UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente

Carrera de Agroindustrias

Tema:

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS DEL ÁCIDO LÁCTICO Y ACÉTICO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao L*) Y SU APLICACIÓN EN LA AGROINDUSTRIA

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera Agroindustrial Otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias

Autores:

García Culqui Roxana Mariuxi

Guevara Narváez Lady Anabel

Tutor:

Ing. Favián Bayas Morejón PhD.

Guaranda – Ecuador

2024

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS DEL ÁCIDO LÁCTICO Y ACÉTICO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L) Y SU APLICACIÓN EN LA AGROINDUSTRIA

REVISADO Y APROBADO POR:

Ing. Favián Bayas Morejón PhD.

TUTOR

Ing. Darwin Núñez Torres MSc.

PAR LECTOR

Ing. Carlos Jácome Pilco PhD.

PAR LECTOR

CERTIFICACIÓN DE AUTORIA

Yo, García Culqui Roxana Mariuxi, con CI: 0250130366 y Guevara Narváez Lady Anabel, con CI:1207283126, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional y que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con sus respectivos autores.

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamento y la Normativa Institucional vigente.

Ing. Favián Bayas Morejón PhD.
CI.0201811916
e-mail: fbayas@ueb.edu.ec
Teléfono: 0990316224

NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA

García Culqui Roxana Mariuxi
CI. 0250130366
e-mail: roxgarcia@mailes.ueb.edu.ec
Teléfono: 0958867710

Guevara Narváez Lady Anabel
CI. 1207283126
e-mail: laguevara@mailes.ueb.edu.ec
Teléfono: 0968904217

NOTARIA 4

DRA. MSc. GINA CLAVIJO CARRION
Notaria Cuarta del Cantón Guaranda.

ESCRITURA Nº 20240201004P00342

DECLARACIÓN JURAMENTADA

OTORGAN:
ROXANA MARIUXI GARCIA CULQUI Y
LADY ANABEL GUEVARA NARVAEZ.
CUANTÍA: INDETERMINADA
Di 2 COPIAS

P.A.

En el Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy lunes a los seis días del mes de mayo del año dos mil veinticuatro, ante mi **DOCTORA MSc. GINA LUCIA CLAVIJO CARRION, NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA,** comparecen con plena capacidad, libertad y conocimiento, a la celebración de la presente escritura, las señoritas **ROXANA MARIUXI GARCIA CULQUI,** de estado civil soltera y **LADY ANABEL GUEVARA NARVAEZ,** de estado civil soltera, por sus propios y personales derechos en calidad de OTORGANTES. Las comparecientes declaran ser de nacionalidad ecuatorianas, mayores de edad, de estado civil como se deja expresado, de ocupación estudiantes ambas partes, domiciliada la primera en la parroquia Angel Polibio Chaves, cantón Guaranda, Provincia Bolivar, con celular número cero nueve cinco ocho ocho seis siete siete uno cero y con correo electrónico **roxgarcia@mailes.ueb.edu.ec;** y la segunda en la parroquia Febres Cordero, Cantón Babahoyo, Provincia Los Rios y de paso por este cantón de Guaranda, con celular número cero nueve seis ocho nueve cero cuatro dos uno siete; y, con correo electrónico laguevara@mailes.ueb.edu.ec, hábiles en derecho para contratar y contraer obligaciones, a quienes de conocerles doy fe, en virtud de haberme exhibido sus documentos de identificación cuyas copias fotostáticas debidamente certificadas por mí, agrego a esta escritura como documentos habilitantes. Advertidas las comparecientes por mí la Notaria de los efectos y resultados de esta escritura, así como examinados que fueron en forma aislada y separada de que comparecen al otorgamiento de esta escritura sin coacción, amenazas, temor reverencial, ni promesa o seducción instruidas por mí de la obligación que tienen de decir la verdad con claridad y exactitud; y, advertidas sobre la gravedad del juramento y de las penas de perjurio, me solicitan que recepte su declaración juramentada: Nosotras: **ROXANA MARIUXI GARCIA CULQUI,** de estado civil soltera y **LADY ANABEL GUEVARA NARVAEZ,** de estado civil soltera, declaramos bajo juramento que los criterios e ideas emitidos en el presente proyecto de investigación, es de nuestra absoluta autoría, titulado: **"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS FERMENTADORAS DEL ÁCIDO LÁCTICO Y ACÉTICO A PARTIR DE MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao L*) Y SU APLICACIÓN EN LA AGROINDUSTRIA"** .Autorizamos a la Universidad Estatal de Bolívar hacer uso de todos los contenidos que nos pertenecen o parte de lo que contiene la obra, con fines estrictamente académicos o de investigación expuestos en el mismo. En el proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingenieras Agroindustriales, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente. Para su celebración y otorgamiento se observaron los preceptos de ley que el caso requiere; y, leída que les fue a las comparecientes íntegramente por mí la Notaria, aquellas se afirman y ratifican en la aceptación de todas sus partes y firman junto conmigo en unidad de acto, incorporándose al protocolo de esta Notaria, la presente declaración juramentada, de todo lo cual doy Fe. ----------

SRTA.ROXANA MARIUXI GARCIA CULQUI.
C.C. 0250130366

SRTA. LADY ANABEL GUEVARA NARVAEZ.
C.C. 1207283126

DOCTORA MSc. GINA CLAVIJO CARRION
NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA.

NOTARIA CUARTA DEL CANTÓN GUARANDA

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

TESIS_GARCIA_GUEVARA_Aislamiento_y_caracterización_de_BAL_y_BAA-copia.docx

TUTOR

FAVIAN BAYAS MOREJÓN

RECUENTO DE PALABRAS

12266 Words

RECUENTO DE CARACTERES

65951 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

78 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

381.5KB

FECHA DE ENTREGA

May 5, 2024 9:54 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 5, 2024 9:55 AM GMT-5

4% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cadabase de datos.

- 3% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 2% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref



Resumen

DEDICATORIA

Al comenzar mi vida universitaria, enfrenté una dura prueba con la pérdida de mi papi, Wilfrido García. Este trabajo está dedicado a ti, quien siempre creyó en mí, me enseñó valores y sabiduría. Sé que estarías orgulloso de la personas en la que me he convertido. Te amo y te extraño cada día.

Roxana Mariuxi García Culqui

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta investigación a mis padres, Alba Narváez y Segundo Guevara, por su amor incondicional, constante apoyo y por ser mi fuente de inspiración. A mis hermanos Kelly, Diana y Eduardo por siempre estar en cada paso y notar mi esfuerzo y dedicación en esta etapa de mi vida. A mis amigos, por estar siempre ahí para animarme y motivarme, incluso en los momentos más difíciles y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a este logro, ¡Gracias!

Lady Anabel Guevara Narváez

AGRADECIMIENTO

La efimeridad de la vida nos recuerda la importancia de agradecer a Dios por sus bendiciones. Este logro académico no habría sido posible sin el apoyo incondicional de mi mami, Virginia Culqui, y mi ñaña, Cristina García, gracias a su amor, palabras y paciencia me han moldeado en la mujer que soy hoy, de la cual me siento orgullosa.

Agradezco a mi alma mater por sus enseñanzas, a mi tutor por su orientación, a la Fundación Maquita por su apoyo financiero y a los Laboratorios de Investigación y Vinculación por su apertura para poder realizar este trabajo.

Roxana Mariuxi García Culqui

AGRADECIMIENTO

Primeramente quiero agradecer a Dios, a mis padres Alba Narváez y Segundo Guevara y hermanos Kelly, Diana y Eduardo quienes me han brindado su aliento y comprensión a lo largo de este trayecto. También quiero expresar mi sincero agradecimiento a los docentes que estuvieron en cada paso en mi entorno académico, principalmente al Ingeniero Favián Bayas, cuya orientación constante y sabios consejos fueron fundamentales en cada etapa del proceso. Asimismo, deseo agradecer a ingeniero Carlos Jácome e ingeniero Darwin Núñez por su tiempo y esfuerzo en revisar mi trabajo y proporcionar valiosas sugerencias que mejoraron significativamente la calidad de mi investigación. Además extiendo mi agradecimiento a la Universidad Estatal de Bolívar, a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente especialmente a la Carrera de Agroindustrias institución que me brindo la oportunidad de adquirir conocimientos en mi entorno académico y a los Laboratorios de Investigación y Vinculación por la atención brindada. Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a cada persona que participó de alguna manera en este proyecto y a todos aquellos que creyeron en mí.

Lady Anabel Guevara Narváez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO **PAG.**

CAPÍTULO I.....1

1.1. INTRODUCCIÓN 1

1.2. PROBLEMA.....3

1.3. OBJETIVOS 6

1.3.1. Objetivo General..... 6

1.3.2. Objetivos Específicos 6

1.4. HIPÓTESIS.....7

1.4.1. Hipótesis Nula..... 7

1.4.2. Hipótesis Alternativa 7

CAPÍTULO II 8

2. MARCO TEÓRICO.....8

2.1. Cacao..... 8

2.1.1. Generalidades..... 8

2.1.2. Composición 8

2.1.3 Producción..... 9

2.2. Mucílago de cacao..... 10

2.2.1. Generalidades..... 10

2.2.2. Composición química..... 10

2.3. Fermentación..... 11

2.3.1. Fermentación microbiana..... 11

2.4. Ácido láctico 13

2.4.1. Propiedades físico-químicas del ácido láctico 13

2.4.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)..... 13
2.5. Ácido acético..... 14
2.5.1. Bacterias del ácido acético (BAA)..... 15
2.6. Técnicas de aislamiento de bacterias..... 15
2.6.1. Técnica de aislamiento para *Lactobacillus*..... 15
2.6.2. Técnica de aislamiento para *Acetobacter*..... 16
2.7. Pruebas bioquímicas para identificar las especies bacterianas..... 18
2.8. Método para conservar bacterias purificadas..... 20
2.8.1. Liofilización..... 20
2.9. Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría..... 20
2.9.1. Espectrofotometría UV-vis..... 20
CAPÍTULO III..... 22
3. MARCO METODOLÓGICO..... 22
3.1. Ubicación de la Investigación..... 22
3.2. Materiales y Equipos..... 22
3.2.1. Material experimental..... 22
3.2.2. Materiales de campo..... 22
3.2.3. Materiales de laboratorio..... 23
3.2.4. Reactivos..... 23
3.2.5. Equipos..... 24
3.3. Métodos..... 25
3.3.1. Factores en estudio..... 25
3.3.2. Tratamientos..... 26
3.3.3. Descripción de la unidad experimental..... 27

3.3.4. Tipo de diseño experimental 28
3.4. Manejo del experimento 31
3.4.1. Extracción de mucílago de cacao 31
3.4.2. Aislamiento por cultivo de bacterias de los ácidos: láctico y acético. 32
3.4.3. Caracterización Bioquímica y Microscópica 38
3.4.4. Incorporación de un sustrato para aumento de biomasa para bacterias acido lácticas y acido acéticas 40
3.4.5. Conservación de los aislados bacterianos 42
3.4.6. Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría 44
3.5. Análisis de datos 45
CAPITULO IV 46
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
4.1. Modelo experimental para las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas 46
4.1.1. Aislamiento de *Lactobacillus* 46
4.1.2. Aislamiento de *Acetobacter* 52
4.2. Caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas. 57
4.2.1. Identificación bioquímica de especies aisladas BAL 57
4.2.2. Identificación bioquímica de especies aisladas BAA 59
4.3. Incorporación de un sustrato con el propósito de potenciar el crecimiento de biomasa en las bacterias acido lácticas y acéticas. 61
4.3.1. Incorporación de un sustrato para el aumento de biomasa en *Lactobacillus* 61

4.3.2. Incorporación de un sustrato para el aumento de biomasa en *Acetobacter* 62
4.4. Cinética de crecimiento para *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp.*..... 64
4.4.1. Cinética de crecimiento para aislados *Lactobacillus spp.*, con sustrato 64
4.4.2. Cinética de crecimiento para aislados *Acetobacter spp.*, con sustrato 66
4.5. Preservación de las cepas bacterianas acido lácticas y acéticas a través del proceso de liofilización. 68
4.5.1. Rendimiento de *Lactobacillus spp.* 68
4.5.2. Rendimiento de *Acetobacter* spp. 69
4.6. Uso de las bacterias liofilizadas en la agroindustria 71
4.7. Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría 72
4.7.1. Viabilidad de bacterias liofilizadas: *Lactobacillus spp.*..... 73
4.7.2. Viabilidad de bacterias liofilizadas: *Acetobacter spp.* 74
4.8. COMPROBACIÓN DE LAS HIPÓTESIS.....75
4.8.1. Hipótesis Nula..... 75
4.8.2. Hipótesis Alternativa 75
4.8.3. Comprobación de hipótesis..... 75
CAPITULO V 76
5.1. CONCLUSIONES 76
5.2. RECOMENDACIONES 78
BIBLIOGRAFÍA.....80
ANEXOS.....96

ÍNDICE DE TABLAS

N°	Detalle	Pag.
1	Composición química de los granos de cacao	9
2	Composición química del mucílago de cacao	11
3	Propiedades físico-químicas del Ácido láctico	13
4	Composición química de Man Rogosa Sharpe (g/L)	16
5	Equipos utilizados en la investigación	24
6	Factores de estudio para el aislamiento de bacterias BAL	25
7	Factores de estudio para el aislamiento y caracterización de bacterias BAA	26
8	Combinación de tratamientos para el aislamiento del BAL	26
9	Combinación de tratamientos para el aislamiento del BAA	27
10	Características del experimento de aislamiento del BAL	27
11	Características del experimento de aislamiento del BAA	28
12	Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para el diseño en arreglo factorial AxBxC	29
13	Tratamientos para *Lactobacillus*	46
14	ANOVA AxBxC para *Lactobacillus*	47
15	Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Medio de cultivo) para *Lactobacillus*	48
16	Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Variedad de cacao) para *Lactobacillus*	50
17	Tratamientos para *Acetobacter*	52
18	ANOVA AxBxC para *Acetobacter*	53

19 Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Medio de cultivo) para *Acetobacter* 53

20 Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Variedad de cacao) para *Acetobacter* 55

21 Identificación bioquímica de especies aisladas BAL 57

22 Identificación bioquímica de especies aisladas BAA 59

ÍNDICE DE FIGURAS

N° **Detalle** **Pag.**

1 Mucílago de cacao..... 8

2 Mapa de Producción Nacional - 2021..... 10

3 Diagrama de flujo para la extracción de mucílago de cacao..... 32

4 Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas 34

5 Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido acéticas con el medio Carr..... 36

6 Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido acéticas con el medio GYC 37

7 Diagrama de flujo para el aumento de biomasa de *Acetobacter spp*. 41

8 Diagrama de flujo para la liofilización de bacterias *Lactobacillus spp*. y *Acetobacter spp*..... 44

9 Gráfico de medias para medios de cultivo (*Lactobacillus*)..... 49

10 Gráfico de medias para variedad de cacao (*Lactobacillus*) 50

11 Gráfico de interacciones entre medio de cultivo y variedad de cacao *Lactobacillus*..... 51

12 Dilución de *Lactobacillus* A (Investigación) y B (Herrera, 2021)..... 51

13 Gráfico de medias para medios de cultivo (*Acetobacter*) 54

14 Gráfico de medias para variedad de cacao (*Acetobacter*)..... 55

15 Gráfico de interacciones entre medio de cultivo y variedad de cacao *Acetobacter* 56

16 Dilución de *Acetobacter* A (Investigación) y B (Gerard, 2015) 56

17 Identificación bioquímica de *Lactobacillus spp*. 58

18 Identificación bioquímica de especies aisladas *Acetobacter spp.*..... 60

19 Bacteria *Lactobacillus spp*., con y sin sustrato 61

20 Bacteria *Acetobacter spp*., en diferentes medios de cultivo..... 62

21 Fotografías de la identificación bioquímica de especies aisladas de *Lactobacillus spp*., y *Acetobacter spp*., con la incorporación de sustratos..... 63

22 Cinética de crecimiento microbiano (*Lactobacillus spp*.)..... 65

23 Cinética de crecimiento microbiano modelo matemático exponencial (*Lactobacillus spp*.)..... 66

24 Cinética de crecimiento microbiano (*Acetobacter spp*.) 67

25 Cinética de crecimiento microbiano modelo matemático exponencial (*Acetobacter spp*.) 68

26 Liofilización de bacterias *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp.*..... 70

27 Etiqueta para las bacterias liofilizadas 70

28 Curva de crecimiento bacteriano después de la liofilización de Absorbancia vs Tiempo (*Lactobacillus spp*.) 73

29 Curva de crecimiento bacteriano después de la liofilización de Absorbancia vs Tiempo (*Acetobacter spp*.)..... 74

ÍNDICE DE ANEXOS

N° **Detalle**

1 Mapa de ubicación de la investigación

2 Relación costo – beneficio del producto

3 Informe de resultados de liofilización

4 Recolección de materia prima cacao Nacional y CCN - 51

5 Siembra de diluciones para bacterias ácido lácticas y acéticas

6 Caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas para *Lactobacillus*

7 Caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas para *Acetobacter*

8 Diluciones para la cinética de crecimiento de *Lactobacillus* 48h

9 Diluciones para la cinética de crecimiento *Acetobacter* 48h

10 Multiplicación de bacterias ácido lácticas y acéticas con sustrato

11 Bacterias para el proceso de liofilización

12 Reactivación de bacterias liofilizadas *Lactobacillus* y *Acetobacter*

13 Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría *Lactobacillus* y *Acetobacter*

14 Certificados de análisis de los reactivos usados

15 Glosario de términos técnicos

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue aislar y caracterizar las bacterias presentes de los ácidos láctico y acético a partir de mucílago de cacao, con el fin de aprovechar este residuo en el recinto San Gerardo. Se hizo un estudio del arte sobre la matriz mucílago de cacao, medios de cultivo y condiciones de incubación para *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp.* Se utilizo el diseño experimental AxBxC (2x2x2), tanto para *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp*., la variable respuesta fue crecimiento (UFC/mL), los factores de estudio fueron variedad de cacao, temperatura de incubación y medios de cultivo. La identificación y caracterización se realizó mediante tinción de Gram, rojo de metilo, catalasa y oxidasa. Se ocupó leche descremada al 5% para aumentar biomasa en *Lactobacillus spp.,* y, para *Acetobacter spp.,* se reemplazó el agar GYC por Agar *Acetobacter*. Las bacterias se conservaron mediante liofilización en solución salina al 1%. La viabilidad se evaluó mediante espectrofotometría a 625 nm durante 72 horas. Los resultados mostraron que *Lactobacillus spp*., está presente en el mucílago de cacao CCN-51, a 30°C en Agar MRS, con un crecimiento de 453 UFC/mL, siendo Gram positiva, rojo de metilo positiva, catalasa y oxidasa negativas. La bacteria *Acetobacter spp.*, se encontraron en el mucílago de cacao Nacional, a 30°C en Agar GYC + natamicina, con un crecimiento de 110 UFC/mL, siendo Gram negativa, oxidasa negativa rojo de metilo y catalasa positiva El cambio de agar y la adición de leche incrementó la biomasa en ambas bacterias, la liofilización mostró un rendimiento del 6.66%. Como conclusión las bacterias fermentadoras aisladas del género *Lactobacillus spp.,* y *Acetobacter spp.,* presentes en el mucílago de cacao pueden ser utilizadas en distintos procesos agroindustriales.

Palabras clave: Aislamiento, mucílago de cacao, caracterización bioquímica, tinción de Gram, *Lactobacillus, Acetobacter*.

SUMMARY

The objective of this research was to isolate and characterize the lactic and acetic acid bacteria present in cocoa mucilage, in order to take advantage of this waste at the San Gerardo site. A study of the art was made on the cocoa matrix, culture media and incubation conditions for *Lactobacillus spp*. and *Acetobacter spp.* The experimental design AxBxC (2x2x2) was used for both *Lactobacillus spp.* and *Acetobacter spp.* The response variable was growth (CFU/mL), the study factors were cocoa variety, incubation temperature and culture media. Identification and characterization were performed by Gram staining, methyl red, catalase and oxidase. Skimmed milk at 5% was used to increase biomass in *Lactobacillus spp.*, and, for *Acetobacter spp.,* GYC agar was replaced by *Acetobacter* Agar. Bacteria were preserved by lyophilization in 1% saline solution. Viability was assessed spectrophotometrically at 625 nm for 72 hours. The results showed that *Lactobacillus spp.,* was present in cocoa mucilage CCN-51, at 30°C on MRS Agar, with a growth of 453 CFU/mL, being Gram positive, methyl red positive, catalase and oxidase negative. *Acetobacter spp.,* bacteria were found in the National cocoa mucilage, at 30°C in GYC+natamycin Agar, with a growth of 110 CFU/mL, being Gram negative, methyl red oxidase negative and catalase positive. The change of agar and the addition of milk increased the biomass in both bacteria; freeze-drying showed a yield of 6.66%. In conclusion, the isolated fermenting bacteria of the genus *Lactobacillus* spp., and *Acetobacter* spp., present in cocoa mucilage can be used in different agroindustrial processes.

Key words: Isolation, cocoa mucilage, biochemical characterization, Gram staining, *Lactobacillus, Acetobacter*.

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador el cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos más notables a escala nacional, debido a su aroma y calidad; este fruto se encuentra localizado en las principales provincias costeras y amazónicas (Lara & Segarra, 2022). Según datos del SIPA (2021a), el Ecuador tuvo una producción aproximada de 302.094 Tn y un rendimiento de 0,56 Tn/ha, esto genera 14.000 Tn de desechos, de los cuales 56,2% son orgánicos y el 43,8% inorgánicos (Ministerio del Ambiente y Agua, 2020)

Actualmente, las variedades de cacao más destacadas son el CCN-51, criollo y el Nacional, estas son reconocidas por su abundante contenido de mucílago, que es una sustancia viscosa que rodea las almendras (Olivares, 2022). Durante el proceso de fermentación, las almendras de cacao obtienen el sabor característico a chocolate, no obstante, el exceso de mucílago puede llegar a dañarlos y afectar su calidad. Por esta razón, en la industria del cacao, el exceso de mucílago se considera un desperdicio y no es aprovechado (Calero, 2022; Olivares, 2022).

Para aislar bactérias lácticas Melgaço et al. (2018), mencionan utilizar medios de cultivos como el Agar o caldo MRS, que permite el crecimiento de esta especie a temperatura de incubación de 37°C durante 48 horas, mientras que, Herrera (2021), considera necesario aislar este tipo de bacteria en el mismo medio de cultivo a 30°C, siendo la matriz de análisis la almendra de cacao recubierta de mucílago fermentado.

Las bacterias acéticas se aislan en agar GYC Salazar (2017), así también, Rodriguez et al. (2023), indicaron que para el proceso de aislamiento de este tipo de

microorganismo es necesario diluir el mucilago, tomando 100 μL de muestra y distribuyendo sobre la superficie del medio de cultivo GYC, para su posterior incubación a 30 ± 2°C durante 48°C.

La investigación actual aportará conocimiento a la chocolatera Choco Warmi, empresa que surgió en el año 2019 impulsada por mujeres cacaoteras del recinto San Gerardo, esta empresa artesanal utiliza 20 Kg de cacao seco para producir 380 barras de chocolate (Pérez et al. 2021). Cabe resaltar que este proyecto de titulación es financiado por Fundación Maquita y Ecosol.

Las bacterias ácido lácticos y acéticas se encuentran en productos fermentados incluido el mucílago de cacao (Lange & Criollo, 2022), el aislamiento de estas bacterias a partir del mucílago de cacao CCN-51 y Nacional permitirá mejorar el proceso de fermentación del cacao para esta empresa; para llevar a cabo este aislamiento, se emplea el medio de cultivo MRS para bacterias lácticas y los medios de cultivo GYC y Carr para las bacterias acéticas (López, 2021). La caracterización e identificación de los géneros aislados se realiza mediante pruebas bioquímicas como la prueba de catalasa, oxidasa, rojo metilo y de microscopia mediante tinción de Gram.

El método de liofilización se utiliza para conservar las bacterias, de entre ellas BAA y BAL con el fin de preservar todas sus propiedades proteicas y organolépticas mediante el proceso de congelación y sublimación a bajas temperaturas (Ruiz, 2019).

El objetivo de la presente investigación es aislar y caracterizar las bacterias fermentadoras de los ácidos láctico y acético a partir de mucílago de cacao, con el fin de aprovechar este residuo desperdiciado en el recinto San Gerardo.

1.2. PROBLEMA

El cacao es una fruta producida en la región costa del Ecuador, siendo así, sus granos uno de los exponentes más importantes en exportaciones del país, en 2022 según datos del SIPA se exportó 370931,3 Tn. Por lo que, este fruto, por su alto valor comercial es bastante sembrado por las familias ecuatorianas. El mucílago es parte fundamental del cacao, pues al contener azúcar 10-15%, pectina 1% y ácido cítrico 1,5% es indispensable para la fermentación de las almendras, ya que genera ácido acético y alcohol (Álava, 2020).

En Ecuador, al mucílago se lo considera como un desperdicio en las fincas familiares debido a que hay más pulpa de la necesaria para la fermentación de las almendras (R. Rodríguez et al., 2021), sin embargo, en la provincia Bolívar no se encuentran datos del volumen de desperdicio de mucilago, en el recinto San Gerardo, según la información proporcionada por la Sra. Yolanda Guerrero miembro de la asociación de productoras de cacao menciona que, de 136,078 Kg de cacao en baba se exuda 45,36 Kg de mucílago, este desecho no es utilizados en otros fines. Para Jordan & Parra (2020), el mucílago de cacao tiene en su flora bacterias fermentadoras del ácido láctico y acético que pueden ser aprovechadas para producir productos de uso agroindustrial para generar ingresos monetarios.

Cada lote de chocolate producido en la planta “Choco Warmi” tiene características distintas, este problema se aduce a la baja actividad fermentativa que puede ocasionar una fermentación incompleta o lenta, además, puede existir una contaminación externa que favorezca la proliferación de microrganismos no deseados durante el proceso.

En este contexto, el aislamiento de bacterias fermentadoras ácido lácticas y ácido acéticas a partir del mucílago del cacao se presenta como una oportunidad para aprovechar este residuo y mejorar los procesos productivos de la planta Choco Warmi, con el fin de optimizar los procesos de fermentación, desarrollar productos de mayor calidad y fomentar la diversidad microbiana.

Formulación del problema

De acuerdo a lo mencionado previamente, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo aislar las bacterias fermentadoras de los ácidos: láctico y acético a partir de mucílago de cacao?

Sistematización del problema

Con el fin de abordar la pregunta general de investigación, se formulan las siguientes preguntas específicas:

1. ¿Cuáles son las técnicas de cultivo para aislar las bacterias productoras de ácido láctico y acético presentes en el mucílago de cacao?

2. ¿Cómo se caracterizan los aislados obtenidos utilizando técnicas microscópicas y bioquímicas?

3. ¿Qué sustrato puede ser incorporado con el fin de potenciar el crecimiento de biomasa en las bacterias ácido lácticas y acéticas?

4. ¿Cómo influye la cinética de crecimiento de las bacterias del género *Lactobacillus spp.,* y *Acetobacter spp.*, tras la utilización de un sustrato?

5. ¿Cuál es el proceso de liofilización para preservar cepas de bacterias ácido lácticas y acéticas?

6. ¿Cuál es la viabilidad de desarrollo de los microorganismos después de ser conservados mediante el proceso de liofilización?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

- Aislar y caracterizar las bacterias fermentadoras de los ácidos láctico y acético a partir de mucílago de cacao.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar técnicas de cultivo para aislar las bacterias productoras de ácido láctico y acético presentes en el mucílago de cacao.
- Caracterizar los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas.
- Incorporar un sustrato con el propósito de potenciar el crecimiento de biomasa en las bacterias acido lácticas y acéticas.
- Realizar la cinética de crecimiento de las bacterias del género *Lactobacillus spp.,* y *Acetobacter spp.*, tras la utilización de un sustrato.
- Preservar cepas de bacterias acido lácticas y acéticas a través del proceso de liofilización.
- Analizar la viabilidad de desarrollo de los microorganismos post conservación en liofilización mediante espectrofotometría.

1.4. HIPÓTESIS

1.4.1. Hipótesis Nula

No existe una diferencia significativa entre los tratamientos considerando las condiciones de cultivo para el aislamiento de *Lactobacillus* y *Acetobacter.*

1.4.2. Hipótesis Alternativa

Existe una diferencia significativa entre los tratamientos considerando las condiciones de cultivo para el aislamiento de *Lactobacillus* y *Acetobacter.*

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Cacao

2.1.1. Generalidades

El cacao es el material directo para la producción de chocolate, generalmente de la especie *Theobroma cacao L.*, las almendras de cacao, que están en el interior de la mazorca son de alto valor comercial y nutricional (Jordan & Parra, 2020). Es cultivado en regiones tropicales húmedas, a temperatura de 20 -30 °C, en un suelo de pH entre 5.0 y 6.5; la producción de frutos se empieza a ver a los 4 años desde su plantación (Jadán-Solís et al., 2023).

El fruto del cacao posee alrededor de 20 a 60 almendras. López (2021), menciona que estas se encuentran almacenadas en la placenta constituida por un epicarpio, epidermis, mesocarpio y endocarpio. (p. 22)

Figura 1
Mucílago de cacao



Nota: Identificación de las partes del cacao. Fuente: (Moreira, 2019).

2.1.2. Composición

El cacao es un fruto que posee diversos tamaños, colores y formas, con la particularidad de poseer una cubierta exterior gruesa, dentro de la corteza se encuentran las semillas, que están revestidas por la pulpa llamada mucílago el cual alcanza el 40% del peso y tiene un aroma muy agradable (Jordan & Parra, 2020)

Los granos de cacao fermentado y desecados al aire están compuestos por:

Tabla 1
Composición química de los granos de cacao

Composición	Descripción
Proteínas y aminoácidos	Constituyen el 60% del nitrógeno total del cacao. En los granos crudos se encuentra α-amilasa, β-glucosidasa y β-fructosidasa, que se inactivan en el procesamiento del cacao
Teobromina	Compone el 1,2% y produce acción estimulante.
Cafeína	Está presente en una proporción diez veces menor a la teobromina.
Lípidos	Presentes en un 97-99% de triglicéridos, 0,5-2% de ácidos grasos libres como el palmítico, esteárico y sustancias insaponificables (estearinas) y purinas
Carbohidratos	Se compone principalmente de almidón, pentosano, galactano, mucílago y celulosa. Los hidratos de carbono solubles destacan la estaquiosa, sacarosa y rabinosa.
Compuestos fenólicos	Formada por cotiledones, que a su vez forman células parenquimatosas, en su mayoría más pequeñas y mixtas que almacenan polifenoles.
Ácidos orgánicos	Se compone de ácido acético más ácido cítrico, succínico y málico. Estos ácidos se forman durante la fermentación otorgándole al cacao su sabor particular.
Compuestos volátiles	Otorgan el aroma característico del cacao. Aportando el sabor amargo astringente formado en la fermentación.
Compuestos aromáticos	El ácido acético es el más abundante, seguido de concentraciones más bajas de 3-Metilbutanal y 2-Metilbutana

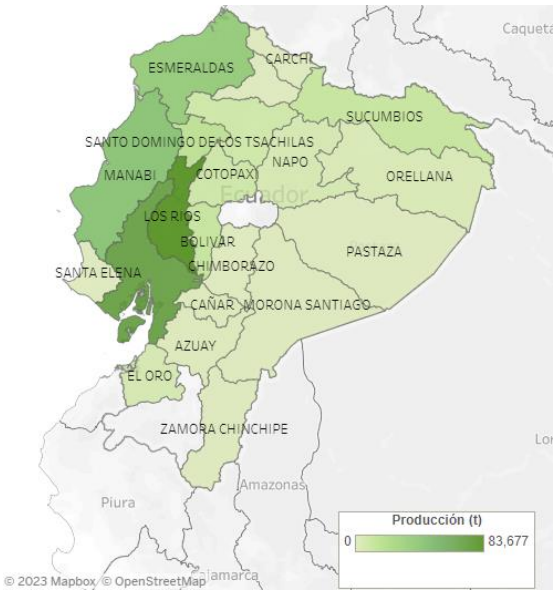
Nota: Compuestos de los granos fermentados y secador al aire. Fuente: (Gómez, 2020).

2.1.3 Producción

En Ecuador, el cacao desempeña un papel fundamental para la economía nacional, pues, el 70% son pequeños, 20% medianos y 10% grandes productores esta se encuentra en las 3 regiones principales (European Forest Institute, 2021).

Para el año 2021, la producción de cacao fue de 302,094 t, en las principales provincias el Ecuador donde 27,70% fue los Ríos, 23,94% Guayas, 14,84% Manabí y 12,14% Esmeraldas (SIPA, 2021b).

Figura 2
Mapa de Producción Nacional - 2021



Nota. La producción cacaotera del país se centra en 23 provincias del país, principalmente en la región litoral, andina y amazónica. Fuente: (SIPA, 2021b).

2.2. Mucílago de cacao

2.2.1. Generalidades

El mucílago también conocido como baba, tiene una textura viscosa, pegajosa, suave y fibrosa recubre la semilla del cacao evitando la entrada de aire, así también tiene un olor afrutado y sabor agridulce, astringente; tanto el olor como el sabor tiene ligeros toques de cacao (Jordan & Parra, 2020; Rivera, 2019). La fermentación produce aproximadamente de 100 a 150 litro de mucílago por tonelada de granos de cacao. Se estima que en las primeras horas de fermentación se alcanza 4 a 7 litros de mucílago a partir de alrededor de 100 kilogramos de cacao (Vásquez et al., 2019).

2.2.2. Composición química

La composición del mucílago es un medio propicio para el desarrollo de microorganismos (Rivera, 2019). Siendo así, se muestra a continuación la composición del mucílago de cacao:

Tabla 2
Composición química del mucílago de cacao

Composición	Porcentaje (%)
Agua	79,2 – 84,2
Sustancia seca	15,8 – 20,8
Ácidos no volátiles	0,77 – 1,50
Ácidos volátiles	0,02 – 0,04
Glucosa	1,60 – 5,32
Sacarosa	0,11 – 0,90
Pectina	5,00 – 6,90
Almidón	-
Proteína	0,42 – 0,50
Ceniza	0,40 – 0,50

Nota. El recubrimiento de los granos de cacao contiene mayoritariamente agua y es rica en azúcares. Fuente: Rivera, (2019).

2.3. Fermentación

La fermentación de las almendras de cacao es importante en la fase de postcosecha, pues permite que los granos cambien sus características físicas y desarrollen los aromas y sabores que están ligados a la calidad industrial del cacao (Álava, 2020). En este contexto, el propósito de la fermentación es permitir que los microorganismos descompongan el mucílago, eleven la temperatura para la muerte del embrión e iniciar las reacciones enzimáticas y los cambios bioquímicos, físicos en el interior de las almendras, que ayudará a formación de los precursores del aroma y sabor del chocolate (Paredes et al., 2022).

2.3.1. Fermentación microbiana

El proceso microbiano durante la fermentación comienza con 5 y 6 especies de levaduras distintas, como *Pichia kudriavzevii, Saccharomyces cerevisiae, Hanseniaspora guilliermondii, Candida zemplinina, Candida silvae y Candida krusei*, que convierten azúcares simples presentes en la pulpa en etanol, descomponiendo la pectina, eliminando el ácido cítrico para reducir su acidez

cambiando la textura del grano. Además, el conjunto de levaduras elimina el oxígeno, creando un ambiente anaerobio que favorece al crecimiento de bacterias lácticas (Erazo, 2019, p. 11).

La segunda etapa contribuye al desarrollo de bacterias acido lácticas (*Lactobacillus fermentum, Lactobacillus collonides, Lactobacillus plantarum, Leuconostoc pseudomesenteroides, Lactobacillus mali, Leuconostoc pseudoficulneum, y Pediococcus acidilactici*), fermentando los carbohidratos restantes que continúan absorbiendo del ácido cítrico (Erazo, 2019, p. 11).

En la tercera etapa productos de la fermentación sufren cambios importantes, pues las bacterias acéticas (*Acetobacter syzygii, Acetobacter pasteurianus, Acetobacter aceti, Acetobacter fabarum y Gluconobacter oxydans*) transforman el etanol que provocaron las levaduras en ácido acético, por medio de la producción de calor. El ácido acético y etanol se propagan en el grano a altas temperaturas, matando al embrión (Erazo, 2019, p. 13).

La cuarta etapa de la fermentación, la temperatura alta es beneficiosa para las bacterias *Bacillus* (*B. megaterium, B. licheniformis, B. pumilus* y un grupo pequeño *de B. megaterium, B. pumilu*s y *B. subtilis*) repara el alimento produciendo un gran número de enzimas que aceleran reacciones, donde los productos dan a las almendras de cacao un sabor y olor indeseable, como las reacciones de proteólisis, que descomponen a las proteínas, y las reacciones lipolíticas, que actúan sobre las grasas; podrían contribuir al sabor con la producción de ácidos orgánicos y saborizantes, como 2,3 butanodiol (C. Erazo, 2019, p. 13).

2.4. Ácido láctico

El ácido láctico (2-hidroxi-propanoico) es un compuesto orgánico de forma ionizada conocida como lactato, es una molécula monocarboxílica producida a partir de metabolismos anaeróbicos lácticos y son utilizadas en procesos bioquímicos (Guamán, 2022). Este ácido es valorado en la industria cosmética debido a su característica de exfoliación y humectación, en la industria química es usado como solubilizador y controlador de pH; en cambio en la industria alimentaria se utiliza como aromatizante, conservante y descontaminante para productos cárnicos (Cadena, 2020).

2.4.1. Propiedades físico-químicas del ácido láctico

Tabla 3
Propiedades físico-químicas del Ácido láctico

Parámetros	**Característica**
Formula química	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08 g/mol
Estado	Liquido
Apariencia	Pálido
Olor	Característico
Acidez (pk_a)	3,5
pH	Mayor a 1,2 a 25°C
Punto de ebullición	120 – 130°C
Punto de fusión	No hay datos disponibles
Punto de solidificación	No aplicable
Densidad	1,206 kg/m^3
Temperatura de autoignición	> 400 °C no aplicable
Temperatura de descomposición	> 200 °C

Fuente: LAFFORT, (2022).

2.4.2. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Estas bacterias tienen la capacidad de transformar los alimentos mediante la fermentación, debido a que producen una serie de metabolitos importantes como ac. láctico y péptido en cadena corta, estas bacterias fermentativas se encuentran en

algunos productos tales como yogurt, quesos y hortalizas (Baque & Romero, 2021). Las bacterias lácticas se clasifican en homofermentativas como *Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus y Pediococcus* que carecen de enzimas fosfocetolasa y hexosa isomerasa estas se sintetizan mediante la fermentación (Baque & Romero, 2021). Las heterofermentativas son bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus, Enterocaccus, Lactococcus, Pediococcus y Streptococcus*, estas bacterias fermentan azúcares convirtiendo el 50% de glucosa en ácido láctico más etanol o ácido acético con un 50% de CO_2 (Lema, 2023).

2.4.2.1. Uso de las bacterias de *Lactobacillus* en la agroindustria

Las bacterias de ácido láctico se encuentran presentes para la fabricación de alimentos fermentados (yogurt, quesos), carnes maduras, embutidos, entre otros., (Vera Peña et al., 2019). Estas bacterias son aplicadas por sus diferentes características sensoriales como textura, sabor, olor, por lo que son consideradas importantes por su método de preservación y fermentación mejorando las condiciones de un producto e inhibiendo los patógenos (Vargas & Vergara, 2020). Otro uso de BAL es mediante la gelificación (mermeladas), acidulante y acentuador de bebidas con zumos, confiterías, aderezos, vinos y cervezas (Fernández, 2022).

2.5. Ácido acético

El ácido acético es un compuesto orgánico en estado líquido e incoloro proviene de la doble fermentación alcohólica y acética de productos alimenticios que contengan azúcar (Torres & Vera, 2019). La fermentación acética es un proceso bioquímico donde las bacterias oxidan al etanol presente en el sustrato alcohólico a condiciones aerobias, permitiendo obtener información acerca de la cinética de crecimiento

bacteriano, esta fermentación cumple una serie de requisitos como el suministro de oxígeno y temperatura óptima (Illescas, 2021).

2.5.1. Bacterias del ácido acético (BAA)

Las bacterias del género *Acetobacter* son células gram-negativas, ovaladas que generan colonias circulares, lisas, convexas de color beige (Lemus, 2020), estas bacterias utilizan diferentes carbohidratos, donde la glucosa es la más importante por su oxidación directa que conduce las cetosas correspondientes (Silva, 2020).

2.5.1.1. Usos de las bacterias *Acetobacter* en la agroindustria

Son bacterias gram-negativas que incluye un gran número de especies, algunas de importancia comercial. Estas bacterias son las responsables de la producción mundial de vinagre, ya que el ácido acético es la principal característica de este condimento (Ricaurte, 2020). Las BAA a menudo están involucradas en la producción de alimentos fermentados de manera beneficiosa, en productos como vinos, té de kombucha, frutas, verduras y vinagres de distintas especias, debido a su producción de celulosa (Dávalos, 2022).

2.6. Técnicas de aislamiento de bacterias

2.6.1. Técnica de aislamiento para *Lactobacillus*

2.6.1.1. Medio MRS (Man Rogosa Sharpe)

Existen varias técnicas para el aislamiento de bacterias a partir de tejido vegetal como tejido infectado, macerado, etc., pero es recomendable aislarlo por el método de estriado cruzado que se utiliza en laboratorios y así poder observar la siembra en distintas colonias aisladas para un estudio individual (Ramirez et al., 2018). La técnica utilizada para el aislamiento de ácido láctico se da mediante la preparación del medio Man Rogosa Sharpe debido a que es utilizado en cultivos de

Lactobacillus, gracias a las propiedades nutritivas de tomate, adición de manganeso y acetato junto al polisorbato que permiten un mayor crecimiento de bacilos lácticos como *Lactobacillus brevis* y *fermenti* (Scharlau Microbiología, 2023).

Las peptonas y suplementos de extractos de carne y levadura han hecho que este medio de cultivo sea completo, pero con una mayor facilidad de contaminación debido a esto el medio MRS debe ser más selectivo por lo que se recomienda subcultivos alternos en medios sólidos, doble capa o caldo con un mayor crecimiento en presencia de CO_2 (Scharlau Microbiología, 2023).

2.6.1.2. Composición química de Man Rogosa Sharpe

Tabla 4
Composición química de Man Rogosa Sharpe (g/L)

Descripción	Característica en medio solido (g/L)	Características en medio líquido (g/L)
Peptona proteosa	10,00	10,00
Extracto de carne	10,00	10,00
Extracto de levadura	5,00	5,00
D (+)-Glucosa	20,00	20,00
Sorbitán monoleato	1 ml	1 ml
Acetato sódico	5,00	5,00
Citrato amonio	2,00	2,00
Sulfato magnésico	0,20	0,20
Sulfato manganoso	0,05	0,05
Fosfato dipótasico	2,00	2,00
Agar	13,00	-

Fuente: Scharlau Microbiología, (2023).

2.6.2. Técnica de aislamiento para *Acetobacter*

2.6.2.1. *Acetobacter* Agar

Es un medio constituido por (glucosa, extracto de levadura, carbonato de calcio, agar) que se utiliza para aislar bacterias del género *Acetobacter*, siendo este un medio estándar de crecimiento (Dávalos, 2022). La composición del medio fue descrita por primera vez en el año de 1975 por Carr y Passmore a partir de bebidas

fermentadas pero el crecimiento de mohos y levaduras ha generado inconvenientes para su aislamiento e imposibilitando el desarrollo de una cepa pura por lo que se debe introducir un antibiótico como natamicina (Gerard, 2015).

2.6.2.1.1. Formulación para Acetobacter Agar

La composición del medio consta de extracto de levadura (10 g), agar (15 g), carbonato de calcio (30 g), glucosa (50 g) a pH H 7.4 ± 0.1 a 25 – 30°C. La incubación se da en aerobiosis (Atlas, 2010). Para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras se añade natamicina a una concentración de 100 mg/L (Gerard, 2015).

2.6.2.2. Medio Carr

El medium de Carr es un medio de agar selectivo para aislar *Acetobacter*, un tipo de bacteria que se usa con frecuencia en la producción de vinagre, el etanol inhibe el crecimiento de otras bacterias y fomenta el crecimiento de *Acetobacter* (Yanti et al., 2017). La composición del medio de Carr fue descrita por primera vez en 1958 y ha sido modificada por varios investigadores desde entonces para mejorar su eficacia y selectividad (B. Wang, 2020).

2.6.2.2.1. Formulación para el medio Carr modificado

La composición del medio consta de extracto de levadura (10 g/L), agar (20 g), natamicina (100 mg/L), verde de bromocresol (0,04 g/L), etanol (17,5 mL/L) a pH 6,8. La incubación es a 30°C por 48 h (El-Askri et al., 2022).

2.6.2.3. Medio GYC

El medio GYC, compuesto por glucosa, extracto de levadura y carbonato de calcio, se utiliza para la obtención de bacterias productoras de ácido acético; este medio se establece como un estándar de crecimiento capaz de identificar la presencia de microorganismos generadores de ácido (Dávalos, 2022).

2.6.2.3.1. Formulación para el GYC

La composición del medio consta de agar bacteriológico (20 g/L), carbonato de calcio (5 g/L), dextrosa (50 g/L), extracto de levadura (10 g/ L); agregar 1 L de agua destilada y mandar a autoclavar a 121°C durante 15 min, cuando el medio se enfría a 50°C se agrega 70 mL de etanol, natamicina 100 mg/L (Condalab, 2019).

2.6.2.4.Natamicina

La natamicina es un producto natural con propiedades antifúngicas que se utiliza para proteger alimentos y bebidas de la contaminación por hongos y moho (San Lucas Sánchez; Carlos, 2012). Proviene de un cultivo de bacterias *Streptomyces natalensis* sin manipulación genética y bajo un proceso de fermentación rigurosamente supervisado, luego de la extracción, este se somete a un proceso de centrifugación, filtración y lavado, garantizando la pureza y la excelencia del producto final (Natamycin, 2014). Su principal función es la de preservar la calidad de productos lácteos fermentados y carnes, aunque también se emplea para tratar la queratitis micótica (Rivera-Toledo et al., 2020).

2.7. Pruebas bioquímicas para identificar las especies bacterianas

- **Rojo metilo:** Fue creada por Clark y Lubs en el año de 1975, es el método más viable para identificar especies bacterianas del grupo coliforme, capaces de producir ácidos con altas concentraciones a partir de la degradación de glucosa manteniendo el pH en valores inferiores de 4; esto se debe a que al someterse a esta prueba su coloración cambia de amarillo a rojo (C. Rodríguez & Zhurbenko, 2018).

- **Tinción de Gram:** Esta técnica fue creada por el Dr. Hans Christian Gram en 1884, permite identificar bacterias a partir de la tinción de la membrana de las células utilizadas, se divide en 2 categorías: Gram- y Gram+ (Fernández, 2022). Las Gram (+) son aquellas que retienen la tinción azul-violeta por su pared celular gruesa compuesta por peptidoglucanos y polímeros generando así una restricción en su decoloración; las Gram (-) sufren una decoloración significativa tiñéndose de safranina, debido a su fina pared celular compuesta por peptidoglucanos con una capa de lipoproteínas y estas son extinguidas en el proceso de decoloración (P. Rodríguez & Arenas, 2018).
- **Prueba de catalasa:** Corresponde a la enzima presente en organismos con citocromos y que neutraliza el H_2O_2 una forma toxica derivada del metabolismo oxigenado (Chisag, 2022). Esta prueba tiene como principal función observar la producción de enzimas catalasa y descompone el peróxido de hidrogeno formado durante la oxidación de azúcares (Ramirez et al., 2018).
- **Prueba de oxidasa:** Consiste en la identificación de oxidasas por su reacción con el citocromo oxidasa. La reacción oxidasa ocurre por la presencia del sistema citocromo oxidasa, que reduce el oxígeno para producir agua o peróxido de hidrógeno, según la especie. La muestra se coloca en una tira de papel de prueba o disco que contiene el reactivo p-amino-N-dimetil-anilina, el cambio de color a azul/violeta se observa en 30 segundos para que sea positivo, sino es negativo (Duchi, 2022).

2.8. Método para conservar bacterias purificadas

2.8.1. Liofilización

Es un método de eliminación de agua mediante la desecación al vacío y bajo un ambiente con temperaturas de oscilación con el fin de conservar un producto por mayor tiempo sin dañar sus características (Ccoyori & Huahuatico, 2022).

La liofilización se utilizó como técnica de concentración de metabolitos inhibidores de BAL para identificar los aumentos potenciales en la actividad antimicrobiana, donde tiene como objetivo la separación del agua mediante el proceso de congelación y sublimación del hielo a menores presiones y así a partir de este método los productos metabólicos de las bacterias evitan la fase liquida obteniendo cambios enzimáticos, químicos y bilógicos (Ruiz, 2019). Pero este método de conservación puede ser agresivo llegando a causar daño celular, reducción significativa de viabilidad y actividad microbiana (Flores, 2020).

2.9. Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría

2.9.1. Espectrofotometría UV-vis

Es un método analítico ampliamente empleado, se fundamenta en la conexión por la absorción de luz por un compuesto y su concentración (Santa Cruz, 2019).

Para generar el espectro de absorción, el dispositivo registra la intensidad lumínica antes y después de pasar a través de la muestra, realizando este proceso para cada longitud de onda. Durante la obtención del espectro, se lleva a cabo una corrección utilizando un blanco, así, el resultado permanecerá intacto ante la absorción inherente del equipo (Belda, 2020).

La espectroscopía se fundamenta en la capacidad de las moléculas para absorber radiación, abarcando incluso aquella dentro del espectro UV-Visible. Tanto las

longitudes de onda que una molécula es capaz de absorber como la eficacia de dicha absorción son afectadas por la estructura atómica y las condiciones del entorno (Santa Cruz, 2019).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación de la Investigación

La recolección de muestras se realizó en el cantón Echeandía, directamente desde el centro de acopio de cacao ubicado en el recinto San Gerardo, correspondiente a la zona geográfica 687965.8 al este y 9832918.4 al norte, en la Zona 17 del sur de Ecuador.

Las actividades de la caracterización y aislamiento de las bacterias de los géneros *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp.* presentes en el mucílago de cacao, se llevaron a cabo en el laboratorio general de la Universidad Estatal de Bolívar, situado en la provincia Bolívar, cantón Guaranda al este 722436.4, norte 9822407.9 Zona 17 M al sur del Ecuador. El proceso de liofilización y viabilidad de bacterias se realizó en el laboratorio de Análisis de Alimentos y Fitoquímica y laboratorio de Bioquímica y Cromatografía del Vicerrectorado de Investigación y Vinculación ubicada en la provincia Bolívar, cantón Guaranda al este 722773, norte 9821524.1 Zona: 17 M sur del Ecuador.

3.2. Materiales y Equipos

3.2.1. Material experimental

- Mucílago de cacao: CCN – 51 y Nacional

3.2.2. Materiales de campo

- Agenda de apuntes
- Esferos
- Bata de laboratorio
- Guantes

3.2.3. Materiales de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer
- Cajas Petri
- Cinta parafilm
- Papel aluminio
- Bisturí
- Asa de siembra
- Asa Digralsky
- Probetas (100 mL, 50 mL – 10 mL)
- Tubos eppendorf (2 mL)
- Espátula
- Gradilla
- Vaso de precipitación (100 mL - 50 mL)
- Mechero de alcohol
- Porta objetos
- Micropipeta (1000 µL)
- Piseta
- Pinzas
- Cronómetro

3.2.4. Reactivos

- *Lactobacillus* MRS Agar; Code: TM 146
- Caldo MRS; Code TM 147
- GYC (Extracto de levadura, bactoagar, dextrosa, carbonato de calcio, natamicina).

- *Acetobacter* agar (Extracto de levadura, agar, glucosa, carbonato de calcio).
- Carr (Extracto de levadura, agar, natamicina, verde de bromocresol, etanol).
- Verde de bromocresol; Code: 11456
- Natamicina; Code: QNATA
- Caldo nutriente; Code: TM 350
- Medio MR-VP
- Agua peptonada; Code: TM 330
- Violeta de genciana.
- Rojo de metileno
- Tiras de oxidasa Code: 600913
- Alcohol 96%
- Agua destilada
- Lugol
- Safranina
- Peróxido de hidrógeno 3%; Code: QCL424
- Glicerol; Code: 597
- NaOH 0.1N; Code: QCL271
- Aceite de inmersión

3.2.5. Equipos

Tabla 5
Equipos utilizados en la investigación

Equipo	Marca	Origen
Estufa	MEMMERT	Alemania
Balanza analítica	RADWAG	Polonia
Cámara de flujo laminar	Biobase	China
Microscopio	Nikon eclipse	China
Potenciómetro	Hanna Intruments	Italia

Autoclave vertical	Trident	España
Liofilizador	Christ (Alpha 1-4 LD plus)	Alemania
Congelador	LG	Corea del Sur
Cuenta colonias	Biobase	China
NanoDrop	Thermo Scientific	Estados Unidos

Nota: La ubicación de estos equipos se encuentran distribuidos en los diferentes laboratorios de la UEB

3.3. Métodos

3.3.1. Factores en estudio

En el contexto de esta investigación, se implementaron dos diseños experimentales. El primero de ellos se enfocó en la fase de aislamiento de bacterias fermentadoras del ácido láctico a partir del mucílago de cacao, este diseño está constituido de tres factores AxBxC. El Factor A correspondió a la variedad del cacao, con dos niveles; el Factor B se refirió a la temperatura de incubación, con dos niveles; y el Factor C estuvo asociado al medio de cultivo, con dos niveles. La variable respuesta en este contexto fue el crecimiento (UFC/mL) de bacterias aisladas, específicamente del género *Lactobacillus*, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Factores de estudio para el aislamiento de bacterias BAL

Factores	**Código**	**Nivel**
Variedad de cacao	A	a_1: CCN – 51 a_2: Nacional
Temperatura de incubación	B	b_1: 30 °C b_2: 35 °C
Medio de cultivo	C	c_1: Medio sólido c_2: Medio líquido

El segundo diseño, abordó la fase de aislamiento de bacterias fermentadoras del ácido acético presentes en el mucílago de cacao. El diseño utilizado es AxBxC que está constituido por tres factores D, E y F. El Factor D se asoció a la variedad del cacao, con dos niveles; el Factor E estuvo relacionado con la temperatura de

incubación, con dos niveles; y el Factor F se refirió al medio de cultivo, con dos niveles. La variable respuesta en este escenario fue el crecimiento (UFC/mL) de las bacterias aisladas, específicamente del género *Acetobacter*, como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7
Factores de estudio para el aislamiento y caracterización de bacterias BAA

Factores	Código	Nivel
Variedad de cacao	D	d_1: CCN - 51 d_2: Nacional
Temperatura de incubación	E	e_1: 25 °C e_2: 30 °C
Medio de cultivo	F	f_1: Medio GYC + natamicina f_2: Medio Carr

3.3.2. Tratamientos

Los tratamientos para el primer diseño constituyen la combinación de cada uno de los niveles de los factores A, B y C que intervienen en el estudio.

Tabla 8
Combinación de tratamientos para el aislamiento del BAL

Tratamiento	Código	Niveles		
		Variedad de cacao	T de incubación (°C)	Medio de cultivo
1	$a_1b_1c_1$	CCN - 51	30	Medio sólido
2	$a_1b_1c_2$	CCN – 51	30	Medio líquido
3	$a_1b_2c_1$	CCN - 51	35	Medio sólido
4	$a_1b_2c_2$	CCN - 51	35	Medio líquido
5	$a_2b_1c_1$	Nacional	30	Medio sólido
6	$a_2b_1c_2$	Nacional	30	Medio líquido
7	$a_2b_2c_1$	Nacional	35	Medio sólido
8	$a_2b_2c_2$	Nacional	35	Medio líquido

Nota: La tabla presenta la combinación de los factores de estudio utilizados en la investigación.

Los tratamientos para el segundo diseño constituyeron la combinación de cada uno de los niveles de los factores D, E y F que intervienen en el estudio.

Tabla 9
Combinación de tratamientos para el aislamiento del BAA

Tratamiento	Código	Niveles		
		Variedad de cacao	T de incubación (°C)	Medio de cultivo
1	$d_1e_1f_1$	CCN - 51	25	Medio GYC + natamicina
2	$d_1e_1f_2$	CCN - 51	25	Medio Carr
3	$d_1e_2f_1$	CCN - 51	30	Medio GYC + natamicina
4	$d_1e_2f_2$	CCN - 51	30	Medio Carr
5	$d_2e_1f_1$	Nacional	25	Medio GYC + natamicina
6	$d_2e_1f_2$	Nacional	25	Medio Carr
7	$d_2e_2f_1$	Nacional	30	Medio GYC + natamicina
8	$d_2e_2f_2$	Nacional	30	Medio Carr

Nota: La tabla presenta la combinación de los factores de estudio utilizados en la investigación.

3.3.3. Descripción de la unidad experimental

Los detalles experimentales se describieron con respecto a los factores de investigación, que incluyó el número de factores, los niveles de cada factor, el número de réplicas y la variable de respuesta correspondientes al diseño para el aislamiento de las bacterias fermentadoras de ácido láctico (BAL) y ácido acético (BAA).

Tabla 10
Características del experimento de aislamiento del BAL

Características del diseño		Descripción	Niveles	Unidades
Número de factores experimentales	3	Variedad de cacao	2	°C
		Temperatura de incubación	2	
		Medio de cultivo	2	
Variable respuesta	1	Crecimiento de bacterias aisladas - *Lactobacillus*		UFC/mL
Número de corridas	24			

Grados de libertad para el error	17		
Réplica	2		
Tamaño de la unidad experimental	5		mL

Nota: Variable respuesta principal es crecimiento de las bacterias aisladas del género *Lactobacillus*

Tabla 11
Características del experimento de aislamiento del BAA

Características del diseño		**Variable respuesta**	**Niveles**	**Unidades**
Número de factores experimentales	3	Variedad de cacao	2	°C
		Temperatura de incubación	2	
		Medio de cultivo	2	
Variable respuesta	1	Crecimiento de bacterias aisladas - *Acetobacter*		UFC/mL
Número de corridas	24			
Grados de libertad para el error	17			
Réplica	2			
Tamaño de la unidad experimental	5			mL

Nota: Variable respuesta principal es crecimiento de las bacterias aisladas del género *Acetobacter*

3.3.4. Tipo de diseño experimental

Como se mencionó anteriormente, se emplearon dos diseños experimentales AxBxC (2x2x2) con dos repeticiones cada uno. El modelo estadístico presentado es el siguiente:

Modelo matemático del diseño AxBxC

$$\boldsymbol{Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}} \quad (\mathbf{1})$$

Donde*:*

$\boldsymbol{\mu}$: Media general.

$\boldsymbol{\alpha_i}$: Efecto debido al i-esimo nivel del factor a.

$\boldsymbol{\beta_j}$: Efecto del j-esimo nivel del factor b.

$\boldsymbol{\gamma_k}$: Efecto del j-esimo nivel del factor c.

$(\boldsymbol{\alpha\beta})_{ij}$, $(\boldsymbol{\alpha\gamma})_{ik}$, $(\boldsymbol{\beta\gamma})_{jk}$: Efecto de interacción doble en los niveles *ij*, *ik*, *jk*.

$(\boldsymbol{\alpha\beta\gamma})_{ijk}$: Efecto de interacción triple en la combinación *ijk*.

$\boldsymbol{\varepsilon_{ijkl}}$: Error aleatorio en la combinación *ijk*.

Análisis de varianza (ANOVA) para diseño AxBxC

Tabla 12
Modelo de análisis de varianza (ANOVA) para el diseño en arreglo factorial AxBxC

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	Valor-p
Efecto A	SC_A	a-1	CM_A	CM_A/CM_E	$P(F > F_0^A)$
Efecto B	SC_B	b-1	CM_B	CM_B/CM_E	$P(F > F_0^B)$
Efecto C	SC_C	c-1	CM_C	CM_C/CM_E	$P(F > F_0^C)$
Efecto AB	SC_{AB}	(a-1)(b-1)	CM_{AB}	CM_{AB}/CM_E	$P(F > F_0^{AB})$
Efecto AC	SC_{AC}	(a-1)(c-1)	CM_{AC}	CM_{AC}/CM_E	$P(F > F_0^{AC})$
Efecto BC	SC_{BC}	(b-1)(c-1)	CM_{BC}	CM_{BC}/CM_E	$P(F > F_0^{BC})$
Efecto ABC	SCA_{BC}	(a-1)(b-1)(c-1)	CMA_{BC}	CMA_{BC}/CM_E	$P(F > F_0^{ABC})$
Error	SC_E	abc(n -1)	CM_E		
Total	SC_T	abcn-1			

Nota: Tomado del libro Análisis y diseño de experimentos. Fuente: Gutiérrez & de la Vara, (2012).

Donde:

$\boldsymbol{SC_A}$: Suma de cuadrados del efecto A

$\boldsymbol{SC_B}$: Suma de cuadrados del efecto B

$\boldsymbol{SC_C}$: Suma de cuadrados del efecto C

$\boldsymbol{Y_{i\cdot}^2}$: Suma de observaciones del tratamiento *i*

$\boldsymbol{Y_{\cdot\cdot}^2}$: Suma total de las $n = n_1 + n_2 + \cdots + n_k$ mediciones

$\boldsymbol{N}$: Número de tratamientos + repeticiones

$\boldsymbol{SC_{AB}}$: Suma de cuadrados del efecto AB

$\boldsymbol{SC_{AC}}$: Suma de cuadrados del efecto AC

$\boldsymbol{SC_{BC}}$: Suma de cuadrados del efecto BC

$\boldsymbol{SC_{ABC}}$: Suma de cuadrados del efecto ABC

$\boldsymbol{a, b}$: Número máximo de factores

$\boldsymbol{SC_E}$: Suma de cuadrados de error

$\boldsymbol{SC_T}$: Suma de cuadrados totales

$\boldsymbol{CM_A}$: Cuadrado medio del efecto A

$\boldsymbol{CM_B}$: Cuadrado medio del efecto B

$\boldsymbol{CM_C}$: Cuadrado medio del efecto C

$\boldsymbol{CM_{AB}}$: Cuadrado medio del efecto AB

$\boldsymbol{CM_{AC}}$: Cuadrado medio del efecto AC

$\boldsymbol{CM_{BC}}$**:** Cuadrado medio del efecto BC

$\boldsymbol{CM_{ABC}}$**:** Cuadrado medio del efecto ABC

$\boldsymbol{CM_E}$**:** Cuadrado medio del error

$\boldsymbol{F_0}$: Razón F

Pruebas de rangos múltiples

Método LSD (Diferencia mínima significativa)

$$\boldsymbol{LSD} = \left|\overline{\boldsymbol{Y}}_{\boldsymbol{i}} - \overline{\boldsymbol{Y}}_{\boldsymbol{j}}\right| > \boldsymbol{t}_{\left(\frac{\alpha}{2}, N-k\right)}\sqrt{\boldsymbol{CM_E}\left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}\right)} \qquad (2)$$

Donde:

$\boldsymbol{k}$**:** número de tratamientos.

$\left|\overline{\boldsymbol{Y}}_{\boldsymbol{i}} - \overline{\boldsymbol{Y}}_{\boldsymbol{j}}\right|$ **:** valor absoluto entre las medias muéstrales.

$t_{\left(\frac{\alpha}{2}, N-k\right)}$ **:** distribución T de Student con N-k grados de libertad que corresponden al error.

CM_E **:** cuadrado medio del error que se obtiene de la tabla ANOVA.

n_i, n_j **:** número de observaciones para los tratamientos *i* y *j*, respectivamente.

3.4. Manejo del experimento

3.4.1. Extracción de mucílago de cacao

El mucílago de cacao es una sustancia viscosa localizada en distintas partes de la almendra de cacao y es considerado un residuo orgánico de color blanquecino (Moreira, 2019).

A continuación, se describe las etapas del proceso:

a) **Recolección:** Las muestras se recolectaron del centro de acopio del Recinto San Gerardo. El cacao, se cosecho en función del grado de madurez, los cuales tenían colores llamativos, para el cacao CCN-51 se escogió las mazorcas de color rojizo; y para la variedad Nacional el color de la mazorca fue amarillo, ambos con textura rugosa suave.

b) **Selección:** Se seleccionaron cuatro mazorcas de cada variedad de cacao, donde la variedad CCN – 51 tenía un peso promedio de 350 g, mientras que la variedad Nacional tenía un peso promedio de 272 g.

c) **Lavado:** Las mazorcas de cacao fueron lavadas con agua clorada al 0,01% y enguadas con agua potable.

d) **Cortado:** Se realizaron dos cortes longitudinales y dos trasversales a la mazorca de cacao con un cuchillo de acero inoxidable.

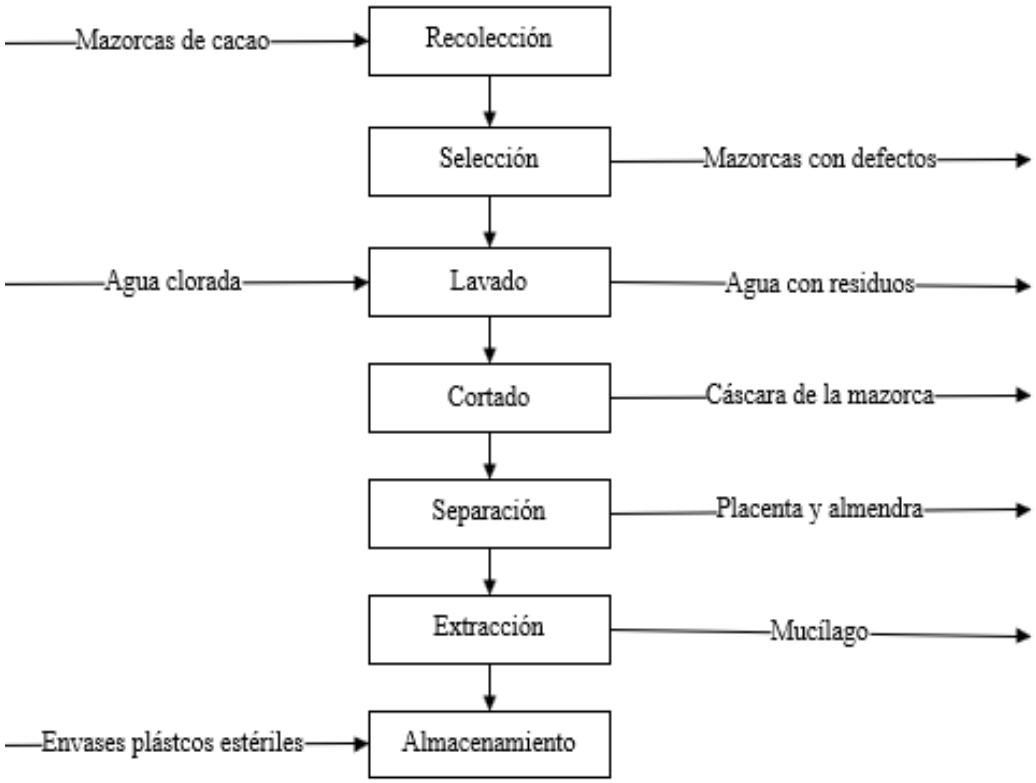
e) **Separación:** Se separaron las almendras de la placenta del cacao de forma manual para posterior uso.

f) **Extracción:** Para la extracción del mucílago de cacao se colocó 160 g de las almendras correspondientes a cada variedad de cacao en un lienzo, donde se ejerció presión con el fin de obtener el mucílago. El mucilago obtenido para la variedad CCN - 51 fue de 100 mL, en contraste con la variedad Nacional donde se obtuvo 60 mL.

g) **Almacenamiento:** Se almacenó en envases plásticos estériles.

Diagrama de flujo para la extracción de mucílago de cacao

Figura 3
Diagrama de flujo para la extracción de mucílago de cacao



Nota: La figura muestra los pasos para realizar la extracción del mucílago de cacao.

3.4.2. Aislamiento por cultivo de bacterias de los ácidos: láctico y acético.

3.4.2.1. Aislamiento de las bacterias ácido lácticas: Agar y caldo MRS

Se empleó el medio de cultivo MRS específico para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas, siguiendo los procedimientos detallados en la normativa UNE-EN

ISO 7218 (2008), para la siembra, que establece los protocolos adecuados para este fin.

A continuación, se describe las etapas del proceso:

a) **Recepción:** El mucílago de cacao fue extraído de los recipientes donde previamente fue almacenado.
b) **Dilución de la muestra:** Se diluyó la muestra de mucílago de cacao en agua estéril, logrando una concentración adecuada de bacterias. Siendo así, 1 mL de la muestra en 9 mL de agua estéril se continuó este proceso de diluciones seriadas hasta asegurar que la cantidad de microorganismo sembrados sea adecuada parar contar colonias individuales.
c) **Preparación del medio de cultivo:** Para preparar el agar MRS, se mezcló 67,15 g/L de agar con agua destilada a temperatura ambiente, mientras que para el caldo MRS se mezcló 55,25 g/L en agua destilada. La solución resultante fue calentada y agitada hasta alcanzar el punto de ebullición, después se colocó en la autoclave y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C.
d) **Sembrado:** Para la siembra en placa se tomaron 100 µL con una micropipeta de la muestra diluida, esta muestra fue distribuida uniformemente sobre la superficie del agar con el asa Digralsky. En cambio, para la siembra en medio líquido se utilizaron 300 µL de la muestra diluida en 50 mL de caldo.
e) **Sellado:** Se procedió a sellar las cajas Petri y matraces con cinta parafilm para evitar la contaminación.

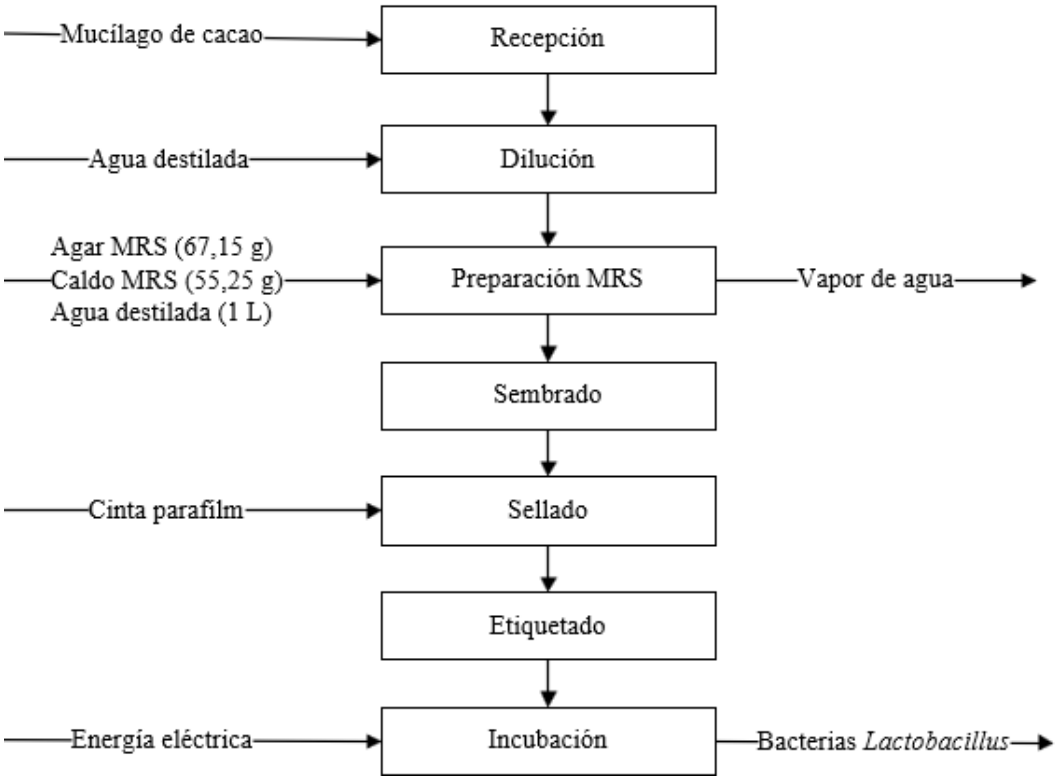
f) Etiquetado: Se rotuló cada caja Petri y matraz según la codificación previamente establecida y fecha de siembra.

g) Incubación: La incubación se llevó a cabo a temperaturas adecuadas para el crecimiento de *Lactobacillus* de 30 °C y 35°C. Se supervisó el crecimiento cada 24 h.

Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas

Figura 4

Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas



Nota: La figura muestra los pasos para realizar el aislamiento de las bacterias ácido lácticas en agar y caldo MRS.

3.4.2.2. Aislamiento de las bacterias ácido acéticas:

3.4.2.2.1. Medio de cultivo Carr

Para realizar el aislamiento de las bacterias ácido lácticas es necesario tener un medio de cultivo especifico (Carr); para la siembra se utilizó la normativa ISO 7218:2007 que detalla los procedimientos adecuados.

A continuación, se describe las etapas del proceso:

a) **Recepción:** El mucílago de cacao fue extraído de los recipientes donde previamente fue almacenado.

b) **Dilución de la muestra:** Se diluyó la muestra de mucílago de cacao en agua estéril, logrando una concentración adecuada de bacterias. Siendo así, 1 mL de la muestra en 9 mL de agua estéril se continuó este proceso de diluciones seriadas hasta asegurar que la cantidad de microorganismo sembrados sea adecuada parar contar colonias individuales.

c) **Preparación del medio de cultivo:** Para la preparación del medio Carr fue necesario mezclar extracto de levadura (10 g/L), agar (20 g/L), verde de bromocresol (0,04 g/L), natamicina (100 mg/L), etanol (17,5 mL/L) a pH 6,8.

d) **Sembrado:** Para la siembra en placa se tomó 100 µL con una micropipeta de la muestra diluida, esta muestra fue distribuida uniformemente sobre la superficie del agar con el asa Digralsky.

e) **Sellado:** Las cajas Petri fueron selladas utilizando cinta parafilm con el fin de prevenir la apertura y contaminación de las mismas.

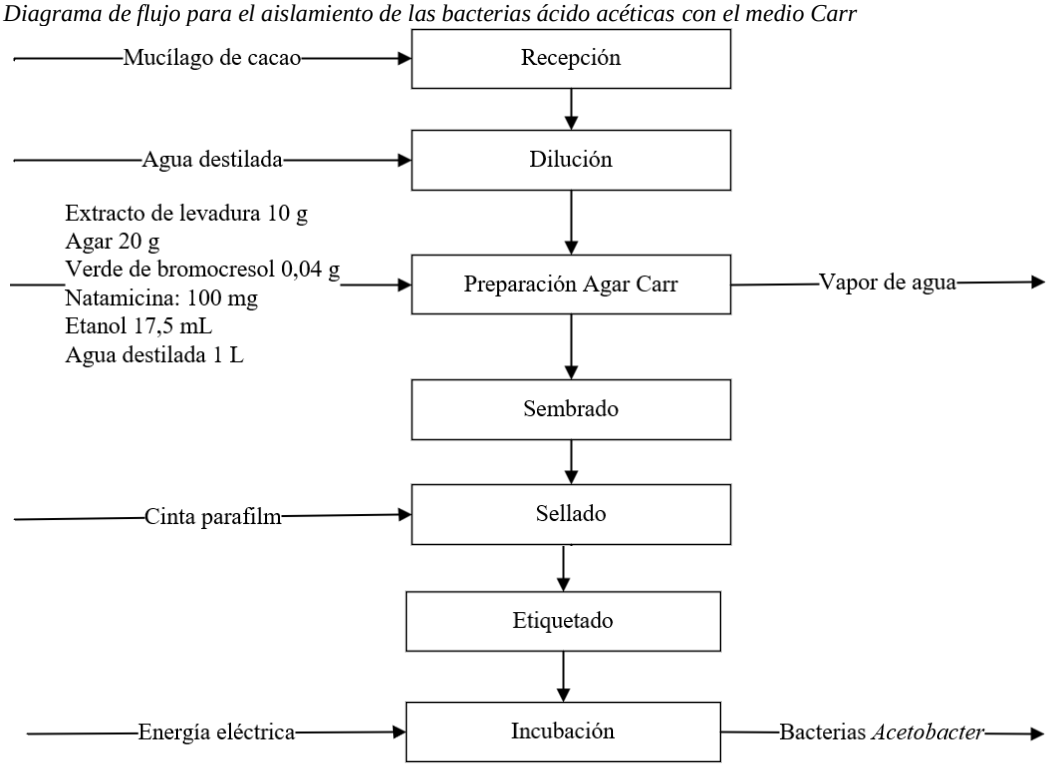
f) **Etiquetado:** Se rotuló cada caja Petri según su codificación previamente establecida y fecha de siembra.

g) **Incubación:** Se incubó a temperaturas adecuadas para el crecimiento de *Acetobacter*, de 25 °C y 30°C. Se supervisó el crecimiento cada 24 h.

Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido acético

Figura 5

Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido acéticas con el medio Carr



Nota: La figura muestra los pasos para realizar el aislamiento de las bacterias ácido acéticas en agar Carr.

3.4.2.2.2. Medio de cultivo GYC

Se utilizó el medio de cultivo GYC para aislar bacterias ácido acéticas, siguiendo las pautas establecidas por la normativa ISO 7218:2007, la cual detalla los procedimientos apropiados para la siembra.

Para aislar bacterias ácido acético, se siguieron estos pasos:

a) **Recepción:** El mucílago de cacao fue extraído de los recipientes donde previamente fue almacenado.

b) **Dilución de la muestra:** Se diluyó la muestra de mucílago de cacao en agua estéril, logrando una concentración adecuada de bacterias. Siendo así, 1 mL de la muestra en 9 mL de agua estéril se continuó este proceso de diluciones

seriadas hasta asegurar que la cantidad de microorganismo sembrados sea adecuada parar contar colonias individuales.

c) **Preparación del medio de cultivo:** La preparación de GYC implicó mezclar extracto de levadura (10 g/L), bactoagar (20 g/L), dextrosa (50 g/L), carbonato de calcio (5 g/L), etanol (70 mL/L), natamicina 100 mg/L y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

h) **Sembrado:** Para la siembra en placa se tomó 100 µL con una micropipeta de la muestra diluida, esta muestra fue distribuida uniformemente sobre la superficie del agar con el asa Digralsky.

d) **Sellado:** Se procedió a sellar las cajas Petri con cinta parafilm y así evitar una contaminación externa.

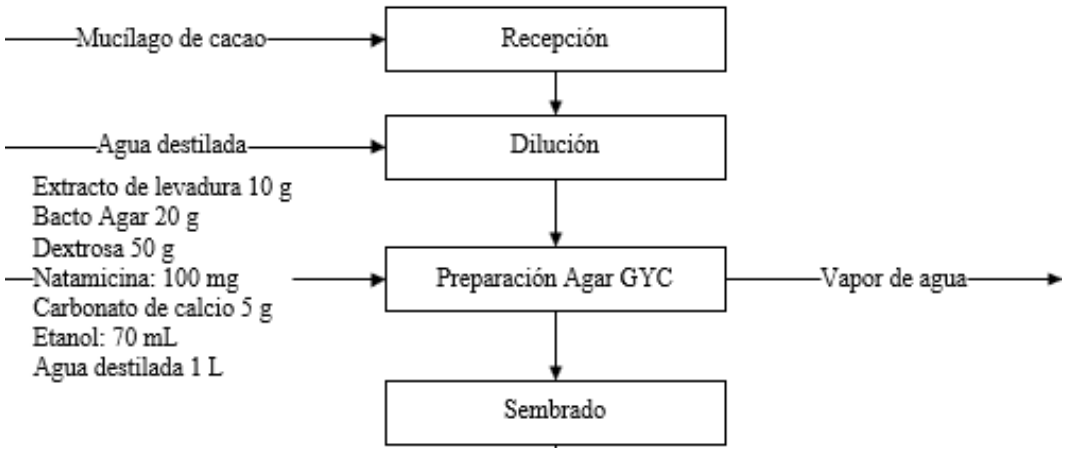
e) **Etiquetado:** Se rotuló cada caja Petri según su codificación previamente establecida y fecha de siembra.

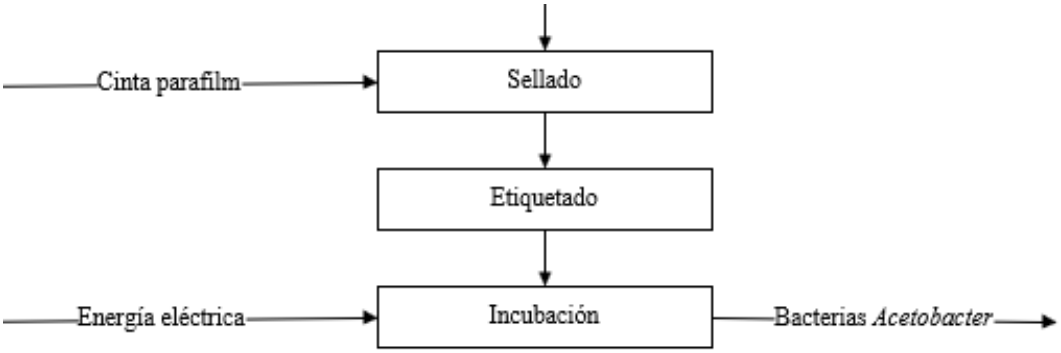
f) **Incubación:** Se incubó a temperaturas adecuadas para el crecimiento de *Acetobacter*, de 25 °C y 30°C. Se supervisó el crecimiento cada 24 h.

Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido acético

Figura 6

Diagrama de flujo para el aislamiento de las bacterias ácido acéticas con el medio GYC





Nota: La figura muestra los pasos para realizar el aislamiento de las bacterias ácido acéticas en agar GYC.

3.4.3. Caracterización Bioquímica y Microscópica

A las bacterias aisladas se aplicó pruebas microscópica y bioquímica

3.4.3.1. Tinción de Gram

- **Preparar la muestra:** Se tomó una asada de muestra de la bacteria y se colocó en un portaobjetos limpio con una gota de agua destilada.
- **Fijación:** Se aplicó calor suave para fijar la muestra en el portaobjetos.
- **Tinción inicial:** Se aplicó siete gotas de violeta de genciana en la muestra y se dejó actuar durante 1 minuto.
- **Mordiente:** Sin lavar se colocó y se mezcló siete gotas de Lugol sobre la muestra durante 1 minuto.
- **Enjuagar:** Se enjuago la muestra con 10 mL de agua destilada para retirar el exceso.
- **Decoloración:** Se aplicó diez gotas alcohol 96% sobre la muestra durante 30 segundos.
- **Enjuagar:** Se enjuago la muestra con 10 mL de agua destilada para retirar el exceso de alcohol.
- **Contratinción:** Se aplicó diez gotas de safranina sobre la muestra y durante 3 min.

- **Enjuagar:** Se enjuago la muestra con 10 mL de agua destilada para retirar el exceso de safranina.
- **Secado:** La muestra se dejó secar y se colocó una gota de aceite de inmersión.
- **Observar al microscopio:** La muestra se observó bajo el microscopio para determinar si se trata de una bacteria Gram positiva o Gram negativa.
    - Gram (+): color violeta oscuro
    - Gram (-): color rojo o rosa.

3.4.3.2. Prueba Rojo metilo

- **Preparación del medio de cultivo:** Se preparó el medio líquido RM-VP a concentración de 17 g/L de agua destilada. Se calentó y agitó hasta llevar a ebullición y se esterilizó al autoclave a 121°C durante 15 minutos
- **Inoculación:** El medio de cultivo líquido se distribuyó en tubos de ensayo donde se colocó una asada de cepa bacteriana.
- **Incubación:** Se incubó los tubos de ensayo a 30° durante 24 horas.
- **Indicador:** Se colocó 2 – 3 gotas del indicador rojo de metilo.
- **Observación:** Se observó la coloración, si el indicador cambia a rojo es positivo y si conserva el color amarillo es negativo.

3.4.3.3.Prueba de catalasa

- Se depositó una pequeña cantidad de la suspensión de la bacteria pura en un portaobjetos que estaba limpio.
- Se añadieron dos gotas de peróxido de hidrógeno al portaobjetos que contenía la bacteria, con una concentración del 3%.

- Se observó si presenta efervescencia, lo que indica que la enzima catalasa de la bacteria ha descompuesto el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.
    - Catalasa positiva: Si se produce efervescencia.
    - Catalasa negativa: No se produce efervescencia.

3.4.3.4. Prueba de oxidasa

- Con guantes estériles se manipuló las tiras reactivas de oxidasa.
- Se utilizó el asa de siembra para depositar una pequeña cantidad de bacteria sobre la almohadilla impregnada con el reactivo tetrametil-p-fenilendiamina.
- El cambio de color se observa de manera inmediata a los primeros 10 - 30 segundos.
    - Oxidasa positiva: Color azul.
    - Oxidasa negativa: No hay cambio de color.

3.4.4. Incorporación de un sustrato para aumento de biomasa para bacterias acido lácticas y acido acéticas

Para aumentar la biomasa de las bacterias acido lácticas se consideró la metodología usada en el apartado 3.4.2.1; con la adición de bactoagar (20 g/L) y leche descremada al 5%.

En cambio, para las bacterias acido acéticas se observó una mayor presencia en el medio *Acetobacter agar* por tener mayor cantidad de carbonato de calcio en su formulación, por tanto, para el aumento de biomasa de las bacterias ácido acético, se siguieron estos pasos:

a) **Recepción:** Se receptó la bacteria aislada del medio de cultivo selectivo donde hubo presencia de *Acetobacter spp*.

b) Preparación del medio de cultivo: La preparación de *Acetobacter* agar implicó la mezcla de extracto de levadura (10 g/L), agar (15 g/L), glucosa (50 g/L) y carbonato de calcio (30 g/L). finalmente, se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos

c) Sembrado: La muestra de bacteria extraída fue sembrada utilizando la técnica de agotamiento en placa.

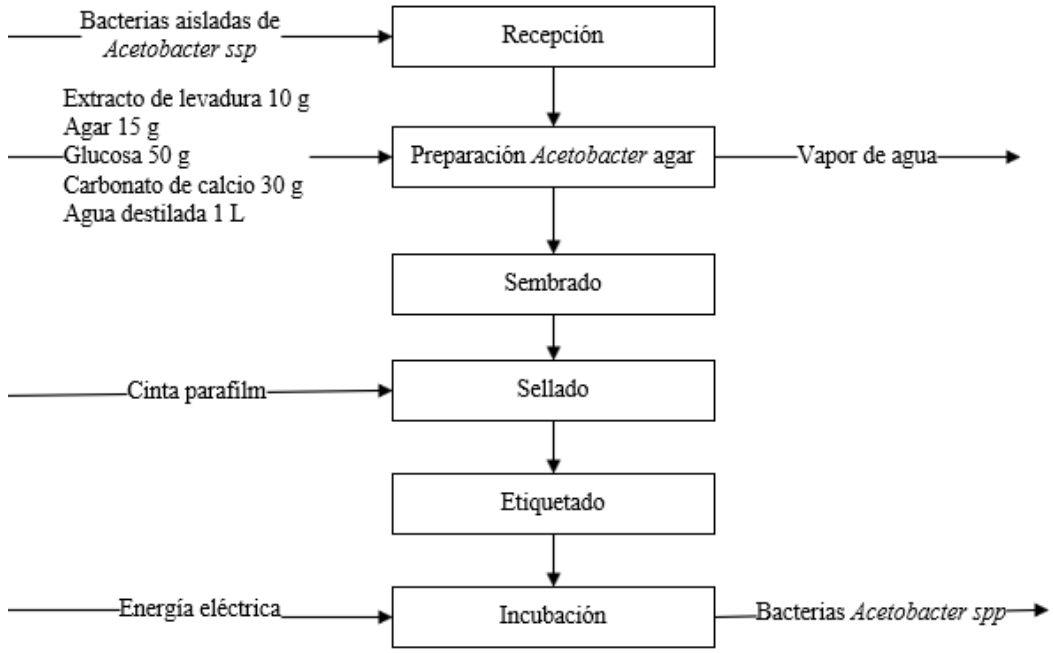
d) Sellado: Se selló en cajas petri con cinta parafilm y así evitar una contaminación externa.

e) Etiquetado: Se codificó cada caja petri según su fecha de siembra.

f) Incubación: Se colocó en la incubadora a temperatura de 30°C resultante del diseño, para el crecimiento de *Acetobacter spp*.

Diagrama de flujo para el aumento de biomasa de *Acetobacter spp.*

Figura 7
Diagrama de flujo para el aumento de biomasa de Acetobacter spp.



Nota: La figura muestra los pasos para realizar el aumento de biomasa de *Acetobacter spp* en *Acetobacter* agar

3.4.4.1. Determinar la cinética de crecimiento de los microorganismos obtenidos.

Para llevar a cabo el análisis de crecimiento microbiano, se procedió a homogeneizar una solución de agua destilada con un 5% de cloruro de sodio, se esterilizó en el autoclave durante 15 min a 121°C.

Para realizar las diluciones se colocó 1 asa de muestra en 10 mL de la solución preparada, siendo esta la dilución 0, para preparar la dilución D^{-1} se ocupó 9 mL de solución preparada y se agregó 1 mL de la dilución anterior; este paso se realizó hasta obtener la dilución D^{-5}. Para inocular se transfirió 100 µL de las diluciones en cajas Petri con los medios MRS para *Lactobacillus spp* y medio GYC para *Acetobacter spp*. Finalmente se incubo durante 72 h a 30 °C, revisando las colonias cada 12 h.

Para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC), se emplearon las siguientes fórmulas matemáticas.

$$\boldsymbol{n = \frac{t}{g}} \qquad (\mathbf{3})$$

$$\boldsymbol{r = \frac{ln\,(2)}{t\ generación}} \qquad (\mathbf{4})$$

$$\boldsymbol{N(t) = \frac{No}{1 + \frac{No - Nmax}{Nmax} \cdot e^{-rt}}} \qquad (\mathbf{5})$$

Donde:

n: Número de generación; **t:** tiempo de incubación; **g:** tiempo generacional; **r:** Tasa de crecimiento; **Nmax:** Capacidad máxima de crecimiento; **N(t):** Población en el tiempo t; **No:** Número inicial de microrganismos.

3.4.5. Conservación de los aislados bacterianos

La liofilización tiene como objetivo la separación del agua mediante el proceso de congelación y sublimación del hielo a menores presiones y así a partir de este método los productos metabólicos de las bacterias evitan la fase liquida (Ruiz, 2019).

Para realizar la liofilización de las bacterias de ácido láctico y acético fueron necesarios los siguientes pasos:

a) **Recepción de las bacterias:** Se recolectó las bacterias cultivadas en los medios específicos *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp.* hasta alcanzar la fase óptima de crecimiento.
b) **Resuspensión:** Se colocó un crioprotector en envases plásticos estériles junto con las cepas bacterianas.

   Solución crioprotectora para Lactobacillus spp. y Acetobacter spp.

   - Agua salina al 1%.

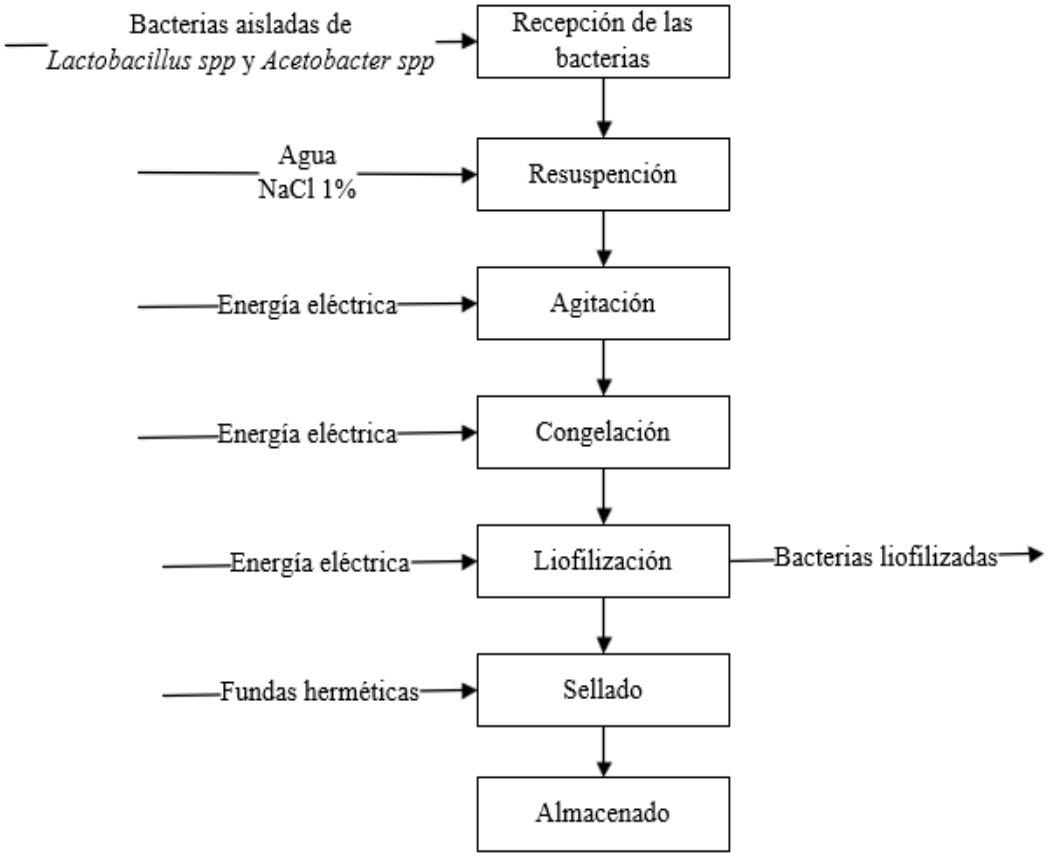
c) **Agitación:** Se mezcló gradualmente para que las bacterias estén suspendidas en el crioprotector.
d) **Congelación:** Se colocó los envases plásticos con la suspensión bacteriana en un congelador a -20°C durante mínimo 48 horas.
e) **Liofilización:** Se transfirió los envases plásticos congelados al liofilizador para que realice el proceso de liofilización, bajo los parámetros de presión 0,03 mbar y -56°C de temperatura.
f) **Sellado:** Las bacterias liofilizadas se trasvasaron a fundas metalizadas, para evitar una contaminación externa.
g) **Almacenado:** Se almacenaron las fundas selladas a temperaturas bajas.

Para determinar el rendimiento se utilizó la siguiente ecuación:

$$\boldsymbol{Rendimiento}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{Peso\ del\ producto\ liofilizado}}{\boldsymbol{Peso\ inical\ del\ producto}}\boldsymbol{x100} \quad (\mathbf{6})$$

Diagrama de flujo para la liofilización de bacterias *Lactobacillus spp. y Acetobacter spp.*

Figura 8
Diagrama de flujo para la liofilización de bacterias Lactobacillus spp. y Acetobacter spp.



Nota: La figura muestra los pasos para realizar la liofilización de las bacterias *Lactobacillus spp* y *Acetobacter spp.*

3.4.6. Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría

- Las bacterias liofilizadas fueron activadas, para *Lactobacillus spp.*, se utilizó caldo MRS y caldo nutriente para *Acetobacter spp*. Los blancos que se consideraron para medición de la absorbancia fueron los caldos de cultivo sin el microorganismo de interés.

- Los aislados de *Lactobacillus spp*. se inocularon 0,025 g de estas en 50 mL de caldo, mientras que en bacterias *Acetobacter spp*. se inoculo 0,05 g en 50 mL de caldo.
- Se realizó la lectura en el espectrofotómetro NanoDrop a una longitud de 625 nm en intervalos de 3 horas durante 72 horas; estos medios fueron incubados a 30°C.

3.5. Análisis de datos

Para realizar los análisis de datos cuantitativos se utilizó programas estadísticos como Statgraphics mediante una estadística inferencial que se usa para probar hipótesis, además de un análisis paramétrico como es el análisis de varianza (ANOVA) (Rodríguez et al., 2021). Además, de programas básicos del paquete de office como Excel.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias ácido lácticas y acéticas son aisladas del mucílago de cacao de la variedad Nacional, el cual posee un pH de 4.20, una acidez titulable de 0.0128 meq NaOH/100 g, un grado Brix de 18, una humedad del 81.54%, y un contenido de cenizas del 1.29%. Según Santana et al. (2019), indicaron que el mucílago de esta variedad tiene un pH de 3,57; acidez titulable 0,88, por otro lado, la información presentada por Jordan & Parra (2020), señaló que el grado Brix es de 17,40; humedad 80,48% y cenizas 2,15%.

En contraste, con el mucílago de cacao CNN-51 tiene un pH de 3.83; acidez titulable 0.0106 meq NaOH/100 g; grado Brix 18.3; humedad 76.06% y cenizas 0.46%. Vera et al. (2023), lograron resultados análogos, donde el mucílago de esta variedad de cacao registra un pH de 3,91 y 16 grado Brix, asimismo, Garcés (2021), indicó que la humedad es de 79,71%, finalmente, Arreaga (2020), señaló que el porcentaje de cenizas presentes en el mucílago es de 0,40%.

4.1. Modelo experimental para las bacterias ácido lácticas y ácido acéticas

Para poder contabilizar el crecimiento de las colonias bacterianas ácido lácticas y acéticas se realizó diluciones seriadas hasta la dilución: 10^{-6}, donde hubo presencia de colonias aisladas.

4.1.1. Aislamiento de *Lactobacillus*

Tabla 13
Tratamientos para Lactobacillus

Tratamiento	Variedad de cacao	T de incubación	Medio de cultivo	Crecimiento (UFC/mL)
1 R_0	CCN-51	30	Medio sólido	453
2 R_0	CCN-51	30	Medio líquido	11
3 R_0	CCN-51	35	Medio sólido	295

4 R_0	CCN-51	35	Medio líquido	25
5 R_0	Nacional	30	Medio sólido	0
6 R_0	Nacional	30	Medio líquido	0
7 R_0	Nacional	35	Medio sólido	0
8 R_0	Nacional	35	Medio líquido	0
1 R_1	CCN-51	30	Medio sólido	144
2 R_1	CCN-51	30	Medio líquido	10
3 R_1	CCN-51	35	Medio sólido	144
4 R_1	CCN-51	35	Medio líquido	19
5 R_1	Nacional	30	Medio sólido	0
6 R_1	Nacional	30	Medio líquido	0
7 R_1	Nacional	35	Medio sólido	0
8 R_1	Nacional	35	Medio líquido	0
1 R_2	CCN-51	30	Medio sólido	121
2 R_2	CCN-51	30	Medio líquido	20
3 R_2	CCN-51	35	Medio sólido	24
4 R_2	CCN-51	35	Medio líquido	30
5 R_2	Nacional	30	Medio sólido	0
6 R_2	Nacional	30	Medio líquido	0
7 R_2	Nacional	35	Medio sólido	0
8 R_2	Nacional	35	Medio líquido	0

La Tabla 13 muestra las combinaciones existentes entre las variedades de cacao (CCN–51 y Nacional), temperatura de incubación, medio de cultivo dando como resultado el crecimiento en UFC/mL de *Lactobacillus*, donde señala que en 0,0000001 mL de muestra hay 453 UFC, presentes en el cacao CCN-51 incubado en medio sólido por 48 h. Para contabilizar las bacterias presentes en el mucílago diluido, incubadas por 48 h en medio líquido se trasvasa 100 µL de este cultivo previamente agitado a cajas Petri, donde se incuba por un periodo de 24 h.

ANOVA

Tabla 14
ANOVA AxBxC para Lactobacillus

Fuente	**Suma de Cuadrados**	**Gl**	**Cuadrado Medio**	**Razón-F**	**Valor-P**
Efectos principales					
A: Variedad de cacao	65940,2	1	65940,2	9,91	0,0062**

B: Temperatura de incubación	2053,5	1	2053,5	0,31	0,5862
C: Medio de Cultivo	47348,2	1	47348,2	7,12	0,0168*
Interacciones					
AB	2816,67	1	2816,67	0,42	0,5245
AC	50784,0	1	50784,0	7,63	0,0139*
BC	3456,0	1	3456,0	0,52	0,4815
ABC	2604,17	1	2604,17	0,39	0,5404
Residuos	106443,	16	6652,71		
TOTAL (CORREGIDO)	281446,	23			

Nota: **: Diferencia estadística altamente significativa; *: Diferencia estadística significativa; todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La Tabla 14 exhibe el análisis de varianza (ANOVA) que divide la variabilidad relacionada con el "Crecimiento (UFC/mL) para *Lactobacillus* " en contribuciones provenientes de diversos factores. Los valores-p indican la significancia estadística de cada uno de estos factores. El factor que indica tener diferencia estadística altamente significativa es “Variedad de cacao” que tiene un valor-p de 0,0062**, seguido por el factor “Medio de cultivo” con el valor-p de 0,0168* y finalmente la interacción AC con el valor-p de 0,0139*.

Pruebas de Múltiple Rangos para Crecimiento por Medio de cultivo

Tabla 15
Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Medio de cultivo) para Lactobacillus

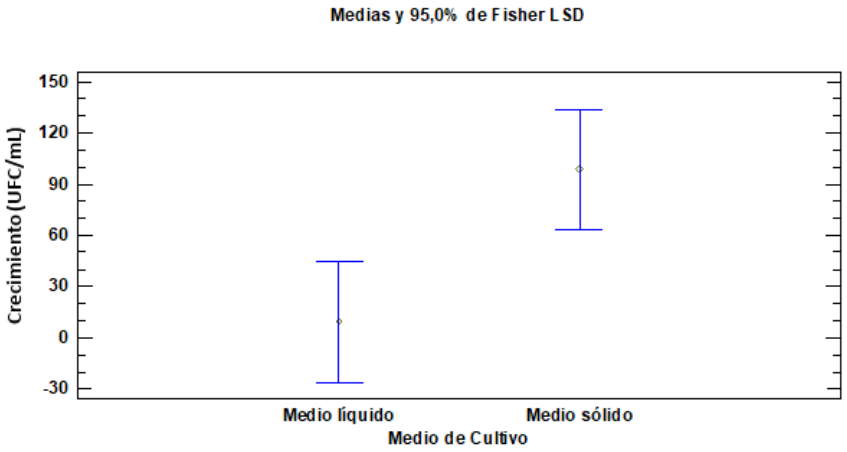
Medio de cultivo	**Casos**	**Media LS**	**Sigma LS**	**Grupos Homogéneos**	
Medio líquido	12	9,58333	23,5455	X	
Medio Sólido	12	98,4167	23,5455		X

La Tabla 15 emplea un enfoque de comparación múltiple para discernir las diferencias significativas entre las medias. Para lograr esto, se aplica el método de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher, el cual conlleva un riesgo del 5,0% de concluir que cada par de medias es significativamente distinto. Destacamos

que el contraste entre los medios de cultivo líquido y sólido muestra una diferencia significativa de -88,8333.

Según Melgaço et al. (2018), mencionaron que para el crecimiento de bacterias del ácido láctico obtenidas mediante el aislamiento a partir del proceso de fermentación del cacao, se debe utilizar medios de cultivos óptimos como el Agar o caldo MRS que permite el crecimiento de esta especie a una temperatura de incubación de 37°C durante 48 horas. Sin embargo, Ouattara et al. (2017), mencionaron que a este agar se le puede modificar agregando un suplemento 50 µg/mL de nistatina para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras y así obtener bacterias acido lácticas puras. En contraste, con otras investigaciones aplicadas para cepas aisladas de bacterias ácido lácticas, Oyeniran et al. (2020), señalaron que un medio clostridial reforzado modificado (mRCM) tiene una mayor precisión en obtener estas cepas.

Figura 9
Gráfico de medias para medios de cultivo (Lactobacillus)



La Figura 9 ilustra una diferencia de medias entre los diferentes niveles del factor medio de cultivo y su impacto en el crecimiento, lo cual indica que el nivel medio sólido presenta una media notablemente superior en comparacion con el medio de cultivo líquido.

Pruebas de Múltiple Rangos para Crecimiento por Variedad de cacao

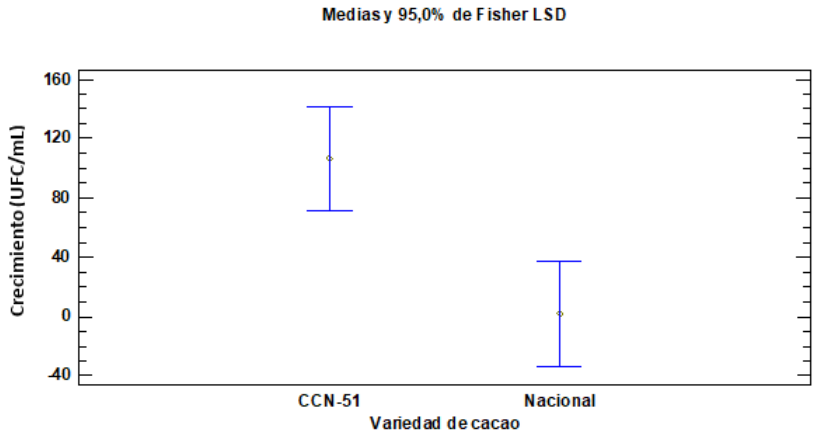
Tabla 16
Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Variedad de cacao) para Lactobacillus

Variedad de cacao	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
Nacional	12	1,58333	23,5455	X	
CCN - 51	12	106,417	23,5455		X

La Tabla 16 utiliza un método de comparación múltiple para identificar qué medias son significativamente distintas entre sí. El método utilizado para distinguir entre estas medias es el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher. Mediante este método, existe un riesgo del 5,0% de afirmar que cada par de medias es significativamente diferente. El contraste entre la variedad de cacao Nacional y CCN - 51 tiene una diferencia significativa de -104,833.

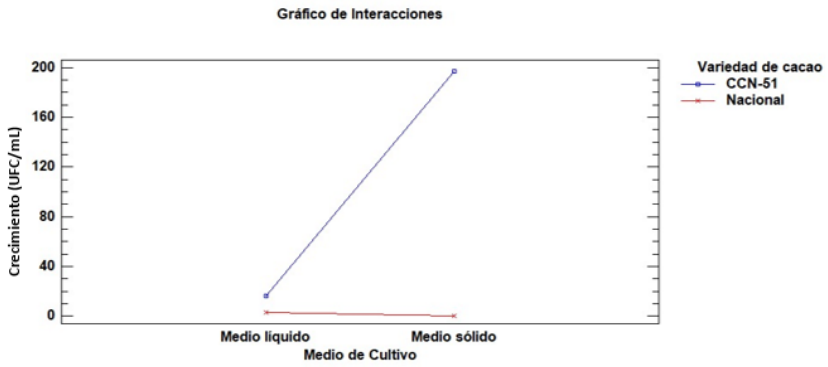
Se evidencia que no hay presencia de *Lactobacillus* en la variedad de cacao nacional, este resultado es similar a lo expuesto por Vallejo et al. (2018), donde señalaron que, en el mucilago de esta variedad de cacao, hay presencia de bacterias lácticas, pero del género *Lactococcus spp*.

Figura 10
Gráfico de medias para variedad de cacao (Lactobacillus)



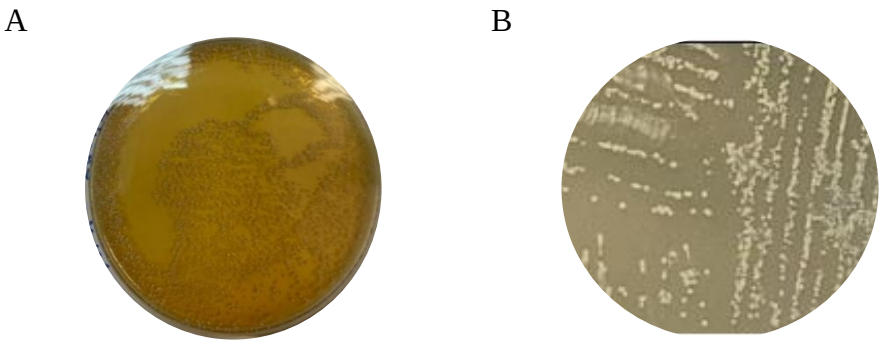
La Figura 10 ilustra una diferencia de medias entre los diferentes niveles del factor variedad de cacao Nacional, CCN – 51 y su impacto en el crecimiento, que indica que el nivel variedad de cacao CC – 51 presenta una media notablemente superior en comparacion con la media del cacao Nacional.

Figura 11
Gráfico de interacciones entre medio de cultivo y variedad de cacao Lactobacillus



La Figura 11 muestra cómo interactúan el medio de cultivo y la variedad de cacao, destacando un crecimiento bacteriano más pronunciado en la variedad de cacao CCN – 51 cuando se utiliza un medio sólido.

Figura 12
*Dilución de Lactobacillus A (Investigación) y B (*Herrera, 2021)



Nota: La imagen A expone los resultados de la presente investigación, mientras que, la imagen B expone los resultados de la investigación de Herrera (2021).

La Figura 12 muestra las diluciones de *Lactobacillus*, donde la imagen A esta sembrada en un factor de dilución 10^{-6} de la placa $a_1b_1c_1$, bajo las caracteristicas de investigacion de cacao CCN-51 en medio solido a una temperatura de incubación de 30°C. De la misma forma en la imagen B tomada de Herrera (2021), aísla las

BAL en medio de cultivo Agar MRS a una temperatura de incubación de 30°C; siendo la matriz de análisis la semilla recubierta de mucílago fermentado.

4.1.2. Aislamiento de *Acetobacter*

Tabla 17
Tratamientos para Acetobacter

Tratamiento	Variedad de cacao	T de incubación	Medio de cultivo	Crecimiento (UFC/mL)
1 R_0	CCN-51	25	GYC+ natamicina	0
2 R_0	CCN-51	25	Medio Carr	0
3 R_0	CCN-51	30	GYC+ natamicina	0
4 R_0	CCN-51	30	Medio Carr	0
5 R_0	Nacional	25	GYC+ natamicina	50
6 R_0	Nacional	25	Medio Carr	0
7 R_0	Nacional	30	GYC+ natamicina	90
8 R_0	Nacional	30	Medio Carr	0
1 R_1	CCN-51	25	GYC+ natamicina	0
2 R_1	CCN-51	25	Medio Carr	0
3 R_1	CCN-51	30	GYC+ natamicina	0
4 R_1	CCN-51	30	Medio Carr	0
5 R_1	Nacional	25	GYC+ natamicina	30
6 R_1	Nacional	25	Medio Carr	0
7 R_1	Nacional	30	GYC+ natamicina	110
8 R_1	Nacional	30	Medio Carr	0
1 R_2	CCN-51	25	GYC+ natamicina	0
2 R_2	CCN-51	25	Medio Carr	0
3 R_2	CCN-51	30	GYC+ natamicina	0
4 R_2	CCN-51	30	Medio Carr	0
5 R_2	Nacional	25	GYC+ natamicina	25
6 R_2	Nacional	25	Medio Carr	0
7 R_2	Nacional	30	GYC+ natamicina	38
8 R_2	Nacional	30	Medio Carr	0

La Tabla 17 muestra las combinaciones existentes entre variedad de cacao (CCN – 51 y Nacional), temperatura de incubación, medios de cultivo selectivo dando como resultado el crecimiento en UFC/mL de *Acetobacter*, donde señala que en 0,0000001 mL de muestra hay 110 UFC. Se evidencia que no hay presencia de *Acetobacter* en la variedad de cacao CCN-51.

ANOVA

Tabla 18
ANOVA AxBxC para Acetobacter

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Variedad de cacao	4902,04	1	4902,04	25,20	0,0001**
B: Temperatura de incubación (°C)	737,042	1	737,042	3,79	0,0694
C: Medio de cultivo	4902,04	1	4902,04	25,20	0,0001**
Interacciones					
AB	737,042	1	737,042	3,79	0,0694
AC	4902,04	1	4902,04	25,20	0,0001**
BC	737,042	1	737,042	3,79	0,0694
ABC	737,042	1	737,042	3,79	0,0694
Residuos	3112,67	16	194,542		
Total (corregido)	20767,0	23			

Nota: **: Diferencia estadística altamente significativa; todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La Tabla 18 exhibe el análisis de varianza (ANOVA) que divide la variabilidad relacionada con el "Crecimiento (UFC/mL) para *Acetobacter* " en contribuciones provenientes de diversos factores. Los valores-p indican la significancia estadística de cada uno de estos factores. Los factores que indican tener diferencia estadística altamente significativa son “Variedad de cacao”, “Medio de cultivo” y la interacción AC con el valor-p de 0,0001**.

Pruebas de Múltiple Rangos para Crecimiento por Medio de cultivo

Tabla 19
Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Medio de cultivo) para Acetobacter

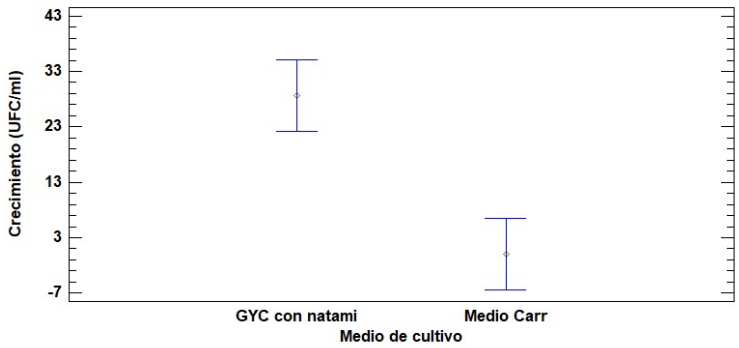
Medio de cultivo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
Medio Carr	12	0	4,02639	X	
Medio GYC + natamicina	12	28,5833	4,02639		X

La Tabla 19 utiliza un método de comparación múltiple para identificar qué medias son significativamente distintas entre sí. El método utilizado para distinguir entre

estas medias es el procedimiento de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher. Mediante este método, existe un riesgo del 5,0% de afirmar que cada par de medias es significativamente diferente. El contraste entre los medios de cultivo selectivos Carr y GYC + natamicina tiene una diferencia significativa de -28,5833. Los resultados expuestos por Salazar (2017), recomendó sembrar este tipo de bacteria en Agar GYC, sin embargo, según lo informado por Avendaño et al. (2021), señalaron un aumento en la concentración de dextrosa en el medio AM que conlleva a una mayor producción de ácido acético por parte de *Acetobacter*, además de prolongar la fase exponencial de crecimiento. Esto contrasta con los resultados obtenidos en el medio GYC.

Así también, Rodriguez et al. (2023), mencionaron que para el proceso de aislamiento es necesario diluir el mucilago de cacao, para lo cual se toman 100 µL de la muestra y se distribuyen uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo GYC, el cual se incuba a 30 ± 2°C durante 48°C.

Figura 13
Gráfico de medias para medios de cultivo (Acetobacter)



La Figura 13 ilustra una diferencia de medias entre los diferentes niveles del factor medio de cultivo y su impacto en el crecimiento, lo cual indica que el nivel medio GYC + natamicina presenta una media notablemente superior en comparacion con el medio de cultivo Carr.

Pruebas de Múltiple Rangos para Crecimiento por Variedad de cacao

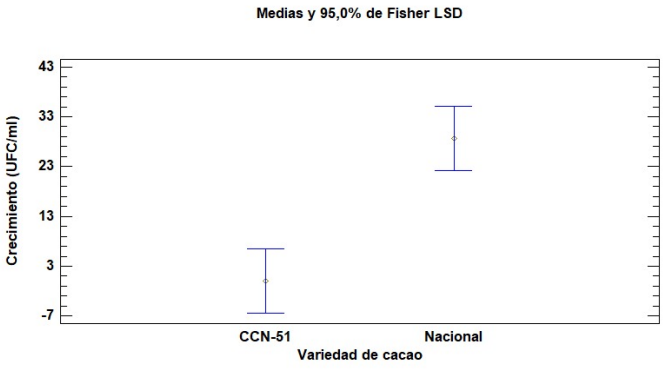
Tabla 20
Pruebas de rangos múltiples - Método: 95,0 porcentaje LSD (Crecimiento por Variedad de cacao) para Acetobacter

Variedad de cacao	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos	
Nacional	12	28,5833	4,02639	X	
CCN - 51	12	0	4,02639		X

La Tabla 20 emplea una comparación múltiple para identificar las diferencias significativas entre las medias. Para esto se utiliza el método de Diferencia Mínima Significativa (LSD) de Fisher. Este método implica un riesgo del 5,0% de afirmar que hay diferencias significativas entre cada par de medias. Por ejemplo, al contrastar las variedades de cacao Nacional y CCN-51, se observa una diferencia significativa de -28,5833.

Los resultados expuestos por Salazar (2017), señaló que hay presencia de *Acetobacter* en el mucilago fermentado del cacao Nacional o Chuncho este género bacteriano se sembró en Agar GYC, a 30°C durante 48 horas.

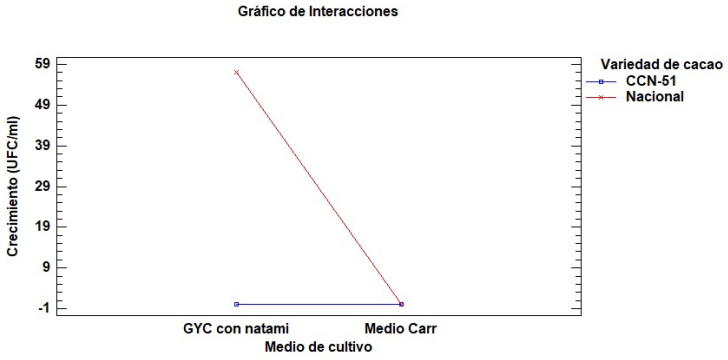
Figura 14
Gráfico de medias para variedad de cacao (Acetobacter)



La Figura 14 ilustra una diferencia de medias entre los diferentes niveles del factor variedad de cacao y su relación con el crecimiento, lo cual indica que el cacao

Nacional presenta una media notablemente superior en comparacion con el cacao CCN - 51.

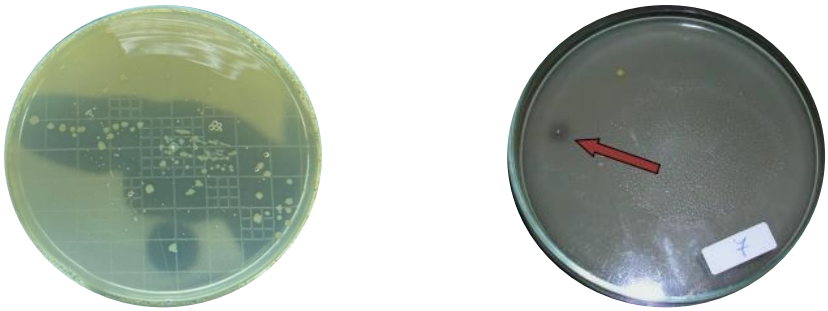
Figura 15
Gráfico de interacciones entre medio de cultivo y variedad de cacao Acetobacter



La Figura 15 ilustra la interacción entre el factor medio de cultivo y el factor variedad de cacao, indicando que hay mayor crecimiento en la variedad de cacao Nacional y aislado en medio GYC + natamicina.

Figura 16
Dilución de Acetobacter A (Investigación) y B (Gerard, 2015)

A B



Nota: La imagen A expone los resultados de la presente investigación, mientras que, la imagen B expone los resultados de la investigación de Gerard (2015).

La Figura 16 muestra las diluciones de *Acetobacter*, donde la imagen A esta sembrada en un factor de dilución 10^{-6} de la placa R_1 - $d_2e_2f_1$, bajo las caracteristicas de investigacion de cacao Nacional en medio GYC a una temperatura de incubación de 30°C. De la misma forma en la imagen B tomada de Gerard (2015), aisló las BAA en medio de cultivo GYC a una temperatura de incubación de 30°C; siendo la matriz de análisis vinagres de fruta.

4.2. Caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas.

4.2.1. Identificación bioquímica de aislados BAL

Los aislados bacterianos presentados a continuación, pertenecen a las cajas Petri donde hubo presencia de bacterias, las cuales se les sometió a pruebas bioquímicas y microscópicas de tinción de Gram, rojo de metilo, catalasa y oxidasa.

Tabla 21
Identificación bioquímica de cepas aisladas BAL

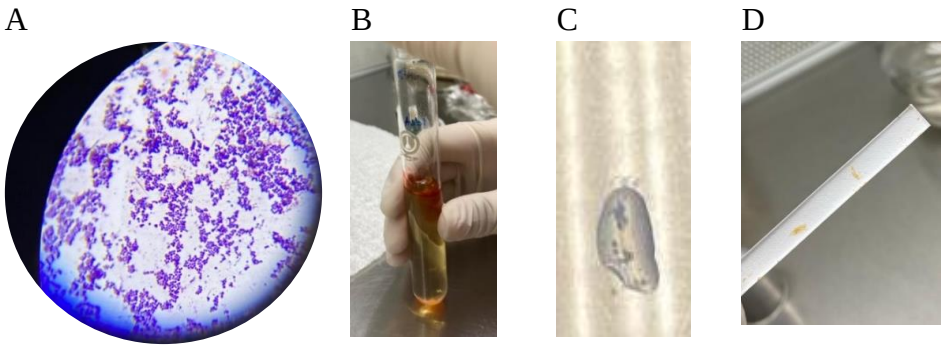
Identificación bioquímica de cepas aisladas BAL				
Cepas aisladas	**Tinción de Gram**	**Rojo de metilo**	**Catalasa**	**Oxidasa**
R_0 - $a_1b_1c_1$	+	+	-	-
R_0 - $a_1b_1c_2$	+	-	-	+
R_0 - $a_1b_2c_1$	-	-	+	+
R_0 - $a_1b_2c_2$	-	-	+	+
R_1 - $a_1b_1c_1$	+	+	+	-
R_1 - $a_1b_1c_2$	-	-	+	+
R_1 - $a_1b_2c_1$	+	+	+	-
R_1 - $a_1b_2c_2$	+	+	+	+
R_2 - $a_1b_1c_1$	+	+	+	-
R_2 - $a_1b_1c_2$	+	-	-	+
R_2 - $a_1b_2c_1$	-	-	+	+
R_2 - $a_1b_2c_2$	-	-	+	+

Nota: En los análisis bioquímicos destinados a la identificación de BAL, se evidencia que la especie $a_1b_1c_1$ satisface las especificaciones correspondientes para ser clasificada como una bacteria del género *Lactobacillus spp*.

La Tabla 21 y Figura 17 revelan que la tinción de Gram para el género *Lactobacillus ssp.* es positiva. Esto se evidencia por la observación bajo el microscopio, donde se aprecia que la célula adquiere un tono violeta y tiene forma de bacilos. Además, la prueba de rojo de metilo arrojó un resultado positivo, lo que indica que la bacteria lleva a cabo la fermentación ácida mixta; la tonalidad rojiza observada y indica la generación de ácido láctico.

Por otro lado, la prueba de catalasa se utiliza para evaluar la presencia de la enzima catalasa en una muestra bacteriana, esta enzima es responsable de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2 el resultado fue negativo al no presentar efervescencia., además, la prueba de oxidasa se emplea para detectar la presencia de la enzima oxidasa, la cual es un indicador de la respiración aeróbica en las bacterias. Al realizar esta prueba con la tira de oxidasa junto con la bacteria, no se observó ningún cambio de color, lo que sugiere que la bacteria no produce esta enzima.

Figura 17
Identificación bioquímica de Lactobacillus spp.



Nota: Las imágenes A, B, C y D corresponden a los resultados obtenidos de la presente investigación, donde la imagen A muestra los resultados de la tinción de Gram, la imagen B presenta los resultados de la prueba rojo de metilo, la imagen C exhibe los resultados de la prueba de catalasa, mientras que la figura D muestra los resultados de la prueba de oxidasa.

Según, Taye et al. (2021), mencionaron que para identificar aislados de bacterias del género *Lactobacillus spp.*, mediante tinción de Gram, catalasa, oxidasa, deben provenir de materias primas que contengan un alto grado de carbohidratos, los resultados obtenidos por los autores señalan que la tinción de Gram es positiva en forma de bacilos, con catalasa y oxidasa negativa, mismas que son características de esta especie.

Igualmente, Suwannaphan (2021), empleó las mismas pruebas bioquímicas y de microscopia utilizadas por Taye et al. (2021), donde destacó que la tinción de Gram

es positiva con una pigmentación violeta y las pruebas de catalasa y oxidasa son negativas, puesto que la primera indica la presencia de la enzima catalasa y la segunda detecta la enzima oxidasa, especialmente en alimentos fermentados y ricos en carbohidratos.

4.2.2. Identificación bioquímica de aislados BAA

Los aislados bacterianos presentados a continuación, pertenecen a las cajas Petri donde hubo presencia de bacterias, las cuales se les sometió a pruebas bioquímicas y microscópicas de tinción de Gram, rojo de metilo, catalasa y oxidasa.

Tabla 22
Identificación bioquímica de cepas aisladas BAA

Identificación bioquímica de cepas aisladas BAA				
Cepas aisladas	**Tinción de Gram**	**Rojo de metilo**	**Catalasa**	**Oxidasa**
R_0 - $d_2e_1f_1$	-	+	-	-
R_0 - $d_2e_2f_1$	-	-	+	-
R_1 - $d_2e_1f_1$	-	-	+	-
R_1 - $d_2e_2f_1$	-	+	+	-
R_2 - $d_2e_1f_1$	-	-	-	-
R_2 - $d_2e_2f_1$	-	-	-	-

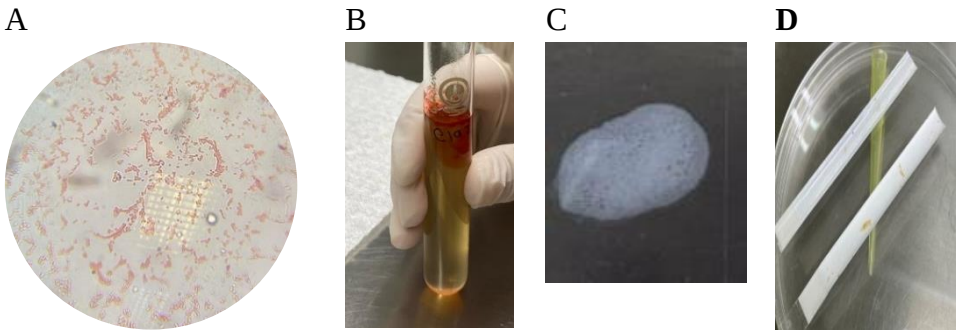
Nota: En los análisis bioquímicos destinados a la identificación de BAL, se evidencia que la especie R_1 - $d_2e_2f_1$ satisface las especificaciones correspondientes para ser clasificada como una bacteria del género *Acetobacter spp*.

La Tabla 22 y Figura 18 evidencian que la tinción de Gram para el género *Acetobacter spp.*, es negativa, debido a que, bajo el microscopio, la célula toma un color rosado y tiene forma de bacilos. La prueba de rojo de metilo resulto positiva, indicando que la bacteria realiza la fermentación ácida mixta; la coloración roja observada indica que la bacteria produjo ácido láctico.

Por otro lado, la prueba de catalasa evalúa la presencia de la enzima catalasa, muestra la capacidad de la bacteria para descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) y oxígeno (O_2), el resultado fue positivo al presentar

efervescencia. Asimismo, la prueba de oxidasa detecta la presencia de la enzima oxidasa, esta enzima es un indicativo de la respiración aérobica de una bacteria, la tira de oxidasa junto con la bacteria no presento un cambio de color, resultando negativo e indicando que la bacteria no produce esta enzima.

Figura 18
Identificación bioquímica de aisladas Acetobacter spp.



Nota: Las imágenes A, B, C y D corresponden a los resultados obtenidos de la presente investigación, donde la imagen A muestra los resultados de la tinción de Gram, la imagen B presenta los resultados de la prueba rojo de metilo, la imagen C exhibe los resultados de la prueba de catalasa, mientras que la figura D muestra los resultados de la prueba de oxidasa.

El análisis llevado a cabo por El-Askri et al. (2022), señalaron que las bacterias acéticas encontradas en manzanas y uvas fueron sembradas en medio GYC y cultivadas a temperatura de 30°C, durante este proceso, la tinción de Gram resulto negativa, y las colonias adoptaron una morfología de bastones dispuestos en pares y cadenas. De igual manera, Rodriguez et al. (2023), emplearon observación microscopia (100x) mediante tinción de Gram, donde monitoreaba los cultivos después de 48 h, donde observo que la bacteria *Acetobacter sp.* es Gram negativa y presenta características macroscópicas como color crema de aspecto brillante y de forma puntiforme. También, Duchi et al. (2023), reportaron que la tinción de Gram es negativa y la bacteria tiene forma lisa brillante y color crema.

Los análisis bioquímicos realizados en esta cepa bacteriana revelaron ser catalasa positiva y oxidasa negativa, según lo reportado por El-Askri et al. (2022), por otro parte, de acuerdo con Ramos (2024), también señala que estas bacterias exhiben

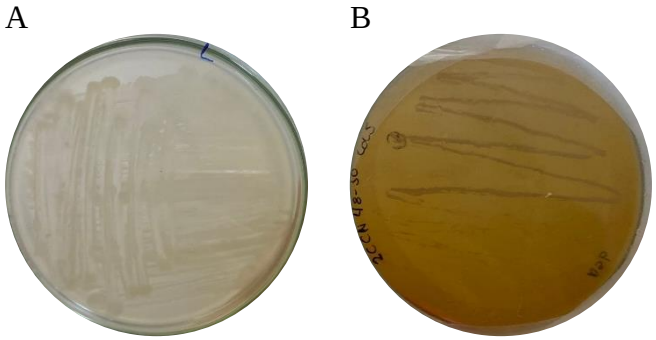
una prueba de catalasa positiva y oxidasa negativa; además, se destaca que estas bacterias presentan un metabolismo aeróbico estricto. Asimismo, Duchi et al. (2023), reportaron que la identificación de la bacteria *Acetobacter* aislada son catalasa positiva y oxidasa negativa.

4.3. Incorporación de un sustrato con el propósito de potenciar el crecimiento de biomasa en las bacterias acido lácticas y acéticas.

4.3.1. Incorporación de un sustrato para el aumento de biomasa en *Lactobacillus*

Se pudo observar que al utilizar un sustrato de leche descremada al 5%, se produjo un aumento notable en la biomasa de bacterias *Lactobacillus spp.,* sometida a las mismas condiciones de incubación. Además, se constató que este cambio en el sustrato aceleró el crecimiento bacteriano, lo que se tradujo en un tiempo de replicación de 24 horas en esta etapa se recolecta la biomasa presente. El aumento de la biomasa se contrasta en la Figura 19.

Figura 19
Bacteria Lactobacillus spp., con y sin sustrato



Nota: La figura A tiene incorporado en el medio de cultivo leche descremada, aumentando la biomasa, la figura B es la bacteria cultivada a agar MRS sin ninguna adición.

Según, Miranda-Yuquilema et al. (2024), mencionan que el crecimiento de bacterias ácido lácticas requiere la aplicación de sustratos fermentados, que pueden ser alimentos o residuos agroindustriales. Además, Bernal-Castro et al. (2024),

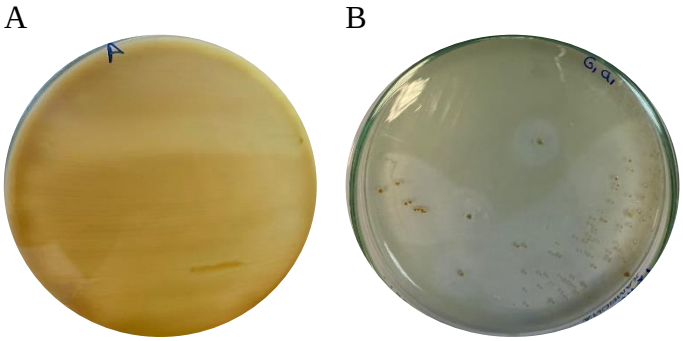
señalan que los sustratos vegetales contienen micronutrientes que permiten la inclusión de probióticos como una alternativa para el crecimiento bacteriano. Por otro lado, de acuerdo con García et al. (2013), la concentración de microorganismos influye en la velocidad de aumento de la población bacteriana, dependiendo de la composición y concentración del medio de sustrato.

En contraste, la utilización de diversos sustratos puede incrementar la biomasa para la producción de *Lactobacillus*. Debido a su naturaleza fermentativa, la utilización de lactosuero y melaza de caña de azúcar son opciones recomendables debido a su composición rica en azúcares como fuente de carbono (Barrazueta Rojas et al., 2019), no obstante, estos sustratos pueden alterar la morfología bacteriana.

4.3.2. Incorporación de un sustrato para el aumento de biomasa en *Acetobacter*

Al replicar bacterias *Acetobacter spp.*, se sustituyó el agar GYC + natamicina por agar *Acetobacter*, el cual contenía una mayor cantidad de carbonato de calcio y glucosa. Esto resulto en una mayor abundancia de microorganismos, y se observó un aumento en su velocidad de crecimiento. El aumento de la biomasa se contrasta en la Figura 20.

Figura 20
Bacteria Acetobacter spp., en diferentes medios de cultivo



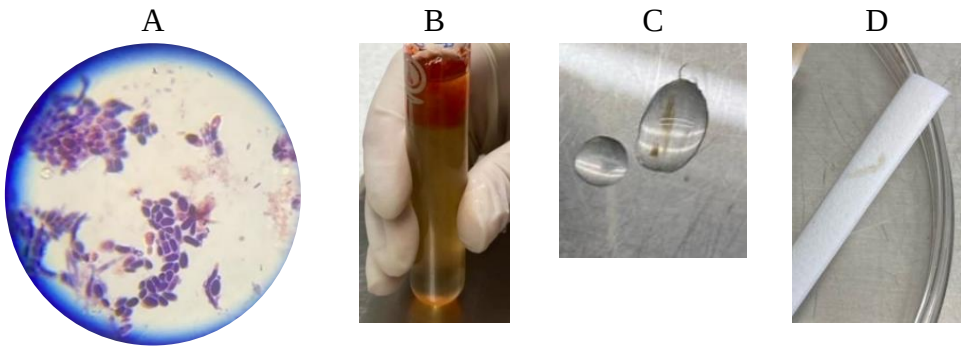
Nota: En la figura A, se observa la bacteria sembrada en *Acetobacter* agar, donde se evidencia un aumento de biomasa, mientras que, en la figura B la bacteria está sembrada en el agar GYC + natamicina.

Según Kim et al. (2019), la elaboración de medios de cultivo destinados a la siembra de *Acetobacter* implica la combinación de ingredientes comunes en diversas proporciones. Sin embargo, estos medios selectivos presentan limitaciones en cuanto a la replicación de cepas BAA. El agar *Acetobacter* se destaca por su notable capacidad tanto de inclusividad como de exclusividad, el cual es capaz de promover el desarrollo de especies de BAA mientras inhibe aquellas que no pertenecen a este grupo. Además, su concentración elevada de glucosa y $CaCO_3$ crea un entorno propicio para la multiplicación de las bacterias ácido acéticas.

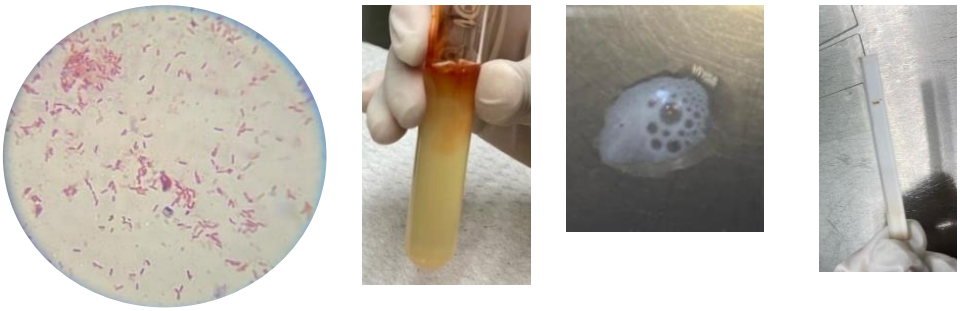
De la misma manera, en el trabajo de Orellana (2022), se empleó el agar *Acetobacter*, el cual contiene carbonato cálcico y una mayor cantidad de dextrosa en su formulación, esto favorece el incremento de la biomasa para este tipo específico de bacteria.

Por otro lado, Ricaurte (2020), reportó que el hongo de kombucha fermentado contiene la cepa de *Acetobacter aceti*¸ por lo cual resulta adecuado para ser usado como sustrato al añadir té verde, donde después de un período de 96 horas, se registró una concentración de 173.33 UFC/mL.

Figura 21
Fotografías de la identificación bioquímica de aislados de Lactobacillus spp., y Acetobacter spp., con la incorporación de sustratos.



E F G H



Nota: Las imágenes corresponden a los resultados obtenidos de la presente investigación, donde la imagen A (*Lactobacillus spp.*) y E (*Acetobacter spp.*) muestran los resultados de la tinción de Gram, la imagen B (*Lactobacillus spp.*) y F (*Acetobacter spp.*) presentan los resultados de rojo de metilo, la imagen C (*Lactobacillus spp.*) y G (*Acetobacter spp.*) exhiben los resultados de catalasa, mientras que la figura D (*Lactobacillus spp.*) y H (*Acetobacter spp.*) muestran los resultados de oxidasa.

La Figura 21 muestra la caracterización bioquímicas y microscópicas, las cuales se mantuvieron constantes después de la exposición a un sustrato, tanto para *Lactobacillus spp*., y *Acetobacter spp.*; en el caso de la bacteria acética, se observó un cambio en el medio de cultivo que contenía una mayor concentración de hidratos de carbono y calcio. Cabe destacar que la caracterización resultó ser idéntica a la mostrada en los ítems anterior presentados.

4.4. Cinética de crecimiento para *Lactobacillus spp.* y *Acetobacter spp.*

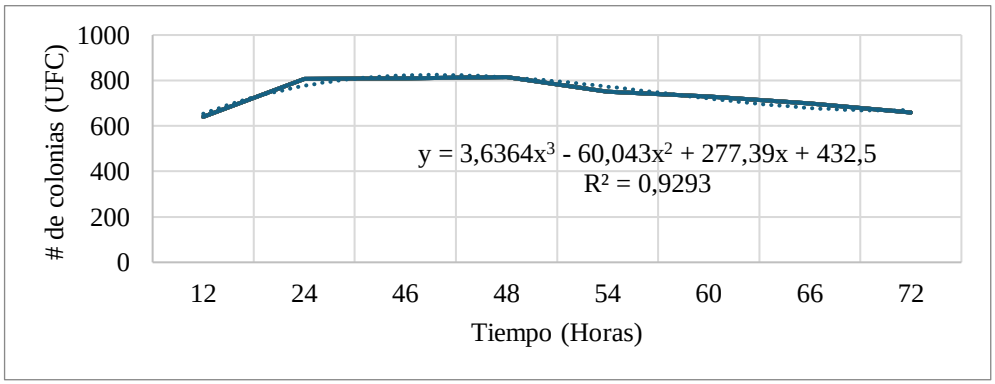
4.4.1. Cinética de crecimiento para aislados *Lactobacillus spp.*, con sustrato

La cinética de crecimiento se realizó al aislado procedente de las condiciones de cultivo que resultaron ser mejores en la etapa de desarrollo de la bacteria, en el cacao CCN - 51 incubado a 30°C en medio MRS sólido.

Cinética de crecimiento

Para poder contar las colonias fue necesario realizar diluciones con el 5% de NaCl en agua destilada, hasta la dilución 10^{-3} donde se realizó el conteo de colonias.

Figura 22
Cinética de crecimiento microbiano (Lactobacillus spp.)



La Figura 22, presenta la cinética de crecimiento bacteriano para *Lactobacillus spp.*, donde, la fase exponencial inicia a partir de la hora 12 que se extiende hasta la hora 24., se observa que la fase estacionaria termina en la hora 48, y desde este punto, se inicia la fase de muerte celular, la cual se extiende hasta la hora 72.

Modelo matemático adaptado de Gompertz

$$\boldsymbol{n = \frac{t}{g}}$$

$$n = \frac{48}{3} = 16 \rightarrow \text{número de generaciones}$$

$$\boldsymbol{r = \frac{ln\,(2)}{t\ generación}}$$

$$r = \frac{ln\,(2)}{3}$$

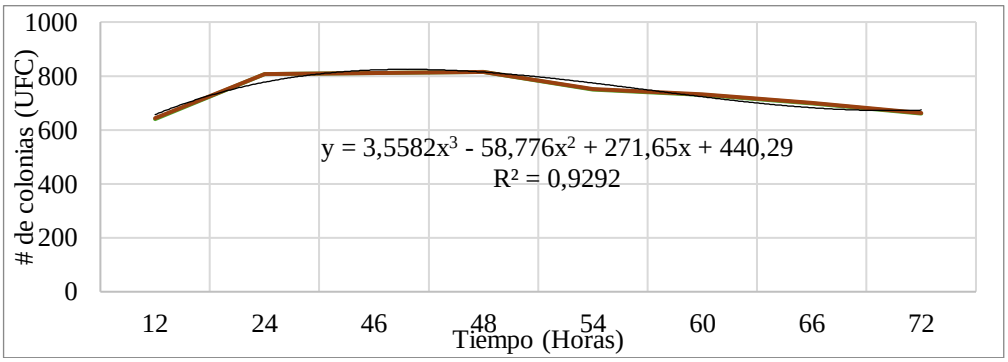
$$r = 0{,}23 \rightarrow Tasa\ de\ crecimiento$$

$$\boldsymbol{N(t) = \frac{No}{1 + \frac{No - Nmax}{Nmax} \cdot e^{-rt}}}$$

$$N(t) = \frac{640}{1 + \frac{640 - 815}{815} \cdot e^{-0{,}23 * 16}}$$

$$N(t) = 643{,}49$$

Figura 23
Cinética de crecimiento microbiano modelo matemático adaptado de Gompertz (Lactobacillus spp.)



En la Figura 23, presenta la cinética de crecimiento bacteriano para *Lactobacillus spp.*, según el modelo matemático adaptado de Gompertz, donde la fase exponencial inicia a partir de la hora 12, seguida por la fase estacionaria que se extiende hasta la hora 48. Posteriormente, se observa una transición a la fase de muerte celular, la cual se extiende hasta la hora 72.

El estudio realizado por Mechmeche et al. (2017), se examinó el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, extraído de semillas de tomate, mediante el modelo matemático de Gompertz. La investigación se llevó a cabo a una temperatura de incubación de 37°C. Se observó que el crecimiento bacteriano comenzó a partir de la hora 0 y continuó hasta la hora 10, momento en el que la bacteria entró en su fase estacionaria, manteniéndose así hasta la hora 24, lo que indica el final del proceso de fermentación. Es importante destacar que no se evidenció la fase de declive o muerte bacteriana en este proceso.

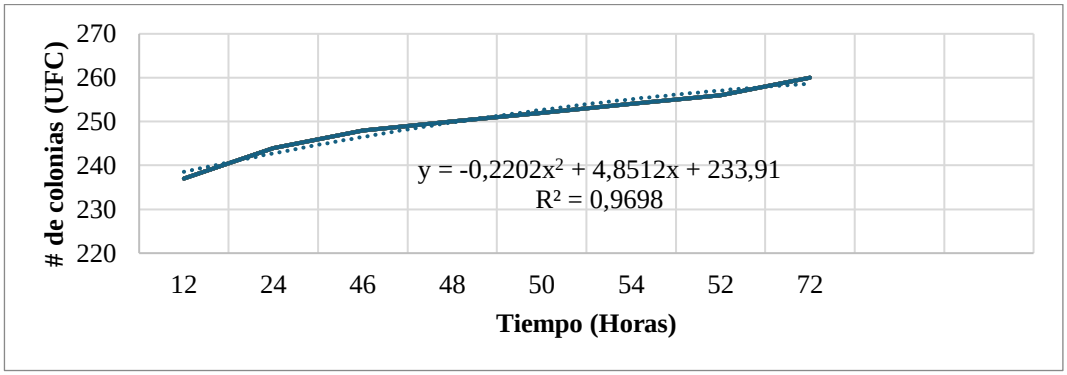
4.4.2. Cinética de crecimiento para aislados *Acetobacter spp.*, con sustrato

La cinética de crecimiento se realizó al aislado procedente de las condiciones de cultivo que resultaron ser mejores en la etapa de desarrollo de bacterias, en el cacao Nacional incubado a 30°C en medio *Acetobacter agar*.

Cinética de crecimiento

Para poder contar las colonias fue necesario realizar diluciones con el 5% de NaCl en agua destilada, hasta la dilución 10^{-3} donde se realizó el conteo de colonias.

Figura 24
Cinética de crecimiento microbiano (Acetobacter spp.)



La Figura 24, presenta la cinética de crecimiento bacteriano para *Acetobacter spp.*, la fase de exponencial inicia a partir de la hora 12, hasta la hora 72, sin observar la fase estacionaria y de muerte celular.

Modelo matemático adaptado de Gompertz

$$\boldsymbol{n = \frac{t}{g}}$$

$$n = \frac{48}{4} = 12 \rightarrow \text{número de generaciones}$$

$$\boldsymbol{r = \frac{ln\,(2)}{t\ generación}}$$

$$r = \frac{ln\,(2)}{4}$$

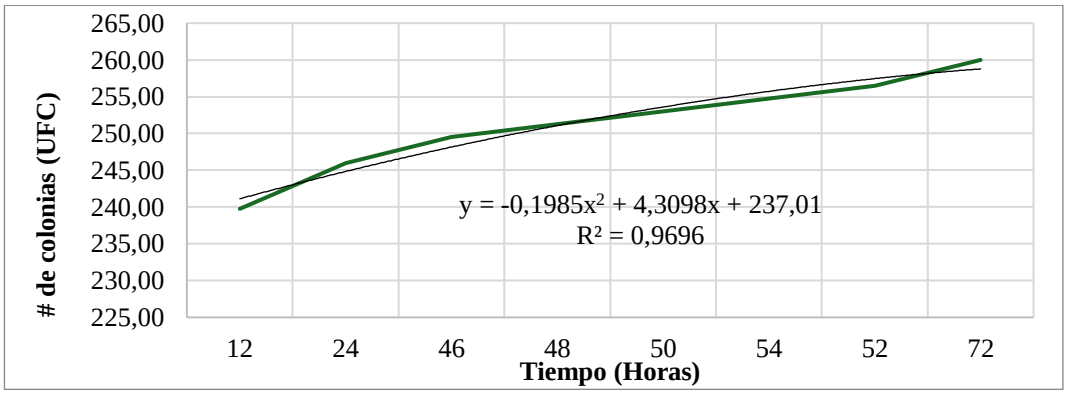
$$r = 0{,}17 \rightarrow Tasa\ de\ crecimiento$$

$$\boldsymbol{N(t) = \frac{No}{1 + \frac{No - Nmax}{Nmax} \cdot e^{-rt}}}$$

$$N(t) = \frac{237}{1 + \frac{237 - 250}{250} \cdot e^{-0{,}17 * 12}}$$

$$N(t) = 253{,}53$$

Figura 25
Cinética de crecimiento microbiano modelo matemático adaptado de Gompertz matemático exponencial (Acetobacter spp.)



La Figura 25 presenta la cinética de crecimiento bacteriano para *Acetobacter spp.*, según el modelo matemático adaptado de Gompertz. La fase de exponencial inicia a partir de la hora 12 hasta la hora 72, sin observar la fase estacionaria y de muerte celular.

La investigación de Syed et al. (2020), indicaron la proliferación de *Acetobacter xylinum* donde mostró la particularidad de omitir la fase de latencia, iniciando directamente la fase exponencial a partir del día 1 hasta el día 12, desde este período se mantiene en la fase estacionaria, sin que la fase de declive se manifestara de manera evidente.

4.5. Preservación de las cepas bacterianas acido lácticas y acéticas a través del proceso de liofilización.

4.5.1. Rendimiento de *Lactobacillus spp*.

Para *Lactobacillus spp.*, ingresó 195 g de los cuales se obtuvo de producto liofilizado 13 g dando un rendimiento de 6,66%.

$$\boldsymbol{Rendimiento}\ (\%) = \frac{\boldsymbol{Peso\ del\ producto\ liofilizado}}{\boldsymbol{Peso\ inical\ del\ producto}}\boldsymbol{x100}$$

$$Rendimiento\ (\%) = \frac{13\ g}{195\ g} x100 = 6{,}66\%$$

Para reproducir biomasa de *Lactobacillus spp*., se incurrió en un gasto total de $264,71; costos detallados en el Anexo 2, esto resultó en un costo para venta de $26,47. En Ecuador, se encuentra disponible únicamente fermento láctico, el cual contiene *Lactobacillus lactis, Lactococcus lactis y Streptococcus thermophilus* disponible en la casa comercial Casa del Químico en una presentación de 3 g en 50 L a un pH de 4,70 con un precio de $6,75 cada sobre.

4.5.2. Rendimiento de *Acetobacter* spp.

El proceso de liofilización de *Acetobacter spp.*, consistió en que las muestras ingresadas al liofilizador fueron suspendidas en agua salina al 1%, el total de muestra fue de 105 g de los cuales se obtuvo un producto liofilizado de 7 g con un rendimiento de 6,66%.

$$Rendimiento\ (\%) = \frac{7\ g}{105\ g} x100 = 6{,}66\%$$

Para reproducir biomasa de *Acetobacter spp*., se incurrió en un gasto total de $203,60; costos detallados en el Anexo 2, esto resultó en un costo para venta de $37,82. Según Frutos (2023), la bacteria *Acetobacter sp*. V6 necesita una fuente de carbono, adicionada con un suplemento de etanol, la cual debe incubarse durante 8 días para tener una producción de 4,16 g/L. En Ecuador, la bacteria *Acetobacter spp.*, no se encuentra disponible para su compra, sin embargo, en México se encuentra *Acetobacter xylinum*, en placa, por un precio de $50,76.

Figura 26
Liofilización de bacterias Lactobacillus spp. y Acetobacter spp.



En la Figura 26 muestra el proceso de liofilización durante 3 días, las muestras que ingresaron al liofilizador fueron suspendidas en agua salina al 1%; fueron almacenadas en fundas metalizadas herméticamente para su conservación en frío. Para la identificación de cada tipo de bacteria se realizó una etiqueta, como se indica en la Figura 27 , la cual incluye información sobre la dosis recomendada para dilución (*Lactobacillus spp.* 0,5g/L; *Acetobacter spp.* 1 g/L), las instrucciones de conservación (4 – 10°C), fecha de elaboración (08/02/2024) y lugar de origen (San Gerardo - Echeandía).

Figura 27
Etiqueta para las bacterias liofilizadas

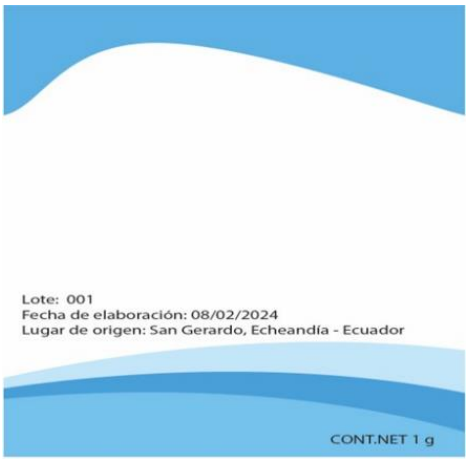
A



B



C



Nota: La imagen A muestra la etiqueta frontal de la bacteria *Acetobacter spp.*, mientras que la imagen B muestra la etiqueta frontal de la bacteria *Lactobacillus spp.*, parte delantera; y la imagen C corresponde a la parte posterior de ambas etiquetas de géneros bacterianos.

4.6. Uso de las bacterias liofilizadas en la agroindustria

Uso de *Lactobacillus* en productos fermentados

Según Wang et al. (2021), mencionaron que las bacterias del ácido láctico, microorganismos con la capacidad de fermentar carbohidratos, son ampliamente empleadas en la industria de alimentos fermentados, esto se fundamenta en su capacidad para mejorar el sabor, los nutrientes y prolongar la vida útil de los productos. De manera similar Freire-Almeida & Maldonado-Alvarado (2023), señalaron el empleo de estas bacterias en la producción de alimentos funcionales, como bebidas fácilmente asimilables., Vallejo (2021), alude que las bacterias ácido lácticas son aplicadas para la bioconservación de carne de cerdo cruda, al inhibir la actividad antimicrobiana.

Uso de *Acetobacter* en productos fermentados

El uso de *Acetobacter aceti* se emplea para la elaboración de té de kombucha, la cual es una bebida fermentada con un ligero sabor ácido, que presenta una vida útil prolongada sin perder sus características distintivas. Este té ofrece un potencial en

el tratamiento de Síndrome metabólico y posee propiedades antinflamatorias, hipoglucemiantes, antioxidantes y antihipertensivas (Ricaurte, 2020).

Teniendo en cuenta a Núñez (2022), para la elaboración de vinagre a partir de naranja, es esencial fermentar la fruta y añadir la bacteria en una concentración de $3x10^8$ UFC/mL, además, se requiere que el grado Brix de las naranjas esté en el rango de 8,3 – 9,4 y que la acidez titulable se encuentre entre 1,46 – 1,55.

4.7. Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría

Es imprescindible resuspender la cepa liofilizada para reactivarla, y durante este procedimiento es de vital importancia mantener un entorno estéril, ya sea utilizando una campana de flujo laminar o trabajando cerca de la llama de un mechero (Frutos, 2023). Los pasos a seguir son los siguientes:

El liofilizado de *Acetobacter spp*., se proporciona en un tubo plástico tipo Eppendorf, donde se pesa 0,1% por litro, para *Lactobacillus spp*., en cambio, se utiliza 0,05%. Por ejemplo, para 50 ml de caldo nutriente se emplean 0,05 g de bacteria acética, mientras que, para bacteria láctica se utiliza 0,025 g, este caldo nutriente y MRS respectivamente, se incuba a 30 ºC.

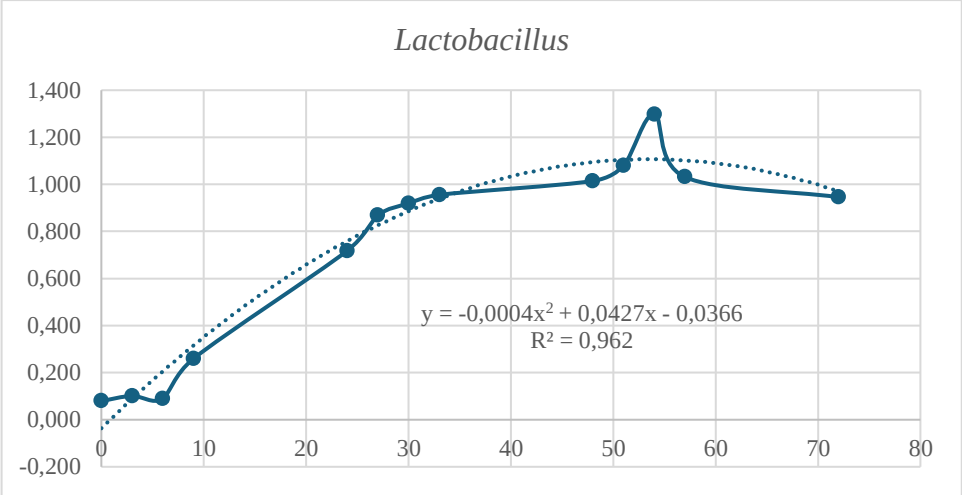
Para la siembra en placa, la relación es la misma del 0,1% y 0,05%, el liofilizado se coloca en un tubo de plástico estéril, donde se añaden unas gotas de agua estéril con una pipeta previamente esterilizada, utilizando un volumen inferior a 0,5 mL. La suspensión resultante puede utilizarse para la inoculación tanto en medios sólidos como en medios líquidos.

Las cepas bacterianas fueron reanimadas tras un período de 22 días después de haber sido sometidas al proceso de liofilización.

4.7.1. Viabilidad de bacterias liofilizadas: *Lactobacillus spp.*

Para evaluar la viabilidad de la bacteria *Lactobacillus spp.*, se sembró en caldo MRS, donde el blanco fue el mismo caldo sin bacteria, que tuvo una absorbancia de 0,12 nm.

Figura 28
Curva de crecimiento bacteriano después de la liofilización de Absorbancia vs Tiempo (Lactobacillus spp.)



La Figura 28, presenta la curva de crecimiento bacteriano para *Lactobacillus spp*., la fase de latencia inicia a partir de la hora 3, seguida por una fase exponencial que se extiende desde la hora 24 hasta la hora 50, donde se observa un pico de crecimiento significativo hasta la hora 54. Posteriormente, se observa un declive hacia la fase muerte celular a partir de la hora 57 hasta la hora 72.

De acuerdo con, Fajardo-Argoti et al. (2021), determinaron que para medir la viabilidad en las bacterias del género *Lactobacillus* mediante microencapsulación, se utiliza 90 mL de caldo MRS estéril con 10 mL del inóculo bacteriano para su posterior conteo a una longitud de onda de 625 nm ajustando la escala de McFarland 0,5; en este proceso se observó que a las 8 horas se detuvo el proceso de crecimiento y empezó su etapa de declive hasta la hora 30, debido a esto al momento de contratar con los resultados obtenidos en la investigación los *Lactobacillus* inoculados del

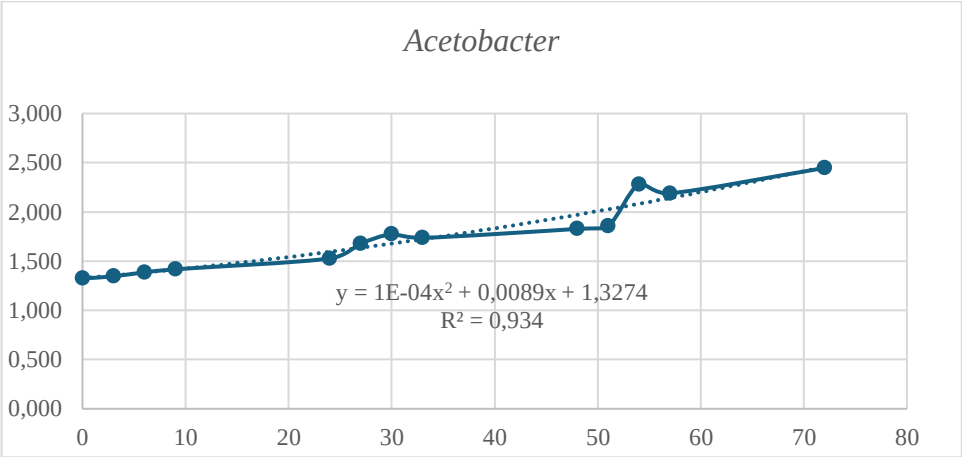
mucilago del cacao tienen una mayor resistencia al momento de la degradación celular.

4.7.2. Viabilidad de bacterias liofilizadas: *Acetobacter spp.*

Para evaluar la viabilidad de la bacteria *Acetobacter spp.*, se sembró en caldo Nutriente, donde el blanco fue el mismo caldo sin bacteria, que tuvo una absorbancia de 0,11 nm.

Figura 29

Curva de crecimiento bacteriano después de la liofilización de Absorbancia vs Tiempo (Acetobacter spp.)



La Figura 29 , presenta la curva de crecimiento bacteriano para *Acetobacter spp.*, la fase de latencia inicia a partir de la hora 9, seguida por una fase exponencial que se extiende desde la hora 33 hasta la hora 54. Posteriormente, se observa un declive hasta la fase muerte celular a partir de la hora 57 hasta la hora 72.

4.8. COMPROBACIÓN DE LAS HIPÓTESIS

4.8.1. Hipótesis Nula

No existe una diferencia significativa entre los tratamientos considerando las condiciones de cultivo para el aislamiento de *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

4.8.2. Hipótesis Alternativa

Existe una diferencia significativa entre los tratamientos considerando las condiciones de cultivo para el aislamiento de *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

4.8.3. Comprobación de hipótesis

Se acepta la hipótesis alternativa, debido que las condiciones de cultivo sí influyen en el aislamiento de las bacterias *Acetobacter y Lactobacillus.*

De acuerdo a la tabla ANOVA para *Lactobacillus* (Tabla 14) presentada en esta sección indica que existe evidencia estadísticamente significativa en el factor A: Variedad de cacao donde el valor–p es igual a 0,0062, en el factor C: Medio de Cultivo donde el valor–p es igual a 0,0168 y en la interacción AC donde el valor – p es igual a 0,0139.

De igual manera, de acuerdo a la tabla ANOVA para *Acetobacter* (Tabla 18) indica la presencia de evidencia estadísticamente altamente significativa en el factor Variedad de cacao (valor - p de 0,0001), en el factor Medio de cultivo (valor – p 0,0001); así como en la interacción doble entre la variedad de cacao y medio de cultivo, donde el valor-p es de 0,0001.

CAPITULO V

5.1. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo sólido resulto como el entorno óptimo para el crecimiento de bacterias lácticas, específicamente del género *Lactobacillus*, alcanzando un crecimiento de 453 UFC/mL en comparación con el medio líquido que no hubo un crecimiento significativo, además, se observó que temperatura y la variedad de cacao también influyeron en el crecimiento. En cuanto las bacterias ácido acéticas, el medio GYC + natamicina destacó como el más propicio, demostrando un crecimiento de 110 UFC/mL en la variedad de cacao Nacional a 30°C, mientras que en el medio Carr no presento ningún crecimiento bacteriano.
- La caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas indicó la presencia de dos géneros bacterianos de interés en el mucílago de cacao: *Lactobacillus spp.*, y *Acetobacter spp*. Los *Lactobacillus* mostraron características anaerobias facultativas, con tinción de Gram positivo, rojo metilo positivo, catalasa y oxidasa negativas, indicando fermentación láctica. A diferencia de *Acetobacter* que mostró tinción de Gram negativo, rojo metilo positivo, catalasa positiva y oxidasa negativa, indicando la capacidad aeróbica para producir ácido acético; útil en procesos agroindustriales.
- La utilización de leche descremada como sustrato incremento notablemente la biomasa de la bacteria láctica, sugiriendo su capacidad para aprovechar componentes específicos de la leche como nutrientes, con implicaciones potenciales en la industria láctea. El cambio del medio GYC + natamicina por agar *Acetobacter*, enriquecido con carbonato de calcio y glucosa, incremento la

presencia de bacterias acéticas, lo que indicó una respuesta positiva a las condiciones de cultivo modificadas.

- El análisis de la cinética de crecimiento reveló que la bacteria *Lactobacillus* presenta las fases de crecimiento exponencial, estacionaria y de muerte celular, mientras que *Acetobacter* mostró la particularidad de no presentar fase de adaptación, durante 72 horas no se evidencio la fase de muerte celular. Estos resultados proporcionan una comprensión de la dinámica de crecimiento a lo largo del tiempo, información útil para la optimización de procesos industriales y la producción de biomasa microbiana.
- El proceso de liofilización demostró ser una técnica efectiva para la preservación de cepas de bacterias lácticas y acéticas, la consistencia en los rendimientos obtenidos indica la viabilidad y reproducibilidad de este método, destacando su potencial para la conservación a largo plazo de cepas microbianas.
- La viabilidad post-liofilización fue evaluada mediante espectrofotometría, la cual ofrece información sobre el comportamiento bacteriano post-preservación, como la identificación de fases de crecimiento y declive, estas fases proporcionar una visión de la estabilidad a largo plazo de estas cepas, siendo importante para comprender su potencial en aplicaciones de conservación y uso agroindustrial.

5.2. RECOMENDACIONES

- Para aislar bacterias *Lactobacillus* y *Acetobacter* a partir del mucílago de cacao se debe realizar diluciones seriadas para evitar proliferación de otros microorganismos, considerando que para bacterias *Lactobacillus* el medio solido es el más adecuado para el crecimiento y para el aislamiento de *Acetobacter* el medio de cultivo debe contener una cantidad alta de glucosa (≥ 50 g/L) para la oxidación de los azúcares.
- En la caracterización de los aislados bacterianos, es necesario realizar tinción de Gram, rojo de metilo, catalasa y oxidasa; ya que, estas pruebas son de carácter esencial, el conjunto de resultados contribuye a la identificación de la especie bacteriana, evitando así falsos positivos en la investigación. Es importante tener en cuenta que la temperatura para realizar la prueba de rojo de metilo es de 30°C, además, durante la ejecución de la prueba de oxidasa, se debe evitar manipular la almohadilla que contiene el reactivo.
- Complementar las técnicas de caracterización bioquímica y microscópica con herramientas de biología molecular, como la secuenciación del ADN que proporciona información sobre la diversidad genética y ayudar en la identificación precisa de las cepas bacterianas.
- En el caso de *Acetobacter*, se considera utilizar un sustrato que contenga (30 g/L) de carbonato de calcio y (50 g/L) de glucosa, esto se debe a que estos componentes favorecen un medio rico en carbono y minerales. Para utilizar leche descremada como sustrato para aumentar la biomasa en *Lactobacillus*, es necesario esterilizar en un autoclave, luego, se añade al medio de cultivo MRS cuando esté caliente para

prevenir la gelificación. Después de cada uso, es importante sellar la leche para evitar la contaminación y conservarla en frío.

- Para la calibración de la curva de crecimiento microbiano se debe emplear modelos matemáticos adaptados, que permitirá conocer el desarrollo de los microorganismos a medida que transcurra el tiempo.
- Realizar estudios de viabilidad a más largo plazo para evaluar la estabilidad de las bacterias liofilizadas, para obtener información sobre la capacidad de las cepas para conservarse durante períodos prolongados y su aplicabilidad práctica en situaciones de almacenamiento a largo plazo.
- Explorar las aplicaciones industriales y alimentarias de las bacterias lácticas y acéticas aisladas, como estudios de fermentación para la producción de productos específicos, como vinagre o productos lácteos fermentados, y la evaluación de su potencial uso como probióticos.
- Se sugiere llevar a cabo estudios adicionales para identificar otros tipos de bacterias y levaduras presentes en el mucílago de cacao fermentado del recinto San Gerardo.
- Dado a que el mucílago resulto ser muy rico a nivel nutricional se recomienda formular un medio de cultivo tanto sólido como líquido a partir de este, en combinación con otros nutrientes necesario para el desarrollo microbiano.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, B. (2020, July 7). *Partes del fruto y sus funciones*. Ecologiaverde.Com. https://www.ecologiaverde.com/partes-del-fruto-y-sus-funciones-2864.html

Álava, W. (2020). *Caracterización física – química del mucílago de cacao (Theobroma cacao l.) Con énfasis en los azúcares que lo componen* [Universidad Agraria del Ecuador]. https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ALAVA%20ZAMBRANO%20WISTON%20ADRIAN.pdf

Arreaga, A. (2020). *Identificación del perfil fenólico del mucílago y cascarilla de cacao (Theobroma Cacao L.) de las variedades CCN-51 y Nacional*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Atlas, R. (2010). *Handbook of Microbiological media* (4th ed.). CRC Press.

Avendaño, E., Oliveros, D., & Hilarión, W. (2021). La eliminación como un patrón fisiológico en los organismos: el caso de la Acetobacter. *Mem. Congreso. Nac. Cienc. Biológicas*, *56*(4), 244–246. https://www.researchgate.net/profile/Edisson-Avendano-Rodriguez/publication/364277015_La_eliminacion_como_un_patron_fisiologico_en_los_organismos_el_caso_de_la_Acetobacter_-_ISSN_2500-7459_p244_-_246_vNA/links/64b64b42b9ed6874a52b9017/La-eliminacion-como-un-patron-fisiologico-en-los-organismos-el-caso-de-la-Acetobacter-ISSN-2500-7459-p244-246-vN-A.pdf

Bancalari, A., & Schalchli, H. (2019). Chemical composition of bran from different cereals. *Journal of Cereal Science*, *86*, 39–45.

Baque, A., & Romero, K. (2021). *Evaluación de las bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica para la conservación de: banano (M. paradisiaca L.) y papaya hawaiana (Carica papaya L.)* [Universidad de las Fuerzas Armadas]. https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25892/1/T-ESPESD-003138.pdf

Barrazueta Rojas, S. G., Yánez Tisalema, G. D., Mendoza Zurita, G. X., & Lara Freire, M. L. (2019). Uso y análisis químicos de distintos sustratos para el desarrollo de biomasa bacteriana. *Ciencia Digital*, *3*(3.4.), 152–166. https://doi.org/10.33262/cienciadigital.v3i3.4..843

Belda, N. (2020). *Sistemas fotoactivos para estudios de viabilidad celular con células cancerosas SKBR-3*. Universitat Politecnica de Valencia.

Bernal-Castro, C., Espinosa-Poveda, E., Gutiérrez-Cortés, C., & Díaz-Moreno, C. (2024). Vegetable substrates as an alternative for the inclusion of lactic acid bacteria with probiotic potential in food matrices. *Journal of Food Science and Technology*, *61*(5), 833–846. https://doi.org/10.1007/s13197-023-05779-z

Brooks, G. (2018). Lactate production under fully aerobic conditions: the lactate shuttle during rest and exercise. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, *32*(1), 26–35.

Cadena, K. (2020). *Producción de ácido láctico, a través de la fermentación de melaza tipo C por Bacillus subtilis MUR 1 para abastecer a las industrias cosmetológica y alimentaria nacional* [Universidad San Francisco de Quito]. https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/9686/1/118061.pdf

Calero, R. (2022). *Desarrollo de una aplicación móvil para determinar el grado de fermentación de los granos de cacao (theobroma cacao L.) aplicando técnicas*

de visión artificial basadas en deep learning [Proyecto de Investigación]. Universidad Técnica de Cotopaxi.

Ccoyori, R., & Huahuatico, V. (2022). *Obtención de yogurt simbiótico liofilizado a diferentes temperaturas y porcentajes de jarabe de yacón (Smallanthus sonchifolius)*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Chiarle, A. (2021, March 19). *¿Qué carbohidratos encontramos en las células vegetales?* NutriNews. https://nutrinews.com/que-carbohidratos-encontramos-en-las-celulas-vegetales/

Chisag, L. (2022). *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en un fermentado láctico de granos germinados de quinua (chenopodium quinoa) para potenciales aplicaciones* . Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.

Condalab. (2019, November 13). *Agar GYC Medio para bacterias acéticas*.

Dávalos, P. (2022). *Aislamiento y caracterización de cepas nativas de Komagataeibacter xylinus y comparación de su crecimiento en diferentes sustratos* [Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/34967/1/BQ%20308.pdf

Duchi, B. (2022). *Microorganismos de uso agroindustrial aislados del suelo de un bosque primario de la Parroquia Pungala Cantón Riobamba*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Duchi, B., Flores, C., Salgado, I., & Sánchez, T. (2023). Microorganisms of agroindustrial use isolated from the soil of a primary forest of the Pungalá Parish in the Riobamba Canton . *Journal of Survey in Fisheries Sciences* , *10*(3), 308–318. https://sifisheriessciences.com/journal/index.php/journal/article/view/34/30

El-Askri, T., Yatim, M., Sehli, Y., Rahou, A., Belhaj, A., Castro, R., Durán-Guerrero, E., Hafidi, M., & Zouhair, R. (2022). Screening and Characterization of New Acetobacter fabarum and Acetobacter pasteurianus Strains with High Ethanol–Thermo Tolerance and the Optimization of Acetic Acid Production. *Microorganisms*, *10*(9), 1741. https://doi.org/10.3390/microorganisms10091741

Erazo, C. (2019). *Diseño de un fermentador y secador solar piloto, para dos variedades de cacao (Theobroma cacao L), en el cantón el Empalme provincia Guayas*. Universidad Internacional Sek .

European Forest Institute. (2021). La cadena de suministro de cacao en Ecuador. In *Diagnóstico de la cadena de valor del cacao, y mapeo de los indicadores y sistemas de información existentes* (pp. 6–26).

Fajardo-Argoti, C., Jurado-Gámez, H., & Parra-Suescún, J. (2021). Viabilidad de Lactobacillus plantarum microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición sobre Escherichia coli O157:H7. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *24*(1). https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733

Fernández, S. (2022). *Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de ácido láctico (AL) a escala de planta piloto* . Universidad de Costa Rica.

Flores, J. (2020). *Optimización estadística de la produción de ácido láctico a partir de lactosuero por Lactobacillus casei*. Universidad Técnica del Norte.

Freire-Almeida, E., & Maldonado-Alvarado, P. (2023). Use of *Lactobacillus* for Lactic Acid Production from Agro-Industrial By-Products. In *Lactobacillus* -

A Multifunctional Genus. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.106697

Frutos, G. (2023). *Aprovechamiento de residuos alimentarios provenientes de la cafetería para la producción de nanocelulosa* [Universidad Politécnica de Madrid]. https://oa.upm.es/76543/1/TFG_GEMA_FRUTOS_ROLDAN.pdf

Fuentes, E., Carrillo, M., Gijón, I., & Macías, R. (2018). − Aplicación de la liofilización en la conservación de microemulsiones usadas en alimentos funcionales y nutracéuticos: un caso de la ingeniería en alimentos. *TLATEMOANI*, 304.

Garcés, B. (2021). *Evaluación de las diferentes proporciones de mucílago de Cacao (Theobrma cacao L.) CCN-51 y jugo de caña de azúcar (Saccharum officinarum L.) en la elaboración de jalea* [Universidad Nacional de Ucayali]. https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/fe293eaa-909d-4c48-b416-c5be38c2e996/content

García, C., Arrázola, G., & VIllalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplemntado utilizando Lactobacillus casei . *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *11*.

Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas* . Universidad Politécnica de Valencia .

Gómez, D. (2020, July 9). *El cacao: condiciones de cultivo, composición y valor nutricional*. Biotecnología, Tecnología Alimentaria. https://fundacion-antama.org/el-cacao-condiciones-de-cultivo-composicion-y-valor-nutricional/

Guamán, A. (2022). *Obtención de ácido láctico a partir del almidón del maíz chulpi (Zea mays sacchara) utilizado la fermentación de bacterias ácido lácticas, para su uso en la industria cosmética* [Proyecto de Investigación, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/17719/1/96T00785.pdf

Gutiérrez, H., & de la Vara, R. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos* (3rd ed.). McGraw-Hill/Interamericana Editores.

Herrera, C. (2021). *Capacidad probiótica de levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) recuperadas del proceso de fermentación de cacao con potencial uso industrial.* [Pontificia Universidad Javeriana]. https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/58283/CAPACIDAD%20PROBIOTICA%20DE%20LEVADURAS%20Y%20BAL%20RECUPERADAS%20DEL%20PROCESO%20DE%20FERMENTACION%20DE%20CACAO%20CON%20POTENCIAL%20USO%20INDUSTRIAL.%20-%20Carlos%20Herrera%20Acosta.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Illescas, L. (2021). *Elaboración de un vinagre a base de pomarrosa (Syzgium jambos) como una alternativa de consumo* [Universidad Agraria del Ecuador]. https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ILLESCAS%20ANDRADE%20LISETTE%20ROCIO.pdf

Jadán-Solís, P., Cifuentes-Rojas, T., & Amaya-Diaz, I. (2023). Manejo Técnico del Cultivo de Cacao a Emprendedores Agrícolas del Recinto Cuatro Mangas-Buena Fe-Los Ríos-Ecuador. *Revista Científica Dominio de Las Ciencias*, *9*(3), 354–372.

Jordan, K., & Parra, M. del C. (2020). *Evaluación del mucílago de cacao (Theobroma Cacao L) para la obtención de etanol de segunda generación*. Universidad Técnica de Machala.

Kim, D.-H., Chon, J.-W., Kim, H., & Seo, K.-H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control*, *106*, 0956–7135. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717

Kumar, K. (2019). α-Amylase: An Overview. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(3), 1276–1286.

Laboratorium Discounter. (n.d.). *2-metilbutano*. Laboratorium Discounter.

LAFFORT. (2022). *Ácido Láctico, Ficha de datos de seguridad* (pp. 1–12).

Lange, F., & Criollo, F. (2022). *Evaluación del aprovechamiento industrial del mucílago de cacao de la variedad ccn-51 y nacional a partir de su caracterización fisicoquímica*. Universidad de Guayaquil.

Lara, K., & Segarra, M. (2022). *Propuesta de una bebida antioxidante a base de hojas y mucílago deTtheobroma cacao L fino de aroma*. Universidad de Guayaquil.

Lema, J. (2023). *Aprovechamiento del suero de la leche para la obtención de ácido láctico* [Universidad Nacional de Chimborazo]. http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/10593/1/Lema%20Jaime%20%282023%29%20Aprovechamiento%20del%20suero%20de%20la%20leche%20para%20la%20obtenci%C3%B3n%20de%20%C3%A1cido%20l%C3%A1ctico..pdf

Lemus, S. (2020). *Optimización de un proceso de fermentación artesanal para elaboración de vinagre y estudio del inóculo empleado (Madre del vinagre)* [Ingeniería en Alimentos]. Universidad Autónoma de Puebla.

López, J. (2021). *Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en dos variedades de cacao (mucílago), Nacional y CCN-51, para la bioconservación de papaya (Carica papaya) y naranjilla (Solanum quitoense*. Universidad de las Fuerzas Armadas.

Mechmeche, M., Kachouri, F., Yaghlane, H. B., Ksontini, H., Setti, K., & Hamdi, M. (2017). Kinetic analysis and mathematical modeling of growth parameters of *Lactobacillus plantarum* in protein-rich isolates from tomato seed. *Food Science and Technology International*, *23*(2), 128–141. https://doi.org/10.1177/1082013216665706

Melgaço, A. C. C., Blohem Pessoa, W. F., Freire, H. P., Evangelista de Almeida, M., Santos Barbosa, M., Passos Rezende, R., Timenetsky, J., Miranda Marques, L., & Romano, C. C. (2018). Potential of Maintaining a Healthy Vaginal Environment by Two *Lactobacillus* Strains Isolated from Cocoa Fermentation. *BioMed Research International*, *2018*, 1–14. https://doi.org/10.1155/2018/7571954

Ministerio del Ambiente y Agua. (2020, July 30). *Ambiente*. https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-impulsa-la-gestion-adecuada-de-residuos-organicos-en-las-ciudades/

Miranda-Yuquilema, J., Taboada, J., Once, V., Coyago, M., & Briñez, W. (2024). Effect of Agroindustrial Waste Substrate Fermented with Lactic Acid Bacteria

and Yeast on Changes in the Gut Microbiota of Guinea Pigs. *Microorganisms*, *12*(1), 133. https://doi.org/10.3390/microorganisms12010133

Mollejo, V. (2022, May 4). *Café y cacao: la combinación perfecta gracias a la teobromina*. Alimente. https://www.alimente.elconfidencial.com/consumo/2022-05-04/teobromina-propiedades-beneficios_1662390/

Moreira, S. (2019). *Caracterización del mucílago de caco (Theobroma cacao L.) Nacional y Trinitario en el catón Quevedo* [Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3796/1/T-UTEQ-0056.pdf

Natamycin. (2014). *¿Qué es la natamicina?* Natamycin Conservante de Alimentos Eficaz y Natural.

Núñez, F. (2022). *Escalado de procesos fermentativos aerobios en biorreactores tipo tanque agitado : Escalado de la fermentación para la obtención de vinagre de naranja agria (Citrus aurantium L.) con Acetobacter sp.* [Escuela Politécnica Nacional]. https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/23098/1/CD%2012522.pdf

Olivares, W. (2022). *Propuesta de creación de empresa productora y comercializadora de jugo embotellado a base de mucílago de cacao.* [Universidad Católica De Santiago de Guayaquil]. http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/19413/1/T-UCSG-PRE-ESP-IE-359.pdf

Orellana, A. (2022). *Aislamiento e identificación de microorganismos con interés agroindustrial a partir de muestras de suelo de bosques primarios del cantón*

Colta [Escuela Politécnica de Chimborazo]. http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/20237/1/96T00846.pdf

Ouattara, H. D., Ouattara, H. G., Droux, M., Reverchon, S., Nasser, W., & Niamke, S. L. (2017). Lactic acid bacteria involved in cocoa beans fermentation from Ivory Coast: Species diversity and citrate lyase production. *International Journal of Food Microbiology*, *256*, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.008

Oyeniran, A., Ibrahim, S. A., Gyawali, R., Tahergorabi, R., Zimmerman, T., & Krastanov, A. (2020). A modified reinforced clostridial medium for the isolation and enumeration of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus in a mixed culture. *Journal of Dairy Science*, *103*(6), 5030–5042. https://doi.org/10.3168/jds.2019-17894

Parada, R. (2019, July 14). *Arabinosa: características, estructura y funciones*. Lifeder. https://www.lifeder.com/arabinosa/

Parada, R. (2020, February 20). *Peptidoglicano: síntesis, estructura, funciones*. Lifeder. https://www.lifeder.com/peptidoglicano/

Paredes, N., Monteros-Altamirano, Á., Lima, L., Caicedo, C., Bastidas, S., Tinoco, L., Fernández, F., Vargas, Y., Pico, J., Subía, C., Burbano, A., Chanaluiza, A., Sotomayor, D., Díaz, A., Intriago, J., Chancosa, C., Andrade, A., & Enríquez Geovanny. (2022). *Manual del cultivo de cacao sostenible para la Amazonía ecuatoriana* (1era ed.). Manual Nro. 125.

Pérez, M., Sampedro, M., Pazmiño, L., & Pulla, I. (2021). Bolívar 2021 Innova, Emprende, Produce. *Fundación Maquita - Prefectura de Bolívar - Universidad Estatal de Bolívar* , 1–52. https://issuu.com/guaranga/docs/0001

Portal de productos del grupo PCC. (2022, September 20). *Ácido málico – fórmula, propiedades y aplicación*. PCC Group. https://www.products.pcc.eu/es/blog/acido-malico-formula-propiedades-y-aplicacion/

Raca, S. (2020). *El papel del citocromo c en la regulación del metabolismo energético y el desarrollo en plantas*. Universidad Nacional del Litoral.

Rae.es. (2023). *Endocarpio*. Rae.Es. https://dle.rae.es/endocarpio

Ramirez, J., Medina, Y., & Uscanga, I. (2018). *Manual de laboratorio de microbiologia*. Universidad Veracruzana.

Ramos, N. (2024). *Concentración de Acetobacter Aceti a diferente temperatura para la elaboración de vinagre de frambuesa (Rubus Idaeus) evaluando sus características fisicoquímicas* [Universidad Nacional de Cajamarca]. https://190.116.36.86/bitstream/handle/20.500.14074/6348/TESIS%20NESTOR%20JO%c3%89L%20RAMOS%20CAMACHO.pdf?sequence=5&isAllowed=y

Ricaurte, A. (2020). *Determinación de la viabilidad del Acetobacter Aceti y Saccharomyces Cerevisiae presentes en el Medusomyces Gisevi (hongo kombucha) para una posible aplicación en la agroindustria, mediante la utilización de tres sustratos* [Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/15506/1/27T00457.pdf

Rivera, S. (2019). *Propuesta de aplicación del mucílago de cacao para la elaboración de bebidas y postres mediante técnicas de vanguardia.* Universidad de Cuenca.

Rivera-Toledo, E., Jiménez-Delgadillo, A. U., & Manzano-Gayosso, P. (2020). Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones. *Revista de La Facultad de Medicina*, *63*(2), 7–17. https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2020.63.2.02

Rodrigo, R. (2020, October 4). *Ácidos monocarboxílicos: estructura, propiedades y usos*. Medio Ambiente y Ecología. https://estudyando.com/acidos-monocarboxilicos-estructura-propiedades-y-usos/

Rodríguez, C., Breña, J., & Esenarro, D. (2021). *Las variables en la metodología de la investigación científica* (1st ed.). Área de innovación y desarrollo, SL .

Rodríguez, C., & Zhurbenko, R. (2018). *Manual de medios de cultivo 2018* (T. Rodríguez, M. Díaz, & D. Viera, Eds.; Cuarta). BioCen.

Rodriguez, L., Sánchez, D., Espinosa, M., & Coronado, R. (2023). Caracterización microbiológica, sensorial y bromatológica de la fermentación de cacao en los genotipos CCN 51 E ICS 95. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, *22*, 1–19. https://doi.org/10.14409/fa.2023.22.e0016

Rodríguez, P., & Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram and His Staining. In *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* (Vol. 16, pp. 166–167). Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Rodríguez, R., Posada, G., Valero, A., Torres, E., Torres, Y., & Díaz, R. (2021). Valoración de baba de cacao (mucílago) no utilizada en el cantón Quevedo - Ecuador. *Revista Científica Ciencia y Tecnología*, *21*(32), 79–86.

Ruiz, M. (2019). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas*

por alimentos. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Salas, P. (2022). *Estrategias para producir ácido succínico en Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Salazar, L. (2017). *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. De la variedad "Chuncho" obtenida en Cuzco, Perú* [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y

San Lucas Sánchez; Carlos. (2012). *Uso de Natamicina en Pan de Molde sin Corteza para Aumentar el Tiempo de Vida Útil* [Informe de trabajo profesional]. Escuela Superior Politécnica del Literal.

Sánchez, J. (2019). *Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de frutos procedentes de la Región Loreto* . Universidad Nacional Mayor de San Marcos .

Santa Cruz, A. (2019). *Cuantificación de hidroximetilfurfural (HMF) por cromatografía líquida de alta resolucion (HPLC) y espectrofotometría UV-Visible en miel.* Universidad Católica de Santa María .

Santana, P., Vera, J., Vallejo, C., & Álvarez, A. (2019). Mucílago de cacao, Nacional y Trinitario para la obtención de una bebida hidratante. *Universidad Ciencia Y Tecnología*, *4*.

Scharlau Microbiología. (2023). *MRS Agar*.

Shaanxi Sciphar Natural Products Co., Ltd. (2018, January 24). *Estaquiosa*. SCIPHAR.

Silva, R. (2020). *Desarrollo de vinagre de pulpa de mango kent (Mangefera indica L.)" empleando acetobacter nativo* [Universidad Nacional Agraria de la Selva]. http://repositorio.unas.edu.pe/handle/UNAS/1846

SIPA. (2021a). *Cifras Agroproductivas*. Información Productiva Territorial.

SIPA. (2021b). *Ficha del cultivo de cacao (Theobroma cacao L.)*. Participación En La Producción Nacional 2021 Cacao (Almendra Seca).

Suwannaphan, S. (2021). Isolation, identification and potential probiotic characterization of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented food. *AIMS Microbiology*, *7*(4), 431–446. https://doi.org/10.3934/microbiol.2021026

Syed, S., Supang, J., & Mohd, M. (2020). The development of Acetobacter xylinum growth measurement through total protein analysis. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *24*(2), 258–265.

Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *The Scientific World Journal*, *2021*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2021/4697445

Torres, C., & Vera, G. (2019). *Efecto del porcentaje de ácido acético en la vida útil de una conserva de pollo desmenuzado en escabeche* [Escuela Superior Politécniva Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. https://repositorio.espam.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/42000/1231/TAI177.pdf?sequence=6&isAllowed=y

UNE-EN ISO 7218. (2008). *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen*

microbiológico. (ISO 7218:2007). https://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2021/08/UNE-EN_ISO_72182008.pdf

Vallejo, C., Vera, J., Quintana, J., Verdezoto, D., Cajas, L., & Mendoza, T. (2018). Bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (Theobroma Cacao L.) de dos variedades. *Revista de Investigación Talentos*, *1*, 59–68. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8551197

Vallejo, K. (2021). *Utilidad de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas para la bioconservación de productos cárnicos*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Vargas, J., & Vergara, V. (2020). *Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano a escherichia coli por bacterias ácido lácticas provenientes de queso fresco de la región cafetera de colombia*. Universidad Libre Seccional Pereira.

Vásquez, Z., de Carvalho, D., Pereira, G., Vandenberghe, L., de Oliveira, P., Tiburcio, P., Rogez, H., Góes, A., & Soccol, C. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, *90*, 72–83.

Vera, J., Vásquez, L., Alvarado, K., Mora, K., Intriago, F., Naga-Raju, M., Radice, M., & Vallejo, C. (2023). Mucílago de cacao (CCN-51) en la elaboración de almíbar de manzana con propiedades antioxidantes. *Revista Multidisciplinaria de Desarrollo Agropecuario, Tecnológico, Empresarial y Humanista.*, *5*(1), 1–10. https://www.dateh.es/index.php/main/article/view/130/282

Vera Peña, M. Y., Cortés Rodríguez, M., & Valencia-García, F. E. (2019). Secado por atomización de bacterias ácido lácticas: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, *15*(29), 179–213. https://doi.org/10.17230/ingciencia.15.29.7

Wang, B. (2020). *Characteristics of Dominant Acetic Acid Bacteria and Yeasts in Kombucha Sold in New Zealand*. Massey University.

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285

Xianyan, R., Chang, H., Xingxing, J., Xueping, S., & Yanju, L. (2019). Synthesis and application of p-amino-N-dimethyl aniline-based dyes in dye-sensitized solar cells. *Materials Chemistry A*, *7*, 22288–22296.

Yanti, N., Ahmad, S., Ambardini, S., Muhiddin, N., & Sulaiman, L. (2017). Screening of Acetic Acid Bacteria from Pineapple Waste for Bacterial Cellulose Production using Sago Liquid Waste. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *9*(3), 387–393. https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v9i3.10241

ANEXOS

Anexo 1

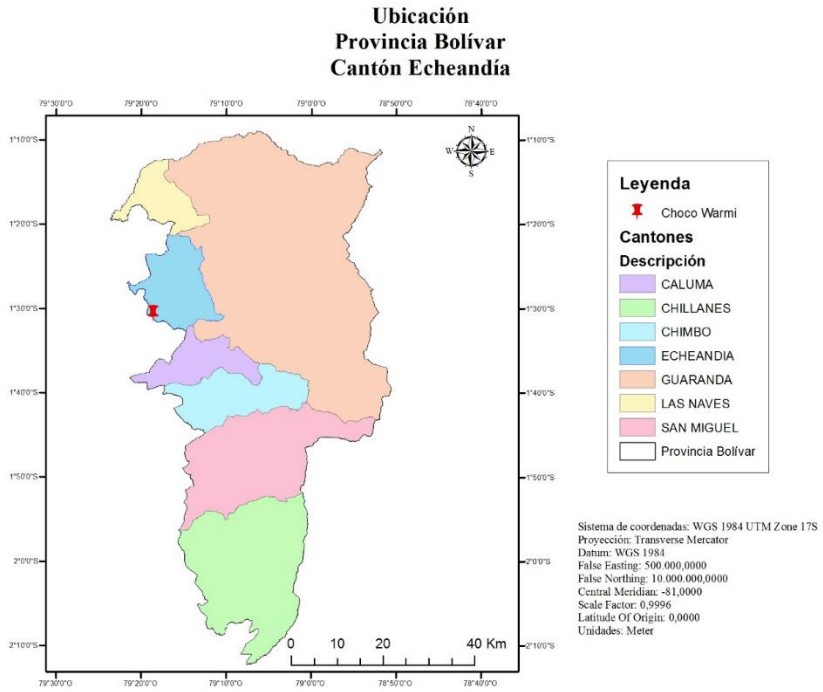
Mapa de ubicación de la investigación



Nota: Vista satelital del Laboratorio de Vinculación e Investigación de la UEB. Toma de puntos mediante de la aplicación "coordenadas" 722773 E, 9821524.1 N



Nota: Vista satelital del laboratorio general de la UEB. Toma de puntos mediante de la aplicación "coordenadas" 722436.4 E, 9822407.9 N



Nota: Mapa geográfico de Recinto San Gerardo Toma de puntos mediante de la aplicación "coordenadas" 687965.8 E, 9832918.4 N

Anexo 2

Relación costo – beneficio del producto

	Lactobacllus spp.		***Acetobacter spp.***	
REACTIVOS	**Cantidad utilizada**	**Precio producto**	**Cantidad utilizada**	**Precio producto**
Agar *Lactobacillus* MRS	750 g	$ 112,50		
Alcohol industrial			1 L	$ 3,00
Caldo nutritivo 500gr titan	75 g	$ 7,91	25 g	$ 2,64
Calcio carbonato precipitado			250 g	$ 35,71
Glucosa			300 g	$ 18,00
Extracto de levadura			80 g	$ 12,80
Bactoagar	30 g	$ 9,00		
Agar			60 g	$ 5,40
Frascos de plástico	20 unidades	$ 5,00	12 unidades	$ 1,56
Leche	1 l	$ 1,00		
Agua destilada	8 l	$ 4,70	4 l	$ 2,35
Sal	14 g	$ 0,01	8 g	$ 0,009
MATERIALES				
Cinta parafilm	19 m	$ 20,50	19 m	$ 20,50
Guantes de nitrilo	50 unidades	$ 6,75	50 unidades	$ 6,75
Fundas metalizadas	13 fundas	$ 5,33	7 fundas	$ 2,87
PROCEDIMIENTOS				
Ultracongelación		$ 12,39		$ 12,39
Liofilización		$ 14,17		$ 14,17
Espectrofotometría		$ 15,45		$ 15,45
Mano de obra		$ 50,00		$ 50,00
TOTAL GENERAL EGRESOS		$ 264,71		$ 203,60
Productos Obtenidos		**13 g**		**7 g**
Costo por Producto		$ 20,36		$ 29,09
Costo - Beneficio		$ 6,11		$ 8,73
Precio para Venta		$ 26,47		$ 37,82

Anexo 3

Informe de resultados de liofilización

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIO DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS Y FITOQUÍMICA Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.	Versión	1
	INFORME DE RESULTADOS	Año	2024
		Pagina	Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYOS N°075

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Solicitante	Roxana Garcia – Lady Guevara
Muestra	Bacterias lácticas y acéticas en agua salina
Código asignado UEB	INV075
Estado de la muestras	Líquidos
Envase de recepción	Frascos de vidrio
Análisis requerido(s)	Proceso de liofilización
Fecha de recepción	18 de diciembre de 2023
Fecha de análisis	18 de diciembre 2023 -07 de febrero 2024
Fecha de informe	07 de febrero de 2024
Técnico (s) asignado	MPWF

RESULTADOS OBTENIDOS

PARAMETROS BROMATOLÓGICOS

Código laboratorio	Muestra	Método	Condiciones	Cantidad [g]
INV075	Bacterias lácticas y acéticas en agua salina	Liofilización	-56°C – 0,03 milibar	20,00

Ing. Fabián Bayas, PhD.
Director DIVIUEB

Anexo 4

Recolección de materia prima cacao Nacional y CCN - 51

A B C

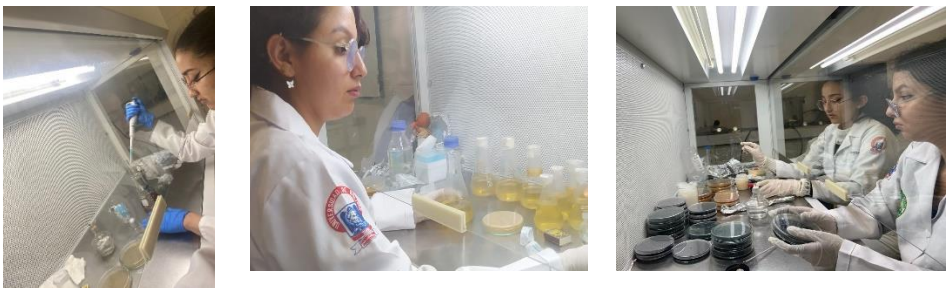


Nota: La figura A indica la recolección del cacao Nacional, la figura B muestra la recolección del cacao CCN-51 y la figura C indica el lavado de las mazorcas de cacao.

Anexo 5

Siembra de diluciones para bacterias ácido lácticas y acéticas

A B C



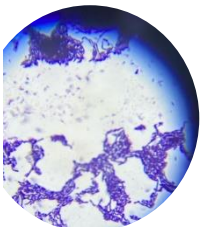
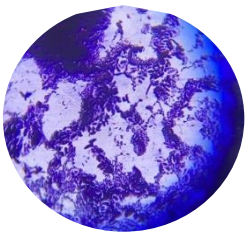
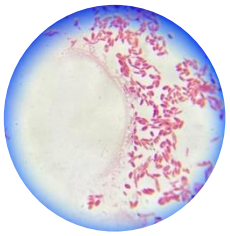
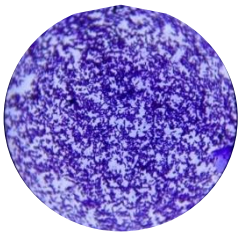
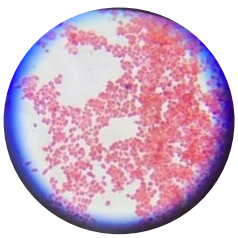
D E F



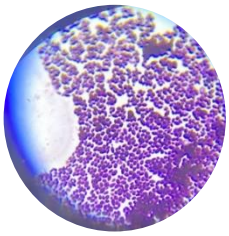
Nota: La figura A muestra las diluciones seriadas para bacterias ácido lácticas, la figura B muestra las diluciones seriadas para bacterias ácido acéticas, la figura C muestra la siembra de diluciones seriadas de bacterias ácido acéticas en medio Carr y GYC, la figura D indica la siembra para el aislamiento de bacterias ácido lácticas en medio MRS la figura E señala la siembra para el aislamiento de bacterias ácido acéticas en medio GYC + natmicina y la figura F muestra los aislados de bacterias ácido lácticas.

Anexo 6

Caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas para Lactobacillus

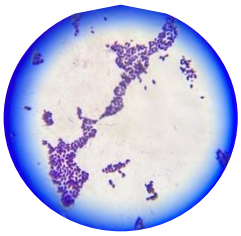
Especie	Tinción de Gram	Rojo de metilo	Catalasa
$a_1b_1c_2$			
$a_1b_2c_1$			
$a_1b_2c_2$			
R_1 - $a_1b_1c_1$			
R_1 - $a_1b_1c_2$			

R_1 - $a_1b_2c_1$



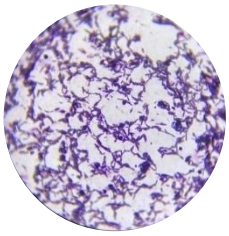


R_1 - $a_1b_2c_2$



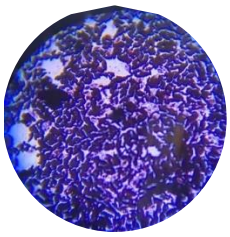


R_2 - $a_1b_1c_1$



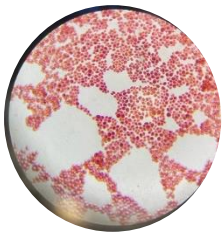


R_2 - $a_1b_1c_2$



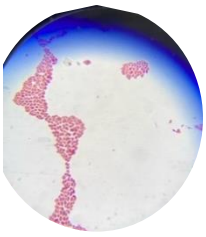


R_2 - $a_1b_2c_1$





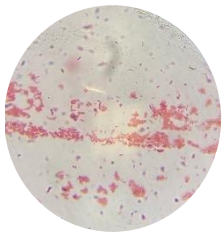
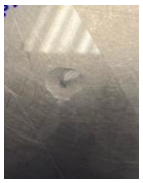
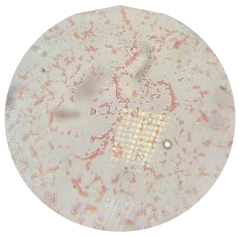
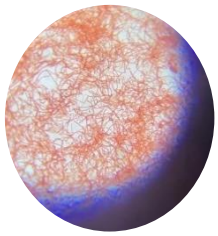
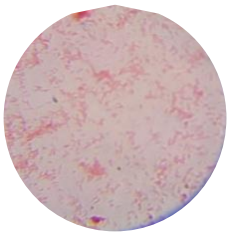
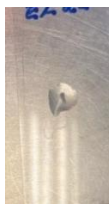
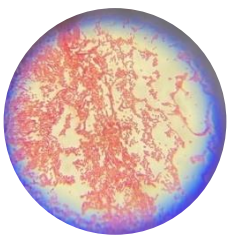
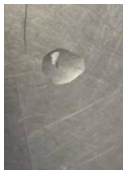
R_2 - $a_1b_2c_2$





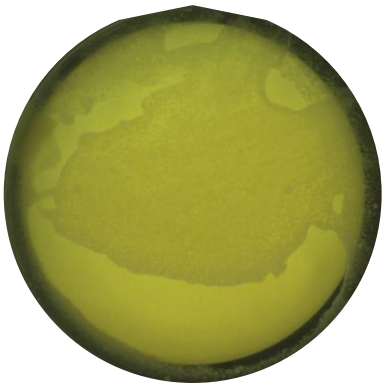
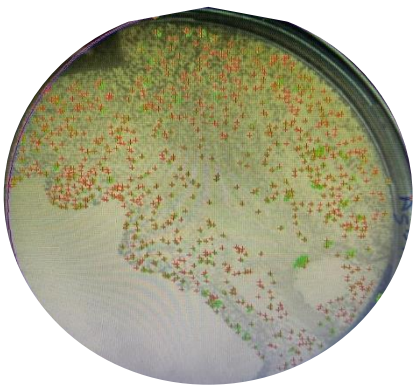
Anexo 7

Caracterización de los aislados obtenidos mediante técnicas microscópicas y bioquímicas para Acetobacter

Especie	Tinción de Gram	Rojo de metilo	Catalasa
$d_2e_1f_1$			
$d_2e_2f_1$			
R_1 - $d_2e_1f_1$			
R_2 - $d_2e_1f_1$			
R_2 - $d_2e_2f_1$			

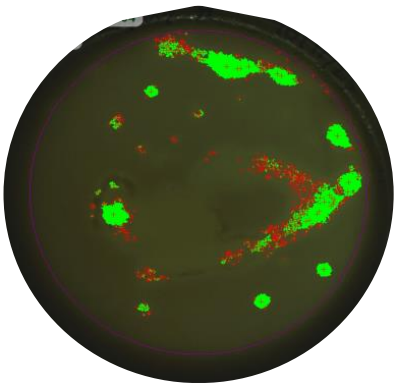
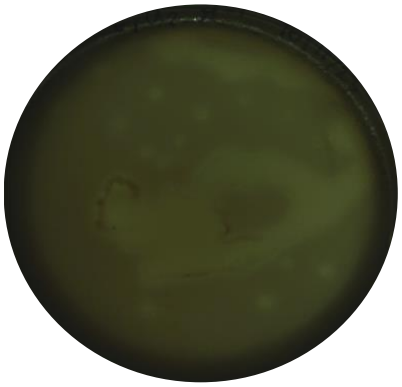
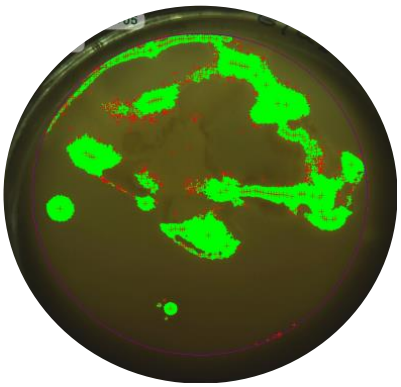
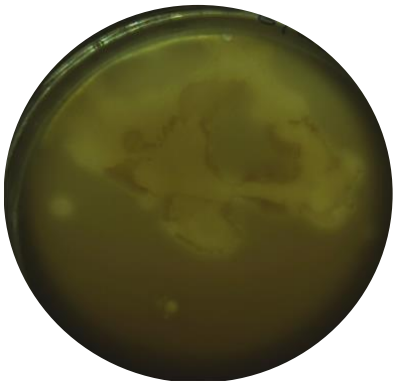
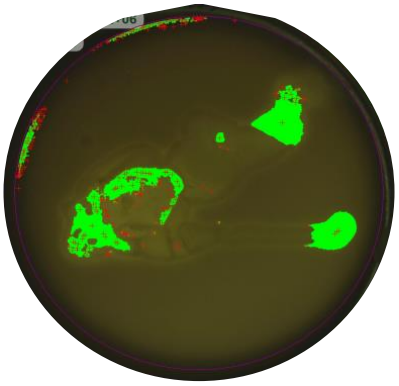
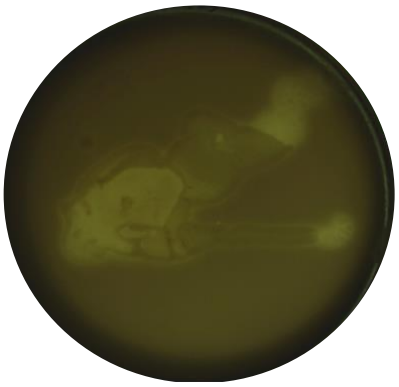
Anexo 8

Diluciones para la cinética de crecimiento de Lactobacillus 48h

Diluciones	**Conteo**	**CFU**
Dilución: 10^{-1} 		CFU: Incontable
Dilución: 10^{-2} 		CFU: Incontable
Dilución: 10^{-3} 		$\mathrm{CFU} = 807$

Anexo 9

Diluciones para la cinética de crecimiento Acetobacter 48h

Diluciones	**Conteo**	**CFU**
Dilución: 10^{-1}		$CFU = 537$
		
Dilución:10^{-2}		$CFU = 495$
		
Dilución: 10^{-3}		$\mathrm{CFU} = 244$
		

Anexo 10

Multiplicación de bacterias ácido lácticas y acéticas con sustrato

A B





Nota: La figura A muestra la multiplicación de bacterias ácido lácticas MRS + 5% leche y la figura B indica la multiplicación bacterias ácido acéticas *Acetobacter* agar.

Anexo 11

Bacterias para el proceso de liofilización

A B C







Nota: La figura A muestra a las bacterias para el proceso de liofilización, la fugura B indica la molienda de bacterias liofilizadas *Lactobacillus* y *Acetobacter* y la figura C las bacterias liofilizadas *Lactobacillus* y *Acetobacter*.

Anexo 12

Reactivación de bacterias liofilizadas Lactobacillus y Acetobacter

A B





Nota: La figura A muestra a las Bacterias liofilizadas *Lactobacillus y* la fugura B indica la Bacterias liofilizadas *Acetobacter*.

Anexo 13

Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría Lactobacillus y Acetobacter



Nota: Incubación de bacterias *Lactobacillus* y *Acetobacter* a 30°C.



Nota: Medición de absorbancia de *Lactobacillus* y *Acetobacter*

Anexo 14

Certificados de análisis de los reactivos usados

TITAN BIOTECH LIMITED

AN ISO 9001-2015 CERTIFIED COMPANY
Corp. Office: 903-909, 9th Floor, Bigjos Tower, Netaji Subhash Place, Delhi-110034, INDIA
R.O. & Works
Unit-I: A-902-A, RIICO Industrial Area, Phase-III, Bhiwadi, Rajasthan-301019, INDIA
Unit-II: E-540, Industrial Area, Chopanki, Bhiwadi, Rajasthan-301019, INDIA
C.I.N. – L74999RJ1992PLC013387
Customer Care Cell: 91-11-71239900, customercare@tmmedia.in

QUALITY ASSURANCE DEPARTMENT
CERTIFICATE OF ANALYSIS

CoA No.	:	TBL/QC/023/03049	**Date**	:	16/03/2023
Product Name	:	**PEPTONE WATER**	**Code**	:	TM 330
Lot No.	:	M3D0CX01			
Date of Mfg.	:	Mar. 2023	**Best Before**	:	Feb. 2027

Physical & Chemical Parameters:

Parameters	Specifications	Results
Dehydrated Medium	Cream to yellow colour, homogenous mixture, free flowing powder	Complies
Prepared Medium	Light amber colour, clear solution	Complies
pH at 25 °C	7.2 ± 0.2	7.39

Microorganism response:

Culture characteristics observed after inoculating 50-100 CFU, for incubation period of 18 - 24 hours at 35 – 37°C.

Microorganisms	ATCC	Inoculum (CFU)	Growth	Indole test	Results
Staphylococcus aureus	25923	80	Luxuriant	Negative reaction	Complies
Escherichia coli	25922	89	Luxuriant	Positive reaction	Complies
Salmonella Typhimurium	23564	76	Luxuriant	Negative reaction	Complies

Results: Satisfactory

Information on TSE / BSE risk

This is to certify that Titan Biotech Ltd had not done product specific validation for majority of their products. Titan Biotech Ltd provides all the data that allows the customers to evaluate and minimize risk when using the products in their respective processes. We declare the bovine raw material for products was collected from bovine of Indian origin only and were procured from the Government approved slaughter houses in India. The animal was screened for contagious diseases by the Government approved Veterinarian doctor before slaughter and was slaughtered if found to be free. Parts of bovine animals which are highly contagious such as skull/vertebra/other parts are not considered as raw material, only those tissues are taken which posses least risk such as skeleton muscles/body fluid – milk/other tissues with no detected infective are taken (WHO guideline). The material is washed with hot water and cleaned in order to restrict cross contamination.
Till to date there is no case of TSE / BSE had been reported in India.

We certify the above product is having least or no risk of TSE / BSE.

Electronically Generated Certificate-Valid without signature.

TITAN BIOTECH LIMITED

AN ISO 9001-2015 CERTIFIED COMPANY
Corp. Office: 903-909, 9th Floor, Bigjos Tower, Netaji Subhash Place, Delhi-110034, INDIA
R.O. & Works
Unit-I: A-902-A, RIICO Industrial Area, Phase-III, Bhiwadi, Rajasthan-301019, INDIA
Unit-II: E-540, Industrial Area, Chopanki, Bhiwadi, Rajasthan-301019, INDIA
C.I.N. – L74999RJ1992PLC013387
Customer Care Cell: 91-11-71239900, customercare@tmmedia.in

QUALITY ASSURANCE DEPARTMENT
CERTIFICATE OF ANALYSIS

CoA No.	:	TBL/QC/022/0152	Date	:	29/01/2022
Product Name	:	LACTOBACILLUS MRS AGAR (MRS AGAR)	Code	:	TM 146
Lot No.	:	M1E6AW01			
Date of Mfg.	:	Jan. 2022	Best Before	:	Dec. 2025

Physical & Chemical Parameters:

Parameters	Specifications	Results
Dehydrated Medium	Cream to light yellow colour, homogenous mixture, free flowing powder	Complies
Prepared Medium	Medium to dark amber coloured, clear to slightly opalescent gel	Complies
pH at 25 °C	6.5 ± 0.2	6.55

Microorganism response:

Culture characteristics observed after inoculating 50-100 CFU, for incubation period for 18-24 hours at 35-37°C.
*Recovery for the growth of microorganism on Soya Casein Digest Agar (TM 345) is considered to be 100%.

Microorganisms	ATCC	*Inoculum (CFU)	Observed (CFU)	Growth	Recovery on test media (%)	Results
Lactobacillus casei	9595	72	66	Luxuriant	92%	Complies
Lactobacillus fermentum	9338	89	70	Luxuriant	79%	Complies
Lactobacillus delbrueckii	4797	76	69	Luxuriant	91%	Complies
Lactobacillus leichmannii	7830	77	72	Luxuriant	94%	Complies
Pediococcus acidilactici	8042	91	65	Luxuriant	92%	Complies

For inhibitory microorganism: No growth is observed after inoculating ≥ 1000 CFU and incubating for not less than longest incubation period (3 days) at 35°C.
Results: Satisfactory

Information on TSE / BSE risk

This is to certify that Titan Biotech Ltd had not done product specific validation for majority of their products. Titan Biotech Ltd provides all the data that allows the customers to evaluate and minimize risk when using the products in their respective processes. We declare the bovine raw material for products was collected from bovine of Indian origin only and were procured from the Government approved slaughter houses in India. The animal was screened for contagious diseases by the Government approved Veterinarian doctor before slaughter and was slaughtered if found to be free. Parts of bovine animals which are highly contagious such as skull/vertebra/other parts are not considered as raw material, only those tissues are taken which posses least risk such as skeleton muscles/body fluid – milk/other tissues with no detected infective are taken (WHO guideline). The material is washed with hot water and cleaned in order to restrict cross contamination.
Till to date there is no case of TSE / BSE had been reported in India.

We certify the above product is having least or no risk of TSE / BSE.

Certified by: Q.C. Incharge Q.A. Incharge

Electronically Generated Certificate-Valid without signature.

TITAN BIOTECH LIMITED

AN ISO 9001:2015 CERTIFIED COMPANY
Corp. Office: 903-909, 9th Floor, Bigjos Tower, Netaji Subhash Place, Delhi-110034, INDIA
R.O. & Works:
Unit-I: A-902-A, RIICO Industrial Area, Phase-III, Bhiwadi, Alwar, Rajasthan-301019, INDIA
Unit-II: E-540, Industrial Area, Chopanki, Bhiwadi, Alwar, Rajasthan-301019, INDIA
C.I.N. – L74999RJ1992PLC013387
Customer Care Cell: +91-11-71239900, customercare@titanmedia.in

QUALITY ASSURANCE DEPARTMENT
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of the product	: GLYCEROL (Glycerine)	Product code	: 597
Batch No.	: C5J7EX01	A. R. No.	: TB/B/230523-122
Mfg. Date	: May. - 2023	Date of Receipt	: 23/05/2023
Best before	: Apr. - 2028	Date of Completion	: 29/05/2023

PHYSICAL PARAMETERS

S. No.	PRODUCT PARAMETERS	SPECIFICATIONS	RESULTS
1.	Appearance	Clear colorless, syrupy liquid, odorless.	Complies

CHEMICAL PARAMETERS

S. No.	PRODUCT PARAMETERS	SPECIFICATIONS	RESULTS
1.	Moisture	NMT – 2.0%	0.97%
2.	Specific gravity	1.260 – 1.265	1.263
3.	Ash	NMT – 0.01%	Complies
4.	Heavy Metals(Pb)	NMT- 0.0005%	Complies
5.	Iron(Fe)	NMT- 0.0004%	Complies
6.	Sulphate (SO_4)	NMT- 0.003%	Complies
7.	Assay	98.0-101.0%	99.55 %

Electronically Generated Certificate-Valid Without Signature.

TITAN BIOTECH LIMITED

AN ISO 9001:2015 CERTIFIED COMPANY
Corp. Office: 903-909, 9th Floor, Bigjos Tower, NetajiSubhash Place, Delhi-110034, INDIA
R.O. & Works
Unit-I: A-902-A, RIICO Industrial Area, Phase-III, Bhiwadi, Rajasthan-301019, INDIA
Unit-II: E-540, Industrial Area, Chopanki, Bhiwadi, Rajasthan-301019, INDIA
C.I.N. – L74999RJ1992PLC013387
Customer Care Cell: 91-11-71239900, customercare@tmmedia.in

QUALITY ASSURANCE DEPARTMENT
CERTIFICATE OF ANALYSIS

CoA No.	: TBL/QC/021/01068	Date	: 04/01/2022
Product Name	: NUTRIENT BROTH	Code	: TM 350
Lot No.	: M3F0HW01		
Date of Mfg.	: Jan. 2022	Best Before	: Jul. 2026

Physical & Chemical Parameters:

Parameters	Specifications	Results
Dehydrated Medium	Cream to yellow colour, homogenous mixture, free flowing powder	Complies
Prepared Medium	Light yellowcolour, clear solution	Complies
pH at 25 □C	7.4 ± 0.2	7.41

Microorganism response:

Culture characteristics observed after inoculating 50-100 CFU, for incubation period of 18 - 48 hours at 35 – 37°C.

Microorganisms	ATCC	Inoculum (CFU)	Growth	Results
Escherichia coli	25922	82	Luxuriant	Complies
Staphylococcus aureus	25923	78	Luxuriant	Complies
Pseudomonas aeruginosa	27853	80	Luxuriant	Complies
Salmonella Typhi	6539	76	Luxuriant	Complies

Results:Satisfactory

Information on TSE/BSE risk

This is to certify that Titan Biotech Ltd had not done product specific validation for majority of their products. Titan Biotech Ltd provides all the data that allows the customers to evaluate and minimize risk when using the products in their respective processes. We declare the bovine raw material for products was collected from bovine of Indian origin only and were procured from the Government approved slaughter houses in India. The animal was screened for contagious diseases by the Government approved Veterinarian doctor before slaughter and was slaughtered if found to be free. Parts of bovine animals which are highly contagious such as skull/vertebra/other parts are not considered as raw material, only those tissues are taken which possess least risk such as skeleton muscles/body fluid – milk/other tissues with no detected infective are taken (WHO guideline). The material is washed with hot water and cleaned in order to restrict cross contamination. Till to date there is no case of TSE / BSE had been reported in India.

We certify the above product is having least or no risk of TSE / BSE.

Certified by: **Q.C. Incharge** **Q.A. Incharge**

Electronically Generated Certificate-Valid without signature.

SISCO RESEARCH LABORATORIES PVT. LTD.

www.srlchem.com

Certificate of Analysis

Product	**11456 - Bromocresol Green Sodium Salt (water soluble) ACS - [62625-32-5]**
Batch No	**9504249**
Analysis Date	30-Sep-2021
Date of Manufacture	September 2021
Expiry Date/Re-Test Date	September 2026
Molecular Formula	C21H13Br4NaO5S
Molecular Weight	720.00

Test Parameters	Standards	Actual Results
Appearance (Colour)	White to yellow to brown	Brown
Appearance (Form)	Powder	Powder
Clarity of solution	Passes test	Passes
Visual transition interval	pH 3.8 (yellow) to pH 5.4 (blue)	Passes

608-B, Satellite Gazebo, Andheri Ghatkopar Link Road,
Chakala, Andheri (E), Mumbai - 400 099. India. ☎ +91-22-4268 5800

This COA has been generated electronically and it is valid without signature.

HARDY DIAGNOSTICS

~ CERTIFICATE OF ANALYSIS ~

PREPARED MEDIA, TEST KITS, AND REAGENTS

Product Name:	OxiStrips™
Container Size:	25 strips/vial
Catalog No:	Z93
Lot No:	600913
Manufacture Date:	5/17/2023
Expiration Date:	5/16/2024
Certificate Date:	5/23/2023

This product lot is supplied by Hardy Diagnostics in accordance with its quality management system, which complies with the U.S. Food and Drug Administration's (FDA's) Quality Systems Regulation (QSR) and current Good Manufacturing Practices (cGMP) contained in Title 21 Part 820 of the Code of Federal Regulations (CFR). The company's manufacturing establishments are registered, and its medical devices are listed with the FDA. Hardy Diagnostics' quality management system is certified to ISO 13485 for medical devices.

Representative samples of this lot were tested and found to meet the specifications listed on this certificate and published on the Instructions for Use (IFU) for this product as located on the Hardy Diagnostics website, where applicable. In addition, this lot conforms to the quality control standards listed in the reference document, where indicated. End-users of commercially prepared culture media and reagents should perform QC testing in accordance with applicable government regulatory agencies and in compliance with accreditation requirements. Hardy Diagnostics recommends end-user to check for signs of contamination and deterioration and, if dictated by laboratory quality control procedures or regulation, perform QC testing to demonstrate a positive reaction and/or a negative reaction, if applicable.

Performance Testing

Test Organism	Strain Number	Results**
Pseudomonas aeruginosa	ATCC® 27853*	Oxidase-positive; blue/purple color develops within 10-20 seconds
Neisseria gonorrhoeae	ATCC® 19242*	Oxidase-positive; blue/purple color develops within 10-20 seconds
Escherichia coli	ATCC® 25922*	Oxidase-negative; no color develops

* ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108, USA

Acceptable growth and/or inhibitory specification with appropriate organisms as described in this document were verified at the time of release.

** Expected results when tested according to the package insert.

Physical Characteristics

Appearance: White reagent test strips with a plastic handle.

Microbial Load Testing

Acceptable microbial load (as described in the "Test for Microbial Load" section of the *Finished Product Quality Control*) was verified at the time of release. Please view the *Finished Product Quality Control* document for more information.

Ingredient Origin

All ingredients of animal origin in this lot have been sourced from Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)-free and Transmissible Spongiform Encephalopathy (TSE)-free countries as identified by the United States Department of Agriculture (USDA). This product complies with 9 CFR 94.18 *"Restrictions on importation of meat and edible products from ruminants due to bovine spongiform encephalopathy."*

Paul Richmond
QC Manager
Hardy Diagnostics

Anexo 15

Glosario de términos técnicos

- **2-Metilbutano:** Es un isopentano perteneciente a los tres isómeros del pentano, es un líquido muy volátil que se evapora rápidamente a temperaturas ambiente (Laboratorium Discounter, n.d.).
- **Acido Málico:** Es un compuesto químico orgánico que se forma como un subproducto de los procesos metabólicos de los azúcares (Portal de productos del grupo PCC, 2022).
- **Acido succínico:** Es el elemento primordial en la generación de una amplia variedad de compuestos orgánicos y de la fabricación de productos acabados dentro de la industria petroquímica (Salas, 2022).
- **Citocromos:** Es una proteína hemo-localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria donde cataliza la transferencia de electrones entre los complejos III y IV de la cadena de transporte de electrones (Raca, 2020).
- **Crioprotectora:** Son compuestos usados para prevenir las tensiones que ocurren entre las bicapas de lípidos formadas por dos distintas gotas emulsionadas durante los pasos de congelación y secado (Fuentes et al., 2018).
- **Endocarpio:** Capa interna de las tres que forman el pericarpio de los frutos, que puede ser de consistencia leñosa, como el hueso del melocotón (Rae.es., 2023).
- **Epicarpio:** Es la capa más externa del pericarpio, y consiste en lo que habitualmente llamamos la cáscara o piel del fruto (Acosta, 2020).
- **Estaquiosa:** Es un oligosacárido que está compuesta por dos unidades de D-galactosa, un D-glucosa y un D-fructosa pero es menos dulce que la sacarosa (Shaanxi Sciphar Natural Products Co., 2018).

- **Galactano:** Son los carbohidratos de almacenamiento de las leguminosas y las gomas de β-glucano se encuentran en el salvado de cebada, avena y centeno y en la pared celular de las gramíneas (Chiarle, 2021).
- **Heterofermentativas:** fermentan la glucosa exclusivamente a ácido láctico vía la glicólisis y las pentosas y compuestos relacionados por la vía de la fosfocetolasa (Sánchez, 2019).
- **Homofermentativas:** Fermentan la glucosa a ácido láctico exclusivamente a través de la vía de EMP, pero no pueden fermentar pentosas ni compuestos relacionados (Sánchez, 2019).
- **Lactato:** Es un compuesto orgánico referido también como ácido láctico en su forma ácida. Este compuesto es producido por medio de la fermentación láctica de carbohidratos y la glucólisis bajo condiciones anaeróbicas (Brooks, 2018).
- **Ácidos monocarboxílica:** Es una molécula orgánica que tiene átomos de hidrógeno y carbono, pero además contiene un carbono con doble enlace a un oxígeno. El carbono con doble enlace unido al oxígeno está enlazado con otro oxígeno que está enlazado con un hidrógeno (Rodrigo, 2020).
- **p-amino-N-dimetil-anilina:** es un compuesto orgánico que se caracteriza por tener un grupo amino (-NH2) en la posición para del anillo bencénico, y dos grupos metilo (-CH3) unidos al átomo de nitrógeno en la posición N y en la posición orto del anillo bencénico. Este compuesto se utiliza como un precursor importante en la fabricación de colorantes sintéticos y otros productos químicos (Xianyan et al., 2019).
- **Pentosano:** es un polisacárido que se encuentra naturalmente en diferentes fuentes, como la madera y algunos granos de cereal. Está formado por pentosas

que están conectadas por enlaces glucosídicos β(1-4). Debido a su capacidad para retener agua y formar geles, los pentosanos tienen aplicaciones útiles en la industria alimentaria y en otras áreas (Bancalari & Schalchli, 2019).

- **Peptidoglucano:** El Peptidoglucano es una sustancia esencial en la pared celular de las bacterias, que está compuesta por una red tridimensional de moléculas enlazadas de aminoazúcares y péptidos. Esta estructura polimérica es responsable de mantener la forma de la célula y protegerla contra fluctuaciones osmóticas (Parada, 2020).
- **Rabinosa:** Es un monosacárido perteneciente al grupo de las aldopentosas. Presente en varios carbohidratos y glicoproteínas y juega un papel importante en su estructura molecular (Parada, 2019).
- **Teobromina:** Es un compuesto que se encuentra de forma natural en el cacao y en otros productos derivados del cacao, como el chocolate. Es un alcaloide con propiedades estimulantes (Mollejo, 2022).
- **α-amilasa:** Es una enzima hidrolasa que descompone los enlaces alfa-1,4-glucosídicos de los carbohidratos complejos tal como el almidón y el glucógeno en monómeros de glucosa (Kumar, 2019).