



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos.

Título del Proyecto de Investigación:

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)
PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) TRINITARIO Y
NACIONAL”.

Autora:

Diana Carolina Verdezoto Quinatoa

Director de Proyecto de Investigación:

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.

Mocache - Los Ríos - Ecuador

2017



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS.

Yo, **DIANA CAROLINA VERDEZOTO QUINATO**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

DIANA CAROLINA VERDEZOTO QUINATO

CI. 120703738-1



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc., docente de la Facultad de Ciencia Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

CERTIFICO: Que la señorita Diana Carolina Verdezoto Quinatoa, realizó el Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos titulado: **“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) TRINITARIO Y NACIONAL”**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc, en calidad de Director del Proyecto de Investigación titulado: “AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) TRINITARIO Y NACIONAL”, me permito manifestarle a usted y por medio del Consejo Académico lo siguiente:

Que, la señorita **Diana Carolina Verdezoto Quinatoa**, egresada de la Facultad de Ciencias Pecuarias, ha cumplido con las correcciones pertinentes, de acuerdo al Reglamento de Graduación de Pregrado de la UTEQ, he ingresado el Proyecto de Investigación al sistema URKUND, tengo bien certificar la siguiente información sobre el informe del sistema reflejando un porcentaje del 3%.



Urkund Analysis Result

Analysed Document: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) TRINITARIO Y NACIONAL.docx (D29453324)
Submitted: 2017-06-20 19:48:00
Submitted By: jquintana@uteq.edu.ec
Significance: 3 %

Sources included in the report:

CARLOS G.pdf (D8475837)
Trabajo De Investigación.docx (D20960172)
trabaj-inv.-CACAO.docx (D20940341)
anteproyecto MORALES MENDOZA MARIA JOSE.docx (D24942006)
anteproyecto MORALES MENDOZA MARIA JOSE.docx (D25216153)
anteproyecto MORALES MENDOZA MARIA JOSE.docx (D25098971)
<https://www.facebook.com/Conoce-Mas-Sobre-La-Diversidad-De-Ecuador-203397386660894/>
<http://polymeza.blogspot.com/2015/06/ruta-del-cacao-en-ecuador.html>
<https://brainly.lat/tarea/2205844>
<http://comunidad.todocomercioexterno.com.ec/profiles/blogs/la-industrializaci-n-del-cacao-en-sucumbios-contribuir-al>

Instances where selected sources appear:

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)
PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) TRINITARIO Y
NACIONAL”

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de
Ingeniera en Alimentos.

Aprobado por:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Christian Vallejo Torres M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Orly Cevallos Falquez M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Jaime Vera Chang M.Sc.

AGRADECIMIENTO.

Quiero darle gracias a Dios por darme salud, los dones, entusiasmo, mucha fuerza de voluntad y disciplina necesaria para obtener esta conquista en mi camino profesional, y sobre todo, porque me premio dándome una familia tan extraordinaria como la que tengo, a mi hermana y compañero incondicional que me han tenido mucha paciencia (estoy riéndome) , como también le agradezco a Dios que me dio la oportunidad de conocer durante la realización de este trabajo, a personas maravillosas que me han brindado su ayuda y amistad desinteresadamente.

Gracias a cada una de las personas que me han brindado su apoyo y compañía a lo largo de toda esta investigación sin ustedes esto no hubiese sido posible, pues aquí está el resultado de este trabajo que gracias a su apoyo incondicional está concluido.

Muchas Gracias

Dianita

DEDICATORIA.

*Mi tesis la dedico con todo mi amor y
cariño.*

*A ti Dios que me diste la oportunidad
de vivir y guiarme a lo largo de todo
este camino.*

*A mi Mami mi Papi a la Meli y al Tati
a Alex y mi ñaño David, seres que sin
ellos mi vida no estaría completa por
ustedes siempre y para siempre.*

Diana Verdezoto Q.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVES.

Este estudio tuvo como objetivo: Aislar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 de origen Trinitario y tipo Nacional (EET-103). El mucílago extraído de las variedades de cacao CCN-51 Y EET-103 fueron sometidos a un proceso de fermentación durante 24, 48 y 72 horas, tomando muestras cada día, durante dicho proceso, se realizó el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas mediante medios de cultivos selectivos como son Man, Rogosa y Sharpe para *Lactococcus spp* y Bilis Esculina para *Enterococcus spp*. Los resultados del aislamiento nos indicaron que *Lactococcus spp* se la encuentra en el mucílago de cacao CCN-51 y EET-103 en los tres tiempos de fermentación obteniendo de entre 1.43×10^5 y $2,60 \times 10^5$ (UFC/ML) en cambio para *Enterococcus spp* solo se detectó presencia de esta bacteria en el mucílago de cacao EET-103 a las 48 horas con $6,62 \times 10^5$ y 1.19×10^5 (UFC/ML) a las 72 horas, mientras que en el CCN-51 hubo 1.43×10^5 (UFC/ML) a partir de las 72 horas de fermentación del mucílago. Mediante tinción de Gram se identificó morfológicamente a las bacterias aisladas observando que *Lactococcus spp* presenta en forma coco-bacilar y *Enterococcus spp* de forma de coco afirmando así la existencia de estas bacterias. Se logró comprobar que en el mucílago de cacao de la variedad EET-103 no se encontró diferencia estadística entre los tratamientos pudiendo concluir de *Lactococcus spp* está presente en las dos variedades de cacao estudiadas y en los tres de fermentación a diferencia de *Enterococcus spp* donde si hubo diferencia estadística entre los tratamientos dando como resultado que en la variedad EET-103 existe presencia a las 48 y 72 horas y en el CCN-51 a las 72 horas de fermentación del mucílago.

Palabras Claves: *Lactococcus spp*, *Enterococcus spp*, mucílago, fermentación, aislamiento, identificación, tinción.

ABSTRACT AND KEYWORDS.

The objective of this study was to Isolate and identify lactic acid bacteria (BAL) present in the mucilage of cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 of Trinitarian origin and National type (EET-103). The mucilage extracted from cocoa varieties CCN-51 and EET-103 were subjected to a fermentation process for 24, 48 and 72 hours, taking samples every day, during that process, the isolation and identification of lactic acid bacteria was carried out by means of selective cultures such as Man, Rogosa and Sharpe for *Lactococcus spp* and Bilis Esculine for *Enterococcus spp*. The results of the isolation indicated that *Lactococcus spp* is found in the mucilage of cacao CCN-51 and EET-103 in the three fermentation times obtaining between 11.43×10^5 and $2,60 \times 10^5$ The presence of this bacterium in the EET-103 cocoa mucilage was detected at 48 hours with $6,62 \times 10^5$ and 1.19×10^5 (UFC / ML) at 72 hours, while for *Enterococcus spp*. in The CCN-51 had 1.43×10^5 (CFU / ML) from the 72 hours of mucilage fermentation. Gram staining was morphologically identified to isolated bacteria observing that *Lactococcus spp* presents in coconut-bacillary form and *Enterococcus spp* of coconut form affirming thus the existence of these bacteria. It was verified that in the mucilage of cacao of the variety EET-103 no statistical difference was found between the treatments being able to conclude of *Lactococcus spp* is present in the two varieties of cocoa studied and in the three of fermentation unlike *Enterococcus spp* where There was a statistical difference between the treatments, resulting in the presence of EET-103 at 48 and 72 hours and in CCN-51 at 72 hours of mucilage fermentation.

Keywords: *Lactococcus spp*, *Enterococcus spp*, mucilage, fermentation, isolate, identify, staining.

TABLA DE CONTENIDO.

	Pág.
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y SESIÓN DE DERECHOS	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA	vii
RESUMEN Y PALABRAS CLAVES.	viii
ABSTRACT AND KEYWORDS.	ix
TABLA DE CONTENIDO.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
CÓDIGO DUBLÍN	xvi
Introducción.....	1
CAPÍTULO I	
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	
1.1. Problema de investigación.	4
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema.	4
1.1.3. Sistematización del problema.	5
1.2. Objetivos.....	5
1.2.1. Objetivo General.	5
1.2.2. Objetivos Específicos.	5
1.3. Justificación.....	6
CAPÍTULO II	
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	
2.1. Marco Conceptual.	8
2.2. Marco Referencial.....	10
2.2.1. Origen del Cacao.....	10
2.2.2. Taxonomía del Cacao.....	10
2.2.3. Generalidades del Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L).....	11
2.2.4. Variedades de cacao.....	11

2.2.5.	Composición del fruto del cacao.....	11
2.2.6.	Mucílago de cacao.....	12
2.2.7.	Composición química del mucilago de cacao.....	12
2.2.8.	Fermentación del cacao.	13
2.2.9.	Microorganismo en la fermentación.....	13
2.2.10.	Bacterias ácido lácticas (BAL).	14
2.2.11.	Características de las bacterias ácido lácticas.	14
2.2.12.	Importancia de las BAL.....	15
2.2.13.	Clasificación de las BAL.	15
2.2.14.	Clasificación de las bacterias por su forma.	18
2.2.15.	Investigaciones relacionadas a la investigación.....	20

CAPÍTULO III

MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.	Localización.	23
3.2.	Tipo de Investigación.....	23
3.3.	Métodos de la investigación.	23
3.4.	Fuentes de recopilación de información.	23
3.5.	Diseño de la investigación.....	24
3.5.1.	Factores.....	24
3.5.2.	Modelo matemático.....	25
3.5.3.	Análisis de varianza.....	25
3.5.3.1.	Población y muestra.	26
3.5.3.2.	Característica del diseño experimental.	26
3.5.3.3.	Tratamientos de la investigación.....	26
3.6.	Instrumentos de Investigación.	27
3.6.1.	Materia prima.	27
3.6.2.	Preparación de medio de cultivo MRS Man Rogosa y Sharpe.	27
3.6.3.	Preparación del medio de cultivo Bilis Esculina.	27
3.6.4.	Preparación del agua de peptona como medio diluyente.	28
3.6.5.	Aislamiento de las bacterias ácido lácticas.....	28
3.6.6.	Identificación de los géneros.	28
3.6.7.	Tinción de Gram.	28
3.7.	Tratamiento de los datos.	29
3.8.	Recursos humanos y materiales.....	29

3.8.1.	Materia prima.	30
3.8.2.	Materiales.....	30
3.8.3.	Equipos.	30
3.8.4.	Insumos.....	31
3.8.6.	Mediciones Experimentales.	31

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.	Resultados y discusión.	33
4.1.1.	Efecto de los tiempos de fermentación del mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L) Trinitario y Tipo Nacional (Factor A).	33
4.1.2.	Efecto de las variedades de cacao en el Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Trinitario y Nacional (Factor B).....	34
4.1.3.	Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L) Trinitario y Nacional.....	36
4.1.4.	Identificación de las de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) Trinitario y nacional.	37
4.1.4.1.	Tinción de Gram.	37

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	Conclusiones.....	41
5.2.	Recomendaciones.	42

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

6.1.	Literatura Citada.	44
------	-------------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla.	Pág.
1. <i>Descripción taxonómica del Cacao (Theobroma Cacao L.)</i>	10
2. <i>Composicion Química del Mucilago de Cacao.</i>	12
3. <i>Morfología de las bacterias.</i>	19
4. <i>Factores en estudio del diseño experimental.</i>	24
5. <i>Análisis de varianza.</i>	25
6. <i>Característica diseño experimental.</i>	26
7. <i>Esquema del experimento.</i>	26
7. <i>Descripción de los tratamientos.</i>	29
9. <i>Efecto de los tiempos de fermentación del mucilago de cacao (Theobroma cacao L) trinitario y nacional.</i>	33
10. <i>Efecto de las variedades de cacao en el Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucilago de cacao (Theobroma cacao L.) trinitario y nacional.</i>	35
11. <i>Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucilago de cacao (Theobroma cacao L.) trinitario y nacional.</i>	36

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura.	Pág.
1.Observacion microscópica de <i>Lactococcus spp.</i> en el medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe).....	38
2.Observación microscópica de <i>Enterococcus spp</i> aislada en el medio de cultivo Bilis Esculina.....	39

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexos.	Pág.
1.Resultados Obtenidos de la Tinción de Gram en el medio de cultivo MRS.	51
2.Resultados Obtenidos de la Tinción de Gram en el medio de cultivo Bilis Esculina.	52
3.Recoleccion de la materia prima en la Finca La Represa de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.....	53
4.Imágenes de la extracción del mucilago de cacao (<i>Theobroma Cacao</i> l.) trinitario y nacional para su posterior fermentación.....	53
5. Preparación de los medios de cultivos MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y Bilis Esculina.	54
6.Siembra de las muestras en los diferentes medios de cultivos.	55
7. Proceso de incubación de las muestras.	56
8. Conteo Microbiano.	56
9.Preparación del frotis para la realización de la Tinción de Gram.....	57
10.Imágenes de <i>Lactococcus</i> spp y <i>Enterococcus</i> spp.....	58

CÓDIGO DUBLÍN.

Título:	“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) PRESENTES EN EL MUCÍLAGO DE CACAO (<i>Theobroma cacao</i> L.) TRINITARIO Y NACIONAL”
Autor:	Verdezoto Quinatoa Diana Carolina
Palabras clave:	<i>Lactococcus spp</i> , <i>Enterococcus spp</i> , mucílago, fermentación aislamiento, identificación, tinción
Editorial:	
Resumen:	<p>Este estudio tuvo como objetivo: Aislar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) CCN-51 de origen Trinitario y tipo Nacional (EET-103). El mucilago extraído de las variedades de cacao CCN-51 Y EET-103 fueron sometidos a un proceso de fermentación durante 24 ,48 y 72 horas, tomando muestras cada día, durante dicho proceso, se realizó el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas mediante medios de cultivos selectivos como son Man , Rogosa y Sharpe para <i>Lactococcus spp</i> y Bilis Esculina para <i>Enterococcus spp</i> . Los resultados del aislamiento nos indicaron que <i>Lactococcus spp</i> se la encuentra en el mucílago de cacao CCN-51 y EET-103 en los tres tiempos de fermentación obteniendo de entre 1.43×10^5 y $2,60 \times 10^5$ (UFC/ML) en cambio para <i>Enterococcus spp</i> solo se detectó presencia de esta bacteria en el mucílago de cacao EET-103 a las 48 horas con $6,62 \times 10^5$ y 1.19×10^5 (UFC/ML) a las 72 horas ,mientras que en el CCN-51 hubo 1.43×10^5 (UFC/ML) a partir de las 72 horas de fermentación del mucilago. Mediante tinción de Gram se identificó morfológicamente a las bacterias aisladas observando que <i>Lactococcus spp</i> presenta en forma coco-bacilar y <i>Enterococcus spp</i> de forma de coco afirmando así la existencia de estas bacterias. Se logró comprobar que en el mucílago de cacao de la variedad EET-103 no se encontró diferencia estadística entre los tratamientos pudiendo concluir de <i>Lactococcus spp</i> está presente en las dos variedades de cacao estudiadas y en los tres de fermentación a diferencia de</p>

	<p><i>Enterococcus spp</i> donde si hubo diferencia estadística entre los tratamientos dando como resultado que en la variedad EET-103 existe presencia a las 48 y 72 horas y en el CCN-51 a las 72 horas de fermentación del mucílago.</p> <p>Abstract. - The objective of this study was to Isolate and identify lactic acid bacteria (BAL) present in the mucilage of cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) CCN-51 of Trinitarian origin and National type (EET-103). The mucilage extracted from cocoa varieties CCN-51 and EET-103 were subjected to a fermentation process for 24, 48 and 72 hours, taking samples every day, during that process, the isolation and identification of lactic acid bacteria was carried out by means of selective cultures such as Man, Rogosa and Sharpe for <i>Lactococcus spp</i> and Bilis Esculine for <i>Enterococcus spp</i>. The results of the isolation indicated that <i>Lactococcus spp</i> is found in the mucilage of cacao CCN-51 and EET-103 in the three fermentation times obtaining between 11.43×10^5 and $2,60 \times 10^5$ The presence of this bacterium in the EET-103 cocoa mucilage was detected at 48 hours with $6,62 \times 10^5$ and 1.19×10^5 (UFC / ML) at 72 hours, while for <i>Enterococcus spp</i>. in The CCN-51 had 1.43×10^5 (CFU / ML) from the 72 hours of mucilage fermentation. Gram staining was morphologically identified to isolated bacteria observing that <i>Lactococcus spp</i> presents in coconut-bacillary form and <i>Enterococcus spp</i> of coconut form affirming thus the existence of these bacteria. It was verified that in the mucilage of cacao of the variety EET-103 no statistical difference was found between the treatments being able to conclude of <i>Lactococcus spp</i> is present in the two varieties of cocoa studied and in the three of fermentation unlike <i>Enterococcus spp</i> where There was a statistical difference between the treatments, resulting in the presence of EET-103 at 48 and 72 hours and in CCN-51 at 72 hours of mucilage fermentation.</p>
Descripción:	75 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM.
URL.:	(En blanco hasta cuando se dispongan los repositorios).

Introducción.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una fruta tropical, sus cultivos se localizan especialmente en el Litoral y en la Amazonía, se centraliza primordialmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos variedades de cacao: CCN-51 de origen trinitario y el denominado Cacao Nacional de origen forastero (1).

El Ecuador es el mayor exportador de cacao fino y de aroma del mundo , en la actualidad cuenta aproximadamente con 263.800 hectáreas cultivadas, entre los principales compradores de nuestro cacao en grano y elaborado se encuentran :Estados Unidos , Holanda , Alemania , Japón , Francia , Italia , Bélgica , Argentina , Chile y España (2)

Los procesos agrícolas e industriales del cacao generan una serie de subproductos que tienen poca o ninguna utilización que a nivel de finca estos son desechados. Las semillas del cacao están rodeadas de una sustancia mucilaginosa que está compuesto por azúcares, pectinas y de ácido cítrico, parte de esta pulpa es imprescindible para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras, pero de 4 a 8% es desechado por las industrias cacaoteras (3).

Habitualmente se desaprovechan más de 70 litros por tonelada de este material mucilaginoso. Este exceso de pulpa, tiene un delicioso sabor tropical, ha sido utilizado en diferentes países como Brasil, Costa Rica, Colombia, para fabricar productos alimenticios (4).

En el proceso de fermentación participan los microorganismos que se encuentran naturalmente en los granos, de entre los cuales actúan primeramente las levaduras, posteriormente actúan las bacterias lácticas y, finalmente, intervienen las bacterias acéticas, los *Bacillus* y las enterobacterias. Esta fermentación es esencial tanto para modificar los granos, eliminando el mucílago, como para preparar el grano que requieren las enzimas encargadas de modificar su color, sabor y olor, produciendo también compuestos de sabor. La fermentación es una etapa del procesamiento del grano de cacao,

que requiere aún de investigación, en condiciones controladas permitirá obtener cacao de buena calidad y de características homogéneas (5).

Las bacterias del ácido láctico (BAL), o también bacterias ácido lácticas y cultivos lácticos por razón de sus características al ser procesadas y multiplicadas para su utilización como grupo comprenden un caldo de bacterias fermentadoras y productoras de ácido láctico, la función por la que son empleadas en la industria es para darle ciertas cualidades a los alimentos y protegerlos contra la acción de otros organismos dañinos. Uno de ellos pueden ser los lactobacilos los cuales aportan al producto un buen cuidado (6).

La presente investigación pretende aislar e identificar bacterias lácticas presente en el mucilago de *Theobroma cacao* L. en diferentes tiempos de fermentación.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación.

1.1.1. Planteamiento del problema.

El desconocimiento de los posibles usos industriales del mucilago de cacao conlleva al desaprovechamiento por parte de los pequeños y medianos productores, incidiendo indirectamente en las oportunidades de crecimiento socio económico en los mismos y a la vez un impacto medio ambiental por su eliminación directa a la naturaleza.

Diagnóstico.

El proceso de aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el mucilago de cacao, materia prima que se desconoce su importancia durante la cosecha del cacao, permitirá darle un valor agregado a este residuo, ya que estas bacterias tienen funciones antimicrobianas.

Pronóstico.

Al no ser aprovechado este residuo agroindustrial se está perdiendo oportunidades de empleo y de innovar dentro de la industria alimentaria brindando a los pequeños agricultores de nuestro país darle un valor agregado al mucilago de cacao que mayormente es desperdiciado en los centros de acopios del país.

1.1.2. Formulación del problema.

En la actualidad se ha registrado un aumento en la adición de bacterias ácido lácticas (BAL) en productos comerciales conocidos, con el fin de dar un valor agregado al producto y a la vez perfeccionar los procesos, aumentar la seguridad y tiempo de conservación de los productos, sin embargo en nuestro país falta mucho por investigar ya que para los pequeños y medianos productores esto es un trabajo imposible ya que no cuentan con recursos físicos y económicos para realizar esta tarea, lo cual afecta directamente la competitividad de sus productos al enfrentarse con marcas que presentan un alimento más duradero y con menor riesgo de contaminación.

Una de las características de Ecuador es que posee una gran producción de cacao lo cual la mayor parte de este solo es utilizado la semilla, desperdiciándose una gran cantidad de residuos, como es el mucilago que no tiene mucha investigación, al cual estudiarlo nos brindara nuevas alternativas para el desarrollo agroindustrial.

1.1.3. Sistematización del problema.

¿En el mucilago de cacao se conseguirá aislar e identificar bacterias ácido lácticas para darle un valor agregado?

1.2. Objetivos.

1.2.1. Objetivo General.

- Aislar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) CCN-51 de origen Trinitario y tipo Nacional (EET-103).

1.2.2. Objetivos Específicos.

- Cuantificar las bacterias ácido lácticas encontradas en el mucílago de *T. cacao* en los diferentes tiempos de fermentación.
- Observar la morfología de las bacterias ácido lácticas encontradas en el mucílago de *T. cacao* en los diferentes tiempos de fermentación.
- Establecer el tiempo de fermentación eficiente del mucílago de *T. cacao* para la reproducción de las bacterias ácido lácticas (BAL).
- Determinar en qué variedad de cacao tendrá la mayor concentración de bacterias ácido lácticas (BAL).

1.3. Justificación.

La presente investigación propone realizar una búsqueda, aislar e identificar bacterias ácido lácticas en el mucilago de cacao, materia prima mayormente desechada por los diferentes centros de acopio, esto con el fin de encontrar cepas nativas que puedan usarse en futuros productos asegurando calidad, mayor duración, mejor resistencia a contaminación microbiana y además que presenten actividades benéficas para la salud de los consumidores, lo cual podría mejorar el nivel competitivo de los productores artesanales.

De manera que la presente investigación aportará con la generación de nuevas tecnologías que permitan hacer uso eficiente de las bacterias ácido lácticas (BAL) dentro de la industria alimentaria.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco Conceptual.

Cacao.

El cacao es una planta que pertenece al orden Malvales, a la familia Esterculiáceas, genero *Theobroma*, especie cacao .Su centro de origen se cree está ubicado en la cuenca del Amazonas (América del sur), en las estribaciones orientales de los Andes, cerca de los límites de Colombia, Ecuador y Perú, su fruto es grande tiene sobre el tamaño y de forma ovoide, en su interior contiene granos de cacao en forma de almendra (7).

Mucílago de cacao.

El mucílago de cacao es un líquido viscoso amarillento y pálido, que es subproducto del desecho dentro de la industria del cacao. Se deriva del producto de descomposición del mucílago (pulpa) que rodea los granos de cacao frescos del árbol (*Theobroma cacao*) es el 10% el peso de la fruta del cacao (8).

Fermentación.

La fermentación es un proceso biológico que transforma los azúcares simples en gases, ácidos y alcohol; mediante la descomposición química de una sustancia por bacterias, levaduras, u otros microorganismos (9).

Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos importantes en la preparación de cultivos iniciadores aplicados en la industria alimenticia; estudios más recientes permiten tener un mejor conocimiento sobre la fisiología, genética y ecología de estos microorganismos (10).

Aislamiento.

En microbiología, el término aislamiento se refiere a la separación de una cepa de una población natural mixta de microbios vivos, presentes en el ambiente, por ejemplo en el

agua o la flora del suelo, o de seres vivos con flora de la piel, flora oral o flora intestinal, Con el fin de identificar el (los) microbio (s) de interés (11).

Identificación.

“Es el proceso por el cual se delinean las características importantes de un microorganismo basándose en un conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo” (12).

Tinción.

Es el proceso por el cual las moléculas de un colorante se adsorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico (13).

Medio de Cultivo.

Un medio de crecimiento o medio de cultivo es un sólido, líquido o semisólido diseñado para soportar el crecimiento de microorganismos o células, o plantas pequeñas. Diferentes tipos de medios se utilizan para el cultivo de diferentes tipos de células (14).

2.2. Marco Referencial.

2.2.1. Origen del cacao.

“Antiguamente el punto de origen del cacao se encontraba en Centroamérica en países como México, Guatemala y Honduras donde se cree que su uso se estima alrededor de 2,000 años A.C” (15).

El cacao, (*Theobroma cacao* L), es una planta de origen americano. Debido al sistema de vida nómada que siempre llevaron los primeros habitantes de este continente, es prácticamente imposible decir a ciencia cierta cuál fue el lugar de origen. Sin embargo, actualmente investigaciones demuestran que el cacao es originario de América del sur, en el área del alto amazonas, que comprende países como Colombia, Ecuador, Perú y Brasil. Es en este último lugar donde se ha encontrado la mayor variabilidad de la especie (16).

2.2.2. Taxonomía del cacao.

La taxonomía es una rama de la ciencia en la que podemos establecer parámetros de diferencia a distintos organismos, la taxonomía del cacao se lo describe a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Descripción taxonómica del Cacao (*Theobroma cacao* L.).

Reino	Plantae
Subreino : División	<i>Tracheobionta : Magnoliophyta</i>
Clase :Subclase	<i>Magnoliopsida: Dilleniidae</i>
Orden	<i>Malvales</i>
Familia : Subfamilia	<i>Malvaceae.: Sterculioideae</i>
Tribu	<i>Theobromeae</i>
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>cacao</i> L.

Fuente: *DOSTERT et al* (17).

2.2.3. Generalidades del cacao (*Theobroma cacao* L)

Es un árbol de características pequeñas en las partes más viejas del tronco es donde crecen sus flores y sus frutos; sus flores son pequeñas que dan fruto a una mazorca o baya que en su interior contiene semillas cubiertas de una pulpa mucilaginosa blanquecina rica en azúcares (18).

2.2.4. Variedades de cacao.

Nacional o Arriba.

De esta variedad, de conocida calidad, quedan pocas plantaciones en estado puro, las que están localizadas en las provincias del Guayas y los Ríos en la costa occidental, la mayoría del actual cacao calificado como Arriba viene de plantaciones híbridas de Nacional y Trinitarios. La variedad pertenece a los forasteros amazónicos de mazorcas amelonadas , grandes , casi ovales , con un ligero estrangulamiento en el cuello, cascara gruesa verde , surcos profundos , notoriamente rugosa , punta roma, semillas de medianas a gruesas y de color violeta a morado , arboles altos , robustos , troncos gruesos , hojas grandes y las flores tienen el pedicelo del estambre rosado (19).

Trinitarios.

Casi el 90% de la producción de Ecuador proviene de plantaciones de trinitarios, conocidos localmente como “venezolano morado” o venezolano verde”, estos fueron introducidos de Venezuela en la década de 1930-40 y, por ser más tolerantes a la escoba de bruja reemplazaron a las principales áreas de cacao Nacional. A la presente las nuevas plantaciones de nuestro país están siendo incrementadas con híbrido entre clones forasteros resistentes a la escoba de bruja y trinitarios de alta producción (19).

2.2.5. Composición del fruto del cacao.

El fruto del cacao está formado por su cascara y placenta que quedan al momento que se quiebran los frutos para poder extraer los granos, estas representan menos del 75% del

peso total de las mazorcas desechadas, es decir que un 21% máximo del producto cosechado es expresado por semillas o granos que se aprovechan para el beneficio (20).

“En la actualidad, la producción de cacao está centrada principalmente en el aprovechamiento y comercio de la semilla de cacao, sin tener en cuenta el alto valor nutricional que contiene la pulpa que la recubre” (18).

2.2.6. Mucílago de cacao.

Uno de los principales subproductos no utilizados del cacao es el mucilago de cacao (pulpa). Las almendras del cacao están rodeadas de una sustancia viscosa mucilaginosa llamada mucílago de cacao, es un subproducto de la transformación de los granos de cacao, constituye el 10% del cacao total, con sólidos solubles hasta 17.78°Bx, pH de 3.43 - 3.5, ricos en azúcar, minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, esta sustancia suele confundirse con las gomas por lo cual lo se las diferencian por sus propiedades físicas y químicas (21).

2.2.7. Composición química del mucilago de cacao.

El mucílago es un medio rico para el crecimiento microbiano, la composición química del mucílago de cacao se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. *Composición Química del Mucílago de cacao.*

Componente	% p/p (Base Húmeda)
Agua	78.2 – 84.2
Proteína	0.09 – 0.11
Azucares	12.60 – 15.9
Glucosa	11.6 – 15.32
Pectinas	0.9 – 1.19
Ácido Cítrico	0.78 – 1.52
Cenizas	0.42 -0.50

Fuente: GONZÁLEZ *et al* (22)

2.2.8. Fermentación del cacao.

La razón original y primordial para la fermentación del cacao fue probablemente para quitarle la pulpa mucilaginosa adherida a la testa de la almendra. En efecto, esto se realizaba dejando las almendras húmedas, de preferencia cubiertas con hojas de banano y permanecer por varios días entre cinco y siete días este proceso depende de diferentes factores como la variedad de cacao, pronto las finas paredes de las células se destruyen y el jugo celular de la pulpa se infesta con levaduras y los azúcares del jugo se convierten en alcohol y anhídrido carbónico estos cambios químicos y físicos producen en pequeñas cantidades de sustancias aromáticas de determinan el olor y el gusto altamente característicos de algunos derivados del cacao (23).

La fermentación se puede llevar a cabo en una pila o, para mayor control, en una caja perforadora o mezclando periódicamente los granos en una pila o recipiente pueden requerirse hasta 10 días en los cuales el mucilago se separa del grano (24).

2.2.9. Microorganismo en la fermentación.

Las levaduras (*Saccharomyces sp.* y *Bitabacterium sp.*) actúan durante la primera etapa de fermentación (24-28 horas), atacando los azúcares para transformarlos en anhídrido carbónico y alcohol, con desprendimiento de temperatura, las levaduras requieren de aire todo el tiempo. Las bacterias aeróbicas (*Acetobacter sp.*), producen fermentación acética, consumen alcohol, necesitan oxígeno y desarrollan algo de temperatura (25).

Las bacterias anaeróbicas producen una fermentación butírica, cuando no hay buena oxigenación o aireación, que puede terminar en una putrefacción de los granos. Las levaduras predominan en la primera parte del proceso (24 horas), debido quizá a la presencia de un pH muy bajo de la pulpa (menor de 4), lo que permite el crecimiento de las levaduras y algunos hongos solamente, cuando el pH sube de 4 (al 3er día) las bacterias lácticas deben ser favorecidas tanto por la falta de oxígeno, como por la alta temperatura. Mas tarde, con la formación de alcohol, se favorece el desarrollo de las bacterias acéticas (25).

2.2.10. Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecen a un grupo de microorganismos que son representados por varios géneros que presentan características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Por lo general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (26).

Las BAL están considerablemente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos , tierra , plantas verdes , así como también del tracto digestivos entre otras fuentes ,para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa , además de aminoácidos , vitaminas y otros factores de crecimiento, la leche es el medio típico y satisfactorio para la multiplicación de las BAL , sin embargo , otros alimentos son también excelentes medios de crecimientos y producción de metabolitos de bacterias lácticas , entre ellos se encuentran las masas de cereales , los vegetales y la carne (27).

2.2.11. Características de las bacterias ácido lácticas.

Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos, su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido (28).

Debido a las características de estos microorganismos al ser procesadas y multiplicadas para su utilización como grupo comprenden un caldo de bacterias fermentadoras y productoras de ácido láctico, función por la cual son utilizadas en la industria alimentaria brindando a varios alimentos cualidades únicas y también protegerlos contra la acción de otros microorganismos dañinos (28).

2.2.12. Importancia de las BAL.

Las bacterias ácido lácticas o BAL se han empleado para fermentar o crear cultivos de alimentos durante al menos 4 milenios. El uso más común de estos microorganismos es la industria de los lácteos son utilizadas en productos tales como el yogurt, el queso, la crema de leche y la mantequilla. (29).

No obstante sin entender la base científica que explica la acción de estas bacterias, numerosos pueblos antiguos utilizaban estas bacterias para la elaboración de alimentos claramente modificados que debido a la acción de estas bacterias podían conservarse por mucho más y estaban dotados de sabores y texturas únicas que estas bacterias les brindaban al producto original (29).

Actualmente las bacterias lácticas son utilizadas en su mayoría por industria de los lácteos en una extensa variedad de productos fermentados como el queso, yogurt o el kéfir, la acción de estas bacterias tiene como consecuencia un proceso microbiano por lo cual el azúcar de la leche (lactosa) se transforma en ácido láctico. A medida que el ácido láctico se acumula la estructura de las proteínas de la leche se van modificando es decir se van cuajando, y lo mismo ocurre con la textura del producto, existen otras variables la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades particulares de los distintos productos resultantes (29).

2.2.13. Clasificación de las BAL.

Las BAL pertenecen a un grupo heterogéneo que comprende alrededor de 20 géneros , de los cuales , *Streptococcus* , *Enterococcus* , *Pediococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Vagococcus* , *Carnobacterium* , , *Weissela* y *Aerococcus* ; son los que tiene mayor incidencia en alimentos (30).

2.2.13.1. *Streptococcus*.

Consiste en un grupo de bacterias Gram positivas, con forma esférica u ovoide de 0.8 – 1.2 µm, no presentan motilidad, típicamente dispuestos en pares o cadenas, catalasa negativas,

crecen en condiciones anaeróbicas o microaerofilicas, las especies anaeróbicas no son de importancia en la microbiología de alimentos (31).

2.2.13.2. *Enterococcus.*

Cocos homofermentativos Gram-positivos, facultativamente anaeróbicos. Puede crecer a 10 ° C y a 45 ° C en caldo con NaCl al 6,5%, a pH 9,6, y sobrevivir al calentamiento a 60 ° C durante 30 minutos. El nombre del género enfatiza el origen intestinal de estas bacterias. La patogenicidad nosocomial de los enterococos ha surgido en los últimos años, así como el aumento de la resistencia a los antibióticos glicopéptidos (32)

2.2.13.3. *Pediococcus.*

Pertenece al grupo de cocos, Gram positivos, catalasa negativas de un tamaño uniforme aproximadamente de 0.36-1.43 μm de diámetro, sin motilidad, no esporulados. Se trata de bacterias esféricas cuya división tiene lugar en dos planos en ángulo recto con lo que se forman tétradas, crecen bajo condiciones microaerofilicas o anaeróbicas facultativas (33).

2.2.13.4. *Lactobacillus.*

Estrictamente fermentativo con requerimientos nutricionales complejos; Crecen y se asocian con muchos diferentes hábitats; Acidúricos o acidófilos, producen pH 4,0 en alimentos que contienen un carbohidrato fermentable; A menudo suprimen el crecimiento o matan a otras bacterias; Importante en la fabricación de alimentos fermentados (lácteos, carnes, levadura, cerveza y vino), así como el deterioro (31).

2.2.13.5. *Lactococcus.*

Lactococcus es un microorganismo clasificado informalmente como una bacteria ácido láctica porque fermenta el azúcar de la leche (lactosa) y la transforma en ácido láctico. Los lactococos son típicamente células esféricas o ovoides, de aproximadamente 1,2 μm por 1,5 μm , que ocurren en pares y cadenas cortas. Son Gram-positivos, no móviles, y no forman esporas. Los lactococos se encuentran asociados con material vegetal, principalmente hierbas, de las cuales se inoculan fácilmente en la leche. Por lo tanto, se

encuentran normalmente en la leche y pueden ser una causa natural de acidez. *Lactococcus lactis* tiene dos subespecies, *lactis* y *cremoris*, ambas esenciales en la fabricación de muchas variedades de queso y otros productos lácteos fermentados (34).

2.2.13.6. *Leuconostoc.*

Género predominante entre las BAL sobre plantas, con *L. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* como el principal aislado. Son bacterias Gram positivas en forma de cocabacilos, anaerobias facultativas, catalasa negativa, dispuestas en pares y cadenas. En los alimentos fermentados de origen vegetal, *L. mesenteroides* es generalmente el primer organismo en crecer y ser sustituido por lactobacilos más tolerantes al ácido. El *Leuconostoc* tiene considerable importancia comercial específica de especie (35).

2.2.13.7. *Vagococcus.*

Son bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas individualmente, en pares y cadenas, son catalasa negativa, anaerobia facultativa, se encuentran en las heces, agua del río, peces enfermos, animales, así como las fuentes humanas, la carne molida y el deterioro de los camarones cocidos (36).

2.2.13.8. *Carnobacterium.*

Es un género atípico de *Lactobacillus* aislado comúnmente de carne envasada al vacío, de peces y de agua de mar, este género se creó para incluir algunos microorganismos anteriormente clasificados como lactobacilos al estar filogenéticamente más próximos a los Enterococos y *Vagococos* son un grupo heterofermentativo, grampositivas, catalasa positiva, no son exigentes metabólicamente y son menos intolerantes al oxígeno, las especies de *Carnobacterium* se pueden diferenciar de los *Lactobacillus* por su capacidad de crecimiento a pH de 9, son psicrótrofos creciendo la mayoría a 0°C, mientras que a 45°C no crecen, algunas especies producen gas a partir de la glucosa (37).

2.2.13.9. *Weissella*.

“Las bacterias asignadas al género *Weissella* son células Gram-positivas, catalasa negativa, que no forman esporas, con morfología coccóide o en forma de varilla” (38).

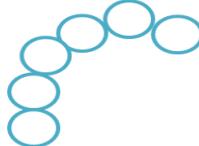
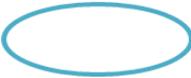
2.2.13.10. *Aerococcus*.

Bacteria Gram-positiva coccoide esta bacteria se divide en dos planos en ángulos rectos, dando lugar a una tétrada y arreglos de racimos; También se pueden encontrar en pares o solas. La mayoría de los aerococos son facultativamente anaeróbicos (*A. viridans* se clasifica como microaerófilos), no motiles, no formadores de esporas y catalasa negativos, aunque algunas cepas pueden producir una reacción de tipo catalasa débilmente positiva. Las enzimas citocromas están ausentes (39).

2.2.14. Clasificación de las bacterias por su forma.

Las bacterias presentan una gran variedad de tamaños y formas que solo se las permiten ser vistas a través del microscopio, como las que se presentan a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. *Morfología de las bacterias.*

Cocos	
Coco	
Diplococo	
Estafilococo	
Estreptococo	
Tétrada	
Diplococo encapsulado	
Bacilos	
Cocobacilo	
Bacilo	
Empalizada	
Estreptobacilo	
Diplobacilo	

Fuente: JIMÉNEZ, 2011 (40)

2.2.15. Investigaciones relacionadas a la investigación.

Según Elnaz *et al*, 2016 (41) en su trabajo de investigación con el *Aislamiento E Identificación De Las Bacterias Del Ácido Láctico En El Queso Curdo Durante La Maduración*, el queso curdo es un queso local especial producido y consumido en la provincia de Khorasan, en el noreste de Irán. Entre los aislados de bacterias de ácido láctico de las diversas etapas de maduración del queso curdo después de la identificación del nivel de género mediante bioquímicos y análisis molecular basados en cebadores universales y específicos, se encuentran *Enterococcus faecium* (29,5%), *Lactobacillus plantarum* (16,2%), *Enterococcus faecalis* *Lactobacillus caseus* (8,6%), *Lactobacillus casei* (3,8%), *Enterococcus hirae* (2,9%), *Lactobacillus paracasei* (2,9%), *Lactobacillus pentosus* (8,6%), *Helveticus* (1,9%) y *Lactobacillus brevis* (0,9%). En las etapas iniciales de la maduración del queso curdo, *L. lactis* subsp *lactis* fue el LAB predominante, mientras que *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus plantarum* fueron el BAL predominante en las etapas posteriores.

Así como Misganaw *et al*, 2016 (42) en su trabajo de investigación *Aislamiento E Identificación De Bacterias De Ácido Láctico De Leche De Vaca Cruda*, un total de 83 aislamientos de bacterias de ácido láctico pertenecieron a seis géneros *Lactobacillus* (26.51%), *Lactococcus* (21.69%), *Leuconostoc* (18,07%), *Streptococcus* (9,64%), *Pediococcus* (12,05%) y *Enterococcus* (9,64%). *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Lactococcus* fueron cocos y *Lactobacillus* en forma de varilla. En el presente estudio, el géneros de las bacterias del ácido láctico identificados de las muestras crudas de la leche de vaca eran *Lactobacillus* (26.51%). El estudio tuvo éxito aislando e identificando el BAL natural de leche cruda de vaca. De esto podemos concluir que la leche cruda de vaca es una buena fuente de bacterias del ácido láctico

También Garnero *et al*, 2011 (43) señala en su trabajo de investigación *Aislamiento Y Selección De Bacterias Ácido Lácticas Para La Obtención De Ácido Poliláctico A Partir De Lactosuero*, que la explotación de los desechos industriales se aprecia por el cuidado del medioambiente y por el ahorro económico. En este sentido, el lacto suero resulta atractivo para producir ácido poliláctico, pero su bajo rendimiento limita su uso. El objetivo de este trabajo ha sido seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas con buena

capacidad acidificante para ser empleadas en la producción de ácido láctico a partir de lacto suero. En esta primera etapa, se aislaron 25 cepas de bacterias ácido láctico obtenido de 5 sueros de la región Centro de nuestro país. Las cepas resultaron, en su mayoría, mesófilas y homofermentativas, y las seleccionadas fueron las denominadas SM3, R3 y J3 (lactococos) y M4 y Sc3 (lactobacilos). Los lactococos resultaron más rápidos para acidificar que los lactobacilos, con una disminución de pH y una producción de ácido a las 48 h de 1,7 unidades y 1 g/L, y 1,6 unidades y 0,7 g/L, respectivamente.

CAPÍTULO III

MÉTODOLÓGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.Localización.

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Rumiología de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, la misma que está ubicada en el Km 7,5 vía Quevedo – El Empalme, entrada al cantón Mocache, Provincia de Los Ríos.

3.2.Tipo de Investigación.

Se aplicó una investigación Exploratoria, Descriptiva y Experimental; puesto que no se ha encontrado datos sobre aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas en el mucilago de cacao.

3.3.Métodos de la investigación.

En esta investigación se usó diferentes métodos de investigación de los cuales se hace referencia a continuación:

Con el método de observación se analizó los diferentes tipos de cacao que existen en nuestro país con el Nacional y el CCN51; mediante el método analítico se procedió a analizar los diferentes tiempos de fermentación en las variedades de cacao donde se logró identificar las bacterias ácido lácticas presentes en las muestras experimentales.

El método experimental es el más eficaz, mediante el cual se estudió cada una de las variables a evaluar, y se determinó los mejores tratamientos con la aplicación del análisis de varianza y las pruebas de Tukey.

3.4.Fuentes de recopilación de información.

La presente investigación de aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas (BAL) en el mucilago de cacao, se utilizó las siguientes fuentes:

Información primaria: se utilizó consultas directamente a la fuente, investigación en el laboratorio.

Información secundaria: se consultó tesis de grado, textos y documentos publicados en internet sobre la materia.

3.5. Diseño de la investigación.

El diseño experimental es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un resultado dentro de un estudio experimental.

En la investigación se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) bi-factorial AxB, con dos factores de estudio, Factor A: tiempos de fermentación y Factor B: Variedades de cacao, resultando seis tratamientos y tres repeticiones.

Para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizó prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) el análisis estadístico se realizó utilizando un software libre.

3.5.1. Factores.

El planteamiento de los factores y niveles en estudio de la presente investigación se redacta en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores en estudio del diseño experimental.

Factores	Código	Niveles
FATOR A	a ₁	24
(Tiempo de fermentación en horas)	a ₂	48
	a ₃	72
FACTOR B	b ₁	CCN-51
(Variedad de cacao)	b ₂	EET-103

Fuente: VERDEZOTO D. (2017)

3.5.2. Modelo matemático.

Las fuentes de variación para este ensayo se elaboraron con un modelo de experimentación simple cuyo esquema es el siguiente:

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + \beta_j + a*\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

y_{ijkl} = El total de una observación

μ = Valor de la media general de la población

A_i = Efecto “i-esimo” del factor A

β_j = Efecto “j-esimo” del factor B

$A*\beta_{ij}$ = Efecto de la interacción del factor A por el factor B

ϵ_{ijk} = Efecto del error experimental

3.5.3. Análisis de varianza.

En la siguiente Tabla 5, se muestra el esquema del análisis de la varianza:

Tabla 5. *Analisis de varianza.*

Fuente de variación (FV)		Grados de libertad (GL)
Tratamiento	$(a * b - 1)$	5
Factor A	$(a - 1)$	2
Factor B	$(b - 1)$	1
Interacción A*B	$(a - 1) (b - 1)$	2
Error experimental	$(a * b) (r - 1)$	12
Total	$a * b * r - 1$	17

Fuente: VERDEZOTO D. (2017)

3.5.3.1. Población y muestra.

Para llevar a cabo esta investigación se realizó lo siguiente:

3.5.3.2. Característica del diseño experimental.

Para llevar a cabo esta investigación se realizó lo siguiente especificado en la Tabla 6:

Tabla 6. *Característica diseño experimental.*

Numero de tratamientos :	6
Numero de repeticiones :	3
Unidades Experimentales :	18

Fuente: VERDEZOTO D. (2017)

3.5.3.3. Tratamientos de la investigación.

En la Tabla 7 se detalla el esquema del experimento con los tratamientos, réplicas y unidades experimentales.

Tabla 7. *Esquema del experimento.*

Tratamientos	Códigos	Replicas	Unidades Experimentales	Subtotal
T ₁	a ₁ b ₁	3	1	3
T ₂	a ₂ b ₁	3	1	3
T ₃	a ₃ b ₁	3	1	3
T ₄	a ₁ b ₂	3	1	3
T ₅	a ₂ b ₂	3	1	3
T ₆	a ₃ b ₂	3	1	3
Total				18

Fuente: VERDEZOTO D. (2017)

3.6. Instrumentos de Investigación.

Los instrumentos de la investigación a aplicaron en el presente proyecto de investigación son los siguientes:

3.6.1. Materia prima.

La fruta se recolectó en la finca experimental “La Represa” de propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), provincia de Los Ríos, Quevedo-Ecuador. La recolección de la fruta madura se la realizó en la mañana, 24 horas antes del procesamiento, de forma manual con tijeras, se lavaron las frutas en agua clorada (100 ppm cloro) y se enjuagaron con agua potable. Se trocearon los frutos realizando 2 cortes longitudinales y 2 transversales y se separó manualmente la cáscara de las almendras. Para la extracción del exudado se utilizó un lienzo que sirvió para filtrar el mucilago mediante presión.

3.6.2. Preparación de medio de cultivo MRS Man Rogosa y Sharpe.

Este medio de cultivo es para el aislamiento de bacterias ácido lácticas, para su preparación se procedió a agregar 70 g del medio en un litro de agua destilada, se mezcla con agitador luego de esto se lo coloca en el calentador agitador, hasta que llegue a punto de ebullición durante un lapso de 15 ó 20 minutos, se verifica con la prueba de solidificación, una vez terminado se lo coloca a esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

3.6.3. Preparación del medio de cultivo Bilis Esculina.

Este medio de cultivo se usa para aislar e identificar un gran número de miembros del género *Enterococcus spp* y también estreptococos del grupo D, se lo preparo agregando 45gr en 1lt de agua destilada.

3.6.4. Preparación del agua de peptona como medio diluyente.

Se disolvió 3 g de agua de peptona en 3000 ml de agua destilada en un quitazato, se lo colocó en el agitador por 10 minutos hasta que se haya disuelto completamente se controló el pH de acuerdo a los criterios del fabricante, luego de esto se llevó a autoclave por 20 min, a 121 °C.

3.6.5. Aislamiento de las bacterias ácido lácticas.

El mucilago fermentado en tres tiempos diferentes se tomaron 10ml y se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-6} , se sembró por duplicado en cajas de petri conteniendo medios selectivos para bacterias ácido láctico: agar MRS de Man, Rogosa y Sharpe y agar Bilis Esculina. Las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia durante 48h a 37°C, las colonias seleccionadas fueron purificadas tres veces para obtener un cultivo puro de las colonias estas serán reproducidas en el mismo medio de cultivo y conservadas en refrigeración para ensayos posteriores

3.6.6. Identificación de los géneros.

Las cepas purificadas se las identifiqué de acuerdo a los criterios de su morfología. Las pruebas de identificación que se utilizó es la tinción de Gram que nos permitirá clasificarlas en bacterias Gram positivas y negativas.

3.6.7. Tinción de Gram.

Se recogió la muestra estéril con una aza, se hace el extendido en espiral sobre un portaobjetos, se deja secar a temperatura ambiente y se fija la muestra al calor (flameado 3 veces aprox.) y se siguen los siguientes pasos:

- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejará de color morado las bacterias Gram positivas.

- Enjuagar con agua destilada.
- Agregar lugol y esperar 1 minuto.
- Enjuagar con agua destilada.
- Agregar alcohol y acetona y esperar 15 segundos.
- Enjuagar con agua destilada.
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejará de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua destilada.
- Observar en el microscopio con el lente de inmersión 100x.

3.7. Tratamiento de los datos.

De la combinación de los factores y niveles mencionados en la Tabla 4 se obtuvieron los siguientes tratamientos:

Tabla 8. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Descripción
T ₁	Mucílago de cacao EET-103 a 24 horas de fermentación
T ₂	Mucílago de cacao CCN-51 a 24 horas de fermentación.
T ₃	Mucílago de cacao EET-103 a 48 horas de fermentación.
T ₄	Mucílago de cacao CCN-51 a 48 horas de fermentación.
T ₅	Mucílago de cacao EET-103 a 72 horas de fermentación.
T ₆	Mucílago de cacao CCN-51 a 72 horas de fermentación.

Fuente: VERDEZOTO D. (2017)

3.8. Recursos humanos y materiales.

La presente investigación se realizó con la asistencia del Director propuesto de la Tesis el Ing. Jorge Quintana ya que con él se ha establecido el tema y se llevó a cabo la tabulación de los datos obtenidos con el software libre que se utilizó para la comparación de las medias de los diferentes tratamientos.

3.8.1. Materia prima.

Cacao CCN-51 y EET-103.

3.8.2. Materiales.

- Cajas Petri.
- Lienzo.
- Tubos de ensayos.
- Matraces Erlenmeyer.
- Plástico parafilm
- Papel aluminio
- Mechero.
- Pipetas.
- Gasa.
- Algodón.
- Alcohol.
- Cloro.
- Marcador permanente.
- Agua destilada.
- Machete.
- Tijera.
- Frascos de plástico estériles.

3.8.3. Equipos.

- Incubadora.
- Bortex.
- Contador de colonias.
- Cabina de Bioseguridad Tipo II.
- Autoclave.

- Calentador –Agitador.

3.8.4. Insumos.

- Mucilago de cacao CCN-51.
- Mucilago de cacao EET-103.
- Agua.

3.8.5. Reactivos.

- Agar MRS.
- Agar Bilis esculina
- Agua peptona

3.8.6. Mediciones Experimentales.

- Recuento de bacterias lácticas en medios de cultivo MRS y BILIS ESCULINA.
- Observación de la morfología de las bacterias ácido lácticas.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados y discusión.

4.1.1. Efecto de los tiempos de fermentación del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L) Trinitario y Tipo Nacional (Factor A).

El efecto de los tiempos de fermentación del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) trinitario y nacional expresados en la tabla 9, si influyen estadísticamente en el crecimiento de *Lactococcus spp* a las 24 horas se observa un crecimiento de 1.80×10^5 UFC y a las 48 horas es donde se registra el mayor recuento de UFC siendo de $2,47 \times 10^5$ que va disminuyendo a las 72 horas con un recuento de 1.48×10^5 UFC. Mientras que los *Enterococcus spp* también difieren estadísticamente en los tres tiempos de fermentación en las comparación de medias con Tukey ($p>0.05$) y de acuerdo a la tabla 9, se observa que la mayor presencia de esta bacteria se encuentra a las 48 horas de fermentación con 3.31×10^5 UFC.

Tabla 9. Efecto de los tiempos de fermentación del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L) trinitario y nacional.

Microorganismos	24h. TF.	48h. TF	72h. TF	p>	E.E	\bar{x}
<i>Lactococcus spp.</i>	1.80×10^5 ^b	$2,47 \times 10^5$ ^c	1.48×10^5 ^a	0.0001***	0.07	$1,92 \times 10^6$
<i>Enterococcus spp.</i>	0.00×10^0 ^a	3.31×10^5 ^c	1.31×10^5 ^b	0.0001***	0.09	$1,31 \times 10^4$

TF=Tiempo de fermentación; h=Horas; E.E=Error Estándar; \bar{x} = media

Estos resultados se asemejan a los demostrados por Ardhana *et al.*, 2003 (44) quien señala que el crecimiento de las BAL (Bacterias ácido lácticas) mayormente comienza hasta después de 24 horas obteniendo su máximo a las 48 horas y partir de las 72 horas, después de este tiempo ocurre una disminución.

Estos resultados se comparan con lo descrito por Aldaz., 2005 (45) donde el mucílago de cacao cuyo pH ácido es debido a la presencia del ácido cítrico, constituye un medio muy

favorable al desarrollo de las levaduras , bajo el efecto de estas levaduras los azúcares de la pulpa son transformados en alcohol etílico con desprendimiento de anhídrido carbónico , donde la fermentación alcohólica provoca una elevación al mismo tiempo de pH y temperatura y es en donde las bacterias del ácido láctico comienzan a desarrollarse pero pronto la ruptura de las células de la pulpa y el desprendimiento de los jugos que resulta , permiten una mejor aireación y en ese momento intervienen y adquieren un gran desarrollo las bacterias acéticas que transforman por oxidación el alcohol en ácido acético . A partir del tercer día, es alcanzado el equilibrio entre las bacterias del ácido y las levaduras, habiendo sido la fermentación láctica de muy corta duración.

4.1.2. Efecto de las variedades de cacao en el Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Trinitario y Nacional (Factor B).

En la tabla 10, se expresa el efecto de las variedades de cacao en el aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) trinitario y nacional se observa que en la bacteria aislada (*Lactococcus spp*) no existió diferencia estadística, sin embargo hubo una mínima diferencia numérica donde se obtuvo una mayor cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en el mucílago de cacao EET-103 con 1.93×10^5 que en el mucílago de cacao CCN-51 con $1,90 \times 10^5$.

En cambio para *Enterococcus spp* si difieren estadísticamente en la comparación de medias según Tukey ($p > 0.05$) que de acuerdo lo expresado en la tabla 10 se encontró mayor presencia de UFC en el mucílago de cacao ETT-103 con $2,60 \times 10^5$, mientras que en el mucílago de cacao CCN-51 existió 0.48×10^5 .

Tabla 10. Efecto de las variedades de cacao en el Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucilago de cacao (*Theobroma cacao L.*) trinitario y nacional.

Microorganismos	Nacional (EET-103)	Trinitario (CCN-51)	p>	E.E	\bar{x}
<i>Lactococcus spp.</i>	1,93 x10 ⁵ a ^{1/}	1,90 x10 ⁵ a	0,7598ns	0.06	1,92x10 ⁵
<i>Enterococcus spp.</i>	2,60 x10 ⁵ b	0.48 x10 ⁵ a	0.0001***	0.07	1.54x10 ⁵

BAL= Bacterias ácido lácticas; EET-103= Variedad de cacao nacional perteneciente a la estación experimental Pichilingue; CCN-51 =Colección Castro Naranjal cacao clonado de origen ecuatoriano; 1/ Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p>0.05$); E.E=Error Estándar; \bar{x} = media.

Estos resultados se asemejan a los descritos por Bachmann *et al.* ,2012 (46) quien señala que *Lactococcus spp* se reproduce en gran una variedad de nichos mayormente en sustratos vegetales es por esto que esta bacteria no presenta ninguna alteración en cuanto a la variedad de mucilago de cacao estudiadas.

Estos resultados concuerdan con los descrito por Serna *et al* , 2006 (47) que revela que los representantes de este género (*Lactococcus spp*) son aislados principalmente en vegetales y de la piel de los animales por tanto se cree que su presencia en la leche se debe a la contaminación durante el ordeño , dado que el forraje representa la principal fuente de contaminación .Su presencia en el ser humano o animales es accidental debido a que no son normalmente encontrados en un número significativo en excrementos o en suelos.

En cambio los *Enterococcus spp* según lo señalado por González, 2010 (48) nos indica que esta bacteria se encuentra mayormente en agua, suelos, alimentos y también forman parte de la microbiota normal del hombre y otros animales, donde residen habitualmente en el tracto digestivo y genital.

4.1.3. Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L) Trinitario y Nacional.

En la tabla 11, se muestran los resultados de las interacciones de los factores A x B que mediante la comparación de medias según Tukey ($p > 0.05$) estas no difieren estadísticamente para *Lactococcus spp* pero si existe una diferencia numérica entre sus tratamientos que nos indica que dada las interacciones de sus factores se obtuvo un mayor recuento de UFC en el T3 ,T4 con $2,34 \times 10^5$ y $2,60 \times 10^5$. A diferencia que con *Enterococcus spp* que de acuerdo a la tabla 11 si existió diferencia estadística según Tukey ($p > 0.05$) donde nos señala que solo existió presencia de UFC en los tratamientos T3 , T5 y T6 siendo el T3 con el mayor recuento de UFC con $6,62 \times 10^5$, en cambio en los tratamientos T1,T2 y T4 no hubo presencia de esta bacteria.

Tabla 11. Aislamiento de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) Trinitario y Nacional.

M.	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	$\frac{P^*}{V \times TF}$	E.E	CV
<i>Lactococcus spp.</i>	$1,92 \times 10^5$ bc	$1,68 \times 10^5$ ab	$2,34 \times 10^5$ cd	$2,60 \times 10^5$ d	$1,53 \times 10^5$ ab	$1,43 \times 10^5$ a	0,0689	0,10	9,04
<i>Enterococcus spp</i>	-	-	$6,62 \times 10^5$ c	-	$1,19 \times 10^5$ b	$1,43 \times 10^5$ b	0,0001***	0,12	13,95

M=Microorganismos; $V \times TF$ =Variedades por tiempo de fermentación. T₁ = Mucílago de cacao EET-103 a 24 horas de fermentación.; T₂= Mucílago de cacao CCN-51 a 24 horas de fermentación.; T₃= Mucílago de cacao EET-103 a 48 horas de fermentación.; T₄= Mucílago de cacao CCN-51 a 48 horas de fermentación.; T₅= Mucílago de cacao EET-103 a 72 horas de fermentación.; T₆= Mucílago de cacao CCN-51 a 72 horas de fermentación; ^{1/} Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente, según Tukey ($p > 0.05$).

Estos resultados de las interacciones de los factores A x B son debidos a que según Rodarte, 2011 (49) durante la segunda fase de fermentación del cacao 48 horas es donde favorece al desarrollo de las bacterias lácticas esto es producto porque se fermentan carbohidratos residuales y posterior continúan el consumo de ácido cítrico. Sin embargo la bacteria aislada (*Enterococcus spp.*) presento presencia en la variedad EET-103 a las 48 horas de fermentación con $6,62 \times 10^5$ UFC/ML esto puede deberse al aporte glucósido que esta variedad de cacao le brinda a estas bacterias para su desarrollo ya que el aporte de azúcares reductores, fructosa y glucosa, no representan después de la fermentación más que aproximadamente el 25% del contenido inicial de sacarosa, en cambio en la variedad CCN-51 necesita 72 horas de fermentación para su crecimiento.

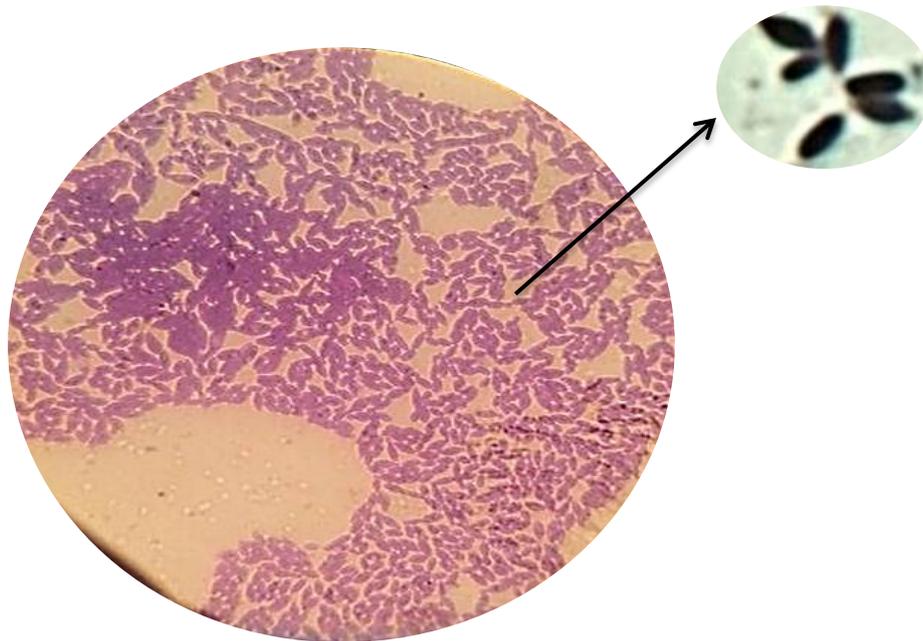
En cambio según Morales *et al.*,2015 (50) estos resultados pueden deberse a que al realizar mezclas de cacao criollo , trinitario y forastero se obtiene un bajo recuento de bacterias lácticas durante las 24 y 72 horas de haber iniciado la fermentación esto es producto ya que las bacterias a las 48 horas iniciales de la fermentación según Navia *et al.*,2011 (51) existe un aumento de pH(potencial de hidrogeno) productos de que se comienza a metabolizar el ácido cítrico principal acido orgánico de la pulpa (Mucilago) favoreciendo el desarrollo de bacterias lácticas que son tolerantes a esas condiciones y a la baja concentración de oxígeno.

4.1.4. Identificación de las de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) presentes en el mucílago de cacao (*Theobroma cacao L.*) Trinitario y nacional.

4.1.4.1. Tinción de Gram.

Una vez aisladas las treinta y seis cepas se procedió a realizar proceso de identificación mediante el método de Tinción de Gram observada en el microscopio con el lente de inmersión 100x que se detalla a continuación:

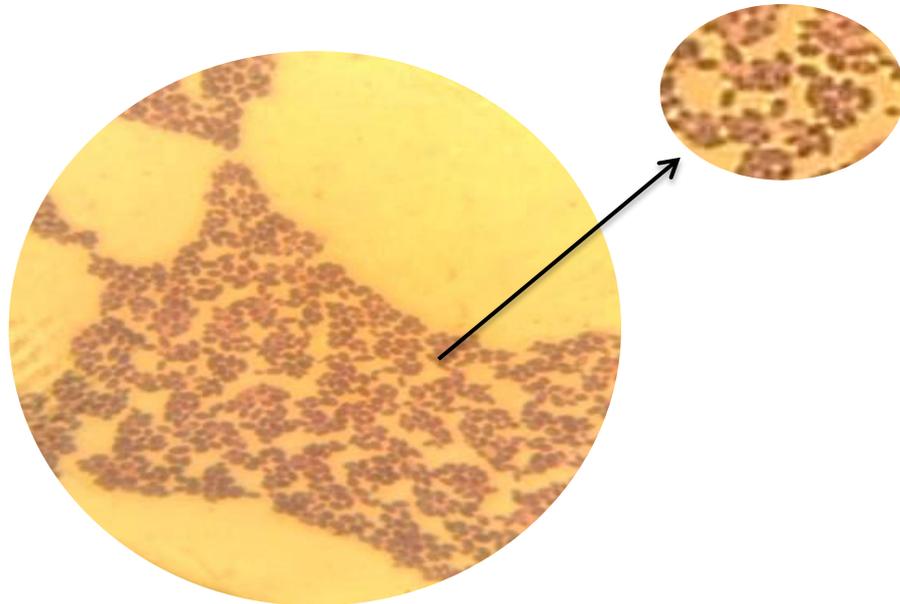
Figura 1. Observación microscópica de *Lactococcus spp.* en el medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe)



En la figura 1, se observa los resultados de la tinción de Gram el cual las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta característica principal de las bacterias lácticas, las bacterias encontradas son cocobacilos u ovoides, no móviles, microaerofilicas se encuentran individualmente , en parejas o en cadenas , algunas células de *Lactococcus spp.* Algunas células se extienden en forma de cadena lo que dificulta un poco su diferenciación de los lactobacilos.

Esta descripción se asemejan con los descritos por Samaržija *et al* ,2001 (52) que señalan que los lactococos son bacterias Gram-positivas microaerofilicas homofermentativas que crecen a una temperatura mayor de 10°C, pero no mayor a 45 y producen L (+) Ácido láctico de la glucosa. Se caracterizan por ser células ovoides que aparecen individualmente, en parejas o en cadenas. A menudo sucede que las células de lactococos se extienden en una cadena, lo que dificulta su diferenciación de lactobacilos, Muehler, 2005 (53) también nos describe a *Lactococcus spp* como una bacteria coco-bacilo Gram positiva de forma ovoide que se agrupa en pares y cadenas cortas.

Figura 2. Observación microscópica de *Enterococcus spp* aislada en el medio de cultivo *Bilis Esculina*.



En la figura 2, se observa a bacterias del genero *Enterococcus spp* de forma de cocos, no móviles, Gram positivas, microaerofilicas crecen en temperaturas alrededor de 37°C, se encuentran la mayoría agrupadas individualmente y algunas en pares. Esta descripción se asemejan a los descritos por PHIL, 2009 (54) donde se indica que las bacterias del genero *Enterococcus spp* son Cocos Gram-positivos se encuentran agrupadas en forma de racimos, cadenas cortas, diplococos y cocos solos, por otro lado Rollins,2004 (55) también nos muestra que *Enterococcus spp* son Cocos Gram-positivos no motiles que se encuentran agrupados en parejas o cadenas cortas, la mayoría son anaerobios facultativos.

Por otra parte Maza *et al*, 2004 (56) sustenta que los Enterococos son cocos Gram-positivos que pueden sobrevivir en condiciones duras en la naturaleza. Se pueden encontrar en el suelo, el agua y las plantas son cocos Gram-positivos que normalmente forman cadenas cortas o se disponen en parejas y que bajo ciertas condiciones de crecimiento pueden alargarse y aparecer como bacilares.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

- Se realizó el conteo microbiano de las bacterias ácido lácticas utilizando medios selectivos para cada una de ellas como fueron agar MRS y BILIS ESCULINA , obteniendo así presencia de las bacterias aisladas en el MRS en todos los tratamientos a diferencia del BILIS ESCULINA donde se obtuvo presencia de las bacterias en los tratamientos T3 , T4 Y T5.
- Según la morfología de las bacterias aisladas en los medios de cultivos selectivos obtuvieron se identificaron las bacterias del genero *Lactococcus spp* y *Enterococcus spp*
- Para el desarrollo o crecimiento de las bacterias acido lácticas su tiempo óptimo de reproducción es a las 48 horas, *para Lactococcus spp* existe presencia a las 24,48 y 72 horas de fermentación del mucilago de cacao siendo su máximo a las 48 horas, a diferencia de *Enterococcus spp* que solo se detectó presencia a las 48 horas en el cacao Tipo Nacional (EET-103) y a las 72 horas de fermentación del mucilago de cacao de origen Trinitario (CCN-51).
- Dado a los resultados obtenidos en esta investigación se concluyó que para *Lactococcus spp* la variedad de cacao no interfiere en su presencia ya que esta bacteria se encontró en las dos variedades de cacao estudiadas, en cambio para *Enterococcus spp* se obtuvo mayor presencia de unidades formadores de colonias en la variedad de cacao Tipo Nacional (EET-103) que en el cacao de origen trinitario (CCN-51).

5.2. Recomendaciones.

- Caracterizar estas bacterias aisladas para obtener por medio de este método si las bacterias encontradas en las materias primas estudiadas son de buena calidad y puedan ser utilizadas dentro del campo de la industria alimentaria.
- Estas bacterias aisladas se las puede utilizar dentro de la industria alimentaria como cultivo iniciador para la fabricación nuevos productos.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Literatura Citada.

1. H. GG. Revista Lideres. [Online]. [cited 2016 NOVIEMBRE 17. Available from: <http://www.revistalideres.ec/lideres/cacao-ecuatoriano-historia-empezo-siglo.html>.
2. Salvador HW. Estudio en la variacion del contenido de alcaloides en cacao de produccion durante el proceso de beneficio. In Salvador HW. Estudio en la variacion del contenido de alcaloides en cacao de produccion durante el proceso de beneficio. Guayaquil: INIAP Archivo Historico; 2002.
3. Gomez OB. Posibilidades de la utilizacion de los subproductos del beneficio del cacao. In CATIE BOI/. Memoria Seminario Regional Sobre Tecnologia Poscosecha Y Calidad Mejorada Del Cacao.: Bib. Orton IICA / CATIE.
4. Vallejo Torres A, Díaz Ocampo R, Morales Rodríguez W, Soria Velasco R, Vera Chang J, Baren Cedeño C. UTILIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO, TIPO NACIONAL Y. ; 7(1).
5. Rodarte MdCW. Microorganismos y Chocolate. 2011; 12(4).
6. BERROCAL DAMLHM. Evaluación de la actividad de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogur. World Wide Web. 2002 Diciembre; 52(4).
7. Cacao E. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture. Libro. American Institute for Cooperation on Agriculture.
8. BAQUERIZO MJG. “Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación”. Tesis. Quevedo: UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO, Facultad de Ciencias Pecuarias; 2012.
9. Hernandez A. Microbiología Industrial EUNED , editor.
10. Bedolla S, Dueñas Gallegos C, Esquivel Ibarra I, Favela Torres T, Guerrero Huerta R, Mendoza Madrid E, et al. Introduccion a la Tecnologia de Alimentos. 2nd ed. Mexico: Limusa.
11. Gilmartin H. Isolation: A Concept Analysis. , Nursing Forum; 2013.
12. Scott By. Diagnostico Microbiologico. 12th ed. Rodinone S, editor. Madrid:

Panamericana ; 2009.

13. Santambrosio E. Tinción y observación de microorganismos. Trabajo práctico. Universidad Tecnológica Nacional, Departamento De Ingeniería Química ; 2009.
14. Birgit Hadelar SS. Gelrite And Agar Differently Influence Cytokinin-Sensitivity Of A Moss. Artículo. Michigan: Journal of Plant Physiology; 2005.
15. ANECACAO. Historia del Cacao. Quevedo: Asociación Nacional de Exportadores e Industriales de Cacao del Ecuador; 2015.
16. Enríquez GA. Curso Sobre el Cultivo de Cacao. Libro. Turrialba: Centro Agronómico Tropical De Investigación Y Enseñanza ; 1995. Report No.: 9977-951-52-7.
17. Dostert N, Roque J, Cano A, La Torre M, Weigend M. Hoja botánica: Cacao. Lima. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Report No.: 1ed.
18. Yugcha Carpio V, Largo Tomalá SV. Elaboración de Néctar Natural de Cacao a Partir del Mucílago. Tesis Previo la obtención del Título de:Ingeniero en Alimentos. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica Y Ciencias De La Producción; 2016.
19. Turrialba. Notas sobre el cultivo de cacao. In CATIE BOI/, editor. Notas sobre el cultivo de cacao. Costa Rica; 1978.
20. Desarrollo Experimental Del Proceso para la Obtencion de Jugo Derivado del Mucilago de Cacao. Tesis de Grado. Bucaramanga: Universidad Industrial Santander , Escuela de Ingeniería Química; 2005.
21. Alaniz Zeledón Y, Arvizú Aráuz G, González Urrutia I. “Producción de postres y vinagres a partir de exudado de cacao en la cooperativa de servicios múltiples “Ríos de agua viva, 21 de Junio, municipio Rancho Grande Matagalpa. Protocolo de Investigación. Estelí: Universidad Nacional De Ingeniería, Recinto Universitario Augusto C. Sandino; 2012.
22. Gonzalez Ortiz , Jaimes Jaimes M. Desarrollo Experimental del Proceso para la Obtencion de Jugo Derivado del Mucilago de Cacao. Tesis de grado. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química; 2005.
23. Manual del Curso de Cacao. Libro. Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Fitotecnia; 1999.
24. Arango FS. Equipo para procesamiento de productos agrícolas IICA Biblioteca

Venezuela 1, editor.

25. Bib. Orton IICA / CATIE 1, editor. Curso sobre el cultivo del cacao.
26. Ramirez Ramirez JC, Rosas Ulloa P, Velasquez Gonzalez MY, Ulloa J, Arce Romero. Bacterias Lacticas :Importancia en Alimentos y sus efectos en la Salud. Revista. Nayarit: Universidad Autonoma de Nayarit , Centro de Tecnologia de Alimentos ; 2011.
27. Vazquez SM, Suarez H, Zapata S. Utilizacion de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias acido lacticas en la conservacion de la carne. Chilena de Nutricion. 2009;(64-71).
28. Mora Peñaflor , Garcia Guerrero A. Susceptibilidad de Bacterias Acido Lacticas (BAL) Frente a Diversos antibioticos. Tesis de Grado. Pachuca de Soto: Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Basicas e Ingenieria; 2007.
29. Gomez. EUFIC-ALIMENTACIÓN HOY EN DÍA. [Online].; 1999 [cited 2016 11 27]. Available from: <http://www.eufic.org/article/es/artid/bacterias-acido-lacticas/>.
30. Axelsson L. Lactic acid bacteria : Classification and Physiology. Publicacion. New York: Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research, Food Safety and Quality; 2004.
31. Bascomb S, Manafi. Use of Enzyme Tests in Characterization and Identification of Aerobic and Facultatively Anaerobic Gram-Positive Cocci. CLINICAL MICROBIOLOGY. 1998 April; 11(2).
32. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of. University of Northampton, School of Health; 2009.
33. Ibarra JAG. Identificacion de Bacterias Acido Lacticas Mediante Perfiles de Fermentacion y Ribotificacion. Tesis previo a la obtencion de licenciado en Quimica en Alimentos. Pachuca de Soto: Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Basicas e Ingenieria ; 2007.
34. PhD KT. Online Textbook of Bacteriology. [Online]. [cited 2017 Abril Sabado]. Available from: http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html.
35. Young-Joo Yi. Potential use of lactic acid bacteria *Leuconostoc mesenteroides* as a probiotic for the removal of Pb(II) toxicity. Microbial Physiology and Biochemistry. 2017 April; 55(4).

36. MD C. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. Institute of Food Research, Microbiology; 1990.
37. Limaymanta TC. Aislamiento E Identificación Bioquímica De *Carnobacterium Maltaromaticum* En Truchas Arcoíris (*Oncorhynchus Mykiss*) De Cultivo En El Departamento De Junín. Tesis de Grado. Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad De Medicina Veterinaria; 2014.
38. Bockelmann , Fusco V. The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. National Research Council of Italy. Germany: Institute of Sciences of Food Production, Microbiology and Biotechnology.
39. Ruoff KL. *Aerococcus*, *Abiotrophia*, and Other Aerobic Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci. 9th ed. In P. R. Murray EJBMLLJHJ&MAP, editor. Washington; 2007.
40. Jimenez JC. Las Bacterias. Presentación. ; 2011.
41. Elnaz Milani FSAMS. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Kurdish Cheese During Ripening using 16S rRNA Gene Sequence Analysis. Article. Cárdenas: Journal of Food Processing and Preservation; 2016.
42. Wassie MWaT. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from. Artículo. Debrezeit: Addis Ababa University, Veterinary Medicine and Agriculture; 2016.
43. Daniele R, Zanazzo V, Garnero PC, V. Nicolau V. Aislamiento Y Selección De Bacterias Ácido Lácticas Para La Obtención De Ácido Poliláctico A Partir De Lactosuero. Artículo. San Francisco, Córdoba, Argentina.: UTN Regional San Francisco, Av. de la Universidad 501; 2011.
44. Ardhana MM,FGH. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. International Journal of Food Microbiology. ; 2003.
45. Aldaz KOP. Estudio Del Comportamiento De Fructosa ,Glucosa Y Sacarosa En Almendras De Cacao De Producción Nacional Durante La Fermentación. Tesis de Grado. Riobamba : Escuela Superior Politecnica de Chimborazo , Ciencias Químicas ; 2005.
46. Bachmann H, Starrenburg MJ, Molenaar D, Kleerebezem M, Hylckama Vlieg JEv. Microbial Domestication Signatures Of *Lactococcus Lactis* Can Be Reproduced By Experimental Evolution. Article. Amsterdam, The Netherlands: Universiteit Amsterdam, Centre for Genomics of Industrial Fermentation; 2012.

47. Serna Cock , Rodríguez de Stouvenel A. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. *Revista Electronic Journal of Biotechnology*. Cali, Colombia : Universidad del Valle, Departamento de Ingeniería de Alimentos ; 2006.
48. González LMO. Enterococos: Actualización. Artículo de revista. La Habana : Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Ciencias Clínicas Y Patológicas; 2010.
49. Rodarte MdCW. Microorganismos y Chocolate. Artículo. UNAM, *Revista Digital Universitaria*; 2011.
50. Cesar Amilcar Alas Rivera. , Morales Solorzano AdS. Estandarizacion Del Proceso De Fermentacion De La Mezcla De Semillas De Tres Accesiones De *Theobroma Cacao* L. (Cacao) Del Cultivar San Jose Del Real De La Carrera Ubicada En El Departamento de Usulután. Tesis En Licenciado (A) En Química Y Farmacia.. El Salvador : Universidad De El Salvador , Facultad De Química Y Farmacia; 2015.
51. Navia Orcés AA, Pazmiño Piedra. Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación. Tesis de Grado. Guayaquil: Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción; 2012.
52. Samaržija D, Antunac , J. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. , *Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu* ; 2001. Report No.: UCD: 637.146.35.
53. Muehler A. *Lactococcus lactis*. Missouri : University of Science and Technology; 2005.
54. (PHIL) PHIL. Bacteria under Microscope. *Enterococcus faecalis*. Centers for Disease Control and Prevention; 2009.
55. Rollins DM. *Enterococcus* Summary. Maryland: University of Maryland; 2004.
56. Maza LM, MTPaJTS. *Color Atlas of Medical Bacteriology*. Washington: American Society for Microbiology Press; 2004.
57. BAQUERIZO MJG. “Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de. Tesis. Quevedo: UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO, Facultad de Ciencias Pecuarias; 2013.

CAPÍTULO VII
ANEXOS

7.1. Anexos.

Anexo 1. Resultados Obtenidos de la Tinción de Gram en el medio de cultivo MRS.

Cepa	Códigos	Respiración	Tiempo de crecimiento óptimo	Morfología /Tinción de Gram
1	T1R1	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
2	T1R2	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
3	T1R3	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
4	T2R1	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
5	T2R2	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
6	T2R3	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
7	T3R1	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
8	T3R2	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
9	T3R3	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
10	T4R1	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
11	T4R2	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
12	T4R3	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
13	T5R1	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
14	T5R2	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
15	T5R3	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
16	T6R1	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
17	T6R2	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo
18	T6R3	Mi	48h	Cocobacilo Gram Positivo

T: Tratamiento, R: Replica, Mi: Microaerofilia 5% CO₂, h: Horas.

En la Anexo 1, se indica el resultado obtenido al realizar la tinción de Gram a las cepas aisladas en el medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Shape) vistas a través del microscopio con el lente de inmersión 100x.

Anexo 2. Resultados Obtenidos de la Tinción de Gram en el medio de cultivo Bilis Esculina.

Cepa	Códigos	Respiración	Tiempo de crecimiento óptimo	Morfología /Tinción de Gram
1	T1R1	Mi	AUSENCIA	Coco Gram Positivo
2	T1R2	Mi	AUSENCIA	Coco Gram Positivo
3	T1R3	Mi	AUSENCIA	Coco Gram Positivo
4	T2R1	Mi	AUSENCIA	Coco Gram Positivo
5	T2R2	Mi	AUSENCIA	Coco Gram Positivo
6	T2R3	Mi	AUSENCIA	Coco Gram Positivo
7	T3R1	Mi	48h	Coco Gram Positivo
8	T3R2	Mi	48h	Coco Gram Positivo
9	T3R3	Mi	48h	Coco Gram Positivo
10	T4R1	Mi	48h	Coco Gram Positivo
11	T4R2	Mi	48h	Coco Gram Positivo
12	T4R3	Mi	48h	Coco Gram Positivo
13	T5R1	Mi	48h	Coco Gram Positivo
14	T5R2	Mi	48h	Coco Gram Positivo
15	T5R3	Mi	48h	Coco Gram Positivo
16	T6R1	Mi	48h	Coco Gram Positivo
17	T6R2	Mi	48h	Coco Gram Positivo
18	T6R3	Mi	48h	Coco Gram Positivo

T: Tratamiento, R: Replica, Mi: Microaerofilia 5% CO₂, h: Horas.

En la Anexo 2, se indica el resultado obtenido al realizar la tinción de Gram a las cepas aisladas en el medio de cultivo Bilis esculina vistas atravez del microscopio con el lente de inmersión 100x.

Anexo 3.Recolección de la materia prima en la Finca La Represa de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.



Materia prima utilizada, cacao EET-103 y cacao CCN51.

Anexo 4.Imágenes de la extracción del mucilago de cacao (*Theobroma Cacao* L.) trinitario y nacional para su posterior fermentación.



Extracción del mucilago de cacao y posterior proceso de fermentación.

Anexo 5. Preparación de los medios de cultivos MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y Bilis Esculina.



Preparación de los medios, envasado de las cajas de Petri con los medios de cultivos, cajas de Petri con los medios ya solidificados.

Anexo 6.Siembra de las muestras en los diferentes medios de cultivos.



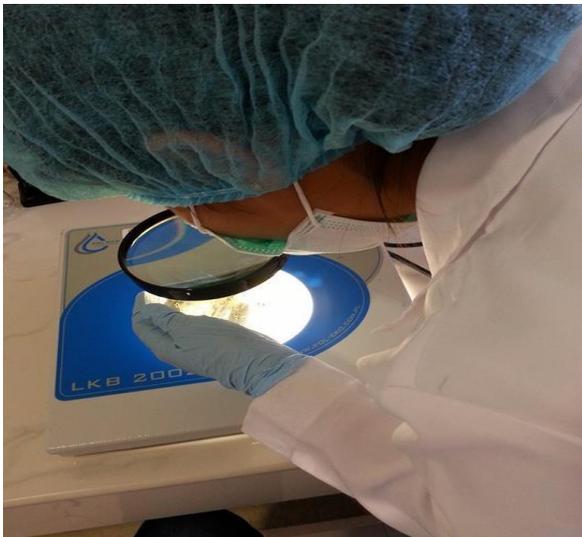
Diluciones seriadas de la muestra a estudiar ; siembra de las muestras a estudiar en los medios de cultivos MRS y Bilis Esculina.

Anexo 7. Proceso de incubación de las muestras.



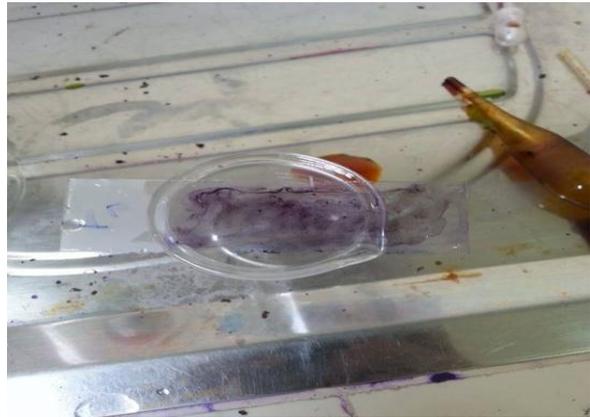
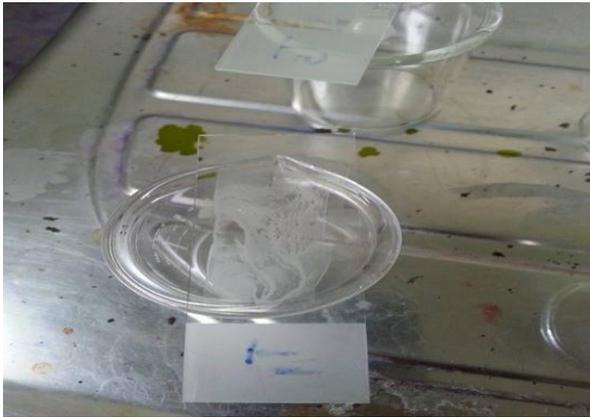
Muestras en la incubadora al 5%CO₂.

Anexo 8. Conteo Microbiano.



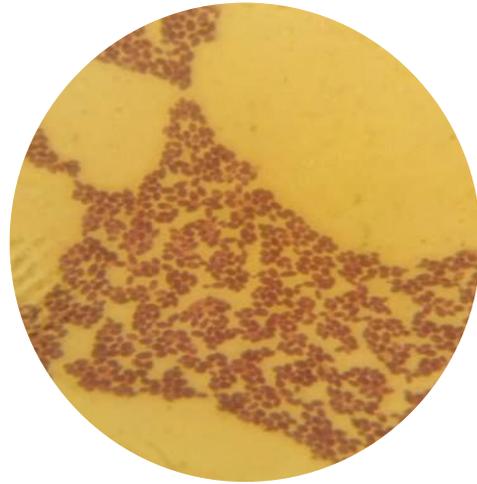
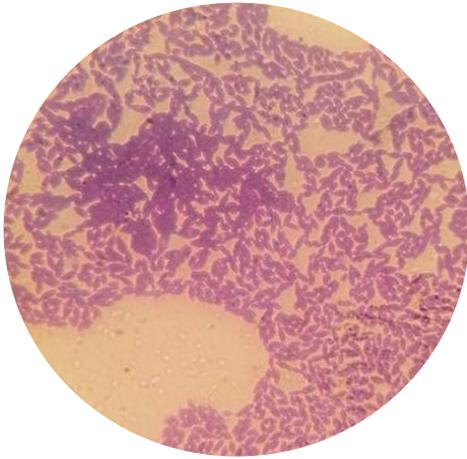
Muestras en el contador de colonias ; anotacion de los resultados del conteo microbiano.

Anexo 9.Preparación del frotis para la realización de la Tinción de Gram.



Tincion de gram ; vista de las muestras en el microscocopio con el lente de inmersión de 100x.

Anexo 10. Imágenes de *Lactococcus spp* y *Enterococcus spp*.



Lactococcus spp y *Enterococcus spp*.