro (FAO, 2019). Este es el caso de ciertas hortalizas como el brócoli y el calabacín los cuales son susceptibles al deterioro en cortos periodos de tiempo que van de 2 a 5 días y que la aplicación de bajas temperaturas afecta la integridad de los mismos.

En este sentido, la implementación de tecnologías que permitan incrementar la vida útil de productos hortícolas y que se ajusten a la tendencia de alimentos libres de conservantes químicos es necesaria para afrontar la realidad que atraviesa el país. Por lo que una alternativa novedosa es la bioconservación que se basa en el empleo de microorganismos capaces de producir compuestos con actividad antimicrobiana natural.

Los microorganismos mayormente utilizados para desempeñar esta tarea son las bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales son muy bien caracterizadas y su potencial para producir ácido láctico y algunos

compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas incentiva su aplicabilidad en productos hortícolas para incrementar características organolépticas y extender la vida útil de los productos (Singh, 2018). Además, las BAL son catalogados como microorganismos no patógenos y seguros para el consumo lo que motiva su aplicación a productos hortícolas al no generar una acción independiente a la deseada que es la bioconservación.

Las BAL al ser un género ampliamente distribuido se pueden obtener de la fase media y tardía de la fermentación de diversos productos e incluso se ha observado la obtención de BAL a partir de granos germinados, este es el caso de la quinua la cual representa en la actualidad un atractivo novedoso debido a su elevado contenido nutricional y su perfil de aminoácidos, es así que varios estudios realizados fuera del país han destacado la presencia de *Lactococcus lactis* con una elevada actividad antimicrobiana de la fermentación espontánea de harinas de quinua.

Objetivos

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas obtenidas de la fermentación discontinua de quinua blanca y roja (*Chenopodium quinoa*), para la bioconservación de brócoli (*Brassica olerace var. italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*).

Objetivos específicos

Caracterizar las propiedades físico-químicas y microbiológicas de las muestras fermentadas de quinua blanca y roja.

Aislar e identificar bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación discontinua de quinua blanca y roja.

Evaluar el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de bacterias ácido lácticas en la bioconservación de brócoli (*Brassica olerace var. italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*).

Determinar mediante análisis fisicoquímico y microbiológico la influencia del bioconservante aplicado en las hortalizas.

Hipótesis

Hipótesis del Factor A (Hortalizas)

Ho: La aplicación de bacterias ácido lácticas no influye sobre la bioconservación de brócoli y calabacín.

Ha: La aplicación de bacterias ácido lácticas si influye sobre la bioconservación de brócoli y calabacín.

Hipótesis para el Factor B (Concentraciones de BAL)

Ho: La aplicación de diferentes concentraciones de bacterias ácido lácticas, no influye en la bioconservación de brócoli y calabacín.

Ha: La aplicación de diferentes concentraciones de bacterias ácido lácticas, si influye en la bioconservación de brócoli y calabacín.

Capítulo II

Revisión de Literatura

La quinua

Generalidades

La quinua es una planta herbácea autóctona de la región andina de América del Sur. La especie se consideró un alimento sagrado para la civilización Inca. Sin embargo, en el periodo colonial el cultivo de quinua fue remplazado por otros cereales, no obstante, la prevalencia de ciertos cultivos en tierras comunales, permitió el desarrollo de diferentes variedades de quinua que ofrecen varios perfiles nutricionales, así como diferentes aspectos visuales (Angeli et al., 2020).

Las semillas de quinua son de forma esférica y tiene un diámetro de 1.4 a 1.6 mm. En la parte exterior la semilla está formada por un pericarpio de dos capas. En el interior, un embrión curvo con un eje hipocótilo radicular. Los componentes proteicos y lipídicos de la semilla de quinua se localizan en el embrión (Gómez-Ramírez et al., 2017).

La producción de quinua en la última década ha incrementado notablemente, debido al aporte de varios estudios que han destacado el valor nutricional y funcional de este cereal, lo que ha incentivado a la industria alimentaria a implementar el uso de quinua para potencializar el perfil nutricional de varias matrices alimentarias. Además, en la composición lipídica de la quinua se destaca la presencia de ácidos grasos poli saturados, lo que representa un aporte significativo a la dieta del consumidor (Zambrano & Solorzano, 2019).

Taxonomía

La quinua pertenece al género *Chenopodium* que comprende al menos 150 especies anuales distribuidas por todo el mundo. En América del Sur, prevalece la especie *Chenopodium quinoa* que ha sido utilizada para varios programas de propagación (Sukhorukov & Zhang, 2013).

Tabla 1*Clasificación Taxonómica de la Quinua*

Reino	Plantae
Dominio	Eukarya
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Chenopodiaceae
Genero	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>Chenopodium quinua</i>

Fuente: Recuperado de (Wilson, 1980).

Variedades

En Ecuador, la creación del Banco Nacional de Germoplasmas de quinua por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIAP), permitió en 1992 la liberación de dos variedades de quinua de bajo contenido de saponinas “INIAP Ingapirca” e “INIAP Tunkahuan”, así también en 2007, se liberó la variedad “INIAP Pata de Venado”, que se caracterizó por su excelente adaptación y producción en ambiente de altura. Sin embargo, en la actualidad, la variedad INIAP Tunkahuan es de mayor uso por los agricultores de la región andina del país (Hinojosa et al., 2021).

Producción de quinua

La quinua es un cultivo con un equilibrado perfil de aminoácidos en comparación con otros cereales comunes. Esta especie crece en una amplia gama de condiciones climáticas, por lo que, en los

últimos años se ha observado una tendencia a la siembra de quinua en varios países como Francia, Inglaterra, Suecia, Dinamarca, China, Estados Unidos y Canadá (Maliro et al., 2017).

En Ecuador, la producción de quinua se focaliza en la región interandina del país, esto por las características agroecológicas y climáticas del entorno, que limita la propagación de enfermedades y plagas a los cultivos de quinua. Sin embargo, a pesar de la versatilidad del cultivo, la producción de quinua fue constante y no superaba las 1000 t antes del 2010, no obstante, en 2015 la producción de quinua supero las 12 000 t. Este aumento se debe a la implementación de políticas gubernamentales que incentivaron la producción de quinua en el país (McElhinny et al., 2007).

El área total de quinua sembrada es de 2 057 ha, y los cultivos se focalizan en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Carchi y Pichincha (Hinojosa et al., 2021).

Tabla 2

Producción de Quinua en Ecuador

Provincia	Superficie sembrada (ha)	Producción (t)
Carchi	68.6	197.25
Chimborazo	1549.92	1968.59
Cotopaxi	634.17	1778.18
Imbabura	669.4	551.27
Pichincha	35.00	9.55

Fuente: Recuperado de (Hinojosa et al., 2021).

Composición de las semillas de quinua

La composición de las semillas de quinua es variada y en muchas ocasiones está en función de la localidad en la que se desarrolló el cultivo. A nivel mundial, se han reportado resultados versátiles en lo que respectan los nutrientes y aminoácidos que posee las semillas de quinua, por ejemplo, la quinua

cultivada por Craine & Murphy (2020) en el estado de Washington, demostró un contenido de 69.56 % de carbohidratos totales, 10.04 % de proteína cruda, 6.41 % de humedad y 2.70 % de cenizas.

A nivel nacional los resultados obtenidos del análisis composicional de las semillas de quinua por parte del Departamento de Ciencias de Alimento y Biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional en el 2016 se destacan en la Tabla 3.

Tabla 3

Análisis proximal de las semillas de quinua

Parámetro	Método	Resultado
Humedad (%):	AOACC 925.10	15.48
Cenizas (%):	AOACC 923.03	2.25
Extracto Etéreo	AOAC 920.85	5.61
Proteína (%):	AOAC 2001.11	14.2
Fibra cruda (%):	INEN 522	2.34
Carbohidratos totales (%):	FAO	62.46
Valor calórico (%):	FAO	357

Germinación de semillas de quinua

La germinación es un proceso crucial que permite activar la fisiología, morfología y actividad bioquímica de la semilla seca. Este proceso se puede clasificar en tres etapas que son la hidratación, activación y crecimiento radicular (Weitbrecht et al., 2011). La primera etapa de la germinación consiste en sumergir las semillas secas en agua, permitiendo la activación del metabolismo débil de la semilla y además hidratándola. La segunda etapa es un proceso prolongado que se basa en la activación de

fitohormonas, nutrientes y la modificación de la pared celular. Finalmente, en la última etapa se observa la elongación de la radícula.

El proceso de germinación ha sido aplicado a una amplia gama de semillas, sin embargo, algunas semillas requieren condiciones específicas de luz u oscuridad. En el caso de la quinua su germinación se realiza en presencia de luz y se observa que este proceso genera una alteración la síntesis y almacenamiento de proteínas en semillas secas de quinua, el que podría explicarse al caracterizas su dinámica molecular. Sin embargo, se desconoce el mecanismos molecular involucrado en la germinación de semillas de quinua, esto en parte, a que la mayor parte de estudios se han enfocado en caracterizas la composición nutricional de estas semillas (Hao et al., 2022).

Fermentación de semillas

La fermentación de cereales y legumbres se puede dividir en tres categorías: fermentación natural, inversa y controlada. Por un lado, la fermentación natural tiene lugar a través de un proceso secuencial que involucra la competencia de microorganismos y depende de la adaptabilidad y multiplicación de microorganismos. La fermentación inversa consiste en la utilización de lote de fermentación previamente exitosos que servirán como iniciadores de una nueva fermentación. En cambio, la fermentación controlada emplea cultivos iniciadores ya caracterizados como levaduras, *Bacillis sp* que hacen de los procesos de fermentación más confiables y repetibles (Adebo et al., 2022).

Formulación de productos a base de quinua

El elevado contenido de aminoácidos, vitaminas y minerales de la quinua, ha incentivado al sector alimentario a implementar este cereal en la producción de varios productos de consumo y en específico en la elaboración de bebidas fermentadas que ofrezcan cuantiosos beneficios al consumidor. El enfoque de incluir el uso de semillas germinadas de quinua en la producción de bebidas, ha sido

ampliamente estudiado por varios autores y ha reflejado excelentes resultados en lo que respecta la viabilidad y características funcionales de la bebida (Guevara et al., 2021).

En el estudio de Maldonado-Jibaja et al. (2018), se reporta que la formulación final de la bebida a base de quinua era capaz de aportar 9 g de proteínas por cada 200 g de bebida, además la vida útil del producto fue de 70 días a 4 °C. Por otro lado, Guallasamín-Dávila et al. (2018), en su investigación concluye que el incremento gradual del pH en bebidas de quinua incrementa la solubilidad proteica, no obstante, el incremento drástico de temperatura desestabiliza la bebida y reduce la solubilidad proteica.

Bacterias ácido lácticas

Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen a un grupo heterogéneo de bacterias capaces de desempeñar un papel importante en los procesos de fermentación. Las BAL se caracterizan por ser bacterias grampositivas, inmóviles, tolerantes a entornos ácidos, no esporulantes, catalasa negativa y con morfología de cocos o bacilos, además contiene un bajo contenido de guaninas y citosinas (Bintsis, 2018).

Las BAL se catalogan como microorganismos seguros, es decir, no son capaces de producir ningún tipo de afección al consumidor. Es por ello, que le interés de la industria ha incrementado notablemente en el desarrollo continuo de procesos, que permitan identificar y sintetizar bacterias específicas, debido al valor económico que se ha atribuido a ciertas especies en particular como *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium breve* entre otras, y el interés creciente de industrias específicas como la alimentaria y farmacéutica (Kleerebezem & de Vos, 2011).

De hecho, en los últimos años, las BAL han desempeñado un papel importante en la industria alimentaria, ya que la actividad metabólica de estas bacterias, permite producir de ácido láctico a partir

de la acidificación de los alimentos, lo que incrementa las características organolépticas, valor nutricional y la vida útil de varios productos terminados como bebidas fermentadas, encurtidos, yogurt, quesos y entre otros. A su vez, que reduce las sustancias nocivas que incrementan el deterioro del producto, esto a través de la producción de ácidos orgánicos y sustancias inhibidores como las bacteriocinas (Angeli et al., 2020). Por otro lado, el impacto de las BAL en la industria farmacéutica está enfocado en la fabricación de probióticos, siendo así que en la actualidad se han fabricado películas orales, tabletas, comprimidos y capsulas a partir de especies como *Enterococcus faecium*, *Levilactobacillus brevis* y entre otras (Baral et al., 2021).

Taxonomía y Características

La clasificación taxonómica de las BAL se basa en los rasgos fenotípicos, el rango de temperatura y el perfil del metabolismo del azúcar, identificándose dos grupos denominados BAL homo y heterofermentativas. En este caso las bacterias homofermentativas metabolizan los disacáridos para la formación directa de ácido láctico casi puro, mientras que las heterofermentativas descomponen la lactosa para la formación de dióxido de carbono, alcohol etílico, peróxido de hidrogeno y diacetilo además del ácido láctico (Zapašnik et al., 2022). Por otro lado, Makarova & Koonin (2007), destacan que la clasificación de las BAL se debe dar de forma biológica más no taxonómica, ya que las BAL no comprenden un grupo monofilético de bacterias.

En base a este contexto, según Qiao et al. (2022) la última reorganización taxonómica de las BAL, sugiere la existencia de 300 especies clasificadas en 7 géneros y en una familia que comprende las *Lactobacillaceae* con 31 géneros en el que destacan los *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Convivina*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y entre otros.

Actividad antimicrobiana

Las BAL producen varios componentes que se consideran agentes potenciales para la bioconservación de diferentes matrices alimentarias. De hechos, gran parte de las BAL son capaces de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos y organismos del deterioro, especialmente por la formación de bacteriocinas que se catalogan como péptidos antimicrobianos sintetizados en los ribosomas y con capacidad de degradar cepas microbianas estrechamente relacionadas, e incluso se ha documentado la capacidad de este péptido para inhibir bacterias patógenas en varios alimentos como verduras, quesos y carnes (Ibrahim et al., 2021). Además características particulares de las BAL, como la producción de ácidos orgánicos y la acidificación, limitan el deterioro y la contaminación de los alimentos por varios grupos microbianos que no están relacionados filogenéticamente, lo que incrementa la vida media del producto (Gómez-García et al., 2019).

Varias investigaciones han arrojado excelentes resultados de la actividad antimicrobiana de las BAL, por ejemplo, Ren et al. (2018) en su estudio in vitro reportó que el extracto crudo de *Lactobacillus plantarum* aislado de salsa de chile, encurtidos de mostaza y tofu apesados provocó un efecto antibacteriano de amplio espectro contra *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, lo que sugiere la presencia de bacteriocinas capaces de permeabilizar la membrana de estos microorganismos patógenos.

Identificación molecular

Las herramientas moleculares implicadas en la clasificación de BAL se basan en la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ADN y la secuenciación. Varios estudios han aplicado técnicas particulares como el ribotipado, el análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA) y entre otras tecnologías capaces de discriminar especies de BAL, sin embargo, hasta la actualidad no existe un método capaz de proporcionar toda la información sobre la diferenciación entre especies e intraespecies (Sharma et al., 2020).

En la actualidad, la mayor parte de estudios destinados a la clasificación BAL en productos fermentados, emplean el ADN ribosomal 16S que es un polirribonucleótico de 1 500 pb que contiene gran variabilidad y divergencia génica entre varias especies, además de poseer regiones conservadas. Esta región al contener alta diversidad y representar un gran segmento en la secuencia, se cataloga como un excelente marcador genético con alta aplicabilidad, reproductividad y poder discriminatorio, ideal para trabajos de para taxonomía y filogenia (Valenzuela-González et al., 2015).

Efecto bioconservante de BAL en alimentos

En la actualidad, la demanda por parte del consumidor, de obtener productos mínimamente procesados y libres de conservantes químicos, ha incentivado a la industria alimentaria a desarrollar nuevas tecnologías que permitan cumplir con los requerimientos expuestos por el consumidor. Es por ello, que una alternativa novedosa que ha tomado impulso es la aplicación de BAL en diferentes matrices alimentarias, a fin de mantener características organolépticas, nutricionales y conservar el producto (Cortés-Sánchez, 2018).

Las BAL son capaces de producir una amplia gama de compuestos orgánicos y péptidos antimicrobianos que permiten limitar el desarrollo de varios microorganismos relacionados con la descomposición de los alimentos. Por ello, estas bacterias han sido utilizadas en varios productos como frutas, verduras, hortaliza y carnes a fin de generar una acción bioconservante que mantenga en gran medida la integridad de los productos. Además una característica importante del metabolismo de las BAL, es la producción de ácido láctico durante la fermentación, lo que ocasiona un incremento sustancial del índice de acidez en los productos, a tal punto, de generar un efecto antimicrobiano que interfiere en el transporte activo y la integridad de membrana de varios microorganismos patógenos (Preciado et al., 2013).

Brócoli

Generalidades

El brócoli es un cultivo de invierno que se encuentra distribuido a lo largo de la región mediterránea. La producción de esta especie a nivel mundial ha incrementado notablemente en los últimos años, esto debido a los cuantiosos beneficios que se han atribuido al consumo de brócoli. De hecho, varios estudios han destacado la presencia de minerales, vitaminas y una serie de compuestos bioactivos como fenoles, glucosinolatos, ácido ascórbico y entre otros, capaces de combatir ciertas patologías en el ser humano como el hígado graso, la diabetes e incluso el brócoli se le ha catalogado como un agente anticancerígeno (Kim et al., 2021).

En Ecuador, la producción de brócoli ha incrementado paulatinamente, y en la actualidad es uno de los principales productos agrícolas exportados por el país. En el mercado internacional, el brócoli ecuatoriano es exportado a la Unión Europea y Japón. Es así que, en el 2018 se reportaron ingresos por cerca de los 83 millones de dólares por la comercialización de esta hortaliza (Duque & Murillo, 2021).

Clasificación Taxonómica

Tabla 4

Taxonomía del Brócoli

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Brassicaceae
Género	<i>Brassica</i>
Especie	<i>Brassica oleracea L.</i>

Manejo Poscosecha del Brócoli

Del brócoli se cosechan las inflorescencias inmaduras, lo que produce en la planta un estrés severo que afecta la composición nutricional de la hortaliza, identificándose repercusiones significativas en el contenido de nutrientes, minerales y la vida útil del brócoli. De hecho, se ha documentado que el brócoli almacenado a 20 °C tiene una vida útil de 3 a 4 días, mientras que el almacenamiento a 0 °C permite incrementar la vida útil a 4 semanas, sin embargo, incluso al utilizar este proceso de almacenamiento se visualizan cambios bioquímicos en la superficie del brócoli, mostrándose una descoloración del mismo, esto debido a la pérdida de clorofila, lo que sugiere problemas de calidad en la hortaliza (Narváez Pallo, 2019).

Calabacín

Generalidades

El calabacín o zucchini pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, la cual contiene otros cultivos importantes como el zapallo y el pepino que han sido catalogados como cultivos estratégicos por ciertos países. Sin embargo, el cultivo de calabacín en los últimos años ha incrementado gradualmente, a tal punto que en 2014 la producción de esta hortaliza alcanzó los 25 millones de toneladas y en la actualidad representa un cultivo económicamente importante (Montero-Pau et al., 2018). La presencia de una mayor cantidad de cultivos de calabacín se debe al excelente perfil de micronutrientes que contiene esta especie, pudiendo identificarse mayoritariamente minerales, carotenoides, vitamina C y compuestos fenólicos, que reflejan una actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica (Martínez-Valdivieso et al., 2017).

En Ecuador la producción de calabacín no supera las 16 t/ha y la tendencia al cultivo de esta especie se centra en la región interandina del país, pudiendo encontrarse cultivos distribuidos en las provincias de Pichincha, Loja, Chimborazo y Tungurahua (Rua Carpio, 2022).

Clasificación Taxonómica

Tabla 5

Taxonomía del Calabacín

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitoideae
Género	<i>Cucurbita</i>
Especie	<i>Cucurbita pepo</i>

Manejo poscosecha del calabacín

Una alternativa poscosecha utilizada para la conservación de hortalizas es el almacenamiento en frío, sin embargo, existen ciertos cultivares susceptibles al deterioro producto de la aplicación de esta tecnología. Este es el caso del calabacín, el cual, al ser sometido a temperaturas bajas refleja daños significativos en su superficie y además incrementa la pérdida de agua en la hortaliza lo que reduce su vida útil y calidad (García et al., 2020). De hecho varios estudios han reportado que la aplicación de temperaturas de 7 a 10 °C permite incrementar la vida útil del calabacín a 2 semanas, a pesar de esto la aplicación de temperatura por debajo de los 7 °C incrementan drásticamente el deterioro de la especie, debido al elevado contenido de humedad característico de la hortaliza (Bleocanca et al., 2022).

Bioconservación

El concepto de bioconservación se inspira en la fermentación de los alimentos utilizados para conservar alimentos en la antigüedad, excepto que la fermentación implica una transformación sustancial del sustrato alimentario, que no suele ser la intención al diseñar sistemas de bioconservación. Sin embargo, la bioconservación se ha expandido con éxito a alimentos no fermentados como mariscos, carne cruda y productos vegetales no fermentados. Por ejemplo, la bioconservación de productos vegetales no fermentados se usa principalmente contra microorganismos de descomposición como levaduras, mohos, bacterias formadoras de esporas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) y bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes* (Borges et al., 2022).

Capítulo III

Materiales y Métodos

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:	Franco Arenoso

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

Ubicación Geográfica

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de los Alimentos de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Extensión Santo Domingo, ubicado en la Hcda. Zoila Luz, Vía Santo Domingo – Quevedo Km. 24, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

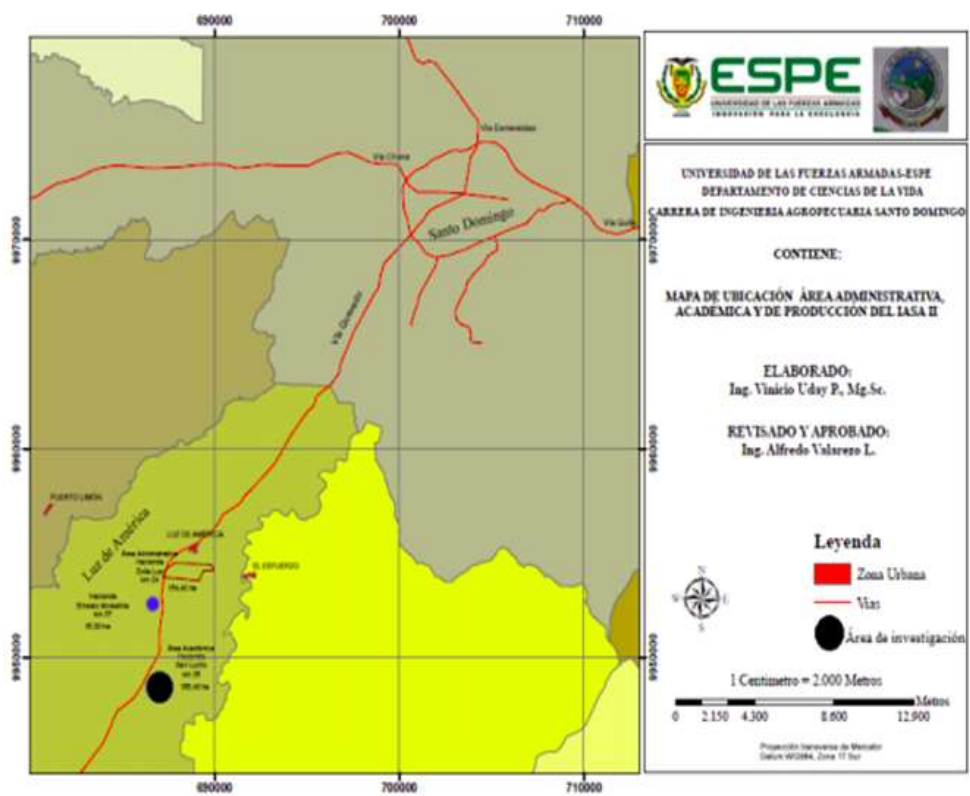
Latitud: 00° 24' 36''

Longitud: 79° 18' 43''

Altitud: 270 msnm

Figura 1

Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación



Materiales

Determinación de pH

Tabla 6

Recursos necesarios para la determinación de pH

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestras
Potenciómetro	Vaso de precipitación (250 mL)	Agua destilada	Fermentado de quinua
Balanza analítica	Mortero y pistilo		Brócoli
	Probeta (100 mL)		Calabacín
	Pipeta (10 mL)		
	Probeta (100 mL)		

Determinación de la acidez titulable

Tabla 7

Recursos necesarios para la determinación de acidez titulable

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Potenciómetro	Vaso de precipitación (250 mL)	NaOH 0.1 N	Fermentado de quinua
Balanza analítica	Soporte universal	Agua destilada	Brócoli
Plancha magnética	Mortero y pistilo		Calabacín
	Bureta graduada (25 mL)		
	Probeta (100 mL)		
	Pipeta (10 mL)		

*Determinación de sólidos solubles***Tabla 8***Recursos necesarios para la determinación de sólidos solubles*

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Refractómetro	Pipeta pasteur (3 mL)	Agua destilada	Fermentado de quinua
	Mortero y pistilo		Brócoli
			Calabacín

*Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas***Tabla 9***Recursos necesarios para el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en los fermentados de quinua*

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayos	Agar MRS	Fermentado de quinua
Plancha térmica magnética	Asa bacteriológica	Agua destilada	
Balanza analítica	Asa digralsky	Agua de peptona	
Microscopio óptico	Micropipeta	Cristal violeta	
Incubadora	Mechero de alcohol	Lugol	
Autoclave	Portaobjetos	Alcohol acetona	
Vórtex	Placas Petri	Safranina	
	Frascos para medio	Aceite de inversión	
		Peróxido de hidrógeno	

*Enriquecimiento selectivo de bacterias ácido lácticas***Tabla 10***Recursos necesarios para el enriquecimiento de BAL*

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica	Caldo MRS	Bacterias aisladas
Plancha térmica magnética	Mechero de alcohol	Agua destilada	
Balanza analítica	Fascos para medio		
Incubadora	Algodón		
Autoclave	Probeta		

*Bioconservación de las hortalizas***Tabla 11***Recursos necesarios para la bioconservación de la solución probiótica*

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo	Caldo MRS	Caldo enriquecido
Balanza analítica	Asa bacteriológica	Agua destilada	
Incubadora	Mechero de alcohol	Citrato de sodio	
Autoclave	Vasos de precipitación	Ácido cítrico	
Centrifuga	Atomizador	Alcohol al 96%	
Potenciómetro	Probeta		
Espectrofotómetro			
Vórtex			

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

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivos	Muestras
Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo	Agua de peptona	Fermentado de quinua
Plancha térmica magnética	Micropipeta	Agua destilada	Brócoli
Balanza analítica	Mechero de alcohol	Petrifilm	Calabacín
Incubadora	Probeta	Alcohol al 96%	
Contador de colonias	Vaso de precipitación		
Balanza analítica			
Autoclave			
Vórtex			

*Determinación de la pérdida de peso***Tabla 13***Recursos necesarios para determinar la pérdida de peso*

Equipos	Materiales/Insumos	Muestras
Balanza	Papel aluminio	Brócoli
		Calabacín

Métodos

Obtención de la materia prima

Las semillas de quinua (variedad Tunkahuan) se obtuvieron de un distribuidor comercial ubicado en la Av. Pedro Vicente Maldonado S11-122, Quito.

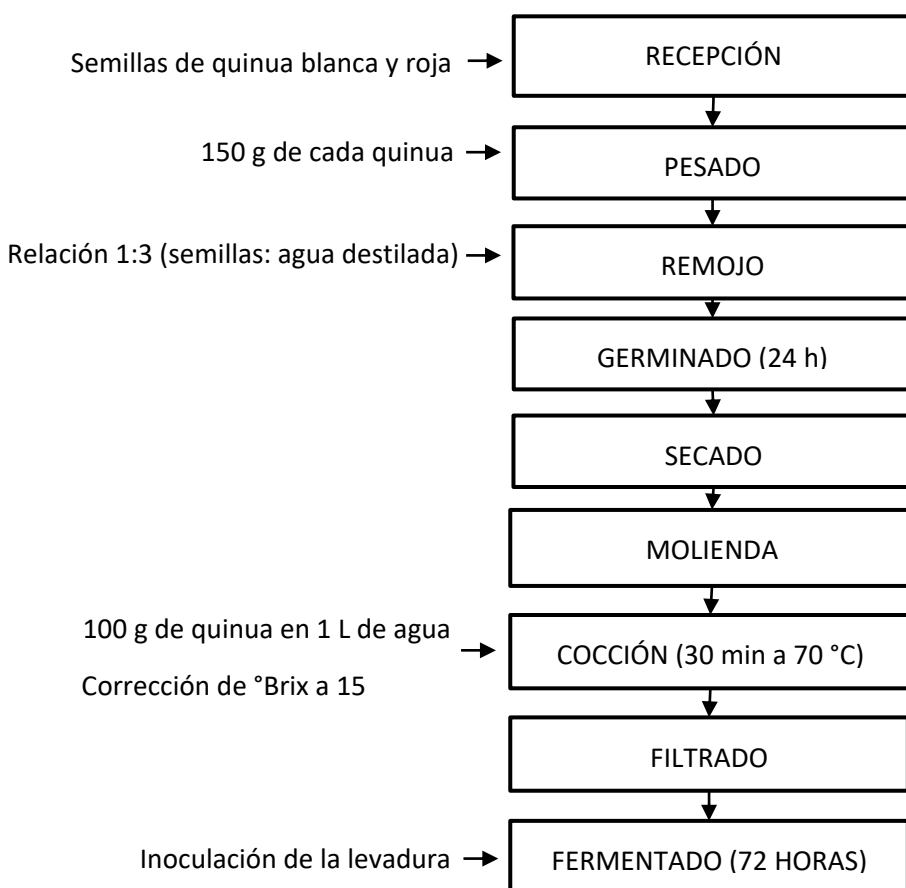
Por otro lado, las hortalizas utilizadas en la fase experimental, fueron obtenidas del Mercado Municipal de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Fermentación de quinua

La fermentación se realizó en base al diagrama de flujo, detallado en la Figura 2.

Figura 2

Diagrama de flujo de la fermentación de quinua



Pesado.

Se pesaron 150 gramos de quinua blanca y roja para cada repetición, haciendo un total de 900 gramos entre ambos fenotipos de quinua.

Remojo.

El remojo se realizó a temperatura ambiente y consistió en sumergir las semillas en agua destilada a relación 1:3 (semillas: agua) por un tiempo estimado de 4 horas (Llacsá Mamani & Cucho Arapa, 2020).

Germinación.

Las semillas previamente remojadas se filtraron en un colador para eliminar el exceso de agua, a continuación, se depositaron en bandejas de metal y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Para mantener la humedad superficial de la semilla cada bandeja se cubrió con papel estéril húmedo (Valencia, 2015).

Secado.

El proceso de secado consistió en exponer las semillas germinadas al sol, hasta que estas estén libres de humedad.

Molienda.

Se inició triturando las semillas germinadas en un mortero hasta obtener partículas de menor tamaño, para posteriormente depositar el triturado en un molino eléctrico, el cual se dejó funcionar hasta obtener un polvo fino (harina).

Cocción.

Se disolvió 100 gramos de harina de quinua en 1 litro de agua destilada en un vaso de precipitación y se dejó calentar a 70 °C por 20 minutos y con agitación constante. Al terminar el calentamiento se realizó una corrección de °Brix añadiendo sacarosa hasta alcanzar 15 °Brix.

Fermentación.

El proceso de fermentación consto en dos etapas, la primera etapa consistió en activar la levadura seca comercial (*Saccharomyces cerevisae*), disolviendo 1 gramo de levadura en 100 mL del mosto de quinua, luego se dejó reposar la mezcla por 15 minutos a una temperatura de 30 °C. Mientras que, en la segunda etapa se inoculó la levadura, para lo cual, en botellas plásticas cubiertas con papel aluminio y acopladas a una trampa de agua, se vertió 900 mL del mosto de quinua y también los 100 mL que contienen la levadura activada. La fermentación se realizó a temperatura ambiente y duró 72 horas (Llacsá Mamani & Cucho Arapa, 2020).

Siembras y Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se preparó diluciones seriadas hasta 10^{-6} , utilizando 1 mL de los fermentados de quinua en tubos de ensayo con 9 mL de agua peptona (1.5%), posteriormente se sembró 0,2 mL de las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} en agar MRS por duplicado utilizando el método de extensión. Las muestras inoculadas se incubaron en un rango de temperatura de 35 a 37 °C por un periodo de 48 horas.

Para obtener colonias puras, se subcultivaron las colonias formadas en un nuevo agar MRS y se sembró utilizando el método por estrías.

Identificación microbiana

Tinción Gram.

Se recogió un inóculo de una colonia bacteriana con el asa bacteriológica y se homogeneizó en una gota de agua destilada que previamente había sido colocada en un portaobjetos, a continuación, se fijó el portaobjetos con calor.

Seguidamente se añadieron varias gotas de cristal violeta por 1 minuto, después lugol por 30 segundos, seguido de alcohol cetona por 15 segundos y safranina por 1 minuto. Finalmente se retiró el

exceso de agua en la muestra y se observó en el microscopio óptico con el lente de mayor aumento y añadiendo aceite de inmersión (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016).

Prueba de catalasa.

Con una pipeta Pasteur se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (3% de solución) en un portaobjetos, posteriormente se recogió una colonia bacteriana con el asa bacteriológica y se extendió la muestra y se observó la reacción generada.

La formación de burbujas antes de los 20 segundos sugiere que la prueba es positiva (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016).

Secuenciación y análisis filogenético.

Las bacterias aisladas en caja Petri con medio agar MRS fueron enviadas a Macrogen Inc. de Corea del Sur para la secuenciación del ARNr 16S. Las secuencias obtenidas se compararon con el programa BLASTn.

El análisis filogenético se realizó en el programa MEGA X, utilizando un alineamiento de las secuencias obtenidas con el algoritmo ClustalW, así también se realizó un árbol filogenético mediante el método de Neighbor-Joining utilizando la distancia genética de Tamura-Nei basada en 1000 réplicas Bootstrap. La bacteria utilizada como grupo externo fue *Staphylococcus aureus*.

Bioconservación de hortalizas

Solución bacteriana.

Se preparó caldo MRS añadiendo 27,58 gramos en 500 mL de agua destilada para inocular las colonias bacterianas aisladas a 37 °C por 24 horas (López Paredes, 2021).

A continuación, se lavó las soluciones bacterianas con tampón de ácido cítrico – citrato de sodio (0,1M; pH 3,8) y se centrifugo a 5 000 rpm por 15 minutos, este proceso se repitió 2 veces.

Posteriormente se suspendió la solución lavada en el tampón de ácido cítrico – citrato de sodio en relación 1:1 de volumen (Russo, 2014).

Para cuantificar la carga bacteriana en la solución probiótica se realizó por densidad óptica, para lo cual se midió en un espectrofotómetro la absorbancia de la muestra a 600 nm.

Preparación de la muestra.

El brócoli y calabacín fueron lavados con agua destilada y ácido cítrico al 2% respectivamente. Posteriormente se roció la solución bacteriana en ambas muestras. Las hortalizas se conservaron en fundas durante 10 días.

Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial con escala hedónica a un jurado de 10 personas no entrenados, donde se evaluó parámetros de color, olor y textura de los tratamientos utilizados en el estudio.

Diseño Experimental

Factores del experimento

Tabla 14

Factores y Niveles a probar en el estudio de la bioconservación de brócoli y calabacín con bacterias ácido lácticas provenientes de quinua

Factores	Simbología	Niveles
Hortalizas (A)	a0	Brócoli
	a1	Calabacín
Concentración de bacterias ácido lácticas (B)	b0	1,0E+07 UFC/mL
	b1	2,0E+07 UFC/mL

Tratamientos a comparar

Tabla 15

Tratamientos a comparar en el estudio de la bioconservación de brócoli y calabacín con bacterias ácido lácticas provenientes de quinua

N°	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a0b0	Brócoli + 1,0E+07 UFC/mL
T2	a0b1	Brócoli + 2,0E+07 UFC/mL
T3	a1b0	Calabacín + 1,0E+07 UFC/mL
T4	a1b1	Calabacín + 2,0E+07 UFC/mL

Tipo de diseño

Para el análisis estadístico de este estudio se utilizó un ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB, donde el factor A corresponde a las hortalizas y el factor B a las diferentes concentraciones de bacterias ácido lácticas.

Repeticiones

Para el diseño experimental se consideró 4 repeticiones para cada tratamiento, conformando un total de 16 unidades experimentales.

Análisis Estadístico

Tabla 16

Esquema del análisis de varianza (ANOVA) para el estudio de la bioconservación de brócoli y calabacín con bacterias ácido lácticas provenientes de quinua

Fuente de variación		Grados de libertad
Hortalizas	a-1	1
Concentración de BAL	b-1	1
Hortalizas x Concentración de BAL	(a-1)(b-1)	1
Replicas	r-1	3
Error Experimental		9
Total		15

Análisis funcional

En el análisis de varianza para evaluar los resultados significativos de cada variable analizada en este estudio se aplicó una prueba de significación Tukey ($p < 0,05$).

Variables evaluadas

Determinación de pH

Para determinar el pH del mosto de quinua, se utilizó la metodología detallada en la norma INEN 389 (1985):

Se mezclaron 10 mL de la muestra preparada en un vaso de precipitación con 100 mL de agua destilada, y se agitó suavemente. Posteriormente, se filtró el preparado para retirar la presencia de partículas en suspensión.

Determinación de la acidez

Para determinar la acidez titulable, se utilizó la metodología detallada en la norma INEN 0381 (1985):

Se añadió 25 mL de la muestra en un matraz volumétrico de 250 cm³ y se diluyó a volumen con agua destilada, mezclando la solución. Posteriormente, se colocó 25 mL de la muestra preparada en un vaso de precipitación y se midió el pH. Se tituló la muestra con hidróxido de sodio 0.1 N hasta llegar a pH 7, se continuó titulando hasta alcanzar pH 8.3 aproximadamente. Se registró el volumen de hidróxido de sodio consumido y el pH obtenido en cada adición del valorante. Finalmente, se estableció el volumen exacto de solución 0.1 N de hidróxido de sodio añadido por interpolación a pH 8.1.

Por otro lado, para muestra sólida se pesó 25 gramos y se licuo con 50 mL de agua destilada. Posteriormente se tituló con hidróxido de sodio 0.1 N y se registró el volumen consumido.

La acidez titulable se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$A = \frac{V_1 N_1 M}{V_2}$$

Siendo:

A = valor de la acidez en gramos.

V₁= mL de NaOH utilizados en la titulación.

N₁= normalidad del valorante.

M= masa molecular del ácido de referencia. Para el ácido láctico = 0.090.

V₂= volumen de la muestra utilizada para el análisis.

Determinación de sólidos solubles

Se agregó varias gotas de la muestra en el prisma del refractómetro y se leyó la cantidad de sólidos solubles totales expresados en grados Brix.

Determinación de Pérdida de Peso

La pérdida de peso se determinó en base a la siguiente ecuación

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

Recuento de poblaciones microbianas

Para determinar las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL), se utilizó la metodología descrita en la norma INEN 1529-5 (2006):

Se homogeneizó 5 gramos de agua de peptona en 1000 mL de agua destilada, a continuación, se colocó 9 mL de la solución en tubos de ensayo para la preparación de diluciones seriadas hasta 10⁻⁸. Posteriormente, los tubos con la solución fueron esterilizados en el autoclave. Luego, en la cámara de flujo laminar, se preparó diluciones con 1 gramo de la muestra, y se inoculó 1 mL de la disolución en las láminas Petrifilm evitando la formación de burbujas de aire.

Los Petrifilm de bacterias se incubaron en un rango de temperatura de 35 a 28 °C por un tiempo de 48 horas, mientras que los Petrifilm de mohos y levaduras se dejaron a temperatura ambiente por 72

horas. Finalmente se realizó el contenido de colonias con UN contador de colonias Colony Counter ISOLAB, y aplicando 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

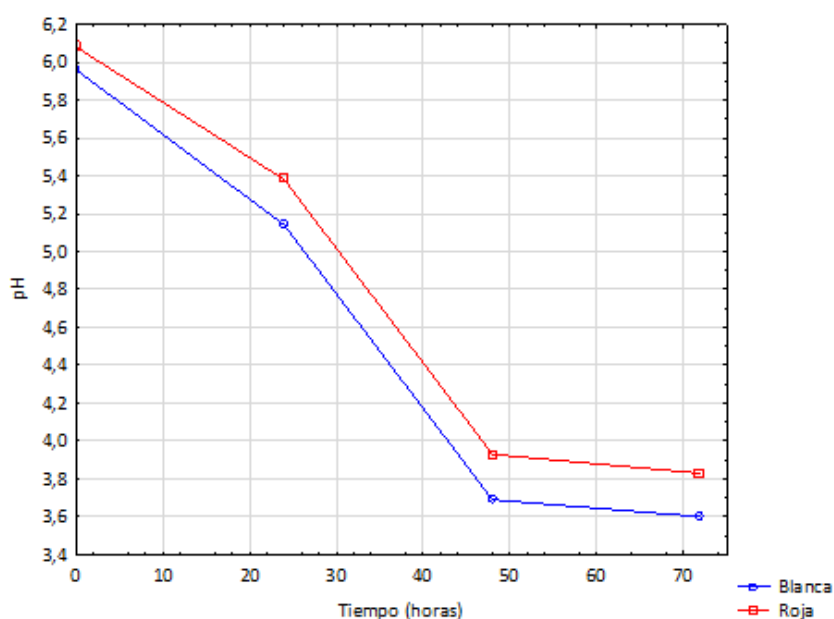
Resultados

Comportamiento físico-químico de los mostos de quinua

Variable pH

Figura 3

Cinética de fermentación de función del pH



En la figura 3, se muestra la variación de pH en el proceso de fermentación, y se observó que las tendencias de ambas curvas presentaron un decrecimiento paulatino a las 24 horas. Sin embargo, a las 48 horas el comportamiento de pH varió bruscamente evidenciándose valores de 3,69 y 3,93 para la quinua blanca y roja. Así también, a las 72 horas la variación de pH no reflejó cambios bruscos más bien la reducción de este es mínima, obteniéndose al final de la fermentación un pH de 3,60 y 3,83 para el fenotipo blanco y rojo respectivamente. El comportamiento decreciente de pH comprendido entre las 24 a 48 horas se debe a la formación de varios ácidos orgánicos (mayoritariamente ácido láctico),

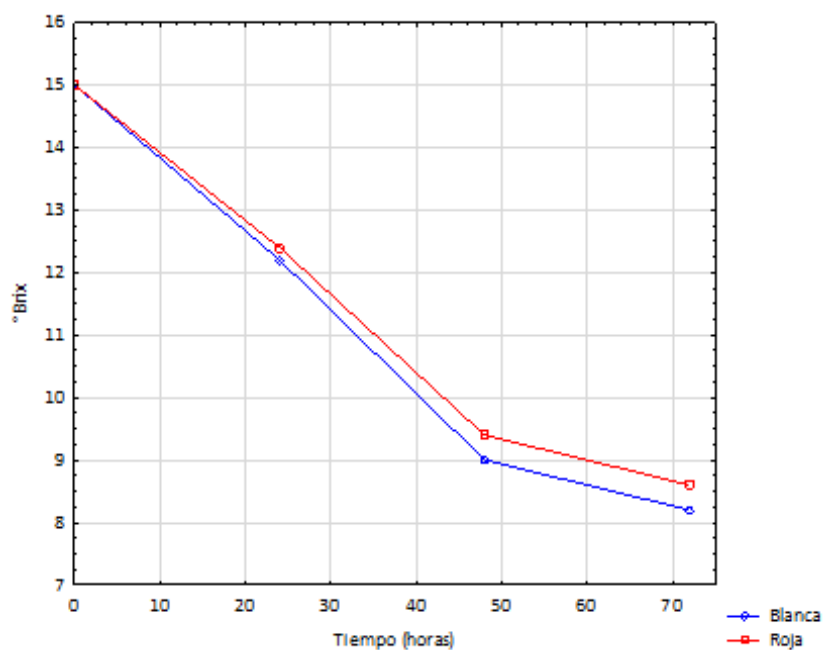
resultantes del metabolismo de la levadura y la presencia de ciertas bacterias características de los procesos de fermentación. Por lo que, a mayor cantidad de microorganismo presentes en el mosto, mayor será la tasa de producción de ácidos y por ende menor el pH del medio (Morocho & Leiva-Mora, 2019).

Asimismo, el análisis estadístico de esta variable no reflejó diferencia significativa $p(0,80) > 0,050$, lo que sugiere que el fenotipo de quinua no influye en la variación de pH de los mostos utilizados en este estudio. Los resultados obtenidos son comparables con los reportados por Llacsá Mamani & Cucho Arapa (2020), los cuales señalan que a las 72 horas la quinua blanca presentó un menor valor de pH en comparación con la quinua roja, obteniendo valores de 3,49 y 3,59 respectivamente para cada fenotipo de quinua utilizado en su estudio.

Variable sólidos solubles

Figura 4

Cinética de fermentación en función de los sólidos solubles



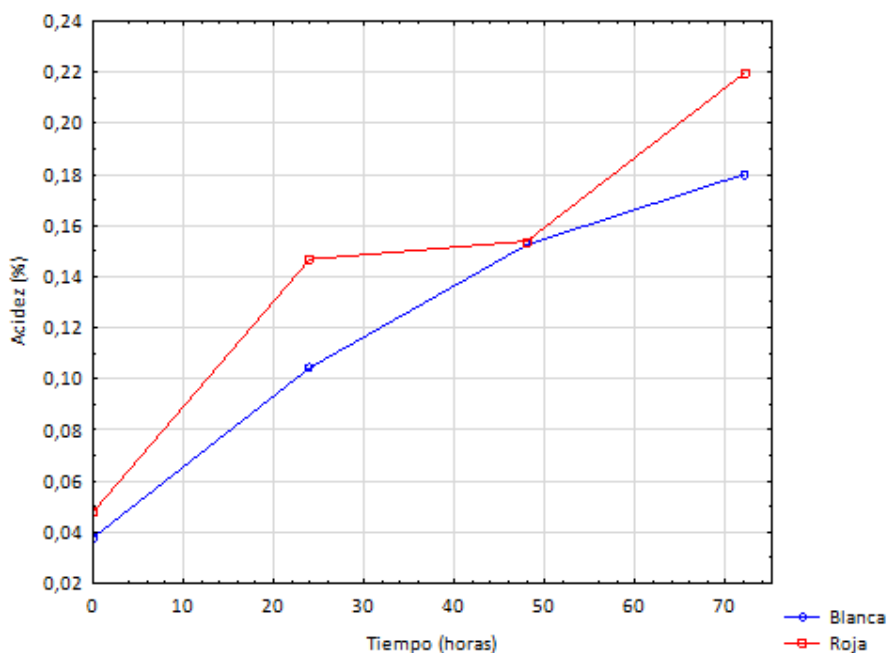
En la figura 4, se muestra la variación de sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix), el comportamiento de la cinética reflejó un decrecimiento de los $^{\circ}$ Brix a medida que aumenta el tiempo de fermentación, este fenómeno se debe a que la levadura empleada como iniciador de la fermentación y la formación de bacterias incrementan la síntesis de azúcares y polisacáridos presentes en el mosto fermentable. La variación de $^{\circ}$ Brix denota que a mitad del proceso de fermentación (48 horas) se consumió cerca del 50 % de azúcar contenido en el mosto, esto es debido a que, durante las primeras 36 horas el consumo de azúcares es intenso por parte de la levadura a fin de producir alcohol etílico y anhídrido carbónico compuestos que influyen gradualmente en la concentración de sólidos solubles de la bebida fermentada (Hoyos et al., 2010). Del mismo modo, en la gráfica se muestra que a las 72 horas los valores de $^{\circ}$ Brix fueron de 8,2 y 8,6 para la quinua blanca y roca respectivamente.

El análisis estadístico de esta variable no reflejó diferencia significativa $p(0,92) > 0,050$, lo que sugiere que el fenotipo de quinua no influye en la cantidad de sólidos solubles consumidos en la fermentación. Los resultados obtenidos reflejaron que a las 72 horas los valores de $^{\circ}$ Brix fueron de 8,2 y 8,6 para la quinua blanca y roja respectivamente, mientras que el estudio de Llacsá Mamani & Cucho Arapa (2020), reportó valores de 11,30 y 11,02 para la quinua blanca y roja. La no correlación entre estos valores, se debe a la localidad donde se llevó a cabo la investigación por un lado este estudio se realizó en una región tropical, mientras que el estudio de mencionado anteriormente se realizó en el altiplano peruano, y varios estudios han reportado que el incremento de temperatura en la fermentación incrementa la tasa de crecimiento de las células de levadura y por ende en la capacidad de sintetizar azúcares del medio (Henderson et al., 2013).

Variable acidez titulable

Figura 5

Cinética de fermentación en función de la acidez



En la figura 5, se muestra la variación de acidez, el comportamiento de las curvas reflejó un incremento gradual de la acidez en el mosto fermentado, el cual al inicio de la fermentación tuvo una acidez de 0,038 % y 0,048 % para la quinua blanca y roja respectivamente. Sin embargo, a las 72 horas la acidez del mosto había incrementado a 0,18 % y 0,21 % para el fenotipo blanco y rojo. Este incremento se debe a la formación de ácidos de bajo peso molecular habituales de la fermentación, los cuales se han considerado factores de interferencia que repercuten en la calidad del proceso y la producción del etanol. Además, la acidez que se obtuvo a las 72 horas sugiere un incremento en la cantidad de materia presente en la fermentación, lo sugiere la presencia de bacterias del tipo ácido lácticas, las cuales al encontrarse en un entorno adecuado incrementan su tasa de crecimiento y por ende la acidez del medio (Zuluaga Domínguez, 2020). Además, el acondicionamiento ácido que toma el mosto a medida que incrementa el tiempo de fermentación, permite el desarrollo de bacterias ácido lácticas que son capaces de tolerar un $\text{pH} \leq 5$ y a la vez limita la presencia de microorganismos contaminantes en la fermentación como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* (Tixicuro et al., 2021).

El análisis estadístico de esta variable si reflejó diferencia significativa $p(0,041) < 0,050$, lo que sugiere que el fenotipo de quinua si influye en la acidez del mosto fermentado. Los resultados obtenidos en este estudio, concuerdan con los reportados por Casas Forero et al (2016), en el que obtuvo un valor 0,19 % para la quinua blanca, mientras que para la quinua roja Onofre Huamanchoque (2018) reporta un valor de 0,20%.

Tabla 17

Análisis microbiológico de la fermentación de quinua

Fenotipo de quinua	Mohos/Levaduras		Aerobios	
	0 horas	72 horas	0 horas	72 horas
Blanca	3,1E+03 UFC/mL	4,1E+03 UFC/mL	0	2,3E+03 UFC/mL
Roja	2,8E+03 UFC/mL	3,9E+03 UFC/mL	0	3,1E+03 UFC/mL

Con respecto al análisis microbiología de los mostos de quinua, se obtuvo una población de mohos y levaduras de 3,1E+03 UFC/mL para la quinua blanca y 2,8E+03 UFC/mL para la quinua roja en el día 0 de fermentación, esto debido a que para activar la fermentación se inoculó levadura, en lo que respecta la cantidad de mohos y levaduras registrado a las 72 horas de acuerdo a Hidalgo Ortiz & Tulcanaza Pala (2016) es normal en bebidas artesanales ya que el proceso de fermentación no se ha detenido y se puede observar un contenido elevado de levadura por encima de 1,0E+03 UFC/mL en la fermentación. En el conteo de aerobios se observó la presencia de poblaciones a las 72 horas siendo estas 2,3E+03 UFC/mL para la quinua blanca y 3,1E+03 UFC/mL para el fenotipo rojo, lo que sugiere la presencia de bacterias del ácido lácticas (Ramos-Izquierdo et al., 2009).

Identificación de BAL aisladas del mosto fermentado de quinua

Tabla 18

Resultados microbiológicos de la identificación bacteriana



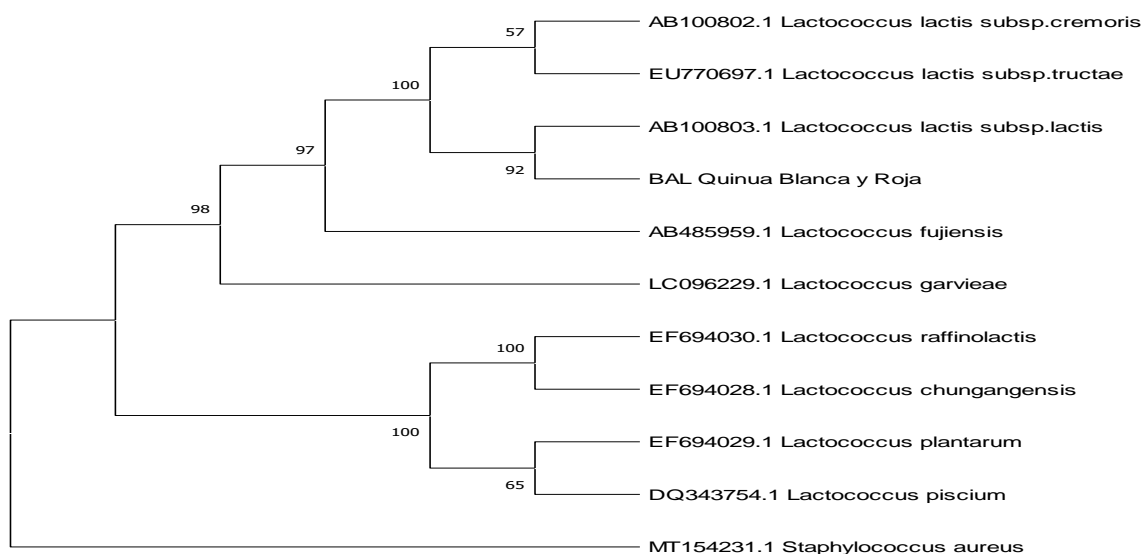
Muestra	Características	Tinción Gram
Quinoa blanca	Gram positivo Cocos Catalasa negativa	
Quinoa roja	Gram positivo Cocos Catalasa negativa	

Figura 6

Árbol filogenético basado en la secuencia del gen 16s ARNr de las BAL



Nota. Árbol filogenético correspondiente a las BAL aisladas de quinua blanca y roja, con *Staphylococcus aureus* como grupo externo.

Los resultados presentados en la tabla 18, corresponden a las bacterias aisladas del agar MRS a partir de la fermentación discontinua de quinua. En este caso se observó que las bacterias aisladas son cocos gram positivos y catalasa negativos. Según el estudio de Yu et al. (2017), *Lactococcus* comprende un género de bacterias anaerobias facultativas, gram positivas, catalasa negativa, inmóviles, tolerantes a entornos ácidos y no patógenos para los humanos.

En la Figura 6, se presenta el árbol filogenético de las cepas secuenciadas (BAL Quinua Blanca y Roja), y se observó la formación de un clado para la bacteria aislada con el *Lactococcus lactis subsp. lactis*, con un valor de Bootstrap de 92%. Según Ruiz Rodríguez et al. (2016), en la fermentación de quinua existe una diversidad microbiana en la que se puede identificar BAL con morfología de cocos y bacilos, y su presencia depende del tiempo de fermentación y pH del medio. De esta manera durante las primeras horas de fermentación se han identificado cocos BAL que corresponden a *Enterococcus* que se asocian a contaminantes comunes del procesamiento de los granos, sin embargo, el uso de granos comerciales limita la presencia de este género. Mientras que en la fase temprana de la fermentación de quinua (1 o 2 días) se ha logrado aislar cepas de *Lactococcus lactis* en especial cuando el medio alcanza valores de pH que oscilan entre 4.36 a 3.87.

En base a esto, la BAL aislada de la fermentación de quinua blanca y roja tiene un elevado grado de similitud con *Lactococcus lactis subsp. lactis*, en vista que se ha reportado que esta especie tiene una morfología esférica u ovoide y por lo general se presenta individualmente o en cadenas cortas (Mills et al., 2011).

Análisis de varianza

*Análisis de varianza para la variable pH***Tabla 19***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: Hortalizas	4,002	1	4,002	1013,90	0,0000
B: Concentración de BAL	0,002	1	0,002	0,61	0,464
C: Repeticiones	0,005	3	0,002	0,72	0,522
INTERACCIONES					
A*B	0,010	1	0,010	2,59	0,158
RESIDUOS	0,023	9	0,003		
TOTAL	4,044	15			

En la tabla 19, se muestra el análisis de varianza del pH en el día 0 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, en el que se identificó diferencia significativa para el Factor A (Hortalizas). Mientras que para el Factor B (Concentración de BAL), la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL) y las repeticiones no mostraron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 20*Análisis de varianza para el pH en el día 5 de bioconservación*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	3,864	1	3,864	16762,45	0,0000
B:Concentración de BAL	0,015	1	0,015	66,83	0,0002
C:Repeticiones	0,000	3	0,000	0,47	0,6463
INTERACCIONES					
A*B	0,001	1	0,001	6,11	0,0484
RESIDUOS	0,001	9	0,000		
TOTAL	3,883	15			

En la tabla 20, se muestra el análisis de varianza del pH en el día 5 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL), y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 21

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:Hortalizas	5,174	1	5,174	155236,00	0,0000
B:Concentración de BAL	0,403	1	0,403	12100,00	0,0000
C:Repeticiones	0,000	3	0,000	4,00	0,0787
INTERACCIONES					
A*B	0,177	1	0,177	5329,00	0,0000
RESIDUOS	0,000	9	0,000		
TOTAL	5,755	15			

En la tabla 21, se muestra el análisis de varianza del pH en el día 10 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL), y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Análisis de varianza para la variable sólidos solubles

Tabla 22

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

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	3,100	1	3,100	2232,60	0,0000
B:Concentración de BAL	0,007	1	0,007	5,40	0,0591
C:Repeticiones	0,005	3	0,002	1,80	0,2441
INTERACCIONES					
A*B	0,000	1	0,000	0,60	0,4680
RESIDUOS	0,008	9	0,001		
TOTAL	3,122	15			

En la tabla 22, se muestra el análisis de varianza de los sólidos solubles en el día 0 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas). Mientras que para el Factor B (Concentración de BAL), la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL) y las repeticiones no mostraron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 23

Análisis de varianza para los sólidos solubles en el día 5 de la bioconservación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	1,400	1	1,400	458,45	0,0000
B:Concentración de BAL	0,187	1	0,187	61,36	0,0002
C:Repeticiones	0,001	3	0,000	0,27	0,7703
INTERACCIONES					
A*B	0,100	1	0,100	33,00	0,0012
RESIDUOS	0,018	9	0,003		
TOTAL	1,709	15			

En la tabla 23, se muestra el análisis de varianza de los sólidos solubles en el día 5 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL), y la interacción A*B

(Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 24

Análisis de varianza para los sólidos solubles en el día 10 de la bioconservación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	0,163	1	0,163	29,40	0,0016
B:Concentración de BAL	0,12	1	0,12	21,60	0,0035
C:Repeticiones	0,006	3	0,003	0,60	0,5787
INTERACCIONES					
A*B	0,213	1	0,213	38,40	0,0008
RESIDUOS	0,033	9	0,005		
TOTAL	0,536	15			

En la tabla 24, se muestra el análisis de varianza de los sólidos solubles en el día 10 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL), y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Análisis de varianza para la variable acidez titulable

Tabla 25

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

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	0,002	1	0,002	34,71	0,0011
B:Concentración de BAL	0,000	1	0,000	3,86	0,0972
C:Repeticiones	0,000	3	0,000	0,43	0,6699
INTERACCIONES					

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A*B	0,000	1	0,000	1,71	0,2383
RESIDUOS	0,000	9	0,000		
TOTAL	0,003	15			

En la tabla 25, se muestra el análisis de varianza de la acidez titulable en el día 0 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas). Mientras que para el Factor B (Concentración de BAL), la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL) y las repeticiones no mostraron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 26

Análisis de varianza de la acidez para el día 5 de la bioconservación

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	0,002	1	0,002	17,45	0,0058
B:Concentración de BAL	0,007	1	0,007	61,36	0,0002
C:Repeticiones	0,000	3	0,000	0,82	0,4851
INTERACCIONES					
A*B	0,000	1	0,000	6,82	0,0401
RESIDUOS	0,000	9	0,000		
TOTAL	0,0114	15			

En la tabla 26, se muestra el análisis de varianza de la acidez titulable en el día 5 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL) y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 27

Análisis de varianza de la acidez en el día 10 de la bioconservación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	0,007	1	0,007	15,87	0,0073
B:Concentración de BAL	0,011	1	0,011	25,83	0,0023
C:Repeticiones	0,002	3	0,001	2,43	0,1683
INTERACCIONES					
A*B	0,003	1	0,003	6,81	0,0401
RESIDUOS	0,002	9	0,000		
TOTAL	0,026	15			

En la tabla 27, se muestra el análisis de varianza de la acidez titulable en el día 10 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas) y el Factor B (Concentración de BAL) y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Análisis de varianza para la pérdida de peso

Tabla 28

Análisis de varianza de la pérdida de peso en el día 5 de la bioconservación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	0,100	1	0,100	1512,50	0,0000
B:Concentración de BAL	0,016	1	0,016	242,00	0,0000
C:Repeticiones	0,000	3	0,000	2,00	0,2160
INTERACCIONES					
A*B	0,012	1	0,012	180,50	0,0000
RESIDUOS	0,000	9	0,000		
TOTAL (CORREGIDO)	0,129	15			

En la tabla 28, se muestra el análisis de varianza de la pérdida de peso en el día 5 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL), y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Tabla 29

Análisis de varianza de la pérdida de peso en el día 10 de la bioconservación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Hortalizas	0,235	1	0,235	2288,43	0,0000
B:Concentración de BAL	1,373	1	1,373	13365,08	0,0000
C:Repeticiones	0,000	3	0,000	3,49	0,0989
INTERACCIONES					
A*B	0,388	1	0,388	3782,92	0,0000
RESIDUOS	0,000	9	0,000		
TOTAL (CORREGIDO)	1,99897	15			

En la tabla 29, se muestra el análisis de varianza de la pérdida de peso en el día 10 de la bioconservación de hortalizas con diferentes concentraciones de BAL, se presentó diferencia significativa para el factor A (Hortalizas), Factor B (Concentración de BAL), y la interacción A*B (Hortalizas*Concentración de BAL). Mientras que las repeticiones no reflejaron diferencia significativa, lo que sugiere normalidad en la toma de datos.

Prueba de significación de Tukey para los factores de estudio

Resultados de estudio para las hortalizas (Factor A)

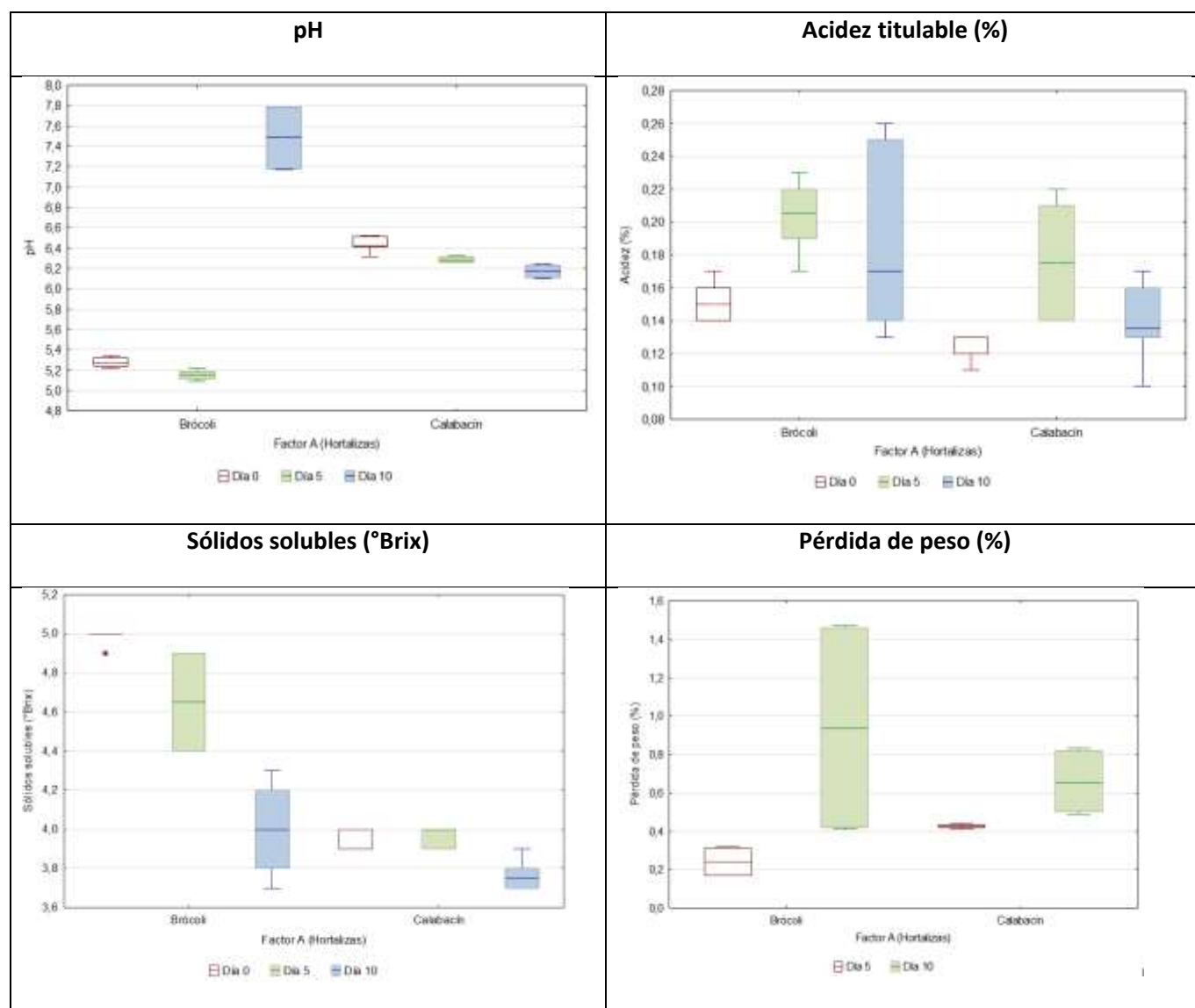
Tabla 30

Resultados de la prueba de Tukey para el Factor A de las variables físico-químicas

Factor A (Hortalizas)	pH	Acidez titulable	°Brix	pH	Acidez titulable	°Brix	Pérdida de peso	pH	Acidez titulable	°Brix	Pérdida de peso
		Día 0			Día 5				Día 10		
Brócoli	5,27 ^B	0,15 ^A	4,98 ^A	5,15 ^B	0,20 ^A	4,65 ^A	0,24 ^A	7,48 ^A	0,18 ^A	4,00 ^A	0,93 ^A
Calabacín	6,43 ^A	0,12 ^B	3,96 ^B	6,28 ^A	0,18 ^B	3,96 ^B	0,42 ^B	6,17 ^B	0,13 ^B	3,78 ^B	0,65 ^B

Figura 7

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



En la tabla 30, se observa que el brócoli presentó mayor valor de acidez titulable y los sólidos solubles, mientras que el calabacín reflejó valores más altos de pH y pérdida de peso en los días de bioconservación.

El pH del calabacín disminuyó en los días de bioconservación, reflejando un pH de 6,43 a 6,28 en el día 5 y 6,17 en el día 10. Por el contrario, el brócoli presentó una reducción de pH en dos tiempos de bioconservación, que fue de 5,27 a 5,15 en el día 5, mientras que en el día 10 el pH incrementó a 7,48.

La acidez en ambas hortalizas incrementó hasta el día 5 de la bioconservación, la acidez del brócoli aumentó de 0,15% a 0,20%, mientras que, en el calabacín fue de 0,12% a 0,18%. A diferencia que, la acidez disminuyó en el día 10 reflejando valores de 0,20% a 0,13% y 0,8% a 0,16% para el brócoli y calabacín respectivamente.

Los sólidos solubles en el brócoli disminuyeron en el periodo de bioconservación, siendo así que se obtuvo valores de 4,98 °Brix a 4,65 °Brix en el día 5 y 4,0 en el día 10. Por el contrario, en el calabacín la concentración de sólidos solubles se mantuvo constante hasta el día 5 (3,96 °Brix), mientras que en el día 10 la concentración disminuyó a 3,78 °Brix.

En la pérdida de peso, en ambas hortalizas se observó un incremento en el tiempo de bioconservación. Con el brócoli aumentó a 0,24% en el día 5 y a 0,93% en el día 10, mientras que con el calabacín aumentó a 0,42% en el día 5 y a 0,65 en el día 10.

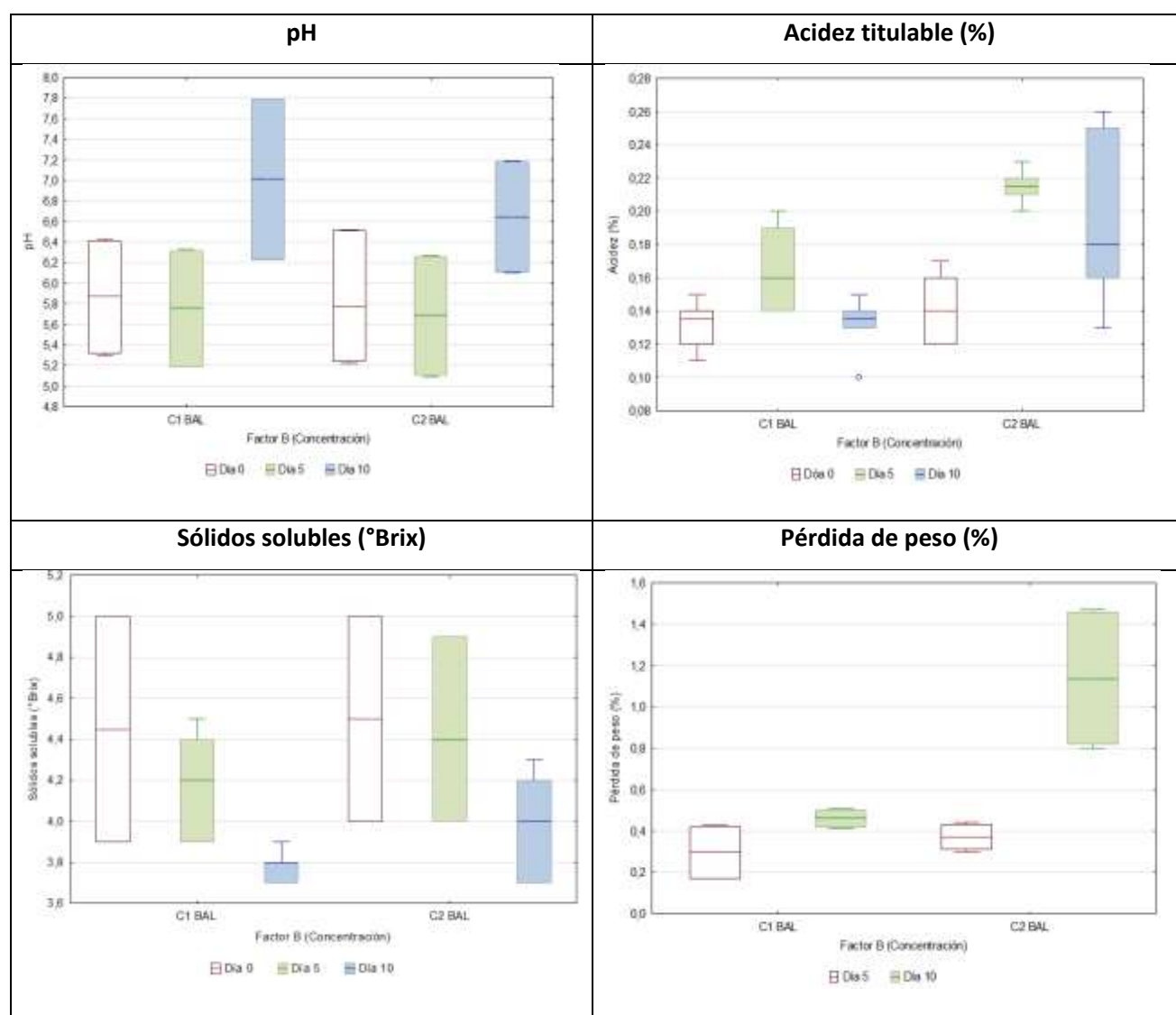
Resultados de estudio para las distintas concentraciones de bacterias ácido lácticas (Factor B)

Tabla 31

Resultados de la prueba de Tukey para el Factor B en las variables físico-químicas

Factor B (Concentración de BAL)	Día 0			Día 5			Día 10				
	pH	Acidez titulable	°Brix	pH	Acidez titulable	°Brix	Pérdida de peso	pH	Acidez titulable	°Brix	Pérdida de peso
1,0E+07 UFC/mL	5,86 ^A	0,13 ^A	4,45 ^A	5,75 ^A	0,16 ^B	4,18 ^B	0,29 ^B	7,01 ^A	0,13 ^B	3,78 ^B	0,46 ^B
2,0E+07 UFC/mL	5,84 ^A	0,14 ^A	4,5 ^A	5,68 ^B	0,21 ^A	4,43 ^A	0,37 ^A	6,64 ^B	0,19 ^A	3,98 ^A	1,13 ^A

Figura 8 Estudio del efecto de las concentraciones de BAL (Factor B) en las variables de estudio



En la tabla 31, se observa que al aplicar ambas soluciones probióticas ($1,0E+07$ UFC/mL y $2,0E+07$ UFC/mL) se incrementó el pH de los tratamientos en el día 10, del mismo la mayor concentración en la solución probiótica incrementó los valores de acidez titulable y la pérdida de peso, mientras que los sólidos solubles se vieron menos afectados aplicando dicha concentración.

El uso de concentraciones al $1,0$ y $2,0E+07$ UFC/mL de BAL redujeron el pH de los tratamientos en el día 5 de la bioconservación, reflejando valores de 5,86 a 5,75 y de 5,84 a 5,68 respectivamente, mientras que en el día 10 se observó que las muestras tratadas con la concentración al $2,0E+07$ UFC/mL de BAL mostraron un menor valor de pH que fue de 6,64 en comparación de la concentración al $2,0E+07$ UFC/mL de BAL que su pH final fue de 7,01.

Las concentraciones al $1,0$ y $2,0E+07$ UFC/mL de BAL incrementan la acidez de las muestras tratadas en el día 5 de la bioconservación, reflejando valores de 0,13 a 0,16 y de 0,14 a 0,21 respectivamente, mientras que en el día 10 se observó que ambas concentraciones ($1,0$ y $2,0E+07$ UFC/mL) redujeron la acidez de los tratamientos a 0,13 y 0,16.

En los sólidos solubles se observó que los tratamientos que fueron aplicados con $2,0E+07$ UFC/mL de BAL reflejaron valores más alto de °Brix, siendo estos de 4,5 a 4,43 para el día 5 y de 3,98 para el día 10, mientras que la concentración al $1,0E+07$ UFC/mL de BAL redujo los °Brix de las muestras tratadas reflejando valores de 4,45 a 4,18 en el día 5 y de 3,78 en el día 10.

En la pérdida de peso, la concentración al $2,0E+07$ UFC/mL de BAL reflejo valores más altos en los días de bioconservación siendo estos 0,37% para el día 5 y de 1,13% para el día 10, mientras que la concentración al $1,0E+07$ UFC/mL de BAL mostró valores más bajos de 0,29% en el día 5 y de 0,46 en el día 10.

Prueba de Tukey para la interacción significativa en la bioconservación

*Análisis de Tukey en la interacción A*B (Hortalizas + Concentración de BAL)*

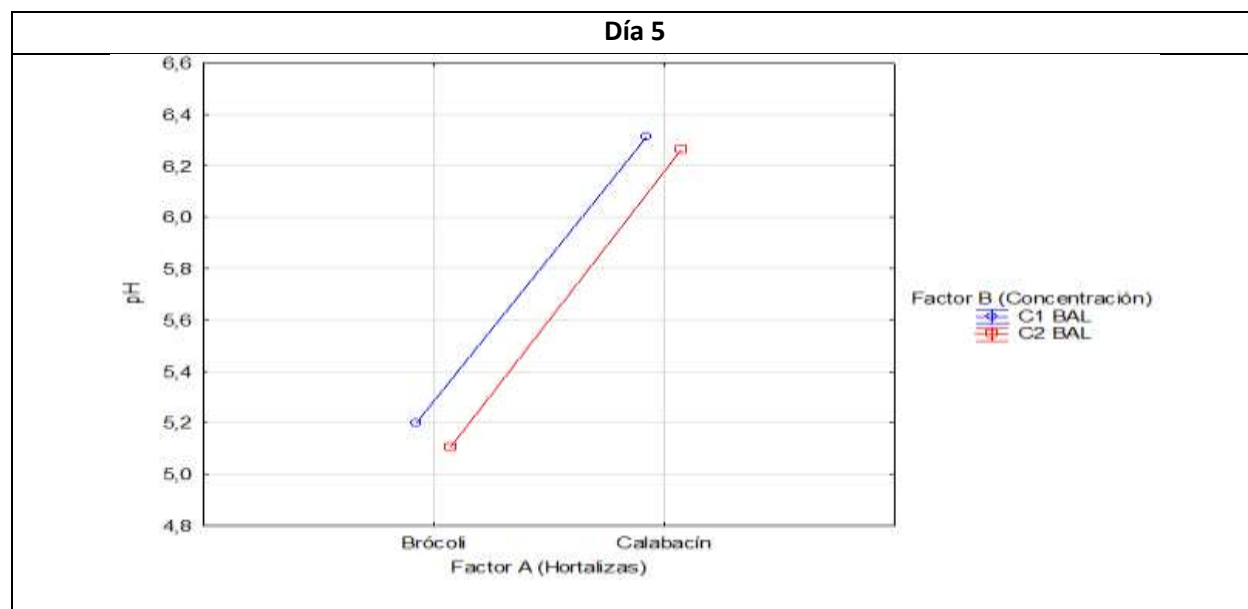
Tabla 32

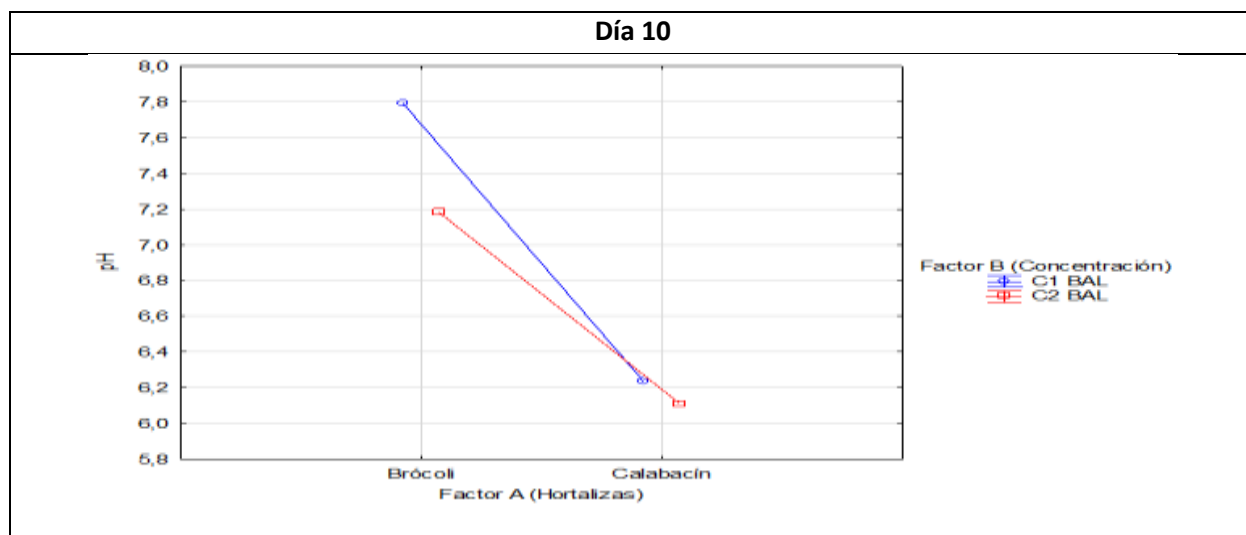
*Resultados de la prueba de Tukey para la interacción A*B en las variables físico-químicas*

Factor A (Hortalizas)	Factor B (Concentración de BAL)	pH	Acidez titulable	°Brix	Pérdida de peso	Día 5		Día 10	
						pH	Acidez titulable	°Brix	Pérdida de peso
Brócoli	1,0E+07 UFC/mL	5,20 ^B	0,19 ^A	4,43 ^B	0,17 ^C	7,79 ^D	0,14 ^A	3,77 ^A	0,42 ^A
Brócoli	2,0E+07 UFC/mL	5,11 ^A	0,22 ^C	4,87 ^C	0,31 ^C	7,18 ^C	0,23 ^B	4,23 ^B	1,46 ^D
Calabacín	1,0E+07 UFC/mL	6,31 ^D	0,14 ^A	3,93 ^A	0,42 ^C	6,23 ^B	0,12 ^A	3,80 ^A	0,50 ^B
Calabacín	2,0E+07 UFC/mL	6,26 ^C	0,21 ^{BC}	4,00 ^A	0,43 ^C	6,11 ^A	0,15 ^A	3,73 ^A	0,82 ^C

Figura 9

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

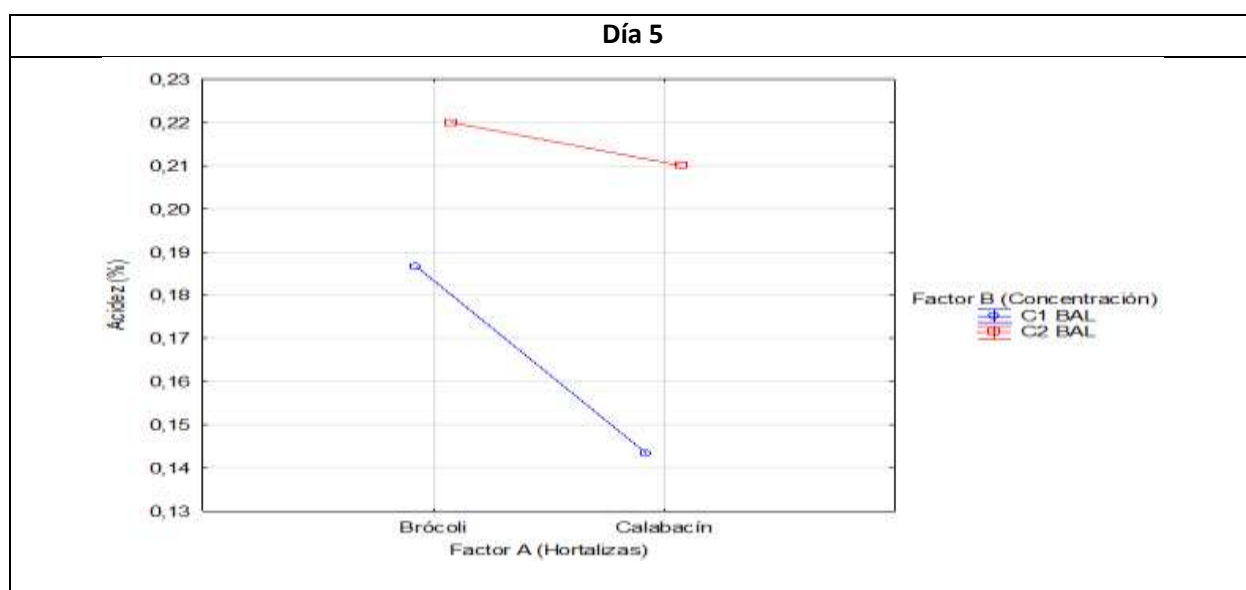


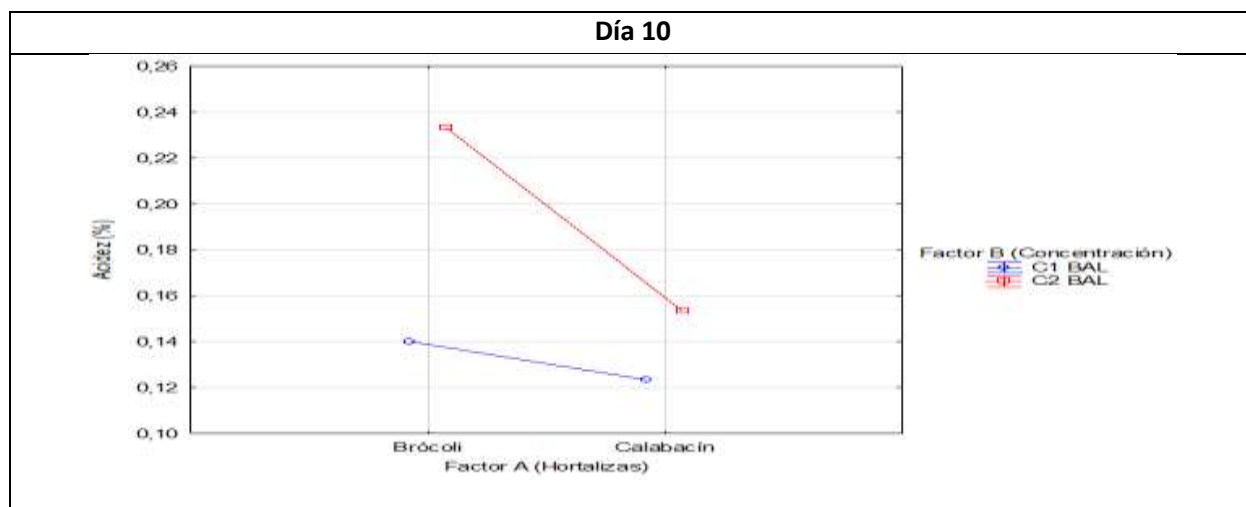


En la figura 9, se muestra la interacción A*B del pH obtenido, identificándose diferencia entre las hortalizas y en las concentraciones de BAL utilizadas en la bioconservación, observándose que el calabacín y el brócoli rociado con una solución $2,0E+07$ UFC/mL de BAL presentó valores menores de pH en comparación con el calabacín y el brócoli rociado con una solución al $1,0E+07$ UFC/mL de BAL.

Figura 10

*Efecto de la interacción A*B de la variable acidez*

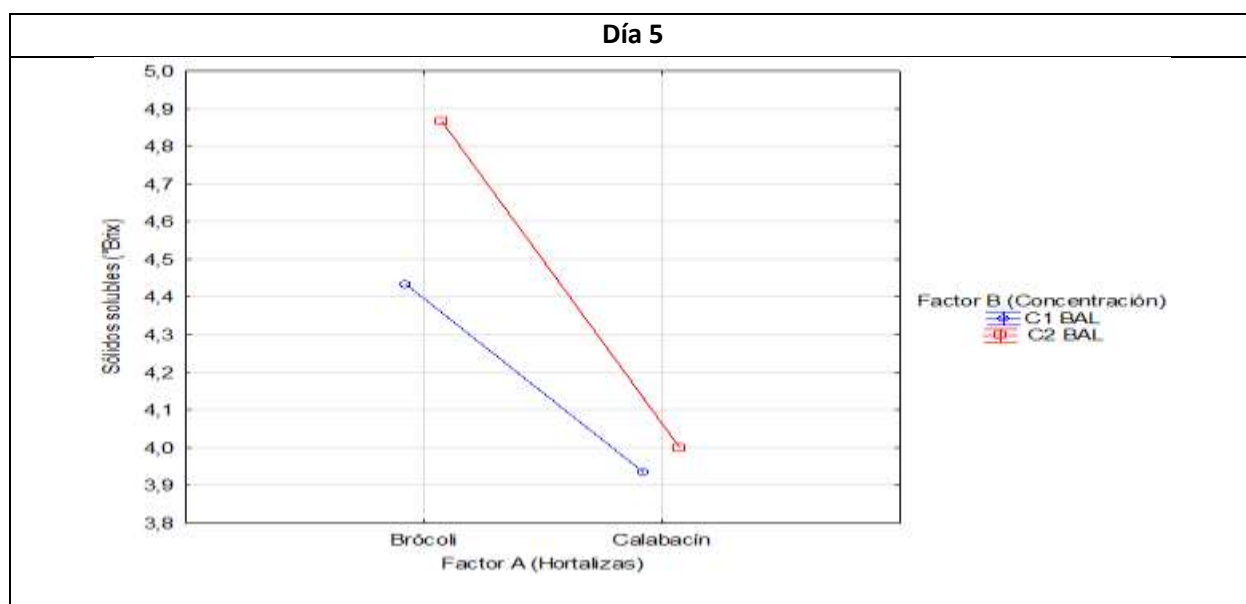


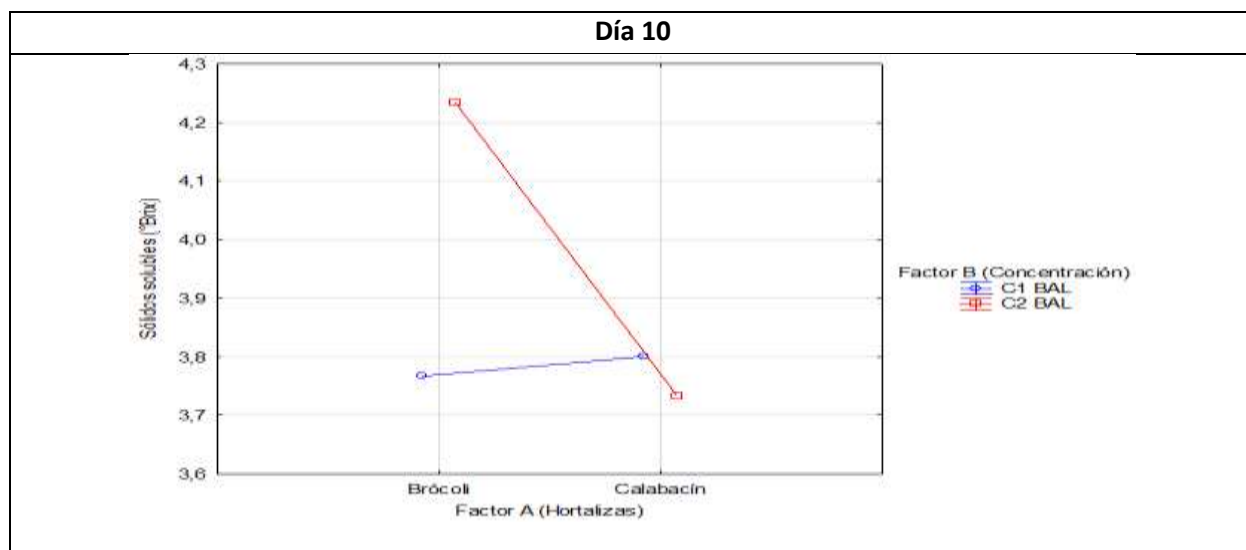


En la figura 10, se muestra la interacción A*B de la acidez obtenida, identificándose diferencia entre las hortalizas y en las concentraciones de BAL utilizadas en la bioconservación, por lo que, el calabacín y el brócoli rociado con una solución $2,0E+07$ UFC/mL de BAL presentó valores mayores de acidez en comparación con el calabacín y el brócoli rociado con una solución $1,0E+07$ UFC/mL de BAL.

Figura 11

*Efecto de la interacción A*B en la variable sólidos solubles*

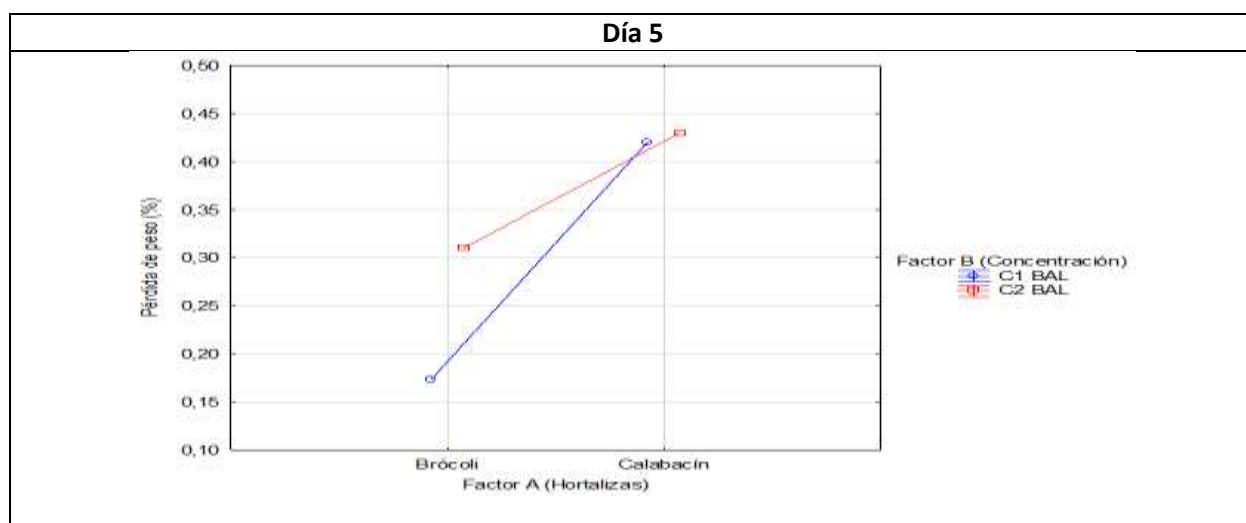


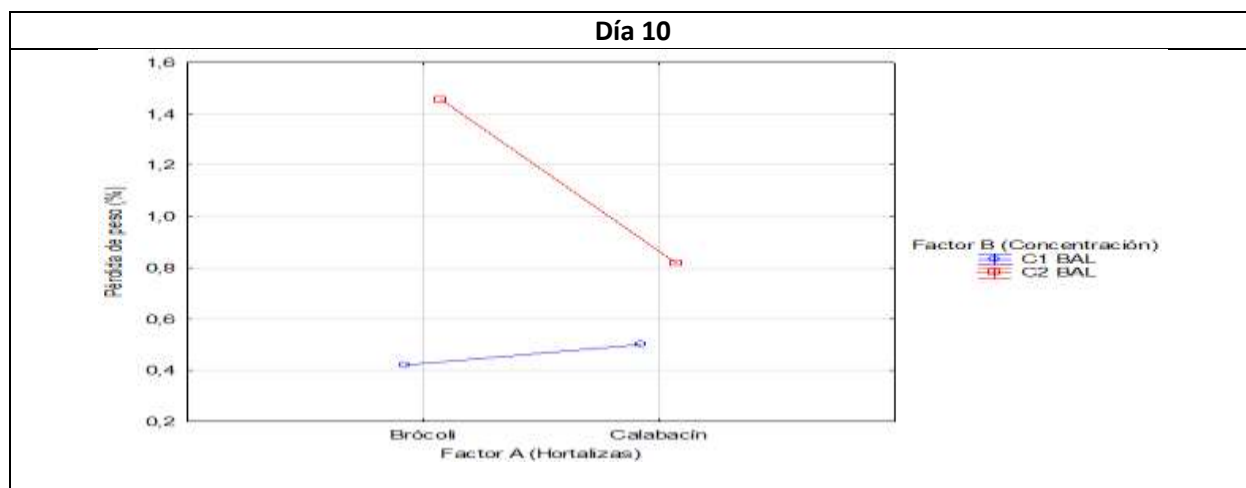


En la figura 11, se muestra la interacción A*B de los sólidos solubles, identificándose diferencia entre las hortalizas y en las concentraciones de BAL utilizadas en la bioconservación, por lo que, el calabacín y el brócoli rociado con una solución $2,0E+07$ UFC/mL de BAL presentó valores mayores de sólidos solubles en comparación con el calabacín y el brócoli rociado con una solución $1,0E+07$ UFC/mL de BAL.

Figura 12

*Efecto de la interacción A*B en la variable pérdida de peso*





En la figura 12, se muestra la interacción A*B de la pérdida de peso, identificándose diferencia entre las hortalizas y en las concentraciones de BAL utilizadas en la bioconservación, por lo que, se observa que el calabacín y el brócoli rociado con una solución $2,0E+07$ UFC/mL de BAL presentó valores mayores de pérdida de peso en comparación con el calabacín y el brócoli rociado con una solución $1,0E+07$ UFC/mL de BAL.

Parámetro microbiológico en las hortalizas

Recuento de bacterias aerobias

Tabla 33

Recuento de bacterias aerobias y mohos/levaduras durante la bioconservación en las hortalizas

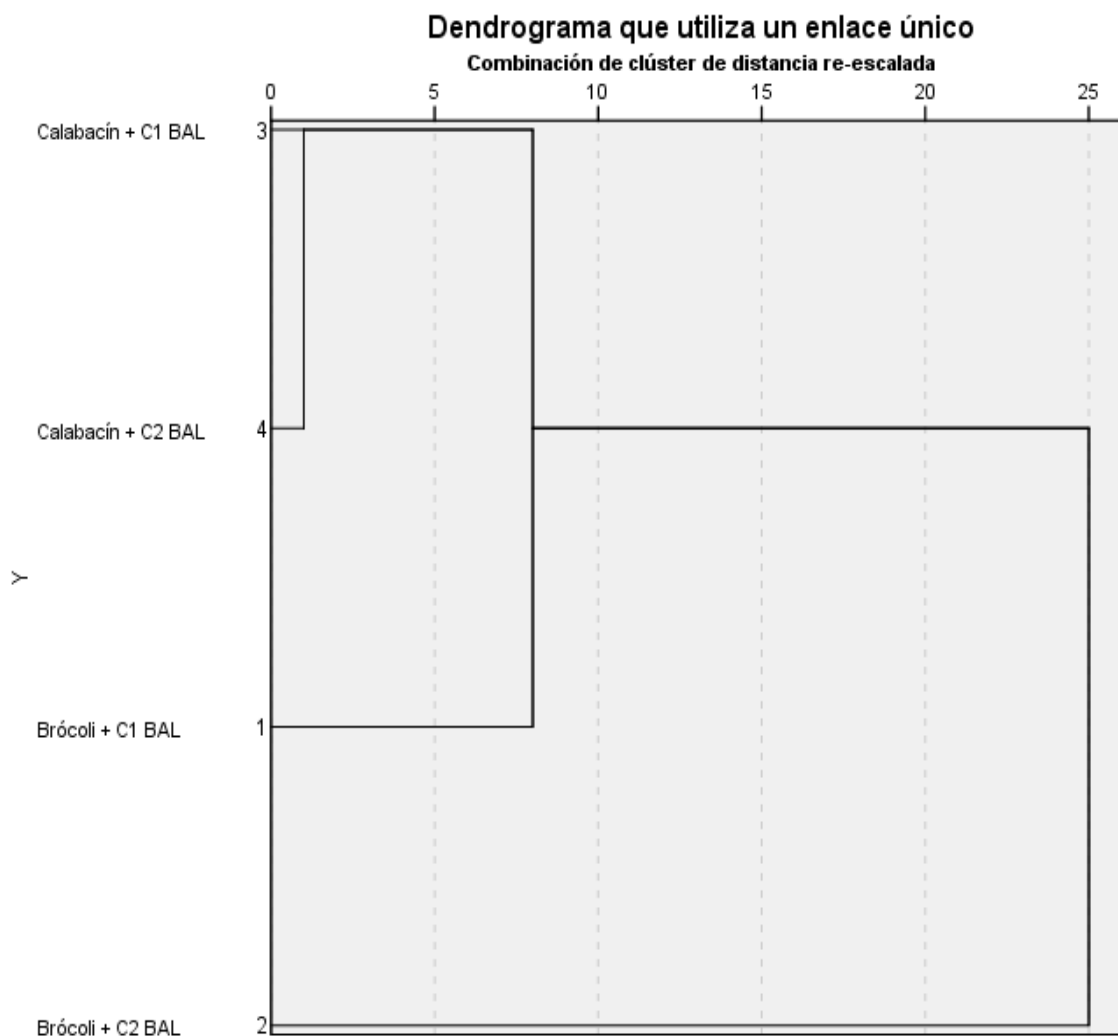
Tratamiento	Día 5		Día 10	
	Aerobios	Mohos/levaduras	Aerobios	Mohos/levaduras
Brócoli + $1E+07$ UFC/mL	$1,9E+05$ UFC/mL	0	$1,7E+05$ UFC/mL	$2,7E+05$ UFC/mL
Brócoli + $2E+07$ UFC/mL	$2,4E+05$ UFC/mL	0	$2,1E+05$ UFC/mL	$1,3E+05$ UFC/mL
Calabacín + $1E+07$ UFC/mL	$1,8E+05$ UFC/mL	0	$1,6E+05$ UFC/mL	0
Calabacín + $2E+07$ UFC/mL	$2,1E+05$ UFC/mL	0	$1,8E+05$ UFC/mL	0

En la tabla 33 se muestra el conteo bacteriano para los días 5 y 10 de bioconservación, en el que se observa una mayor carga bacteriana para los tratamientos que fueron rociados con la solución probiótica de $2,0E+07$ UFC/mL, mientras que la menor carga bacteriana se observa en los tratamientos rociados con la solución de $1,0E+07$ UFC/mL, en este caso el decrecimiento en el conteo bacteriano al día 5 y 10 de la bioconservación está en función del tiempo de exposición del microorganismos, ya que se ha reportado que la carga bacteriana es susceptible a disminuir en al menos 40 veces la concentración en 11 días de exposición, e incluso la cantidad de microorganismos no garantiza la integridad de las bacterias probióticas adherida a la superficie de la hortaliza, en vista que en el conteo de bacterias no se puede observar la presencia de bacterias lesionadas que reducen significativamente su actividad metabólica, por lo que es recomendable utilizar métodos complementarios como la tinción de vivos y muertos para determinar con eficacia la cantidad exacta de células que perduraron en la bioconservación (Nugroho et al., 2020).

Por otro lado, en el conteo de mohos y levaduras no se observó la presencia de estos microorganismos en el día 5 de las bioconservación de todos los tratamientos, lo que sugiere un mantenimiento óptimo de la matriz alimentaria del producto. Sin embargo, en el día 10 se observa la presencia de mohos y levaduras para los tratamientos de brócoli con ambas concentraciones de solución probiótica, observándose una mayor presencia de mohos y levaduras en el tratamiento que se aplicó la menor cantidad de la solución probiótica ($2,7E+03$ UFC/mL), mientras que el tratamiento al que se le aplicó la mayor concentración de la solución probiótica permitió reducir la cantidad de mohos y levaduras a $1,3E+03$ UFC/mL, los valores obtenidos son comparables con los de Tournas (2005) el cual destaca que en el brócoli la presencia de mohos y levaduras puede variar en un rango de $1,4E+04$ a $1,7E+05$ UFC/mL.

Análisis de conglomerados

Figura 13

Dendrograma para los factores de estudio

En la figura 13, se muestra el dendrograma de vecinos cercanos aplicado a los tratamientos de estudio para las variables físico-químicas (pH, acidez, °Brix, pérdida de peso), en el que se observa la formación de un clúster que reflejó estrecha similitud entre los tratamientos de calabacín con ambas concentraciones de BAL. Mientras que el tratamiento con menos similitud es el brócoli con la concentración más alta de BAL ($2,0E+07$ UFC/mL).

Análisis de componentes principales

Tabla 34

Matriz de correlación de componentes principales

	pH Día 0	pH Día 5	pH Día 10	Acidez Día 0	Acidez Día 5	Acidez Día 10	°Brix Día 0	°Brix Día 5	°Brix Día 10	PP Día 5	PP Día 10
pH (Día 0)	1,000	,999	-,931	-,927	-,490	-,634	-,997	-,929	-,627	,854	-,386
pH (Día 5)	,999	1,000	-,927	-,927	-,530	-,647	-,999	-,932	-,621	,852	-,400
pH (Día 10)	-,931	-,927	1,000	,725	,305	,315	,935	,729	,308	-,984	,028
Acidez (Día 0)	-,927	-,927	,725	1,000	,587	,865	,915	,998	,869	-,596	,692
Acidez (Día 5)	-,490	-,530	,305	,587	1,000	,756	,535	,637	,461	-,240	,697
Acidez (Día 10)	-,634	-,647	,315	,865	,756	1,000	,630	,873	,928	-,159	,958
°Brix (Día 0)	-,997	-,999	,935	,915	,535	,630	1,000	,922	,597	-,865	,380
°Brix (Día 5)	-,929	-,932	,729	,998	,637	,873	,922	1,000	,852	-,604	,699
°Brix (Día 10)	-,627	-,621	,308	,869	,461	,928	,597	,852	1,000	-,137	,887
PP (Día 5)	,854	,852	-,984	-,596	-,240	-,159	-,865	-,604	-,137	1,000	,131
PP (Día 10)	-,386	-,400	,028	,692	,697	,958	,380	,699	,887	,131	1,000

En la tabla 34, se presenta la matriz de correlación de componentes principales, en la que se observa que el pH está correlacionado hasta el día 5 con un 0,99. Mientras que la variable acidez se correlaciona con el pH del día 10 y con todos los 3 tiempos de bioconservación con un 0,75, así también los sólidos solubles se correlacionan con el pH del día 10, la acidez del día 0,5 y 10 e incluso con los 3 tiempos de bioconservación con un 0,85. Además, la pérdida de peso se correlaciona con el pH del día 10, la acidez, los sólidos solubles y con los dos tiempos de bioconservación con un 0,13.

Tabla 35

Matriz de componentes

N°	Componentes	Componentes	
		1	2
1	pH (Día 0)	-,959	,208
2	pH (Día 5)	-,964	,266
3	pH (Día 10)	,794	-,608
4	Acidez (Día 0)	,986	,093
5	Acidez (Día 5)	,653	,363
6	Acidez (Día 10)	,827	,563

N°		Componentes	
		1	2
7	°Brix (Día 0)	,958	-,287
8	°Brix (Día 5)	,993	,096
9	°Brix (Día 10)	,784	,510
10	Pérdida de peso (Día 5)	-,684	,725
11	Pérdida de peso (Día 10)	,630	,777

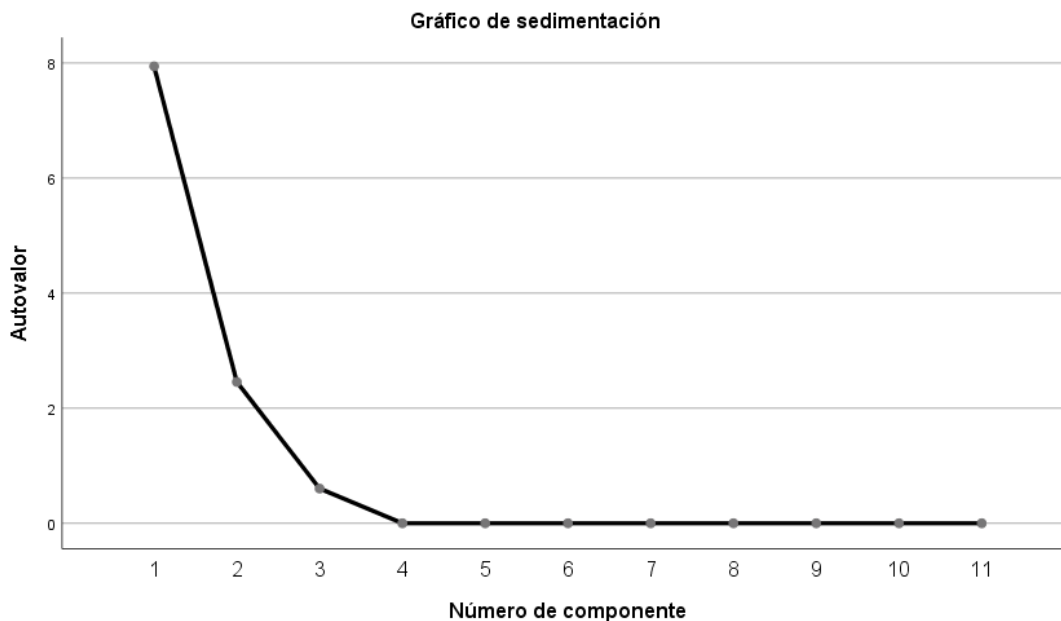
Tabla 36

Porcentajes de varianza total explica

Componentes	Varianza total explicada					
	Autovalores iniciales			Sumas de cargas al cuadrado de la extracción		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	7,943	72,208	72,208	7,943	72,208	72,208
2	2,456	22,324	94,531	2,456	22,324	94,531
3	,602	5,469	100,000			
4	6,708E-16	6,099E-15	100,000			
5	2,801E-16	2,547E-15	100,000			
6	2,001E-16	1,819E-15	100,000			
7	-6,414E-18	-5,831E-17	100,000			
8	-1,619E-16	-1,472E-15	100,000			
9	-2,594E-16	-2,358E-15	100,000			
10	-4,648E-16	-4,225E-15	100,000			
11	-1,597E-15	-1,452E-14	100,000			

Figura 14

Gráfica de sedimentación

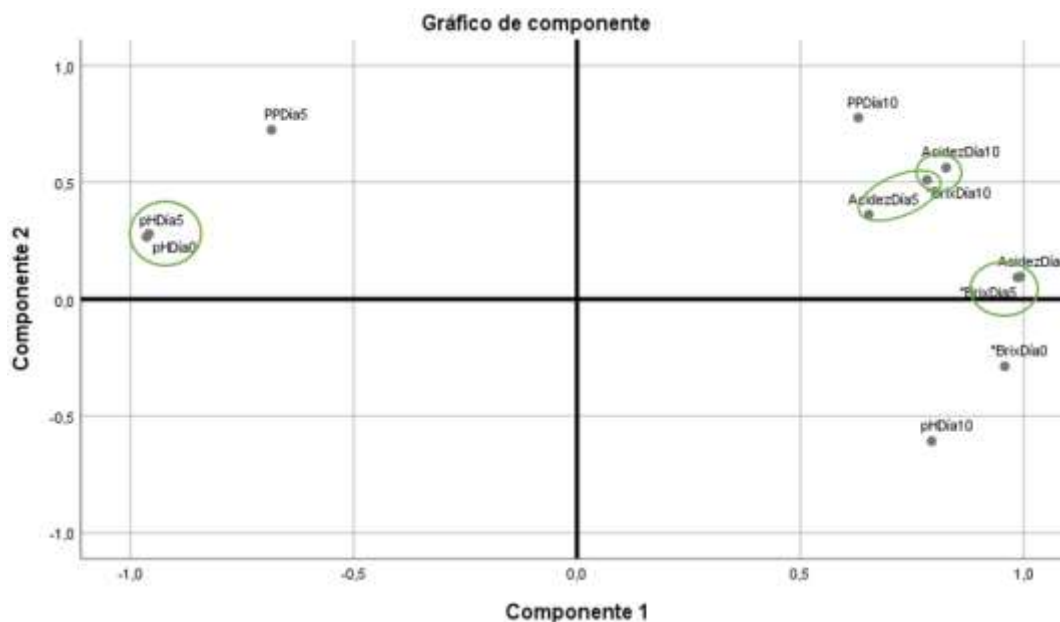


En la figura 14, se presenta el gráfico de sedimentación donde se evaluó las 11 variables de estudio, identificando en base a la varianza explicativa la presencia de 2 componentes con mayor porcentaje de varianza (>1%). El pH del día 0 (componente 1) registra un porcentaje de 72,2 % superior al del resto de variables evaluadas. Además, el pH del día 5 (componente 2) también registró un porcentaje de 22,3%. El resto de variables evaluadas no mostraron valores superiores al 1%, lo que sugiere que son menos relevantes en el estudio.

En general, en la conservación de alimentos se pueden situar una serie de factores extrínsecos e intrínsecos que incrementan el deterioro, en el que se destaca que el pH es uno de los más relevantes junto a la humedad y temperatura, en vista que el aumento sustancial de este parámetro permite el crecimiento de microorganismos como mohos, levaduras y bacterias que producen metabolitos que incrementan la tasa de deterioro en el alimento (Amit et al., 2017).

Figura 15

Gráfica de componentes principales



En la figura 15, se muestra el resultado de los componentes principales en el que se idéntico 1 grupo relacionando en el componente 2, que fue el pH del día 0 y 7, mientras que para el componente 1 se idéntico grupos relacionados entre los °Brix de los días 5 y 10 y la acidez del día 0,5 y 10.

Análisis sensorial

Tabla 37

Análisis sensorial de las hortalizas en el día 10 de la bioconservación

Parámetro	Tratamiento	Día 10
Color	Brócoli + $1,0 \times 10^7$	1,33 ^A
	Brócoli + $2,0 \times 10^7$	1,67 ^A
	Calabacín + $1,0 \times 10^7$	3,33 ^B
	Calabacín + $2,0 \times 10^7$	4,00 ^B
Textura	Brócoli + $1,0 \times 10^7$	2,00 ^A
	Brócoli + $2,0 \times 10^7$	2,33 ^{AB}

Parámetro	Tratamiento	Día 10
Olor	Calabacín + 1,0 x10 ⁷	3,33 ^{AB}
	Calabacín + 2,0 x10 ⁷	3,67 ^B
	Brócoli + 1,0 x10 ⁷	1,33 ^A
	Brócoli + 2,0 x10 ⁷	2,00 ^A
	Calabacín + 1,0 x10 ⁷	3,67 ^B
	Calabacín + 2,0 x10 ⁷	4,00 ^B

Nota. La escala fue Excelente (4), Bueno (3), Regular (2) y Malo (1)

En la tabla 37, se muestran los resultados del análisis sensorial, en el que se identificó que el calabacín roseado con ambas concentraciones (1,0E+07 y 2,0E+07) obtuvo un mayor puntaje por parte del jurado para los 3 parámetros evaluados. Por otro lado, de acuerdo a los encuestados el brócoli tuvo una puntuación inferior a 2 para los parámetros de color y olor, mientras que la textura del brócoli obtuvo una mejor puntuación (≥ 2). En general en base al análisis sensorial se observó que al aplicar la concentración 2,0E+07 UFC/mL de BAL a los tratamientos, se obtuvo valores mayores de aceptación por parte de los encuestados en contraste con la concentración 1,0E+07 UFC/mL de BAL.

Capítulo V

Discusión

El impacto de las bacterias ácido lácticas en la industria ha incentivado a la caracterización de especies de importancia económica, a través del uso de sustratos presentes en cereales y pseudocereales. Este es el caso de las bacterias procedentes de la fermentación de quinua variedad Tunkahuan de la cual se ha logrado caracterizar la especie *Lactococcus lactis subsp. lactis* que es catalogado como un excelente candidato para la bioconservación de alimentos, en parte a su seguridad alimentaria y su capacidad de producir péptidos particulares que limitan e inhiben la presencia de patógenos y agentes del deterioro, que se acoplan a la superficie de los productos, reduciendo su vida útil y siendo una fuente de contaminación para el consumidor (Sadiq et al., 2014). En este sentido, la aplicación de estas bacterias en frutas y especialmente en hortalizas han demostrado resultados favorables que destacan un incremento gradual de la vida útil de productos cortados y completos y una perduración de la calidad nutricional. A pesar de esto, en la actualidad la aplicación de microorganismos beneficios a los productos alimentarios ha estado sujeta a debate, lo que ha limitado el desarrollo de esta tecnología ecológica y segura (Agriopoulou et al., 2020).

En este contexto varios estudios han detallado los notables beneficios de ciertas bacterias del ácido láctico para reducir la carga bacteriana de alimentos, es así que el estudio de Tenea et al. (2018) ha mencionado que cepas de *Lactococcus lactis* son capaces de generar un efecto inhibitor de amplio espectro para ciertos microorganismos patógenos en determinado tiempo, de este modo se ha observado que *E. coli* tiene una inhibición total a las 3 horas de exposición de los péptidos antimicrobianos, mientras que la inhibición de *Salmonella* se obtiene en un periodo de 3 a 7 horas y *Pseudomonas* en 6 horas.

Respecto a las hortalizas (Factor A)

En el pH, el calabacín reflejó una disminución que fue de 6,43 en el día 0 a 6,24 en el día 10, estos valores no son comparables con los de Blanco Díaz (2015), que reportó un incremento gradual del pH en el calabacín recién cortado mostrando valores de 6,46 en el día 0 y 7,06 en el día 10 es importante mencionar que en este estudio la única tecnología de conservación aplicada es el almacenamiento a 6 °C. De acuerdo a Bautista-Gallego et al. (2020) la reducción de pH en hortalizas tratadas con bacterias ácido lácticas se debe al acoplamiento de las bacterias a la superficie lo que permite la producción de ácidos de bajo peso molecular. En lo que respecta al brócoli los valores de pH disminuyeron de 5,27 a 5,15 en el día 5 por acción de las bacterias ácido lácticas, sin embargo, en el día 10 el pH incrementó a 7,48 esto se debe a que el brócoli es susceptible a la degradación de clorofila en función de la temperatura y humedad, lo cual báscula al incremento del pH y la degradación del color de la hortaliza (Manolopoulou & Varzakas, 2016).

En la acidez, el calabacín mostró un incremento de 0,12% a 0,18% en el día 5 y este redujo a 0,13% en el día 10, mientras que el brócoli tuvo valores de 0,15% a 0,2% en el día 5 y disminuyó a 0,18% en el día 10, el incremento de la acidez hasta el día 5 se debe a la producción de varios ácidos como el láctico y acético debido a la presencia de bacterias ácido lácticas (Junnarkar et al., 2019). Mientras que la disminución de la acidez, se puede deber a un probable incremento de la respiración celular o la solubilización de pectinas (Durigan & Mattiuz, 2007).

En los sólidos solubles, los valores registrados para el calabacín fueron 3,96 a 3,78 °Brix y para el brócoli de 4,98 a 4,0 °Brix, esto se debe a que la interacción de las hortalizas con la temperatura incrementa la descomposición metabólica y la senescencia en respuesta a la pérdida de firmeza y humedad propia de la hortaliza almacenada (Mahnen et al., 2006).

En la pérdida de peso el calabacín presentó mejor consistencia mostrando valores de 0,42% en el día 5 a 0,65% en el día 10, en contraparte con el brócoli que su pérdida de peso fue de 0,24% en el día 5 a 0,93% en el día 10. En hortalizas la pérdida de peso está ligada a factores ambientales que afectan la integridad del alimento y que influyen en la firmeza lo que ocasiona pérdida de biomasa en la hortaliza. Por otro lado, de acuerdo a Shakeel et al. (2019) el brócoli es más susceptible a las condiciones ambientales y en especial a la humedad, por lo que es importante controlar parámetros de temperatura y humedad para reducir la pérdida de peso en esta hortaliza.

Respecto a las diferentes concentraciones de bacterias ácido lácticas (Factor B)

En el pH, se observó que la solución de $2,0E+07$ UFC/mL generó valores más bajos de pH (5,84 en el día 0 y 6,64 en el día 10), en contraste con la solución de $1,0E+07$ UFC/mL que tuvo valores de 5,86 en el día 0 y 7,01 en el día 10. De acuerdo a Bautista-Gallego et al. (2020) la reducción de pH se debe al correcto acoplamiento de las bacterias a la superficie, lo que permite la producción de ácidos de bajo peso molecular.

En la acidez, los valores registrados fueron de 0,14% en el día 0 y 0,19% para el día 10 al utilizar la solución de $2,0E+07$ UFC/mL, mientras que la solución de $1,0E+07$ UFC/mL reflejó una acidez de 0,14% en el día 0 y 0,13% en el día 10. En este caso el incremento de acidez se debe a la producción de ácido láctico, fórmico y acético por parte de las bacterias ácido lácticas, las cuales de acuerdo a Nugroho et al. (2020) tienen altas tasas de producción de ácidos orgánicos en especial cuando se trabaja con cepas de *L. Lactis* las que reflejan una producción exponencial de ácidos al emplear una elevada cantidad de UFC y prolongar el periodos de interacción.

En los sólidos solubles, se obtuvo valores de 4,5 °Brix en el día 0 a 3,98 °Brix en el día 10, al aplicar la solución de $2,0E+07$ UFC/mL, mientras que la solución de $1,0E+07$ UFC/mL reflejó 4,45 °Brix en el día 0 y 3,78 °Brix en el día 10. En este caso la aplicación de ambas soluciones de BAL no influyeron

drásticamente en esta variable, esto debido a que se ha reportado que la aplicación de altas concentraciones de probióticos no influye sobre gran parte de las cualidades sensoriales en periodos prolongados de almacenamiento que van de 9 a 11 días (Siroli et al., 2015).

En la pérdida de peso, se obtuvo valores de 0,37% en el día 0 y 1,13% en el día 10, al aplicar la solución de $2,0E+07$ UFC/mL, mientras que la solución de $1,0E+07$ UFC/mL reflejó un valor de 0,29% en el día 0 a 0,46% en el día 10. De acuerdo a Ruiz Cruz et al. (2006) un elevado contenido de bacterias del ácido láctico en hortalizas incrementa la pérdida de firmeza e integridad de los tejidos por acción de los ácidos orgánicos producidos, lo que repercute en la biomasa de la hortaliza.

Respecto a la interacción A*B (Hortalizas + Concentración de BAL)

En el pH, se observó diferencia significativa entre los tratamientos, mostrando valores de 5,20 y 5,11 en el día 5, para la interacción entre el brócoli y ambas soluciones probióticas, mientras que la interacción del calabacín con las soluciones probióticas mostraron valores de 6,31 y 6,26 en el día 5. Por otro lado, los valores registrados para el día 10 fueron de 7,79 y 7,18 para la interacción de brócoli con ambas soluciones probióticas y de 6,23 a 6,11 en el calabacín bajo las mismas condiciones. En el calabacín y brócoli los valores de pH se ven reducidos mayoritariamente al utilizar la solución probiótica de $2,0E+07$ UFC/mL, esto es debido a que la adhesión de las bacterias del ácido láctico a la superficie genera una interacción entre matriz alimentaria y microorganismos, de la cual se obtiene como resultados la producción de ciertos ácidos orgánicos en respuesta al metabolismo de las bacterias, lo que representará una acidificación del medio (Bautista-Gallego et al., 2020), esto se correlaciona con los resultados obtenidos en la gráfica de sedimentación (Figura 15) que detalla que el pH es un componente principal que influye en la bioconservación de hortalizas. Para el caso puntual las interacciones del brócoli en el día 10, el aumento se puede deber a otros factores que estrictamente no se asocian a la presencia de bacterias probióticos en la superficie y más bien puede representar una degradación

natural por parte de la hortaliza en respuesta a ciertos factores ambientales (Manolopoulou & Varzakas, 2016).

En la acidez el mejor efecto se obtuvo en las interacciones de brócoli y calabacín con la solución probiótica de $2,0E+07$ UFC/mL registraron valores más altos de acidez 0,22% y 0,21% respectivamente, esto debido a que la tasa de producción de ácidos orgánicos está en función del tipo de microorganismo, de esta forma el empleo de *L. lactis* en este proceso incrementan la producción de ácidos específicos que incrementarían la acidez de los tratamientos. (Nugroho et al., 2020). Por otro lado, la reducción de acidez que fue de 0,23% a 0,15% para los tratamientos de brócoli y calabacín con la solución bacteriana de $2,0E+07$ UFC/mL en el día 10 se debe en gran parte al deterioro de la materia orgánica por la exposición prolongada al medio ambiente y al no controlar variables como la temperatura y humedad (Shakeel et al., 2019).

En los sólidos solubles la interacción de brócoli con la solución de $1,0E+07$ UFC/mL registró valores de 4,43 °Brix en el día 5 y de 3,77 °Brix en el día 10, la cual es diferente a la interacción brócoli con solución de $1,0E+07$ UFC/mL que reflejó un valor de 4,87 °Brix en el día 5 y de 4,23 en el día 10, esto se debe a que el brócoli es más susceptible al deterioro lo que influye en la cantidad de sólidos solubles (Mahnen et al., 2006). Mientras que la interacción de calabacín con ambas soluciones probióticas no fueron significativas lo que se ajusta a lo expuesto por Siroli et al. (2015).

En la pérdida de peso los tratamientos más significativos fueron brócoli y calabacín con la solución probiótica de $2,0E+07$ UFC/mL, registrando valores de 0,31% y 0,43% en el día 5 y 1,46% y 0,82% en el día 10 respectivamente, varias investigaciones han destacado que un elevado contenido de bacterias reduce la firmeza e integridad de los tejidos vegetales lo que incrementa su deterioro ocasionando pérdidas sustanciales en la biomasa de las hortalizas (Ruiz Cruz et al., 2006). Mientras que los tratamientos a los que se aplicó menos concentración de la solución probiótica ($1,0E+07$ UFC/mL)

reflejaron una menor pérdida de peso esto en respuesta a una menor carga bacteriana en la superficie del material vegetal.

Capítulo VI

Conclusiones

Factor A (Hortalizas)

Con respecto a los resultados físico-químicos de las hortalizas, se concluye que la aplicación de BAL tuvo mejores efectos para el calabacín en los 10 días de bioconservación, mientras que el brócoli mostró un efecto positivo hasta el día 5.

Las variables de pH, acidez y sólidos solubles fueron más consistentes en el transcurso de la bioconservación del calabacín. Mientras que la pérdida de peso fue menor en el brócoli hasta el día 5.

En lo que respecta al conteo bacteriano, el brócoli presentó un mayor valor de UFC por mL en los días 5 y 10 de la bioconservación.

En base a esto, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que el uso de BAL si influye en la bioconservación de hortalizas.

Factor B (Concentración de bacterias ácido lácticas)

En base a los resultados físico-químicos se concluye que, si existe diferencia significativa en la concentración de las soluciones utilizadas, identificándose que la solución de $2,0 \times 10^7$ UFC/mL tuvo mejor efecto en las variables de estudio.

Al aplicar una concentración de $2,0 \times 10^7$ UFC/mL se observó un efecto positivo para las variables de pH, acidez y °Brix. Mientras que la pérdida de peso y el conteo bacteriano, tiende a decrecer cuando se aplica una solución concentrada de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que la aplicación de diferentes concentraciones de BAL si influye en la bioconservación de hortalizas.

Interacción A*B (Hortalizas + Concentración de BAL)

En base a los datos obtenidos, se concluye que el tratamiento calabacín + concentración $2,0E+07$ UFC/mL del probiótico es más efectivo para mantener propiedades como pH, acidez y °Brix.

Así también, los tratamientos que generaron menos efecto en la variable de pérdida de peso, son los conformados por brócoli y calabacín rociados con la solución probiótica de menor concentración ($1,0E+07$ UFC/mL).

Con respecto al conteo bacteriano, los tratamientos que reflejaron un menor contenido de aerobios fueron los que se roció con la solución probiótica de menor concentración, mientras que al aplicar una mayor concentración de la solución probiótica se observa menor población de mohos y levaduras en el tratamiento de brócoli + $2,0E+07$ UFC/mL.

Recomendaciones

En función de los resultados obtenidos de las variables físico-químicas como pH, acidez, sólidos solubles, pérdida de peso y conteo bacteriano, se recomienda la aplicación de una solución probiótica en el brócoli hasta el día 5 de conservación, mientras que para el calabacín se recomienda extender la aplicación de la solución hasta el día 10.

En lo que respecta a las concentraciones de soluciones probióticas se recomienda aplicar una solución de $1,0 \text{ E}+07 \text{ UFC/mL}$ en vista que la consistencia de los valores es comparable a la aplicación de una concentración más alta del probiótica, y además esta concentración permitió reducir la pérdida de peso de las muestras analizadas.

De esta forma se recomienda realizar futuras investigaciones que combinen tecnologías biotecnológicas y convencionales en la conservación de hortalizas para prolongar el periodo de almacenamiento.

Capítulo VII

Bibliografía

- Adebo, J. A., Njobeh, P. B., Gbashi, S., Oyedeji, A. B., Ogundele, O. M., Oyeyinka, S. A., & Adebo, O. A. (2022). Fermentation of Cereals and Legumes: Impact on Nutritional Constituents and Nutrient Bioavailability. *Fermentation*, 8(2), 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation8020063>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. *Microorganisms*, 8(6), 952. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060952>
- Amit, S. K., Uddin, Md. M., Rahman, R., Islam, S. M. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Angeli, V., Miguel Silva, P., Crispim Massuela, D., Khan, M. W., Hamar, A., Khajehei, F., Graeff-Hönniger, S., & Piatti, C. (2020). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): An Overview of the Potentials of the “Golden Grain” and Socio-Economic and Environmental Aspects of Its Cultivation and Marketization. *Foods*, 9(2), 216. <https://doi.org/10.3390/foods9020216>
- Baral, K. C., Bajracharya, R., Lee, S. H., & Han, H.-K. (2021). Advancements in the Pharmaceutical Applications of Probiotics: Dosage Forms and Formulation Technology. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 7535-7556. <https://doi.org/10.2147/IJN.S337427>
- Bautista-Gallego, J., Medina, E., Sánchez, B., Benítez-Cabello, A., & Arroyo-López, F. N. (2020). Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas y Aceites*, 71(2), e358-e358. <https://doi.org/10.3989/gya.0344191>
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4(4), 665-684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

- Blanco Díaz, M. T. (2015). *Estudio del potencial de variedades de calabacín para ser transformadas en un producto IV Gama. Suitability of summer squash cultivar to be processed as fresh-cut products*. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/12876>
- Bleoanca, I., Lanciu, A., Patraşcu, L., Ceoromila, A., & Borda, D. (2022). Efficacy of Two Stabilizers in Nanoemulsions with Whey Proteins and Thyme Essential Oil as Edible Coatings for Zucchini. *Membranes*, 12(3), 326. <https://doi.org/10.3390/membranes12030326>
- Borges, F., Briandet, R., Callon, C., Champomier-Vergès, M.-C., Christieans, S., Chuzeville, S., Denis, C., Desmasures, N., Desmonts, M.-H., Feurer, C., Leroi, F., Leroy, S., Mounier, J., Passerini, D., Pilet, M.-F., Schlusshuber, M., Stahl, V., Strub, C., Talon, R., & Zagorec, M. (2022). Contribution of omics to biopreservation: Toward food microbiome engineering. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.951182>
- Casas Forero, N., Salgado, Y. N., Moncayo, D. C., & Cote, S. P. (2016). *Efecto del proceso de malteado en la calidad y estabilidad de una bebida de quinua (Chenopodium quinoa Willd) y mango (Mangifera indica)*. Universidad Nacional de Trujillo. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/1131>
- Cortés-Sánchez, A. D. J. (2018). BIOCONSERVACIÓN, ALIMENTOS Y PESCADO. *Agro Productividad*, 11(11). <https://doi.org/10.32854/agrop.v11i11.1276>
- Craine, E. B., & Murphy, K. M. (2020). Seed Composition and Amino Acid Profiles for Quinoa Grown in Washington State. *Frontiers in Nutrition*, 7, 126. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00126>
- Duque, P., & Murillo, A. (2021). Análisis de los canales de comercialización del brócoli en Ecuador | Revista Tecnológica—ESPOL. *Revista Tecnológica ESPOL*, 33. <https://doi.org/10.37815/rte.v33n3.857>

- Durigan, M. F. B., & Mattiuz, B.-H. (2007). Efeito de injúrias mecânicas na qualidade de abobrinhas armazenadas em condição ambiente. *Horticultura Brasileira*, 25, 291-295.
<https://doi.org/10.1590/S0102-05362007000200032>
- FAO. (2019). *STATE OF FOOD AND AGRICULTURE 2019 (SPANISH EDITION): Moving forward on food loss and waste ... reduction*. FOOD & AGRICULTURE ORG.
- García, A., Aguado, E., Cebrián, G., Iglesias, J., Romero, J., Martínez, C., Garrido, D., Reboloso, M. del M., Valenzuela, J. L., & Jamilena, M. (2020). Effect of Ethylene-Insensitive Mutation *etr2b* on Postharvest Chilling Injury in Zucchini Fruit. *Agriculture*, 10(11), 532.
<https://doi.org/10.3390/agriculture10110532>
- Gómez-García, M., Sol, C., de Nova, P. J. G., Puyalto, M., Mesas, L., Puente, H., Mencía-Ares, Ó., Miranda, R., Argüello, H., Rubio, P., & Carvajal, A. (2019). Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine Health Management*, 5(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s40813-019-0139-4>
- Gómez-Ramírez, A., López-Santos, C., Cantos, M., García, J. L., Molina, R., Cotrino, J., Espinós, J. P., & González-Elipe, A. R. (2017). Surface chemistry and germination improvement of Quinoa seeds subjected to plasma activation. *Scientific Reports*, 7(1), 5924. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06164-5>
- Guallasamín-Dávila, A., Ávila-Vélez, J., & Sotomayor-Grijalva, C. (2018). Elaboración de una bebida pasteurizada a partir de un extracto proteico de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Enfoque UTE*, 9(2), 36-47.
- Guevara, R. M. B., Rodríguez, D. F. C., González, I. R., & Charfuelan, M. L. I. (2021). Influencia de la quinua en las propiedades fisicoquímicas en una bebida fermentada—Revisión. *Documentos de Trabajo ECBTI*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.22490/ECBTI.4795>

Hao, Y., Hong, Y., Guo, H., Qin, P., Huang, A., Yang, X., & Ren, G. (2022). Transcriptomic and metabolomic landscape of quinoa during seed germination. *BMC Plant Biology*, *22*, 237.

<https://doi.org/10.1186/s12870-022-03621-w>

Henderson, C. M., Zeno, W. F., Lerno, L. A., Longo, M. L., & Block, D. E. (2013). Fermentation Temperature Modulates Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylinositol Levels in the Cell Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5345-5356. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-13>

Hidalgo Ortiz, J. L., & Tulcanaza Pala, F. V. (2016). *Industrialización de granos andinos” cerveza artesanal de quinua “atuy”*. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/3593>

Hinojosa, L., Leguizamo, A., Carpio, C., Muñoz, D., Mestanza, C., Ochoa, J., Castillo, C., Murillo, A., Villacréz, E., Monar, C., Pichazaca, N., & Murphy, K. (2021). Quinoa in Ecuador: Recent Advances under Global Expansion. *Plants*, *10*(2), 298. <https://doi.org/10.3390/plants10020298>

Hoyos, J. L., Urbano, F. E., Castillo, H. S. V., Sanchez, S. A. M., & Navia, D. P. (2010). Determinación de parámetros fermentativos para la formulación y obtención de vino de naranja (*citrus sinensis*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*(1), 26-34.

Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, *10*(12), 3131.

<https://doi.org/10.3390/foods10123131>

NTE INEN 389. (1985). Conservas vegetales: Determinación de la concentración de ion hidrógeno (pH). Norma técnica ecuatoriana. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/389.pdf>

NTE INEN 0381. (1985). Conservas vegetales: determinación de acidez titulable método potenciométrico de referencia. Norma técnica ecuatoriana.

<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.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>
- Junnarkar, M., Pawar, S., Gaikwad, S., Mandal, A., Jass, J., & Nawani, N. (2019). Probiotic potential of lactic acid bacteria from fresh vegetables: Application in food preservation. *INDIAN J EXP BIOL*, 14.
- Kim, H. Y., Ediriweera, M. K., Boo, K.-H., Kim, C. S., & Cho, S. K. (2021). Effects of Cooking and Processing Methods on Phenolic Contents and Antioxidant and Anti-Proliferative Activities of Broccoli Florets. *Antioxidants*, 10(5), 641. <https://doi.org/10.3390/antiox10050641>
- Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (2011). Lactic acid bacteria: Life after genomics: Editorial. *Microbial Biotechnology*, 4(3), 318-322. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00262.x>
- Kumar, D., & Kalita, P. (2017). Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. *Foods*, 6(1), 8. <https://doi.org/10.3390/foods6010008>
- Llacsá Mamani, J. D., & Cucho Arapa, A. L. (2020). Cinética de fermentación de la chicha de quinua evaluado en tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Universidad Nacional del Altiplano*. <http://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3280494>
- López Paredes, J. M. (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)*. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/25894>
- Mahnen, B. V. C., Dhatt, A. S., Kumar, S., & Manohar, L. (2006). Effect of pre-storage treatments and packaging on the storage behaviour and quality of Kinnow mandarin. *Journal of Food Science and Technology*, 43, 589-593.
- Makarova, K. S., & Koonin, E. V. (2007). Evolutionary Genomics of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1199-1208. <https://doi.org/10.1128/JB.01351-06>

- Maldonado-Jibaja, R., Carrillo-Herrera, P., Ramírez-Cárdenas, L., & Carvajal-Larenas, F. E. (2018). Elaboración de una bebida fermentada a base de quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Enfoque UTE*, 9(3), 1-11.
- Maliro, M. F. A., Guwela, V. F., Nyaika, J., & Murphy, K. M. (2017). Preliminary Studies of the Performance of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Genotypes under Irrigated and Rainfed Conditions of Central Malawi. *Frontiers in Plant Science*, 8, 227.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00227>
- Manolopoulou, E., & Varzakas, T. (2016). Effect of Temperature in Color Changes of Green Vegetables. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 4(Special Issue Nutrition in Conference October 2016), 10-17.
- Martínez-Valdivieso, D., Font, R., Fernández-Bedmar, Z., Merinas-Amo, T., Gómez, P., Alonso-Moraga, Á., & Del Río-Celestino, M. (2017). Role of Zucchini and Its Distinctive Components in the Modulation of Degenerative Processes: Genotoxicity, Anti-Genotoxicity, Cytotoxicity and Apoptotic Effects. *Nutrients*, 9(7), 755. <https://doi.org/10.3390/nu9070755>
- McElhinny, E., Peralta, E., Mazón, N., Danial, D. L., Thiele, G., & Lindhout, P. (2007). Aspects of participatory plant breeding for quinoa in marginal areas of Ecuador. *Euphytica*, 153(3), 373-384. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9200-x>
- Mills, S., Ross, R. P., & Coffey, A. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Lactococcus lactis*. En J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 132-137). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00266-1>
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziarsolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., Ferriol, M., Gómez, P., Jamilena, M., Mueller, L., Picó, B., & Cañizares, J. (2018). De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the Cucurbita genus. *Plant Biotechnology Journal*, 16(6), 1161-1171. <https://doi.org/10.1111/pbi.12860>

- Morocho, M. T., & Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos e cientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 46, 93-103.
- Narváez Pallo, J. A. (2019). *Desarrollo de un prototipo de coliflor y brócoli empacada lista para el consumo en la parroquia Chuquiribamba, cantón y provincia de Loja*.
<https://dspace.unl.edu.ec//handle/123456789/23069>
- Nugroho, A. D. W., Kleerebezem, M., & Bachmann, H. (2020). A Novel Method for Long-Term Analysis of Lactic Acid and Ammonium Production in Non-growing *Lactococcus lactis* Reveals Pre-culture and Strain Dependence. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 580090.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.580090>
- Onofre Huamanchoque, C. (2018). Efecto del Proceso de Fermentación Alcohólica de la Chicha de Quinoa (*chenopodium quinoa willd*) sobre su contenido de Antioxidante, Vitaminas y Minerales. *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*.
<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/8537>
- Preciado, G. M., EscalanteMinakata, P., Castro, J. A. O., Junquera, V. I., Chávez, J. A. M., González, C. N. A., & Herrera, R. R. (2013). *Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos*. 7.
- Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, G. E., & Gänzle, M. G. (2022). After the storm—Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae. *JDS Communications*, 3(3), 222-227.
<https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información tecnológica*, 27(6), 115-128. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>
- Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E., & Izquierdo-Reyes, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y ciencia*, 25(2), 159-171.

- Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H., & Yu, H. (2018). Antimicrobial Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Homemade Fermented Foods. *BioMed Research International*, 2018, 5416725. <https://doi.org/10.1155/2018/5416725>
- Rua Carpio, J. S. (2022). *Evaluación de residuos de coberturas vegetales como acolchado en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Zucchini (Cucurbita pepo L.) con labranza reducida*. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/38147>
- Ruiz Cruz, S., Luo, Y., Gonzalez, R. J., Tao, Y., & González, G. A. (2006). Acidified sodium chlorite as an alternative to chlorine to control microbial growth on shredded carrots while maintaining quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(12), 1887-1893. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2550>
- Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P. S., Fontana, C., Saavedra, L., Vignolo, G., & Hebert, E. M. (2016). Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1289-1301. <https://doi.org/10.1111/jam.13104>
- Russo, P. (2014). *Fresh-Cut Pineapple as a New Carrier of Probiotic Lactic Acid Bacteria*.
- Sadiq, S., Imran, M., Hassan, M. N., Iqbal, M., Zafar, Y., & Hafeez, F. Y. (2014). Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.018>
- Shakeel, M., Khan, S. N., Saleem, Y., Burgess, P. J., & Shafiq, S. (2019). Colour, water and chlorophyll loss in harvested broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica*) under ambient conditions in Pakistan. *Scientia Horticulturae*, 246, 858-861. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.041>

- Sharma, A., Lee, S., & Park, Y.-S. (2020). Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: A review. *Food Science and Biotechnology*, *29*(10), 1301-1318.
<https://doi.org/10.1007/s10068-020-00802-x>
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation—A review. *Open Veterinary Journal*, *8*(1), 104-111. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology*, *47*, 74-84.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.008>
- Sukhorukov, A. P., & Zhang, M. (2013). Fruit and Seed Anatomy of Chenopodium and Related Genera (Chenopodioideae, Chenopodiaceae/Amaranthaceae): Implications for Evolution and Taxonomy. *PLOS ONE*, *8*(4), e61906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061906>
- Tenea, G. N., Hurtado, P., & Ortega, C. (2018). Inhibitory Effect of Substances Produced by Native Lactococcus lactis Strains of Tropical Fruits towards Food Pathogens. *Preventive Nutrition and Food Science*, *23*(3), 260-268. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.260>
- Tixicuro, J. M. F., Chanfrau, J. M. P., Céspedes, I. S. S. de, Fiallos, M. V. L., & Pérez, J. N. (2021). Optimización estadística de un bioproceso de ácido láctico a partir de lactosuero. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, *5*(3), 3259-3274. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i3.530
- Tournas, V. H. (2005). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, *99*(1), 71-77.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.009>
- Valencia, B. P. Y. E. (2015). Evaluacion tecnologica de la germinacion y clarifi cacion de las bebidas tradicionales fermentadas y pasteurizadas de maiz morado (zea mays) y quinua (chenopodium

quinua) variedad inia 420 negra collana. *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*.

<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/159>

Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., Valenzuela-González,

F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297-313.

<https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>

Weitbrecht, K., Müller, K., & Leubner-Metzger, G. (2011). First off the mark: Early seed germination.

Journal of Experimental Botany, 62(10), 3289-3309. <https://doi.org/10.1093/jxb/err030>

Wilson, H. D. (1980). Artificial Hybridization Among Species of *Chenopodium* sect. *Chenopodium*.

Systematic Botany, 5(3), 253. <https://doi.org/10.2307/2418372>

Yu, J., Song, Y., Ren, Y., Qing, Y., Liu, W., & Sun, Z. (2017). Genome-level comparisons provide insight into

the phylogeny and metabolic diversity of species within the genus *Lactococcus*. *BMC*

Microbiology, 17(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1120-5>

Zambrano, P. V., & Solorzano, R. A. (2019). ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO SOBRE EL POTENCIAL NUTRICIONAL

DE LA QUINUA (*CHENOPODIUM QUINOA*) COMO ALIMENTO FUNCIONAL. 46(4), 12.

Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and

Safety. *Foods*, 11(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>

Zuluaga Domínguez, C. M. (2020). *Evaluación de las condiciones de proceso para la elaboración de una*

bebida fermentada de quinua (Chenopodium quinoa Wild) con inclusión de bacterias ácido

lácticas [Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá].

<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78836?show=full>