

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN CULTIVO INICIADOR DE BACTERIAS LACTICAS
SOBRE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y
SENSORIALES EN LA ELABORACIÓN DE ENCURTIDO DE PIMENTÓN ROJO
(*Capsicum annuum* var. *grossum*)**

**DAVID FERNANDO DOSMAN VARGAS
MÓNICA VIZCAÍNO WAGNER**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
SANTIAGO DE CALI – COLOMBIA
2013**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN CULTIVO INICIADOR DE BACTERIAS LACTICAS
SOBRE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS Y
SENSORIALES EN LA ELABORACIÓN DE ENCURTIDO DE PIMENTÓN ROJO
(*Capsicum annuum var. grossum*)**

**DAVID FERNANDO DOSMAN VARGAS
MÓNICA VIZCAÍNO WAGNER**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero de
Alimentos**

**Dirigido por:
CRISTINA RAMIREZ TORO
PhD. en procesos biotecnológicos.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
SANTIAGO DE CALI - COLOMBIA
2013**

DEDICATORIA

Llega el punto que miras hacia atrás y ves todo el camino recorrido, lo gratificante que es, todos los conocimientos que has adquirido, ver que todos los esfuerzos culminan de la mejor forma y se vuelven una realidad, es una satisfacción enorme que quiero dedicar principalmente a Dios por llenarme de bendiciones y sabiduría para poder realizar este proyecto de la mejor manera, por colocar en mi vida a todas las maravillosas personas que me han acompañado en este proceso, que me ayudaron a llegar a ser lo que soy en este momento; a mis padres por brindarme el apoyo incondicional, por ser el motor de trabajar cada día, por ser todo un ejemplo de perseverancia y responsabilidad, por todo su cariño, y por su atención. A Xiomara Ramírez por todo su amor, por todos sus consejos de hacer las cosas con entrega, con pasión, por los ánimos de seguir adelante, y por su paciencia y comprensión. Y a todos mis compañeros y amigos de universidad que aportaron de una u otra manera en este bello proyecto.

David Dosman Vargas

A mis padres Gonzalo y Liliana por ser el pilar fundamental de la persona que soy, por su confianza, amor y apoyo incondicional, por ser la guía de mi camino y tan admirable ejemplo a seguir, por enseñarme que los grandes sueños se logran paso a paso, con esfuerzo y mucha dedicación. A mi familia y allegados por confiar en mí e inspirarme en cada momento. A Jaime por darme la fuerza para continuar cada día, por trabajar junto a mí para lograr cada sueño, por su comprensión y más que nada, por su gran amor. A Manuel, José y Roberto por su valiosa amistad en estos años y por no dejarme desfallecer en ningún momento. A todos aquellos que creyeron en mí, porque su confianza me llevó a trabajar cada día con mayor dedicación.

Mónica Vizcaíno Wagner

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Cristina Ramírez por ser una excelente directora, por darnos la confianza para emprender este proyecto, por todas las herramientas para desarrollarlo, por su asesoramiento, compañía continua y por convertirse en un ejemplo a seguir.

Al profesor German Bolívar por adoptarnos en su laboratorio y hacernos sentir como en casa, siempre bienvenidos.

Al grupo de investigación MIBIA por siempre estar ahí colaborándonos, a Jose Luis Plaza, Constanza Montalvo, Liliana Londoño, Claudia Rubiano, Edna Bolivar por ser un apoyo continuo, nuestros guías en todo momentos, aportándonos todos sus conocimientos para el desarrollo óptimo de la investigación, y yendo más allá, convirtiéndose en una familia.

A la Escuela de Ingeniería de Alimentos por aportar los recursos necesarios para el desarrollo de esta investigación y por la formación académica durante toda la carrera.

A la Universidad del Valle por formarnos en el camino hacia la integridad, profesionales con sentido de pertenencia y conscientes de nuestra realidad social.

Y a todos aquellos que de una manera u otra aportaron a que este proyecto se hiciera realidad.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	12
2.	JUSTIFICACIÓN	14
3.	OBJETIVOS	16
3.1.	General	16
3.2.	Específicos	16
4.	MARCO DE REFERENCIA	17
4.1.	Generalidades sobre el pimentón	17
4.2.	Conservación de alimentos	18
4.3.	Bioconservación de hortalizas	19
4.4.	Fermentación acidoláctica	20
4.4.1.	BAL encargadas de la fermentación	21
4.4.1.1.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	21
4.4.1.2.	<i>Lactobacillus plantarum</i> A6	22
4.4.2.	Medio de cultivo de los microorganismos	22
4.4.3.	Factores tecnológicos del proceso de fermentación	23
4.4.4.	Cambios fisicoquímicos y sensoriales durante el proceso de fermentación	24
4.4.4.1.	Color	24
4.4.4.2.	Textura	25
4.4.4.3.	Contenido de azúcares	27
4.4.4.4.	pH	28
4.4.4.5.	Actividad de agua y humedad	28
4.4.4.6.	Características sensoriales	29
4.4.4.7.	Normatividad	30
5.	ANTECEDENTES	31
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
6.1.	Materiales	32
6.1.1.	Materia prima	32
6.1.2.	Bacterias ácido lácticas	32
6.1.3.	Inóculo	33
6.1.4.	Fermentador	33

6.2. Métodos	34
6.2.1. Selección y preservación de microorganismos	34
6.2.2. Selección de medio óptimo de crecimiento	34
6.2.2.1. Estimación del modelo de superficie de respuesta polinomial canónico.....	35
6.2.2.2. Análisis estadístico	35
6.2.2.3. Análisis del crecimiento microbiano	36
6.2.2.4. Precio de la mezcla.....	36
6.2.3. Cinética de crecimiento en los medios de cultivo seleccionados	37
6.2.3.1. Viabilidad de microorganismos.....	37
6.2.3.2. Comportamiento del pH	37
6.2.3.3. Consumo de azúcares totales	38
6.2.3.4. Rendimiento de la cinética de fermentación	38
6.2.4. Fermentación de pimentón rojo con <i>L. plantarum</i> A6 y <i>L. mesenteroides</i>	39
6.2.4.1. Selección y acondicionamiento de materia prima	39
6.2.4.2. Preparación del inóculo	40
6.2.4.3. Fermentación ácido láctica del pimentón.....	40
6.2.4.4. Modelo estadístico para tres factores	42
6.2.5. Análisis sensorial	43
6.2.6. Análisis microbiológico del pimentón fermentado.....	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1. Selección y preservación de microorganismos	44
7.2. Determinación de medio óptimo de crecimiento	44
7.2.1. Bacterias acidolácticas	45
7.3. Cinética de crecimiento en los medios de cultivo seleccionados	47
7.3.1. Cinética de crecimiento	47
7.3.2. Comportamiento del pH	49
7.3.3. Comportamiento del consumo de azúcares totales	50
7.3.4. Sosténimiento de la viabilidad en el tiempo.....	50
7.4. Fermentación de pimentón rojo con <i>L. plantarum</i> A6 y <i>L. mesenteroides</i>	51
7.4.1. Comportamiento de los microorganismos en el proceso de fermentación del pimentón rojo	51
7.4.2. Consumo de azúcares totales	53
7.4.3. Variación del pH	54
7.4.4. Humedad y a_w	56

7.4.5. Variación en el color	59
7.4.6. Variación en la textura	62
7.5. Análisis microbiológico	64
7.6. Análisis sensorial	65
7.6.1. Prueba hedónica para Color, Aroma y Textura.....	65
7.6.2. Percepción de salinidad y acidez	66
7.6.3. Prueba de preferencia	67
8. CONCLUSIONES.....	68
RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS.....	78

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Precio promedio anual del pimentón (\$/kg).....	14
Tabla 2. Composición nutricional de 100g de contenido comestible de pimentón.....	18
Tabla 3. Factores influyentes en la calidad del encurtido.....	24
Tabla 4. Estudios relacionados con fermentación acidoláctica de fruta y hortalizas	31
Tabla 5. Costo de los componentes del medio de cultivo (\$/g)	36
Tabla 6. Cantidad de los componentes en los medios de cultivo evaluados.....	36
Tabla 7. Costo de un litro de medio (\$/L).....	37
Tabla 8. Cuadro comparativo de crecimiento en el tiempo para <i>L. mesenteroides</i> y <i>L. plantarum</i>	48
Tabla 9. Parámetros cinéticos de las cepas	48
Tabla 10. Estadístico P según fuente de variación para el crecimiento microbiano	53
Tabla 11. Estadístico P según fuente de variación para el contenido de azúcares	54
Tabla 12. Estadístico P según fuente de variación para pH.....	55
Tabla 13. Estadístico P según fuente de variación para humedad.	58
Tabla 14. Estadístico P según fuente de variación en parámetros de color	60
Tabla 15. Estadístico P según fuente de variación para Módulo de Young.....	63
Tabla 16. Análisis microbiológico de producto terminado	64

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía de barrido electrónico del <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	21
Figura 2. Microfotografía de barrido electrónico de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
Figura 3. Diagrama CIELab.....	25
Figura 4. Curva típica esfuerzo-deformación para un alimento sólido.	26
Figura 5. Pimentón variedad <i>Grossum</i>	32
Figura 6. Fermentador diseñado para fermentación láctica de hortalizas.....	33
Figura 7. Selección y acondicionamiento del pimentón.....	39
Figura 8. Diseño experimental fermentación pimentón.....	41
Figura 9. Proceso fermentación ácido láctica del pimentón.....	41
Figura 10. Colonias observadas en estereoscopio (a) <i>L. plantarum</i> (b) <i>L. mesenteroides</i>	44
Figura 11. Crecimiento bacteriano en los medios evaluados (a) <i>L. mesenteroides</i> y (b) <i>L. plantarum</i> transcurridas 24 horas de incubación	45
Figura 12. Gráfica de optimización del medio de cultivo para (a) <i>L. mesenteroides</i> y (b) <i>L. plantarum</i>	46
Figura 13 Cinética de crecimiento en MS y MRS para (a) <i>L. mesenteroides</i> y (b) <i>L. plantarum</i>	47
Figura 14. Comportamiento del pH en la cinética de crecimiento en MS y caldo MRS para (a) <i>L. mesenteroides</i> y (b) <i>L. plantarum</i>	49
Figura 15. Comportamiento de los azúcares totales en la cinética de crecimiento en MS y caldo MRS del (a) <i>L. mesenteroides</i> y (b) <i>L. plantarum</i>	50
Figura 16. Sostenimiento de viabilidad en el tiempo en MS y caldo MRS de (a) <i>L. mesenteroides</i> y (b) <i>L. plantarum</i>	51
Figura 17. Crecimiento de las BAL durante la fermentación de pimentón rojo.	52
Figura 18. Comportamiento del consumo de azúcares totales durante la fermentación de pimentón.....	54
Figura 19. Comportamiento del pH durante la fermentación de pimentón rojo con y sin cultivo iniciador de BAL	55
Figura 20. Comportamiento de la humedad durante la fermentación acidoláctica.....	57
Figura 21. Comportamiento de la a_w durante la fermentación acidoláctica.....	59
Figura 22. Pimentón después del proceso de fermentación.....	60
Figura 23. Representación química de la molécula del ácido láctico.....	61
Figura 24. Comportamiento del Módulo de Young durante el tiempo de fermentación... ..	62
Figura 25. Perfil sensorial producto del proceso de fermentación del pimentón	66
Figura 26. Prueba de preferencia de muestras de pimentón fermentado	67

ABREVIATURAS

a_w	Actividad de agua
CH	Contenido de humedad en base humedad (kg agua/ kg muestra)
r²	Coeficiente de correlación
BAL	Bacteria(s) acidoláctica(s)
MS	Medio seleccionado
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
SI	Sin inóculo
CI	Con inóculo

Resumen

Se evaluó el efecto de un cultivo iniciador con *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10880 y *Lactobacillus plantarum* ABBL A6 sobre algunas de las características fisicoquímicas microbiológicas y sensoriales en la elaboración de encurtido de pimentón rojo (*Capsicum annuum* var. *grossum*). Para llevar esto a cabo se optimizó el medio de cultivo del inóculo de fermentación de las dos bacterias a partir de suero de leche, leche entera en polvo, leche de soya, sacarosa y salvado de trigo, y se seleccionaron los más económicos y que presentaron una viabilidad por encima de 10^7 UFC/mL. Se realizó un diseño de mezclas en donde se variaron las proporciones de suero de leche y leche en polvo y se seleccionó el medio sin leche en polvo para los dos microorganismos, para caracterizar los medios se realizaron cinéticas de crecimiento. En el proceso de fermentación se estudió el comportamiento del pH, el consumo de azúcares, el crecimiento bacteriano, cambios en la textura, el color, la humedad y la actividad de agua de las muestras. A los 9 días de fermentación, la mayoría de los parámetros mostraron tendencia a estabilizarse, el pH estuvo por debajo de 3.7 y no se presentaron diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos después de este tiempo, la a_w estuvo por debajo de 0.91, la humedad en 87%, 90% y 93% para concentraciones de sal 15%, 10% y 5%, respectivamente y el color de las muestras con BAL se tornó a un rojo más intenso. El análisis sensorial coincidió con las pruebas instrumentales realizadas, la muestra más aceptada fue la de 10% de NaCl con cultivo iniciador, seguida por la del 5% con cultivo iniciador. Las cepas *L. mesenteroides* y *L. plantarum* A6 incubadas en el MS durante 12 y 18h, respectivamente, adicionadas en una salmuera al 10% de NaCl, sin agitación, a una temperatura de 32 °C, constituyen las mejores condiciones para la fermentación de pimentón rojo escaldado.

Palabras claves

Leuconostoc mesenteroides, *Lactobacillus plantarum*, fermentación, encurtidos, pimentón.

1. INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos ha sido una tarea de suma importancia para el ser humano desde los inicios de la humanidad. En sus orígenes, el hombre era cazador y recolector de frutos silvestres, y debía consumir sus alimentos de inmediato, dedicando gran parte de su existencia a esta actividad. (Barreiro y Sandoval, 2006). En la actualidad los avances tecnológicos han sido aplicados a la conservación de alimentos, uno de ellos es la fermentación en la producción de vegetales y bebidas fermentadas (Barreiro y Sandoval, 2006).

La fermentación es originaria de Oriente (China y Japón), siendo introducida a Europa y Estados Unidos donde ha sufrido innumerables adaptaciones. El valor nutritivo de los alimentos fermentados es muy poco alterado en comparación con los demás métodos de preservación. Ocurren pequeños cambios en el valor energético, minerales y vitaminas. De esta forma los alimentos fermentados ofrecen muchas de las cualidades nutritivas de las hortalizas frescas (Gioldoni, 1983). Las fermentaciones del ácido láctico son de gran importancia en la conservación de alimentos. El azúcar en el alimento puede ser convertido a ácido láctico y otros productos, y en tales cantidades que el medio circundante es controlado sobre otros microorganismos (Pares y Juarez, 2002).

Los alimentos fermentados por esta vía tienen un valor nutritivo alto, el sabor es potencializado y son inocuos. El ácido láctico es el principal producto de la fermentación y es el responsable del contenido ácido del producto. También se producen bacteriocinas, que actúan sobre bacterias patógenas como la *Listeria* y el *Clostridium* (Wood y Warner, 2003). El aspecto más interesante de las bacterias ácido lácticas en la fermentación es resaltar las características sensoriales, y reológicas como resultado de su actividad metabólica (Wood y Warner, 2003). Una de las aplicaciones de éste proceso es la elaboración de encurtidos o '*pickles*', estos son conservas de vegetales que se obtienen por dos procesos: cocción o fermentación. Pueden ser simples o mixtas, es decir, de una o varias hortalizas (Boucher, 1991).

Los encurtidos obtenidos por cocción son una mezcla de vegetales cocidos en un líquido de gobierno que contiene ácido acético, azúcar y otros aderezos (Boucher, 1991). Muchas industrias que procesan encurtidos no fermentan las hortalizas por medio de un cultivo iniciador, lo que se acostumbra es mantenerlas por algún tiempo en una salmuera de alta concentración; luego se preparan y se envasan, utilizando un líquido de gobierno a base de ácido acético (Boucher, 1991).

El pimentón (*Capsicum annum*) variedad *grossum*, es también conocido como pimienta dulce, es nativo de América, y su consumo está en crecimiento debido a la variedad de características que posee como color, forma, tamaño y sabores, y variedad en usos (Castro *et al.* 2007). Colombia tiene un área de cultivo de pimentón de 2,133 hectáreas, con una producción de 31,015 toneladas al año. (Acuerdo de competitividad, 2006). Según el área cultivada el principal departamento productor de pimentón en Colombia es el Valle del Cauca, con un área de 470 hectáreas, y con una producción de 7,930 toneladas al año, seguida por los departamentos de Antioquia y el Huila (Mitchell, 2012).

En este trabajo, la fermentación láctica se implementó para la elaboración de encurtido de pimentón haciendo uso de las BAL *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* como cultivo iniciador. El producto obtenido cumple con la calidad deseada y está bajo las tendencias actuales de consumo.

2. JUSTIFICACIÓN

El consumo de frutas y hortalizas ha aumentado, al igual que la demanda de productos frescos, con alto valor nutritivo, que promuevan la salud y estén listos para su consumo (Del Greco, 2010). En Estados Unidos y Europa se están realizando campañas para estimular e incrementar el consumo de frutas y hortalizas. En 1970 el consumo mundial anual per cápita de hortalizas era solo de 144 libras, para el 2000 aumentó un 30% con un consumo de 187 libras per cápita de hortalizas y legumbres. Para el año 2020 se espera un aumento del 7,2% en consumo de vegetales per cápita. En el caso específico del pimentón, en 1970 el consumo era de 2 libras por persona al año, para el 2000 aumentó a 7,3 libras por persona al año, y estas cifras siguen en aumento (Del Greco, 2010)

La producción primaria de alimentos en Colombia es escasamente remunerada, los precios bajos de venta de las hortalizas frescas en ocasiones pueden generar pérdidas económicas para los productores. El pimentón en fresco ha sufrido una variación en su precio en los últimos 5 años lo que ocasiona una inestabilidad en su mercado, en la Tabla 1 se puede observar la variación de precios desde el 2008 hasta la actualidad: (Corabastos, 2013).

Tabla 1. Precio promedio anual del pimentón (\$/kg)

Año	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Precio	\$8.927	\$9.586	\$10.773	\$10.940	\$5.284	\$2.173

Pasados 7 días de almacenamiento del pimentón en refrigeración se presentan cambios sensoriales significativos, y a los 11 días presentan un deterioro en su calidad fisicoquímica, lo que indica que la vida útil del pimentón fresco es corta, no siendo mayor a 11 días (Alvarado y Cabrera, 2010)

El procesamiento de las hortalizas mediante fermentación láctica reduce las pérdidas postcosecha y evita los altos costos de exportación de productos que debe asumir el

consumidor final por la corta vida útil del producto, y de esta forma le proporciona valor agregado.

El proceso industrial de producción tarda más de 35 días, ya que la fermentación se realiza naturalmente con la flora bacteriana presente en el alimento (Gioldoni, 1983). Los tiempos son largos y las características sensoriales de los encurtidos en ocasiones no son las más deseables, obteniéndose productos en su sabor, color y textura no aceptables. El uso de cultivos iniciadores acelera el proceso de fermentación garantizando un producto con excelentes características sensoriales, fisicoquímicas, y adicionalmente uniformes, además de ser un método de conservación económico en comparación con las tecnologías emergentes. La especie *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10880 produce aromas y sabores deseables, derivados de los ácidos, alcoholes y otros productos de la fermentación. El *Lactobacillus plantarum* ABBL A6 es una especie que produce grandes cantidades de ácido láctico en corto tiempo (Montaño, *et al.*, 1992)

3. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar el efecto de los cultivos iniciadores *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10880 y *Lactobacillus plantarum* ABBL A6 sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales en la elaboración de encurtido de pimentón rojo (*Capsicum annum* var. *grossum*).

3.2. Específicos

- Determinar la formulación óptima del medio de cultivo de los microorganismos iniciadores en función de la viabilidad de los microorganismos y del costo de cada mezcla.
- Analizar el efecto de las condiciones de fermentación en las características microbiológicas y fisicoquímicas de los encurtidos de pimentón rojo.
- Analizar el efecto de las condiciones de fermentación en las propiedades sensoriales de los encurtidos.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1. Generalidades sobre el pimentón

El pimentón (*Capsicum annuum*) variedad *grossum*, es también conocido como pimienta dulce, proviene de una planta herbácea anual que recibe su mismo nombre (Vallejo y Estrada, 2004). El pimentón es un fruto nativo de América, muy apetecido debido a la gran variedad de colores (variando desde verde, amarillo, naranja, rojo y púrpura), formas, tamaños y sabores característicos (Castro *et al.*, 2007).

Es un fruto hueco, con forma cónica o alargada, la pared del fruto puede ser gruesa o delgada. Existen dos grandes tipos de pimentón, los dulces y los picantes, estos varían en su forma, color, tamaño y sabor. Tiene una densidad de siembra de aproximadamente 3000 plantas por hectárea. La recolección de la cosecha se realiza entre 90 y 115 días después de la siembra y se prolonga entre 2 o 3 meses más. Se cultiva en climas cálidos entre 21 a 26°C, no toleran heladas. (FAO, 2006). En la Tabla 2 se observa la composición nutricional del pimentón.

El pimentón dulce es usado para elaborar productos deshidratados (páprika), encurtidos y rebanadas o discos congelados que son usados en pizzas, pastas y ensaladas crudas (Papageorge *et al.*, 2003) El consumo de estos productos se ha incrementado en los últimos años, debido a las actuales preferencias del consumidor por ingerir productos mínimamente procesados, como parte de hábitos saludables de alimentación. (Castro *et al.*, 2007). Esta hortaliza es una fuente natural de compuestos antioxidantes. Ha sido reconocido como un alimento benéfico para la prevención del cáncer y afecciones cardiovasculares, cuando se ingiere en cantidades adecuadas (Navarro *et al.*, 2004). Por su parte, la vitamina C presente es capaz de atrapar iones metálicos pesados, reaccionar con el oxígeno y radicales libres reduciendo la peroxidación (Navarro *et al.*, 2004).

Tabla 2. Composición nutricional de 100g de contenido comestible de pimentón

Agua	Carbohidratos	Fibra	Proteína	Lípidos	Energía	Potasio	Fosforo	Vitamina C
90.3g	6.4g	1.9g	1g	0.4g	33kcal	210mg	25mg	131mg

Fuente: Tablas de composición de alimentos: Moreiras *et al.* (2007)

4.2. Conservación de alimentos

El pimentón, como la mayoría de las frutas y los vegetales, tiene una vida útil muy corta, pierde agua rápidamente limitando su longevidad y puede empezar a presentar pérdida de turgencia entre 3 y 5 días a 20°C, perdiendo entre 2.2% y 3.0% de su peso (Lownds *et al.*, 1993).

De acuerdo a la definición de la FAO, la preservación de los alimentos consiste en prevenir o evitar el desarrollo de microorganismos indeseados, para que el producto no se deteriore durante el almacenaje. En cuanto a la conservación, es el conjunto de tratamientos que prolongan la vida útil de los alimentos, manteniendo sus atributos de calidad, en parámetros como color, textura, sabor y su valor nutricional (FAO, 2013).

Se han desarrollado distintas tecnologías que permiten la conservación del alimento, dentro de éstos se encuentran el uso de tratamientos térmicos, agentes químicos, empaque, radiación ionizantes, altas presiones hidrostáticas, tecnología de barreras, entre otros (Zhou, *et al.*, 2010).

El escaldado del pimentón contribuye a la reducción de la carga microbiana y la inactivación de enzimas (Cano, 1996). Algunos cambios ocurridos en la distribución y almacenamiento de los vegetales son debidos a las reacciones de deterioro que son catalizadas por enzimas, como peroxidasas (POD), polifenol oxidasa (PPO) y pectina metilesterasa (PME). Sin embargo, el tratamiento térmico causa también pérdidas de atributos sensoriales (textura, sabor, olor y color) y calidad nutricional, como la reducción del contenido de ácido ascórbico (Castro *et al.*, 2007).

4.3. Bioconservación de hortalizas

El mercado global de los alimentos, nuevos procesos de fabricación y la creciente demanda de mínimamente procesados, pueden requerir cadenas alimentarias más largas y complejas, lo que aumenta el riesgo de contaminación microbiológica (García, *et al.*, 2010). Debido a esto, la bioconservación ha traído la atención de la industria de alimentos como un sustituto potencial de los procesos industriales actuales.

La aplicación de bacteriocinas como bioconservantes en vegetales comenzó hace aproximadamente 25 años. Actualmente, estudios se han centrado en la inhibición de microorganismos patógenos para los humanos; la aplicación de bacteriocinas ha representado una buena alternativa como sustituto a los compuestos químicos y antibióticos (Balciunas, *et al.*, 2013).

Las BAL, responsables de la fermentación láctica, poseen características metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal y tolerancia a la alcalinidad y acidez (Ramírez, 2005). Los vegetales representan una fuente importante de bacterias lácticas como los del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, entre otros, sin embargo también representan un riesgo sanitario alto en la medida que pueden contener bacterias del género *Yersinia*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Pseudomonas* y *Listeria* (Monroe y Tarazona, 1981).

En la industria, la fermentación de hortalizas se realiza con los microorganismos presentes en el producto (Chang y Chang, 2011). Algunas bacterias acidolácticas incluyen *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum* y *Lactobacillus plantarum* que han sido sugeridas como cultivos iniciadores para la fermentación de vegetales (Ji *et al.*, 2012).

La fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles y produce moléculas orgánicas que pueden presentar actividad antimicrobiana, siendo las más comunes el ácido láctico, acético y propiónico. No obstante, también se conoce que las bacterias ácido lácticas producen otras sustancias antagónicas, como son el peróxido de hidrógeno

(H₂O₂), reuterina, dióxido de carbono (CO₂), diacetilo (2,3-butanodiona), acetaldehído y compuestos de alto peso molecular como las bacteriocinas (Ramírez, 2005).

El uso de cultivos iniciadores no solo evita la proliferación de microorganismos que deteriore el producto si no que se obtiene uno con mayor calidad sensorial, y homogéneo. Los procesos de fermentación controlada alcanzan las características deseables del producto en un menor tiempo que los procesos de fermentación natural.

4.4. Fermentación acidoláctica

En el proceso de fermentación ocurren varios tipos de cambios en el alimento de estudio, los cuales pueden ser físicos, químicos, y microbiológicos:

- Físicos: En las primeras 48 a 72 horas el cambio de textura ocurre debido a la difusión osmótica de azúcares, proteínas, minerales y otras sustancias hacia la salmuera, éstas actúan como alimento de las bacterias productoras de ácido láctico y otros microorganismos, por consecuencia, el alimento pierde peso y se produce un arrugamiento de la hortaliza (García *et al.*, 2004), es decir, se genera una deshidratación osmótica.
- Químicos: El azúcar contenido en el alimento se transforma a ácido láctico por las bacterias fermentativas, también se transforman en pequeñas cantidades de ácido acético, estos dos ácidos son los responsables de la auto conservación, se producen también otros compuestos en menor proporción como alcoholes y ésteres, anhídros carbónicos e hidrógeno (García *et al.*, 2004).
- Microbiológicos: La cepa *Leuconostoc mesenteroides*, considerado como GRAS (Generalmente Reconocida Como Segura, por sus siglas en inglés); en el inicio del proceso predomina por encima de las demás. Esta bacteria se cultiva en medios hipersacarosados produciendo grandes cantidades de exopolisacaridos de grado alimenticio como el dextrano (García *et al.*, 2004).

4.4.1. BAL encargadas de la fermentación

4.4.1.1. *Leuconostoc mesenteroides*

Este microorganismo es anaeróbico facultativo, requiere factores complejos de crecimiento y aminoácidos (Han *et al.*, 2013). Son bacterias Gram positivas, y no móviles. Como se muestra en la Figura 1, la mayoría de las bacterias tienen forma de cocos, se producen solos o en pares y cadenas cortas, sin embargo, la morfología puede variar con las condiciones de crecimiento. Los miembros de este género son típicamente BAL heterofermentativas que producen D-lactato, dióxido de carbono, etanol y acetato. Su temperatura óptima de crecimiento va entre 20 y 30°C, con un intervalo de pH entre 4,5 y 8 (Montaño *et al.*, 1992). Estas bacterias han tenido la mejor respuesta en el proceso de elaboración de *Kimchi* (Jung, *et al.*, 2011, Ji, *et al.*, 2012), un producto fermentado típico coreano elaborado a partir de coles chinas.

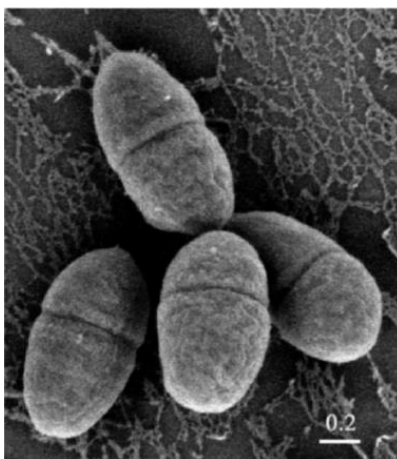


Figura 1. Microfotografía de barrido electrónico del *Leuconostoc mesenteroides*
Fuente: (Kalchayanand *et al.*, 2002)

Además se conoce que el *Leuconostoc mesenteroides* produce manitol, un poliol natural utilizado como edulcorante en productos para diabéticos que imparte un sabor refrescante con propiedades anti carcinogénicas, y que presenta altos niveles en la fermentación del *kimchi* a través de la reducción de la fructosa (Groben, 2001).

4.4.1.2. *Lactobacillus plantarum* A6

Este microorganismo está clasificado como homofermentativo facultativo debido a que posee las enzimas para realizar la fermentación a partir de glucosa y fructosa produciendo un sólo tipo de ácido. Su temperatura óptima de crecimiento va entre 30 y 35°C, con un intervalo de pH entre 3,8 – 7,5 (Montaño et al, 1992). se conoce su origen en África y es una de las mayores productoras de ácido láctico, por lo cual tolera bajos pHs (Giraud, et al., 1994). También se ha comprobado que puede metabolizar manitol para producir ácido láctico (Montaño, et al., 1992). Tiene una gran capacidad biosintética y una excelente adaptación en medios que tienen gran cantidad de nutrientes y fuentes energéticas (Georgieva, et al., 2009). Debido a su genoma 50% más grande que la mayoría de BAL posee una mayor capacidad metabólica (Vásquez, 2008). Muy comúnmente se encuentran en la mayoría, si no todos, los vegetales junto a otras bacterias lácticas. En la Figura 2 se observa la morfología de bacilos de la bacteria.

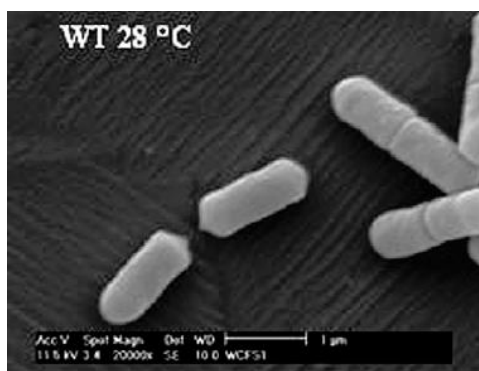


Figura 2. Microfotografía de barrido electrónico de *Lactobacillus plantarum*.
Fuente: Capozzi et al., 2011

4.4.2. Medio de cultivo de los microorganismos

Los microorganismos presentes en los alimentos necesitan las siguientes sustancias para multiplicarse y desarrollar sus actividades con normalidad: Agua, fuente de energía, fuente de nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento relacionados, y minerales (Monroe y Tarazona, 1981).

Las BAL se asocian a hábitats ricos en nutrientes, como son diversos productos alimenticios tales como leche, carne, bebidas, granos y vegetales (Mora y García, 2007). A continuación se listan los sustratos utilizados en la presente investigación.

Suero de leche: Tiene como principal fuente de carbono la lactosa que es utilizada por los microorganismos para transformarla en ácido láctico en una primera fermentación. El contenido de proteínas es alto, lo que lo hace un buen medio para los microorganismo que necesitan aminoácidos y son capaces de hidrolizar las proteínas (García *et al.*, 2004). Algunos microorganismos también producen a partir del suero pequeñas cantidades de ácido acético y dióxido de carbono (Urribarri *et al.*, 2004).

Leche en polvo: Aporta proteínas y lactosa a la mezcla, géneros de bacterias como *Lactobacillus* transforma estos nutrientes para desarrollar características de sabor en el producto (Hernández y Sastre, 1999).

Leche de soya: Es rica en aminoácidos esenciales y vitaminas, es un alimento concentrado de proteínas, recomendable para el metabolismo celular (IESN, 2001). También posee oligosacáridos como la rafinosa y estaquiosa que favorecen el crecimiento de las BAL debido a su capacidad de metabolizar estos carbohidratos durante la fermentación (Yeo *et al.*, 2011)

Sacarosa: Es utilizada como fuente de carbono

Salvado de trigo: Actúa como soporte físico de los microorganismos, es decir, como plataforma para asentamiento de las colonias.

4.4.3. Factores tecnológicos del proceso de fermentación

Las propiedades fisicoquímicas de los vegetales varían ampliamente. En la Tabla 3 se mencionan los diferentes factores que influyen sobre la calidad de alimentos fermentados (Doyle, 1997).

Tabla 3. Factores influyentes en la calidad del encurtido

Factor influyente	
Calidad de la materia prima	- Condiciones de almacenamiento, transporte y recolección - Uso de pesticidas y fertilizantes, calidad del suelo, clima - Grado de madurez - Variedad
Factores tecnológicos	- Tratamientos previos: Limpieza y pelado, trat. térmico, y álcalis - Ajuste del pH - Tamaño del vegetal: Entero, agujereado, troceado - Fermentador: Dimensión, material - Temperatura: Calentamiento, enfriamiento - Anaero-biosis: Tapado, potencial redox
Microbiología	- Flora original y ambiental - Cultivo iniciador - Inhibidores: Componentes de los vegetales y residuos
Ingredientes / aditivos	- Conservantes, azúcares, NaCl, hierbas y especias

Se debe verificar que no haya presencia de levaduras y hongos en los recipientes en que se va a realizar la fermentación o que hayan crecido en la superficie de las salmueras. Entre las levaduras alterantes más habituales se encuentran la *Debaryomyces hansenii* y *Pichia membranaefaciens* (Doyle, 1997).

4.4.4. Cambios fisicoquímicos y sensoriales durante el proceso de fermentación

4.4.4.1. Color

La escala de color CIELab está organizada en forma cúbica. El eje L* atraviesa el cubo verticalmente. El valor máximo de L* es 100, lo que representa que el material es un difusor perfecto que refleja, es decir, iluminación completa. El mínimo es cero, que representa al color negro. Los ejes a* y b* no tienen límites numéricos, un valor positivo de a* indica color rojo, negativo es verde. Un valor positivo de b* es amarillo y negativo es azul. En la Figura 3 se muestra el diagrama CIELab (HunterLab, 2008).

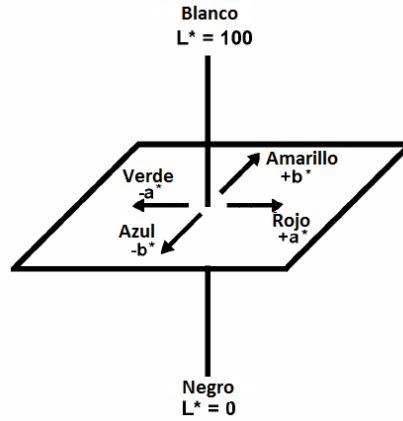


Figura 3. Diagrama CIE Lab.

Fuente: HunterLab (2008)

La tolerancia en los cambios de color se evalúa con los valores Δ de cada parámetro L^* , a^* o b^* (Ecuaciones 1, 2 y 3) calculado respecto a valores estándar. La diferencia total del color, ΔE^* , es un valor único que indica el cambio en los tres parámetros L^* , a^* y b^* al mismo tiempo, con respecto a una muestra estándar. ΔE^* se halla utilizando la Ecuación 4 (HunterLab, 2008).

$$\Delta L^* = L^*_{muestra} - L^*_{estandar} \quad (1)$$

$$\Delta a^* = a^*_{muestra} - a^*_{estandar} \quad (2)$$

$$\Delta b^* = b^*_{muestra} - b^*_{estandar} \quad (3)$$

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (4)$$

La importancia de la medición del color y de los parámetros ópticos en los alimentos radica principalmente en la aceptación por parte del consumidor (Arce-Lopera, *et al.*, 2013). Mantener los colores vivos y de apariencia de productos frescos es el objetivo principal de los estudios relacionados con las características ópticas de los alimentos. La conservación de algunos nutrientes y compuestos funcionales puede determinarse a través del estudio del deterioro o conservación del color (Idham, *et al.*, 2012).

4.4.4.2. Textura

La textura de un alimento tiene un conjunto de atributos que aportan al alimento sus propiedades de textura. La percepción de la textura depende de la actividad muscular (cinestesia): tacto y presión. Como normalmente trabajan juntos en la percepción de la

textura, resulta muy difícil distinguir la parte que corresponde a cada uno (Bello, 2000). Los ensayos que se realizan sobre los alimentos buscan encontrar la relación que existe entre las acciones mecánicas a las que pueden ser sometidos y los efectos de su deformación (Contento, *et al.*, 2009). Por ejemplo Bengtsson y colaboradores (2011), en su estudio, mencionan la relación que existe entre la textura de un alimento y su contenido y estructura fibrosa. La morfología de la fuente de la fibra parece ser el factor principal en los parámetros de textura.

La textura en alimentos fermentados se ve afectada en la medida que las enzimas producidas por los microorganismos pueden modificar la estructura del alimento. Las BAL contribuyen a mantener la calidad textural de los alimentos fermentados, ya que los metabolitos producidos en el proceso resultan en beneficio de dicha característica (Bello, 2000).

Entre las acciones mecánicas se encuentran aquellas relacionadas con la fuerza y su modo de aplicación sobre un área, es decir, el tipo de esfuerzo, que pueden depender del tiempo o no (Contento *et al.*, 2009). Uno de los posibles análisis consiste en la determinación del Módulo de Elasticidad y la relación esfuerzo-deformación del alimento.

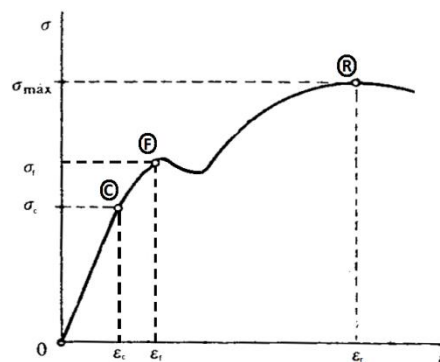


Figura 4. Curva típica esfuerzo-deformación para un alimento sólido.

Fuente: Contento, *et al.* (2009)

Una curva como la ilustrada en la Figura 4 es característica para alimentos que tienden a ser sólidos, como frutas y vegetales, cuando son sometidos a ensayos de compresión. El punto C, es el punto de cedencia, que representa el cambio de comportamiento lineal, es decir, que el material pasa del comportamiento elástico al plástico. El punto F es el punto de biofluencia, que puede ocurrir en cualquier punto más allá del punto C, donde la curva

se aparta de su tendencia lineal, en éste ocurre un incremento en la deformación con un decrecimiento o ningún cambio en el esfuerzo. En muchos materiales biológicos, la presencia de este punto indica que hay ruptura celular en la estructura interna del material. El punto R es el punto de ruptura del material, que indica una fractura macroscópica en la muestra. La distancia entre los puntos de biofluencia y ruptura determina el grado de fragilidad del material (Contento, *et al.*, 2009).

La parte lineal de la Figura 4, permite calcular el módulo de Young o elasticidad lineal (Ecuación 5). Este módulo está asociado a la energía de los átomos y es una medida de rigidez del material:

$$\text{Módulo de Young o elasticidad} = \frac{\text{Esfuerzo}}{\text{Deformación}} \quad (5)$$

4.4.4.3. Contenido de azúcares

Los carbohidratos se clasifican de acuerdo con el número de átomos de carbono y el tipo de grupo carbonilo que contienen (Mc Murry, 2008). Los principales carbohidratos existentes en la mayoría de los vegetales son glucosa, fructosa y sacarosa (Montaño, *et al.*, 1992). Como ha mencionado, la producción ácida a partir de una determinada cantidad de azúcar es generalmente menor en una fermentación heteroláctica que en una homoláctica. Si consideramos el caso en que se fermenten iguales cantidades de glucosa y fructosa, y la fructosa se reduce cuantitativamente a manitol, se tendría lo siguiente:

a) Bacterias homofermentativas

- 2 Glucosa → 4 Láctico
- 2 Fructosa → 4 Láctico

b) Bacterias heterofermentativas

- 2 Glucosa → 2 Láctico + 1 Acético + 1 Etanol + 2 CO₂
- 2 Fructosa → 2 Manitol

Por lo anterior, la cuantificación de los azúcares presentes en el medio de fermentación representa una información importante a fin de lograr caracterizar el proceso. La

cuantificación de azúcares totales está descrito por el método de Dubois, (1956), conocido como el método de Antrona.

4.4.4.4. pH

Algunos alimentos tienen una acidez propia, y otros es debido a la actividad de ciertos microorganismos. Esta última acidez se conoce como acidez biológica y caracteriza a algunos alimentos (Monroe y Tarazona, 1981). La mayor parte de las hortalizas presentan pHs mayores que los de las frutas, en consecuencia, las primeras son más fácilmente alterables por bacterias que las frutas. El descenso del pH se ha utilizado como un método de conservación, uno de ellos es la adición de vinagre, cuyo principal componente es el ácido acético. (Guerra-Vargas, *et al.*, 2001).

El fenómeno de conservación se debe a que cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma de las células microbianas se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad (Henao, 2010).

Muchos de los microorganismos crecen mejor a pHs cercanos a la neutralidad, aunque unos cuantos pueden desarrollarse a pHs por debajo de 4.0 (Monroe y Tarazona, 1981). El pH mínimo de crecimiento de algunos lactobacilos depende del tipo de ácido que se utilice para lograr la acidificación del medio. (Monroe y Tarazona, 1981).

4.4.4.5. Actividad de agua y humedad

En un alimento la actividad de agua está relacionada a la humedad relativa del espacio que lo rodea. La actividad de agua, a_w , es el cociente entre la presión parcial de vapor de agua contenida en el alimento (P_a) y la presión parcial de vapor del agua pura (P_0) a una

temperatura determinada (Bello. 2000). Éste término significa una medida indirecta del agua que hay disponible en el alimento que ocurran reacciones.

La variación de la presión osmótica generada por la sal puede causar daños a la célula bacteriana. Medios hipertónicos generan, por ósmosis, la salida de agua del interior de la bacteria ocasionando un efecto bactericida (Montoya-Villafañe, 2008), además el ion cloruro es tóxico para algunos microorganismos (Goulas y Kontominas, 2005).

Por regla general, las bacterias Gram negativas tienen más necesidades de agua que las positivas. La mayoría de las bacterias alterantes no se multiplican por debajo de una a_w igual a 0.91 (Monroe y Tarazona, 1981).

Según Lee (2012), al emplear cloruro de sodio como reductor de a_w son necesarias concentraciones muy elevadas para disminuir este parámetro por debajo de 0.80.

4.4.4.6. Características sensoriales

La evaluación sensorial puede ser definida como el análisis que se realiza al producto a través de los sentidos del hombre, los cuales perciben, integran e interpretan las características organolépticas del producto, involucrando además aspectos culturales, psicológicos y fisiológicos (Contento, *et al.*, 2009).

Las pruebas de análisis sensorial se dividen en dos grandes grupos, pruebas objetivas y subjetivas. Las pruebas que están dirigidas a la aceptación o rechazo del consumidor por el producto o por atributos de éste se encuentran dentro de las pruebas subjetivas (Contento, *et al.*, 2009), éstas se subdividen en:

- *Pruebas de preferencia:* se desea conocer la preferencia del consumidor por una muestra sobre la(s) otra(s).
- *Pruebas de grado de satisfacción o de aceptabilidad:* se desea conocer el nivel de gusto por el producto. Se relaciona con estados y grados de placer. La escala se construye con expresiones gramaticales que indican el grado de gusto o disgusto.

4.4.4.7. Normatividad

El ICONTEC establece unas recomendaciones en el producto terminado dado por la NTC 4810 para pepinos encurtidos, la cual es equivalente a la del CODEX 115:81.

La resolución 2155 de 2012 establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las hortalizas que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional; definiendo aquí qué es una hortaliza encurtida, sus requisitos generales, fisicoquímicos, y microbiológicos.

5. ANTECEDENTES

Las evidencias escritas más antiguas de la fermentación ácido-láctica de los vegetales datan del primer siglo d.C., en donde Plinio describió la conservación del repollo en vasijas de barro. En la actualidad se sabe que este proceso conlleva a la fermentación ácido láctica del repollo para obtener repollo ácido o también conocido como chucrut (Doyle, 1997).

Estudios han encontrado que las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus plantarum* son capaces de aprovechar los azúcares presentes en los vegetales, produciendo una fermentación altamente eficiente, presentando excelentes características sensoriales y manteniendo los nutrientes propios de cada vegetal (Quintero y Ramírez, 2007). En la Tabla 4 se muestran las investigaciones más recientes donde se han aislado las especies más comunes de bacterias lácticas autóctonas en frutas y vegetales, y se han utilizado para la fermentación de las mismas.

Tabla 4. Estudios relacionados con fermentación acidoláctica de fruta y hortalizas

Alimento	Microorganismo / Observaciones	Referencia
Tomates, calabacines, zanahorias, pepinos, berenjenas, remolachas, alcaparras rojas, piña, ciruelas, kiwi, papaya, cerezas, pimentón, lechuga	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Di Cagno <i>et al.</i> , 2008a, 2008b, 2010a, 2011a, 2011b; Pulido <i>et al.</i> , 2012; Plenghvidhya <i>et al.</i> , 2007; Sanchez <i>et al.</i> , 2000; Tamminen <i>et al.</i> , 2004
Coles blancas, zanahorias, pimentón, pepinos, berenjenas, lechuga, cerezas	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Lee <i>et al.</i> , 2011; Plenghvidya <i>et al.</i> , 2007; Sanchez <i>et al.</i> , 2000; Di Cagno <i>et al.</i> , 2008a, 2009, 2011a
<i>Kimchi</i> (plato típico de la gastronomía coreana que usa como ingrediente básico la col china)	<i>L. mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Weissella</i> / Reducción del tiempo de fermentación	Jung <i>et al.</i> , 2011
Pimentón rojo	<i>L. mesenteroides</i> y <i>L. plantarum</i> . / Preservación del color e incremento en la firmeza.	Di Cagno <i>et al.</i> , 2009
Berenjenas de almagro	Adición de cultivos iniciadores acelera el proceso de fermentación.	Seseña, 2005
Berenjenas de almagro	Acelera el proceso de fermentación pero da sabor amargo al producto.	Ballesteros, 1996

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

6.1.1. Materia prima

Se utilizaron pimentones rojos (*Capsicum annum*) variedad *Grossum*, se adquirieron en un mercado local, de la misma variedad, proveedor, siguiendo los parámetros de calidad fijados por la NTC 3634-1, el pimentón de categoría I debe ser entero, sano, limpio, de apariencia fresca, bien desarrollado, con sus pedúnculos, libre de daños en su piel y de sabores y olores extraños, como se muestra en la Figura 5.



Figura 5. Pimentón variedad *Grossum*

6.1.2. Bacterias ácido lácticas

La investigación se realizó con cepas de *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10880 y *Lactobacillus plantarum* ABBL A6 de la colección del cepario del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Marina de la facultad de ciencias de la Universidad del Valle.

6.1.3. Inóculo

Se evaluaron cinco formulaciones, manteniendo fijas las cantidades de leche de soya, sacarosa y salvado de trigo, y variando la leche en polvo, y el suero de leche, con el fin de desarrollar un medio de cultivo económico, viable a nivel industrial pero que permitiera condiciones de crecimiento similares a las del medio de cultivo comercial, se emplearon estos componentes debido a que sus características nutricionales constituyen una buena fuente de nutrientes para las BAL (Montalvo, 2010).

6.1.4. Fermentador

Dados los requerimientos específicos de los microorganismos y del experimento, se construyó un fermentador (Figura 6), que cumpliera con la condición de anaerobiosis y con capacidad de extracción de las muestras en cada tiempo. Se utilizaron estructuras flexibles compuestas por una película coextruida de tres capas, con nylon en la capa externa como elemento de barrera y PEBD (polietileno de baja densidad) lineal en la capa de sellado con impresión por superficie; selladas herméticamente, con dimensiones 25 cm x 15 cm, con una tapa de rosca en la parte superior de 3 cm de diámetro; en la tapa se adaptó una válvula desaireadora con el fin de retirar el oxígeno al interior del fermentador. Para garantizar la hermeticidad se utilizó un empaque de caucho en la parte interna de la tapa.



Figura 6. Fermentador diseñado para fermentación láctica de hortalizas

6.2. Métodos

6.2.1. Selección y preservación de microorganismos

Se utilizaron microorganismos lácticos crioconservados, para la reactivación se cultivaron por agotamiento en medio sólido MRS con azul de anilina para ayudar al reconocimiento de las cepas según lo recomendado por Giraud (1992) y Ramírez (2005), ya que las bacterias lácticas pueden diferenciarse por la asimilación del azul de anilina del medio. Éste procedimiento se realizó varias veces, verificando constantemente su pureza mediante tinción de Gram y reconocimiento morfológico. Las cepas puras se crioconservaron en tubos Ependorf con caldo MRS y 26% de glicerol a -20°C para su uso durante la investigación.

6.2.2. Selección de medio óptimo de crecimiento

Se seleccionó el medio de cultivo que cumplió con la mayor deseabilidad compuesta (D) entre el crecimiento de los microorganismos y el costo del medio. Para ello se utilizó un diseño experimental de mezclas. El modelo incluye los puntos altos y bajos, es decir, el nivel inferior y el superior, dos puntos axiales y un punto central, para ambas cepas de microorganismos. Las condiciones estadísticas fueron:

- Unidad experimental: Medios de cultivo, 24 horas de incubación a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Fuente de variación: Proporción de los componentes (suero de leche y leche en polvo) en la mezcla. Los niveles, descritos en fracción, fueron:

Leche	0,000	0,500	0,250	0,125	0,375
Suero	1,000	0,500	0,750	0,875	0,625

- Variables de respuesta: Precio de la mezcla, viabilidad de microorganismos (UFC/mL).

En este diseño la fuente de variación son los ingredientes de una mezcla y sus niveles no son independientes. Se asume que las variables de respuesta dependen únicamente de las proporciones relativas de los componentes presentes en la mezcla en la que los porcentajes de cada uno deben sumar el 100% (Montgomery, 2008).

Las investigaciones de experimentos con mezclas se concentran en la relación de la variable respuesta medida con las proporciones relativas de cada ingrediente presente en el producto. Como $x_1, x_2, \dots, x_k$ son las variables que representan las proporciones de los k ingredientes o componentes de la mezcla, los valores de las x , están restringidos de manera que $0 < x_i < 1, i=1, \dots, k$, es decir: (Kuehl, 2001).

$$\sum_{i=1}^k x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_k = 1$$

6.2.2.1. Estimación del modelo de superficie de respuesta polinomial canónico

El modelo completo polinomial canónico para el experimento de mezcla para el medio de cultivo es:

$$y_{ij} = \beta_1 x_{1j} + \beta_2 x_{2j} + \varepsilon_{ij} \text{ Con } i = 1, \dots, t; j = 1, \dots, r$$

Donde se supone que los errores experimentales ε_{ij} son independientes, con distribución normal, con media 0 y varianza σ^2 con $t = 5$ tratamientos de mezcla y $r = 4$ réplicas de cada una (Kuehl, 2001).

6.2.2.2. Análisis estadístico

El análisis matemático de los datos se realizó en la herramienta Excel y el análisis estadístico en MINITAB 16.

6.2.2.3. Análisis del crecimiento microbiano

Se realizó recuento de colonias en cajas Petri por triplicado. Se realizaron diluciones sucesivas en agua peptonada en proporción 1:10 hasta la dilución 10^{-8} . De las últimas cuatro diluciones se tomó 0,1 mL y se sembró en caja Petri con MRS-azul de anilina. El recuento se expresó en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (NTC 5034 de 2002).

6.2.2.4. Precio de la mezcla

El costo de cada medio se evaluó según el porcentaje utilizado de cada componente en un litro de mezcla, el precio de los componentes por gramo, los pesos utilizados por litro de los componentes de los medios, y el precio total de cada medio se muestran en la Tablas 5, 6 y 7 respectivamente.

Tabla 5. Costo de los componentes del medio de cultivo (\$/g)

Componente	Precio/gramo	Marca
Leche en polvo	9,00	Coolechera
Suero de leche	6,38	Rawchemical
Azúcar	1,54	La cabaña
Leche de soya	15,74	Toning - Leche de soya natural
Salvado de trigo	4,38	Toning - Salvado natural
MRS	420	

Tabla 6. Cantidad de los componentes en los medios de cultivo evaluados

Componentes	Medio 1 (g/L)	Medio 2 (g/L)	Medio 3 (g/L)	Medio 4 (g/L)	Medio 5 (g/L)
Leche en polvo	50	37,5	25	12,5	0
Suero de leche	50	62,5	75	87,5	100
Azúcar	70	70	70	70	70
Leche de soya	50	50	50	50	50
Salvado de trigo	5	5	5	5	5

Tabla 7. Costo de un litro de medio (\$/L)

Medio	Precio (\$/1L)
1	1554,70
2	1587,45
3	1620,20
4	1652,95
5	1685,70

6.2.3. Cinética de crecimiento en los medios de cultivo seleccionados

Una vez determinado el medio de cultivo óptimo para cada bacteria se realizaron las respectivas cinéticas de fermentación para conocer su crecimiento en un período de 24 horas. El muestreo se realizó cada tres horas por triplicado del medio seleccionado, contenido en Erlenmeyers de 1000 mL a 32 °C y agitación constante a 120 rpm en un agitador orbital, según lo recomendado por Montalvo (2010). Paralelo y en las mismas condiciones se realizó el análisis para el medio comercial MRS. Se analizó el comportamiento del pH, de azúcares totales y la viabilidad de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* A6 y *Leuconostoc mesenteroides*.

Durante seis semanas se verificó la viabilidad de los microorganismos en los medios de cultivo, asegurándose que se mantuviera en un orden mínimo de 10^7 , esto con el fin de mantener la viabilidad necesaria según el protocolo biotecnológico para un cultivo iniciador para fermentación de vegetales crudos y frutas de Di Cagno (2012).

6.2.3.1. Viabilidad de microorganismos

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el numeral 4.2.2.

6.2.3.2. Comportamiento del pH

La medida de pH se realizó utilizando un potenciómetro Thomas Scientific previamente calibrado según las recomendaciones del equipo.

6.2.3.3. Consumo de azúcares totales

Los azúcares se determinaron por el método de Dubois, (1956), conocido como el método de Antrona. Primero se construyó una curva patrón, para lo cual se utilizó glucosa anhidrida como patrón primario, con concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 ppm. Se prepararon 2,5 mL de cada concentración y se hicieron reaccionar con 5mL de la solución del reactivo de Antrona en ácido sulfúrico al 96%. La lectura de absorbancia se llevó a cabo en el Espectrofotometro *Unico*. La absorbancia obtenida se graficó contra la concentración mencionada y mediante la linealización de mínimos cuadrados se encontró la ecuación de la recta, con un coeficiente de correlación de 0,9976. Previamente a la cuantificación de azúcares totales en las muestras se determinó el factor de dilución que permitiera leer el resultado interpolando de la curva patrón. Una vez determinado el factor de dilución se siguió el proceso descrito anteriormente. La concentración se obtuvo reemplazando los valores de absorbancia en la ecuación de la curva patrón teniendo en cuenta el factor de dilución.

6.2.3.4. Rendimiento de la cinética de fermentación

Los cálculos considerados para las cinéticas en los diferentes medios seleccionados se definieron según las siguientes ecuaciones (Crueger, 1993).

- Tasa de crecimiento volumétrico (dx/dt):

$$\frac{dX}{dt} \quad (6)$$

- Tasa o velocidad específica del crecimiento (μ):

$$\mu = \frac{d(\ln X)}{dt} \quad (7)$$

- Tiempo de duplicación celular (t_d):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (8)$$

Donde, μ : Velocidad específica de crecimiento t_d : Tiempo de duplicación X: Biomasa

6.2.4. Fermentación de pimentón rojo con *L. plantarum* A6 y *L. mesenteroides*

6.2.4.1. Selección y acondicionamiento de materia prima

El pimentón se adquirió según las características mencionadas en el numeral 6.1.1. El proceso de limpieza y desinfección se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en el decreto 3075 de 1997 sobre buenas prácticas de manufactura; con ayuda de un sacabocado se cortaron discos de 2 cm de diámetro con 0.5 cm de espesor. Las muestras que fueron utilizadas para el proceso de fermentación con adición de un cultivo iniciador se escaldaron con agua caliente (85°C por 2 min), como lo recomienda Di Cagno (2009) para fermentación de pimenton amarillo y rojo. El acondicionamiento de la materia prima se muestra en la Figura 7.

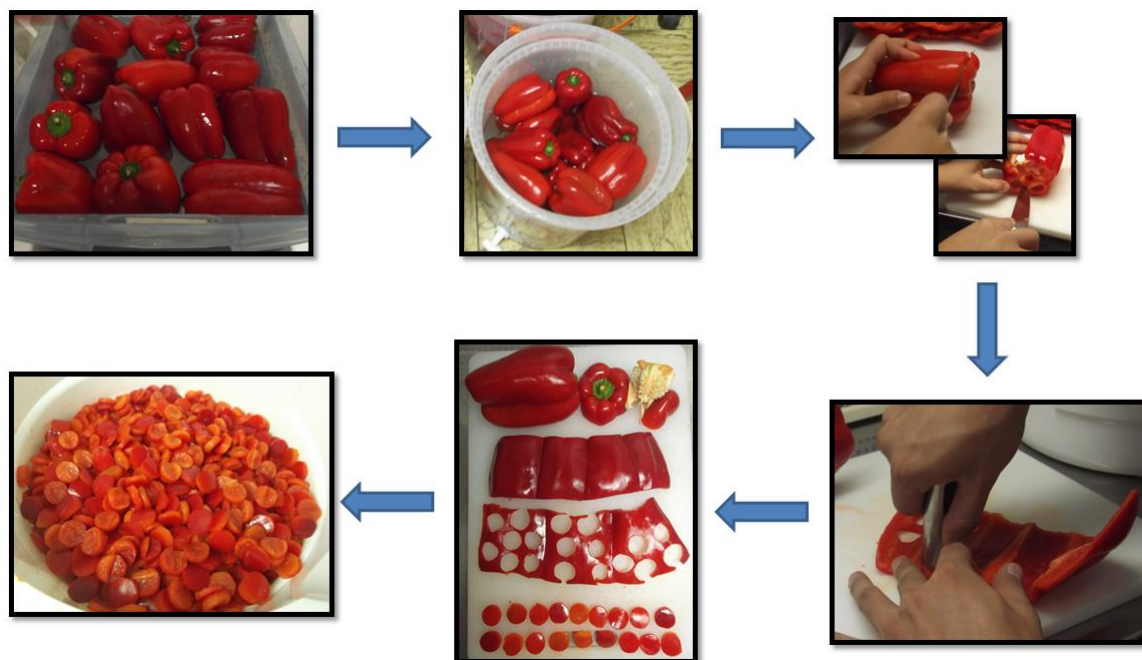


Figura 7. Selección y acondicionamiento del pimentón

6.2.4.2. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó en el mejor medio de cultivo seleccionado para cada microorganismo. Se reactivó la bacteria crioconservada, incubándola por 48 h a 32 °C en caldo MRS, luego se repicó dejándolas el tiempo en que la bacteria tenía mayor viabilidad en MRS a 32°C, y por último se adicionó el MRS con la cepa al medio lácteo seleccionado para obtener el inóculo, este se dejó en incubación el tiempo que presentaba mayor viabilidad, según la cinética de crecimiento. Este procedimiento se realizó para las dos bacterias por separado.

6.2.4.3. Fermentación ácido láctica del pimentón

Se utilizó un diseño factorial con tres factores: “Inóculo” (con BAL y sin BAL), “Concentración de sal” (5, 10 y 15 %) y “Tiempo” (0, 3, 6, 9, 12 y 15 días) de exposición al tratamiento (Figura 8). El experimento consistió en dos réplicas de la unidad experimental para cada uno de los 36 tratamientos, cada combinación se asignó al azar a cada unidad experimental del diseño totalmente aleatorizado. El cultivo iniciador se adicionó en la relación recomendada por Di Cagno (2009). A los tratamientos control se les adicionó el 8% v/v de vinagre comercial siguiendo lo realizado por Seseña (2005). La relación salmuera-pimentón se ajustó según lo recomendado por Díaz *et al.* (2010) para elaboración de encurtidos. Los datos se tomaron cada 3 días.

El pimentón se mantuvo en anaerobiosis para evitar el crecimiento de microorganismos indeseables. Los fermentadores se mantuvieron a una temperatura promedio de 28°C. La fermentación se llevó a cabo por 15 días. Las etapas de la fermentación ácido láctica del pimentón se observa en la Figura 9.

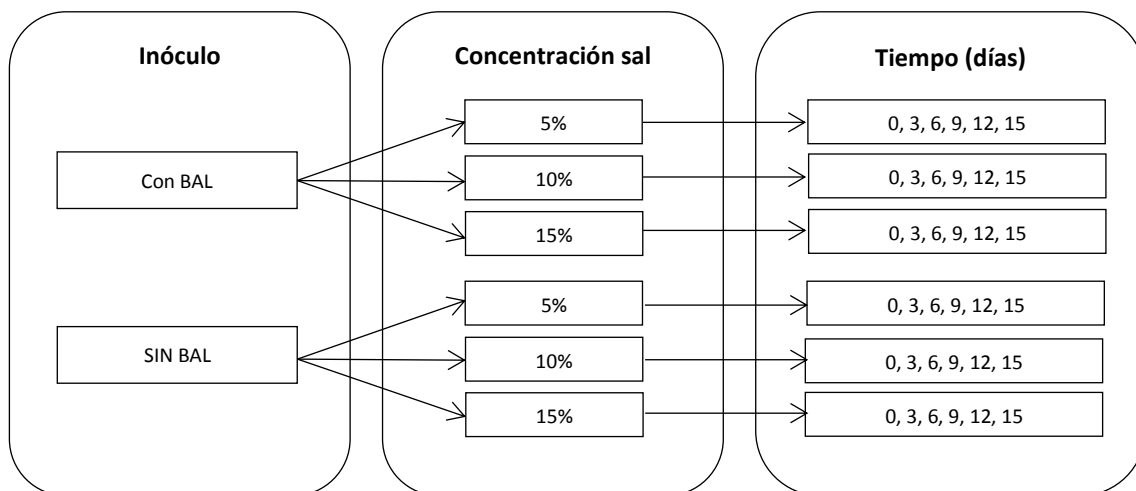


Figura 8. Diseño experimental fermentación pimentón

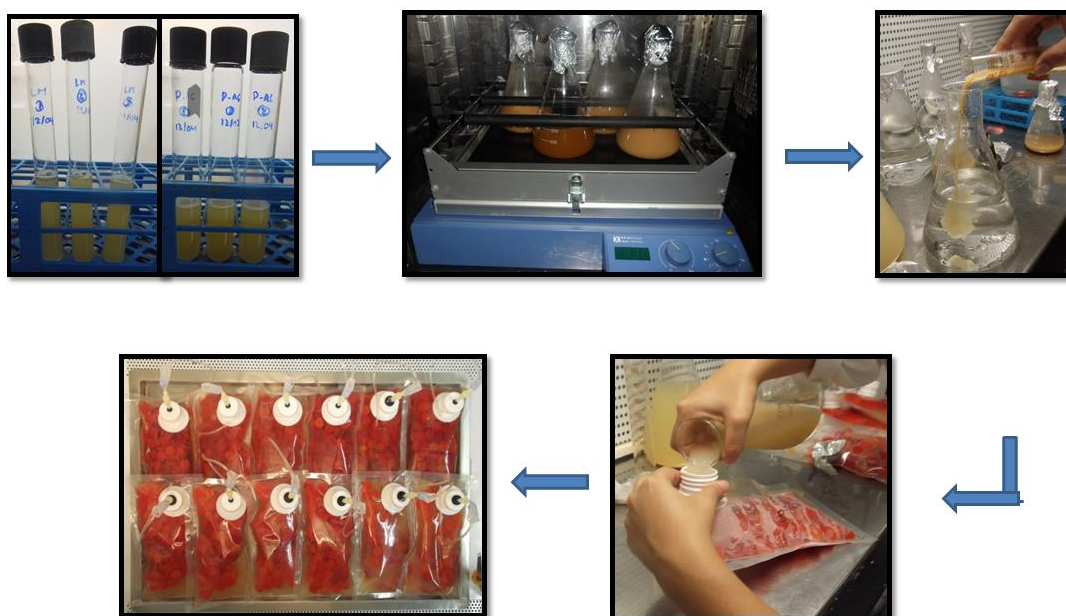


Figura 9. Proceso fermentación ácido láctica del pimentón

El agua utilizada en la salmuera debió ser potable y contener menos de 1% de sales carbonatos, bicarbonatos de sodio, calcio y magnesio, para evitar la neutralización del ácido producido en el proceso de fermentación (García, *et al.*, 2004). Para garantizar esto, se utilizó agua desionizada y esteril.

6.2.4.4. Modelo estadístico para tres factores

El modelo de medias de celdas para un experimento con tres factores y r réplicas de cada una de las abc combinaciones de tratamientos en un diseño totalmente aleatorizado es:

$$y_{ijkl} = \mu_{ijk} + e_{ijkl} \quad i = 1, 2 \quad j = 1, 2, 3 \quad k = 1, 2, 3, 4, 5 \quad l = 1, 2$$

La media de celdas μ_{ijk} expresada como una función del factorial de los efectos principales y las interacciones es:

$$\mu_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk}$$

Donde $\mu = \bar{\mu}$ es la media general y α_i , β_j y γ_k son los efectos principales de A (Inóculo), B (Concentración de sal) y C (Tiempo). Los efectos de la interacción respectivos de dos factores son $(\alpha\beta)_{ij}$, $(\alpha\gamma)_{ik}$, $(\beta\gamma)_{jk}$ y el efecto de la interacción de tres factores es $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$.

Hipótesis del modelo

Hipótesis nula: H_0 = La presencia de un cultivo iniciador, la concentración de sal y el tiempo de tratamiento no afectan significativamente las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del pimentón fermentado.

Hipótesis alterna: H_a = La presencia de un cultivo iniciador, la concentración de sal y el tiempo de tratamiento afectan significativamente las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del pimentón fermentado.

La recolección de los datos se realizó siguiendo los procedimientos mencionados a continuación:

- pH: se siguió la AOAC 10.041/84 (guía de procesos biotecnológicos)
- Azúcares totales: método de ANTRONA.
- Color: (método CIElab) con el equipo Hunterlab serie CX1983.
- Contenido de agua: (Bernal, 1998)
- Actividad de agua con el equipo Aqualab modelo 4TE.

- Textura: con el texturómetro marca Shimadzu modelo EZ TEST.
- Recuento de microorganismos: NTC 5034.

6.2.5. Análisis sensorial

Al finalizar el tiempo de fermentación se realizó un análisis sensorial utilizando una prueba hedónica de aceptabilidad con un panel no experto de 68 personas, siguiendo lo recomendado por Sancho, *et al.* (1999). A cada una de las muestras se le asignó un número aleatorio para evitar sesgos en el análisis. Se midieron los atributos de color, aroma, textura, percepción de salinidad y acidez. El formato de la encuesta realizada (Figura A1) se encuentra como anexo.

6.2.6. Analisis microbiológico del pimentón fermentado

Con el fin de garantizar la inocuidad del producto obtenido se realizó el recuento total de mohos y levaduras (NTC 4132, 1997), coliformes totales y coliformes fecales (NTC 4458, 2007), y mesófilos totales.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Selección y preservación de microorganismos

Las cepas crioconservadas y sembradas en caldo MRS para su reactivación, presentaron turbidez a las 24 horas de crecimiento y pasadas 48 horas presentaron formación de botón blanco en el fondo del tubo como indicador de crecimiento. Las siembras en medio sólido Agar-MRS con azul de anilina arrojaron crecimientos de colonias redondas, con alto relieve, bordes definidos y de color azul característico para cada cepa (Figura 10).

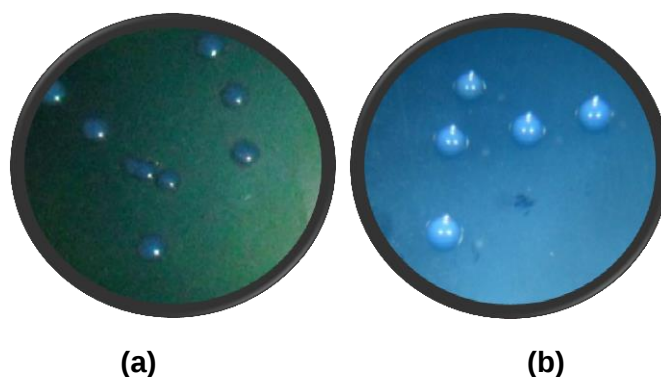


Figura 10. Colonias observadas en estereoscopio. (a) *L. plantarum* (b) *L. mesenteroides*

Fuente: La presente investigación

7.2. Determinación de medio óptimo de crecimiento

La importancia del desarrollo de un medio de cultivo económico y capaz de facilitar el crecimiento microbiano radica en que los costos primarios asociados a las fermentaciones por BAL y a la producción de ácido láctico están relacionados con los substratos necesarios para el crecimiento de las BAL y de la fermentación en sí, siendo muy costosas las fuentes de nitrógeno y azúcares requeridos (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Se analizó el comportamiento de los microorganismos frente a la variación del suero de leche y la leche en polvo ya que éstos, en conjunto con los componentes complementarios, constituyen una buena fuente de nutrientes para las BAL. El suero en polvo contiene un 70% de lactosa (NTC 5098/2002), el principal azúcar que metabolizan

las BAL, y la leche en polvo un 8.2%, sin embargo, la mayor importancia de la leche radica en su contenido de proteína (33%) (NTC 1036/2002), el cual actúa como fuente de nitrógeno para las BAL.

La relación aproximada del costo por litro entre los medios evaluados y el medio comercial MRS fue de 1:8, lo cual evidencia la favorabilidad del medio láctico evaluado. El análisis estadístico indicó que el costo de los medios se ajusta a un comportamiento lineal (Tablas A1 y A2).

7.2.1. Bacterias acidolácticas

Como se observa en la Figura 11, transcurridas 24 horas de incubación en todos los medios el crecimiento fue superior al objetivo 10^7 UFC/mL y en su mayoría, igual o superior al valor alcanzado en el MRS, lo que hace al medio láctico una alternativa viable para elaboración de inóculos de estos dos microorganismos.

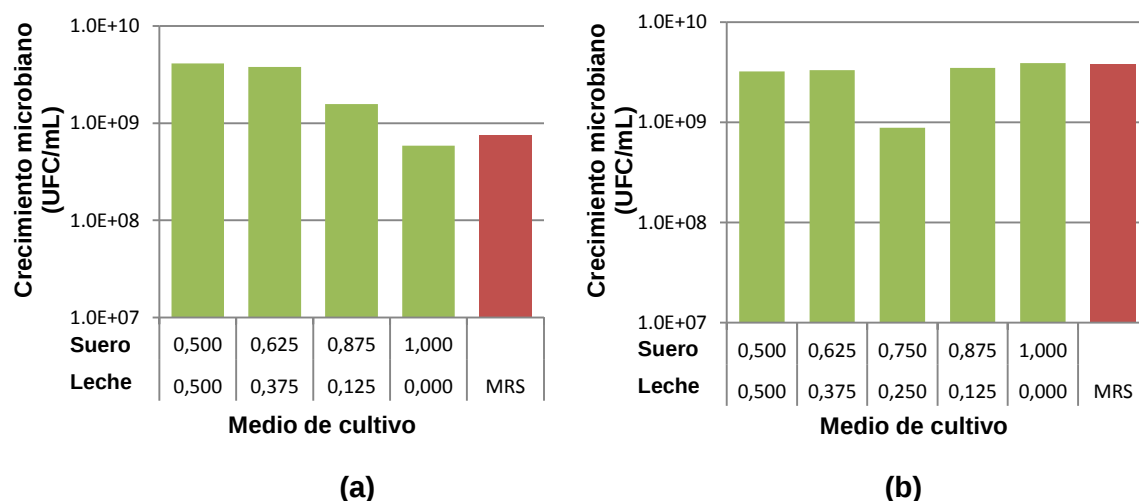


Figura 11. Crecimiento bacteriano en los medios evaluados (a) *L. mesenteroides* y (b) *L. plantarum* transcurridas 24 horas de incubación. Los valores para Leche y Suero se encuentran en fracción relativa, donde la suma de los dos componentes es la unidad

La Figura 12 muestra las gráficas de optimización, para las cuales la variable crecimiento microbiano se transformó a valores en logaritmo natural, se utilizó una deseabilidad

individual mínima de 18.42, que corresponde al logaritmo natural de 10^7 UFC/mL. Por otro lado, la variable precio se minimizó, a fin de favorecer el medio más económico. La deseabilidad compuesta resulta de la combinación de las dos deseabilidades individuales.

En la parte inferior de la Figura 12 se encuentra el crecimiento microbiano (Ln Viabilidad), el cual presentó un comportamiento cuadrático en los dos casos; en la parte media, el costo del medio de cultivo y; en la parte superior, la combinación de las dos variables. La línea roja indica el medio que mejor cumple con las dos condiciones establecidas, para ambos casos, el medio más favorable es el que no contenía leche en polvo. Esto sugiere que la proteína de la soya contenida en el medio es capaz de reemplazar la de la leche en polvo, proporcionando una buena fuente de nitrógeno para los microorganismos. El medio de cultivo seleccionado tiene un costo de \$1,554 /L y un crecimiento microbiano del orden de 10^8 UFC/mL para las dos bacterias.

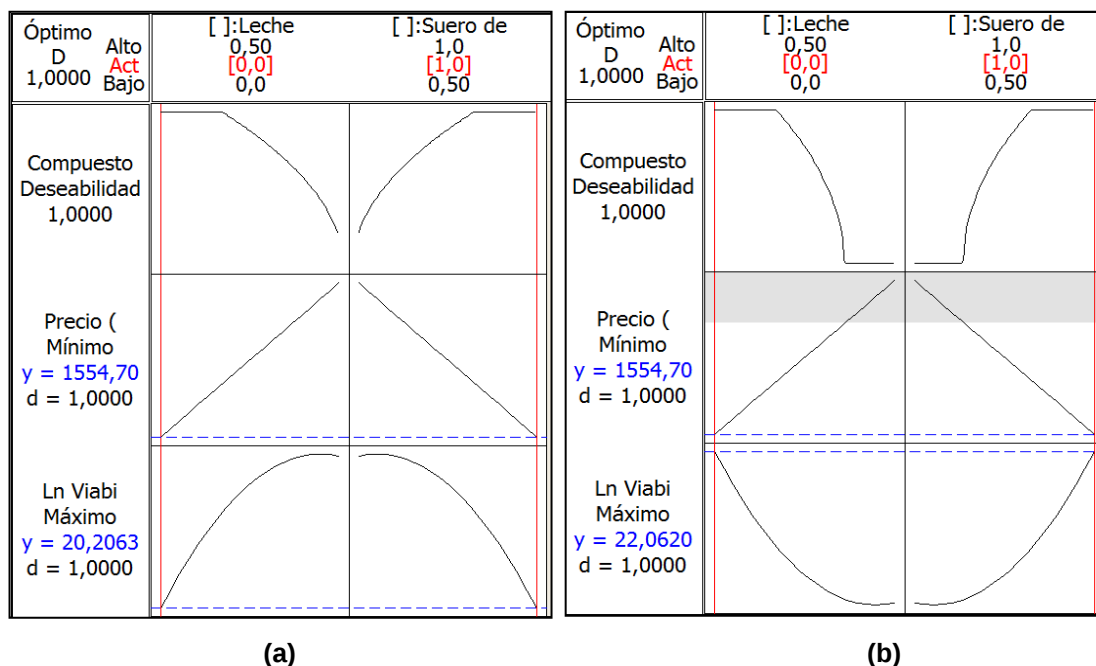


Figura 12. Gráfica de optimización del medio de cultivo para (a) *L. mesenteroides* y (b) *L. plantarum*

7.3. Cinética de crecimiento en los medios de cultivo seleccionados

7.3.1. Cinética de crecimiento

Tras haber determinado que el medio de cultivo en que las dos bacterias presentaron la mayor viabilidad a las 24 horas fue el medio sin leche en polvo (MS), se realizaron las cinéticas de crecimiento (Figura 13) siguiendo la metodología expuesta en el Numeral 6.2.3.

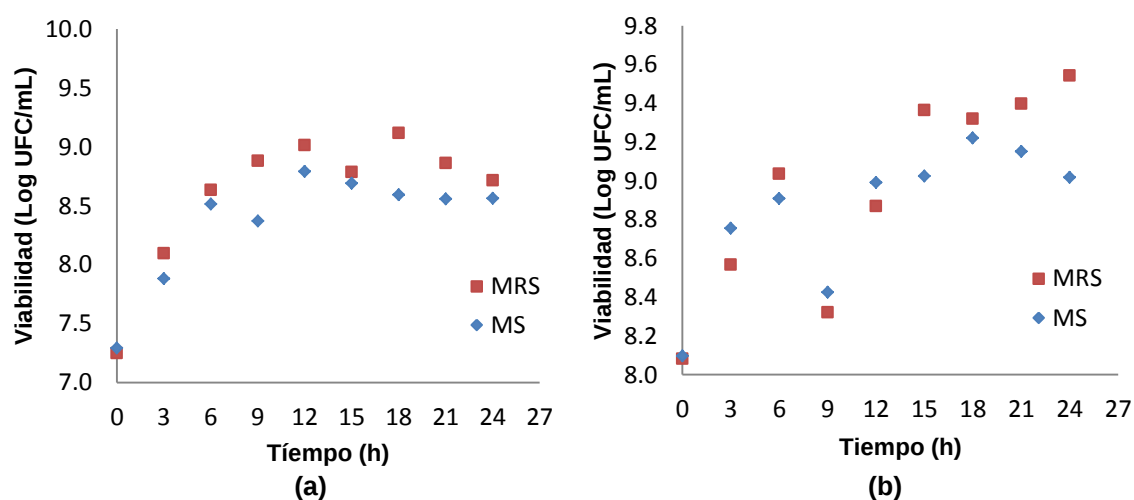


Figura 13 Cinética de crecimiento en MS y MRS para el (a) *L. mesenteroides* y (b) *L. plantarum*

Se puede observar que el crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* presentó dos fases, para el MS, una primera exponencial entre 0 y 6 horas, y la segunda entre 9 y 12 horas; en caldo MRS presentó una fase exponencial entre 0 y 12 horas, y la segunda de 15 a 18 horas, según Flores (2000), en esta última fase las células se reproducen con ausencia de nutrientes a su velocidad máxima; en adelante a estos tiempos presentaron una fase estacionaria hasta las 24 horas, en donde no hubo disminución considerable en la viabilidad del microorganismo. La etapa exponencial se considera una fase de latencia en la cual el microorganismo se encarga de desdoblar los azúcares complejos en moléculas simples para poder asimilarlos en tiempos posteriores (Madigan *et al.*, 2000).

Para ninguna de las dos bacterias se observó fase de adaptación de las bacterias al medio de cultivo, es posible que esta fase sea corta y se dé en las primeras horas, debido

a que las bacterias tienen una gran capacidad de adaptación y crecimiento (Fu y Mathews, 1999), además de venir de una fase de crecimiento de 24 horas del pre-inóculo.

En la Tabla 8 están registrados los tiempos que las bacterias presentan la viabilidad máxima en MS y en caldo MRS a las 24 horas.

Tabla 8. Cuadro comparativo de crecimiento en el tiempo para *L. mesenteroides* y *L. plantarum*

Cepa	Tiempo de máximo crecimiento microbiano (h)		Máximo crecimiento microbiano (UFC/mL)	
	MS	MRS	MS	MRS
<i>L. mesenteroides</i>	12	18	6.20×10^8	1.31×10^9
<i>L. plantarum</i>	18	24	1.67×10^9	3.50×10^9

Con los resultados registrados en la tabla anterior se determinaron los tiempos que fueron requeridos para repicar las bacterias en medio MRS, e incubar el inóculo en MS. En ambos casos se obtuvo la viabilidad mayor a la deseada para un cultivo iniciador, 10^7 UFC/mL (Di Cagno *et al.*, 2009; Seseña, 2005; Jung, 2011).

Con los datos de la Figura 14 y las Ecuaciones 6, 7 y 8 se calcularon los parámetros cinéticos para caracterizar el crecimiento de cada cepa, estos se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las cepas

Parámetros cinéticos	<i>L. mesenteroides</i>		<i>L. plantarum</i>	
	MS	MRS	MS	MRS
Tasa de crecimiento volumétrico (UFC/mL)	5,11E+07	8,44E+07	1,15E+08	1,62E+08
Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})	0,47	0,42	0,31	0,37
Tiempo de duplicación celular (h)	1,48	1,66	2,22	1,89

La velocidad específica de crecimiento indica que la cepa *L. mesenteroides* tiene un crecimiento más rápido en la fase exponencial respecto a *L. plantarum*, aunque esta última presenta una mayor viabilidad en el tiempo debido a que el *L. plantarum* tiene una gran capacidad de biosíntesis y una muy buena adaptación a medios ricos en nutrientes y fuentes de energía (Georgieva *et al.*, 2009).

En otros estudios se han obtenido para *L. mesenteroides* valores de velocidad específica en medios ricos en lactosa y glucosa de 0.17 h^{-1} y 0.55 h^{-1} (Garriga *et al.*, 1988), lo que indica que el medio seleccionado tiene un balance adecuado de nutrientes.

El tiempo de duplicación celular es el tiempo necesario para que la población doble su tamaño; se ha encontrado en otros estudios tiempos de 1.28 h; 1.1 h; 1.98 h para la cepa *L. plantarum* (Agudelo, *et al.*, 2010; Giraud, 1994; Rao, *et al.*, 2004) mientras que en el MS, éste tiempo se alcanzó un poco más tarde, a las 2.2 h.

7.3.2. Comportamiento del pH

El pH en el tiempo cero es menor en el MS que en MRS; a las 24 horas tiende a igualarse, lo que evidencia una producción similar de ácido láctico en los dos medios (Figura 14).

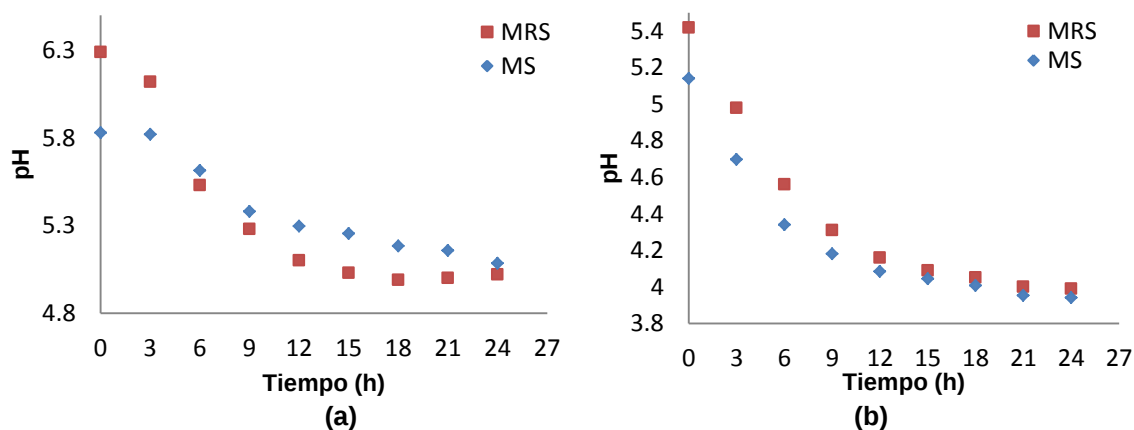


Figura 14. Comportamiento del pH en la cinética de crecimiento en MS y caldo MRS para (a) *L. mesenteroides* y (b) *L. plantarum*

El pH óptimo del *L. plantarum* está entre 6 y 7 (Flores, 2000), sin embargo, la viabilidad de la cepa no se vio afectada a pHs inferiores, debido a que esta cepa es capaz de mantener el gradiente de pH entre el interior y el exterior de la célula, por lo que soporta bajos pHs (Samaniego y Sosa del Castillo, 2000; Giraud *et al.*, 1994).

Drosinos *et al.* (2005) estudiaron la cepa *L. plantarum* y obtuvieron una tasa de crecimiento de 0.15 h^{-1} a un pH de 5.5 a 6.0 en medio MRS, valor inferior al alcanzado en esta investigación de 0.42 h^{-1} a un pH de 5.5 al final de la fase exponencial, lo que quiere decir que se trabajó bajo mejores condiciones para la cepa mencionada.

7.3.3. Comportamiento del consumo de azúcares totales

El consumo de azúcares en las primeras horas de la cinética de fermentación disminuyó considerablemente, después de unas horas lo hizo lentamente, como se puede observar en la Figura 15. Para las dos cepas en los dos medios el consumo de azúcares a las 24 horas tuvo un comportamiento similar, lo que era de esperarse dado el comportamiento del pH ya conocido.

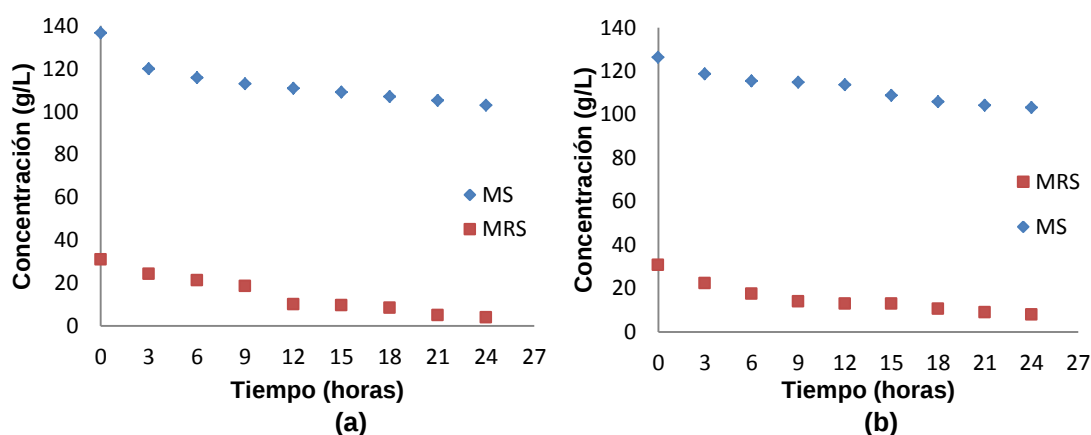


Figura 15. Comportamiento de los azúcares totales en la cinética de crecimiento en MS y caldo MRS del (a) *L. mesenteroides* y (b) *L. plantarum*.

7.3.4 Sostenimiento de la viabilidad en el tiempo

El análisis se realizó semanalmente en el MS, hasta un conteo microbiano inferior a 10^7 UFC/mL. El *L. mesenteroides* se sostuvo hasta la segunda semana con una viabilidad del

orden de 10^7 UFC/mL y cayendo a la tercera semana a 10^5 . En cambio, el *L. plantarum* se sostuvo por encima de 10^7 hasta la sexta semana (Figura 16).

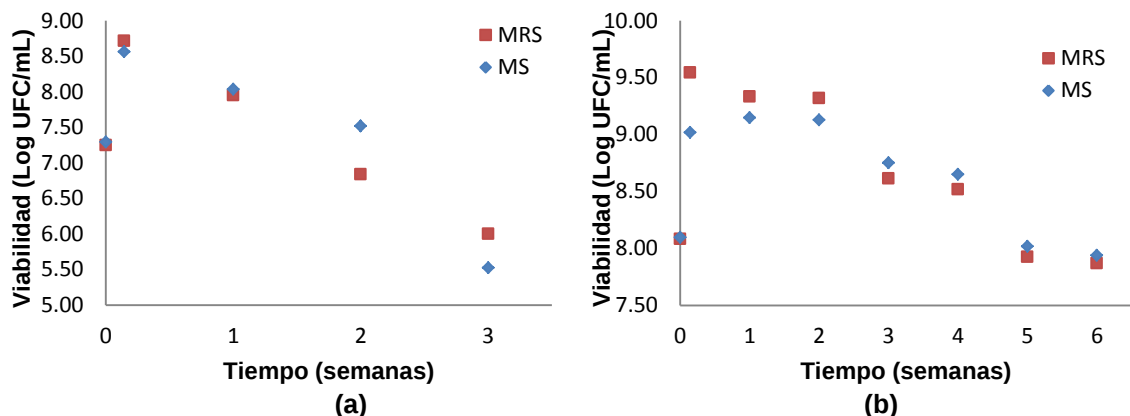


Figura 16. Sostenimiento de viabilidad en el tiempo en MS y caldo MRS de (a) *L. mesenteroides* y (b) *L. plantarum*

7.4. Fermentación de pimentón rojo con *L. plantarum* A6 y *L. mesenteroides*

Como se describe en el numeral 6.2.4.2, la inoculación de la salmuera para la fermentación se realizó en el MS, en su máxima viabilidad, que fue en promedio de 7.87 y 9.21 en términos de logaritmo de UFC/mL para el *L. mesenteroides* y *L. plantarum*, respectivamente.

7.4.1. Comportamiento de los microorganismos en el proceso de fermentación del pimentón rojo

En la Figura 17 se muestra el comportamiento microbiano durante el proceso de fermentación. Éste se divide teóricamente en cuatro etapas definidas (Montaño, *et al.*, 1992):

1. Iniciación: Suele incluir el desarrollo de muchos microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos presentes originalmente en los vegetales.

2. Fermentación primaria: Implica el crecimiento de bacterias acidolácticas con o sin desarrollo de levaduras fermentativas.
3. Fermentación secundaria: se caracteriza por el crecimiento de levaduras fermentativas a partir de la materia fermentable que permanece después de que el desarrollo de las bacterias acidolácticas resulta inhibido por bajos valores de pH.
4. Post-fermentación; tiene lugar después de consumirse la materia fermentable y se caracteriza, en general, por el crecimiento de microorganismos oxidativos en la superficie de la salmuera cuando ésta se encuentra expuesta a la atmósfera.

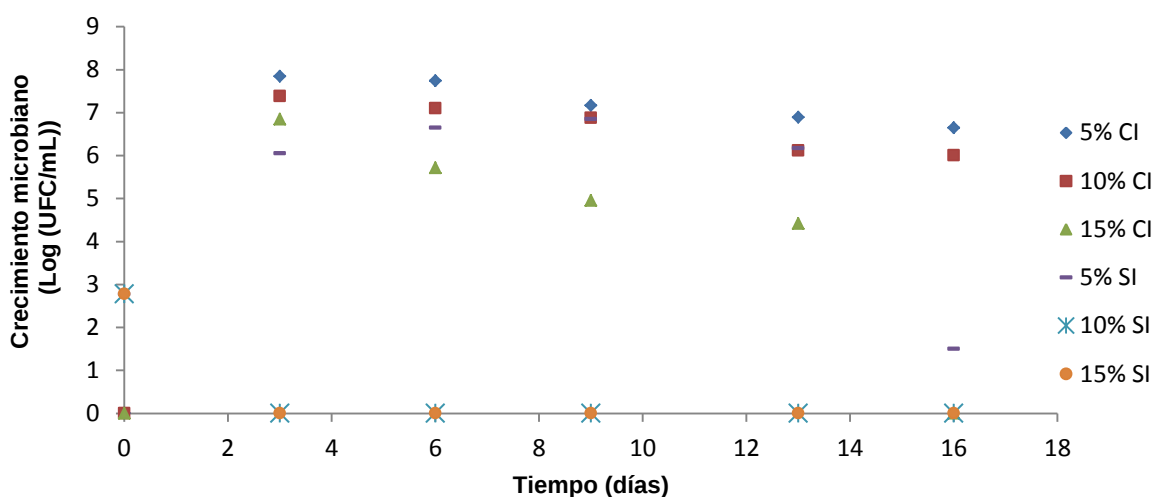


Figura 17. Crecimiento de las BAL durante la fermentación de pimentón rojo.

Los valores de 0 para 10% SI y 15% SI indican que las siembras realizadas no detectaron el crecimiento microbiano, éste corresponde a valores de orden inferior a 10^2 . El análisis de varianzas expresado en la Tabla 10 indicó que tanto la presencia del cultivo de BAL, como la concentración de sal y el tiempo de fermentación influyen significativamente en el crecimiento microbiano.

Tabla 10. Estadístico P según fuente de variación para el crecimiento microbiano. Diferencias significativas con $P > 0,05$

Fuente	Crecimiento microbiano (log(UFC/mL))
Inóculo BAL	0.000
Concentración de sal (%)	0.000
Tiempo (días)	0.000
Inóculo BAL* Conc. de sal	0.000
Concentración de sal*Tiempo	0.003
Inóculo BAL*Tiempo	0.000
Inóculo BAL*Conc. de sal*Tiempo	0.003
Desviación estándar, S	1.183
R ² (ajustado) (%)	86.39

Dado que las bacterias acidolácticas proliferan durante las dos primeras fases y no se detectó crecimiento significativo para los tratamientos 10% SI y 15% SI, se entiende que las altas concentraciones de sal inhiben o retardan el crecimiento de estos microorganismos nativos del pimentón. El tratamiento control a una concentración de 5% de NaCl presentó un crecimiento aceptable en comparación con los de cultivo iniciador.

El análisis postanova por el método de Tukey (Tabla A3) indicó que básicamente se diferencian dos etapas en el tiempo, la primera va desde el inicio hasta el día 9 y la segunda, hasta el día 16. Según lo reportado por Montaña *et al.* (1992), éstas dos etapas pueden corresponder a la fase de iniciación y fermentación primaria, pues no se observó crecimiento de levaduras y el diseño especial del fermentador no permitió el desarrollo de microorganismos oxidantes en la superficie de la salmuera.

7.4.2. Consumo de azúcares totales

De los resultados obtenidos en la Figura 18 y el análisis de varianza mostrado en la Tabla 11 se tiene que la concentración de sal en la salmuera influye estadísticamente en el consumo de azúcares. Según Navarro *et al.* (2004), la concentración de NaCl, además de prevenir el ablandamiento en los vegetales, regula también el tipo y la extensión del crecimiento microbiano. La glucosa se consume un 83 % más deprisa en presencia de cationes alcalinos en condiciones anaeróbicas y un 69% en aerobiosis (Monroe y Tarazona, 1981) Sin embargo, el *L. mesenteroides* disminuye su actividad en salmueras

con concentración mayor al 8% (Navarro *et al.*, 2004), pero los microorganismos del género *Lactobacillus* pueden crecer mejor en concentraciones de NaCl entre 8 y 12% (Hurtado *et al.*, 2012) por lo que probablemente en el tratamiento al 10% de NaCl la mayor parte de los azúcares fue consumida por el *L. plantarum*, mientras que en el de 5% debió desempeñarse mejor el *L. mesenteroides*.

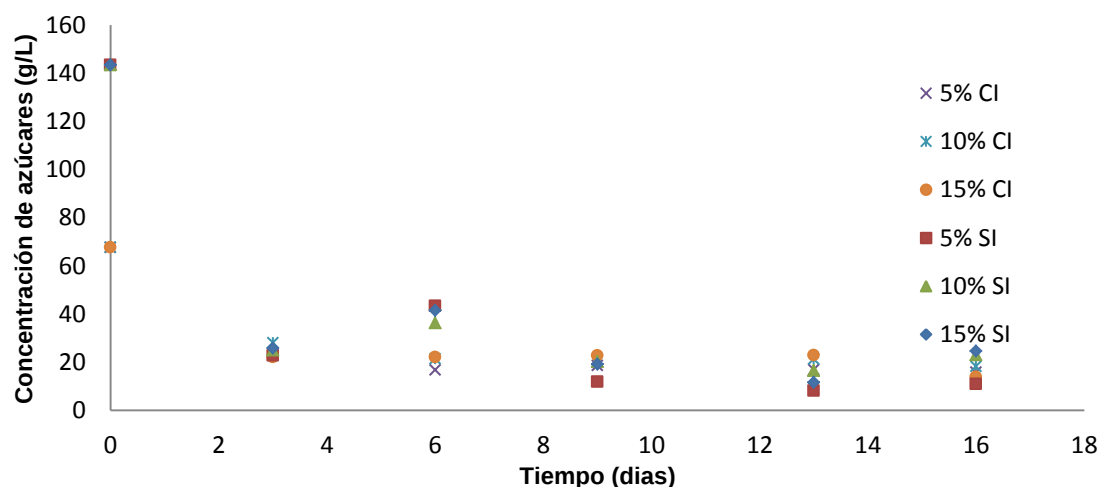


Figura 18. Comportamiento del consumo de azúcares totales durante la fermentación de pimentón

Tabla 11. Estadístico P según fuente de variación para el contenido de azúcares. Diferencias significativas con $P > 0.05$

Fuente	Contenido de azúcares (g/L)
Inóculo BAL	0.000
Concentración de sal (%)	0.064
Tiempo (días)	0.000
Inóculo BAL* Conc. de sal	0.848
Concentración de sal*Tiempo	0.939
Inóculo BAL*Tiempo	0.000
Inóculo BAL*Conc. de sal*Tiempo	0.824
Desviación estándar, S	6.222
R ² (ajustado) (%)	97.03

7.4.3. Variación del pH

Las hortalizas contienen una menor proporción de proteínas lo que las inhabilita para soportar bien los cambios del pH durante el crecimiento de los microorganismos y es por

esto que el descenso del pH se logra a una velocidad considerable, pues al tercer día de fermentación, en la mayoría de los tratamientos el pH fue inferior a 4.0.

Cuando los microorganismos llegan a un ambiente cuyo pH está por debajo o por encima de la neutralidad, su capacidad para multiplicarse depende de su capacidad para modificar el pH que le contiene hasta alcanzar un valor óptimo para ellos. Como puede observarse en la Figura 19 en todos los casos ocurrió una disminución del pH, esto indica que en mayor o menor proporción hubo producción de ácidos orgánicos; probablemente la mayor parte corresponda al L-ácido láctico.

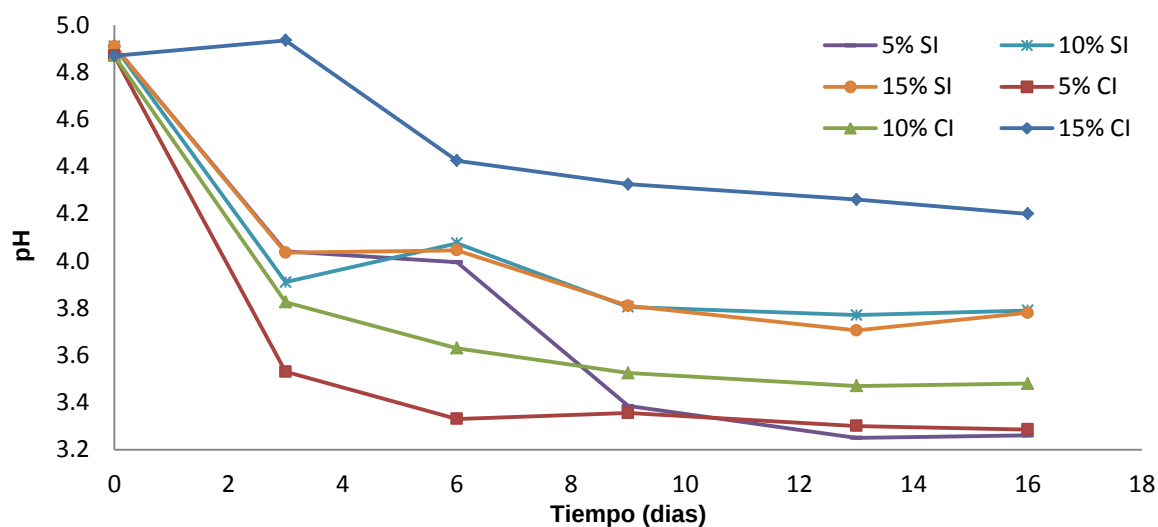


Figura 19. Comportamiento del pH durante la fermentación de pimentón rojo con y sin cultivo iniciador de BAL

Tabla 12. Estadístico P según fuente de variación para pH. Diferencias significativas con $P > 0.05$

Fuente	pH
Inóculo BAL	0.730
Concentración de sal (%)	0.000
Tiempo (días)	0.000
Inóculo BAL* Conc. de sal	0.000
Concentración de sal*Tiempo	0.000
Inóculo BAL*Tiempo	0.003
Inóculo BAL*Conc. de sal*Tiempo	0.000
Desviación estándar, S	0.112
R ² (ajustado) (%)	95.99

En análisis de varianza mostrado en la Tabla 12 evidenció que la presencia del cultivo iniciador no tiene un efecto significativo en la variación del pH, sin embargo, la concentración de sal y el tiempo si lo tienen. Los valores más bajos de pH se alcanzaron en salmueras al 5% de NaCl, siendo éste a los 16 días aproximadamente de 3.29. Gracias al análisis post anova se observa que a partir del día 9 días hasta el 16 no ocurrió un cambio significativo en el pH (Tabla A3) resultado que concuerda con el crecimiento microbiano y el consumo de azúcares, por lo que, en cuanto a parámetros microbiológicos se refiere, la fermentación podría detenerse en el día 9, mientras que en estudios similares como el de Díaz *et al.* (2010), se ha encontrado un tiempo adecuado de fermentación de 4 semanas. A los 9 días, los tratamientos 5% Cl y 10% Cl han alcanzado valores de pH inferiores a 3.7, valor recomendado por Di Cagno *et al.* (2009) como adecuados en pimentón fermentado.

7.4.4. Humedad y a_w

En la Figura 20 se observa que el punto inicial de los tratamientos con cultivo iniciador (5%, 10% y 15% de NaCl) presentó una mayor humedad que las muestras control, esto puede explicarse ya que las muestras de los primeros fueron sometidos a un escaldado al inicio de la fermentación, lo que aumentó su humedad inicial probablemente porque el agua caliente presenta facilidad de inclusión en los tejidos vegetales (Soysal, *et al.*, 2009). Por otro lado, estudios como el de Guerra-Vargas *et al.* (2001) han demostrado que este tratamiento térmico puede aumentar la concentración de carotenoides, quizá debido a la mayor capacidad de extracción química y la pérdida de humedad, ocurre una concentración de la muestra. El tratamiento térmico también inactiva algunas enzimas oxidativas y rompe algunas estructuras, que conduce a una mayor biodisponibilidad.

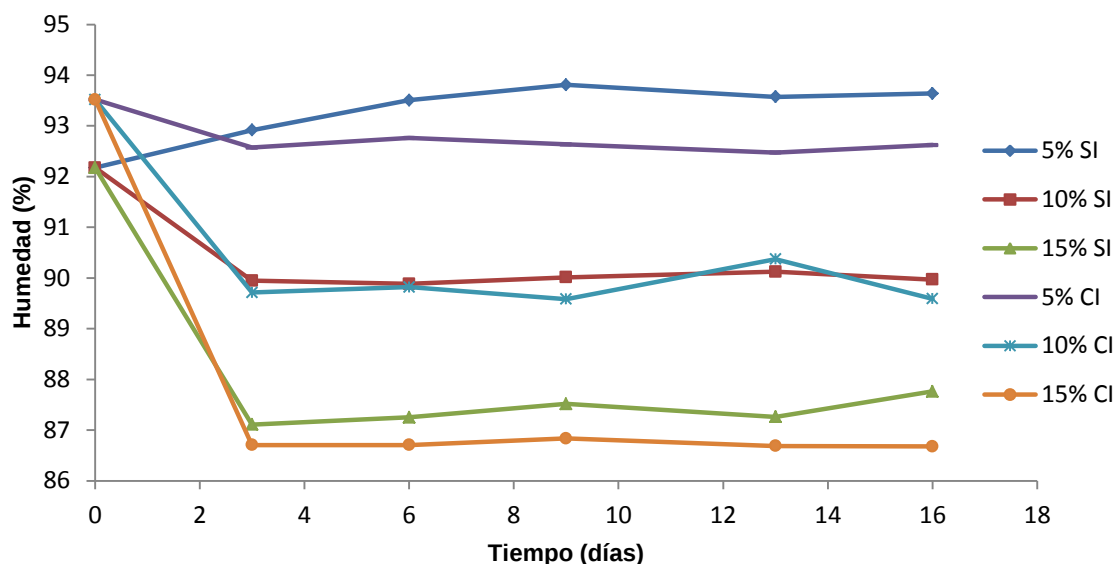


Figura 20. Comportamiento de la humedad durante la fermentación acidoláctica

Como se observa en la Tabla 14, la humedad y la a_w varían significativamente debido a los factores evaluados, es decir, tanto la presencia del cultivo iniciador, el porcentaje de sal del líquido de gobierno y el tiempo de fermentación influyen en el contenido de humedad y en la a_w de las muestras. Según lo anterior y la Figura 20, y exceptuando el comportamiento atípico del tratamiento 5% SI, las muestras sufren una deshidratación osmótica debido a que el líquido de gobierno se encuentra a concentraciones elevadas. A pesar de presentar una humedad inicial superior, las muestras de los tratamientos con cultivo iniciador presentaron una humedad final más baja, en todos los casos, fenómeno que ocurrió desde el tercer día de fermentación. Lo anterior puede deberse a que el cultivo iniciador generara un aumento en la concentración de solutos del medio, aumentando dicho gradiente y logrando una deshidratación en menor tiempo.

Tabla 13. Estadístico P según fuente de variación para humedad. Diferencias significativas con $P > 0.05$

Fuente	Humedad (p/p)	a_w
Inóculo BAL	0.001	0.018
Concentración de sal (%)	0.000	0.000
Tiempo (días)	0.000	0.000
Inóculo BAL* Conc. de sal	0.003	0.380
Concentración de sal*Tiempo	0.000	0.000
Inóculo BAL*Tiempo	0.000	0.557
Inóculo BAL*Conc. de sal*Tiempo	0.564	0.053
Desviación estándar, S	0.281	0.005
R^2 (ajustado) (%)	98.78	98.66

El análisis Postanova (Tabla A3) indicó que la humedad presenta una tendencia al equilibrio, ya que estadísticamente no existe diferencia en la humedad desde el día 3 hasta el 16 para cada tratamiento. Schmidt (2008), encontró en alimentos cárnicos que factores como el tiempo de inmersión, temperatura, pH y microestructura de la matriz, pueden afectar la ganancia de sal y agua o pérdida de agua en alimentos inmersos en soluciones salinas pero en este caso la humedad del pimentón parece presentar un comportamiento constante en el tiempo durante la fermentación después de tres días. Sin embargo, el análisis por el método de Tukey para la a_w indicó que éste parámetro presenta diferencias en todos los tiempos hasta el día 13 y similitud hasta el día 16, es decir que la a_w empieza a equilibrarse en el día 13.

Como se observa en la Figura 21 la disminución de la humedad en los tres primeros días genera una importante reducción en la a_w , encontrando en todos los casos que es menor a 0,91, valor en el cual la mayoría de las bacterias alterantes ya no se multiplican (Monroe y Tarazona, 1981). Sin embargo, el proceso de rehidratación de las muestras, llevado a cabo en los días siguientes incrementa nuevamente la a_w , los valores finales obtenidos concuerdan con lo reportado por Lee (2012), donde la a_w para soluciones con concentración de 5% de NaCl se encuentra entre 0.96 y 0.98, para 10% de NaCl alrededor de 0.94 y para 15% de NaCl entre 0.90 y 0.92.

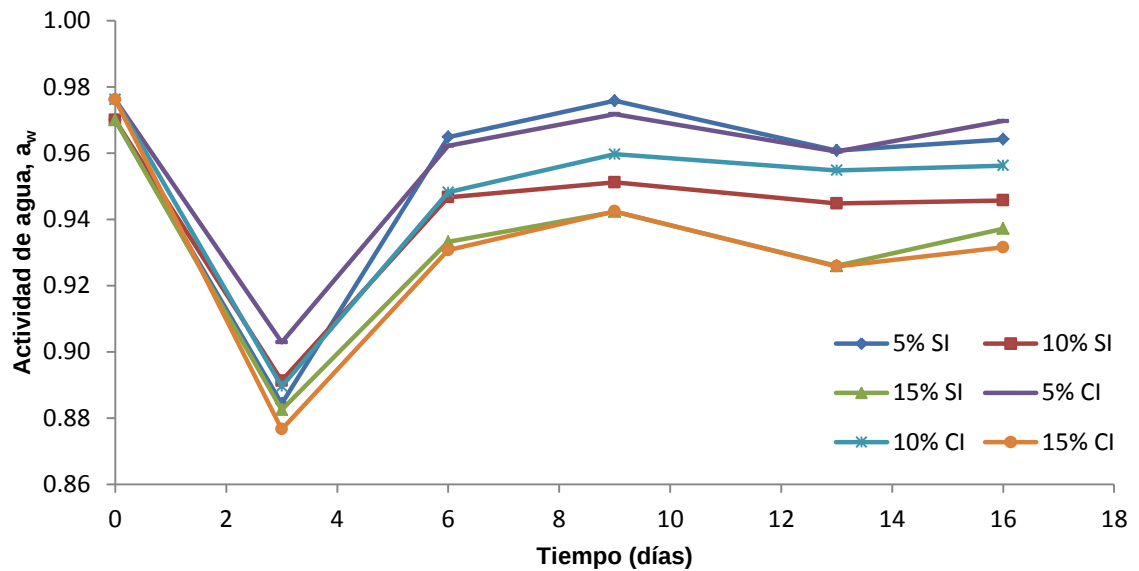


Figura 21. Comportamiento de la actividad de agua durante la fermentación acidoláctica

A los 13 días de fermentación el valor de a_w corresponde aproximadamente a 0.94, valor apto para el desarrollo de las especies lácticas *Bacillus* y *Lactobacillus*. Algunas de ellas logran el equilibrio osmótico manteniendo una concentración intracelular de Cl^- que iguala la del medio externo. A este fenómeno se le conoce como la respuesta de “sal en el citoplasma”. Lee (2004) explica que el efecto directo del ion Cl^- es reducir la tensión de oxígeno e interferir con la acción de las enzimas. Por lo tanto la cantidad de oxígeno disponible para los microorganismos en medios con altas concentraciones de sal es menor que en medios sin sal.

7.4.5. Variación en el color

Las diferentes coloraciones del pimentón (Figura 22), según el estado de maduración y demás factores pueden representarse en un espacio cromático cuya descripción se basa lógicamente en tres dimensiones, cada una indica un determinado cambio de color: una muestra los cambios en tono y luminosidad, otro en tono y saturación, y el tercero en saturación y luminosidad con una pequeña variación de tono (Bello, 2000).



Figura 22. Pimentón después del proceso de fermentación
Fuente: La presente investigación

El análisis estadístico de los parámetros del color se muestra en la Tabla 15. Los valores delta se calcularon con las Ecuaciones 1, 2 3 y 4, y como referencia los parámetros del pimentón fresco, ya que la apariencia de frescura es un valor agregado importante en este tipo de productos.

Tabla 14. Estadístico P según fuente de variación en parámetros de color. Diferencias significativas con $P > 0.05$

Fuente	Int ΔL^*	Int Δa^*	Int Δb^*	Int ΔE^*	Ext ΔL^*	Ext Δa^*	Ext Δb^*	Ext ΔE^*
Inóculo BAL	0.219	0.000	0.000	0.107	0.000	0.000	0.000	0.067
Concentración de sal (%)	0.618	0.471	0.742	0.310	0.469	0.251	0.396	0.960
Tiempo (días)	0.002	0.000	0.011	0.000	0.122	0.116	0.005	0.000
Inóculo BAL* Conc. de sal	0.094	0.855	0.141	0.532	0.154	0.932	0.475	0.444
Concentración de sal*Tiempo	0.172	0.421	0.350	0.328	0.240	0.942	0.107	0.085
Inóculo BAL*Tiempo	0.322	0.000	0.001	0.072	0.011	0.121	0.432	0.004
Inóculo BAL*Conc. de sal*Tiempo	0.191	0.287	0.171	0.719	0.415	0.936	0.238	0.364
Desviación estándar, S	1.863	0.877	2.690	1.928	2.164	1.651	3.120	2.100
R^2 (ajustado) (%)	31.17	88.54	65.47	54.37	59.27	28.71	38.54	51.98

La totalidad de valores de ΔE^* para ambos lados de las muestras, después de los tres días estuvieron por encima de 2.7 que representa el cambio mínimo perceptible por el ojo humano, por lo tanto puede decirse que la fermentación produce un cambio perceptible por el consumidor con respecto al pimentón fresco.

Sin embargo, el análisis de varianzas muestra que el cambio de color total, ΔE^* , tanto en la parte interna como externa del pimentón, presentó diferencias estadísticas únicamente

en el factor tiempo, lo cual indica que ni la presencia del inóculo de BAL, ni la concentración de sal en el rango evaluado, presentan efecto alguno en el cambio de color.

Adicionalmente, los parámetros Δa^* y Δb^* si presentan diferencias significativas con respecto la presencia del cultivo iniciador de BAL. La fermentación con adición del cultivo iniciador presentó, desde los 3 días de proceso, cambios positivos en Δa^* y negativos para Δb^* , que representan un color más rojo y con tonalidades azules en la parte interna de las muestras. Las muestras control presentaron un oscurecimiento más leve y a diferencia de los anteriores, se tornó a tonalidades amarillosas en vez de azules. Contrariamente, en la parte externa de las muestras, el tratamiento con cultivo iniciador generó una pérdida de luminosidad en comparación con las muestras control, pero presentó un cambio a tonalidades más rojas mientras que el control a verde, en tiempos posteriores el parámetro b^* indicó un cambio hacia tonalidades azules en las muestras con BAL y amarillas en la muestra control.

Dentro de las causas por las que un alimento manifiesta una coloración determinada se encuentra la presencia de pigmentos colorantes naturales y su formación como consecuencia de reacciones químicas o enzimáticas (Bello, 2000). El cambio en la coloración de las muestras puede producirse por la presencia o formación de sustancias con grupos cromóforos, la combinación de estos grupos con estructuras cíclicas o la inclusión de grupos auxocromos (Bello, 2000), es decir, grupos ácidos (carboxilos) o básicos (aminos), capaces de estar ionizados según el pH del medio y ofrecer de este modo una coloración determinada.

La cantidad de ácido láctico producido durante la fermentación y la velocidad de descenso del pH puede haber generado los cambios de color y luminosidad mencionados, gracias al grupo carboxilo presente en la molécula del ácido láctico (Figura 23) que le confiere su propiedad ácida.

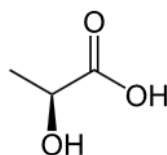


Figura 23. Representación química de la molécula del ácido láctico

Las propiedades cromóferas de muchas de estas sustancias resultan explicables cuando se considera su estructura de orbitales moleculares (Bello, 2000). Se reconocen dos grupos:

- Estructuras que incorporan porfirinas coordinadas con metales (mioglobina, hemoglobina, clorofila y derivados).
- Estructuras con sistemas conjugados (carotenoides, antocianinas, flavonoides, betalaínas, caramelo).

Se conoce que los ácidos débiles pueden desplazar el átomo del metal conjugado, dando lugar a la feofitina de color marrón grisáceo (McMurry, 2008), lo cual pudo haber generado la pérdida de luminosidad de las muestras con cultivo iniciador, donde el descenso del pH se dio a mayor velocidad que en las muestras control.

7.4.6. Variación en la textura

El análisis instrumental de la textura de manera instrumental proporciona información técnica sobre la degustación bucal de un alimento que es llevada a cabo por medio del tacto, de la presión y de la posición con la intervención de dientes, lengua y cavidad bucal. Teniendo en cuenta la clasificación realizada por Bello (2000), se considera el pimentón dentro del grupo de productos alimenticios agregados, debido a que está constituido por células turgentes que resultan jugosas a la masticación.

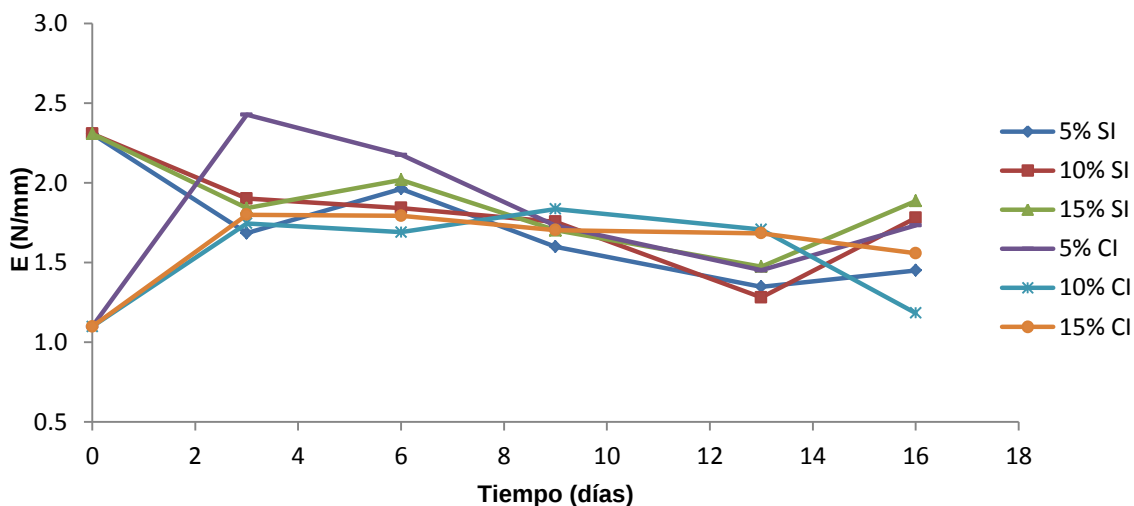


Figura 24. Comportamiento del Módulo de Young, E, durante el tiempo de fermentación del pimentón rojo

El Módulo de Young, o de Elasticidad, E, está asociado a la energía de enlace de los átomos y es una medida de la rigidez del alimento. En la Figura 24 se observa el cambio de dicha rigidez en el tiempo de fermentación. El análisis de varianza de los datos (Tabla 16) muestra que el tiempo y la presencia del cultivo de BAL influyen significativamente en la textura del pimentón. La prueba postanova (Tabla A3) indica que hasta el día 9 de fermentación el módulo de elasticidad permanece constante, al igual que en el intervalo desde el día 9 hasta el 16, es decir, que en este tiempo no existe variación significativa en la textura, lo cual puede deberse a que la humedad permanece constante en este período.

Tabla 15. Estadístico P según fuente de variación para Módulo de Young. Diferencias significativas con $P > 0.05$

Fuente	E (N/mm)
Inóculo BAL	0.004
Concentración de sal (%)	0.538
Tiempo (días)	0.000
Inóculo BAL* Conc. de sal	0.025
Concentración de sal*Tiempo	0.447
Inóculo BAL*Tiempo	0.000
Inóculo BAL*Conc. de sal*Tiempo	0.237
Desviación estándar, S	0.222
R ² (ajustado) (%)	64.77

El punto inicial de los tratamientos sin cultivo iniciador hace referencia a las muestras frescas, y puede observarse un notorio cambio con las muestras escaldadas, cuyo valor de E se encuentra por debajo del promedio global. Según lo encontrado por Castro et al. (2007), el sometimiento de las muestras a tratamientos térmicos genera pérdidas sensoriales importantes, dentro de las que se encuentra la textura. Sin embargo, en el tiempo, la presencia de NaCl y muy probablemente el ácido láctico producido en poco tiempo por las cepas del cultivo iniciador proporcionaron una mayor firmeza en las muestras. El ácido láctico tiene la capacidad de formar el polímero poli (ácido L-Láctico) o ácido poliláctico (PLA) gracias a la reactividad del ion H^+ en el grupo carboxilo (Figura 23), (Jiménez *et al.*, 2012). Éste polímero genera altas viscosidades y estructuras con alta elasticidad (Oliveira *et al.*, 2013).

7.5. Análisis microbiológico

La Resolución 2155 del 2012 establece los requisitos sanitarios que deben cumplir las hortalizas que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional, para identificar el nivel aceptable de calidad de las hortalizas encurtidas que no son envasadas herméticamente, éstas deben dar cumplimiento a los parámetros:

- Conteo no mayor a 10^3 UFC/g de mohos y levaduras.
- Recuento de bacterias ácido lácticas no mayor a 10^3 UFC/g
- Para enterobacterias se utiliza la referencia de hortalizas desecadas o deshidratadas con un conteo no mayor a 10 UFC/g.

Éste último parámetro se verificó mediante siembra en medio sólido Cristal Violeta Rojo Neutro (CVRN) y en caldo Lauril para determinar el Número Más Probable (NMP). Los resultados obtenidos después del proceso de fermentación se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Análisis microbiológico de producto terminado

Medio	Sin BAL			Con BAL		
	5% sal	10% sal	15% sal	5% sal	10% sal	15% sal
PCA	1,51E+06	1,10E+04	1,23E+06	5,45E+05	5,90E+05	6,38E+05
PDA	1,38E+02	0*	0*	7,05E+02	8,73E+02	8,68E+02
CRVN	0	0	0	0	0	0
Caldo Lauril	0	0	0	0	0	0

* No fueron detectados por las siembras realizadas, corresponden a valores de orden inferior a 10^1 .

Los productos cumplen con los parámetros de recuento de mohos y levaduras, y enterobacterias, sin embargo, el recuento de mesófilos está por encima de especificación, lo que corresponde a la presencia de las cepas de BAL encargadas de la fermentación, es por ello que se recomienda que se implemente un tratamiento de pasteurización o similar que reduzca la carga final de dichos microorganismos si se desea producir a nivel industrial, ya que actualmente no existe regulación de productos encurtidos con cargas microbianas de bacterias lácticas.

7.6. Análisis sensorial

La encuesta se realizó a 68 personas mayores de 14 años, de los cuales el 55% fueron hombres y el 45% restante mujeres.

Para realizar el análisis sensorial a las muestras obtenidas al final del proceso se hizo un proceso de desalinización con inmersión y lavado con agua para asegurar el porcentaje permitido para consumo humano el cual es de 2%. Las muestras con concentración al 5%, 10%, y 15% se dejaron en inmersión de agua potable durante 5, 12 y 20 minutos respectivamente.

7.6.1. Prueba hedónica para Color, Aroma y Textura

La mayor aceptación de color corresponde a las muestras con concentración de sal del 15% SI con un 5%, seguida de la concentración del 10% CI con un 46.6%. El color es lo primero que se percibe de un alimento, determinante para juzgar su calidad, es por ello importante tener un color en el producto agradable al consumidor, la sal en vegetales resalta su color haciéndolo más agradable a la vista (Cubero *et al.*, 2002).

Para el aroma se obtuvo una mayor preferencia para las muestras con BAL con concentración de sal al 5% y 10%, con un resultado de 36.7% y 35.3% respectivamente, las BAL producen metabolitos secundarios durante la fermentación que dan aromas característicos al producto (Jung *et al.*, 2011), los cuales son captados por los receptores olfativos dando una percepción agradable. Para el caso de las muestras sin BAL se obtuvieron porcentajes bajos de aceptación.

La textura tuvo una diferencia marcada para las muestras con BAL al 5% y 10% en aceptación, con un resultado de 47% y 42,6% respectivamente, lo que corrobora que las BAL ayudan a mejorar las características reológicas del alimento, debido a que la textura es una propiedad que resulta de la combinación de estructuras y diferentes compuestos químicos que posee el alimento, definidas por diversos sistemas fisicoquímicos (Bello, 2000). Para las muestras Sin BAL se obtuvo baja aceptación.

Se realizó el perfil sensorial tomando los descriptivos de aceptación a valor numérico siendo 1 “Me disgusta mucho” y 5 “Me gusta mucho”, los atributos graficados fueron color, aroma, y textura, esto se puede observar en la Figura 25.

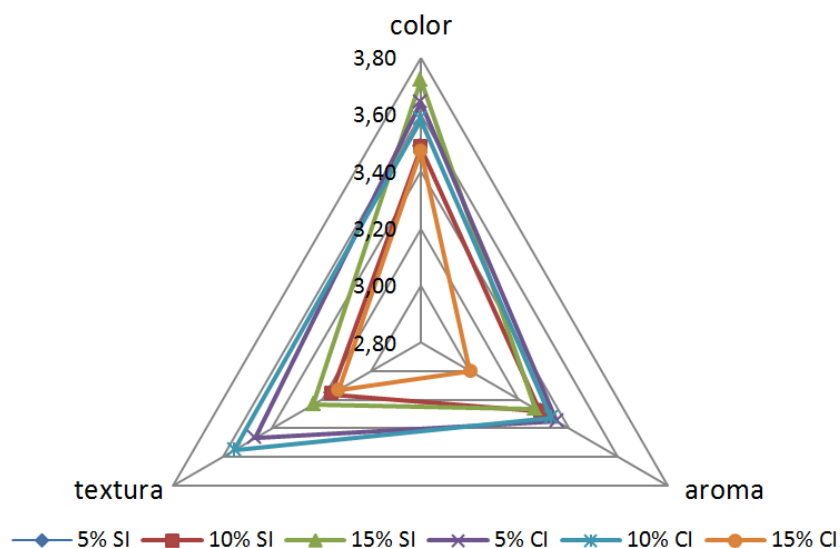


Figura 25. Perfil sensorial producto del proceso de fermentación del pimentón

Se observa en el perfil sensorial que las muestras tuvieron medias entre 3 a 3.5 que corresponde al descriptivo de “No me gusta ni me disgusta”, con ligeras tendencias a “Me gusta”.

7.6.2. Percepción de salinidad y acidez

En las muestras con concentración de sal al 15% con BAL y sin BAL, se manifestó una alta percepción del sabor salado, y para las muestras con bajo contenido de sal se obtuvo bajos porcentajes de percepción, lo cual puede indicar que los tiempos de enjuague fueron insuficientes en las muestras más concentradas. El sabor salado lo provocan las sales inorgánicas de bajo peso molecular, en este caso el NaCl, también llamada sal común. Los mecanismos de la percepción de salado en un inicio se da por su carácter iónico, y posterior que la parte aniónica determina las notas de sabor salado (Sancho *et al.*, 1999).

Los datos obtenidos del pH fueron en promedio de 3.29 al 5% con BAL; 3.26 al 5% sin BAL; y 3.48 al 10% con BAL los cuales tienen los porcentajes más altos en la percepción de acidez, 31.3%; 29.2%, y 28.1% respectivamente. De igual manera se mantuvo el comportamiento para las otras muestras, con un valor alto de pH y baja percepción de acidez. Este comportamiento es debido a que el sabor ácido lo originan los iones hidronio H_3O^+ de los ácidos, aunque no baste por sí solo la presencia de estos iones para que resulte un sabor ácido. Sin embargo, la sensación ácida percibida no resulta siempre directamente proporcional a la concentración protónica del medio, medida por su pH, aunque se puede observar que cuanto más bajo sea el pH de un alimento más ácido será el sabor provocado. Esto quiere decir que toda modificación que se haga del pH de un alimento implicará la alteración de la sensación de acidez (Sancho *et al.*, 1999)

7.6.3. Prueba de preferencia

Como se muestra en la Figura 26, la mayor preferencia se encuentra en la muestra de la concentración de sal 10% CI, seguida por 5% CI, lo que evidencia que el tratamiento con BAL resalta su sabor el cual es la sensación recibida en respuesta al estímulo provocado por sustancias químicas solubles que posee el alimento sobre las papilas gustativas (Bello, 2000). La cepa *L. mesenteroides* produce compuestos como lactato, dióxido de carbono, etanol y acetato que le da propiedades especiales al alimento (Jung *et al.*, 2011, Ji, *et al.*, 2012).

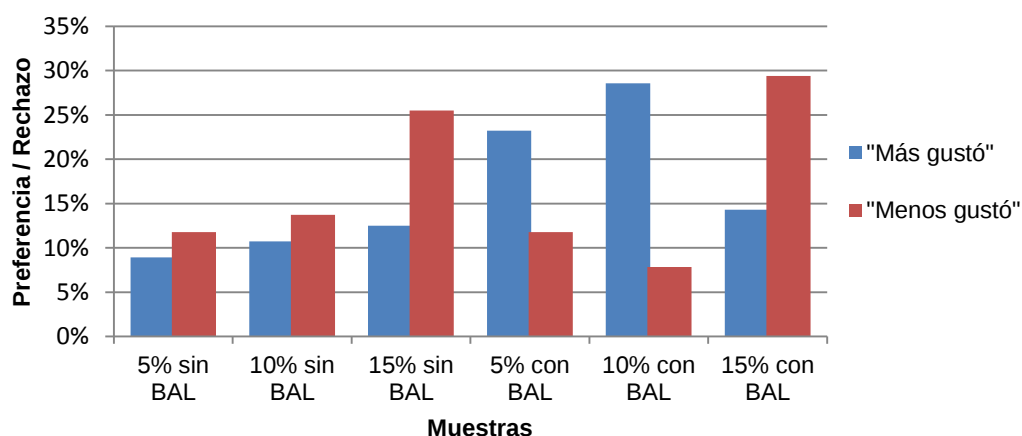


Figura 26. Prueba de preferencia de muestras de pimentón fermentado

8. CONCLUSIONES

El medio de cultivo seleccionado garantiza el crecimiento de *L. mesenteroides* y *L. plantarum* por encima de 10^8 UFC/mL con un costo ocho veces inferior al medio comercial MRS.

Considerando el efecto de la fermentación en las características físicoquímicas y microbiológicas, el proceso puede detenerse en el noveno día ya que existe una tendencia al equilibrio, a partir del cual ya no se presentan cambios significativos, alcanzando un pH inferior a 3.7.

La deshidratación osmótica de las muestras en la salmuera se relaciona directamente con la concentración de NaCl en la misma, encontrando que la flora propia del pimentón no resiste altas concentraciones de NaCl.

El tratamiento térmico de escaldado aumenta la humedad inicial y reduce la elasticidad, sin embargo, se favorece el incremento en la tonalidad roja de la parte interior del pimentón.

A partir de tres días de fermentación los parámetros físicoquímicos presentaron tendencia a estabilizarse; la a_w estuvo por debajo de 0.91, la humedad en 87%, 90% y 93% para concentraciones de sal 15%, 10% y 5%, respectivamente.

El color no se afecta significativamente por la presencia de las BAL ni por la concentración de sal. La textura no presenta una tendencia definida ni se ve afectada por la concentración de sal, pero sí por el tiempo, igualando al final la elasticidad de las muestras control.

El producto terminado es apto para el consumo humano, sin embargo se recomienda realizar un tratamiento de reducción de la carga de bacterias lácticas final del proceso con el fin de cumplir con la Resolución 2155 del 2012.

La muestra con mayor aceptación sensorial en todos los parámetros, tanto el aroma, como la textura y el color es la 10% CI, seguida por 5% CI. Éstas mismas presentan la mayor percepción de acidez, lo cual concuerda con los bajos valores de pH alcanzados.

Las cepas *L. mesenteroides* y *L. plantarum* A6 incubadas en el MS durante 12 y 18h, respectivamente, adicionadas en una salmuera al 10% de NaCl, sin agitación, a una temperatura de 32 °C, constituyen las mejores condiciones para la fermentación de pimentón rojo escaldado.

Finalmente, y teniendo en cuenta el futuro promisorio de la producción de hortalizas en el Valle del Cauca, y las tendencias actuales de alimentación, se puede decir que los encurtidos de pimentón elaborados mediante fermentación ácido láctica tienen un potencial mercado inmediato.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el proceso de fermentación con otras BAL y comparar los resultados obtenidos en esta investigación.
- Realizar nuevas investigaciones del proceso de fermentación láctica con otro tipo de hortalizas, dando un valor agregado a este grupo de alimentos, e impulsando su desarrollo agroindustrial.
- Evaluar la vida útil del pimentón fermentado en diferentes tipos de empaques a través del tiempo.
- Estudiar las características nutricionales del pimentón fermentado comparado con el fresco.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. Disponible online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>
- Acuerdo de competitividad cadena de hortalizas*. (2006). P 17. Bogotá: Universidad Nacional. Consultado el 12 de febrero de 2013, página web Universidad Nacional: http://www.sich.unal.edu.co/sich/datos_publicos/
- Agudelo, C., Ortega, R., Hoyos, D. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. Universidad del Cauca. p. 3-4.
- Alvarado, M., y Cabrera, L. (2010). *Determinación del tiempo de vida útil en los pimientos california verdes frescos en bandejas plásticas empacados con papel film*. Seminario de graduación para obtención del título de Tecnólogo en Alimentos. Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Arce-Lopera, C., Masuda, T., Kimura, A., Wada, Y., Okajima, K. (2013). Luminance distribution as a determinant for visual freshness perception: Evidence from image analysis of a cabbage leaf. *Food Quality and Preference*. 27, 202-207.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). (1984). Official methods of analysis. 10.041
- Balciunas, E., Castillo, F., Dimitrov, S., Gombossy, B., Converti, A., Oliveira, R. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32, 134-142.
- Ballesteros, C. (1996). *Contribución al conocimiento científico de las Berenjenas de Almagro*. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado Químico. Ciudad Real, España: Facultad de Ciencias Químicas.
- Barreiro, J., y Sandoval, A. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. Venezuela: Equinoccio
- Bello, J. (2000) *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. España: Díaz de Santos S.A. p 195-196, 179-186.
- Bengtsson, H., Hall, C. y Tornberg, E. (2011). Effect of physicochemical properties on the sensory perception of the texture of homogenized fruit and vegetable fiber suspensions. *Journal of Texture Studies*, 42, 291-299.
- Bernal, I. (1998). *Análisis de alimentos (3ª ed.)*. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Boucher, F. (1991). *Tecnología alimentaria y agroindustria rural*. Colombia: Celater.
- Cano, M. P. (1996). *Vegetables*. En L. E. Jeremiah (Ed.), Freezing effects on food quality (p. 520). New York: Marcel Dekker.
- Castro, S., Saraiva, J., Lopes-da-Silva, J., Delgadillo, I., Loey, A., Smout, C., Hendrickx. (2007). Effect of thermal blanching and of high pressure treatments on sweet green and red bell pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry*. 107, 1436-1449.
- Capozzi, V., Weidmann, S., Fiocco, D., Rieu, A., Hols, P., Guzzo, J., Spano, G. (2011). Inactivation of a small heat shock protein affects cell morphology and membrane fluidity in *Lactobacillus plantarum* WCF1. *Research in Microbiology*. 162. 419 – 425.
- Chang, J.Y., Chang, H.C. (2011). Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *Journal of Food Science*, 76, M72–M78.

- CODEX ALIMENTARIUS. (1981). Pepinos encurtidos (encurtido de pepinos). Codex Stan 115. Estados Unidos.
- Contento, R., Abril, D. F., Vargas, E. M., Varela, D. A., Arango, L. M., y Useche, B. L. (2009). *Manual de prácticas de Ingeniería de alimentos*. Bogotá, Colombia: Universidad Jorge Tadeo Lozano. pp. 30-48.
- Corabastos. (2013). Consultado el 01 de junio 2013. Página web Corabastos: <http://www.corabastos.com.co/historico/reportes/>
- Crueger, W. (1993). *Biotecnología: Manual de microbiología industrial*. España: Acribia.
- Cubero N., Monferrer A., Villalta J. (2002). Aditivos alimentarios. Ediciones Mundi-Prensa. España. P. 21.
- Del Greco, N. (2010). *Estudio sobre tendencias de consumo de alimentos* (p. 10-26).
- Di Cagno, R., Cardinali, G., Minervini, G., Antonielli, L., Rizzello, C.G., Ricciuti, P., Gobbetti, M. (2010a). Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. *Food Microbiology*, 27, 381-389.
- Di Cagno, R., Coda, R., Angelis, M., Gobetti, M. (2012). Review: Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food microbiology*. 33(1), 1-10.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2011a). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28, 1062-1071.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S., Gobbetti, M. (2011b). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 900-909.
- Di Cagno, R., Surico, R., Minervini, G., De Angelis, M., Rizzello, C., Gobbetti, M. (2009). Use of autochthonous starters to ferment red and yellowpeppers (*Capsicum annum* L.) to be stored at room temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 130, 108-116.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Paradiso, A., De Angelis, M., Salmon, J.-C., Buchin, S., De Gara, L., Gobbetti, M. (2008b). Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 473-483.
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., Gobbetti, M. (2008a). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*, 127, 220-228.
- Díaz Z., Sánchez, H., Carreño, C. (2010). Temperatura y tiempo de fermentación en la elaboración de encurtidos con *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. *Ciencia, tecnología y humanidades*, 1(1), 39-46.
- Doyle, M. (1997). *Microbiología de los alimentos*. España: Acribia S.A.
- Drosinos, E., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M., y Metaxopoulus, J. (2005). Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology*, 99(6), 1314-1323.
- Dubois, M., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- FAO (Food and Agriculture Organization). (2006). *Fichas técnicas, Productos frescos y procesados*. Consultado el 03 de junio 2013. Página web FAO:

http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/PIMIENTO.HTM

- FAO (Food and Agriculture Organization). (2013). *Principios de conservación de alimentos*. Consultado el 18 de junio de 2013. Página web FAO: <http://www.fao.org/docrep/x5062s/x5062S08.htm#Los%20principios%20de%20la%20conservaci%C3%B3n%20de%20alimentos>
- Flores, M. (2000). *Elaboración de cultivos microbianos a partir de pasta de coco y su utilización para borregos en engorda*. Tesis de grado para optar por el título Maestra en Ciencias pecuarias. México: Universidad de Colima.
- Fu, W., y Mathews, A.P. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3, 163-170.
- García, G., Quintero, R., López, M. (2004). *Biotecnología alimentaria*. México: Limusa.
- García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., y Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in food science and technology*, 21, 373-382.
- Garriga, M., Compte, M., Casademont, G. y Moreno-Amich, R. (1988). Influence of carbohydrates in the fermentation of dry sausages. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 28, 548-557.
- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, Danova, S. (2009). Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology and Biotechnology*. Edición especial, disponible online.
- Gioldoni, J. (1983). *Fermentação láctica de hortaliças e azeitonas*. En A. Aquarone, W. Borzani, U. Almeida, & E. Blucher (Ed.), *Alimentos e bebidas produzidos por fermentação* (vol. 5, pp. 149-171). Brasil.
- Giraud, E., Champalier, A., y Raimbault, M., (1994). Degradation the raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 60(12), 4319-4323.
- Giraud, E., Raimbault, M., (1992). Contribution to the physiological and enzymological study of a new amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented cassava, Université d'Aix-Marseille. P. 152.
- Goulas, A. E., y Kontominas, M. G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93(3), 511-520.
- Groben, G. J., Peters, S., Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Hoefnagel, M., Hugenholtz, J., Eggink, G. (2001). Spontaneous Formation of a Mannitol-Producing Variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* Grown in the Presence of Fructose. *Applied and Enviromental Microbiology*, 67(6), 2867-2870.
- Guerra-Vargas, M., Jaramillo-Flores, M. E., Dorantes-Alvarez, L., y Hernandez-Sanchez, H. (2001). Carotenoid Retention In Canned Pickled Jalapeño Peppers and Carrots As Affected by Sodium Chloride, Acetic Acid, and Pasteurization. *Journal of Food Science*, 66(4), 620-626.
- Han, S. C., Jeong, M. L., Ju-Hoon, L., Pyung, C. L. (2013). Isolation and Characterization of a Cryptic Plasmid, pMBLR00, from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3733. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 837-842.
- Henao, S. (2010). *Evaluación de las propiedades físico-químicas y la calidad microbiológica de mango tomy atkins (mangifera indica l.) impregnado con bacterias lácticas*. Trabajo de

- grado para optar al título Ingeniera de Alimentos. Cali, Colombia: UniVersidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos.
- Hernández, M., Sastre, A. (1999). *Tratado de Nutrición*. España: Ediciones Díaz de Santos. pp. 336-338.
- HunterLab. (2008). *Applications Note. Insight on Color (vol. 8, No. 7)*.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozes, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*, 31, 1-8.
- Idham, Z., Muhamad, I. I. y Sarmidi, M. (2012). Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from *hibiscus sabdariffa* L. *Journal of Food Process Engineering*, 35, 522-542.
- IESN (2001). *Consciencia Natural: Una estrategia de salud para toda la vida*. (Informe Abril, 2001). Chile: Instituto de Estudios en Salud Natural, consultado el 28 de mayo de 2013. Página web IESN: <http://www.oocities.org/iesnchile/soya.html>
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (1994). NTC 3634-1. Frutas frescas y hortalizas frescas. Pimentón. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (1997). NTC 4132. Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnicas de recuento de colonias a 25°C. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (2000). NTC 4810. Pepinos encurtidos (encurtido de pepino). Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (2002). NTC 1036. Productos lácteos. Leche en polvo. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (2002). NTC 5034. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de bacterias mesófilas de ácido láctico. Técnica de recuento de colonias a 30°C. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (2002). NTC 5098. Productos lácteos. Sueros en polvo. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (INCONTEC). (2007). NTC 4458. Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de coliformes o *Escherichia coli* o ambos. Técnica de recuento de colonias utilizando medios fluorogénicos o cromogénicos. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS (INVIMA). (2012). Resolución 2155 por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las hortalizas que se procesan, empaquetan, transportan, importan y comercializan en el territorio nacional. Bogotá D.C. Colombia
- INSTITUTO NACIONAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE MEDICAMENTOS Y ALIMENTOS (INVIMA). (1997). Decreto 3075 Por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones. Bogotá D.C. Colombia
- Ji, Y. J., Se, H. L., Hyo, J. L., Hye-Young, S., Wan-Soo, P., Che, O. J. (2012). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 378-387.
- Jiménez, P., Sibaja, M., Vega-Baudrit, J. (2012). Síntesis y caracterización de poli(ácido l-láctico) por policondensación directa obtenido del fermento de desechos agroindustriales de banano (*Musa acuminata* var. Cavendish cultivar Gran naine) en Costa Rica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(2), 52-59.

- Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, J. M., Park, M. S., Bae, J. W., Hahn, Y., Madsen, E. L., Jeon, C. O. (2011). Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2264–2274.
- Kalchayanand. N., Frethem. C., Dunne. P., Sikes. A., Ray. B. (2002). Hydrostatic pressure and bacteriocin-triggered cell wall lysis of *Leuconostoc mesenteroides*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3. 3. 33 - 40.
- Kuehl, R.O. (2001). *Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones* (2ª ed.). México: Thomson International.
- Lee, H., Yoon, H., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J. (2011). Functional properties of *Lactobacillus* strains from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 155-161.
- Lee, S. Y. (2004). Seguridad microbiana de encurtidos de frutas y vegetales y la tecnología de barreras. *Internet Journal of Food Safety*, 4, 21-32.
- Lee, S.-Y. (2012). Seguridad microbiana de encurtidos de frutas y vegetales y la tecnología de barreras. *Mundo Alimentario*, 20-27.
- Lownds, N., Banaras, M., Bosland, P. (1993). Relationships between Postharvest Water Loss and Physical Properties of Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.). *Postharvest Technology*, 28(12), 1182-1184.
- Madigan M., Martingo J., Parker J. (2000). *Brock Biology of Microorganisms* (9ª ed.). Estados Unidos: Prentice Hall.
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica* (7ª ed.). México: Cengage Learning. p. 1006.
- Mitchell, D., (2012). *Aprovechamiento del TLC con EEUU en el Valle del Cauca* (pp. 11, 17). Colombia: Oficina para el aprovechamiento del TLC con EEUU.
- Monroe, J., y Tarazona, J. M. (1981). *Microbiología moderna de los alimentos*. España: Acribia S.A.
- Montalvo, C. (2010). *Bioconservación de cárnicos de cerdo con bacterias acidolácticas*. Trabajo de grado para optar por el título Magister en Ingeniería con énfasis en Ingeniería de Alimentos. Cali, Colombia: Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos.
- Montaño, A., de Castro, A., Rejano, L. (1992). Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 43(6), 352-360.
- Montgomery, D.C. (2008). *Diseño y Análisis de Experimentos* (2ª ed.). México: Grupo Editorial Iberoamérica.
- Montoya-Villafañe, H. H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines* (2 ed.). Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Mora, N., y García, A. (2007). *Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos*. Trabajo de grado para obtener el título Lic. En Química de Alimentos. México: Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C. (2010). *Tablas de composición de alimentos / Food composition tables*. España: Pirámide.
- Navarro, J., Flores, P., Garrido, C., Martínez, V. (2004). Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*. 96, 66-73
- Oliveira, J. E., Moraes, E. A., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H., Glenn, G. M., Medeiros, E. S. (2013). Properties of Poly(lactic acid) and Poly(ethylene oxide) Solvent Polymer Mixtures and Nanofibers Made by Solution Blow Spinning. *Journal of Applied polymer science*, 10, 3672-3681.

- Papageorge, L., McFeeters, R., Fleming, H. (2003). Factors Influencing Texture Retention of Salt-free, Acidified, Red Bell Peppers during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1460-1463.
- Pares, R., y Juárez, A. (2002). *Bioquímica de los microorganismos*. España: Reverté.
- Parker, P. (2009). *The 2009 Report on Pickles: World Market Segmentation by City*. Consultado el 21 de abril de 2013, página web *Researchs and Markets*: <http://www.researchandmarkets.com/reports/>
- Plenghvidhya, V., Breidt, F., Lu, Z., Fleming, H. P. (2007). DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7697-7702.
- Pulido, R. P., Benomar, N., Cañamero, M. M., Abriouel, H., Gálvez, A. (2012). *Fermentation of caper products*. En: Hui, Y. H. (Ed.). *Handbook of Plant-based Fermented Food and Beverage Technology* (2^a ed). Estados Unidos. pp. 201-208.
- Quintero, J., y Ramirez, C. (2007). Determinación de la cinética de fermentación en la elaboración de pickles y sauerkraut, usando cultivos iniciadores de bacterias lácticas. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 16(3), 54-56.
- Ramírez, M. (2005). *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos*. Trabajo de grado para optar por el título de Lic. Químico en Alimentos. México: Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.
- Rao, M., Pintado, J., Stevens, W., Guyot, J. (2004). Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology*, 94, 331-337.
- Samaniego, L. M., Sosa del Castillo, M. (2000). *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Ciudad de Matanzas, Cuba. Editorial Universitaria del Ministerio de Educación Superior de la República de Cuba. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía.
- Sánchez, I., Palop, L., Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of "Almagro" eggplants. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 9-17.
- Sancho J., Bota E., Castro J. (1999). Introducción al análisis sensorial de los alimentos. *Estudi General*. España. P. 74 – 75.
- Sancho, J., Bota, E., & de Castro, J. (1999). *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona.
- Schmidt, F. C., Carciofi, B. A., y Laurindo, J. B. (2008). Salting operational diagrams for chicken breast cuts: Hydration-dehydration. *Journal of Food Engineering*, 88, 36-44.
- Seseña, S. (2005). *Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivos iniciadores para la fermentación de la berenjena de almagro*. Tesis doctoral. Toledo, España: Universidad de Castilla-La Mancha. Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos. pp. 76-77
- Soysal, Y., Ayhan, Z., Esturk, O., Ankan, M. F. (2009). Intermittent microwave–convective drying of red pepper: Drying kinetics, physical (colour and texture) and sensory quality. *Biosystems Engineering*, 103, 455-463.
- Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjöblom, M., Joutsen, M., Palva, A., Ryhänen, E.-L. (2004). Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 439-444.
- Thomas, T., y Berry. J. (1999). *Pickling Fruits and Vegetables*. *Food Preservation*. Estados Unidos: Washington State University.

- Urribarrí, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z., Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica FCV-LUZ*, 14(4), 297-302.
- Vallejo F., y Estrada E. (2004). *Producción de hortalizas de clima cálido* (p. 111). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
- Vázquez, M. M. (2008). *Viabilidad y propiedades fisicoquímicas de leche fermentada probiótica*. Trabajo de grado para optar por el título Maestra en Ciencia de Alimentos. Puebla, México: Escuela de Ingeniería y Ciencias. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas de Puebla.
- Wood, B., y Warner, P. (Ed.) (2003). *Genetics of lactic acid bacteria* (vol. 3). Estados Unidos: Plenum publishers.
- Yeo, S., Ewe, J., Sau-Chan, C., Tze, T., Tze, M. (2011). Carriers of Probiotic Microorganisms. *Microbiology Monographs*, 21, 191-220.
- Zhou, G., Xu, X., y Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, 86(1), 119-128.

ANEXOS

ANÁLISIS SENSORIAL PIMENTON FERMENTADO

Fecha: _____ Género: M () F () Edad: Menos de 14 años () Entre 14 y 22 años () Entre 23 y 50 años () Mas de 50 años ()

Pruebe cada muestra y responda en el orden las preguntas marcando con una "X" en el espacio indicado para cada referencia de muestra.

1. El **color** del producto

	694	591	376	914	344	794
a) Me gusta mucho						
b) Me gusta						
c) No me gusta ni me disgusta						
d) Me disgusta						
e) Me disgusta mucho						

2. El **aroma** del producto

	694	591	376	914	344	794
a) Me gusta mucho						
b) Me gusta						
c) No me gusta ni me disgusta						
d) Me disgusta						
e) Me disgusta mucho						

3. La **textura** del producto

	694	591	376	914	344	794
a) Me gusta mucho						
b) Me gusta						
c) No me gusta ni me disgusta						
d) Me disgusta						
e) Me disgusta mucho						

4. Marque con una "X" de 1 a 6, donde **1 es poco percibido y 6 muy percibido**, su percepción sobre los siguientes aspectos:

Salado

	694	591	376	914	344	794
6						
5						
4						
3						
2						
1						

Ácido

	694	591	376	914	344	794
6						
5						
4						
3						
2						
1						

Observaciones adicionales:

MUCHAS GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Figura A1. Formato de encuesta de analisis sensorial del pimenton fermentado

Tabla A1. Análisis estadístico para el crecimiento del *L. mesenteroides*

Regresión para mezclas: Ln Viabilidad vs. Leche. Suero de leche Coeficientes de regresión estimados para Ln Viabilidad (proporciones del componente)							
		EE del					
Término	Coef	coef.	T	P	VIF		
Leche	19,226	0,59526	*	*	52,221		
Suero de leche	20,206	0,04981	*	*	2,166		
Leche*Suero de leche	9,619	1,12005	8,59	0,000	58,889		
S = 0,0909371 PRESS = 0,131989 R-cuad. = 99,02% R-cuad. (pred.) = 98,25% R-cuad. (ajustado) = 98,80%							
Análisis de varianza para Ln Viabilidad (proporciones del componente)							
Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Regresión	2	7,48273		7,482733	3,741366	452,43	0,000
Lineal	1	6,87280		0,024000	0,024000	2,90	0,123
Cuadrática	1	0,60994		0,609937	0,609937	73,76	0,000
Leche*Suero de	1	0,60994		0,609937	0,609937	73,76	0,000
Error residual	9	0,07443		0,074426	0,008270		
Falta de ajuste	1	0,00923		0,009230	0,009230	1,13	0,318
Error puro	8	0,06520		0,065196	0,008150		
Total	11	7,55716					
Regresión para mezclas: Precio (\$/1L) vs. Leche. Suero de leche Coeficientes de regresión estimados para Precio (\$/1L) (proporciones del componente)							
		EE del					
Término	Coef	coef.	T	P	VIF		
Leche	1816,70	0,000000	*	*	52,221		
Suero de leche	1554,70	0,000000	*	*	2,166		
Leche*Suero de leche	-0,00	0,000000	*	*	58,889		
S = 0 PRESS = 0 R-cuad. = 100,00% R-cuad. (pred.) = 100,00% R-cuad. (ajustado) = 100,00%							
Análisis de varianza para Precio (\$/1L) (proporciones del componente)							
Fuente	GL	SC	Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Regresión	2	32176,9		32176,88	16088,44		
Lineal	1	32176,9		1713,56	1713,56	*	*
Cuadrática	1	0,0		0,00	0,00	*	*
Leche*Suero de	1	0,0		0,00	0,00	*	*
Error residual	9	0,0		0,00	0,00		
Falta de ajuste	1	0,0		0,00	0,00	*	*
Error puro	8	0,0		0,00	0,00		
Total	11	32176,9					

Tabla A2. Análisis estadístico para el crecimiento del *L. plantarum*

Regresión para mezclas: Ln Viabilidad vs. Leche. Suero de leche						
Coeficientes de regresión estimados para Ln Viabilidad (proporciones del componente)						
Término	Coef	EE del coef.	T	P	VIF	
Leche	22,1436	0,93864	*	*	52,221	
Suero de leche	22,0620	0,07854	*	*	2,166	
Leche*Suero de leche	-0,8011	1,76616	-0,45	0,661	58,889	
S = 0,143395 PRESS = 0,338181						
R-cuad. = 21,91% R-cuad. (pred.) = 0,00% R-cuad. (ajustado) = 4,56%						
Análisis de varianza para Ln Viabilidad (proporciones del componente)						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Regresión	2	0,051934	0,051934	0,025967	1,26	0,329
Lineal	1	0,047703	0,000166	0,000166	0,01	0,930
Cuadrática	1	0,004231	0,004231	0,004231	0,21	0,661
Leche*Suero de	1	0,004231	0,004231	0,004231	0,21	0,661
Error residual	9	0,185058	0,185058	0,020562		
Falta de ajuste	1	0,001256	0,001256	0,001256	0,05	0,821
Error puro	8	0,183803	0,183803	0,022975		
Total	11	0,236992				
Regresión para mezclas: Precio (\$/1L) vs. Leche. Suero de leche						
Coeficientes de regresión estimados para Precio (\$/1L) (proporciones del componente)						
Término	Coef	EE del coef.	T	P	VIF	
Leche	1816,70	0,000000	*	*	52,221	
Suero de leche	1554,70	0,000000	*	*	2,166	
Leche*Suero de leche	-0,00	0,000000	*	*	58,889	
S = 0 PRESS = 0						
R-cuad. = 100,00% R-cuad. (pred.) = 100,00% R-cuad. (ajustado) = 100,00%						
Análisis de varianza para Precio (\$/1L) (proporciones del componente)						
Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
Regresión	2	32176,9	32176,88	16088,44		
Lineal	1	32176,9	1713,56	1713,56	*	*
Cuadrática	1	0,0	0,00	0,00	*	*
Leche*Suero de	1	0,0	0,00	0,00	*	*
Error residual	9	0,0	0,00	0,00		
Falta de ajuste	1	0,0	0,00	0,00	*	*
Error puro	8	0,0	0,00	0,00		
Total	11	32176,9				

Tabla A3. Análisis Postanova poe el método de Tukey. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Crecimiento microbiano	Tiempo	N	Media	Agrupación
	3	12	4,6	A
	6	12	4,5	A
	9	12	3,9	A B
	13	12	3,0	B C
	16	12	2,2	C D
	0	12	1,4	D
Humedad	Tiempo	N	Media	Agrupación
	0	12	92,8	A
	13	12	90,1	B
	9	12	90,1	B
	16	12	90,0	B
	6	12	90,0	B
	3	12	89,8	B
pH	Tiempo	N	Media	Agrupación
	0	12	4,9	A
	3	12	4,0	B
	6	12	3,9	B
	9	12	3,7	C
	16	12	3,6	C
	13	12	3,6	C
Módulo de Young, E	Tiempo	N	Media	Agrupación
	6	12	1,9	A
	3	12	1,9	A
	9	12	1,7	A B
	0	12	1,7	A B
	16	12	1,6	B
	13	12	1,5	B
a_w	Tiempo	N	Media	Agrupación
	0	12	1,0	A
	9	12	1,0	B
	16	12	1,0	C
	6	12	0,9	C
	13	12	0,9	C
	3	12	0,9	D