



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Departamento de Ciencias de la Vida
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Autor: Muñoz Guzmán Jean Pierre

Directora: PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador

2022

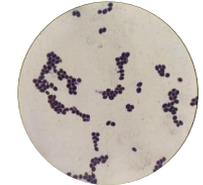
Introducción



- El sector hortícola a crecido en mercados locales e internacionales.
- A los beneficios que se ha atribuido al consumo de hortalizas.
- Retos ligados a la poscosecha.



- Almacenamiento en bajas temperaturas
- Películas de policloruro de vinilo grado alimenticio



Bacterias ácido lácticas



Bioconservante

- Prolonga la vida útil
- Mantiene las características
- Actividad antimicrobiana



Semillas de quinua



Bacterias de la fermentación de quinua

Objetivos

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*).

Específicos



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



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 y calabacín.



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



Hipótesis

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.

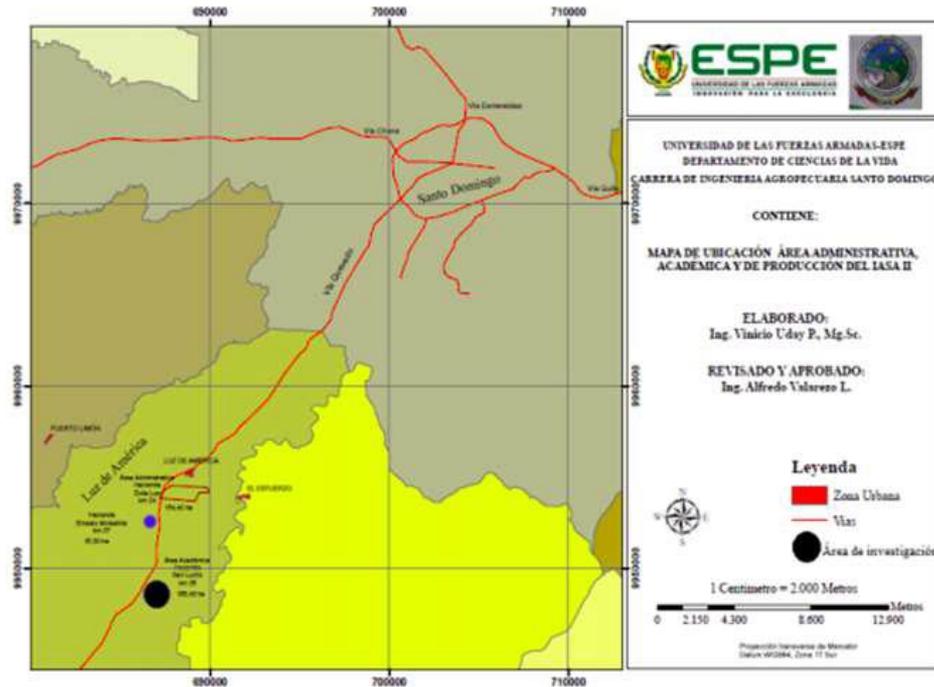
Factor B (Concentración de BAL)

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.

Metodología

Ubicación del área de investigación



Ubicación política

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

Ubicación Ecológica

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

Diseño Experimental

Factores y niveles de experimentación

Factores	Simbología	Niveles
Hortalizas (A)	a_0 a_1	Brócoli Calabacín
Concentraciones de bacterias ácido lácticas (B)	b_0 b_1	1,0E+07 UFC/mL 2,0E+07 UFC/mL

Tratamientos a comparar

N°	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a_0b_0	Brócoli con 1,0E+07 UFC/mL
T2	a_0b_1	Brócoli con 2,0E+07 UFC/mL
T3	a_1b_0	Calabacín con 1,0E+07 UFC/mL
T4	a_1b_1	Calabacín con 2.0+07 UFC/mL

Tipo de diseño

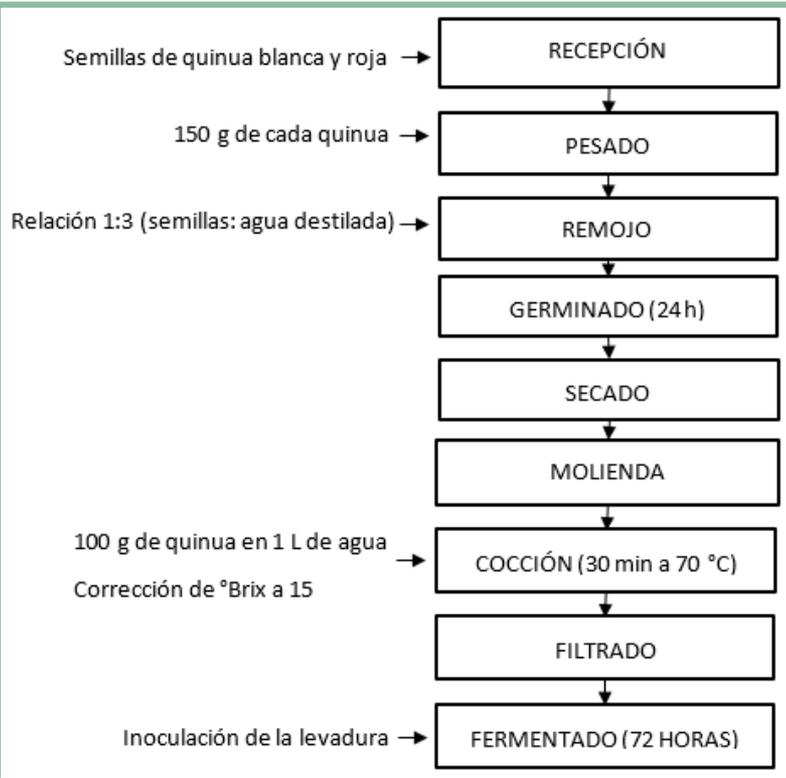
ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB

4 tratamientos con 4 repeticiones = 16 UE

Análisis funcional: prueba de significancia de Tukey ($p < 0,05$)

Metodología

Fermentación de la quinua



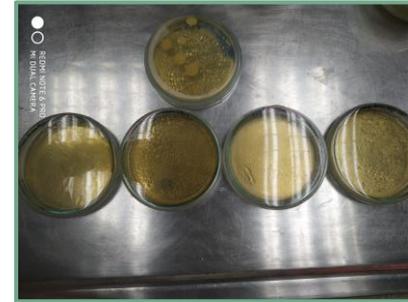
Metodología

Aislamiento y siembra de bacterias ácido lácticas

Preparación de disoluciones de agua peptona (10^{-6})



Siembra de muestras



Preparación del medios de cultivo MRS e inoculación



Aislamiento de BAL



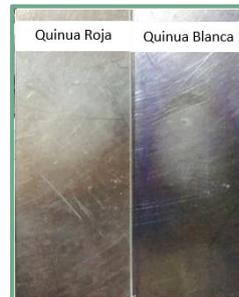
Metodología

Identificación microbiana

Tinción Gram



Prueba de catalasa



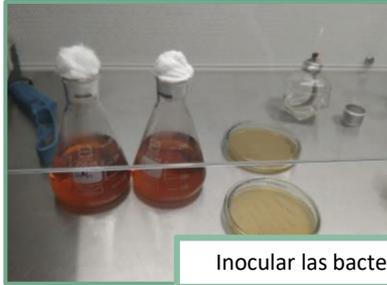
Análisis filogenético



Metodología

Bioconservación de las hortalizas

Preparación de la solución probiótica



Inocular las bacterias en caldo MRS



5 000 rpm por 15 minutos



Tampón de ácido cítrico-citrato de sodio (pH 3,8; 0,1M)



Concentración de BAL

Preparación de las muestras

Lavado con ácido cítrico al 2%



Bioconservación por 10 días a temperatura ambiente

Metodología

VARIABLES DE ESTUDIO

pH



NTE INEN 183
(2013)

Acidez



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

Sólidos solubles



Pérdida de peso



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

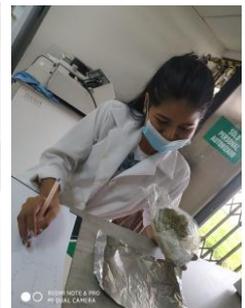
**Recuento de poblaciones
microbianas (UFC/mL)**

NTE INEN 1529-5 (2006)

$$\left(\frac{UFC}{ml}\right) = \frac{n * \text{Inverso del } F}{\text{Volumen inoculado}}$$



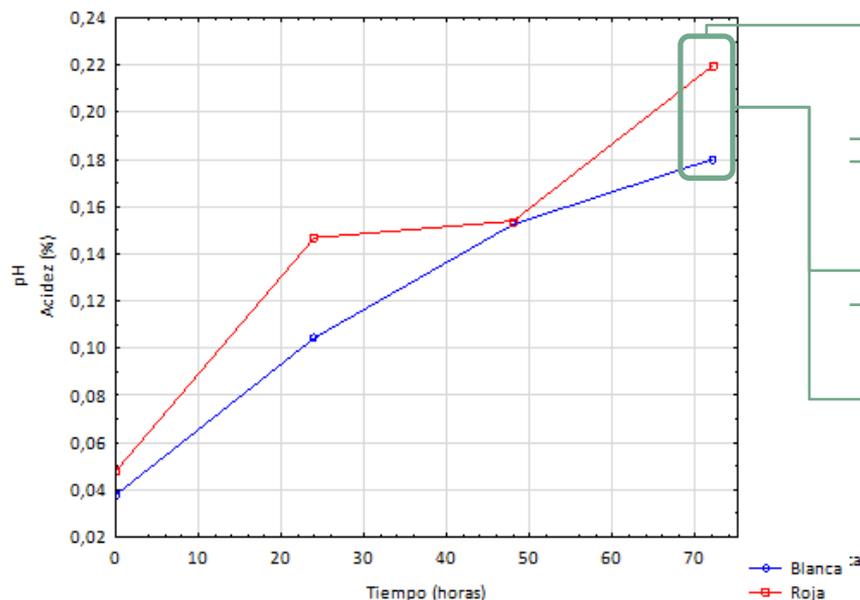
Análisis sensorial



Resultados y Discusión

Características físico-químicas de la quinua

Cinética en función de la acidez



Blanca = 0,18 % y Roja = 0,21 %

Durante las primeras 36 horas el consumo de azúcares es intenso (Hoyos et al., 2019).

Formación de ácidos de bajo peso molecular (Zuluaga Domínguez, 2020)

0,19% y 0,20% para la quinua blanca y roja (Casas Forero et al, 2016) y (Onofre, 2018).

Blanca = 3,60 y Roja = 3,66
Blanca = 8,2 °Brix y Roja = 8,6 °Brix

Resultados y Discusión

Análisis microbiológico de la quinua

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

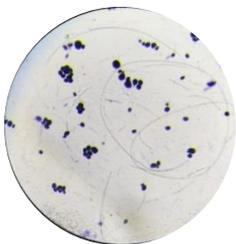
En bebidas artesanales el conteo bacteriano suele ser superior a 1,0E+03 UFC/mL (Hidalgo Ortiz & Tulcanaza Pala, 2016)

La presencia de bacterias a las 72 h, sugiere la presencia de BAL (Ramos-Izquierdo et al., 2009).

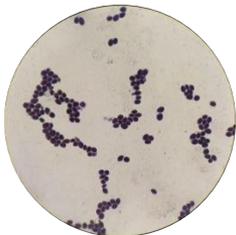
Resultados y Discusión

Identificación de las BAL aisladas de quinua

Quinua blanca



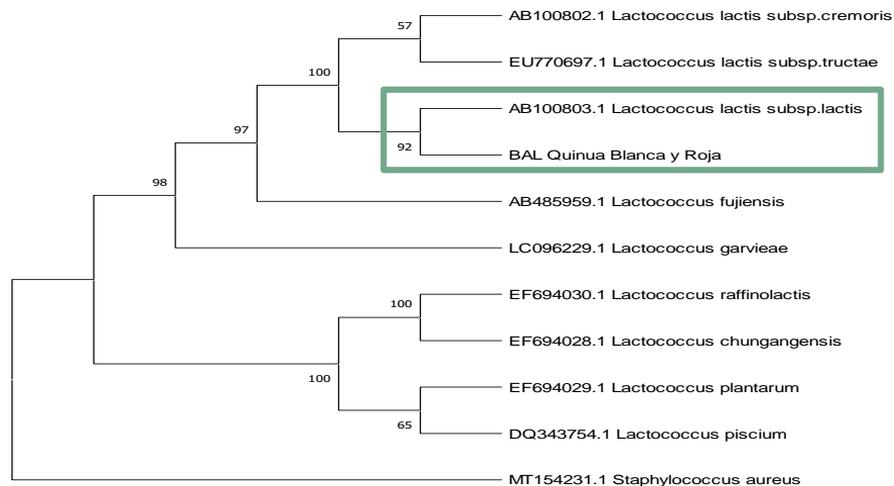
Quinua roja



Análisis microbiológico

Gram positivos
Cocos
Catalasa -

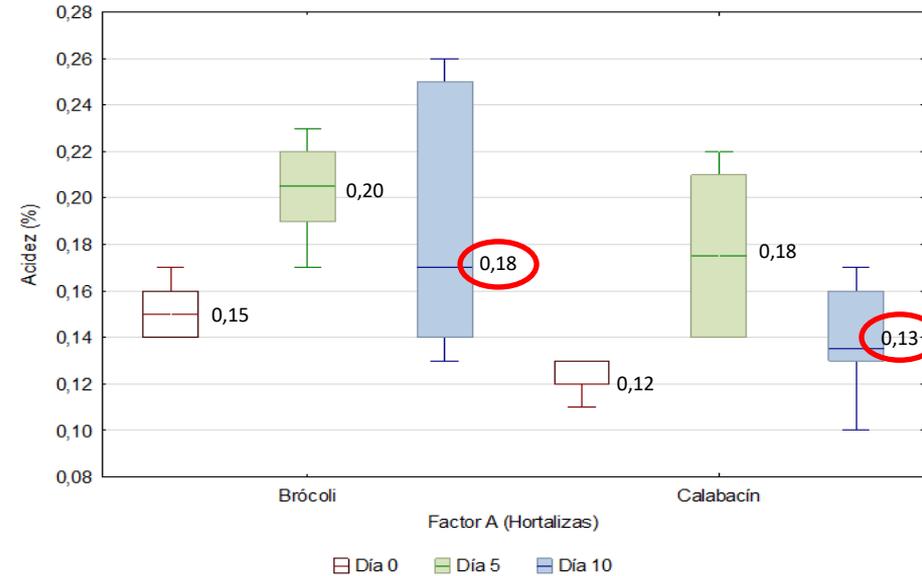
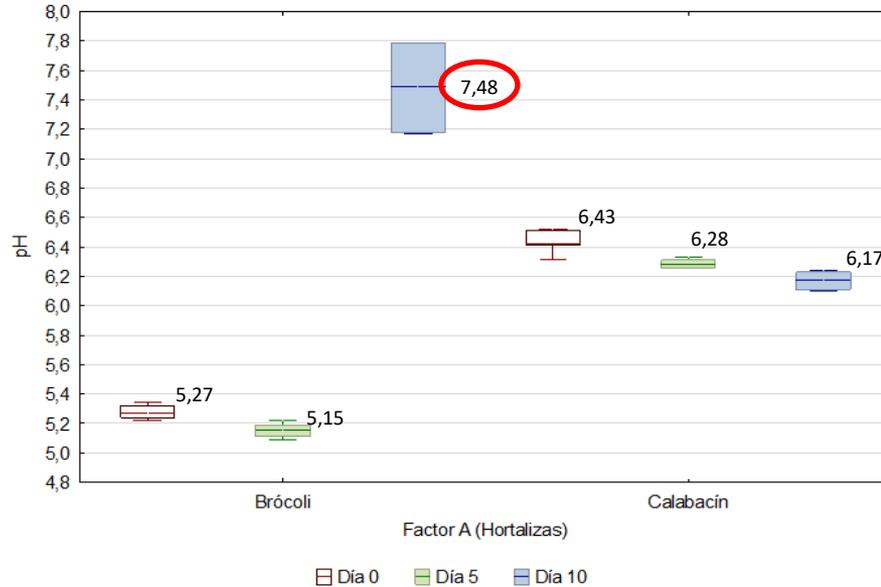
Árbol filogenético del ARNr 16S



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 (Ruiz Rodríguez et al., 2016).

Resultados y Discusión

Factor A (Hortalizas)

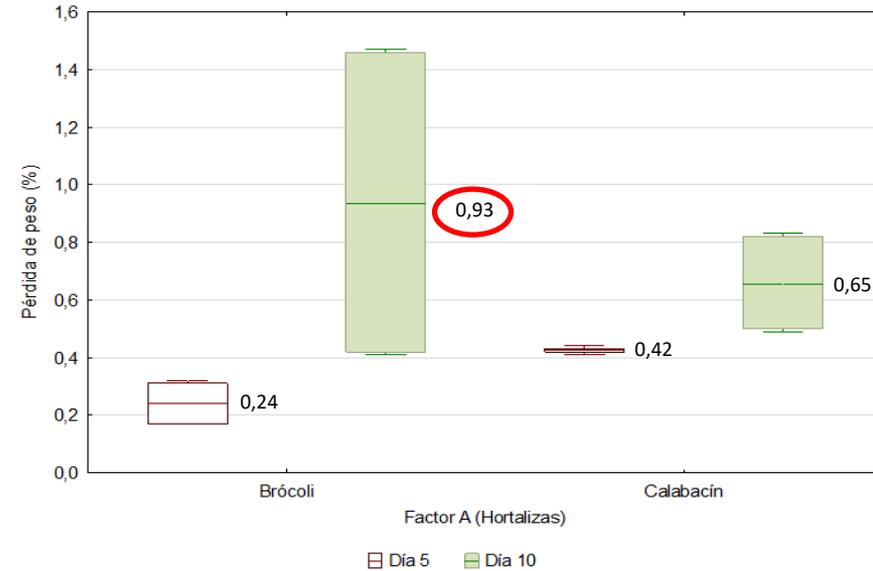
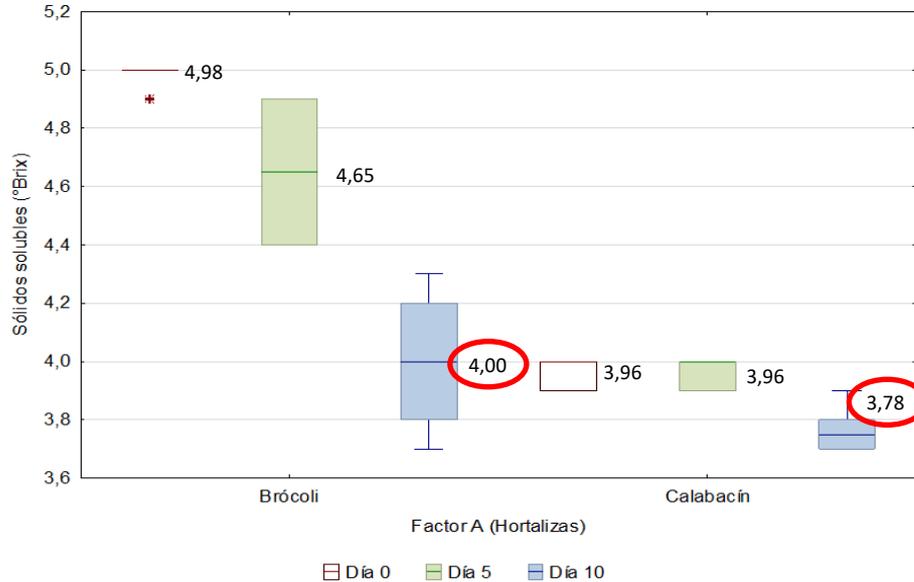


La reducción de pH en hortalizas tratadas con bacterias ácido lácticas se debe al acoplamiento de las bacterias a la superficie (Bautista-Gallego et al., 2020)

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).

Resultados y Discusión

Factor A (Hortalizas)

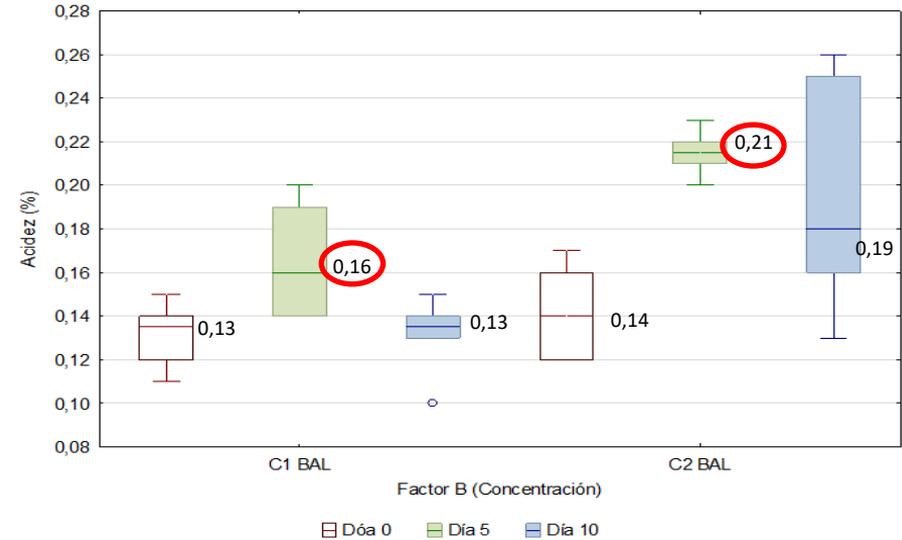
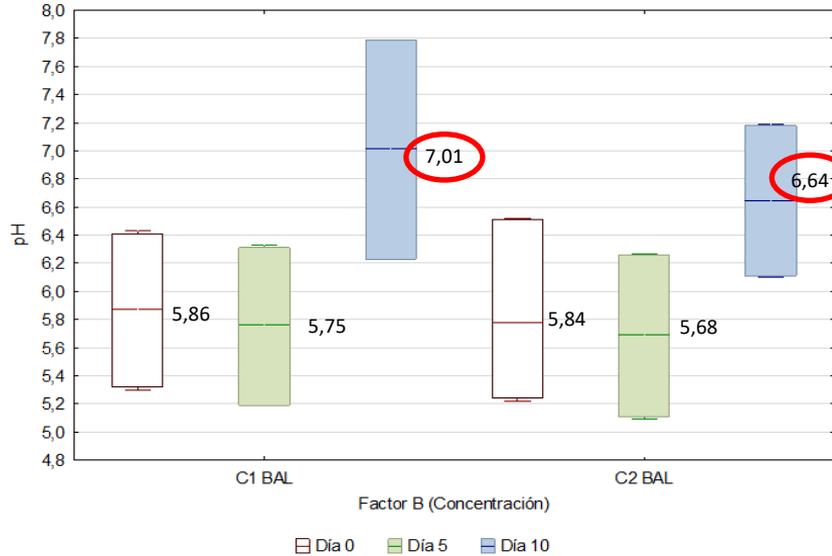


La temperatura incrementa la descomposición metabólica y la senescencia en respuesta a la pérdida de firmeza y humedad propia de la hortaliza almacenada (Mahnen et al., 2006).

El brócoli es más susceptible a las condiciones ambientales y en especial a la humedad (Shakeel et al., 2019)

Resultados y Discusión

Factor B (Concentración de BAL)

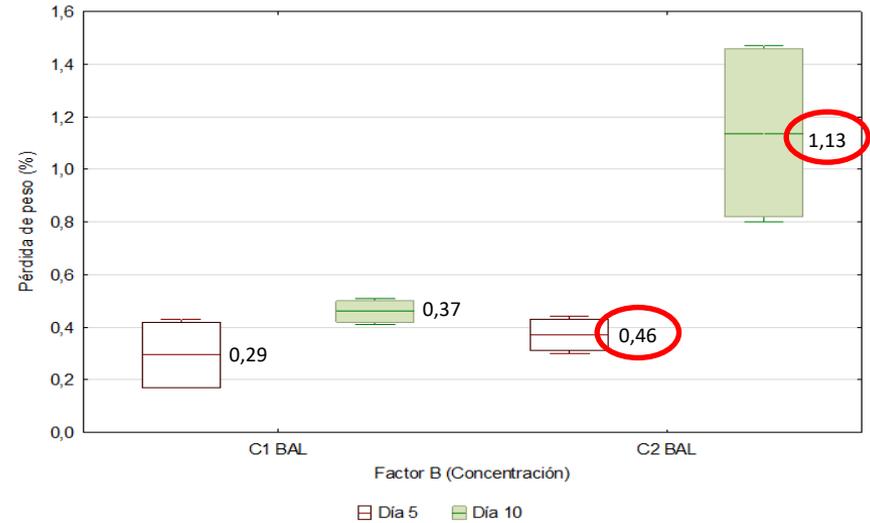
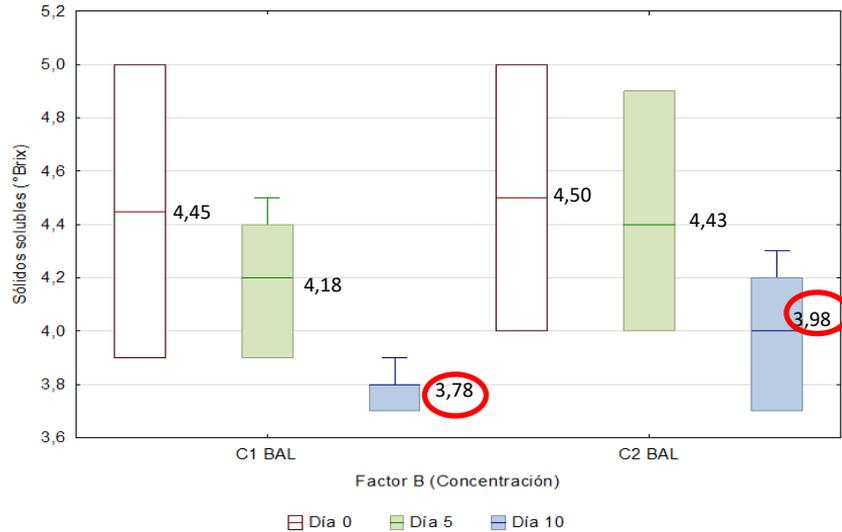


De acuerdo a Bautista-Gallego et al. (2020) la reducción de pH se debe al correcto acoplamiento de las bacterias a la superficie, lo que permite la producción de ácidos de bajo peso molecular.

El incremento de acidez se debe a la producción de ácido láctico, fórmico y acético por parte de las bacterias ácido lácticas (Nugroho et al., 2020)

Resultados y Discusión

Factor B (Concentración de BAL)

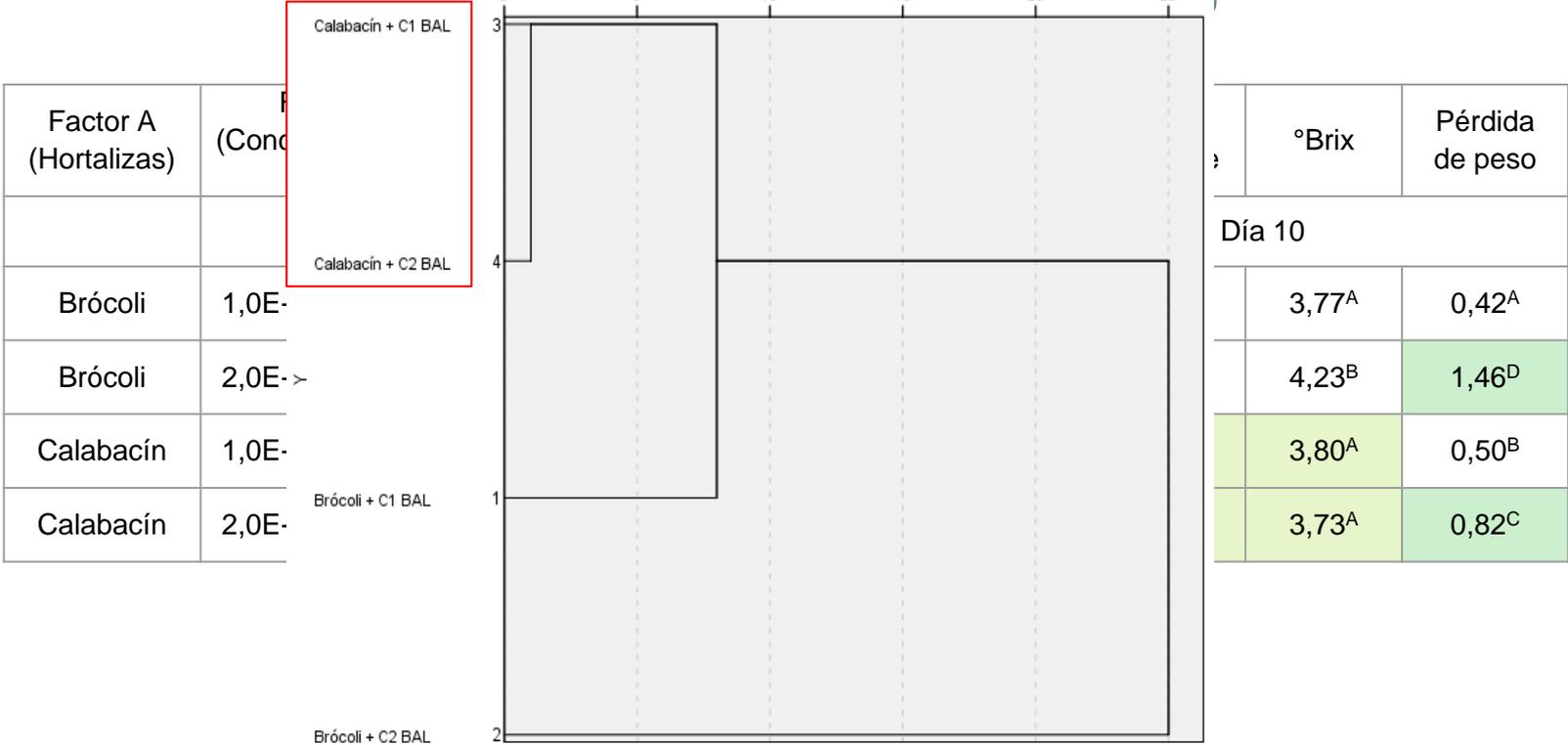


La aplicación de altas concentraciones de probióticos no influye sobre gran parte de las propiedades sensoriales en periodos prolongados de almacenamiento que van de 9 a 11 días (Siroli et al., 2015).

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.

Resultados y Discusión

Dendrograma que utiliza un enlace único
Combinación de clúster de distancia re-escalada



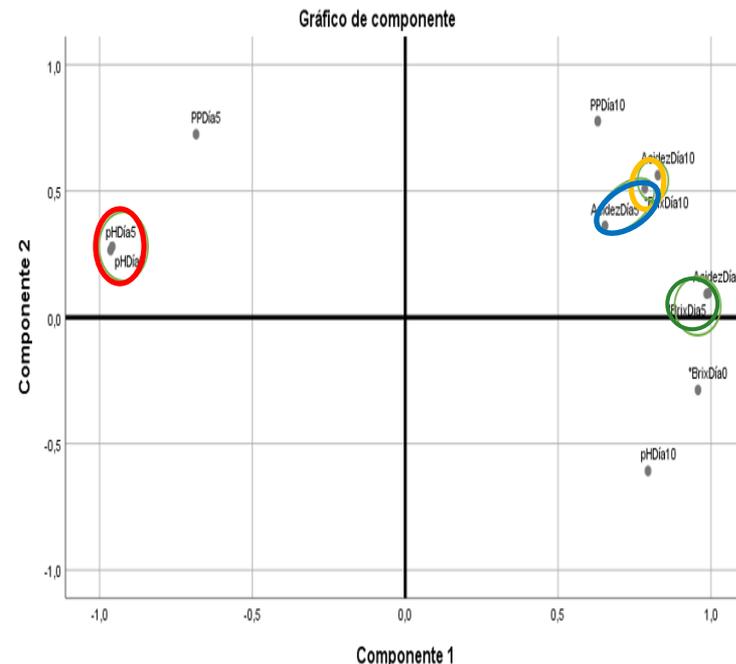
Resultados y Discusión

Interacción A*B

14

	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

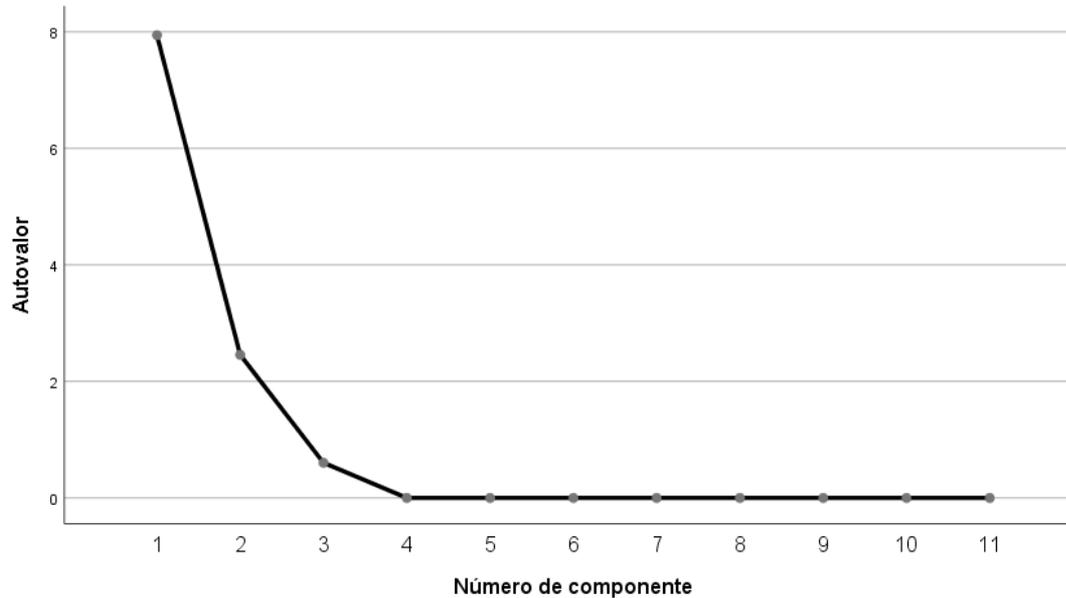
Correlación



Resultados y Discusión

Interacción A*B

Gráfico de sedimentación



1	pH (Día 0)	72,21%
2	pH (Día 5)	22,32%
3	pH (Día 10)	5,47%

El aumento del pH permite el crecimiento de microorganismos como mohos, levaduras y bacterias que producen metabolitos que incrementan la tasa de deterioro del alimento (Amit et al., 2017)

Resultados y Discusión

Parámetro microbiológico 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

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.

Resultados y Discusión

Análisis funcional

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

Conclusiones

Factor A

- 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.

Factor B

- 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.

Interacción AxB

- El tratamiento calabacín + concentración $2,0 \times 10^7$ UFC/mL del probiótico es más efectivo para mantener propiedades como pH, acidez y °Brix.
- 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 ($1,0 \times 10^7$ 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

Recomendaciones

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 $1,0 \text{ E}+07$ 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

**Muchas gracias por su
atención**