



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS



CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*.

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Jonatan Alfonso Toscano Avila

Tutor: Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía

AMBATO – ECUADOR

Enero – 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Liliana Alexandra Cerda Mejía

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 10 de Diciembre de 2018



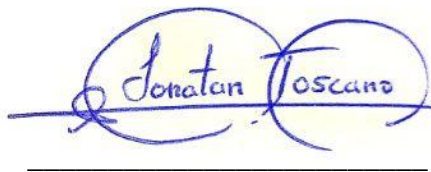
Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía Ph.D.

C.I. 180414808-6

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jonatan Alfonso Toscano Avila, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniería en Alimentos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.

A handwritten signature in blue ink that reads "Jonatan Toscano". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath it.

Jonatan Alfonso Toscano Avila

C.I. 131040288-6

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del tribunal



M.Sc. Paulo Santiago Baquero Icaza

C.I. 180323354-1



Lic. David Andrés Terán Mera Ph.D.

C.I. 171656972-6

Ambato, 20 de Diciembre de 2018

DERECHOS DEL AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de éste Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos de línea patrimoniales de mi proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink that reads "Jonatan Toscano". The signature is stylized with large loops and a horizontal line underneath.

Jonatan Alfonso Toscano Avila

C.I. 131040288-6

AUTOR

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a Dios, por bendecirme y guiarme cada día, dándome la suficiente fortaleza, sabiduría e inteligencia para poder alcanzar mis metas, logros y sueños.

A mis padres, Telmo y Margarita por su inmenso amor, apoyo y comprensión que me han ofrecido durante todos estos años de estudio, siendo el pilar fundamental en este tiempo de educación, qué enseñándome valores como el respeto, la puntualidad, la humildad y la sencillez he logrado ser la persona que soy ahora.

A mi hermano Jean Pool por haberme apoyado en todo momento, por la paciencia, consejos y voz de aliento que me ha impulsado a salir siempre adelante.

A mis abuelitos Marcos, Adela, Carlos y Zoila, que siempre me supieron enseñar el valor de reconocer el esfuerzo que han hecho mis padres cada día por darme el estudio y poder ser alguien en la vida.

A mi enamorada Carolina, por creer siempre en mí, por estar en los momentos difíciles, que de manera incondicional siempre me brindó todo su apoyo.

Jonatan Toscano Avila

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato y en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, que han permitido realizar mis estudios y ser un profesional.

A todos los docentes que formaron parte de mi educación académica, por impartir sus conocimientos y enseñanzas a lo largo de la carrera.

A Liliana Cerda, por la confianza depositada en mí, por la paciencia, tiempo y dedicación en el desarrollo del proyecto, por su asesoramiento y sus conocimientos compartidos. Siempre me sentiré orgulloso de haber trabajado con una persona como usted.

A David Terán, por sus valiosas enseñanzas, pensamientos y tiempo de dedicación al proyecto, por ser una persona abierta que me ha enseñado a ver de una manera diferente cómo funciona el mundo dentro de esta carrera.

A Paulo Baquero, por su dedicación y tiempo entregado en la revisión de mi trabajo de graduación.

A mis compañeros de clase, compañeros de laboratorio, quienes fueron mi compañía durante toda esta etapa universitaria.

Gracias a todos.

Jonatan Toscano Avila

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DEL AUTOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN	xvi

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes investigativos.....	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo General	4
1.2.2 Objetivos Específicos.....	4
1.3 Hipótesis.....	5
1.3.1 Hipótesis nula.....	5
1.3.2 Hipótesis alternativa.....	5
1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis.....	5
1.4.1 Variable Independiente	5
1.4.2 Variable dependiente.....	5

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales.....	6
2.1.1 Mora de castilla.....	6
2.1.2 Cepa bacteriana.....	6
2.2.3 Materiales.....	7
2.2 Métodos.....	7
2.2.1 Producción.....	7
2.2.2 Composición del medio H-S.....	7
2.2.3 Producción de celulosa bacteriana con cepas comerciales.....	8
2.2.4 Obtención de celulosa bacteriana en medio líquido.....	8
2.2.5 Obtención de cepa en medio sólido.....	8
2.2.6 Almacenado de la cepa.....	8
2.2.7 Lavado del film y aplicación del recubrimiento.....	8
2.2.8 Almacenado de la celulosa bacteriana.....	9
2.2.9 Aplicación.....	9
2.3 Análisis físico-químico y microbiológico.....	9
2.3.1 Determinación de acidez titulable (IDT).....	9
2.3.2 Determinación de sólidos solubles totales (°Brix).....	9
2.3.3 Índice de madurez.....	10
2.3.4 Pérdida de peso por ultracongelación.....	10
2.3.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	10
2.3.6 Análisis de vida útil.....	10
2.3.7 Azúcares reductores.....	11
2.4 Diseño experimental.....	12
2.5 Análisis Estadístico.....	12

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados.....	13
3.1.1 Determinación de acidez titulable (IDT).....	13
3.1.2 Determinación de sólidos solubles totales (°Brix).....	14
3.1.3 Índice de madurez.....	14

3.1.4 Pérdida de peso por ultracongelación	15
3.1.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	17
3.1.6 Análisis de vida útil.....	17
3.1.7 Azúcares reductores	19
3.2 Verificación de hipótesis.....	20

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones	21
4.2 Recomendaciones.....	22
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ANEXOS	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición del medio de cultivo.	7
Tabla 2: Factores y niveles del diseño experimental.	12
Tabla 3: Pérdida de peso por ultracongelación.	16
Tabla 4: Determinación de acidez titulable (IDT).	32
Tabla 5: Determinación de sólidos solubles totales (°Brix).....	32
Tabla 6: Índice de madurez.....	33
Tabla 7: Pérdida de peso por ultracongelación con recubrimiento.	34
Tabla 8: Pérdida de peso por ultracongelación sin recubrimiento.	35
Tabla 9: Vida de anaquel con y sin recubrimiento en agar PDA.....	36
Tabla 10: Vida de anaquel con y sin recubrimiento en agar nutriente.....	36
Tabla 11: Tabla de resultados del programa estadístico R Project for Statistical Computing.....	36
Tabla 12: Interacciones mediante el programa R Project for Statistical Computing.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Carta de color de mora de Castilla.	6
Figura 2: Morfología de la celulosa bacteriana.	17
Figura 3: Color de la mora con recubrimiento (izquierda) y de la muestra control sin recubrimiento (derecha) al día 18 de almacenamiento en ultracongelación.	18
Figura 4: Recolección de la fruta.	29
Figura 5: Producción de celulosa bacteriana.	29
Figura 6: Obtención y lavado del film de celulosa bacteriana.	29
Figura 7: Muestra con recubrimiento (izquierda), muestra sin recubrimiento (derecha).	30
Figura 8: Análisis microbiológico de mohos, levaduras, bacterias psicrótrofas y aerobios mesófilos.	30
Figura 9: Muestras con y sin recubrimiento en ultracongelación.	30
Figura 10: Curva de calibración para azúcares reductores.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Figuras de los materiales, producción de CB, análisis microbiológico y ultracongelación.	29
ANEXO B: Cálculo de unidades formadores de colonias	31
ANEXO C: Análisis físico-químico de la mora de castilla (<i>Rubus Glaucus Benth</i>) con la aplicación del recubrimiento y sin recubrimiento.	32
ANEXO D: Análisis de vida útil, Azúcares reductores.	36

RESUMEN

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es un cultivo andino con propiedades nutricionales y antioxidantes, cuya ingesta potencia el sistema inmunológico y reduce el riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas y cardiovasculares. Sin embargo, es una de las frutas más perecederas debido a su alta tasa de respiración y la carencia de cáscara que protege la calidad de la fruta, lo que la vuelve susceptible al ataque microbiano y rápido deterioro, que constituye un problema para su comercialización.

Esta investigación tuvo como objetivo estimar la vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*, aplicada en la calidad postcosecha de la mora de castilla, con la finalidad de mejorar las características tanto fisicoquímicas como nutricionales.

El tratamiento con recubrimiento de biofilm de celulosa bacteriana a temperatura de 4°C permitió aumentar la vida de anaquel de la fruta hasta 9 días, además de mantener su textura, color, olor y sabor característicos, es decir que el biofilm generado a partir de *Komagataeibacter xylinus*, puede ser utilizado como agente antimicrobiano, en recubrimientos comestibles para frutas, verduras, carnes, etc.

Palabras claves: Vida útil, mora de castilla, celulosa bacteriana, recubrimiento, biofilm.

ABSTRACT

The Blackberry (*Rubus glaucus* Benth) is an Andean crop with nutritional and antioxidant properties, whose intake potentiates the immune system and reduces the risk of developing degenerative and cardiovascular diseases. However, it is one of the most perishable fruits due to its high respiration rate and the lack of peel that protects the quality of the fruit, which makes it susceptible to microbial attack and rapid deterioration, which is a problem for commercialization.

The objective of this research was to estimate the useful life of Castile mulberry (*Rubus glaucus* Benth) from the coating of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter xylinus*, applied in the postharvest quality of the Mora de Castilla, with the purpose of improving both physicochemical characteristics as nutritional.

The treatment with biofilm coating of bacterial cellulose at a temperature of 4 °C allowed to increase the shelf life of the fruit up to 9 days, in addition to maintaining its characteristic texture, color, smell and taste, that is to say that the biofilm generated from *Komagataeibacter xylinus*, can be used as an antimicrobial agent, in edible coatings for fruits, vegetables, meats, etc.

Key words: Useful life, arrera de castilla, bacterial cellulose, coating, biofilm.

INTRODUCCIÓN

La mora es un alimento destinado para todo tipo de consumidor, que presenta un alto índice de deterioro perjudicando así el tiempo de anaquel, por tal razón el presente proyecto pretende estimar el tiempo de vida útil de mora de castilla mediante el recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*.

Además, es apreciada por la agroindustria y en el mercado de productos frescos **Garzón et al., (2009)**. Las características morfológicas de la mora y las malas condiciones pre y post cosecha, como la manipulación, transporte, envasado, provocan pérdidas de peso, cambios de color, disminución del contenido de compuestos bioactivos, ablandamiento y pudrición **(Bernal-Roa et al., 2011)**, por lo que la hacen susceptible al ataque microbiano y al rápido deterioro, los mismos que constituye un problema para la agroindustria.

La demanda exigente de frutas de buena calidad, así como la importancia de la ingesta de fruta en la prevención de enfermedades crónicas, fundamentan el estudio de tratamientos que presentan a las frutas en su forma natural, manteniendo sus cualidades físicas, nutritivas y sensoriales, además de minimizar pérdidas postcosecha y enfermedades transmitidas por alimentos.

La creciente demanda por alimentos frescos, de calidad y de vida útil extendida, ha fomentado la investigación y el desarrollo de recubrimientos comestibles **(Tharanathan, 2003)**.

Por estas razones la investigación se orienta a través de la tecnología de recubrimiento con celulosa bacteriana producida con *Komagataeibacter xylinus* en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), con la finalidad de que la fruta estudiada prolongue el tiempo de vida útil. Los recubrimientos comestibles son matrices continuas y delgadas elaboradas a partir de polisacáridos, lípidos o proteínas o una mezcla de éstos, que son aplicados sobre la superficie del producto **(Quintero et al., 2010)**. Deben tener propiedades mecánicas que garanticen adhesividad, no afecten al color y olor del alimento **(Figueroa et al., 2011)**.

El desarrollo de tecnologías postcosecha, mediante la aplicación de recubrimientos comestibles con base en polímeros y antimicrobianos naturales permite proteger al alimento y a la vez fortalecer la textura, mantener la apariencia general y controlar las pérdidas de peso durante el periodo de conservación y almacenamiento (**Méndez, 2008**). La combinación del recubrimiento con la temperatura de almacenamiento adecuada, es capaz de prolongar la vida útil postcosecha de las frutas y mantener su calidad sensorial y nutricional (**Almenar et al., 2010**).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) es una baya dura formada por pequeñas drupas de color rojo a negro brillante y de sabor agridulce con propiedades nutricionales (NTE INEN 2427, 2010). Es considerada un fruto no climatérico, frágil a la manipulación y al ataque de hongos. Los principales efectos de un deficiente almacenamiento son la pérdida de peso, pérdida de textura, cambios en el color, el sabor y el aroma, los cuales están acompañados por pudrición debido principalmente a bacterias como *Erwinia*, *Pseudomonas* y a mohos como *Penicillium*, *Botrytis*, *Aspergillus* y *Fusarium*, que pueden provocar importantes pérdidas en la postcosecha (Ramírez et al., 2013).

Por lo tanto la mora de Castilla es un cultivo perecedero por su estructura frágil y alta susceptibilidad al daño mecánico debido a la manipulación postcosecha, por lo que el rápido deterioro en la fruta dificulta su comercialización y genera pérdidas económicas al agricultor (Freire Salazar, 2012). Por tal razón, en los últimos años las industrias procesadoras se han visto en la necesidad de extender el tiempo de vida útil de este tipo de fruta. En Tungurahua, provincia que genera alrededor del 41% de la producción total de la fruta, las pérdidas post cosecha ascienden a 200 Tm, lo que representa 62 hectáreas de terreno de siembra perdidas (INEC, 2000).

Debido a esta gran problemática, una solución al problema es la aplicación de un recubrimiento a base de un polímero comestible biodegradable (celulosa bacteriana) que no afecte o pueda comprometer el estado del alimento. Entre los métodos de conservación postcosecha están los recubrimientos y coberturas comestibles que se utilizan en las frutas y hortalizas con el fin de extender su vida útil y mantener su calidad, para así evitar pérdidas postcosecha (Oliveira et al., 2013).

A continuación se presentan algunos estudios que abarcan diferentes métodos de recubrimiento de frutas y desinfección con radiación ultravioleta de onda corta:

- **Albán, Ramos, & Nuñez (2010)** observaron un estudio de la vida útil de fresas (*Fragaria vesca*) mediante tratamiento con luz ultravioleta de onda corta UV-C, que los tratamientos con radiación UV-C provocan un mejoramiento en la calidad de la fresa, en consecuencia se lo puede utilizar como alternativa para prolongar el tiempo de vida útil de las mismas e influyen directamente sobre los parámetros de calidad e inocuidad. Además las propiedades físico-químicas de las fresas no son influenciadas por los tratamientos con radiación UV-C; el utilizar la radiación UV-C como medio de destrucción de microorganismos en fresas (*Fragaria vesca*) contribuye en la reducción de la carga microbiana, existiendo una relación directa entre el tiempo de exposición, distancia de las lámparas UV-C en contacto con las fresas y la letalidad de los microorganismos, por tanto, se determinó que el mejor tratamiento es a una distancia de 40 cm por un tiempo de 7,5 min de exposición a la radiación VC-C y el tiempo de vida útil del mismo es de 10 días.

- **Castro & González (2010)** en la evaluación físico-química de la efectividad de un recubrimiento comestible en la conservación de uchuva (*Physalis peruviana L. var. Colombia*), consideran que la utilización de los recubrimientos comestibles como una alternativa de conservación para aumentar el tiempo de vida útil de diferentes tratamientos, especialmente de frutas y hortalizas, se deben considerar técnicas como la inmersión y el pintado de un recubrimiento comestible de gelatina, aceite de orégano, fibra prebiótica, los resultados que obtuvieron fueron la reducción de la actividad metabólica en los frutos recubiertos en 36% menos con respecto a los frutos control, las pérdidas de peso disminuye el 17.67%, aumento de la vida útil en un promedio del 33% e incremento de la fibra prebiótica al 8%.

- **Trejo-Marquez et al., (2007)** estudiaron el efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de gelatina sobre la calidad de fresa almacenada en refrigeración; en esta investigación se utilizó un recubrimiento comestible a base de gelatina, tween 60, glicerol y ácido acético; observaron una reducción significativa en la respiración por efecto de los tratamientos y una inhibición del crecimiento de hongos por el recubrimiento comestible en las fresas tratadas. Por lo tanto, se prolongó su vida útil hasta el décimo día. Es decir, la aplicación del recubrimiento comestible sirvió de barrera protectora a la transferencia de gases y migración humedad, evitando la pérdida de firmeza en 70%, mejorando así la calidad durante su vida en postcosecha.

- **Alvarado et al., (2007)** en un estudio realizado sobre "Tiempos de vida útil de naranjillas recubiertas con quitosano almacenadas a temperaturas constantes y variables", concluyó que las películas de quitosano retardan la pérdida de humedad y extienden el período de almacenamiento a temperaturas de 20°C o superiores, a temperaturas bajas el efecto es mínimo, a 7°C se pueden conservar las frutas durante un mes.

Dentro de las bacterias del ácido acético (BAA), se ha informado que diferentes géneros son productores de celulosa, tales como *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* y *Komagataeibacter* (**Gullo et al., 2012**). *Komagataeibacter xylinus* es considerado un modelo de producción microbiano debido a su capacidad de utilizar azúcares como fuente de carbono para la producción de celulosa bacteriana (CB) producida a través de cultivos líquidos en estado estático. Por ello es importante determinar de qué manera se realizará la experimentación, debido a que el sistema de cultivo para la obtención de CB influye en el rendimiento y características físicas del film obtenido.

Aunque los sistemas agitados o aireados pueden proporcionar mayor producción de CB, muestran algunas desventajas con respecto al sistema estático, ya que existen mayores probabilidades de que se presente la deformación o irregularidad del film terminado, ya que **Krystynowicz et al., (2002)** mencionan que los sistemas agitados y forzados muestran varias desventajas, incluida la alta frecuencia de mutantes celulares y la formación de partículas de celulosa similares a esferas, una forma irregular de CB en suspensión fibrosa, esferas, gránulos o masa irregular.

Por estas razones la investigación se orienta a través de la tecnología de recubrimiento con celulosa bacteriana producida en un sistema estático con *Komagataeibacter xylinus* en mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), con la finalidad de que la fruta estudiada prolongue el tiempo de vida útil. Los recubrimientos comestibles son matrices continuas y delgadas elaboradas a partir de polisacáridos, lípidos o proteínas o una mezcla de éstos, que son aplicados sobre la superficie del producto (Quintero Juan et al., 2010). Deben tener propiedades mecánicas que garanticen adhesividad, no afecten al color y olor del alimento (**Figuroa et al., 2011**).

La síntesis de celulosa bacteriana es un proceso dependiente de la energía (**Ross et al., 1991**), y por lo tanto, en un medio que tiene solo glucosa como fuente de energía, la oxidación de glucosa a gluconato prevalece sobre la síntesis de celulosa bacteriana.

Varias especies de bacterias pueden producir CB, incluidos los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* y el grupo de bacterias ácido acéticas (BAA) (**Chawla Prashant et al., 2009**). Dentro de BAA, la CB es producida por especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter*. Las cepas que se reconocen como los productores más importantes pertenecen a la especie *Komagataeibacter xylinus* que se considera el organismo modelo en los estudios de la síntesis de CB (**Benziman et al., 1980**). La formación de CB por *Komagataeibacter xylinus* se reporta para varios nichos que contienen azúcares y etanol, como frutas, vinagres, nata de coco y té de Kombucha, donde se desarrollan en la superficie de líquidos en fermentación y quedan atrapados en la matriz de exopolisacáridos (**Sievers et al., 1995**).

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Estimar la vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener celulosa bacteriana a partir de *Komagataeibacter xylinus*.
- Identificar la estructura de la celulosa bacteriana mediante microscopia electrónica de barrido.
- Determinar el efecto del recubrimiento en la vida de anaquel de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula

Ho: El recubrimiento comestible a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* no tiene efecto significativo en la estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.3.2 Hipótesis alternativa

Ha: El recubrimiento comestible a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* tiene efecto significativo en la estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.4 Señalamiento de variables de la hipótesis

1.4.1 Variable Independiente

Recubrimiento comestible de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*.

1.4.2 Variable dependiente

Calidad Microbiológica de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Mora de castilla

Se cosecharon 5 kilos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), provenientes de un cultivo ubicado en el sector Alobamba Km 10 vía a Riobamba, cantón Ambato, provincia de Tungurahua. Una vez cosechadas en horas de la mañana, fueron transportadas inmediatamente a los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato, mismos donde se llevó a cabo los correspondientes análisis.

Previo al análisis de las moras, la fruta fue clasificada para eliminar moras que se encontraban en mal estado. La fruta se cosechó en estado de madurez tipo 4, es decir fruto de color rojo oscuro (Figura 1), de acuerdo a la norma (NTE INEN 2427, 2010).

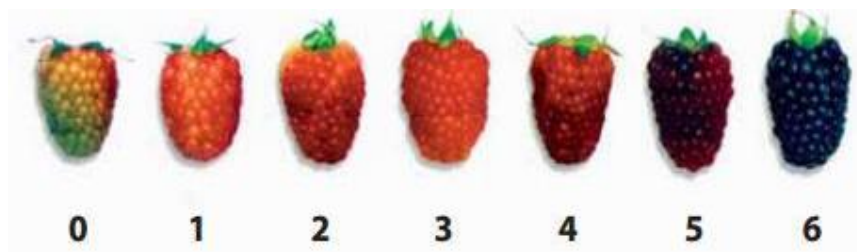


Figura 1: Carta de color de mora de Castilla. (NTE INEN 2427, 2010).

2.1.2 Cepa bacteriana

Se realizó el análisis del grupo de bacterias ácido acéticas (BAA) comerciales y productoras de CB, de la cual se seleccionó la cepa *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, la cual es una cepa comercial que fue adquirida de la colección DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

2.2.3 Materiales

- Glucosa
- Peptona
- Extracto de levadura
- Fosfato disódico
- Ácido cítrico
- Agua destilada
- Agua de peptona
- Hidróxido de sodio 0,01 %
- Fenolftaleína
- Ácido acético 0,01 %
- Agar PDA
- Agar Nutritivo
- Glicerol 100%
- Hidróxido de sodio 0,1 N

2.2 Métodos

2.2.1 Producción

La investigación está enfocada en la producción de celulosa bacteriana mediante *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, orientando su uso como recubrimiento de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) y su efecto en la vida útil, con la finalidad de mejorar las propiedades microbiológicas para la satisfacción del consumidor.

2.2.2 Composición del medio H-S

Para la obtención de celulosa se aplica la metodología descrita por (Hestrin & Schramm, 1954); en la que se describe un medio estándar para producción de celulosa bacteriana. La composición del medio de cultivo se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo.

Medio de cultivo	Componentes	g / L	pH
H-S	Glucosa	20	6
	Peptona	5	
	Extracto de levadura	5	
	Fosfato disódico	2,7	
	Ácido cítrico	1,15	

Fuente: (Hestrin & Schramm, 1954).

2.2.3 Producción de celulosa bacteriana con cepas comerciales

Para la producción de celulosa bacteriana (CB) tanto en medio de cultivo líquido, como cultivo sólido se utilizó la cepa de colección, *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756 (Gullo et al., 2017).

2.2.4 Obtención de celulosa bacteriana en medio líquido

La producción de la membrana de celulosa bacteriana se realizó a temperatura de 30° C y 15 días de incubación, estas condiciones han sido reportada dentro del rango óptimo de crecimiento y producción en forma de película en la superficie (Römling & Galperin, 2015). La incubación de los cultivos será de forma estática para la formación de CB en capas superpuestas (Gullo et al., 2018).

2.2.5 Obtención de cepa en medio sólido

La obtención de la cepa *Komagataeibacter xylinus* se realizó en medio H-S sólido en condiciones aerobias; la temperatura de crecimiento es de 30° C por un tiempo de incubación de 48 horas.

2.2.6 Almacenado de la cepa

Una vez obtenida la cepa bacteriana *Komagataeibacter xylinus*, se suspendió en medio H-S líquido en un tubo cónico para centrífuga (Falcon TM), se homogeniza durante 30 segundos en un agitador vórtex (Labnet, USA), posteriormente se toma un mililitro de la solución y se trasvasa a un tubo de microcentrífuga (Eppendorf) con 15 microlitros de glicerol que actuará como anticongelante, finalmente se almacenan las muestras a -80°C dentro del ultracongelador (Binder, Germany).

2.2.7 Lavado del film y aplicación del recubrimiento

El recubrimiento con celulosa bacteriana se elaboró según el método desarrollado por (Hestrin & Schramm, 1954), una vez obtenida la celulosa bacteriana (film), se realizó un lavado con agua destilada, además se blanquea con hidróxido de sodio 0,01 % por 15 minutos, con la finalidad de eliminar las bacterias y eliminar el color del medio del film.

Después se realizó nuevamente un lavado con agua destilada hasta que no queden restos de hidróxido de sodio mediante titulación con fenolftaleína, finalmente un último lavado con agua destilada previo al almacenado de la celulosa.

2.2.8 Almacenado de la celulosa bacteriana

Se almacena los films en refrigeración en una solución de ácido acético 0,01 %. La finalidad de aquello es que la CB se encuentre estable en la solución ácida.

2.2.9 Aplicación

Una vez obtenido el film, se le aplica un secado en estufa con la finalidad de que la humedad del film no afecte los resultados finales de las muestras. Las moras se recubren con la celulosa, de manera que la muestra quede completamente cubiertas por el film de celulosa bacteriana.

2.3 Análisis físico-químico y microbiológico

2.3.1 Determinación de acidez titulable (IDT)

Se determinó la acidez por medio de una titulación ácido-base con una solución de álcali estandarizado, expresando los resultados de la acidez titulable como el equivalente en masa de ácido cítrico. La determinación de la acidez titulable se la realizó con una solución volumétrica patrón de hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador. Según **Sandoval (2009)** el valor de factor de corrección para ácido cítrico es de 0,064.

Se pesó 5 gramos de muestra de mora con recubrimiento y sin recubrimiento en una balanza analítica (Mettler Toledo, USA), se trasvaso la muestra al vaso valorador del titulador automático (Mettler Toledo, USA) completando la solución hasta los 50 mililitros con agua destilada, se homogenizó la muestra obteniendo una curva de neutralización a un pH de 8,13; valor experimental en el que se titula la fenolftaleína, finalmente se registró el volumen de NaOH consumidos en el ensayo.

$$\text{Acidez} = \text{Volumen de NaOH} * \text{Factor de corrección}$$

2.3.2 Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

El índice de refracción se lo midió a temperatura ambiente, usando un refractómetro (Atago, Japón). Se trituró la muestra de mora con recubrimiento, posteriormente se anotó el resultado de la muestra en °Brix después de 18 días en ultracongelación.

2.3.3 Índice de madurez

Se obtiene de la relación entre el valor mínimo de los sólidos solubles totales (°Brix) y el valor máximo de la acidez titulable, Se expresa como °Brix / % ácido cítrico. (NTE INEN 2427, 2010)

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\text{SST (°Brix)}}{\text{Acidez Titulable}}$$

2.3.4 Pérdida de peso por ultracongelación

Para la pérdida de peso por ultracongelación las muestras de mora se colocaron en un recipiente sin tapa dentro del ultracongelador (Binder, Germany), se trabajó con 18 muestras de mora con recubrimiento y sin recubrimiento a $-80^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 18 días, en la que se registró el peso de la matriz alimenticia diariamente con el fin de determinar la variación de peso.

2.3.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La CB obtenida por la cepa seleccionada se caracterizó para determinar sus características microestructurales. Para el análisis de la morfología de la celulosa bacteriana, se evaluaron pequeños trozos de CB con un microscopio electrónico de barrido (TESCAN, 2014). Las muestras se recubrieron con pequeñas partículas de oro con el fin de obtener una superficie conductora y poder observar la estructura física de la celulosa bacteriana.

2.3.6 Análisis de vida útil

Para el análisis de vida útil se desarrollaron dos metodologías, la primera por ultracongelación por medio de la pérdida de peso y la segunda por recuento de mohos, levaduras, bacterias Psicrótrofas y aerobios mesófilos.

Para el análisis por ultracongelación se basó la experimentación en la pérdida de peso por porcentajes para los dos tratamientos, debido a que a una temperatura de -80°C , no va existir crecimiento de ningún tipo de microorganismo.

Además se determinó el tiempo de vida útil de la mora de Castilla, se realizaron conteos de crecimiento de mohos y levaduras según la norma ecuatoriana (**NTE INEN 1529-10, 2013**) y conteo de crecimiento de bacterias Psicrótrofas (**ICMSF, 1982**) y aerobios mesófilos según la norma (**NTE INEN 1529-5, 2006**), a diferentes temperaturas: $4^{\circ}\text{C} \pm 2$; $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Para el análisis, se trabajó en una cámara de flujo laminar (Optimar, Singapur) se colocó 1 g de muestra y 9 mL de agua de peptona en tubos de ensayo, donde para todos los casos, cada dilución se sembró por duplicado realizándose diluciones decimales 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

Para mohos y levaduras la siembra fue en superficie y las placas se incubaron durante 24 horas a 25°C . Las placas para aerobios mesófilos se sembraron en profundidad y fueron incubadas durante 24 horas a 37°C .

2.3.7 Azúcares reductores

Para la cuantificación de azúcares reductores se aplica el método de **Miller (1959)**, los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. La concentración de los azúcares reductores totales liberados en la muestra se determina haciendo la curva patrón del azúcar utilizado, graficando la absorbancia en función de la concentración. Para la aplicación del método DNS de Miller se necesita preparar el reactivo DNS, disolviendo 0,8 g de NaOH en agua destilada, luego se adicionan 15 g de tartrato de sodio y potasio tetra hidratado y 0,5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).

Esta mezcla se afora a 50 mL con agua destilada y se almacena en un frasco ámbar a 4°C . La concentración de azúcares reductores se determina utilizando una curva de calibración absorbancia en función de la concentración. Para obtener esta curva se prepararon soluciones de 0-100 mg / mL utilizando glucosa como estándar. A estas soluciones se agregó DNS y se leyó la absorbancia a 540 nm de cada una de ellas en un espectrofotómetro (ThermoFisher, USA). (**Ramona et al., 2012**).

2.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño AxB con 6 tratamientos (ver tabla 2). Se realizó dos cosechas de mora en diferentes tiempos, los análisis se realizaron en los días 1, 3, 5 y 8 por duplicado.

Tabla 2: Factores y niveles del diseño experimental.

Factores	Niveles
A: Tipo de tratamiento	a0: Con Recubrimiento
	a1: Sin Recubrimiento
B: Temperatura (°C)	b0: 4
	b1: 25
	b2: 37

2.5 Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa R Project for Statistical Computing.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

La mora fue cosechada en estado de madurez tipo 4, es decir un fruto de color rojo oscuro para los correspondientes análisis experimentales. Los parámetros fisicoquímicos como acidez titulable, sólidos solubles, índice de madurez, pérdida de peso por ultracongelación, fueron evaluados al primer y último día de análisis, con el fin de determinar el efecto del film de recubrimiento en los dos tratamientos durante 18 días (Anexo C).

Los resultados de la estructura de la celulosa bacteriana por microscopía electrónica de barrido (SEM), vida útil y azúcares reductores se reportan en tablas del anexo D.

3.1.1 Determinación de acidez titulable (IDT)

La acidez se expresa en porcentaje de ácido cítrico por 100 gramos de material vegetal fresco. Se realizó el análisis cada 5 días, este parámetro fue disminuyendo a lo largo del tiempo; la acidez inicial de la mora se encontró en 2,34 % de ácido cítrico, mientras que en el día 18, la mora recubierta con el film disminuyó el porcentaje de acidez hasta un valor promedio de 1,6850 %, la muestra sin recubrimiento tuvo un valor promedio de 1,8278 % de ácido cítrico. Se puede visualizar (ver tabla 4) que la mora con recubrimiento se encuentra dentro del rango máximo de consumo 1,8 según la norma (NTE INEN 2427, 2010), a diferencia de la mora sin recubrimiento que su valor sale del rango de aceptación. Según **Wills & Burgos González (1998)** la disminución de acidez podría deberse a un efecto de la concentración, producto de la pérdida de agua de la fruta durante su almacenamiento, es decir que a temperaturas de congelación la acidez tiende a degradarse.

Además **Soares et al, (2014)** trabajaron en la validación de un método para la determinación de cuatro ácidos en pulpa congelada, donde demuestran que existe la pérdida de ácido cítrico en los primeros días de almacenamiento, especialmente en frutas demasiado ácidas como la piña, ya que estas tienden a perder mayormente su contenido de ácido cítrico en los primeros días de almacenamiento.

3.1.2 Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

Para medir los grados °Brix de la mora congelada a $-80^{\circ}\text{C} \pm 2$ a los 18 días, se procedió con un proceso de descongelación progresiva, se mezcló el producto con el líquido formado durante el proceso de descongelación y se procedió a medir la cantidad de sólidos solubles de la pulpa, obteniendo un valor promedio de 10,4 en la muestra con recubrimiento y 9,88 para muestra sin recubrimiento, es decir que el tratamiento con recubrimiento tiene la mayor capacidad de retención de azúcares (SST) contenidos en la fruta, siendo este un factor importante para su correspondiente expendio en el mercado.

Según la norma **NTE INEN 2427 (2010)**, los sólidos solubles totales de mora de castilla debe tener mínimo 9,0 °Brix, la diferencia de contenido de SST se debe a que la muestra al estar en ultracongelación, en lugar de que la mora continúe su proceso de respiración y degradación de azúcares, estos se concentran, motivo por el cual se obtuvo mayor cantidad de °Brix en el tratamiento con recubrimiento en comparación a la muestra sin recubrimiento.

3.1.3 Índice de madurez

El índice de madurez es la relación entre el valor mínimo de los sólidos solubles totales y el valor máximo de la acidez titulable, expresado en °Brix / % ácido cítrico. En el anexo C, se presenta los resultados de los análisis de índice de madurez después de 18 días, donde se pudo determinar que el índice de madurez con recubrimiento es de 6,1721 mientras que sin recubrimiento es de 5,4054. Acorde a la norma **NTE INEN 2427 (2010)** el índice de madurez obtenido se encuentra dentro del límite del nivel de madurez 5 (valor mínimo), es decir que la muestra con recubrimiento después de 18 días presentó un índice de madurez con un valor de aceptación superior a la muestra sin recubrimiento.

Estos parámetros muestran resultados aceptables para su correspondiente proceso, razón por la cual se incrementa la vida útil de la mora de Castilla, y disminuyendo la carga microbiana manteniendo las propiedades sensoriales como el color.

3.1.4 Pérdida de peso por ultracongelación

La ultracongelación es el proceso mediante el cual los alimentos son congelados en el menor tiempo posible (**García et al., 2017**). Los ultracongeladores permiten el almacenamiento prolongado de muestras a temperaturas criogénicas, sin que exista una pérdida de agua, debido a que generan una estructura cristalina en el alimento. **Buelvas et al., (2015)** mencionan que ultracongelación genera estructuras micro cristalinas en el tejido celular de los alimentos, lo cual garantiza una descongelación sin cambios en el volumen y con pérdidas de agua reducidas.

En la Tabla 3 se muestra la pérdida de peso por ultracongelación, en la que se detallan los pesos de varias muestras de mora con y sin recubrimiento durante 18 días; donde se observa que existe una mayor pérdida de peso en el tratamiento con recubrimiento, aquello pudo deberse a que el film actuó como protector de la muestra, impidiendo la formación de micro cristales (fenómeno de nucleación) que son los que ayudarían a que la muestra tengan una mínima variación de peso. Debido a este fenómeno, al sacar la muestra del ultracongelador, ésta no ganó humedad del ambiente al momento de pesarla, conllevando a que como resultado se tenga un peso menor al inicial, teniendo un promedio de pérdida de peso de 2,05 % después de los 18 días de almacenamiento en ultracongelación.

Mientras que para las muestras sin recubrimiento existe una menor pérdida de peso debido a que existe el fenómeno de cambio de volumen en la ultracongelación, ya que al sacar la muestra del ultracongelador, esta no tiene film de recubrimiento que proteja a la mora, conllevando a la formación de la estructura tridimensional de los puentes de hidrógeno y por lo tanto la matriz sea más hidrofílica tendiendo a ganar humedad, en la que finalmente se tuvo un promedio de pérdida de peso de 0,59 % después de los 18 días de ultracongelación. Según **Martín (2015)** menciona que paralelamente, al convertirse el agua en hielo, se incrementa de manera gradual la concentración de elementos disueltos en el agua restante, haciendo que la muestra indirectamente gane peso mientras se encuentra en el proceso de ultracongelación, proceso físico que se forma debido a que la mora se encuentra sin ningún tipo de recubrimiento que la proteja de este fenómeno.

Tabla 3: Pérdida de peso por ultracongelación.

Día	Mora con recubrimiento	Mora sin recubrimiento
	% Pérdida de peso	%Pérdida de peso
1	0,0000	0,0000
2	2,6661	0,9802
3	2,2895	0,7938
4	2,2604	0,7736
5	1,8119	0,9731
6	2,3832	0,4706
7	2,3756	0,4602
8	2,9974	1,7416
9	1,8399	0,4696
10	1,9658	0,3445
11	2,1653	0,8321
12	2,0500	0,1736
13	2,4074	0,4748
14	1,4340	0,7785
15	1,9938	0,2333
16	2,0811	0,5803
17	1,3747	0,3231
18	2,9243	0,2693

Si bien, se obtuvo un efecto adverso en el tratamiento con recubrimiento debido a una mayor pérdida de peso, es importante recalcar que en cuanto a las propiedades organolépticas se tienen mejores resultados en esta muestra, ya que el color se mantuvo estable, a diferencia de la muestra sin recubrimiento en la que donde se vislumbró una pérdida de color después de 18 días de ultracongelación; fenómeno que se atribuye a que la fruta comenzó a sufrir un desorden fisiológico en su cambio de color sobre el área de las drupillas.

El film actuó como una barrera de protección para las propiedades organolépticas en la fruta en el transcurso del almacenamiento, siendo esta una alternativa para que se pueda exportar la fruta utilizando esta metodología como referencia.

3.1.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Según **Ibáñez (2004)** el microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM) es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.

La imagen morfológica de la celulosa bacteriana (ver figura 2), muestra microfibrillas de celulosa, mismas que presentan una única estructura compuesta de fibras ultrafinas que forman una red. Además tiene la característica de ser ultrapura y cristalina a diferencia de la celulosa de la planta que contiene lignina y hemicelulosa. Según **Klemm et al., (2001)** mencionan que las características de color y textura del biofilm provenientes del medio de cultivo desaparecen con el tratamiento con NaOH, ya que se eliminan los residuos celulares y del medio, generando la cristalinidad en el biofilm. En términos generales, **Semjonovs et al., (2017)** analizaron un fragmento de CB demostrando que no aparecen picos anómalos en el espectro FT-IR, lo que demuestra que la celulosa bacteriana es cristalina y pura.

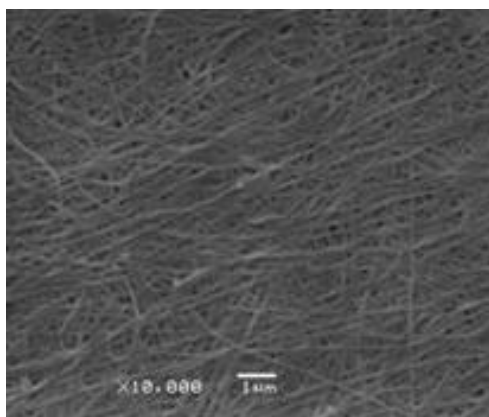


Figura 2: Morfología de la celulosa bacteriana.

Fotografía tomada en el equipo TESCAN, Universidad Técnica de Ambato.

3.1.6 Análisis de vida útil

Según **Bello Gutiérrez (2000)** la vida útil de un alimento es el período de tiempo durante el cual es apto para el consumo de un producto alimenticio elaborado y de la misma forma, el tiempo que tarda la calidad de un alimento en alcanzar niveles considerados inaceptables para su consumo.

Debido a los resultados obtenidos con el uso de este recubrimiento, se determinó que el mejor tratamiento fue la mora con recubrimiento de celulosa bacteriana, ya que mantuvo sus propiedades sensoriales como color, a diferencia de la mora sin recubrimiento, la cual comenzó a sufrir una pérdida de color después de los 18 días de almacenamiento (ver figura 3).

Según **Mcguire (1992)** el color es un criterio de calidad que el consumidor considera cuando desea elegir un producto para su consumo; además es una cualidad importante cuando se determina la eficacia de un tratamiento postcosecha en frutas; siendo este un factor importante al momento de su comercialización.



Figura 3: Color de la mora con recubrimiento (izquierda) y de la muestra control sin recubrimiento (derecha) al día 18 de almacenamiento en ultracongelación.

Además se realizó el análisis a temperaturas de $4^{\circ}\text{C} \pm 2$; $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$, donde se determinó que el mejor tratamiento fue a 4°C con recubrimiento, ya que se consiguió un tiempo de vida útil de 9 días, a partir de este tiempo la mora comenzó a sufrir desordenes fisiológicos tales como deshidratación, arrugamiento y envejecimiento, mientras que sin recubrimiento se consiguió un tiempo de vida útil de 6 días, determinando que este es el tiempo máximo de vida de anaquel que puede tener la mora a estas condiciones de almacenamiento.

Por el contrario, a temperaturas de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$, las moras con recubrimiento presentaron factores de deterioro alrededor del quinto y cuarto día respectivamente, mientras que las moras sin recubrimiento presentaron factores de deterioro alrededor

del tercer y segundo día respectivamente, llegando al día 9 con síntomas de deshidratación, pérdida de color, textura muy suave, daños en su corteza y presencia de moho alrededor de la misma, lo que sensorialmente hace que la fruta sea inaceptable para el consumo humano.

Mediante el programa R Project for Statistical Computing se determinó que no existe diferencia significativa en el análisis con agar PDA debido a que la cantidad obtenida de colonias es baja con relación al crecimiento de hongos y levaduras.

Mientras que en el análisis con agar nutriente a temperaturas de 4°C y 37°C no se evidenció diferencia debido a que se encuentran en estado de latencia y acelerado respectivamente, por lo que los resultados muestran que no existe gran diferencia entre los dos tratamientos, mientras que a 25°C se obtuvo una diferencia significativa, es decir que a esta temperatura la CB está siendo efectiva en la conservación de la fruta.

3.1.7 Azúcares reductores

El consumo de los azúcares reductores fue determinado mediante el método con DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico), donde se observó un descenso progresivo en el contenido de glucosa en el medio de cultivo, que se encuentra relacionado con el crecimiento microbiano. El medio H-S es un medio de cultivo rico en glucosa ya que inicia con una concentración inicial de 20 g / L, al determinar el contenido de azúcares reductores se comprobó que el medio tuvo 21,46 mg / mL de concentración de glucosa, en el transcurso de 11 días el microorganismo consumió 21,34 mg / mL, es decir se consumió 99,44 % del total de glucosa.

Por otro lado se comprobó que la CB necesita una mayor concentración de mg/ml de glucosa en los cinco primeros días de crecimiento, ya que en este tiempo existió un consumo de 10,08 mg / mL de glucosa, es decir aproximadamente la mitad del contenido total de fuente de carbono en el experimento.

Hestrin & Schramm (1954) mencionan que el crecimiento óptimo de celulosa bacteriana es de 15 días, sin embargo con el estudio realizado se comprobó que el crecimiento óptimo de biofilm fue durante los diez días de crecimiento, debido a que en este tiempo se consume la mayor parte de fuente de carbono, quedando en el medio de cultivo el resto de componentes del medio H-S estándar.

3.2 Verificación de hipótesis

Mediante el respectivo análisis de datos ANOVA de cada ensayo, considerando un nivel de confianza de 95%, se rechaza la hipótesis nula, ya que después de realizar todos los estudios correspondiente con respecto al mejor tratamiento, se acepta la hipótesis alternativa, debido a que en lo experimentos realizados se muestra que el recubrimiento comestible a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* tiene efecto significativo en la estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en el tratamiento a temperatura ambiente.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se estimó que el tiempo de vida útil de mora de Castilla a través del recubrimiento de celulosa bacteriana fue de hasta 9 días a 4°C.
- Se determinó que el recubrimiento de celulosa brindó un efecto beneficioso en la inhibición de microorganismos durante la conservación postcosecha de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), siendo este capaz de proveer tanto protección física como biológica a la fruta.
- La calidad sensorial de la fruta no se vio afectada por la aplicación de este recubrimiento, ya que las moras con recubrimiento tuvieron menor pérdida de color, en comparación a las moras sin recubrimiento, lo que influye de manera positiva en la apariencia de la fruta contribuyendo a un mejor expendió en un tiempo mayor de vida de anaquel mientras dure su comercialización en una eventual exportación del producto.
- Las propiedades fisicoquímicas como acidez titulable, sólidos solubles totales, índice de madurez y pérdida de peso se mantuvieron estables durante el tiempo de almacenamiento en ultracongelación durante los 18 días, obteniendo valores aceptables dentro de las normas establecidas para su correspondiente aceptación en el mercado.
- Se determinó que la celulosa bacteriana posee una estructura única compuesta de fibras ultrafinas que forman una red con que le confieren características como ultrapureza y cristalinidad en comparación a la celulosa de origen vegetal.

4.2 Recomendaciones

- Una vez obtenido el film de celulosa bacteriana es importante que esté bien lavado y seco, con el fin de evitar que este contenga en su estructura adheridas pequeñas partículas de bacterias de *Komagataeibacter xylinus*, que puedan afectar en el conteo de microorganismos.
- Las muestras de moras ultracongeladas se deben guardar en recipientes individuales y bien cerrados previamente pesados, para evitar que las muestras ganen humedad del ambiente.
- La celulosa bacteriana es un nuevo estudio que no se ha aplicado a alimentos en los últimos años, por ello se recomienda el estudio y análisis de esta metodología aplicada a diferentes frutas, vegetales y carnes con la finalidad de tener diferentes ejemplares en diferentes matrices que ayuden a erradicar el uso de contenedores y plásticos como fuentes de transporte para este tipo de productos.
- Se recomienda realizar más pruebas y análisis de esta metodología con el fin de mejorar la celulosa bacteriana, con la finalidad de tener un ejemplar que reemplace el plástico en el mercado.
- Mediante la utilización de nuevas metodologías como la agitación, un sistema controlado o un sistema activo como un biorreactor se puede realizar pruebas con la finalidad de obtener una mayor producción de celulosa bacteriana en un menor tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albán, Á. B., Ramos, M., & Nuñez, M. A. (2010). *Revista tecnológica. Revista Tecnológica - ESPOL* (Vol. 23). Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL).
- Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., & Harte, J. (2010). Consumer acceptance of fresh. *Journal of the Science of Food And*, 1121–1128.
- Alvarado, J. de D., Alba, A., & Mirari, A. (2007). Tiempos de vida útil de naranjillas recubiertas con quitosano almacenadas a temperaturas constante y variables. *CIBIA VI*.
- Bello Gutiérrez, J. (2000). *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*.
- Benziman, M., Haigler, C. H., Brown, R. M., White, A. R., & Cooper, K. M. (1980). Cellulose biogenesis: Polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6678–82. <https://doi.org/10.1073/PNAS.77.11.6678>
- Bernal-Roa, Melo, L., & Díaz-Moreno. (2011). *Evaluación del perfil aromático y propiedades antioxidantes durante la maduración de frutos de mora (rubus glaucus benth.)-aromatic profile and antioxidant properties during blackberry (Rubus glaucus benth.) Fruit ripening*.
- Buelvas, G., Castro, M., & Avendaño, M. (2015). *Efecto de la ultra-congelación, el escaldado y la pasteurización sobre la calidad sensorial de la pulpa de mango hilacha*.
- Castro, R. A., & González, G. H. (2010). *EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA EFECTIVIDAD DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE EN LA CONSERVACIÓN DE UCHUVA (Physalis peruviana L. var. Colombia)*.
- Chawla Prashant R., Bajaj Ishwar B., Survase Shrikant A., & Singhal Rekha S. (2009). *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications*. Mumbai.

- Figuroa, J., Salcedo, J., Aguas, Y., Olivero, R., & Narvaez, G. (2011). Recubrimientos comestibles en la conservación del mango y aguacate, y perspectiva, al uso del propóleo en su formulacion. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 3(2), 386. <https://doi.org/10.24188/recia.v3.n2.2011.414>
- Freire Salazar, V. H. (2012). Alternativas de mejora en el manejo poscosecha y comercialización de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) proveniente de la provincia de Tungurahua.
- García, R. J., Torres, J. M., Pinto, A. D., González, J. A., Rengel, J. E., Pérez, N. A., ... Pérez, N. A. (2017). Diseño de una estrategia de control difuso aplicada al proceso de ultracongelación de alimentos. *Ingeniare. Revista Chilena de Ingeniería*, 25(1), 70–84. <https://doi.org/10.4067/S0718-33052017000100070>
- Garzón, A., K, R., & S, S. (2009). Determination of Anthocyanins. *Journal of Food Science*, 227–232.
- Gullo, M., China, S. La, Falcone, asquale M., & Giudici, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives, 14.
- Gullo, M., Mamlouk, D., De Vero, L., & Giudici, P. (2012). *Acetobacter pasteurianus* Strain AB0220: Cultivability and Phenotypic Stability Over 9 Years of Preservation. *Current Microbiology*, 64(6), 576–580. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0112-9>
- Gullo, M., Sola, A., Zanichelli, G., Montorsi, M., Messori, M., & Paolo Giudici. (2017). Point, Increased production of bacterial cellulose as starting Applications, for scaled-up, 13.
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *The Biochemical Journal*, 58(2), 345–52.
- Ibáñez, C. (2004). *Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales*. Ministerio de Educación y Ciencia, Subdirección General de Información y Publicaciones.

- ICMSF. (1982). *Microorganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración*. (Editorial acribia, Ed.). Zaragoza.
- INEC, M. (2000). *III CENSO NACIONAL AGROPECUARIO*.
- Klemm, D., Schumann, D., Udhardt, U., & Marsch, S. (2001). Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1561–1603. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00021-1)
- Krystynowicz, A., Czaja, W., Wiktorowska-Jeziarska, A., Goncalves-Miskiewicz, M., Turkiewicz, M., & Bielecki, S. (2002). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 189–195. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>
- Martín, F. (2015). Cambios y alteraciones en los alimentos durante el proceso de congelación (II) | restauracioncolectiva.com. Retrieved November 9, 2018, from <http://www.restauracioncolectiva.com/n/cambios-y-alteraciones-en-los-alimentos-durante-el-proceso-de-congelacion-ii>
- Mcguire, R. G. (1992). *Reporting of Objective Color Measurements*.
- Méndez, A. (2008). Evaluación de un tratamiento postcosecha de la tecnología IV. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 44–54.
- Miller, G. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*.
- NTE INEN 1529-10. (2013). Control Microbiológico de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad: Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Retrieved October 24, 2018, from <https://archive.org/details/ec.nte.1529.10.1998/page/n3>
- NTE INEN 1529-5. (2006). Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesofilos. REP: Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Retrieved October 24, 2018, from <https://archive.org/details/ec.nte.1529.5.2006/page/n3>
- NTE INEN 2427. (2010). Frutas frescas. Mora. Requisitos. Retrieved October 18, 2018, from <https://archive.org/stream/ec.nte.2427.2010#page/n9>

- Oliveira, D. M., Rosa, C. I. L. F., Kwiatkowski, A., & Clemente, E. (2013). Biodegradable coatings on the postharvest of blackberry stored under refrigeration. *Revista Ciência Agronômica*, *44*(2), 302–309. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000200012>
- Quintero Juan, Falguera V, & Muñoz Aldemar. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, *1*(5).
- Ramírez, J. D., Aristizábal T, I. D., & Restrepo F, J. I. (2013). *CONSERVACIÓN DE MORA DE CASTILLA MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE DE GEL DE MUCÍLAGO DE PENCA DE SÁBILA*. *Vitae* (Vol. 20). Facultad De Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.
- Ramírez, R., Camacho, A., Reyes, G., & Esquivel, R. (2015). *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento* (Trillas). México.
- Ramona, Á., Bernarda, R., Rómulo, H., & Marluy, C. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease. *Multiciencias*, *12*, 129–135.
- Römling, U., & Galperin, M. Y. (2015). Bacterial cellulose biosynthesis: diversity of operons, subunits, products, and functions. *Trends in Microbiology*, *23*(9), 545–557. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2015.05.005>
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, *55*(1), 35–58.
- Sandoval, R. (2009). DETERMINACIÓN DE PH Y ACIDEZ EN ALIMENTOS. Retrieved November 6, 2018, from <https://es.scribd.com/doc/69774122/4-DETERMINACION-DE-PH-Y-ACIDEZ-EN-ALIMENTOS>
- Semjonovs, P., Ruklisha, M., Paegle, L., Saka, M., Treimane, R., Skute, M., ... Cleenwerck, I. (2017). Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(3), 1003–1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7761-8>

- Sievers, M., Lanini, C., Weber, A., Schuler-Schmid, U., & Teuber, M. (1995). Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 18(4), 590–594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0)
- Soares, J., Pires, M., & Azevedo, S. (2014). VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE QUATRO ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM POLPAS DE FRUTAS CONGELADAS. *Quim. Nova*, 37(3), 540–544. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140087>
- Tharanathan, R. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and. *Trends in Food Science & Technology*, 71–78.
- Trejo-Marquez, A., Ramos-López, K., & Pérez, C. (2007). EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE A BASE DE GELATINA SOBRE LA CALIDAD DE FRESA (*Fragaria vesca* L.) ALMACENADA EN REFRIGERACIÓN.
- Wills, R., & Burgos González, J. (1998). *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales /*.

ANEXOS

ANEXO A: Figuras de los materiales, producción de CB, análisis microbiológico y ultracongelación.



Figura 4: Recolección de la fruta.



Figura 5: Producción de celulosa bacteriana.



Figura 6: Obtención y lavado del film de celulosa bacteriana.



Figura 7: Muestra con recubrimiento (izquierda), muestra sin recubrimiento (derecha).



Figura 8: Análisis microbiológico de mohos, levaduras, bacterias psicrótrofas y aerobios mesófilos.



Figura 9: Muestras con y sin recubrimiento en ultracongelación.

ANEXO B: Cálculo de unidades formadoras de colonias

El cálculo de las unidades formadoras de colonias se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{UFC / g} = \frac{\text{NC} * \text{FD}}{\text{Vi}}$$

Donde:

UFC / g = Unidades formadoras de colonias/gramo.

NC = Número de colonias contabilizadas.

FD = Factor de dilución.

Vi = Volumen inoculado en placa.

(Ramírez, et al, 2015)

ANEXO C: Análisis físico-químico de la mora de castilla (*Rubus Glaucus Benth*)
con la aplicación del recubrimiento y sin recubrimiento.

Tabla 4: Determinación de acidez titulable (IDT).

Tratamiento	NaOH Consumidos (mL)	(% Ac. Cítrico/100 g)	Promedio (% Ac. Cítrico/100 g)
Inicial (día 0)	36,562	2,3400	2,3400
Con recubrimiento (día 18)	26,002	1,6641	1,6850
	25,140	1,6090	
	27,842	1,7819	
Sin recubrimiento (día 18)	28,564	1,8281	1,8278
	27,932	1,7876	
	29,184	1,8678	

Tabla 5: Determinación de sólidos solubles totales (°Brix).

Tratamiento	SST (°Brix)	Promedio (°Brix)
Inicial (día 0)	10,5	10,5
Con recubrimiento (día 18)	10,3	10,4
	10,5	
	10,3	
	10,4	
	10,5	
Sin recubrimiento (día 18)	9,6	9,88
	9,8	
	9,9	
	10,1	
	10,0	

Tabla 6: Índice de madurez.

$$\text{Índice de madurez} = \frac{\text{SST (°Brix)}}{\text{Acidez Titulable}}$$

$$\text{Índice de madurez con recubrimiento} = \frac{10,40}{1,6850} = 6,1721$$

$$\text{Índice de madurez sin recubrimiento} = \frac{9,88}{1,8278} = 5,4054$$

Tabla 7: Pérdida de peso por ultracongelación con recubrimiento.

MORA	Peso Inicial	CON	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18
1	4,8829	5,0500	5,0500																	
2	4,9081	5,1798		5,0417																
3	5,2108	5,3637			5,2409															
4	4,9458	5,0477				4,9336														
5	5,5170	5,6184					5,5166													
6	5,4275	5,6101						5,4764												
7	4,1344	4,3652							4,2615											
8	6,6880	7,0362								6,8253										
9	7,3156	7,4622									7,3249									
10	5,7966	5,9722										5,8548								
11	4,2719	4,4336											4,3376							
12	4,9822	5,1073												5,0026						
13	5,8012	5,9650													5,8214					
14	5,3308	5,3976														5,3202				
15	6,0155	6,1793															6,0561			
16	4,7584	4,9350																4,8323		
17	5,4082	5,5357																	5,4596	
18	5,2736	5,6971																		5,5305

Tabla 8: Pérdida de peso por ultracongelación sin recubrimiento.

MORA	Peso	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 17	Día 18
1	6,7759	6,7759																	
2	7,4166		7,3439																
3	5,8327			5,7864															
4	9,2040				9,1328														
5	6,8852					6,8182													
6	7,8621						7,8251												
7	6,6923							6,6615											
8	6,5054								6,3921										
9	6,6220									6,5909									
10	7,6060										7,5798								
11	6,3337											6,281							
12	5,1280												5,1191						
13	5,2447													5,2198					
14	8,0155														7,9531				
15	6,0432															6,0291			
16	6,1174																6,0819		
17	8,3869																	8,3598	
18	7,0541																		7,0351

ANEXO D: Análisis de vida útil, Azúcares reductores.

Tabla 9: Vida de anaquel con y sin recubrimiento en agar PDA.

Temperatura (°C)	Con recubrimiento (Días)	Sin recubrimiento (Días)
4	9	9
25	4	4
37	3	3

Tabla 10: Vida de anaquel con y sin recubrimiento en agar nutriente.

Temperatura (°C)	Con recubrimiento (Días)	Sin recubrimiento (Días)
4	17	14
25	14	7
37	7	6

Tabla 11: Tabla de resultados del programa estadístico R Project for Statistical Computing.

Recubrimiento	Temperatura	Días
Min. :0.0	Min. : 4.00	Min. : 6.00
1st Qu.:0.0	1st Qu.: 9.25	1st Qu.: 7.00
Median :0.5	Median :25.00	Median :10.50
Mean :0.5	Mean :22.00	Mean :10.83
3rd Qu.:1.0	3rd Qu.:34.00	3rd Qu.:14.00
Max. :1.0	Max. :37.00	Max. :17.00

Tabla 12: Interacciones mediante el programa R Project for Statistical Computing.

	Df	Sum Sq	Mean Sq
Recubrimiento	1	1.5	1.5
Temperatura	2	4.0	2.0
Recubrimiento:Temperatura	2	0.0	0.0

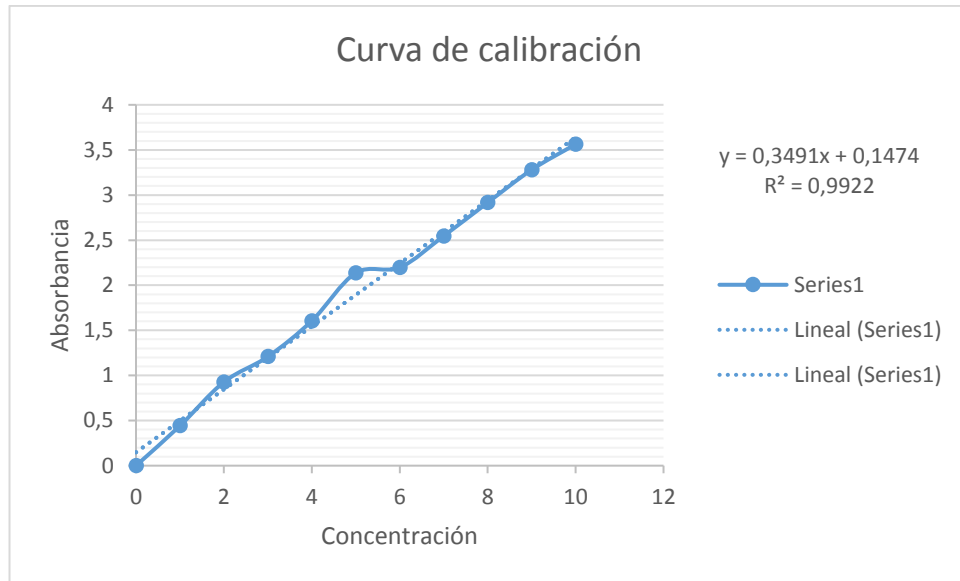


Figura 10: Curva de calibración para azúcares reductores.