

**BIOCONSERVACIÓN DE MATRICES DE FRUTA FRESCA MEDIANTE
IMPREGNACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS: VALIDACIÓN EN MANGO**



KATHERINE MUÑOZ ARTUNDUAGA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
FACULTAD DE INGENIERÍAS
SANTIAGO DE CALI
2015**

**BIOCONSERVACIÓN DE MATRICES DE FRUTA FRESCA MEDIANTE
IMPREGNACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS: VALIDACIÓN EN MANGO**

KATHERINE MUÑOZ ARTUNDUAGA

**Trabajo de Investigación presentado al programa de maestría en Ingeniería
de Alimentos de la Universidad del Valle para optar al título de**

**Magíster en
Ingeniería de Alimentos**

Director Ing. ALFREDO AYALA APONTE. Ph.D

Codirectora Bio. CRISTINA RAMÍREZ TORO Ph.D

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE ALIMENTOS
ESCUELA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
FACULTAD DE INGENIERÍAS
SANTIAGO DE CALI
2015**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	- 7 -
INTRODUCCIÓN.....	- 9 -
1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	- 11 -
2.0 JUSTIFICACIÓN	- 14 -
3.0 OBJETIVOS	- 15 -
3.1 OBJETIVO GENERAL	- 15 -
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	- 15 -
4.0 MARCO TEÓRICO	- 16 -
4.1 PRODUCTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS.....	- 16 -
4.2 LA IMPREGNACIÓN AL VACÍO COMO TRATAMIENTO DE CONSERVACIÓN	- 18 -
4.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	- 20 -
4.3.1 Clasificación de las BAL.....	- 21 -
4.3.1.1 Producción de sustancias antimicrobianas.	- 21 -
4.3.1.2 Beneficios del consumo de BAL	- 23 -
5.0 ANTECEDENTES	- 26 -
CONSERVACIÓN DE FRUTAS POR IMPREGNACIÓN AL VACÍO.....	- 26 -
IMPREGNACIÓN DE BAL.....	- 27 -
6.0 MATERIALES Y MÉTODOS	- 29 -
6.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.	- 29 -
6.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE BAL	- 29 -
6.2.5 PRUEBA DE INHIBICIÓN FRENTE A MOHOS Y LEVADURAS.....	- 31 -
6.3 ELECCIÓN DEL MEDIO PARA IMPREGNACIÓN.	- 32 -
6.4 ELABORACIÓN DEL MEDIO DE IMPREGNACIÓN.	- 37 -
6.5 PRUEBAS DE IMPREGNACIÓN	- 37 -
6.6 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LAS MUESTRAS IMPREGNADAS	- 45 -
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 46 -
7.3 ELECCIÓN DEL MEDIO PARA IMPREGNACIÓN.	- 55 -
7.4.4 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LAS MUESTRAS IMPREGNADAS	- 84 -
8.0 CONCLUSIONES.....	- 87 -
ANEXOS	- 101 -

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Pasos típicos para la operación de transferencia de masa entre alimento poroso inmerso en un líquido bajo condiciones de vacío.	19
Figura 2. Mango Tommy Atkins.	38
Figura 3. Método de corte de mango.	38
Figura 4. Cilindro de muestra.	39
Figura 5. Equipo experimental de impregnación a vacío.	40
Figura 6. Muestras empacadas a dos presiones.	41
Figura 7. Coloración típica de una bacteria ácido láctica Gram (+).	47
Figura 8. Halos de inhibición obtenidos frente a <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
Figura 9. Halos de inhibición obtenidos frente a <i>Salmonella Typhimurium</i> .	50
Figura 10. Halos de inhibición frente a. Fusarium sp b. Penicillium sp c. Rhodotorula rubra.	53
Figura 11. Efectos principales para el recuento de BAL en los medios de cultivo evaluados.	57
Figura 12. Curvas de crecimiento para L.casei en Medio 2 y en MRS.	59
Figura 13. Parámetros evaluados durante la cinética de fermentación de L.casei.	59
Figura 14. Curvas de crecimiento para L.sakei en Medio 2 y en MRS.	61
Figura 15. Parámetros evaluados durante la cinética de fermentación de L.sakei.	62
Figura 16. Comparación del crecimiento de Leuconostoc entre Medio 2 y MRS.	64
Figura 17. Parámetros evaluados durante la cinética de fermentación de Leuconostoc.	64
Figura 18. Variación del Contenido de Humedad (%) en las muestras de mango durante almacenamiento.	69
Figura 19. Evolución del pH para muestras frescas e impregnadas con bacterias lácticas	70

durante el almacenamiento.

Figura 20. Evolución del contenido de azúcares totales para muestras frescas e impregnadas con bacterias lácticas durante el almacenamiento.	71
Figura 21. Evolución del contenido de azúcares reductores para muestras frescas e impregnadas con bacterias lácticas durante el almacenamiento.	73
Figura 22. Cambios de claridad en muestras de mango impregnada con BAL durante el almacenamiento.	74
Figura 23. Evolución de la pureza (*C _{ab}) de claridad en muestras de mango impregnada con BAL durante el almacenamiento.	76
Figura 24. Cambios de tonalidad en muestras de mango impregnada con BAL durante el almacenamiento.	78
Figura 25. Cambios totales de color en las muestras de mango.	79
Figura 26. Evolución del Módulo de Elasticidad (Ed) en las muestras durante el almacenamiento.	80
Figura 27. Evolución del recuento de lactobacillus en las muestras durante el almacenamiento.	84

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas para efectuar la prueba de inhibición	31
Tabla 2. Formulación de los medios de impregnación.	34
Tabla 3. Diseño experimental para elección del medio de impregnación.	34
Tabla 4. Diseño de experimentos con sus factores, niveles y variables de respuesta.	41
Tabla 5. Características morfológicas de las cepas estudiadas.	46
Tabla 6. Viabilidad de las cepas a 25, 35 y 40°C.	48
Tabla 7. Pruebas de inhibición entre las cepas seleccionadas.	48
Tabla 8. Capacidad de producción de gas de las cepas estudiadas.	49
Tabla 9. Prueba de inhibición frente a bacterias patógenas.	51
Tabla 10. Prueba de inhibición frente a mohos y levaduras.	52
Tabla 11. Prueba de viabilidad de las cepas a diferentes pH en UFC/mL.	54
Tabla 12. Resultados de crecimiento de las cepas en los medios de Impregnación.	56
Tabla 13. Comparación de los datos cinéticos obtenidos del crecimiento microbiano de L.casei en el medio 2 y en medio control MRS.	58
Tabla 14. Comparación de los datos cinéticos obtenidos del crecimiento microbiano de L.sakei en el medio 2 y en medio control MRS.	61
Tabla 15. Comparación de los datos cinéticos obtenidos del crecimiento microbiano de Leuconostoc en el medio 2 y en medio control MRS.	63
Tabla 16. Valores iniciales de aw, sólidos solubles (°Brix) y recuento de lactobacilos de las soluciones de impregnación con L. casei rhamnosus y L. sakei.	65
Tabla 17. Valores iniciales de contenido de humedad, aw, sólidos solubles (°Brix), peso, color y recuento de lactobacilos en trozos de mango frescos e impregnados con L. casei	66

rhamnosus, L. sakei y L. casei + L. sakei.

Tabla 18. Análisis microbiológicos (NMP de coliformes totales-CT, NMP de coliformes fecales-CF, Recuento de mohos y levaduras-RML y Recuento de lactobacilos-RL) de muestras control e impregnadas. 83

RESUMEN

A matrices de mango impregnado a vacío con bacterias ácido lácticas se evaluaron propiedades físico-químicas y la calidad microbiológica durante el almacenamiento a 25°C, con el fin de obtener frutas mínimamente procesadas con un incremento en el tiempo de vida útil que permita mantener disponibilidad de productos con características organolépticas similares a la fruta fresca.

Se caracterizaron 7 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL), encontrándose que las cepas con mayor actividad protectora fueron *Lactobacillus casei rhamnosus* y *Lactobacillus sakei*, evaluando su viabilidad en tres medios de cultivo que contenían leche de soya, melaza, suero de leche y salvado de trigo en diferentes proporciones. Posteriormente se impregnaron cilindros de mango (variedad Tommy Atkins) de 1,2 cm de diámetro por 1,5 cm de altura, utilizando por separado soluciones que contenían *L.casei*, *L.sakei* y con una mezcla 50/50 v/v de ambos microorganismos durante 10 min a 0,76 bar con un periodo de relajación de 10 min a presión atmosférica. Se obtuvieron muestras con recuentos iniciales de bacterias ácido lácticas alrededor de 10^7 UFC/g.

Las muestras impregnadas fueron empacadas a dos niveles de presión, atmosférica (0,9bar)(AT) y vacío (-0,8bar)(V) y almacenadas durante 60 días a 25°C y 70% de humedad relativa junto con muestras control (no impregnadas de BAL). Durante su almacenamiento se evaluaron, la variación del contenido de humedad, pH, % azúcares totales y reductores, color, firmeza, calidad microbiológica y viabilidad de las bacterias lácticas.

El contenido de humedad de las muestras de mango impregnado no se afectó significativamente por ningún factor durante el almacenamiento, por consiguiente, se pueden considerar como frutas mínimamente procesadas. El pH de las muestras varió entre 4.15 y 3.15 durante el almacenamiento, sin una influencia para el tipo de bacteria o de empaque; los cambios más significativos se encontraron a los 10 y 20 días producto del metabolismo fermentativo durante el crecimiento de los microorganismos lácticos sin causar una disminución considerable del pH de las muestras, resultados correlacionados con la variación del porcentaje de azúcares totales y reductores en la muestras, que cambian de acuerdo al crecimiento microbiano.

Los parámetros de color mostraron influencia por el tipo de bacteria y el tipo de empaque, presentándose los menores cambios en las matrices de mango impregnadas con *L. Sakei* con empaque al vacío, mientras que las muestras no tratadas con BAL mostraron los mayores cambios, comprobando el efecto protector de la impregnación de BAL a muestras de mango sobre el color en términos de claridad y tonalidad. La impregnación de BAL ejerció un efector protector

sobre la firmeza de las muestras, los mejores resultados se obtuvieron para las muestras con *L.sakei* empacadas a presión atmosférica.

La calidad microbiológica de las muestras impregnadas permaneció estable durante todo el almacenamiento, presentándose deterioro por mohos y levaduras en las muestras sin tratar a partir del día 40 de almacenamiento.

Los resultados demuestran que la técnica de impregnación a vacío es efectiva para la incorporación de componentes activos en matrices de alimentos como el mango, obteniéndose un alimento bioconservado con viabilidad de los microorganismos, en el valor recomendado para ejercer su actividad bioprotectora (10^6 UFC/g), hasta el día 10 de almacenamiento a 25°C en AT y hasta el día 20 en V, para *L.casei* y *L.sakei*.

INTRODUCCIÓN

El cambio en el estilo de vida de la población, las tendencias por el consumo de alimentos más sanos, al igual que las amplias campañas y estudios epidemiológicos, han demostrado que el consumo de frutas y hortalizas tiene un efecto benéfico en la salud, contribuyendo a la prevención de enfermedades como la arteriosclerosis y el cáncer, al presentar moléculas transportadoras de vitaminas, minerales esenciales, fibra dietaria, antioxidantes fenólicos, glucosinolatos, entre otras sustancias bioactivas, que revierten dichos procesos degenerativos (González *et al.*, 2004; Tejedor, 2005; Robles *et al.*, 2007).

Estos cambios en la alimentación han ampliado el mercado hacia la producción de frutas y hortalizas frescas mínimamente procesadas, mediante la aplicación de operaciones unitarias de selección, lavado, pelado, deshuesado, cortado, etc., que para el caso de las frutas, que son productos altamente perecederos, esta manipulación incrementa la actividad metabólica del tejido vegetal, iniciándose procesos de pardeamiento enzimático generando el ablandamiento, deterioro microbiológico y desarrollo de sabores y olores indeseables, aún a temperaturas de conservación bajas, ocasionan grandes inconvenientes en la comercialización (Giraldo, 2006; González *et al.*, 2004; Robles *et al.*, 2007).

Uno de los métodos de conservación no térmica, que aumenta la vida útil del producto en óptimas condiciones de calidad, es la impregnación al vacío (Tejedor, 2005), técnica eficaz que tiene la capacidad de modificar la formulación de los alimentos y aumentar su funcionalidad mediante la incorporación de compuestos fisiológicamente activos (Betoret *et al.*, 2015), como vitaminas, minerales, antioxidantes, enzimas, reguladores de pH, antimicrobianos, fibra dietaria, probióticos, prebióticos y simbióticos, mejorando las características sensoriales y nutricionales de los alimentos y protegiéndolos del deterioro (Fito *et al.*, 2001). Muchas de las frutas que requieren de este tipo de procesos de conservación para evitar su deterioro gozan de gran popularidad entre los consumidores debido a su sabor, olor, color y valor nutritivo como es el caso del mango (Giraldo, 2003).

La fruta del mango es una buena fuente de muchos fitoquímicos beneficiosos para la salud, y la elaboración de técnicas de procesamiento para su conservación es fundamental para optimizar la retención de tales compuestos (Dorta *et al.*, 2012), entre los que encontramos antioxidantes naturales que actuando contra los radicales generados por la peroxidación lipídica, y los fenoles que juegan un papel importante como constituyentes del aroma de las frutas (Saxena *et al.*, 2009). Además, estudios han demostrado que pre-tratamientos, como el uso de matrices de complejos de ácido ascórbico, ácido cítrico y cloruro de calcio, preservan las propiedades antioxidantes, el contenido de fenoles totales y la calidad del mango cortado (Siddiq *et al.*, 2013).

Debido a las propiedades fitoquímicas y a que es una buena fuente de antioxidantes, el mango es una fruta adecuada para ser conservada por la técnica de impregnación al vacío, la cual puede mejorar la funcionalidad del producto elaborado y a su vez permite su efectiva comercialización al atenuar su deterioro (Cortés *et al.*, 2007; Ostos *et al.*, 2012). Adicionalmente presenta una oportunidad amplia de negocio, pues su presentación se ha destinado principalmente como fruta entera y no en trozos, siendo prioridad para la cadena productiva del mango, promover una mayor investigación en procesamiento agroindustrial y generación de nuevos productos derivados (Alvarado, 2012).

Utilizando como fruta modelo el mango por sus características nutricionales y organolépticas, este trabajo tiene como objetivo determinar las características fisicoquímicas, microbiológicas y la funcionalidad del fruto tratado por impregnación al vacío con cepas de bacterias ácido láctico (BAL), que realicen control de los microorganismos asociados a la descomposición del producto procesado durante el almacenamiento a 25 ° C.

1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las tendencias del mercado de las últimas décadas se orientan al consumo de alimentos saludables, siendo las frutas y verduras componentes esenciales en la dieta humana debido a las evidencias de los efectos saludables y benéficos de su consumo (Artés *et al.*, 2009). Es por esta razón que la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda la ingesta de un mínimo de 400 g diarios de frutas y verduras (excluidas las patatas y otros tubérculos feculentos) para prevenir enfermedades crónicas como las cardiopatías, el cáncer, la diabetes o la obesidad, así como para prevenir y mitigar varias carencias de micronutrientes, sobre todo en los países menos desarrollados (OMS & FAO, 2003).

Estas iniciativas son reconocidas por los consumidores, sin embargo los cambios en el estilo de vida, cada vez se cuenta con menos tiempo para la elaboración de los alimentos, está provocando que el consumo de productos frescos sea reemplazado por productos preparados y envasados, mucho más fáciles de consumir. En este sentido, las alternativas de mercado de las frutas deben adaptarse y buscar satisfacer las necesidades del consumidor, ofreciendo lo que en muchos países se conoce como productos mínimamente procesados o de cuarta gama.

Estos productos se ofrecen listos para su consumo en fresco, son estables y contienen las características de frescura, calidad nutricional y organoléptica, similares a las del producto original, solamente se modifica su apariencia para facilitar su utilización (González *et al.*, 2004; Tejedor, 2005; Robles *et al.*, 2007).

La producción de fruta mínimamente procesada, presenta grandes limitantes en el procesamiento y comercialización, entre las cuales se tiene su alta perecibilidad, puesto que el procesamiento agudiza este factor debido al incremento en la actividad metabólica de las células del tejido vegetal, lo que conlleva a productos de vida útil muy corta. Lo anterior dificulta obtener una oferta permanente de trozos de fruta fresca por largos periodos de almacenamiento (Giraldo, 2006; González *et al.*, 2004; Robles *et al.*, 2007).

Sintiéndose pues, la necesidad de desarrollar esquemas de procesamiento ligero de frutas, que permitan obtener un producto similar a las materias primas y que a la vez cuente con un tiempo de vida comercial razonable, ampliándose las perspectivas de aplicación industrial en la fabricación de materias primas pre-procesadas como insumo posterior para la industria (Millán-Trujillo *et al.*, 2001).

Por consiguiente, es necesaria la investigación en el desarrollo de tecnologías de conservación no térmica de matrices de fruta y que combinen distintos factores de preservación, que prolonguen su vida útil en óptimas condiciones de calidad, conservando sus características nutricionales y organolépticas y sin comprometer su inocuidad.

Una de las alternativas de tratamiento es la impregnación al vacío (IV), que permite incorporar cualquier sustancia o componente nutricional en una matriz porosa como son las frutas, permitiendo mejorar su composición y estabilidad (Fito *et al.*, 1999).

Esta técnica tiene la capacidad de modificar la formulación de los alimentos y desarrollar ingredientes funcionales mediante la incorporación de compuestos fisiológicamente activos como vitaminas, minerales, antioxidantes, enzimas, depresores de a_w , reguladores de pH, antimicrobianos, fibra dietaria, probióticos, prebióticos y simbióticos, mejorando las características sensoriales y nutricionales de los alimentos e incrementando la vida útil (Fito *et al.*, 1999).

A pesar de estos beneficios, esta técnica es cuestionada por varios autores en cuanto a: incrementar la a_w en las frutas y producir una textura muy húmeda, por ende disminuir la vida útil del producto, por lo que es posible considerar utilizar como medio de impregnación sustancias o microorganismos lácticos que por sus características mejoren la calidad del producto e incrementen su vida útil.

El mango es una fruta adecuada para este tipo de técnicas, utilizada en estudios de impregnación y con una porosidad aparente y real que la hace adecuada al proceso (Cortés *et al.*, 2007; Ostos *et al.*, 2012), adicionalmente presenta una oportunidad de negocio amplia, pues su comercialización se ha destinado principalmente como fruta entera y no en trozos. Siendo prioridad para la cadena productiva del mango promover una mayor investigación en procesamiento agroindustrial y generación de nuevos productos a partir de mango (Alvarado, 2012).

De acuerdo a este planteamiento, la pregunta de investigación de este trabajo es:

¿Las bacterias ácido lácticas impregnadas en matrices de mango son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y ejercer un efecto protector de características de calidad como el color y la textura durante el almacenamiento a 25°C?

2.0 JUSTIFICACIÓN

El mercado de los productos mínimamente procesados ofrece grandes alternativas económicas para los países productores de frutas, como Colombia, por la amplia variedad de productos; que adicionalmente a su atractivo color y olor, aportan compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, como vitamina C y E, carotenoides y polifenoles especialmente flavonoides; siendo pues una gran alternativa para los consumidores locales e internacionales. Si a lo anterior, se le suma el componente probiótico a la fruta, la alternativa económica se ampliará.

Para fomentar la industrialización de trozos de fruta fresca conservadas a temperatura ambiente, con fines de mercado nacional e internacional, es de vital importancia estudiar alternativas de conservación no térmica que prolonguen su vida útil mediante métodos efectivos y baratos como la bioconservación, que a su vez es una técnica para obtener alimentos funcionales.

Los beneficiarios directos de estos resultados son los comercializadores de procesamiento mínimo de frutas, los restaurantes y la población en general con una oferta permanente de fruta fresca.

De igual forma la aplicación de BAL en productos vegetales como trozos de frutas presenta una gran innovación en este tipo de productos tradicionales benéficos para la salud.

En la producción agrícola colombiana las frutas cobran mayor relevancia por lo cual esta técnica de conservación y de producción de alimentos funcionales, con características muy similares a los frescos, ofrece nuevas alternativas de mercado. Este estudio busca realizar un seguimiento a la aplicación de bacterias lácticas, por medio de impregnación al vacío a trozos de frutas frescas almacenadas a 25°C; para evaluar si estos microorganismos constituyen un método apropiado de bioconservación y de producción de alimentos funcionales.

3.0 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Conservar matrices de mango (Var. *Tommy Atkins*) fresco mediante impregnación a vacío de bacterias ácido lácticas durante el almacenamiento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar las mejores cepas de bacterias ácido lácticas, que presenten el mayor efecto inhibitorio frente a microorganismos patógenos.

3.2.2 Establecer la influencia del tipo de BAL y presión de empaque sobre características fisicoquímicas (Humedad, °Brix, pH, contenido de azúcares totales y reductores, Textura y color) y microbiológicas de matrices de mango fresco impregnado con BAL durante el almacenamiento.

3.2.5. Evaluar la viabilidad de las BAL impregnadas en matrices de mango empacadas a presión atmosférica y al vacío durante el almacenamiento.

4.0 MARCO TEÓRICO

4.1 PRODUCTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS

Los productos frescos mínimamente procesados, se conocen como cualquier fruta u hortaliza que ha sido alterada físicamente a partir de su forma original, pero que mantiene su estado fresco (González *et al.*, 2004; Tejedor, 2005; Robles *et al.*, 2007).

Este tipo de mercado empieza a crecer hacia 1990 en países europeos como España y Francia al igual que en Estados Unidos a través de la comercialización de ensaladas preparadas de hortalizas y de frutas frescas cortadas, incrementándose su aplicación en restaurantes, escuelas, fábricas de alimentos y sustancialmente en el consumo doméstico. Este tipo de mercados fue definido en Francia como productos de cuarta gama teniendo en cuenta que: primera gama corresponde a frutos frescos enteros, segunda gama frutos enlatados, tercera gama frutos congelados y cuarta gama frutos frescos cortados (González *et al.*, 2004).

En los países latinoamericanos la producción de frutas tropicales es una de las principales actividades económicas, pero el desarrollo de industrias de procesamiento de frutas frescas cortadas no ha presentado grandes crecimientos, debido a que los consumidores latinos no presentan tendencia a este tipo de productos, igualmente el poder adquisitivo de estos países es menor que el de países europeos, no obstante la tendencia es al incremento de este tipo de procesamiento con miras a nuevas oportunidades de mercados internacionales y cambios en las tendencias de consumo de la población (González *et al.*, 2004).

El procesamiento de productos de cuarta gama mantiene sus atributos y cualidades de producto fresco por un tiempo relativamente corto. Pues a pesar de ser procesadas estos continúan lentamente su proceso metabólico de respiración, transpiración y maduración, ocasionando cambios en su color, textura, sabor y calidad nutricional, lo que puede reducir la vida media de una a dos semanas en caso del fruto fresco a sólo 1 a 3 días

para los trozos de fruta, aún a temperaturas de conservación bajas (González *et al.*, 2004; Giraldo, 2006; Robles *et al.*, 2007).

Estos cambios ocasionan grandes inconvenientes en el procesamiento y comercialización de este tipo de productos, por lo que el reto está encaminado al desarrollo de nuevas tecnologías de conservación no térmicas, que prologuen su vida útil en óptimas condiciones de calidad, sin comprometer su inocuidad ni las propiedades sensoriales y con cambios mínimos en las propiedades nutricionales y antioxidantes de las frutas (Tejedor, 2005).

La búsqueda de alternativas de conservación de productos de cuarta gama especialmente encaminados a la gran oportunidad de mercado de frutas tropicales de los países de Iberoamérica se inició en el contexto del Programa CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo), subprograma Preservación de alimentos, puesto en marcha por España para conmemorar el Quinto Centenario del Descubrimiento de América con el apoyo de los Consejos Nacionales de Ciencia y Tecnología y universidades e institutos de investigación de países como España, México, Costa Rica, Panamá, Colombia, Cuba, Brasil, Chile y Venezuela, concluyendo en el proyecto de técnicas emergentes de preservación para alimentos en Iberoamérica desarrollado entre 1999 y 2003 (Alzamora *et al.*, 2005).

Dentro de las técnicas de conservación aplicadas se encuentran:

- a) Compuestos naturales y sus derivados en combinación con el envasado en atmósferas modificadas.
- b) Diferentes niveles de irradiación ultravioleta (UV-C)
- c) Tratamientos de acondicionamiento térmicos
- d) Distintos niveles de atmósferas modificadas y controladas (bajo O₂ y/o alto CO₂)
- e) Volátiles naturales (etanol, acetaldehído)
- f) Tratamientos de higienización con ozono
- g) Uso de ciclodextrinas como matriz de antioxidantes y agentes antimicrobianos

El conocimiento del modo de acción de cada una de las técnicas permitirá:

- a) Diseñar estrategias de conservación más adecuadas que mantengan la calidad microbiológica, nutricional y organoléptica de estos productos.
- b) Reducir el pardeamiento enzimático, deterioro y otros desórdenes fisiológicos durante el almacenamiento en frío de los productos cortados.
- c) Establecer tratamientos específicos para diferentes frutos y/o mezclas de éstos, que mantengan los atributos de calidad por un período suficiente para su comercialización (Fan *et al.*, 2008; Raybaudi *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004).

Uno de los objetivos de estudio dentro del proyecto CYTED fue la factibilidad de usar la impregnación atmosférica y/o vacío para incorporar componentes fisiológicamente activos en tejidos de plantas sin destruir la matriz inicial del alimento (Alzamora *et al.*, 2005).

4.2 LA IMPREGNACIÓN AL VACÍO COMO TRATAMIENTO DE CONSERVACIÓN

La impregnación al vacío (IV), es un método de procesamiento mínimo que aprovecha la micro estructura porosa de las matrices de los alimentos, para reemplazar el gas ocluido en su estructura celular por solutos contenidos en un líquido de impregnación mediante acción capilar y gradientes de presión impuestas en el sistema. Involucra un fenómeno de transferencia de masa llamado Mecanismo Hidrodinámico (HDM) (Fito & Pastor, 1993) entre un sistema sólido-líquido, acoplado a un fenómeno de deformación-relajación (FDR) en la matriz sólida del alimento (Fito *et al.*, 1996), permitiendo incorporar en la estructura compuestos fisiológicamente activos o nutraceuticos tales como microorganismos beneficiosos, vitaminas, minerales, etc., este tipo de desarrollos facilita la obtención de una nueva gama de productos alimentarios enriquecidos (Fito *et al.*, 1999).

La incorporación de estos componentes activos en los tejidos de las plantas, se debe a que son sistemas multifacéticos formados por una intrincada microestructura interna de células, espacios intercelulares, capilares y poros que conforman 4 tejidos que son: parénquima, vascular (floema y xilema), soporte y protección; estos tejidos y en especial el parénquima conforman las porciones comestibles de muchas frutas, pero son los poros

o espacios intercelulares los que juegan un papel importante en la penetración de los componentes fisiológicamente activos en la impregnación (Alzamora *et al.*, 2005).

El proceso de impregnación cuando un sólido poroso es inmerso en un líquido bajo condiciones de vacío, se da en los siguientes pasos: 1. El sólido es inmerso en el líquido a presión atmosférica 2. Se aplica una presión de trabajo al sistema ($p < p_{atm}$). 3. El sistema se mantiene con la presión de trabajo por un tiempo (t). 4. Se restaura la condición de presión atmosférica y el sólido se retira del líquido (Fito, 1994). La Figura 1 permite interpretar lo que ocurre al interior del alimento cuando son aplicados los pasos anteriores:

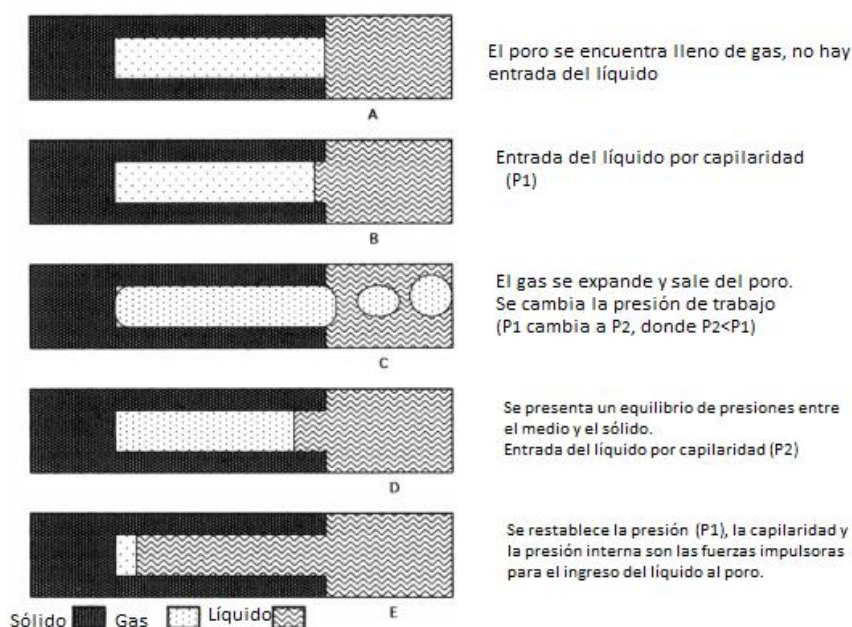


Figura 1. Pasos típicos para la operación de transferencia de masa entre alimento poroso inmerso en un líquido bajo condiciones de vacío. Situación en un poro ideal (Adaptado de Fito, 1994)

Como se observa en la Figura 1 (E), cuando se restaura la presión atmosférica, se crea un nuevo gradiente de presiones que actúa como una fuerza impulsora y hace que los espacios intercelulares o poros se llenen parcialmente de líquido, de esta forma se elimina el oxígeno ocluido en los poros y se incorporan solutos de forma controlada modificando su composición original sin afectar su estructura (Betoret *et al.*, 2012).

La cantidad de líquido que impregne la estructura dependerá del nivel de desgasificación, de las características del alimento, de las propiedades de la disolución de impregnación y de la presión de trabajo (Betoret *et al.*, 2012).

La IV es una técnica eficaz para diseñar nuevos productos nutricionalmente equilibrados, saludables y funcionales, con una importante protección de los mismos frente al deterioro y dado que no se requiere utilizar altas temperaturas minimiza el daño a los tejidos permitiendo que se preserven el color, sabor, aromas y componentes activos naturales. (Fito *et al.*, 2001)

La ingeniería de matrices es una herramienta de la ingeniería de alimentos que utiliza los conocimientos sobre composición, estructura y propiedades de la matriz estructural de un alimento para producir y controlar cambios que mejoren sus propiedades funcionales y/o sensoriales (Chiralt *et al.*, 2001).

El uso de matrices vegetales, como los trozos de frutas portadores de nutrientes, crea un concepto novedoso en el diseño de alimentos funcionales que abre nuevas oportunidades comerciales ampliando la variedad de productos.

El mango como producto fresco goza de gran popularidad entre los consumidores debido a su sabor, olor, color y valor nutritivo, además de contar con una amplia variedad de nutrientes, dentro de los que se encuentran vitaminas, minerales, fibras dietéticas y otros componentes biológicamente activos (Giraldo, 2003).

4.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL), han jugado un papel importante como cultivos bioprotectores, puesto que son flora normal de muchos alimentos, no presentan riesgos a la salud del consumidor por lo cual son consideradas como GRAS (reconocidas generalmente como seguras) por la Food and Drug Administration de USA. Existen numerosos estudios sobre el efecto benéfico en la salud con acciones anticancerígenas, regulación del tracto intestinal, estimulación de la respuesta inmune, incremento en la digestión y tolerancia de la lactosa, reducción del colesterol entre otros; además de su capacidad de inhibición microbiana tanto de patógenos como de agentes deteriorantes a través de producción de ácidos orgánicos (ácido láctico), peróxido de hidrógeno,

compuestos orgánicos antibióticos y bacteriocinas (Zamora, 2003; Ramírez, 2005; Prado *et al.*, 2008)

Son tantas las cualidades y beneficios de las BAL que los productos suplementados con éstas se consideran alimentos funcionales a través del término alimento probiótico que se refiere al alimento que contiene de forma natural o por adición, microorganismo vivos en cantidades suficientes, para lograr un equilibrio microbiano en el intestino de las personas o animales que los ingieren, ayudando a mejorar y prevenir algunas enfermedades (Fuller, 1989).

4.3.1 Clasificación de las BAL

Son bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. *Enterococcus* del grupo Gram positivas, no móviles o raramente y no formadores de endoesporos. Su forma es de bacilos o cocos y originan ácido láctico como producto de fermentación. Obtienen energía solamente a través de la fosforilación del sustrato por carecer de porfirinas y citocromos. Crecen en condiciones anaerobias pero no son sensibles al oxígeno y pueden crecer en presencia o en ausencia de él, son anaerobios aerotolerantes. Obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares. Su hábitat está restringido a la presencia de azúcares, tienen metabolismo biosintético limitado por lo que requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas como tiamina (vitamina B1) biotina piridoxina (vitamina B6) y piridoxina (vitamina B12). Diferencia importante entre los subgrupos radica en los productos de fermentación que generan a partir de los azúcares. El grupo llamado homofermentativo produce solamente ácido láctico y el heterofermentativo produce otros compuestos como etanol y CO₂. Se diferencian además por su temperatura óptima de crecimiento en mesófilas crecen mejor entre 25 a 30°C y termófilas cuya temperatura óptima va de 40 a 44°C (Madigan *et al.*, 2004).

4.3.1.1 Producción de sustancias antimicrobianas.

Las bacterias lácticas tienen una actividad antimicrobiana sobre otros microorganismos especialmente patógenos debido a la producción de sustancias inhibitorias tales como: ácidos orgánicos (ácido láctico), peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas, siendo esta

una característica del metabolismo de las bacterias lácticas, así como un mecanismo mediante el cual realizan su acción preservativa y probiótica (Zamora, 2003).

Esta habilidad de actividad antimicrobiana ha sido utilizada a través del tiempo para la conservación de alimentos, es así como existen evidencias que datan 6000 AC de la utilización de la fermentación de BAL para la conservación de leche; procedimientos para la fermentación de carnes fueron desarrollados en Babilonia y China en 1500 AC; también se desarrollaron fermentaciones de vegetales en China cerca de 600 AC (Zamora, 2003).

De esta manera las BAL han desempeñado un papel fundamental en la obtención y producción de la mayoría de alimentos fermentados que hoy se consumen como yogur, quesos, embutidos, encurtidos y otros. La industria alimenticia no solamente basa su uso en las características organolépticas y estructurales deseables que inducen en los alimentos, sino también su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseables, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil de los alimentos. La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen ser el principal mecanismo de inhibición microbiológica.

El proceso de fermentación reduce la cantidad de carbohidratos disponibles resultando en una cadena de moléculas orgánicas de bajo peso molecular que presentan actividad antimicrobiana, éstas son: ácido láctico, acético y propiónico; diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos; moléculas pequeñas no proteicas y bacteriocinas; el crecimiento en aerobiosis conduce a la producción de metabolitos del oxígeno, peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y otros radicales libres con efectos bacteriostáticos y bacteriocidas frente a microbiota láctica y no láctica (Piard y Desmazeud, 1991 y 1992; citados por Zamora, 2003).

Las bacteriocinas resultan ser uno de los mecanismos de inhibición, éstas son compuestos proteicos de actividad letal sobre otras bacterias que varían en su espectro de acción antimicrobiano, pesos moleculares, origen genético y propiedades bioquímicas (Schillinger, 1990). Su actividad inhibitoria está generalmente relacionado con microorganismos relacionados taxonómicamente como son las bacterias Gram-positivas y frente a otras cepas sensibles, generalmente no presentan inhibición sobre bacterias Gram-negativas a no ser que su pared celular se encuentre debilitada (Zamora, 2003; Ramírez, 2005).

Adicionalmente se han realizado estudios para encontrar la capacidad de las bacterias lácticas de inhibir el crecimiento de mohos y levaduras, principales microorganismos asociados al deterioro de frutas y que generan un alto riesgo a la salud por la producción de metabolitos secundarios tóxicos como las micotoxinas que presentan propiedades nefrotóxicas, neurotóxicas, teratogénicas, estrogénicas y cancerígenas.

La síntesis de metabolitos con actividad antifúngica sólo se ha atribuido a un número limitado de cepas de los géneros *Lactobacillus casei* var. *ramnosus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium*, encontrándose que estas cepas y sus productos metabólicos pueden ser empleados como bioprotectores, conservantes y fungicidas biológicos frente a levaduras y mohos alterantes (Sanz, 2006).

4.3.1.2 Beneficios del consumo de BAL

Son tantas las cualidades y beneficios de las BAL que los productos suplementados con éstas, se consideran alimentos funcionales a través del término alimento probiótico que se refiere al alimento que contiene microorganismos vivos capaces de influir en la salud mejorando el balance de la microflora del intestino (Fuller, 1989).

El concepto de probióticos fue expuesto científicamente por primera vez por Metchnikoff, quien a principios del siglo XX remarcó la longevidad y buena salud de los campesinos búlgaros, que consumían grandes cantidades de yogur, su hipótesis se centró en que el consumo de grandes cantidades de alimentos ricos en bacterias lácticas eliminaba las bacterias formadoras de toxinas, mientras que elevaba la proporción de bacterias lácticas y la flora intestinal mejoraba la salud, incrementando las expectativas de vida.

Desde entonces, la definición de probiótico ha evolucionado notablemente, de forma que hoy se puede definir como un alimento que contiene, ya sea por sí mismo o por incorporación, microorganismos vivos con actividad fisiológica que ayuden a mejorar y prevenir algunas enfermedades debidas tanto a factores intrínsecos (edad, enfermedades, etc.) como extrínsecos (stress, dieta alimenticia, etc.) (Puente, 2003).

Para ser consideradas como probióticas, las bacterias ácido lácticas deben ser capaces de expresarse a pH bajos, a concentraciones de sales biliares y tener la capacidad de adherirse a las superficies intestinales y producir los efectos benéficos (Zamora, 2003; Ramírez, 2005; Prado *et al.*, 2008).

Los mecanismos por los cuales los alimentos probióticos pueden ofrecer beneficios, no están totalmente establecidos, sin embargo existen estas posibilidades (Fuller, 1989):

- Competición por nutrientes
- Secreción de sustancias antimicrobianas
- Reducción del pH en el intestino por la producción de ácidos orgánicos
- Bloqueo en los sitios de adhesión
- Atenuación de la virulencia
- Bloqueo de los receptores de toxinas
- Estimulación inmune
- Disminución de producción de toxinas

Estos mecanismos se traducen en amplios beneficios para la salud de personas o animales que ingieran este tipo de productos, estos son:

Incrementa la tolerancia a la lactosa: debido a la actividad de la enzima β -galactosidasa; protección contra gastroenteritis: esto debido a la capacidad de inhibición de crecimiento de microorganismos patógenos por la secreción de sustancias como ácido láctico, antibióticos naturales de amplio espectro y a la competición por nutrientes y sitios de colonización en el intestino; reducción de toxinas; reducción de colesterol; síntesis de vitaminas; reducción del síndrome de colon irritable; incremento de la digestión y funcionamiento del intestino; disminución de las alergias alimenticias; ayuda a incrementar la respuesta inmune; facilitan la biodisponibilidad de minerales como calcio y magnesio (Gibson, 2007).

Estos efectos benéficos se han atribuido al consumo de alimentos de origen vegetal fermentados como es el caso de Kimchi coreano que es uno de los alimentos más populares en corea y su consumo se está introduciendo a muchos países, puesto que muchos estudios confirman al Kimchi como uno de los alimentos más saludables del mundo. Se elaboran cerca de 187 diferentes tipos de kimchi dependiendo de la localidad y de las materias primas (la cebolleta, ajo, brócoli, col, rábano, etc.) dentro de sus beneficios se encuentran: ayuda a eliminar toxinas en la sangre, disminuye el colesterol,

alta actividad antioxidante debido a contenido de vitaminas y se atribuye propiedades de disminución de cáncer (Lee *et al.*, 2008).

5.0 ANTECEDENTES

Conservación de Frutas por Impregnación al Vacío

La impregnación al vacío es un método de procesamiento mínimo que aprovecha la micro estructura porosa de las matrices de los alimentos, para reemplazar el gas ocluido en su estructura celular, por solutos contenidos en un líquido de impregnación mediante acción capilar y gradientes de presión impuestas en el sistema (Fito y Pastor, 1993).

Anino y colaboradores (2006), estudiaron el potencial de trozos de manzana fresca como matriz para la incorporación de calcio por técnicas de impregnación a presión atmosférica y al vacío, concluyendo que el método de impregnación fue significativo en la incorporación de calcio en la matriz vegetal, con cantidades de Ca^{+2} que satisfacen entre un 23% a 62% de la ingesta diaria recomendada. El análisis sensorial del producto final indicó que a pesar del ablandamiento, los trozos de manzana presentaron características texturales aceptables.

Giraldo (2006), evaluó la vida útil de manzanas, fresas, melocotones y sandías mínimamente procesadas a 5 y 10 °C, impregnadas con soluciones isotónicas de glucosa. Observó que con la impregnación de glucosa se disminuía significativamente el índice respiratorio, al compararlas con los trozos de fruta no impregnados, concluyendo que la impregnación es una alternativa para incrementar la vida útil de las frutas mínimamente procesadas, debido a la disminución de los niveles de O_2 presentes en los poros de las frutas.

Los resultados de Cortés y colaboradores (2007), evidenciaron que la incorporación de vitamina E emulsionada en una fase acuosa en matrices de manzana por impregnación al vacío es viable y que la vitamina E que es un potente antioxidante, permanece estable durante el almacenamiento.

Igual y colaboradores (2008), encontraron en la impregnación al vacío, un mecanismo adecuado para obtener un producto mínimamente procesado de caqui, como alternativa

para incrementar su uso comercial. La fruta se impregnó en cubos con una solución de sacarosa 24°Brix, 5 min a 50 mbar y 5 min presión atmosférica.

Ruíz en el 2009 incorporó una emulsión fortificada a base de vitamina C y E, y minerales calcio y zinc por impregnación a vacío en hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* L., lo cual permitió alcanzar niveles importantes de estos compuestos fisiológicamente activos por cada 100 g de hongo fresco, aumentando en un 50% la vida de anaquel con respecto al control sin el tratamiento.

Frutos de mango fueron procesados por impregnación al vacío con soluciones de lactato de calcio al 6% y cloruro de calcio al 1%, permitiendo la incorporación de 37,6% de calcio en 200 g de mango fresco (cantidad diaria recomendada) de la variedad Tommy Atkins, sin afectar sus características sensoriales (Ostos *et al.*, 2012).

Schulze y colaboradores (2012), estudiaron la impregnación al vacío, como técnica para enriquecer cilindros de manzana con quercitina obtenida de la piel del fruto, encontrando que el contenido final varía entre 368 y 604 µg/g peso seco, dependiendo del tipo de manzana y de la concentración sólidos solubles en la solución de impregnación, evaluando el proceso a través de microtomografía computarizada (µCT).

Se utilizó la IV como método para enriquecer papas con soluciones de hierro, evaluando el proceso en cuanto al tiempo de aplicación de vacío y de restauración, el contenido de hierro incremento >4.1 mg/100 g peso seco (Erihemu *et al.*, 2014).

Adicional a los componentes químicos que se pueden incorporar al producto por medio de la impregnación al vacío, los estudios en la industria de la alimentación están siendo encaminados a la elaboración de alimentos que promuevan la salud y el bienestar con el uso de alimentos enriquecidos con componentes fisiológicamente activos como los microorganismos probióticos (Betoret *et al.*, 2003).

Impregnación de BAL

La industria alimenticia no solamente basa su uso en las características organolépticas y estructurales que inducen en los alimentos, sino también su capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos no deseables, principales microorganismos asociados al

deterioro de frutas, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil de los alimentos (Settanni y Corsetti, 2008).

En 1998, Rodríguez desarrolló estudios de impregnación al vacío con diferentes microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus* y *Phoma glomerata*) sobre trozos de manzana (Granny Smith), empleando una solución isotónica. Los resultados muestran que el método es válido, debido a la incorporación significativa de los microorganismos en estudio (citado por Alzamora *et al.*, 2005).

Maguiña y colaboradores en 2002, fortificaron cilindros de manzana con *Bifidobacterium* spp. “Bb12” (Christian Hansen Corp.) mediante la impregnación al vacío a diferentes presiones con una solución isotónica de sacarosa con 10^{10} UFC/g de los microorganismos. La incorporación de los mismos en el producto fue de 10^7 UFC/g y estos permanecieron viables durante seis días de almacenamiento en anaerobiosis a 4°C (citado por Alzamora *et al.*, 2005). Similares experimentos fueron realizados en trozos de guayaba fortificada con *Bifidobacterium* spp. Las células bacterianas permanecieron viables durante los 12 días de almacenamiento a 5°C. (Ortiz *et al.*, 2002).

Betoret y colaboradores (2003), enriquecieron cilindros de manzana con microorganismos probióticos por impregnación al vacío, empleando dos medios de impregnación: jugo de manzana comercial con incorporación de *S. cerevisiae* y suero de leche con *Lactobacillus casei* spp. *rhannosus*. Evaluaron la viabilidad de los microorganismos en las muestras secadas y almacenadas durante dos meses a temperatura ambiente, encontrando que las muestras impregnadas contenían cerca de 10^7 UFC/mL de cada microorganismo durante su almacenamiento.

En el 2010, Marín y colaboradores desarrollaron a nivel piloto el procesamiento de frutos de uchuva con microorganismos probióticos de *L. casei* impregnado con una solución de glucosa al 14% p/p, encontrando una concentración de bacterias similar a la encontrada en los productos lácteos, como el yogur, helados, quesos, entre otros.

Morantes (2014), desarrollo un producto mínimamente procesado de mango variedad Tommy Atkins biofortificado con *L. casei*, alcanzando durante 15 días a temperatura de $4\pm 2^\circ\text{C}$, un recuento microbiológico de $6,4\pm 0,1$ ciclos Log UFC/ 150 g mango fresco.

6.0 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.

Se trabajó con 7 cepas de bacterias lácticas: *Lactobacillus plantarum* A6, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 10880, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus coryniformis* y *Lactobacillus sakei* (obtenidas del cepario del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Marina de la Universidad del Valle), dichas cepas fueron reactivadas en medio MRS (De Man, Rogosa & Sharp, 1960) con azul de anilina para ayudar al reconocimiento de los microorganismos lácticos, ya que las bacterias lácticas pueden diferenciarse por la asimilación del azul de anilina del medio según lo recomendado por Giraud (1993) y Ramírez (2005); se incubaron a 35 °C en aerobiosis para selección de microorganismos facultativos; luego se verificó su pureza a través de la coloración de Gram, se sembraron en tubos con caldo MRS y en tubos de agar inclinado, para su uso durante el trabajo.

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE BAL

6.2.1 Capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas

Se evaluó la capacidad de las 7 cepas de crecer a tres temperaturas diferentes (25°C, 35°C y 40°C) en caldo MRS durante 24 horas de incubación, posteriormente se realizaron recuentos en placa para verificar la viabilidad. Seleccionando las cepas con capacidad de crecer a 35°C y con viabilidad no inferior a 10⁸UFC/g.

6.2.2 Pruebas de inhibición entre las cepas seleccionadas

Se evaluó su capacidad de crecimiento en cultivo mixto siguiendo un método in vitro. La inhibición de crecimiento entre sí, se efectuó por medio de una adaptación del método de Tagg y Mc Given (1971), seguido por Ramírez (2005). Para lo cual cada cepa se inoculó, por separado, en caldo MRS a 35°C durante 24 h, pasado este tiempo el microorganismo a testar es inoculado adicionando 0.1 ml en medio sólido (siembra en superficie), incubándolo a 35°C durante 48 h. El otro microorganismo a testar se inoculó en medio

líquido durante 24 h 35°C, posteriormente se adicionó 0.1 mL a un medio sólido, sobre el cual se colocaron discos del agar crecido del primer microorganismo y un disco con medio sin inocular como blanco, este sistema se incubó a 35°C durante 24h.

La evaluación se realizó identificando la presencia de zonas claras alrededor de los discos que indican actividad de inhibición entre sí, estas zonas se conocen como halos de inhibición, por lo cual se registraron la presencia de halos como (+) y la no presencia como (-), de esta forma se probaron las 7 cepas y se seleccionaron aquellas que no presentaron inhibición entre sí.

6.2.3 Producción de gas.

La capacidad de producir gas, a partir de glucosa, de las cepas, se evaluó empleando caldo MRS adicionado con 5% de glucosa, en tubos con un volumen de 5 mL que contenían tubos Durham para verificar la presencia de gas. Se inocularon dos tubos por cada cepa, incubándose a 35°C por 24 horas, pasado este tiempo se verificó la presencia o no de gas en los tubos Durham. Se seleccionaron las cepas no productoras de gas (Ramírez, 2005).

6.2.4 Prueba de inhibición frente a bacterias patógenas

La capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas de las cepas de los microorganismos lácticos, se evaluó siguiendo el método descrito en 6.2.2. Para lo cual cada cepa de BAL se inoculó sobre la superficie de agar MRS, incubándose a 35°C por 24 horas, para la obtención de los discos. Las bacterias patógenas se incubaron en tubos que contenían 5 mL de caldo nutritivo a 35°C por 24 horas. Posteriormente se inoculó la superficie de una caja de agar nutritivo con 0.1 mL del crecimiento de la bacteria patógena y sobre ésta se colocó un disco de cada una de las BAL y un disco de agar MRS sin crecimiento como blanco. Se preparó el mismo sistema para cada una de las bacterias patógenas y se incubaron a 35°C por 24 horas.

La evaluación se realizó observando la presencia de zonas claras alrededor de los discos, estas zonas indican la actividad antibacteriana de cada cepa. Se seleccionaron las cepas que presentaron los mayores halos de inhibición frente a los microorganismos patógenos

evaluados (Ramírez, 2005). Los microorganismos patógenos empleados se encuentran en la Tabla 1:

Tabla 1. Cepas de referencia utilizadas para efectuar la prueba de inhibición

Microorganismos Patógeno	Procedencia
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 10708
<i>E. coli</i>	ATCC 11229
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29737
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13280
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC 29336
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579

6.2.5 Prueba de inhibición frente a mohos y levaduras

Adaptando la metodología descrita por Prachyakij, *et al.*, (2007), se evaluó la capacidad antimicótica de las bacterias lácticas contra los siguientes géneros de hongos: *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp, *Rhodotorula rubra* y *Fusarium* spp, (Colección de docencia, Laboratorio de Biología, Departamento de Biología, Universidad del Valle), considerando que son estos los microorganismos que causan mayor alteración en las frutas (Prachyakij, *et al.*, 2007).

Se procedió a inocular cada cepa de los hongos en caldo extracto de malta y se incubaron a 30°C por 24 horas. Se realizó un conteo de las células usando un hemacitómetro para ajustar la concentración a 10⁵ células/mL en agua peptona estéril (0.2% g/mL), estos se usaron como los inóculos a evaluar.

Las BAL, se inocularon realizando dos líneas paralelas de aproximadamente 2 cm, en el centro de una caja que contenía agar MRS (procedimiento realizado 4 veces por cada

cepa de bacteria láctica), cada caja se incubó a 30°C por 48 h. Pasado el tiempo de incubación, cada caja se cubrió con 10 mL de agar extracto de malta que contenía 1 mL de uno de los inóculos de hongo a evaluar. Después de 48 horas de incubación a 30°C, se evaluó la capacidad de inhibición midiendo las zonas de inhibición alrededor de las líneas de crecimiento de bacteria láctica. Todo el procedimiento se realizó por duplicado.

6.2.6 Viabilidad a diferentes concentraciones de pH.

La resistencia a niveles de pH bajos es necesaria para favorecer los procesos de fermentación para la producción de los inóculos de impregnación sin control de pH, por lo cual se evaluó la viabilidad de las cepas seleccionadas a diferentes niveles de pH 6.0, 5.0, 4.0, 3.0 y 2.0 durante 3 horas y al final de 24 horas de inoculación, siguiendo el procedimiento descrito por Yimin *et al.*, (1999).

Este procedimiento se realizó para las 3 cepas seleccionadas de acuerdo a los resultados anteriores (*Lactobacillus casei rhammosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*)

6.3 ELECCIÓN DEL MEDIO PARA IMPREGNACIÓN.

6.3.1 Diseño experimental para la elección del medio de impregnación.

Después de la caracterización y selección inicial, las cepas seleccionadas fueron probadas en 3 medios de cultivo y en el medio de referencia MRS, la formulación de los medios se encuentra en la Tabla 2, el medio que presentó el mejor rendimiento con recuentos superiores a 10^9 UFC/mL, fue escogido como medio de impregnación de los trozos de fruta.

Este proceso se realizó aplicando un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 4 x 3 con 2 réplicas, donde 3 es el número de cepas seleccionadas de acuerdo a los resultados anteriores, número apropiado según los resultados en la literatura que oscila entre 2 y 3 cepas para un estudio de estas características (Ramírez,

2005). Con un número total de 24 experimentos como se muestra en la Tabla 3. La variable de respuesta es la viabilidad de las cepas en el medio.

Los medios de cultivo se formularon, siguiendo las recomendaciones de las investigaciones de Betancourt y Quintero (2002) y Ramírez (2005); que consideran las necesidades nutricionales de las bacterias lácticas, que los componentes sean aptos para consumo humano y viable económicamente si el proceso se industrializa.

De acuerdo a estos requerimientos se emplearon los siguientes componentes:

Sacarosa: Es utilizada como fuente de carbono

Melaza: Es una mezcla compleja de sacarosa, glucosa y fructosa procedente de la caña de azúcar; además, contiene sustancias no fermentables y melanoidinas (a base de nitrógeno), derivados a partir de la condensación del azúcar y aminocompuestos (Fajardo y Sarmiento, 2007).

Suero de leche: Con un alto contenido de lactosa, disacárido metabolizado por las bacterias lácticas en ácido láctico, produce pequeñas trazas de productos volátiles que contribuyen al sabor y textura como ácido acético y dióxido de carbono (Urribarrí et al., 2004).

Leche de soya: Contiene oligosacáridos como la rafinosa y estaquiosa que estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas gracias a su capacidad para metabolizar estos azúcares durante la fermentación. Los productos a base soya, además, protegen las células bacterianas durante el tránsito a través de las duras condiciones del tracto gastrointestinal, debido al pH natural de la soya y la gran cantidad de fuentes de carbono y nitrógeno que presentan (Yeo et al., 2011).

Salvado de trigo: Presenta contenidos de carbohidratos y de proteína apropiados para que el microorganismo produzca sus metabolitos (Hoyos y Carrera, 2004; Arredondo et al., 2007).

Tabla 2. Formulación de los medios de impregnación.

Medio control (MRS)	Medio 1	Medio 2	Medio 3
20 g/L D-glucosa	15 g/L Sacarosa	20 g/L Melaza	10 g/L Melaza
8 g/L extracto de carne	12 g/L Leche de soya	12 g/L Leche de soya	12 g/L Leche de soya
4 g/L Extracto de levadura	120 g/L Suero de leche	120 g/L Suero de leche	120 g/L Suero de leche
	10 g/L Salvado de trigo molido	10 g/L Salvado de trigo molido	10 g/L Salvado de trigo molido

Tabla 3. Diseño experimental para elección del medio de impregnación.

Factores	Niveles	Variable de Respuesta
Medio	MRS	Viabilidad de la cepa en el medio (UFC/mL)
	1	
	2	
	3	
Cepa Seleccionada	<i>L.casei</i>	
	<i>L.sakei</i>	
	<i>Leuconostoc</i>	

El rendimiento del medio se evaluó en erlenmeryers de 250 mL a 35°C con agitación constante durante 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se determinó la viabilidad en el medio mediante el recuento de células viables UFC/mL, por el método de siembra en superficie en agar MRS con azul de anilina, según la metodología descrita por la NTC 4092.

6.3.2 Cinética de fermentación

Con el medio escogido, el medio de control y las cepas seleccionadas, se realizaron 6 cinéticas de crecimiento, con el fin de encontrar las mejores condiciones de proceso para la elaboración de los inóculos de impregnación. Siguiendo la metodología descrita por Ramírez (2005).

Las cinéticas se efectuaron en erlenmeyers de 500 mL a 35 °C, con velocidad de agitación constante con un agitador orbital a 120rpm; no se efectuó control de pH pues los microorganismos seleccionados son resistentes a pH bajos. Los parámetros a considerar en el proceso de fermentación fueron: evolución del pH, conteo de células viables UFC/mL, consumo de azúcar y proteínas.

Los medios para la fermentación se prepararon en 270 mL, al cual se le adicionaron 30 mL del inóculo bacteriano a evaluar, siguiendo las recomendaciones de Crueger y Crueger (1993), el porcentaje de inóculo debe ser 10% v/v para iniciar un proceso de fermentación. El inóculo se preparó en 27 mL de caldo MRS, adicionado con 3 mL de caldo MRS con el microorganismo puro crecido por 24 horas a 35°C y se incubó a 35°C por 24 h.

Se tomaron alícuotas de 10 mL de muestra, al iniciar al proceso y cada tres horas durante 24 horas. Para la determinación de azúcares y proteínas se separaron porciones de 3 mL, las cuales se centrifugaron a 15°C, 5000 rpm por 5 minutos, después del proceso se tomó el sobrenadante y se filtró con membranas de 0.45 µm de tamaño de poro, estas muestras se almacenaron en tubos eppendorf estériles de 2 mL a -18°C hasta el momento de realizar las mediciones.

6.3.2.1 Determinación de pH

Los datos de la evolución del pH durante la fermentación se tomaron usando un pHmetro CORNING 320, directamente en 5 mL de la muestra.

6.3.2.2 Conteo de microorganismos viables por recuento en placa

El conteo de los microorganismos viables durante la fermentación se realizó por el método de recuento estándar en placa siembra en superficie, utilizando como medio de cultivo

agar MRS con azul de anilina, con incubación por 24 horas a 35°C, de acuerdo a la metodología descrita en el NTC 4092.

6.3.2.3 Determinación de azúcares totales

Los azúcares fueron determinados por el método de Dubois, (1956), conocido por el método de antrona. Se preparó previamente una curva patrón con diferentes concentraciones de la solución patrón de glucosa; los valores obtenidos de la lectura de densidad óptica (D.O) a 525 nm, se graficaron versus la concentración en mg/L y obteniendo la ecuación de la recta.

La dosificación de los azúcares presentes en las muestras en estudio se efectuó sobre 2,5 mL de muestra previamente diluida en agua destilada y se adicionaron 5 mL de antrona preparada en ácido sulfúrico. Los valores obtenidos de las muestras se calcularon por la ecuación de la recta, obtenida en la curva patrón y se multiplicaron por el factor de dilución, utilizando un espectrofotómetro visible GENESYS™ 20 4001/4.

6.3.2.5 Determinación de Proteína

La determinación se llevó a cabo siguiendo el método colorimétrico de Lowry (1951), que se basa en la valoración cuantitativa de las proteínas, mediante la adición del reactivo de Folin-Ciocalteu que forma un complejo azul con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Todas las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro visible GENESYS™ 20.

6.3.3 Evaluación de la producción de biomasa.

Los cálculos de fermentación para las cinéticas se realizaron siguiendo lo descrito por Crueger y Crueger (1993) y Rodríguez *et al.*, (2003), donde la velocidad específica de crecimiento está definida por la ecuación (1) y el tiempo de duplicación celular por la ecuación (2).

$$\mu = \frac{1}{\bar{X}} * \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Donde:

La velocidad específica de crecimiento (μ)

Tiempo de duplicación (t_d)

Masa de células (X)

Los resultados obtenidos permitieron determinar las condiciones o tratamientos más adecuados en términos de tiempo - tasa de crecimiento y rendimiento durante el proceso de fermentación.

6.4 ELABORACIÓN DEL MEDIO DE IMPREGNACIÓN.

El medio se elaboró de acuerdo a las condiciones descritas en 6.3.2.1 para el medio 2 y la fermentación se realizó siguiendo las condiciones obtenidas en 6.3.2., para cada una de las bacterias lácticas seleccionadas (*L.casei* y *L. Sakei*), el porcentaje del inóculo se ajustó al 10% v/v, para iniciar la fermentación según lo recomendado por Crueger y Crueger (1993).

6.5 PRUEBAS DE IMPREGNACIÓN

6.5.1. Matrices vegetales

Como matriz vegetal se emplearon mangos (*Mangifera indica* L.) de la variedad *Tommy Atkins* (Figura 2), adquiridos en un mercado local de distribución mayorista, de la ciudad de Cali.

Los mangos fueron seleccionados teniendo en cuenta parámetros de madurez aparente, según los requisitos de la NTC 5210 de 2003 para categoría extra.



Figura 2. Mango var. *Tommy Atkins*.

6.5.2 Preparación y obtención de las muestras.

Los mangos fueron sometidos a un proceso de limpieza y desinfección, el cual comprende:

- ♦ Eliminación de la suciedad visible con agua corriente y jabón.
- ♦ Inmersión de las frutas durante 5 minutos, en una solución desinfectante de TEGO 51 al 2%.
- ♦ Eliminación de los restos de solución desinfectante, con agua corriente.

Todos los instrumentos empleados en la manipulación de las frutas, fueron lavados con agua corriente y jabón, y desinfectados con la misma solución. Se realizaron cortes longitudinales, en dos láminas paralelas a la semilla (Figura 3). Este procedimiento se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras y siguiendo las recomendaciones del Decreto 3075 (1997) del Ministerio de Salud.



Figura 3. Método de corte de mango.

De las láminas obtenidas de cada mango se extrajeron cilindros de aproximadamente 1,2 cm de diámetro por 1,5 cm de altura (Figura 4), empleando para ello un sacabocados de acero inoxidable previamente esterilizado en un autoclave.



Figura 4. Cilindro de muestra.

Se obtuvieron entre 6 y 8 cilindros aproximadamente, según el tamaño del mango.

6.5.2 Impregnación de las muestras

La IV se llevó a cabo por inmersión de las diferentes muestras (conjuntos de cilindros de mango) en los medios de impregnación que contenían *L. casei*, *L. sakei* y la mezcla 50/50 (v/v) de ambas, aplicando una relación sólido-medio de impregnación de 1:10; se emplearon mallas plásticas, previamente desinfectadas, para asegurar que las muestras estuvieran siempre sumergidas en el medio (Figura 5).

Los recipientes de plástico que contenían las muestras en el medio especificado se llevaron a un equipo de vacío marca Centricol Ltda., (Colombia) para el proceso de impregnación. A este sistema se le aplicó una presión de 0,76 bar a 25°C durante 10 min. Después de este tiempo se restituyó lentamente la presión atmosférica durante 10 min de relajación (Santacruz, 2004; Puente, 2003; Betoret *et al.*, 2003; Torres, 2007). Después del proceso de IV se extrajeron las muestras del medio de impregnación, retirándoles el exceso de líquido remanente en su superficie empleando toallas absorbentes para continuar con el empaque de las mismas.

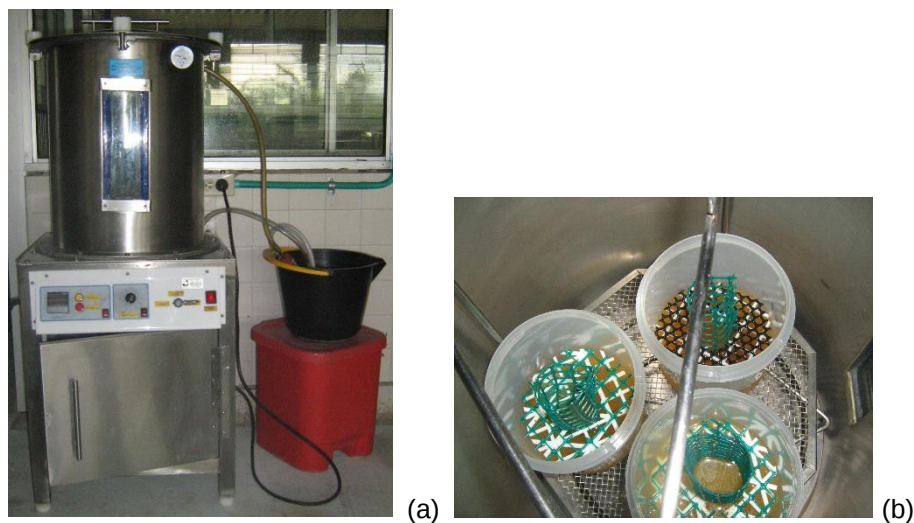


Figura 5. Equipo experimental de impregnación a vacío. (a) Equipo de impregnación a vacío (b) Distribución de recipientes dentro del equipo.

6.5.3 Empaque.

Las muestras se empacaron en bolsas plásticas especiales para alimentos, de la empresa Alico S.A (Colombia), con las siguientes características:

- Material multicapa coextruido, 70 micras, medidas 7x16 cm.
- Composición: poliamida, adhesivo, capa sellante PEBD.
- Con barrera a los aromas y gases como oxígeno, nitrógeno y gas carbónico.
- Transmisión de vapor de agua ASTM F-1249, 38°C, 100%HR, <15 g/m²/24h/atm.
- Transmisión de oxígeno ASTM D-3985, 23°C, 0%HR, <60 cc/m²/24h/atm.
- Excelentes propiedades mecánicas como resistencia al rasgado y punzado.
- Posee buenas propiedades de elongación.

Con el fin de determinar cómo influye la presión de empaque sobre la estabilidad de las muestras impregnadas, se empacaron a presión de vacío (-0.8 bar) y a presión atmosférica (0,9 bar) (IDEAM, 2004). Se empacaron muestras para cada tiempo de almacenamiento, presión de empaque y variable de respuesta a determinar de cada grupo de muestras impregnadas y sin impregnar como referencia, como se puede apreciar en la Figura 6. Después del empaque, fueron almacenadas en una cámara ambiental a 25°C y 70% de humedad relativa.



Figura 6. Muestras empacadas a dos presiones de empaque, tiempo de almacenamiento, prueba a realizar y bacteria impregnada.

6.5.4 Diseño Experimental

La unidad experimental fueron cilindros de mango de 1,2 cm de diámetro por 1,5 cm de altura, con un peso aproximado de 1,6 – 1,7 g. Los ensayos se realizaron por triplicado según un diseño 4 x 2 completamente al azar de acuerdo a los factores y niveles que se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño de experimentos con sus factores, niveles y variables de respuesta.

Factores	Niveles	Variables de Respuesta
Tipo de bacteria	Muestra control (Fresco sin Bacteria)	- Contenido de humedad (%; b.h) -pH
	<i>L. casei</i>	- Color (L^* , C^*_{ab} , h^*_{ab} , ΔE)
	<i>L. sakei</i>	- Textura (Firmeza)
	<i>L. casei</i> + <i>L. sakei</i>	- Azúcares Totales -Azúcares Reductores
	Atmosférica	- Calidad microbiológica (NMP de coliformes totales, coliformes fecales,mohos y levaduras)
Presión de empaque	Vacío	-Recuento de células viables de bacterias lácticas

Las variables color (L^* , C^*_{ab} , h^*_{ab} , ΔE), pH, azúcares totales y azúcares reductores, textura, calidad microbiológica, recuento de células viables de bacterias lácticas se evaluaron a diferentes tiempos (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días) de almacenamiento en cámara ambiental a 25 °C y humedad relativa de 70%, mientras que el contenido de humedad se evaluó a los 0, 30 y 60 días de almacenamiento.

Nomenclatura de los tratamientos

FV: muestra control empacada a presión de vacío.

CV: muestra impregnada con *Lactobacillus casei* y empacada a presión de vacío.

SV: muestra impregnada con *Lactobacillus sakei* y empacada a presión de vacío.

CSV: muestra impregnada con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus sakei* y empacada a presión de vacío

FAT: muestra control empacada a presión atmosférica.

CAT: muestra impregnada con *Lactobacillus casei* y empacada a presión atmosférica.

SAT: muestra impregnada con *Lactobacillus sakei* y empacada a presión atmosférica.

CSAT: muestra impregnada con *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus sakei* y empacada a presión atmosférica.

6.5.5. Determinación de las Propiedades Fisicoquímicas y Microbiológicas

6.5.5.1 Determinación de Humedad

Para la determinación de la humedad se siguió el método AOAC 20.013 (A.O.A.C, 1997) para frutas ricas en azúcar a una temperatura de 60°C, hasta peso constante. Para los cálculos se aplicó la ecuación (3).

$$C.H = \frac{W_1 - W_2}{W} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

W_1 : peso de muestra húmeda (g).

W_2 : peso de muestra seca (g).

W : peso de la muestra húmeda (g).

C.H: contenido de humedad (% b.h)

6.5.5.2 Medidas de pH

Determinación potenciométrica, según procedimiento indicado en NTC 440, en un pH metro marca CORNING 320.

6.5.5.3 Medida del color

El color de las muestras impregnadas se determinó través del espectro reflexión entre 400-700 nm, con un espectro colorímetro Hunter Lab (Color flex®). Las medidas se expresaron con base a las coordenadas de color CIE-L*a*b* a partir de los espectros de reflexión de las muestras, utilizando como referencia el iluminante D65 y el observador 10°.

A partir de éstas se estimaron las coordenadas psicométricas tono (h^*_{ab}) y croma (C^*_{ab}) mediante las ecuaciones (4) y (5) respectivamente (Konica Minolta, 1998).

$$h^*_{ab} = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (4)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

Así mismo, se estimaron las diferencias de color (ΔE) entre las muestras (i,j) mediante la ecuación (6).

$$\Delta E = \sqrt{(L^*_j - L^*_i)^2 + (a^*_j - a^*_i)^2 + (b^*_j - b^*_i)^2} \quad (6)$$

Donde:

i = muestra inicial.

j = muestra tratada.

6.5.5.4 Medida del esfuerzo de fractura (Ensayo de compresión)

Las muestras de mango se comprimieron hasta una deformación del 90% con una velocidad de compresión de 100mm/min, mediante el uso de un texturómetro (Shimadzu, Japón). Se usó una célula de carga de 500N y un émbolo plano circular de 75 mm de diámetro. Los valores de fuerza-distancia obtenidos se transformaron en esfuerzo (σ) y

deformación de Hencky (ϵ_H). El σ se calculó aplicando la ecuación (7) en la que se asume que el volumen total de la muestra no cambia con la compresión para el cálculo del área de contacto para cada nivel de deformación ($A(t)$). La ϵ_H se estimó mediante la ecuación (8). En estas ecuaciones $F(t)$ corresponde al valor a cada tiempo de la fuerza ejercida por la prensa sobre la muestra de mango, $d(t)$ representa la distancia avanzada por el émbolo en la muestra y l_0 y r_0 son respectivamente la altura y el radio de la muestra correspondiente, medidos antes del ensayo con un pie de rey (Peleg, 1984).

$$\sigma(t) = \frac{F(t)}{A(t)} = \frac{F(t)}{\pi r_0^2 l_0} \times (l_0 - d(t)) \quad (7)$$

$$\epsilon_H(t) = \ln \left[\frac{l_0}{(l_0 - d(t))} \right] \quad (8)$$

6.5.5.5 Determinación del contenido de azúcares totales

Se determinaron por el métodos de Dubois, (1956), conocido por el método de antrona, descrito en **6.3.2.3**

6.5.5.6 Determinación del contenido de azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores se determinó por el método de Lane-Eynon, siguiendo la metodología recomendada en NTC 440.

6.5.5.7 Medidas de control microbiológico

La calidad microbiológica de las muestras se evaluó con los parámetros generales recomendados por el INVIMA (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) en la resolución 3929 de 2013. Para ello se usaron microorganismos indicadores como: el recuento de mohos y levaduras (indicador del deterioro de alimentos con características como pH bajos, altos contenidos de humedad y que sean

fermentados) y el número más probable de coliformes totales y fecales que son bacterias asociadas a la contaminación de los alimentos por manipulación, entre las cuales la más importante es *Escherichia coli*, microorganismo termotolerante, utilizado como referencia para el control de calidad de la higiene en la producción de alimentos.

6.5.5.7.1 Recuento de mohos y levaduras

Se realizaron recuentos de mohos y levaduras, por la técnica de recuento estándar en placa siembra en profundidad, utilizando como medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (Merck®), con incubación a 25°C durante 5 a 8 días, según método recomendado en NTC 4092.

6.5.4.7.2 NMP de coliformes totales y fecales

Para la estimación de coliformes totales y fecales se aplicó la técnica del número más probable, en series de 3 tubos por dilución, como medio de cultivo Caldo Lauryl Sulfato con MUG (Scharlau®), incubación a 35°C durante 24 horas, según procedimiento recomendado en NTC 4092.

6.6 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN LAS MUESTRAS IMPREGNADAS

Se determinó mediante el recuento de células viables de bacterias lácticas en las muestras, por medio de la técnica de recuentos estándar en placa siembra en superficie, en medio MRS (Merck®) con azul de anilina incubadas a 35°C durante 24 horas, determinando así el número de UFC/g de bacterias lácticas; los microorganismos protectores deben ser viables en el alimento en concentraciones de 10^6 - 10^{11} UFC/ml, durante el tiempo de vida útil (Collado *et al.*, 2007).

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados se realizaron análisis de varianza de dos factores correspondientes a tratamiento y empaque y un bloque correspondiente al tiempo para todas las variables de respuesta. Donde se encontraron diferencias significativas se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia de 95%, utilizando el paquete estadístico Minitab 16 ®

7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Las cepas de estudio se caracterizaron por su crecimiento en el medio MRS con azul de anilina y por su coloración de Gram, de esta forma se permitió garantizar la obtención de cultivos puros de cada cepa para las siguientes pruebas. Como se observa en los resultados de caracterización Tabla 5, todas las cepas presentaron asimilación del azul de anilina del medio MRS creciendo colonias azules. Estos resultados son los esperados para cepas de microorganismos lácticos de acuerdo a lo reportado por Giraud (1993) y Ramírez (2005).

Tabla 5. Características morfológicas de las cepas estudiadas.

Cepa	Descripción
<i>Lactobacillus plantarum</i> A6	Colonias azules en el medio, bacillos cortos, Gram (+)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Colonias azules en el medio, coco-bacillos, Gram (+)
<i>Lactobacillus casei rhammosus</i>	Colonias azules en el medio, bacillos alargados, Gram (+)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Colonias azules en el medio, bacillos alargados, Gram (+)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Colonias azules en el medio, bacillos, Gram (+)
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Colonias azules en el medio, bacillos, Gram (+)
<i>Lactobacillus sakei</i>	Colonias azules en el medio, bacillos cortos, Gram (+)

De igual manera presentaron reacción positiva a la coloración de Gram. En la Figura 7, se observa la coloración típica para una bacteria Gram (+), los resultados obtenidos

concuerdan con la clasificación para bacterias ácido lácticas reportados previamente en el punto 4.3.1.

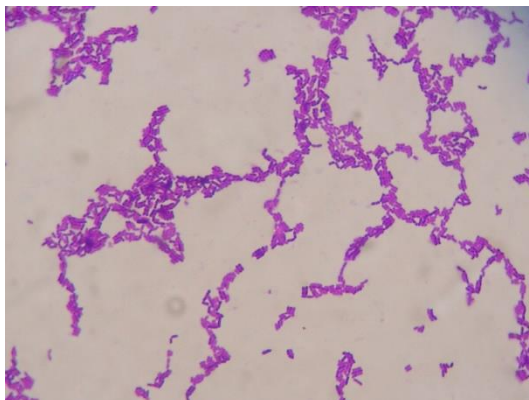


Figura 7. Coloración típica de una bacteria ácido láctica Gram (+).

7.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE BAL

7.2.1 Capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas

Todas las cepas presentaron capacidad de crecimiento a 35°C y con recuentos alrededor de 10^8 UFC/g, excepto la cepa de *Lactobacillus gasseri* que presentó un recuento inferior como se puede constatar en la Tabla 6. De acuerdo a este comportamiento todas las cepas, excepto *Lactobacillus gasseri*, son aptas para procesos de bioconservación; pues 35°C es la temperatura a la cual crecen la mayoría de microorganismos patógenos humanos. Resultados similares fueron obtenidos por Betancourt (2013), en el estudio de la capacidad de crecimiento de aislados de bacterias lácticas en masas fermentadas a diferentes temperaturas, encontrando a 35°C como la temperatura óptima de crecimiento para *Lactobacillus plantarum* en medio líquido (CPQBA 087-11 DRM).

Tabla 6. Viabilidad de las cepas a 25, 35 y 40°C.

Bacteria	Recuento en placa (UFC/mL)		
	Temperatura (°C)		
	25	35	40
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<100	1,60 x10 ⁸	<100
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<100	7,30 x10 ⁷	2,00 x10 ⁴
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,21x10 ⁹	3,24 x10 ⁸	3,49 x10 ⁶
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3,02 x10 ⁹	7,10 x10 ⁸	4,00 x10 ⁴
<i>Lactobacillus casei rhammosus</i>	1,97 x10 ⁹	8,00 x10 ⁸	1,44 x10 ⁶
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6,74 x10 ⁸	2,92 x10 ⁸	3,20 x10 ⁵
<i>Lactobacillus sakei</i>	2,83 x 10 ⁹	3,15 x 10 ⁸	4.76 x 10 ⁶

7.2.2 Pruebas de inhibición entre las cepas seleccionadas

La capacidad de las cepas de crecer en un medio mixto es importante para determinar las condiciones del estudio. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Pruebas de inhibición entre las cepas seleccionadas.

	<i>L.plantarum</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.gasseri</i>	<i>L.coryniformis</i>	<i>L.sakei</i>
<i>L.plantarum</i>	-	+	-	-	+	+	-
<i>Leuconostoc</i>	+	-	-	+	+	+	-
<i>L.casei</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>L.acidophilus</i>	-	+	-	+	+	+	-
<i>L.gasseri</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>L.coryniformis</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>L.sakei</i>	-	-	-	-	+	+	-

Se observa que *L.gasseri* y *L.coryniformis* inhiben el crecimiento del mayor número de cepas de estudio, mientras que *L.casei* y *L.sakei* el menor, seguidos por *Leuconostoc*, siendo estas las cepas recomendadas para medios de impregnación mixtos.

7.2.3 Producción de gas.

La capacidad de producir gas a partir de la glucosa, es una característica empleada en la industria de alimentos como herramienta de identificación bioquímica de las bacterias lácticas, puesto que la mayoría no la presentan. Adicionalmente es importante para el proceso de impregnación emplear cepas que no tengan esta capacidad que podría ocasionar daños en el aspecto de la matriz vegetal durante el almacenamiento. Se observa en la Tabla 8, que ninguna de las cepas presentó producción de gas, en los tubos Durham, al emplear el caldo MRS con 5% glucosa a 35°C por 24 h., por lo tanto pueden ser utilizadas en la impregnación sin causar daños en la matriz vegetal.

Tabla 8. Capacidad de producción de gas de las cepas estudiadas.

Cepa	Producción de gas a partir de glucosa
<i>L.plantarum</i>	-
<i>Leuconostoc</i>	-
<i>L.casei</i>	-
<i>L.acidophilus</i>	-
<i>L.gasseri</i>	-
<i>L.coryniformis</i>	-
<i>L.sakei</i>	-

7.2.4 Poder de inhibición frente a patógenos

El poder de inhibición de las bacterias lácticas fue evaluado frente a 8 bacterias, reconocidas como microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

La prueba de inhibición es positiva (+) cuando se presenta halo de inhibición, causado por la ausencia de crecimiento del patógeno, negativa (-) cuando no se presenta, en las Figuras 8 y 9 pueden observarse los halos de inhibición obtenidos frente a dos patógenos *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium* respectivamente.

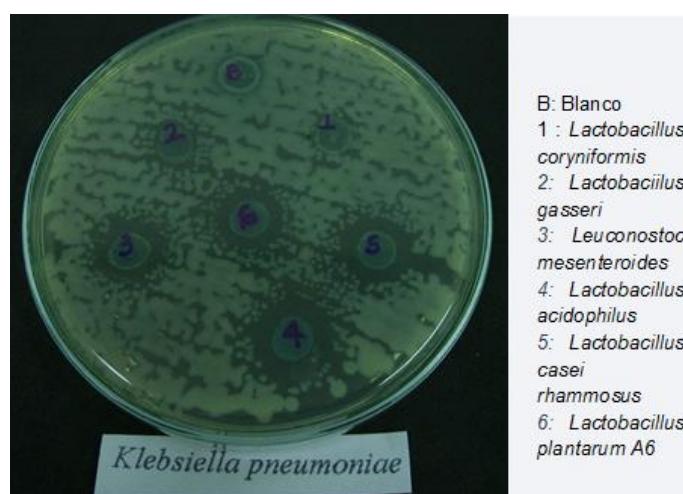


Figura 8. Halos de inhibición obtenidos frente a *Klebsiella pneumoniae*.

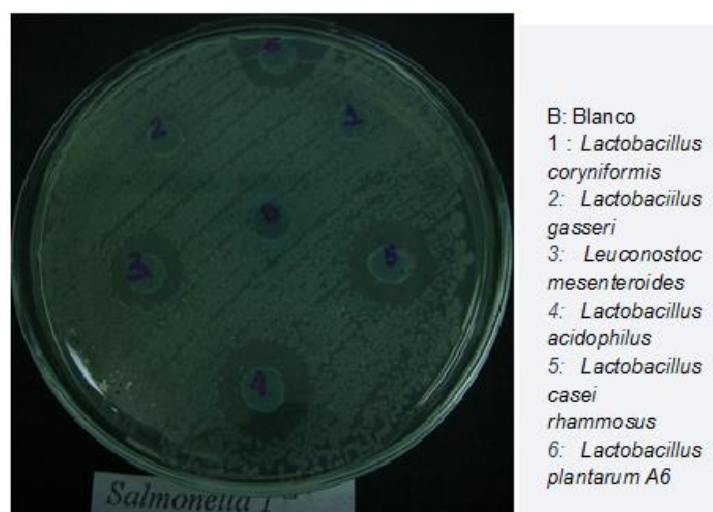


Figura 9. Halos de inhibición obtenidos frente a *Salmonella typhimurium*.

En la Tabla 9, se observan los resultados de las pruebas de inhibición frente a bacterias patógenas, obtenidos con las bacterias ácido lácticas estudiadas.

Tabla 9. Prueba de inhibición frente a bacterias patógenas.

BAL	<i>L.plantarum</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.gasseri</i>	<i>L.coryniformis</i>	<i>L.sakei</i>
Patógeno							
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	+	-	-	+

Se encontró que la mayoría de las cepas presentaron alta capacidad inhibitoria sobre las bacterias patógenas, esto debido a su capacidad de producir sustancias antimicrobianas de amplio espectro como las bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, ácido láctico entre otras, resultados similares fueron obtenidos por: Maldonado *et al.*, (2011), probaron diferentes cepas de lactobacilos, contra bacterias patógenas como *Salmonella dublin* MP/07, *Yersinia enterocolitica* 1845/00, *Escherichia coli* 3511AD, *Streptococcus uberis* MP/06, *Streptococcus dysgalactiae* 05/84 y *Klebsiella sp.* MP/05, obteniendo resultados positivos de inhibición frente a estos patógenos, Ripamonti *et al.*, (2011) probaron las cepas *L. paracasei subsp. Paracasei* SB 137 y *L. animalis* SB310 obteniendo actividad inhibitoria en ensayos con *Escherichia coli* ATCC 25922, *L. monocytogenes* ATCC 7644 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y Alegre *et al.*, (2011) encontraron capacidad del *L.*

rhamonosus GG de reducir el crecimiento de *L.monocytogenes* en trozos de manzana impregnados con ambos microorganismos.

En este estudio, las bacterias ácido lácticas que presentaron la mayor capacidad de inhibición frente a los microorganismos patógenos fueron: *Lactobacillus casei rhammosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus acidophillus*.

7.2.5 Prueba de inhibición frente a mohos y levaduras

La Tabla 10 muestra los resultados de la inhibición frente a mohos y levaduras de las bacterias ácido lácticas.

Tabla 10. Prueba de inhibición frente a mohos y levaduras.

BAL	<i>L.plantarum</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.acidophilus</i>	<i>L.gasseri</i>	<i>L.coryniformis</i>	<i>L.sakei</i>
Mohos y levaduras							
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium spp</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Rhodotorula Rubra</i>	-	+	+	-	-	-	+
<i>Fusarium spp</i>	-	+	+	-	-	-	+

Se observa que, *Lactobacillus casei rhammosus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus sakei* inhibieron el crecimiento de los mohos: *Penicillium spp* y *Fusarium spp* y de la levadura *Rhodotorula rubra*, sin tener efecto sobre el moho *Aspergillus niger*; las demás cepas estudiadas no presentaron dicha capacidad.

La capacidad de algunas cepas de bacterias ácido lácticas de inhibir mohos como *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *A. flavus* o *F. graminearum* ha sido

reportada por los autores: Stiles *et al.*, (2002); Gerez *et al.*, (2009); Prachyakij *et al.*, (2007), Sathe *et al.*, (2007); Dal Bello *et al.*, (2007) y Betancourt, (2013).

La figura 10 muestra algunos de los halos de inhibición obtenidos en esta prueba frente a *Fusarium sp*, *Penicillium sp* y *Rhodotorula rubra*.



Figura 10. Halos de inhibición frente **a.** *Fusarium sp* **b.** *Penicillium sp* **c.** *Rhodotorula rubra*.

7.2.6 Viabilidad a diferentes concentraciones de pH.

Evaluar la resistencia a niveles de pH bajos, es necesaria para favorecer los procesos de fermentación para la producción de los inóculos de impregnación en las frutas, facilitando el manejo del proceso en un sistema cerrado pues no se requiere el control del pH.

Las bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica, tienen un buen comportamiento para valores de pH menores a 4.0 aunque su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 6.5 y 7.0 (De Roissart y Luquet, 1994).

Esta evaluación se realizó a las 3 cepas seleccionadas, por su alta capacidad inhibitoria: *Lactobacillus casei rhammosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Prueba de viabilidad de las cepas a diferentes pH en UFC/mL.

<i>Lactobacillus sakei</i> (UFC/mL)					
pH	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0
Tiempo (h)					
1	1.2×10^8	1.3×10^7	1.1×10^7	7.9×10^5	1.3×10^5
2	2.0×10^9	6.5×10^7	2.0×10^7	6.6×10^6	6.0×10^5
3	6.0×10^9	2.8×10^8	7.5×10^7	1.0×10^7	6.3×10^4
24	5.5×10^{11}	2.0×10^{11}	1.4×10^7	1.3×10^6	<100
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (UFC/mL)					
1	3.4×10^6	3.8×10^6	1.8×10^6	2.6×10^5	7.6×10^4
2	3.5×10^7	2.0×10^7	3.0×10^7	4.2×10^6	4.4×10^4
3	6.0×10^7	4.0×10^7	3.0×10^7	1.9×10^6	4.5×10^4
24	6.0×10^{12}	2.6×10^{11}	8.9×10^{10}	2.3×10^6	<100
<i>Lactobacillus casei rhammosus</i> (UFC/mL)					
1	7.9×10^6	8.4×10^6	6.8×10^6	8.5×10^5	5.2×10^5
2	9.5×10^7	3.0×10^7	7.5×10^7	1.1×10^6	5.2×10^6
3	1.2×10^{10}	2.0×10^9	8.0×10^7	7.7×10^6	4.7×10^6
24	2.7×10^{13}	4.0×10^{12}	4.3×10^{11}	2.7×10^7	<100

Puede notarse que las cepas logran permanecer viables a pH 3.0, después de 24 h de estar expuestas a esta condición con recuentos entre 10^6 y 10^7 UFC/mL, para el pH 2.0 logran permanecer viables durante 3 h con recuentos entre 10^4 y 10^5 UFC/mL. Con estos resultados se logra evidenciar que las 3 cepas al ser resistentes a pH tan bajos pueden estar en capacidad de sobrevivir al paso por el tracto digestivo antes de instalarse en el intestino. Resultados similares encontró Ramírez (2005) con cepas de bacterias lácticas

aisladas de intestinos de camarones y Betancourt (2013) en aislados de masas fermentadas.

Teniendo en cuenta todos los resultados para la elección de microorganismos, las cepas seleccionadas fueron: *Lactobacillus casei rhammosus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*.

7.3 ELECCIÓN DEL MEDIO PARA IMPREGNACIÓN.

El crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo líquido depende de varios factores como son: pH, disponibilidad de nutrientes y la temperatura de incubación. Las bacterias lácticas son microorganismos que tienen requerimientos nutricionales complejos por lo tanto el medio debe aportar la cantidad suficiente de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables (Madigan, et al., 2004).

Emplear medios de cultivo comerciales asegura las condiciones requeridas, sin embargo en la aplicación de medios de impregnación al vacío no pueden ser empleados puesto que representan riesgo a la salud (pueden contener sustancias tóxicas).

La elección del medio de impregnación se basó en la capacidad de crecimiento de los microorganismos y en el pH final, comparando los resultados con el medio comercial, el medio de impregnación debe ser aquel que permita viabilidades superiores a 10^9 UFC/mL, considerando este valor suficiente para que el medio fuera capaz de garantizar la viabilidad para competir con microorganismos alterantes y patógenos, los valores se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de crecimiento de las cepas en los medios de Impregnación.

Medio de cultivo				
Bacteria	MRS	Medio 1	Medio 2	Medio 3
<i>Lactobacillus sakei</i>				
Recuento (UFC/mL)	2.9 x 10 ¹¹	3.1 x 10 ¹¹	6.6 x 10¹³	8.8 x 10 ¹²
pH inicial	6.3	5.27	5.29	5.30
pH final	3.81	4.35	4.29	4.32
<i>Leuconostoc Mesenteroides</i>				
Recuento (UFC/mL)	5.6 x 10 ¹¹	2.5 x 10 ¹¹	5.5 x 10¹³	6.5 x 10 ¹³
pH inicial	5.74	5.25	5.22	5.26
pH final	3.77	4.33	4.20	4.30
<i>Lactobacillus casei</i>				
Recuento (UFC/mL)	1.7 x 10 ¹³	1.2 x10 ¹⁴	2.3 x10¹³	1.4x 10 ¹²
pH inicial	5.89	5.21	5.30	5.24
pH final	3.81	4.35	4.24	4.38

Para el medio 1, se encontraron recuentos alrededor de 10¹¹ UFC/mL para *L.sakei* y *Leuconostoc*, comportamiento similar al medio de control. Para *L.casei* se alcanzaron recuentos alrededor de 10¹⁴ UFC/mL superior al medio control. El pH final del medio estuvo alrededor de 4.33-4.35.

En el medio 2, la viabilidad de los tres microorganismos estuvo alrededor de 10¹³ UFC/mL mejorando el desempeño de *L.sakei* y *Leuconostoc* e igualando a *L.casei*, al comparar los resultados con el medio comercial. La variación del pH estuvo entre 4.20 y 4.29.

En el medio 3, el crecimiento de los 3 microorganismos estuvo entre 10^{12} y 10^{13} UFC/mL, mejorando el desempeño comparado con el medio comercial, para *L.sakei* y *Leuconostoc*, mientras que para *L.casei* se presentó un recuento 10^{12} UFC/mL. La variación del pH se presentó entre 4.30 y 4.38.

Los tres medios presentaron un pH final alrededor de 4.0 que no afecta el crecimiento de los microorganismos, como se evidencia en los altos recuentos y en la capacidad de estos microorganismos de crecer a pH de 3.0. El cambio de pH entre el inicial y el final fue menos marcado para los 3 medios comprados con el medio comercial.

No existen diferencias significativas ($p>0.05$) en los recuentos de las bacterias lácticas ocasionados por el tipo de medio o de bacteria, sin embargo en el gráfico de efectos principales para el recuento, el mayor valor se encuentra para el medio 2 por encima del medio control MRS (Figura 11).

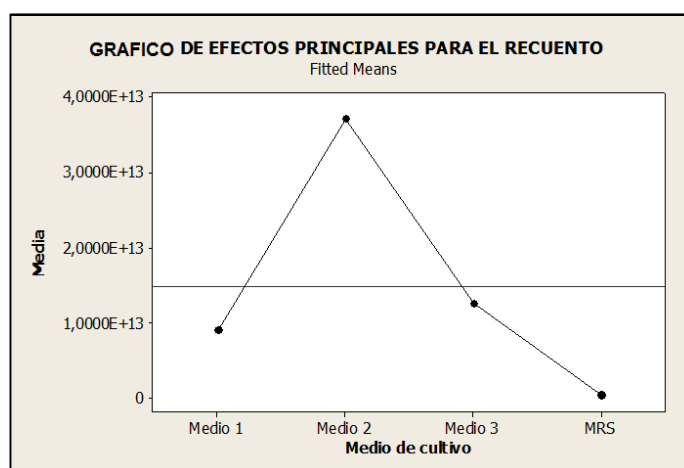


Figura 11. Efectos principales para el recuento de BAL en los medios de cultivo evaluados.

Teniendo en cuenta estos resultados se escogió el medio 2, como medio de impregnación basándose en el crecimiento de los tres microorganismos con valores alrededor de 10^{13} UFC/mL y con el ánimo de explorar el uso de materias primas como la melaza de caña, un sub producto final en la elaboración de azúcar de caña, que contiene sustancias esenciales que favorecen el crecimiento de bacterias lácticas como se demostró en el estudio de Ossa *et al.*, (2010), donde evaluaron la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *L. plantarum*, encontrando condiciones óptimas en un sustrato con 20% de melaza.

7.3.1 Cinética de fermentación

Se realizaron cinéticas de fermentación para los 3 microorganismos escogidos previamente, *L. casei*, *L.sakei* y *Leuconostoc*, en el medio 2 y en el medio de control MRS, siguiendo las técnicas y condiciones del apartado 6.3.2, se realizaron 6 cinéticas por duplicado.

7.3.1.1 Cinética de fermentación de *L.casei*

En la Tabla 13, se presenta la comparación de los datos cinéticos obtenidos para *L.casei* en el medio 2 y en el medio de control MRS. Se observa mejor adaptación del microorganismo al medio control presentando una velocidad de crecimiento y un incremento celular mayor en dicho medio, con recuentos de 3.80×10^{10} UFC/mL para el medio 2 y de $4,50 \times 10^{12}$ UFC/mL para el medio de control, la máxima población microbiana se obtuvo a las 15 h de fermentación para ambos medios; en la Figura 12 se muestran las curvas de crecimiento en ambos medios, confirmando lo anteriormente expuesto.

Tabla 13. Comparación de los datos cinéticos obtenidos del crecimiento microbiano de *L.casei* en el medio 2 y en medio control MRS.

	Medio 2	MRS
Fase lag (h)	3	0
Velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$)	1.16	1,27
Fase logarítmica (h)	15	15
Tiempo de duplicación (h)	0.60	0,55
Incremento celular (UFC/mL)	$3,8 \times 10^{10}$	4.5×10^{12}
Consumo de Azúcares Totales (g/L)	27,2	14,7
Consumo de Proteínas Totales (g/L)	11,50	0,37
R ²	0.9714	0.9038

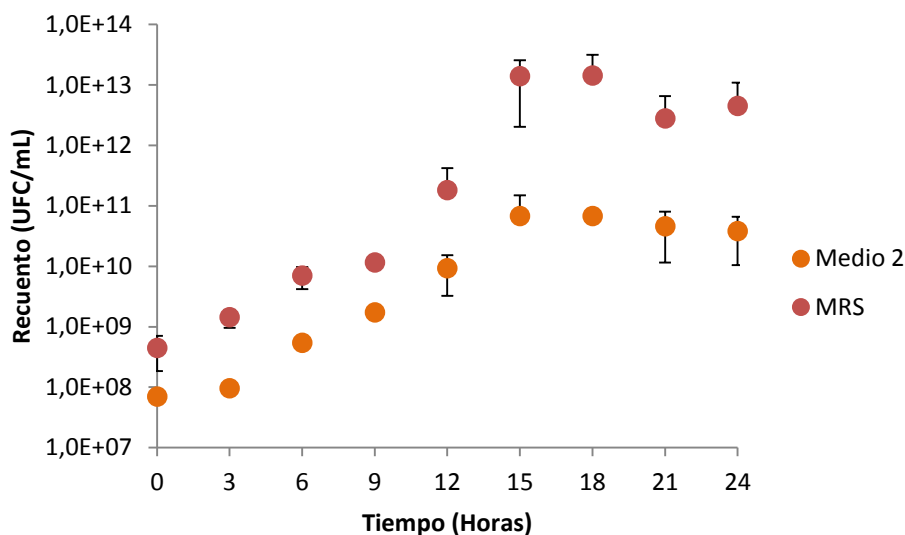


Figura 12. Curvas de crecimiento para *L.casei* en Medio 2 y en MRS.

En la figura 13 se observa la evolución de los parámetros evaluados durante la cinética de fermentación. Para el pH se observa un comportamiento similar en ambos medios, el cual disminuye con el incremento del tiempo llegando a un valor final de 3.50, esto debido posiblemente a la producción de ácido láctico durante la fermentación de azúcar, este valor no afecta el crecimiento del microorganismo por su capacidad de crecer a pH de 3.0, como se encontró en 5.1.6

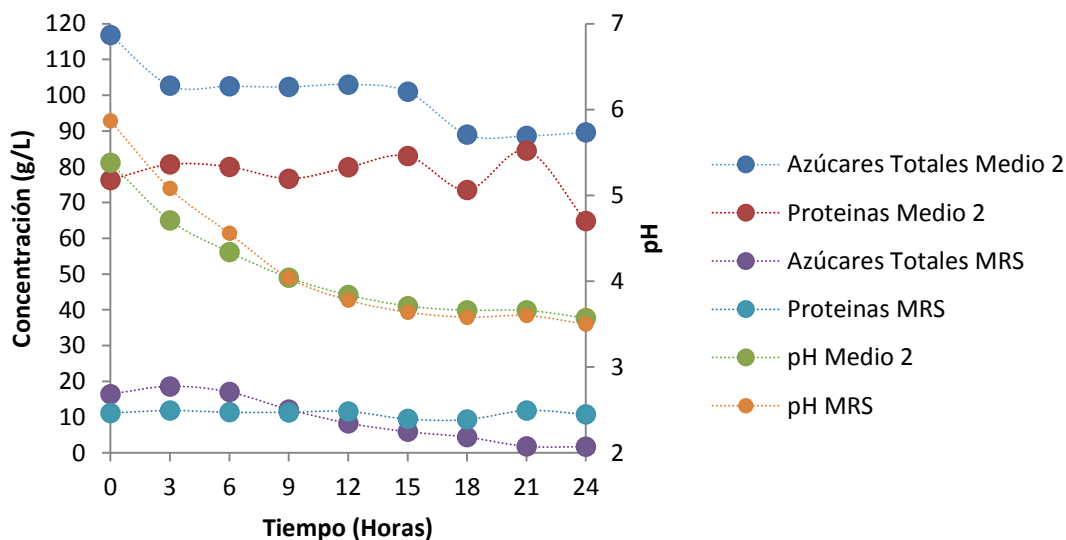


Figura 13. Parámetros evaluados durante la cinética de fermentación de *L.casei*.

La concentración de azúcares totales, en ambos medios, disminuye notablemente a partir de las 6 h de fermentación, relacionándose con el inicio de la fase exponencial de crecimiento en los medios (Figura 12), siendo permanente esta reducción hasta el final de la fermentación. El consumo es debido a los procesos fermentativos del microorganismo que transforman los carbohidratos en ácido láctico, como lo demuestra la disminución en el pH, a través de la glicólisis donde se fosforila la glucosa produciéndose como compuesto final el piruvato (Hernández et al., 2003). El consumo es mayor en el medio 2 que en el control, pues en este se presentan valores iniciales más altos.

La concentración de proteínas permanece constante durante el proceso fermentativo, con una disminución después de las 15 h de fermentación, cuando se alcanza la mayor población de microorganismos, estos resultados demuestran que la cepa no presenta actividad proteolítica marcada, en ambos medios de cultivo.

Los resultados para la cinética de *L.casei*, se deben posiblemente a que en el medio preparado los componentes se encuentran en un estado más complejo y contiene mayor cantidad de nutrientes, lo que le implica a la bacteria más tiempo de adaptación para empezar a duplicarse.

Para este microorganismo se demuestra que puede ser empleado como medio de impregnación pues se obtienen crecimientos del orden de 10^{10} UFC/mL.

7.3.1.2 Cinética *L. sakei* en el medio 2 y en el medio control MRS

Los resultados de los parámetros evaluados en la cinética de fermentación para *L.sakei*, se muestran en Tabla 14. *L.sakei* presenta mejor adaptación al medio control que al medio 2, con una fase de adaptación de 3 h para ambos medios, la fase logarítmica se alcanza a las 15 h en MRS y en 24 h para el medio 2. Este resultado se respalda con la velocidad de crecimiento mayor en el MRS, no obstante su incremento celular es mayor en el medio 2, lo que se evidencia en las curvas de crecimiento en la Figura 14.

Tabla 14. Comparación de los datos cinéticos obtenidos del crecimiento microbiano de *L.sakei* en el medio 2 y en medio control MRS.

	Medio 2	MRS
Fase lag (h)	3	3
Velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$)	0,72	1,27
Fase logarítmica (h)	24	15
Tiempo de duplicación (h)	0,72	0,54
Incremento celular (UFC/mL)	6.57×10^{13}	3.63×10^{10}
Consumo de Azúcares Totales (g/L)	3,80	38,3
Consumo de Proteínas Totales (g/L)	0,17	1,0
R ²	0.9297	0.9038

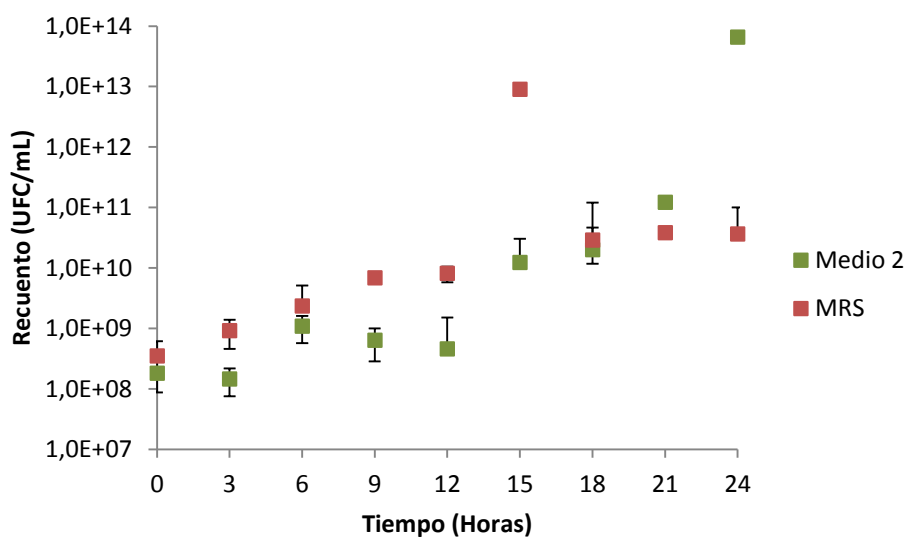


Figura 14. Curvas de crecimiento para *L.sakei* en Medio 2 y en MRS.

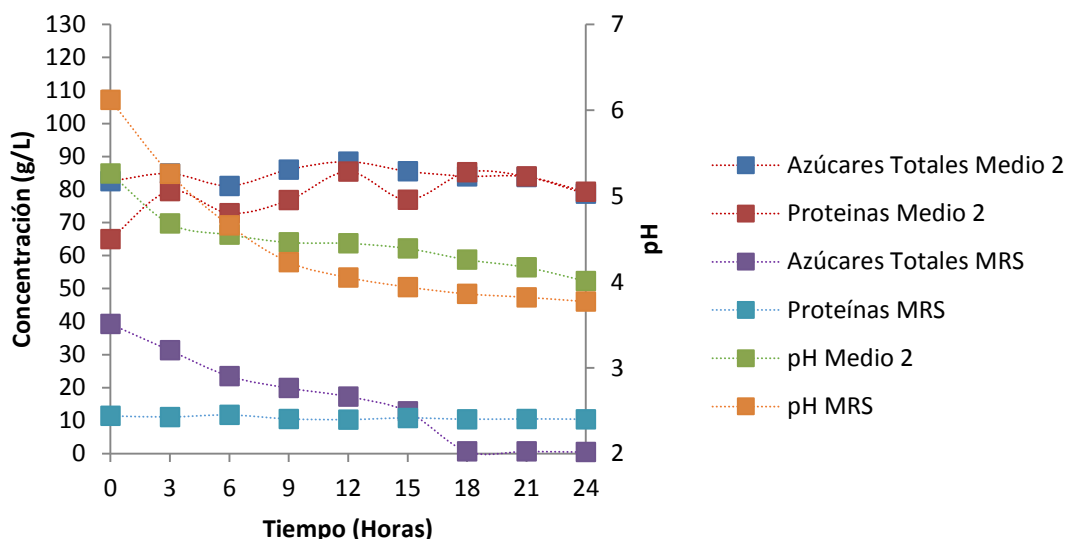


Figura 15. Parámetros evaluados durante la cinética de fermentación de *L.sakei*.

Durante la fermentación el pH presenta mayor variación para el MRS desde un valor inicial de 6.12 a 3.77, mientras que en el medio 2 el pH final fue de 4.01. El consumo de azúcares totales presenta la misma tendencia disminuyendo a medida que el tiempo aumenta en el medio MRS, en el medio 2 no se evidencia un consumo marcado de carbohidratos, debido a que solo hasta el final de la fermentación se alcanza el máximo valor de crecimiento microbiano, como se muestra en la Figura 15. El consumo de proteínas no presenta cambios marcados, no se evidencia por lo tanto actividad proteolítica, como ocurrió para *L.casei*. Para este microorganismo también se demuestra que puede ser empleado como medio de impregnación pues se obtienen crecimientos del orden de 10^{13} UFC/mL.

7.3.1.3 Cinética *Leuconostoc mesenteroides* en el medio 2

Los resultados en la Tabla 15, muestran que *Leuconostoc* presenta una adaptación al medio 2 muy similar que al medio de control, presentando una velocidad de crecimiento mayor en el medio 2 y un incremento celular comparable en ambos medios. La fase exponencial ocurre en el mismo tiempo que para el medio comercial a las 15 h, como se observa en la Figura 16. La variación de pH fue similar en ambos medios a medida que ocurre la fermentación, al igual que se incrementa el consumo de azúcares, el consumo de proteínas sigue el mismo patrón de los anteriores microorganismos (Figura 17). Este

microorganismo puede ser empleado en el medio de impregnación, pues presenta una alta viabilidad con crecimiento del orden de 10^{10} UFC/mL.

Tabla 15. Comparación de los datos cinéticos obtenidos del crecimiento microbiano de *Leuconostoc* en el medio 2 y en medio control MRS.

	Medio 2	MRS
Fase lag (h)	3	3
Velocidad específica de crecimiento (μ h ⁻¹)	1,16	1,52
Fase logarítmica (h)	15	15
Tiempo de duplicación (h)	0,60	0.60
Incremento celular (UFC/mL)	$4,95 \times 10^{10}$	$5,30 \times 10^{10}$
Consumo de Azúcares Totales (g/L)	45,1	20,5
Consumo de Proteínas Totales (g/L)	1,0	0,1
R ²	0.9806	0.9781

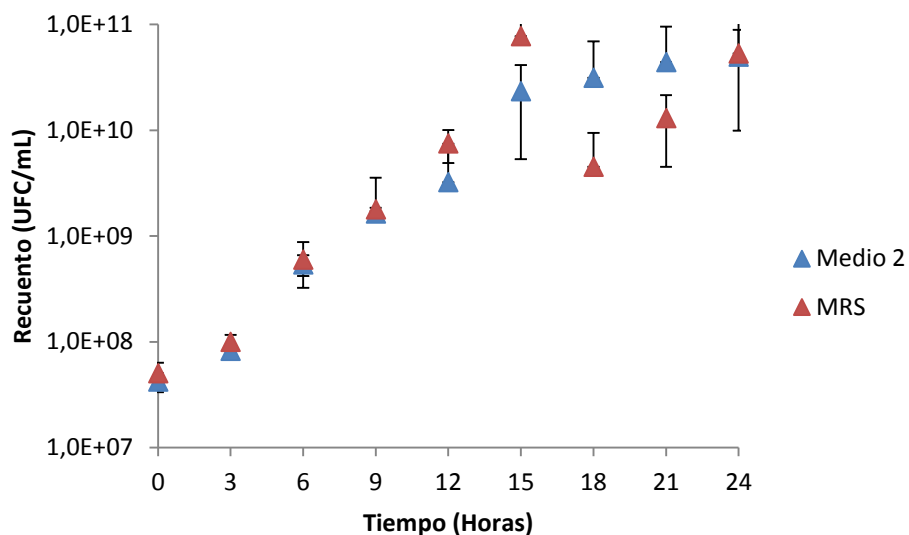


Figura 16. Comparación del crecimiento de *Leuconostoc* entre Medio 2 y MRS.

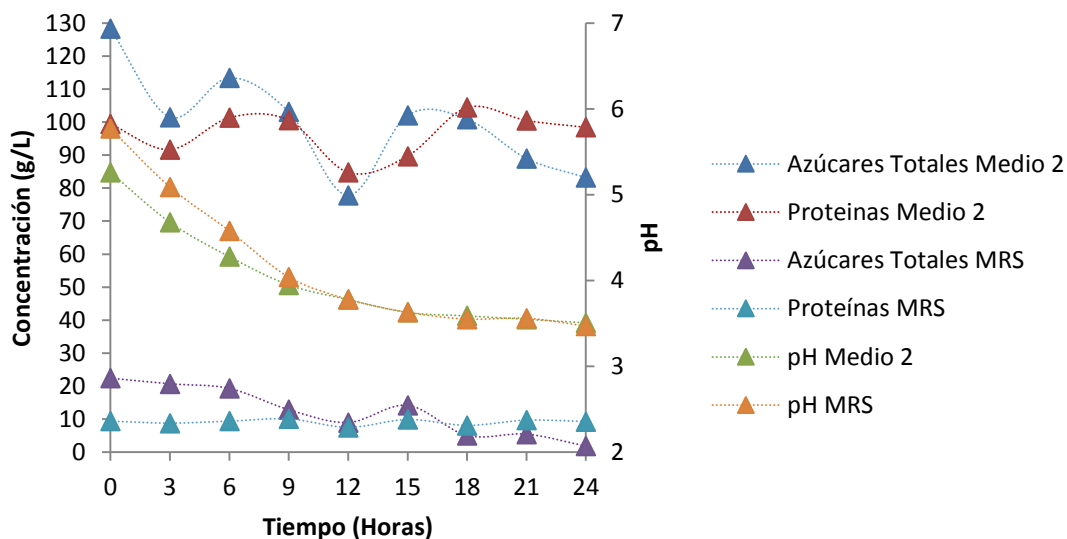


Figura 17. Parámetros evaluados durante la cinética de fermentación de *Leuconostoc*.

Los resultados de las cinéticas para los tres microorganismos muestran que el medio 2 puede emplearse como medio de impregnación, pues los tres microorganismos se adaptan permitiendo velocidades de crecimiento cercanas a $1 \mu h^{-1}$, con un tiempo de 15

a 24 h para el proceso de fermentación y con recuentos del orden de 10^{10} para *L.casei* y *Leuconostoc* y de 10^{13} para *L. Sakei*.

Con el ánimo de evaluar las posibles interacciones entre los microorganismos, se decide realizar la impregnación de la matriz de mango con *L.casei* y *L.sakei* y una mezcla en partes iguales de ambas, por ser estos microorganismos quienes presentaron mejor capacidad inhibitoria frente a microorganismos patógenos.

7.4 PRUEBAS DE IMPREGNACIÓN

7.4.1 Caracterización del Medio de Impregnación

Para determinar la posible influencia del medio en los experimentos de IV se analizaron algunas de sus propiedades fisicoquímicas y los recuentos de los microorganismos escogidos (*L.casei* y *L.sakei*) para evaluar las ventajas de la IV en matrices vegetales. Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores iniciales de a_w , sólidos solubles (°Brix) y recuento de lactobacilos de las soluciones de impregnación con *L. casei rhamnosus* y *L. sakei*.

Parámetro	<i>L. casei</i>	<i>L. sakei</i>
a_w	$0,984 \pm 0,002$	$0,986 \pm 0,003$
Sólidos solubles (°Brix)	$12,6 \pm 0,55$	$11,4 \pm 0,26$
pH	$4,25 \pm 0,02$	$4,30 \pm 0,01$
BAL (UFC/mL)	6.6×10^8	1.1×10^{10}

Un parámetro como la actividad de agua es fundamental para conocer los mecanismos de transferencia de masa en la impregnación, pues un medio isotónico garantiza que sólo el vacío actúa como fuerza impulsora. Se observan resultados semejantes en los medios de ambos microorganismos estos valores son similares a los de las matrices de mango (Tabla 20), por consiguiente estos medios se comportarán termodinámicamente como soluciones isotónicas que no interfieren en el mecanismo de la impregnación.

El valor de sólidos solubles encontrado para ambos medios es menor que el esperado para el mango (*Mangifera indica* L.) de la variedad *Tommy Atkins*, con medidas entre 13 y

15 °Brix, este valor puede influir en pérdida de sólidos solubles de la muestra hacia el medio.

El pH influye fundamentalmente en la capacidad de crecimiento de los microorganismos y en aspectos organolépticos sobre la matriz empleada. Los valores encontrados corresponden a los procesos metabólicos durante el crecimiento bacteriano y están acordes con los resultados de las cinéticas de crecimiento, para ambos microorganismos.

Los recuentos microbiológicos a pesar de ser más bajos que los obtenidos en las cinéticas de fermentación, cumplen con el valor recomendado para garantizar su actividad protectora sobre la fruta.

7.4.2 Caracterización de las matrices vegetales impregnadas (cilindros de mango)

Se realizó una caracterización fisicoquímica y microbiológica de la matriz vegetal utilizada con el fin de evaluar su influencia en el proceso. En la Tabla 17 se presentan los valores iniciales de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de las muestras frescas e impregnadas con *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus sakei* y la mezcla de volúmenes iguales de solución de impregnación de ambos microorganismos.

Tabla 17. Valores iniciales de contenido de humedad, a_w , sólidos solubles, peso, color y recuento de lactobacilos en trozos de mango frescos e impregnados con *L. casei rhamnosus*, *L. sakei* y *L. casei* + *L. sakei*.

Parámetro	Muestra Control	Muestras Impregnadas		
	(Fresco)	<i>L. casei</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L.casei+L.sakei</i>
Humedad (%)	81,24 ± 0,80	82,36 ± 0,52	82,54 ± 0,53	82,12±1,07
a_w	0,9880 ± 0.0007	0,9892 ± 0.0028	0,9884 ± 0.0001	0.9859±0.0026
Sólidos solubles (°Brix)	13,42 ± 1,24	12,00 ± 0,55	10,33 ± 0,26	12,58±1,07
Peso (g)	1,7283 ± 0,0494	1,9019 ± 0,1554	1,8652 ± 0,0718	1,8031± 0,0141
pH	4,15 ± 0,01	3,92± 0,01	4,16 ± 0,01	3,39± 0,01
L*	31,13 ± 4,48	38,45 ± 4,42	35,69 ± 3,31	36.91 ± 3.24
Color a*	5,44 ± 1,25	4,02 ± 1,15	3,29 ± 1,98	4.21± 1,29
b*	36,73 ± 3,90	38,93 ± 4,39	34,32 ± 3,55	36,90 ± 3,26
BAL (UFC/g)	1,5x10 ¹ ± 2,13 x10 ¹	6,00x10 ⁷ ± 4,24x10 ⁶	1,41x10 ⁷ ± 5,37x10 ⁶	4.95x 10 ⁷ ±1.63 x 10 ⁷

De acuerdo a NTC 5210 de 2003, el mango debe tener las siguientes características mínimas: pH 3.19 y sólidos solubles 12.4°Brix. Los resultados indican que las muestras tanto frescas como impregnadas cumplen con estas características comerciales en cuanto al pH presentando una disminución de las muestras impregnadas con respecto al mango fresco, ocasionado por el pH del medio de impregnación. Igualmente se presentó una disminución en los sólidos solubles en las muestras impregnadas, esto debido a que las soluciones de impregnación tienen menor cantidad de sólidos solubles que la muestra de mango original, lo que ocasiona probablemente desplazamiento de sólidos de la muestra a la solución de impregnación en los 3 casos, siendo más evidente para el proceso de impregnación con *L.sakei*. En cuanto al contenido de humedad y a la actividad de agua no se observa una variación muy significativa por efecto de la impregnación, puesto que se están empleando soluciones de impregnación isotónicas.

Los resultados obtenidos para las muestras de mango, difieren a los reportados por Cortés *et al.*, (2007), Salvatori *et al.*, (1998), Ostos *et al.*, (2012), en cuanto a los valores de aw, % Humedad, °Brix, y pH, en estudios de impregnación de mango (*Var. Tommy Atkins*) para su fortificación con sales de calcio, debido a las condiciones de madurez de la fruta, geometría empleada y a la diferencia en las condiciones de impregnación.

Con respecto a las coordenadas de L*, a* y b*, se observa un aumento de L* por efecto de la impregnación, las muestras impregnadas se tornan más claras o luminosas frente a la matriz original, pero sin causar pérdida en su color amarillo como se evidencia en la misma tendencia de variación del valor b* (correspondiente al eje de color azul-amarillo, en el sólido de color). El valor de a* (correspondiente al eje de color verde-rojo) disminuye levemente (no significativo) en todas las muestras impregnadas. De acuerdo al comportamiento de a* y b*, las muestras presentan una ligera tendencia a incrementar su tonalidad hacia el amarillo, por la presencia de la solución de impregnación en los espacios intercelulares del mango.

Las muestras impregnadas presentan una leve ganancia en peso comparada con la muestra fresca debido a que el medio de impregnación queda adherido a las paredes de la matriz vegetal.

Los recuentos microbiológicos de las bacterias lácticas muestran un incremento entre la muestra fresca y las muestras impregnadas de 10^7 UFC/g. Lo que evidencia que el proceso de impregnación no fue tan efectivo al comparar los valores iniciales de microorganismos viables en la soluciones de impregnación, 10^8 UFC/mL para la solución de *L.casei* y 10^{10} UFC/mL para la solución de *L.sakei*.

Este comportamiento es similar al obtenido en el estudio de Ostos *et al.*, (2012) sobre fortificación de mango (*Tommy Atkins*) con calcio por IV, donde encontraron que a pesar de que la porosidad real, muestra gran disponibilidad de los espacios intercelulares para la incorporación de las soluciones, la porosidad efectiva es mucho menor, indicando que no toda la porosidad de la fruta está disponible para el proceso de impregnación, debido a muchos factores: como la capilaridad, cambios de estructurales ocasionados por los cambios de presión, el volumen libre no es totalmente llenado (Mujica-Paz *et al.*, 2003) y la viscosidad de la solución que determina la entrada del líquido en los poros de la matriz, como se reporta en los trabajos de Fito (1994) y Guillemín *et al.*, (2008). Los resultados son similares a los reportados por Morantes (2014) en la impregnación de mango con *L.casei* y a los reportados por Betoret (2003) en manzanas impregnadas con *L.casei* en suero de leche.

7.4.3 Determinación de las Propiedades Fisicoquímicas y Microbiológicas

7.4.3.1 Contenido de Humedad

La variación del contenido de humedad (% b.h.) de las muestras de mango a los diferentes tratamientos, presión de empaque y almacenamiento, se observan en la Figura 18. Las muestras presentan contenidos de humedad de productos frescos altamente perecederos, con un valor promedio de 82.96% para todos los tratamientos, valor más bajo que los reportados para mango fresco por Cortés *et al.*, (2007), Mujica-Paz *et al.*, (2003) y Ostos *et al.*, (2012).

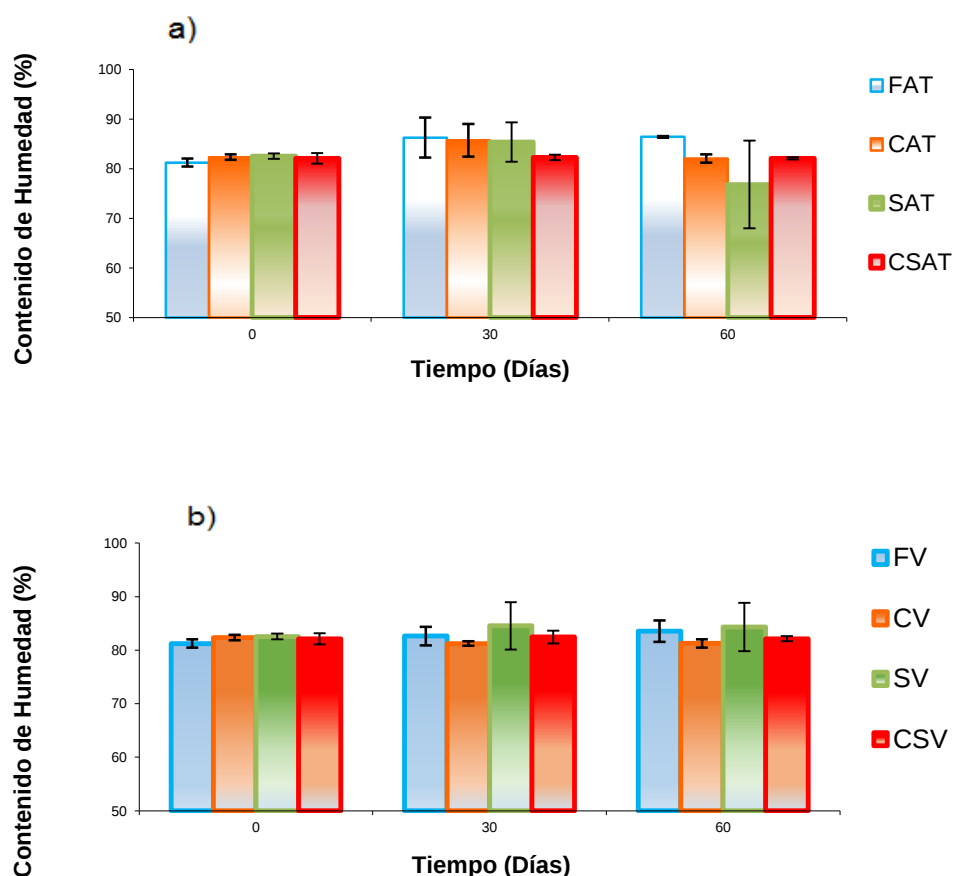


Figura 18. Variación del Contenido de Humedad (%) en las muestras de mango durante almacenamiento: (a) con presión atmosférica (AT) y (b) con presión de vacío (V). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

No se presentaron efectos significativos ($p > 0.05$) de los factores presión, tipo de bacteria y tiempo de almacenamiento sobre en el contenido de humedad, excepto para los tratamientos con presión atmosférica en el tiempo 60 días; mostrando que las muestras impregnadas con BAL presentaron significativamente ($p < 0.05$) menores contenidos de humedad, posiblemente debido al intercambio con el medio ambiente ya que los empaques no son 100% impermeables.

7.4.3.2 pH

En la Figura 19 se muestra la variación del pH de las muestras frescas de mango e impregnadas con bacterias lácticas en los distintos tratamientos durante el almacenamiento.

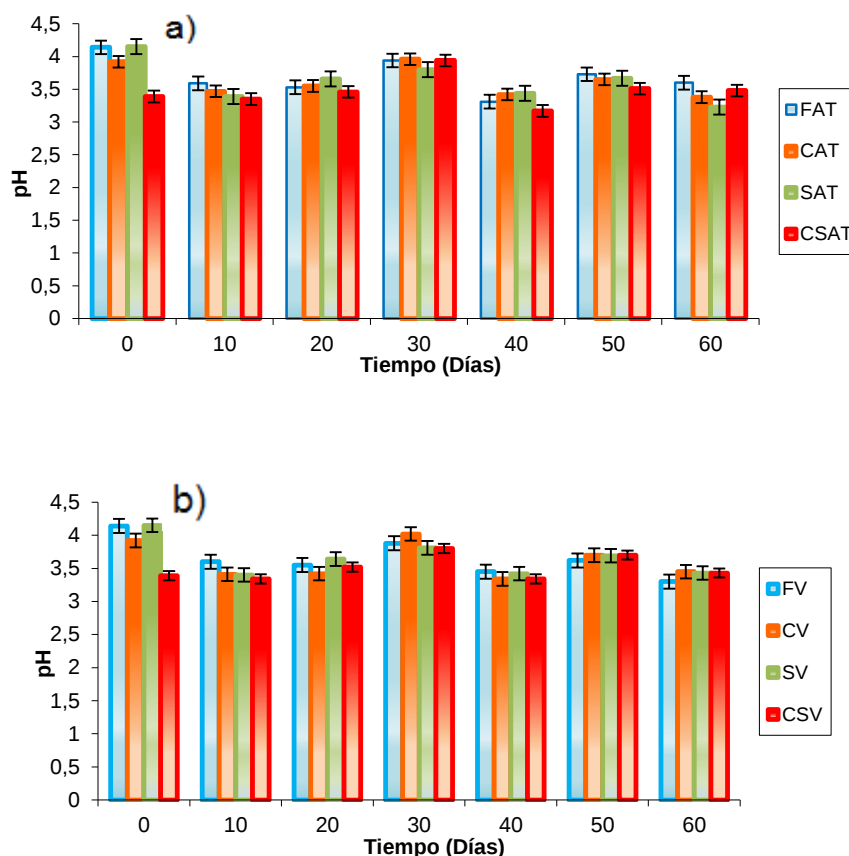


Figura 19. Evolución del pH para muestras frescas e impregnadas con bacterias lácticas durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

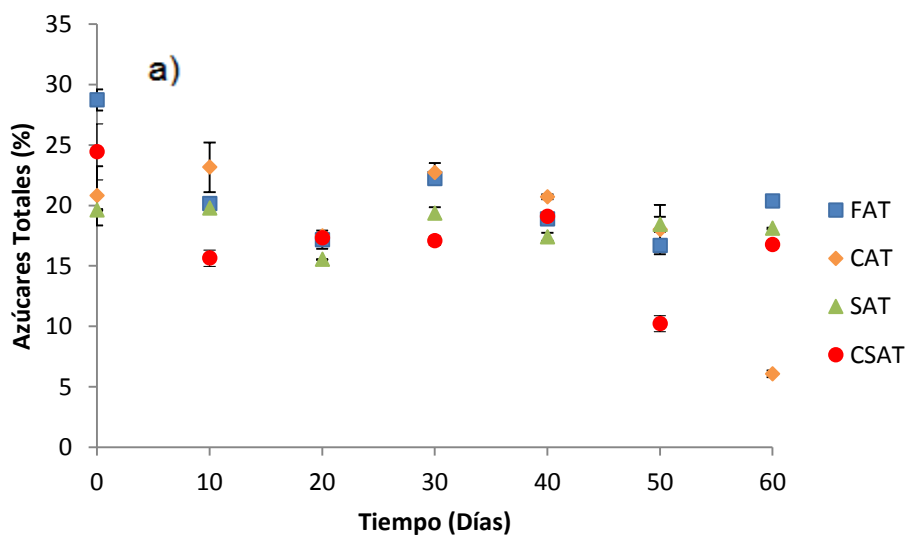
Durante el tiempo de almacenamiento no se observa una tendencia definida del pH, ya que los valores varían entre 4.15 y 3.15, presentándose una disminución significativa ($p < 0.05$) a los 10, 20, 40 y 60 días de almacenamiento, debido posiblemente al crecimiento de los microorganismos lácticos presentes en las muestras. El factor presión y tipo de bacteria no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) sobre esta variable. A

pesar del crecimiento de las bacterias lácticas en la matriz vegetal, su metabolismo fermentativo no disminuye considerablemente el pH de las muestras. Es una muestra ácida, factor que contribuye con el hecho de incrementar su vida útil y se conserva el pH especificado en normatividad para ser empleado en la industria alimenticia.

7.4.3.3 Azúcares Totales

La cuantificación de azúcares totales es importante ya que está relacionada con el proceso de maduración de las frutas, incrementando su valor con el tiempo de almacenamiento. Por consiguiente, si esta variable se mantiene constante o disminuye existe una supresión del proceso de maduración durante el período de almacenamiento y con la disminución de los síntomas de senescencia, según los datos obtenidos por Gonzalez-Aguilar *et al.*, (2000).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de azúcares totales, para este estudio pueden observarse en la Figura 20.



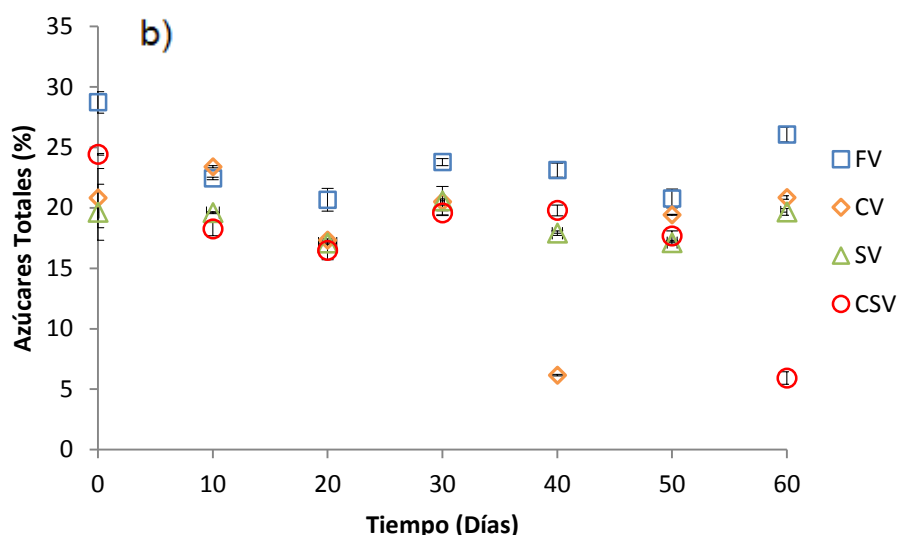


Figura 20. Evolución del contenido de azúcares totales para muestras frescas e impregnadas con bacterias lácticas durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

Se puede apreciar que el % azúcares totales disminuye significativamente ($p < 0.05$) con el tiempo de almacenamiento, este comportamiento puede estar relacionado con la actividad enzimática que metaboliza la escisión de la sacarosa en fructosa y glucosa en la fruta, por el crecimiento bacteriano o por los procesos de maduración de la fruta (Helland et al., 2016). El factor presión de empaque, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$), mientras que el tipo de BAL si influyó significativamente ($p < 0.05$). La prueba de Tukey arroja que no existen diferencias en las medias para las muestras impregnadas con *L.casei*, *L.sakei* y con las muestras sin impregnar, variando desde 23 hasta 18%. Las muestras impregnadas con la mezcla de BAL presentan diferencias disminuyendo desde 24 a 11%, para ambas presiones de empaque, lo que indica que las bacterias limitan los procesos de maduración del mango en el almacenamiento, la disminución además es producto del consumo de las BAL durante su crecimiento en las muestras, ya que el consumo de azúcares está relacionado con su tasa de crecimiento.

7.4.3.4 Azúcares Reductores

La evolución del % de azúcares reductores en las muestras impregnadas y sin impregnar se muestra en la Figura 21. Se aprecia, en todos los tratamientos un incremento hasta el

día 30 de almacenamiento, posteriormente disminuye. Este resultado puede estar relacionado posiblemente a la actividad metabólica de las BAL y de la fruta en cuanto a la ruptura de los enlaces en la sacarosa, resultados que se relacionan con los encontrados en el análisis de azúcares totales.

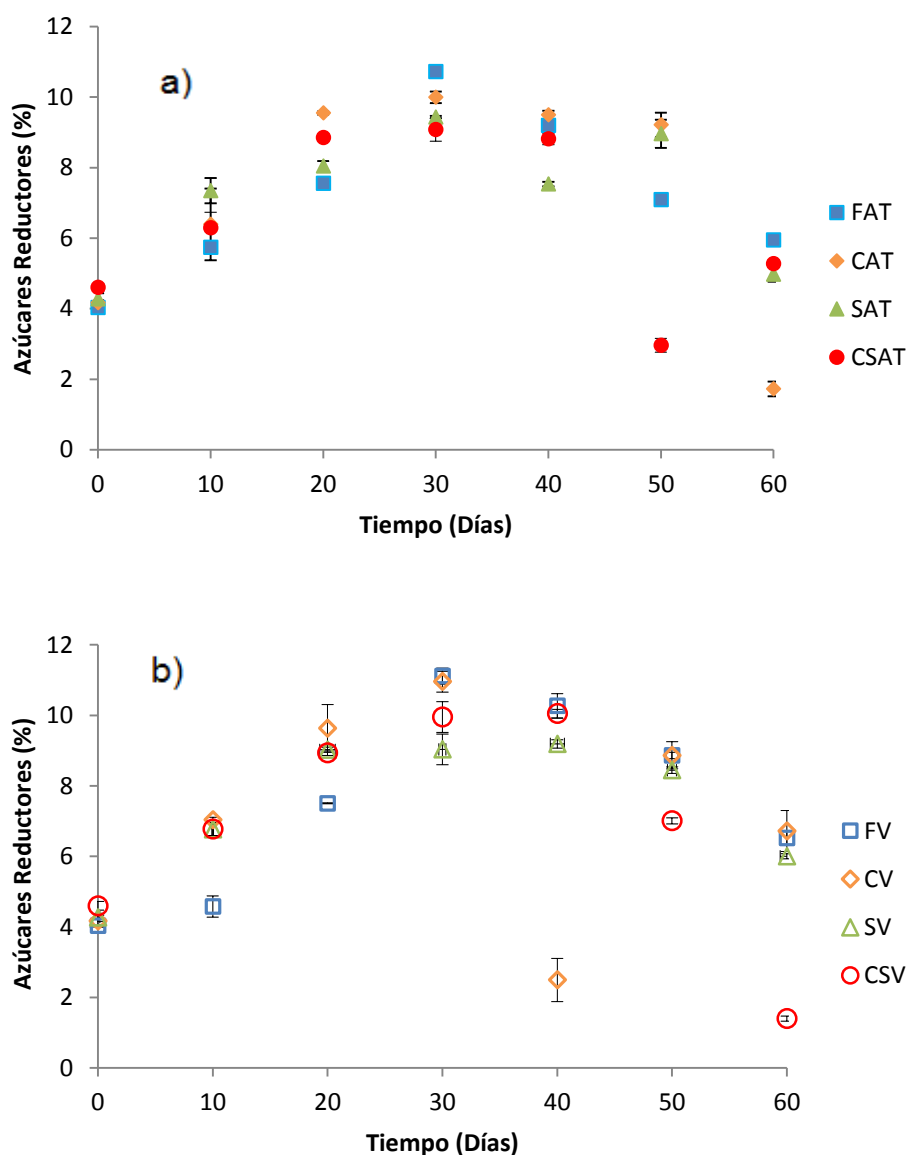


Figura 21. Evolución del contenido de azúcares reductores para muestras frescas e impregnadas con bacterias lácticas durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

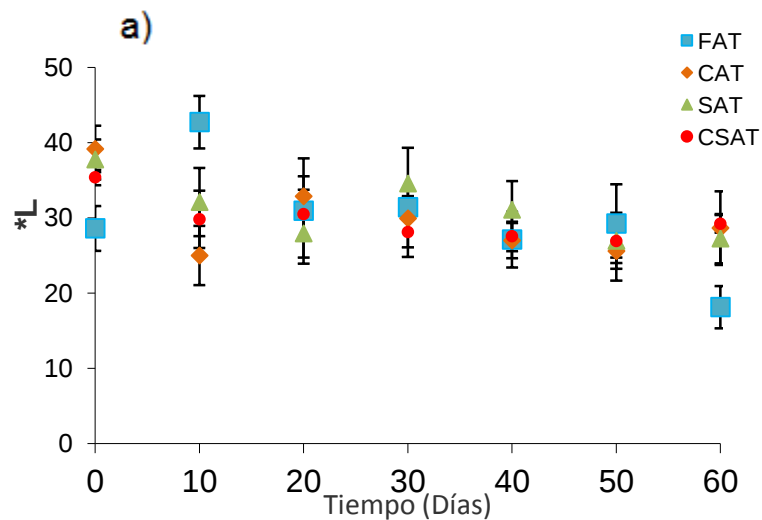
El ANOVA evidenció que el contenido de azúcares reductores en las muestras no presentaron diferencias significativas en cuanto al tipo de BAL y presión de empaque ($p>0.05$).

7.4.3.5 Color

En los siguientes apartados se analizarán las variaciones de los parámetros del color (L^* , C^*ab y h^*ab) y las diferencias globales de color (ΔE) entre las muestras impregnadas y las muestras sin tratamiento, a las dos presiones de empaque y durante el tiempo de almacenamiento.

7.4.3.5.1 Luminosidad (L^*).

En la Figura 22, se muestra la evolución del cambio de claridad (L^*) de muestras de mango tratadas y no tratadas con BAL durante el tiempo de almacenamiento.



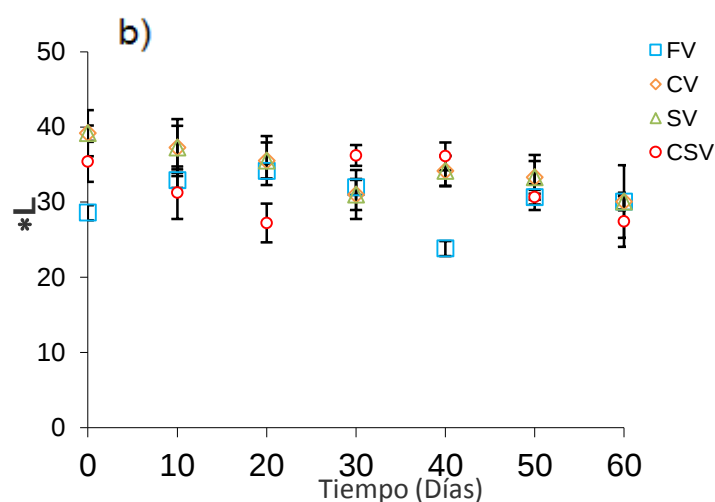


Figura 22. Cambios de claridad en muestras de mango impregnada con BAL durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

Se observa la pérdida de claridad en todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento, siendo más evidente en los tratamientos empacados a presión atmosférica con diferencias significativas ($p < 0.05$), lo que indica que las muestras fueron más oscuras. Este comportamiento puede ser atribuido a que el empaque al vacío retarda los procesos metabólicos del deterioro normal, acelerados por las operaciones de preparación de la muestra (pelado y corte), que favorecen la degradación oxidativa de los pigmentos con la consiguiente reacción de oscurecimiento del tejido, disminuyendo la tasa de respiración en la fruta (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2005).

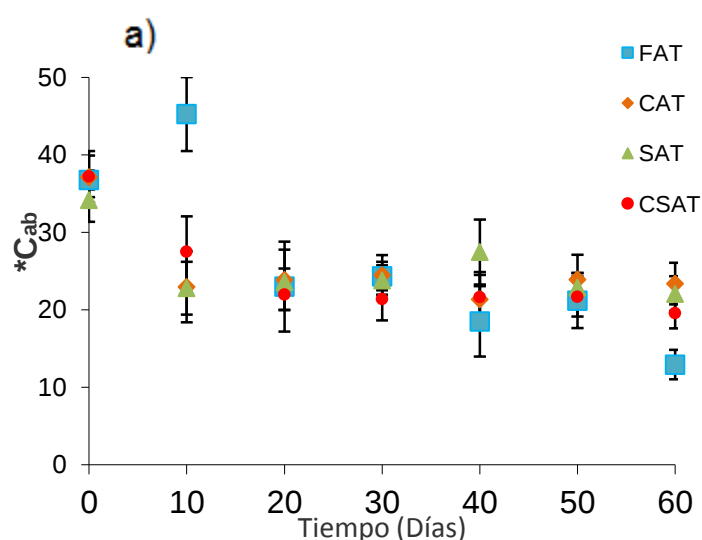
Con respecto al efecto de la aplicación de BAL, se encuentran diferencias significativas para todos los tratamientos ($p < 0.05$), siendo para las muestras impregnadas con *L.casei* y *L.sakei* similares con menores cambios de claridad con respecto a los de las muestras sin impregnar e impregnadas con la mezcla para ambos tipos de empaque. Estos comportamientos indican que las muestras impregnadas con *L. casei* y *L.sakei* fueron más claras que el resto de tratamientos y las muestras sin impregnar las más oscuras. De acuerdo a estos resultados, es positiva la aplicación de BAL a matrices de muestras de mango por presentar menores pérdidas de claridad respecto a las muestras no tratadas, este comportamiento es debido posiblemente a que en el intercambio gas-

líquido durante la impregnación, las bacterias ocupan los poros de la fruta creando una barrera para la respiración de la misma, disminuyendo los daños en la célula y su proceso de pardeamiento enzimático.

La disminución del parámetro L^* , también está asociado a los procesos de IV, debido al cambio de gas por líquido de impregnación en los poros de las matrices vegetales que cambia su índice de refracción en muestras más opacas, de acuerdo a los resultados de Alzamora *et al.*, (2005), Xie y Zao (2003 a), Djoua *et al.*, (2009), Marin *et al.*, (2010) , Erihemu *et al.*, (2014), en procesos de IV en diferentes matrices vegetales.

7.4.3.5.2 Croma o pureza de color (C^*_{ab})

Los valores de croma o pureza tuvieron un comportamiento similar a los de luminosidad, disminuyeron a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento, encontrándose la mayor diferencia entre los 10 y 20 días de almacenamiento. En cuanto a la presión de empaque se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) con valores mayores para vacío, lo que significa que las muestras presentaron mayor pureza de color (color amarillo característico del mango) durante el almacenamiento que las muestras a presión atmosférica (Figura 23).



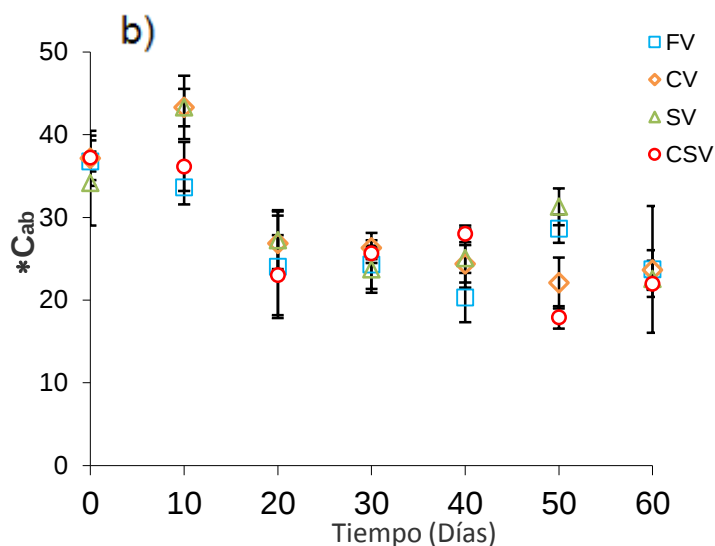


Figura 23. Evolución de la pureza (*C_{ab}) de claridad en muestras de mango impregnada con BAL durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

La aplicación de BAL no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos con BAL, pero sí fue significativo al comparar con las muestras no impregnadas en el almacenamiento a presión atmosférica; lo cual indica que las BAL incrementaron mayor pureza de color o mayor viveza que las no tratadas en las muestras a presión atmosférica.

7.4.3.5.3 Tonalidad (h*ab).

Con respecto a la tonalidad, se registraron diferencias significativas para los tratamientos con BAL, presión de empaque y el tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$). La tonalidad disminuyó al incrementarse el tiempo de almacenamiento, mostrando valores mayores para las muestras tratadas con BAL en ambas presiones de empaque. Con respecto a los tratamientos impregnados con BAL, se observan tanto a presión atmosférica como en vacío cambios significativos ($p < 0.05$) entre sí, los menores cambios se presentaron para *L.sakei*, seguido de *L.casei* y la mezcla. Estos resultados indican el efecto positivo de la impregnación de BAL en muestras de mango, las cuales mantienen significativamente su

color característico amarillo-naranja. Mientras que las muestras no tratadas con BAL, presentaron los valores más bajos variando desde de 81.75 hasta 70.93° para AT y 69,53° para V, lo cual significa que las muestras presentaron una tendencia de cambiar su tono de amarillo-naranja hacia un color marrón. Resultados que se pueden observar en la Figura 24.

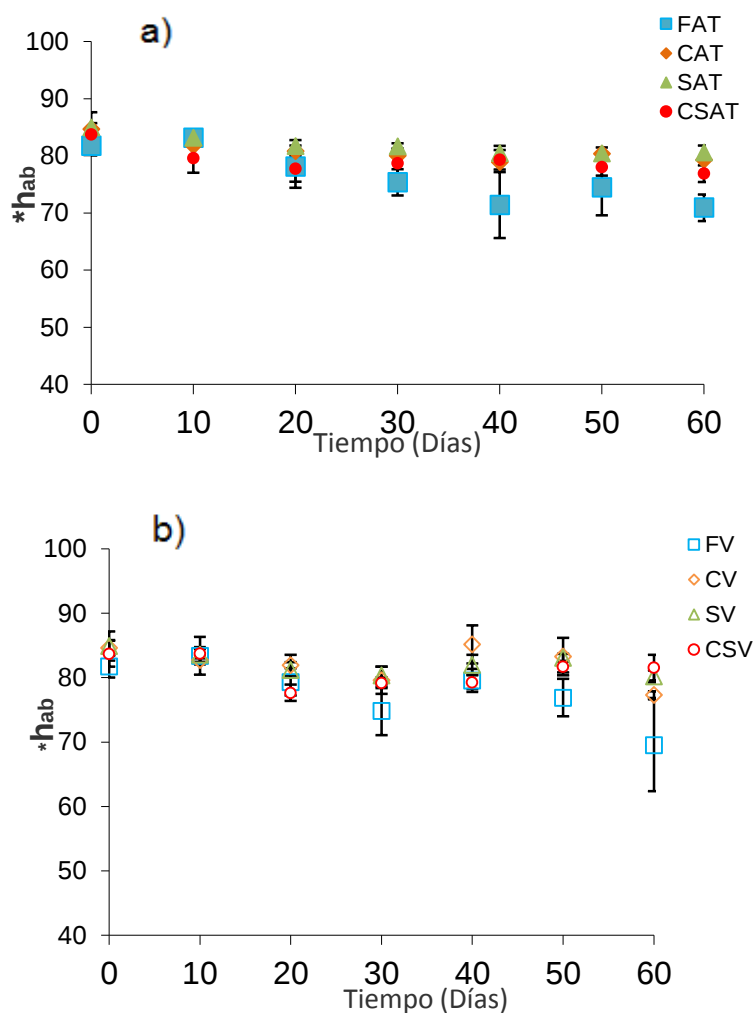


Figura 24. Cambios de tonalidad en muestras de mango impregnada con BAL durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

7.4.3.5.4 Diferencia de color (ΔE).

En la Figura 25 se observa el cambio total de color de muestras de mango tratadas y no tratadas con BAL durante el almacenamiento.

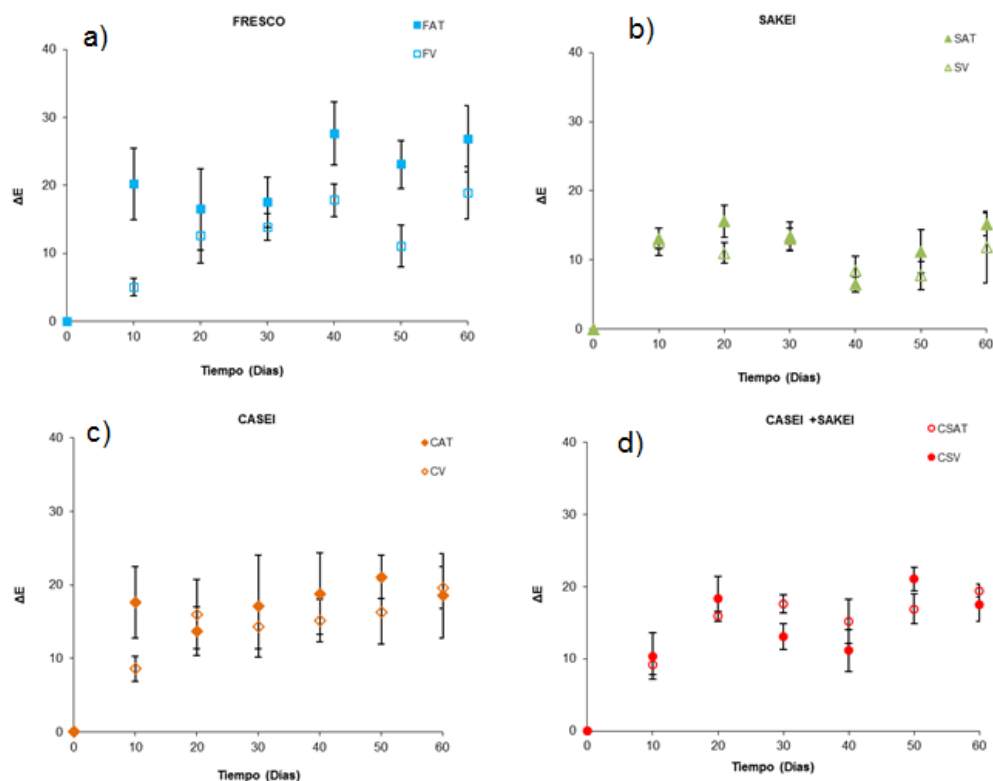


Figura 25. Cambios totales de color en las muestras de mango sin impregnar a) e impregnadas con b) *L.sakei*, c) *L.casei* y d) la mezcla, durante el almacenamiento a 25°C.

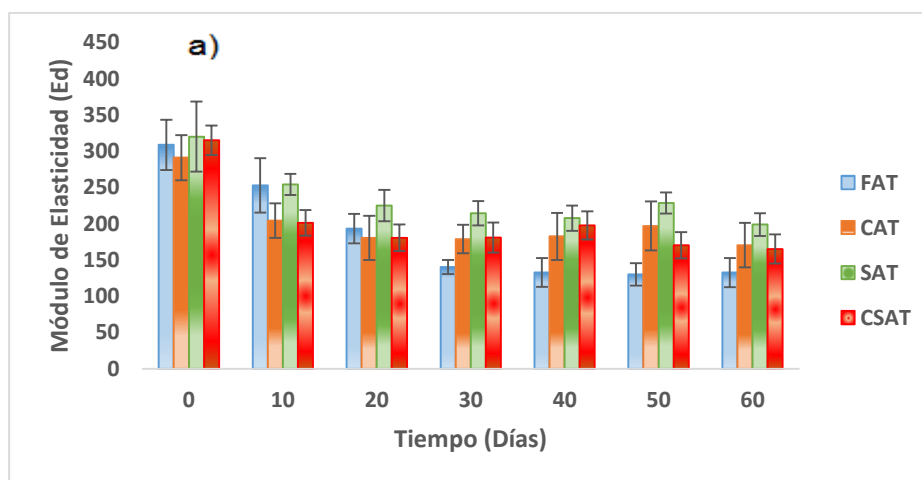
Se evidencia incremento en los cambios totales de color en todos los tratamientos durante el tiempo de almacenamiento, mostrando los mayores cambios entre 0 y 20 días de almacenamiento. Se evidenció un efecto significativo ($p < 0.05$) del factor presión sobre ΔE , mostrando mayores cambios en las muestras empacadas a presión atmosférica, independientemente del tratamiento. El factor tipo de BAL también influyó significativamente ($p < 0.05$) sobre los resultados, presentando los menores cambios en las matrices de mango impregnadas con *L. Sakei*, mientras que las muestras no tratadas con BAL mostraron los mayores cambios. Estos resultados comprueban el efecto protector de

la impregnación de BAL a muestras de mango sobre el color en términos de claridad y tonalidad.

7.4.3.9 Textura (Firmeza)

En estas pruebas no se pudo calcular el esfuerzo de fractura, ya que las muestras no presentaron punto de fractura, mostrando una curva lineal al inicio y después curvo hacia arriba. Por consiguiente la textura se analizó mediante el parámetro módulo de elasticidad correspondiente a la pendiente de la zona lineal, el cual indica que a mayor valor la muestra es más rígida o mayor firmeza (Chiralt, *et al.*, 2001; Cortés et al., 2007).

La Figura 26 muestra la evolución del cambio del módulo de elasticidad de muestras de mango tratadas y no tratadas con BAL a presión de vacío y atmosférica durante el tiempo de almacenamiento.



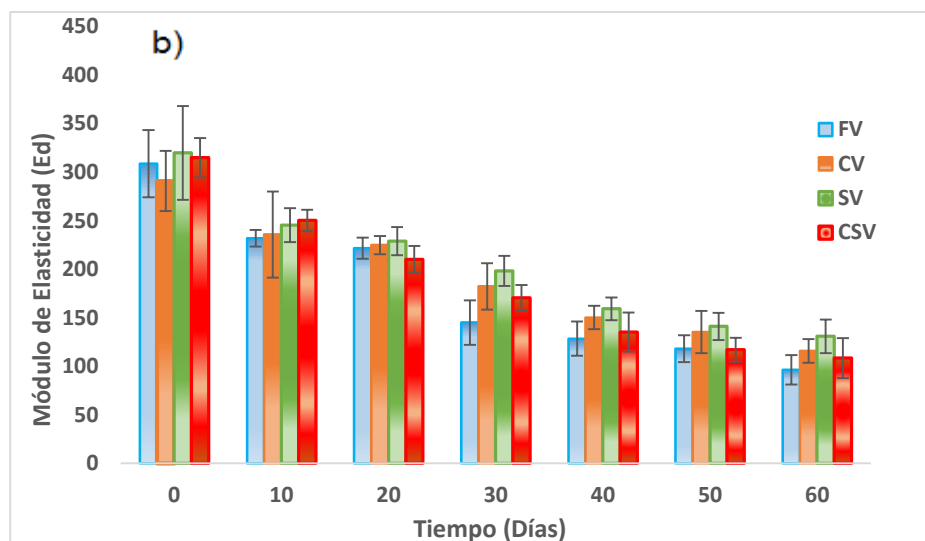


Figura 26. Evolución del Módulo de Elasticidad (Ed) en las muestras durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

Puede notarse en todos los tratamientos la disminución significativa ($p < 0.05$) del módulo de elasticidad con el tiempo de almacenamiento, siendo las muestras frescas no impregnadas las que presentaron los menores valores. Esto indica que las muestras impregnadas con BAL mostraron significativamente ($p < 0.05$) mayor firmeza respecto a las no impregnadas. Este comportamiento puede ser atribuido posiblemente a la producción de ácido láctico, sustancia con 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, (Jiménez *et al.*, 2012). Éste polímero genera altas viscosidades y estructuras con alta elasticidad (Oliveira *et al.*, 2013) y que a la vez tiene posiblemente la capacidad de disminuir la acción de las enzimas causantes de la pérdida de firmeza por la solubilización de la pectina (Djioua *et al.*, 2009) o que pueden inducir a cambios en los componentes de la pared celular generando descenso de la cristalinidad de la celulosa, disminución del contenido de ácido galacturónico y adelgazamiento de la pared celular (Rangel-Marrón y López-Malo, 2012).

Al comparar este módulo entre los tratamientos impregnados, el que presentó mayor firmeza durante el almacenamiento fue el tratamiento con impregnación de *L.sakei*. Con respecto al factor presión de empaque, puede notarse que en las muestras empacadas a presión atmosférica presentaron mayor firmeza respecto a las muestras empacadas al vacío, debido posiblemente al efecto de deformación irreversible provocada por el empaque en el momento de la aplicación del vacío, contribuyendo a debilitar la estructura interna de la fruta y por ende su firmeza (Parry, 1995). Resultados similares fueron encontrados por Córtes et al., (2007) en cilindros de manzana fortificados con vitamina E, con empaque al vacío y almacenadas a 4°C.

De acuerdo a estos resultados se evidencia el efecto protector de la impregnación de BAL sobre la textura de muestras de mango durante el almacenamiento, encontrándose una disminución por encima del 35% con respecto al valor de la muestra fresca para todos los tratamientos a los 20 días de almacenamiento, excepto las muestras impregnadas con *L.sakei* que presentaron una disminución del 30% a ambas presiones de empaque.

7.4.3.10 Calidad Microbiológica

La Tabla 18 muestra los resultados de análisis microbiológicos de muestras control e impregnadas de mango. No se encontró presencia de contaminación por coliformes totales ni fecales para ninguno de los tratamientos, indicando que las muestras se manipularon adecuadamente durante la preparación.

En los recuentos de mohos y levaduras, solo se encontró presencia en las muestras sin impregnar y en las impregnadas con *L. casei*, al inicio de la investigación, con recuentos alrededor de 10^1 UFC/g en ambos casos. A partir del día 10 en todos los tratamientos no se presentaron crecimiento de estos microorganismos hasta el día 40, donde las muestras sin impregnar en empaque atmosférico registran crecimiento alrededor de 10^5 UFC/, posteriormente permanece constante hasta el día 50. Este crecimiento evidencia el deterioro en las muestras con valores por encima de los permitidos por la normatividad para este tipo de alimentos en la Resolución 3929 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social. En las muestras empacadas al vacío se evidencia este tipo de crecimiento al día 50 para las muestras sin impregnar y día 60 para la mezcla.

Tabla 18. Análisis microbiológicos (NMP de coliformes totales-CT, NMP de coliformes fecales-CF, Recuento de mohos y levaduras-RML y Recuento de lactobacilos-RL) de muestras control e impregnadas.

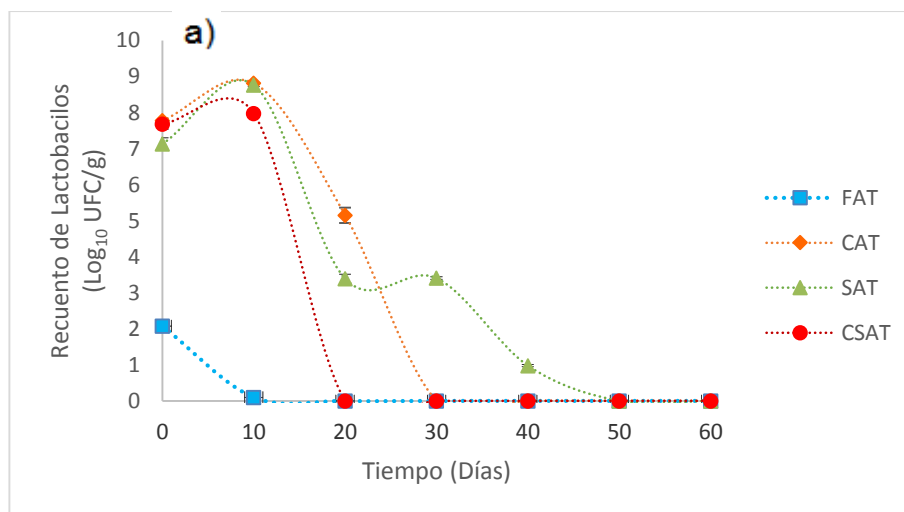
Tratamiento	Análisis	Tiempo (Días)						
		0	10	20	30	40	50	60
FAT	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		1,5 x						
	RML (UFC/g)	10 ¹	<10	<10	<10	4.3 x 10 ⁵	4.9 x 10 ⁵	<10
CAT	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		3,0 x						
	RML (UFC/g)	10 ¹	<10	<10	<10	<10	<10	<10
SAT	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	RML (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
CSAT	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	RML (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	2.2 x10 ⁵
FV	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
		1,5 x						
	RML (UFC/g)	10 ¹	<10	<10	<10	<10	5.0 x 10 ⁴	5.0 x 10 ¹
CV	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	RML (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
SV	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	RML (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
CSV	CT (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	CF (NMP/g)	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	RML (UFC/g)	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

Las muestras por su alto contenido de humedad y de a_w son susceptibles a deteriorarse durante el almacenamiento a 25°C, condiciones que favorecen el crecimiento de este tipo

de microorganismos. No obstante, las muestras en todos los tratamientos permanecieron dentro de los límites de calidad microbiológica durante el almacenamiento, a excepción de las muestras sin tratar, evidenciándose el efecto protector de las bacterias ácido lácticas. Resultados similares fueron obtenidos en rodajas de melón impregnadas con *L. plantarum* (JCM,1149), secados y almacenados durante 35 días sin afectar su calidad microbiológica durante el almacenamiento (Bolívar y Rubiano, 2013).

7.4.4 Determinación de la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en las muestras impregnadas

El efecto bioprotector de las BAL en las muestras depende de su viabilidad durante el almacenamiento con recuentos mínimos de 10^6 UFC/g que les permitan competir contra patógenos y garantizar un contenido de microorganismos vivos que puedan ejercer efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor (Ouwehand *et al.*, 1999). La Figura 27 muestra los resultados de la viabilidad de las BAL durante el almacenamiento.



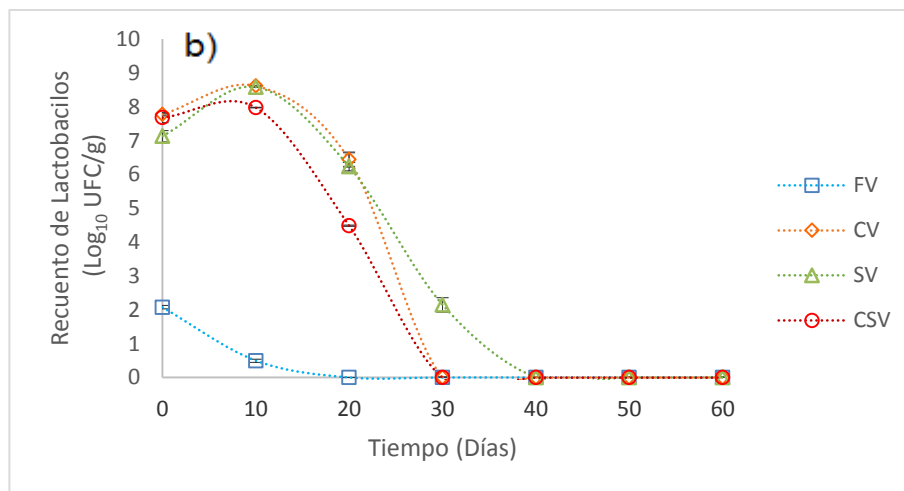


Figura 27. Evolución del recuento de lactobacillus en las muestras durante el almacenamiento: con presión atmosférica (a) y con presión de vacío (b). (F: muestra sin impregnar; C: Impregnada con *L.casei*; S: Impregnada con *L.sakei*; CS: Impregnada con *L.casei*+*L.sakei*)

Se observa que las muestras sin impregnar presentan un recuento inicial de bacterias lácticas (10^1 UFC/g), lo cual es aceptable ya que estos microorganismos forman parte de la flora acompañante en frutas, las cuales pierden su viabilidad durante el almacenamiento en ambos empaques a partir del día 10.

En las muestras impregnadas, se encontró que se logró incorporar a la matriz del mango recuentos de BAL de 10^7 UFC/g para todos los tratamientos. En el día 10 de almacenamiento se presentaron recuentos de 10^8 UFC/g, para *L.casei* y *L.sakei*, mientras que en la mezcla permaneció constante en ambos empaques. Las bacterias logran adaptarse al medio y activar su capacidad metabólica para crecer en el mismo, aprovechándose de los nutrientes presentes en la matriz vegetal. A pesar de que las bacterias *L.casei* y *L.sakei* no presentaron inhibición como se registra en la Tabla 7 de 7.2.2, su capacidad de crecimiento se ve limitada probablemente por competición de los nutrientes presentes en la matriz de mango, lo que causó pérdida de su viabilidad entre el día 20 y 30, a partir del cual no se presentaron recuentos.

Las muestras con *L.casei*, presentaron recuentos de 10^5 UFC/g en AT y 10^6 UFC/g en V, el día 20 de almacenamiento. El número de bacterias empieza a disminuir posiblemente

por falta de nutrientes y por acumulación de sustancias tóxicas producto de su metabolismo, es así como a partir del día 30 no se presenta crecimiento.

Para las muestras impregnadas con *L.sakei*, estas permanecieron viables hasta el día 30 de almacenamiento con recuentos bajos de 10^3 UFC/g para AT y 10^2 UFC/g para vacío; en este caso las bacterias logran permanecen viables en el medio por un tiempo mayor, mostrando mayor resistencia y adaptación al mismo.

De lo anterior podemos afirmar que las muestras impregnadas lograron mantener su viabilidad en el valor recomendado para ejercer su actividad bioprotectora (10^6 UFC/g), hasta el día 10 de almacenamiento a 25°C en AT y hasta el día 20 en vacío para *L.casei* y *L.sakei*.

Estos resultados son interesantes, teniendo en cuenta que las muestras se almacenaron a temperatura ambiente (25°C), en comparación con otras investigaciones como estudios de la población de *L.rham.GC*, en manzana permaneció alrededor de 10^7 UFC/g durante 28 días a 5° y 10°C (Alegre *et al.*, 2011), *L.rham GC* permaneció viable en el valor inicial de impregnación por 10 días a 2-4°C (Rößle *et al.*, 2010), *L.casei* impregnado en Uchuva permaneció viable durante 15 días a 4°C, con recuentos de 10^9 UFC/100 g, (Marin *et al.*, 2010), en muestras rectangulares de mango *Tommy Atkins* impregnadas al vacío y almacenadas por 15 días a 4°C, *L.casei* permaneció con un recuento microbiológico de $6,4 \pm 0,1$ ciclos Log UFC/ 150 g mango fresco.

8.0 CONCLUSIONES

- De 7 cepas de bacterias ácido lácticas evaluadas, se evidenció que *L. sakei* y *L. casei* presentaron el mayor efecto inhibitorio frente a microorganismos patógenos y oportunistas, por lo cual fueron las más indicadas para la conservación de matrices de mango.
- Con la inclusión de la melaza de 20 gr/L como subproducto industrial en la formulación del medio de cultivo seleccionado para el desarrollo de los microorganismos protectores, se logró obtener viabilidades que se ajustan a inóculos masivos de 10^8 UFC/g para *L. casei* y 10^{10} UFC/g *L. sakei*; presentándose una alternativa de producción de medios de cultivo económicos que faciliten el desarrollo del proceso de impregnación.
- La impregnación de BAL (*L. casei* y *L. sakei*) ejerció un efecto protector del color en matrices de mango durante el almacenamiento a 25°C; siendo las muestras impregnadas con *L. sakei* las que mostraron mayor claridad y pureza de color (amarillo más vivo) durante el tiempo de almacenamiento.
- La presión de empaque en las muestras de mango influyó significativamente en los cambios globales de color, observándose que el empacado a presión a vacío presentó las menores pérdidas del color debido al retardo de la degradación oxidativa.
- La impregnación de BAL (*L. casei* y *L. sakei*) ejerció un efecto protector de la textura en matrices de mango durante el almacenamiento a 25°C, siendo las muestras impregnadas con *L. sakei* las que mostraron mayor firmeza. Con respecto al factor presión de empaque, se evidenció que a presión atmosférica la firmeza de las muestras fue mayor debido a que no se presentó una deformación inicial como ocurre con la aplicación de vacío.
- El carácter del mango como alimento funcional durante el almacenamiento a 25°C se limitó por la viabilidad de las bacterias ácido lácticas, observándose que los

microorganismos *L.sakei* y *L. casei* en empaque al vacío permanecieron viables por 20 días con recuentos de 10^6 UFC/g.

- La bioconservación de matrices de mango mediante el proceso de impregnación al vacío con microorganismos lácticos, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus sakei*, resultó ser una técnica efectiva para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y conservar características de calidad como el color y la textura. Por consiguiente, esta técnica es de gran interés en la comercialización de productos frescos con mayor valor agregado.

BIBLIOGRAFÍA

- Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Anguera, M. and Abadías, M. (2011), Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Food Microbiology*, Vol. 28, No. 1, pp. 59-66.
- Alvarado, J. R. (2012), *Situación actual y perspectivas de la cadena productiva del mango en Colombia*, Asociación Hortifrutícola de Colombia – Asohofrucol, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colombia
- Alzamora, S., Salvatori, D., Tapia, M., Lopez, A., Welti, J. and Fito, P. (2005), Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds, *Journal of Food Engineering*, Vol. 67, No. 1-2, pp. 205-214.
- Anino, S. V., Salvatori, D. M. and Alzamora, S. M. (2006), Changes in calcium level and mechanical properties of apple tissue due to impregnation with calcium salts. *Food Research International*, Vol. 39, No. 2, pp. 154-64.
- A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemists. (1997), *Official Methods of Analysis*, Horwitz, W. and Latimer, G. W. (Eds.), Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C.
- Arredondo, C., Pérez, A. and Villegas, V. (2007), Evaluación de la producción del hongo *Lentinula edodes* Pegler en bloques sintéticos a base de residuos agroindustriales. *Ingeniería y Ciencia*. Vol. 3, No. 6, pp. 23-29.
- Artés, F., Gómez, P., Aguayo, A., Escalona, V. and Artés-Hernández, F. (2009), Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 51, No. 3, pp. 287-296.
- Betancour, S. (2013), Influencia de las condiciones del proceso de fermentación con bacterias lácticas sobre las características nutricionales, físico-químicas y microbiológicas en masas elaboradas con QPM (Quality Protein Maize). Tesis Doctoral en Ingeniería énfasis Alimentos, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

- Betancour, S and Quintero, J. (2002), Diseño preliminar del proceso de producción de bacterias ácido lácticas productoras de ácido láctico y biocinas para la conservación y preservación de cárnicos marinos, Tesis de grado Ingeniería Química, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Betoret, E., Betoret, N., Rocculi, P. and Dalla, M. (2015), Strategies to improve food functionality: structure-property relationships on high pressures homogenization, vacuum impregnation and drying technologies, *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 46, No. 1, pp. 1-12.
- Betoret, N., Puente, L., Diaz, M., Pagan, M., Garcia, M., Gras, M., Martinez, J. and Fito, P. (2003), Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation, *Journal of Food Engineering*, Vol. 56, No. 2-3, pp. 273-277.
- Betoret, E., Sentandreu, E., Betoret, N., Codoñer-Franch, P., Valls-Bellés, V. and Fito, P. (2012), Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Vol. 16, pp. 298-304.
- Bolivar, E. J. and Rubiano, C. V. (2013), Preservación de rodajas de melón cantaloupe (*Cucumis melo*) impregnados con *Lactobacillus platarum* (JCM 1149) y secados con secador asistido por bomba de calor. Tesis de grado Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle, Colombia.
- Chiralt, A., Martínez, N., Martínez, J., Talens, P., Moraga, G., Ayala, A. and Fito, P. (2001), Changes in mechanical properties throughout osmotic processes cryoprotectant effect. *Journal of Food Engineering*, Vol. 49, No. 2-3, pp. 129-135.
- CODEX ALIMENTARIUS.(2005), Codex stan 184, Norma del Codex para el Mango.
- Collado, M., Meriluoto, J. and Salminen, S. (2007), Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: in vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiology Methods*, Vol. 71, No. 1, pp. 71-74.

- Cortés, M., Guardiola, L. and Pacheco, R. (2007), Aplicación de la ingeniería de matrices en el enriquecimiento de mango (var. Tommy Atkins) con calcio. *DYNA*, Vol. 74, No. 171, pp. 19-26.
- Cortes, M., Osorio, A. and García, E., (2007), Manzana deshidratada fortificada con vitamina E utilizando la ingeniería de matrices. *Vitae*, Vol. 14, No. 2, pp. 17-26.
- Crueger, W and Crueger, A. (1993), *Biotecnología: manual de microbiología industrial*, Editorial Acribia, Madrid..
- Dal Bello, F., Clarke, C. I., Ryan, L. A. M., Ulmer, H., Schober, T. J., Strom, K., Sjögren, H., Van Sinderen, D., Schnurer, J. and Arendt, E. K. (2007), Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7, *Journal of Cereal Science*, Vol. 45, No. 3, pp. 309–318.
- De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960), A medium for the cultivation of Lactobacilli, *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 23, No. 1, pp. 130-135.
- De Roissart, H. and Luquet, F. M. (1994), *Bacteries lactiques aspects fondamentaux et technologiques, volume 2*, Editorial Loriga, Francia.
- Djioua, T., Charles. F., Lopez-Lauri., F., Filgueiras, H., Coudret, A., Freire Jr, M., Ducamp-Collin, M. and Sallanon, H. (2009), Improving the storage of minimally processed mangoes (*Mangifera indica* L.) by hot water treatments. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 52, No. 2, pp. 221-226.
- Dorta, E., Lobo, M. G. and González, M. (2012), Using drying treatments to stabilize mango peel and seed: effect on antioxidant activity, *LWT - Food Science & Technology*, Vol. 45, No. 2, pp. 261-268.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956), Colorimetric method for determination of sugar and related substances, *Analytical chemistry*, Vol. 28, No. 3, pp. 350-356.

- Erihemu, Hironaka, K., Oda, Y. and Koaze, H. (2014), Iron enrichment of whole potato tuber by vacuum impregnation, *LWT-Food Science and Technology*, Vol. 59, No. 1, pp. 504-509.
- Fajardo, E. E. and Sarmiento, S. C. (2007), Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, Tesis de grado Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Fan, X., Niemera, B. and Prakash, A. (2008), Irradiation of fresh fruit and vegetables. *Food technology*, Vol. 62, No. 3, pp. 36-43.
- Fito, P. (1994) Modelling of vacuum osmotic dehydration of food. *Journal of Food Engineering*, Vol. 22, No. 1-4, pp. 313-328.
- Fito, P. and Pastor, R. (1993), Non diffusional mechanisms occurring during vacuum osmotic dehydration, *Journal of Food Engineering*, Vol. 21, No. 4, pp. 513-519.
- Fito, P., Andrés, A., Chiralt, A. and Pardo, P. (1996), Coupling of hydrodynamic mechanism and deformation-relaxation phenomena during vacuum treatments in solid porous food liquid systems, *Journal of Food Engineering*, Vol. 27, No. 3, pp. 229-240.
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret, N., Martínez-Monzó, J. and Gras, M. (1999), *Procedimiento de impregnación de alimentos naturales con productos nutracéuticos, y dispositivo para su puesta en práctica*, Patente española 2 169 640.
- Fito, P., Chiralt, A., Betoret N., Gras, M., Chfer, M., Martinez-Monzo, J., Andres, A. and Vidal, D. (2001), Vacuum impregnation and osmotic dehydration in matrix engineering: application in functional fresh food development, *Journal of Food Engineering*, Vol. 49, No. 2-3, pp. 175-83.
- Fuller, R. (1989), Probiotics in man and animals, *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 66, No. 5, pp. 365-378.
- Gerez, L. C., Torino, I. M., Rollan, G. and De Valdez, F. G. (2009), Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, Vol. 20, No. 2, pp. 144-148.

- Gibson, G. (2007), Functional foods: probiotics and prebiotics, *Culture*, Vol. 28, No.2, pp. 1-7.
- Giraldo, G. (2006), El efecto del tratamiento de impregnación a vacío en la respiración de frutas (manzana, fresa, melocotón y sandía) mínimamente procesadas. *Vitae*, Vol. 13, No. 2, pp. 21-25.
- Giraldo, G., Talens, P., Fito, P. and Chiralt, A. (2003), Influence of sucrose solution concentration on kinetics and yield during osmotic dehydration of mango, *Journal of Food Engineering*, Vol. 58, No. 1, pp. 33-43.
- Giraud, E. L., Gosselin, M. and Rimbault, M. (1993), Production of a *Lactobacillus plantarum* strain with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 62, No 1, pp. 77-82.
- González-Aguilar, G. A., Wang, C. Y. and Buta, J. G. (2000), Maintaining quality of fresh-cut mangoes using antibrowning agents and modified atmosphere packaging, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, No. 9, pp. 4204-4208.
- González, G., Ayala, F., Ruiz, S., Valenzuela, R. and Cuamea, F. (2004), Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados, presentado en el simposio: Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados en Iberoamérica, San José, Costa Rica, Abril.
- Guerrero-Beltrán, J., Swanson, B. and Barbosa-Cánovas, G. (2005), Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid, *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 38, No. 6, pp. 625-630.
- Guillemin, A., Degraeve, P., Noël, C. and Saurel, R. (2008), Influence of impregnation solution viscosity and osmolarity on solute uptake during vacuum impregnation of apple cubes (var. Granny Smith), *Journal of Food Engineering*, Vol. 86, No. 4, pp. 475-483.
- Helland H. S., Leufvén A., Bengtsson G. B., Pettersen M., K., Lea P. and Wold A. (2016), Storage of fresh-cut swede and turnip: effect of temperature, including sub-zero

temperature, and packaging material on sensory attributes, sugars and glucosinolates, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 111, pp. 370-379.

Hernández, A., Alfaro, I. and Arrieta, R. (2003), *Microbiología Industrial*. EUNED Editorial, Costa Rica.

Hoyos, J. and Carrera, J. (2004), Desarrollo de un complejo enzimático por fermentación de sustrato sólido con *Rhizopus niveus*, para la optimización de la producción de alcohol etílico a partir de melaza, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol. 2, No. 1, pp. 33-42.

IDEAM - Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. (2004), *Condiciones e indicadores ambientales en Colombia. Proyecciones en el corto, mediano y largo plazo: enero de 2004*, informe No. 108, Bogotá.

Igual, M., Castelló, M. L., Ortolá, M. D. and Andrés, A. (2008), Influence of vacuum impregnation on respiration rate, mechanical and optical properties of cut persimmon. *Journal of Food Engineering*, Vol. 86, No. 3, pp.315-323.

ICONTEC - Instituto Colombiano de Normas Técnicas. (1971), *Productos alimenticios métodos de ensayo*, primera actualización, NTC 440, Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Bogotá D.C.

ICONTEC - Instituto Colombiano De Normas Técnicas. (1997), *Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Reglas generales para el análisis microbiológico*, primera actualización, NTC 4092, Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Bogotá D.C.

ICONTEC - Instituto Colombiano De Normas Técnicas. (2003), *Frutas Frescas. Mango. Variedades Mejoradas. Especificaciones*, primera actualización, NTC 5210, Instituto Colombiano de Normas Técnicas, Bogotá D.C.

INVIMA - Instituto Nacional De Vigilancia De Medicamentos y Alimentos. (1997), *Decreto 3075 por la cual se reglamenta parcialmente la Ley 9 de 1979 y se dictan otras disposiciones*, Instituto Nacional De Vigilancia De Medicamentos y Alimentos, Bogotá D. C.

- Jiménez, P., Sibaja, M. and 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* aaa variedad Cavendish cultivar Gran naine) en Costa Rica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, Vol. 13, No. 2, pp. 52-59.
- Konica Minolta Sensing INC. (1998), *Precise Color Communication*, Minolta, Japon.
- Lee, M. A., Han, D.J., Jeong, J. Y., Choi, J. H., Choi, Y. S., Kim, H. Y., Paik, H. D. and Kim, C. J. (2008), Effect of kimchi powder level and drying methods on quality characteristics of breakfast sausage, *Meat Science*, Vol. 80, No. 3, pp. 708-714.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr A. L. and Randall, R. J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 193, No. 1, pp. 265-275.
- Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J. (2004), *Biología de los microorganismos*, décima edición. Pearson Educación, Madrid.
- Maldonado, N. C., Silva De Ruiz, C., Otero, M. C., Sesma, F. and Nader-Macias, M. E. (2011), Lactic acid bacteria isolated from young calves – Characterization and potential as probiotics, *Research in Veterinary Science*, Vol. 92, No. 2, pp. 342-349.
- Marin, Z. T., Cortes, M. and Montoya, O. I. (2010), Frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo ‘Colombia’ mínimamente procesados, adicionados con microorganismos probióticos utilizando la ingeniería de matrices, *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, Vol. 63, No. 1, pp. 5395-5407.
- Millán Trujillo, F. R., López Plá, S., Roa Tavera, V., Tapia, M. S and Cava, R. (2001), Estudio de la estabilidad microbiológica del melón (*Cucumis melo* L.) mínimamente procesado por impregnación al vacío, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Vol. 51, No. 2, pp.173-179.
- Morantes, P. C. (2014), Proceso de obtención de mango biofortificado con microorganismos probióticos mediante la técnica de impregnación a vacío. Tesis

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Mujica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Lopez-Malo, A., and Palou, E. (2003), Impregnation properties of some fruits at vacuum pressure, *Journal of Food Engineering*, Vol. 56, No. 4, pp. 307 - 314.

Oliveira, J. E., Moraes, E. A., Marconcini, J. M., Mattoso, L. H., Glenn, G. M., and 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*, Vol. 10, pp. 3672-3681.

OMS and FAO. (2003), *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. Serie de reporte tecnico No. 916, Genova.

Ortiz, C., Salvatori, D. M. and Alzamora, S. M. (2002), *Combined blanching and vacuum impregnation for enhancing calcium fortification in mushroom tissue*, presentado en 2002 IFT annual meeting. Anaheim, Junio.

Ossa, J. A., Vanegas, M. C. and Badillo, A. M. (2010), Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, Vol. 13, No. 1, pp. 97-104.

Ostos, S. L., Díaz, A. C. and Suarez, H. (2012), Evaluación de diferentes condiciones de proceso en la fortificación de Mango (Tommy Atkins) con Calcio mediante impregnación a vacío, *Revista Chilena de Nutrición*, Vol. 39, No. 2, pp. 181-190.

Ouwehand, A., Kirjavainen, P., Shortt, C. and Salminen, S. (1999), Probiotics: mechanisms and stabilised effect, *International Dairy Journal*, Vol. 9, pp. 43–52.

Parry, R. (Coordinador) (1995), *Envasado de los alimentos en atmósfera modificada*. Ediciones A. Madrid Vicente. Madrid, España.

Peleg, M. (1984), A note on the various strain measures at large compressive deformations, *Journal of Texture Studies*, Vol. 15, No. 4, pp. 317-326.

Prachyakij, P., Schnurer, J., Charennjiratrakul, W. and Kantachote, D. (2007), Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from

- fermented plant beverages, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, Vol. 29, No. 2, pp. 211-218.
- Prado, F., Parada, J., Pandey, A. and Soccol, C. (2008), Trends in non-dairy probiotic beverages, *Food Research International*, Vol. 41, No. 2, pp. 111–123.
- Puente, L. (2003), Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en la obtención de alimentos funcionales con contenido probiótico a partir de manzana, Tesis doctoral Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Rangel-Marrón, M. and López-Malo, A. (2012), Cambios en frutas tropicales frescas, cortadas y empacadas en atmósfera modificada durante su almacenamiento en refrigeración, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, Vol. 6, No 2, pp. 94-109.
- Ramirez, T. C. (2005), Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune, Tesis doctoral, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Raybaudi, R., Soliva, R. and Belloso, O. (2006), Uso de agentes antimicrobianos para la conservación de frutas frescas y frescas cortadas, *Proyecto XI.22 Desarrollo de tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados*, presentado en el I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, Brazil, Abril .
- Resolución 3929 (2013), Ministerio de Salud y Protección Social República de Colombia, 2 de Octubre de 2013, Bogotá.D.C.
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E. and Domeneghini, C. (2011), Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts, *Anaerobe*, Vol. 17, No. 3, pp. 97-105.
- Robles, M., Gorinstein, S., Martín, O., Astiazarán, H., González, G. and Cruz, R. (2007), Frutos tropicales mínimamente procesados: potencial antioxidante y su impacto en la salud, *Interciencia*, Vol. 32, No 4, pp. 227-232.

- Röbke, C., Auty, M., Brunton, N., Gormley, R. and Butler, F. (2010), Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Vol. 11, No. 1, pp. 203–209.
- Rodriguez, L., Bueno, G., Rodríguez, D. E., Delgado, G., Serrano, P. and Brizuela, M. A. (2003), True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics, in: Roussos, S., Soccol, C. R., Pandey, A. and Augur, C. (Eds.), *New Horizons Biotechnology*, Academic Publishers, Paisés Bajos..
- Ruíz, M. P. (2009), Aplicación de la ingeniería de matrices en el desarrollo de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) mínimamente procesados, fortificados con vitamina C, E y minerales calcio y zinc, Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Salvatori, D., A. Andrés, A. Chiralt and P. Fito. (1998), The response of some properties of fruits to vacuum impregnation, *Journal of Food Process Engineering*, Vol. 21, No. 1, pp. 59-73.
- Santacruz, Y. (2004), Impregnación de *Lactobacillus* en productos de manzana, Tesis de maestría en Biotecnología, Universidad de las Américas, Puebla, México.
- Sanz, Y. (2006), *Compuestos con actividad antifúngica producidos por Bifidobacterium spp.*, Patente española No, 070041 A2.
- Sathe, S. J., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P. K. and Kapadnis, B. P. (2007), Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables, *Journal of Applied Microbiology*, Vol.103, No. 6, pp. 2622–2628.
- Saxena, A., Bawa, A. S. and Raju, P. S. (2009), Phytochemical changes in fresh-cut jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) bulbs during modified atmosphere storage, *Food Chemistry*, Vol. 115, No. 4, pp. 1443-1449.
- Schillinger, U. (1990), Bacteriocins of lactic acid bacteria in *Biotechnology of Food Safety* (eds D.D. Bills and S. Kung), Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 55- 74.
- Schulze, B., Peth, S., Hubbermann, E. M. and Schwarz, K. (2012), The influence of vacuum impregnation on the fortification of apple parenchyma with quercetin

- derivatives in combination with pore structures X-ray analysis, *Journal of Food Engineering*, Vol. 109, No. 3, pp. 380-387.
- Settanni, L. and Corsetti, A. (2008), Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 121, No. 2, pp.123-138.
- Siddiq, M., Sogi, D. S. and Dolan, K. D. (2013), Antioxidant properties, total phenolics, and quality of fresh-cut 'Tommy Atkins' mangoes as affected by different pre-treatments, *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 53, No. 1, pp. 156-162.
- Stiles, J., Penkar, S., Plockova, N., Chumchalova, J. and Bullerman, L. B. (2002), Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*, *Journal of Food Protection*, Vol. 65, No. 7, pp. 1188–1191.
- Tagg, J.R., Mc Given, A. R. (1971), Assay sistem for bacteriocins, *Applied Microbiology*, Vol. 21, No. 5, pp. 943.
- Tejedor, W. (2005) HACCP: una herramienta para la industria de los vegetales frescos cortados, *Proyecto XI.22 Desarrollo de tecnologías para la conservación de vegetales frescos cortados*, presentado en el simposio Nuevas Tecnologías de Conservación y Envasado de Frutas y Hortalizas. Vegetales Frescos Cortados, La Habana, Cuba, Marzo.
- Torres, J. (2007), Optimización de las condiciones de operación de tratamientos osmóticos destinados al procesado mínimo de mango (*Mangifera indica* L.), Tesis doctoral de Tecnología de Alimentos, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Urribarrí, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z. and Ramones, E. (2004), Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica, FCV-LUZ*, Vol. 14, No. 4, pp. 297-302.
- Xie, J. and Zhao, Y. (2003a), Nutritional enrichment of fresh apple (Royal Gala) by vacuum impregnation. *International Journal of Food Science and Nutrition*, Vol. 54, No. 5, pp. 387-398.

- Yeo, S., Ewe, J., Sau-Chan, C., Tze, T. and Tze, M. (2011), Carriers of probiotic microorganisms, *Microbiology Monographs*, Vol. 21, pp. 191-220.
- Yimin, C., Puangpen, S., Premasuda, S. and Yoshimi, B., (1999), Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns, *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 45, No. 4, pp. 177-184.
- Zamora, R. L. (2003), Aislamiento, Identificación y Conservación de cultivos de Bacterias Lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero, Tesis doctoral, Universidad de Girona, Girona, España.

ANEXOS

ANEXO A. Análisis estadístico de datos

Tabla A1. Diseño de bloque al azar

Modelo Lineal General: %Humedad versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
Tratamiento	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
Empaque	fixed	2	AT. V
Tiempo	fixed	3	0. 30. 60

Análisis de Varianza for %Humedad, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamiento	3	26,625	26,625	8,875	2,02	0,120
Empaque	1	12,762	12,762	12,762	2,90	0,093
Tratamiento*Empaque	3	24,084	24,084	8,028	1,83	0,151
Tiempo	2	36,965	36,965	18,483	4,21	0,019
Error	62	272,392	272,392	4,393		
Total	71	372,828				

S = 2,09605

R-Sq = 26,94%

R-Sq(adj) = 16,33%

Modelo Lineal General: pH versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTOS	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	ATM. VACIO
Tiempo	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for pH, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTOS	3	0,80594	0,80594	0,26865	16,23	0,000
EMPAQUE	1	0,00003	0,00003	0,00003	0,00	0,967
TRATAMIENTOS*EMPAQUE	3	0,04173	0,04173	0,01391	0,84	0,474
Tiempo	6	7,28737	7,28737	1,21456	73,39	0,000
Error	154	2,54863	2,54863	0,01655		
Total	167	10,68369				

S = 0,128645

R-Sq = 76,14%

R-Sq(adj) = 74,13%

Modelo Lineal General: %Azúcares Totales versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	AT. VACIO
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for %Azucares Totales, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	365,77	365,77	121,92	9,83	0,000
EMPAQUE	1	23,64	23,64	23,64	1,91	0,171
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	43,57	43,57	14,52	1,17	0,325
TIEMPO	6	574,63	574,63	95,77	7,72	0,000
Error	98	1215,26	1215,26	12,40		
Total	111	2222,86				

S = 3,52144 R-Sq = 45,33% R-Sq(adj) = 38,08%

Modelo Lineal General: %Azucares Reductores versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	AT. VACIO
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for %Azucares Reductores, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	7,114	7,114	2,371	0,98	0,404
EMPAQUE	1	1,724	1,724	1,724	0,71	0,400
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	1,133	1,133	0,378	0,16	0,925
TIEMPO	6	426,785	426,785	71,131	29,48	0,000
Error	98	236,455	236,455	2,413		
Total	111	673,212				

S = 1,55332 R-Sq = 64,88% R-Sq(adj) = 60,22%

Modelo Lineal General: L* versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	AT. V
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for L, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	259,48	259,48	86,49	4,07	0,007
EMPAQUE	1	488,36	488,36	488,36	22,97	0,000
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	175,51	175,51	58,50	2,75	0,043
TIEMPO	6	2247,27	2247,27	374,54	17,62	0,000
Error	322	6845,21	6845,21	21,26		
Total	335	10015,84				

S = 4,61069 R-Sq = 31,66% R-Sq(adj) = 28,90%

Modelo Lineal General: C_{ab}* versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	AT. V
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for C*, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	136,19	136,19	45,40	1,94	0,123
EMPAQUE	1	778,10	778,10	778,10	33,28	0,000
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	112,56	112,56	37,52	1,60	0,188
TIEMPO	6	10255,99	10255,99	1709,33	73,10	0,000
Error	322	7529,19	7529,19	23,38		
Total	335	18812,03				

S = 4,83555 R-Sq = 59,98% R-Sq(adj) = 58,36%

Modelo Lineal General: h* versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	AT. V
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for h*, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	1184,29	1184,29	394,76	48,68	0,000
EMPAQUE	1	129,29	129,29	129,29	15,94	0,000
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	25,30	25,30	8,43	1,04	0,375
TIEMPO	6	1519,08	1519,08	253,18	31,22	0,000
Error	322	2611,44	2611,44	8,11		
Total	335	5469,40				

S = 2,84782 R-Sq = 52,25% R-Sq(adj) = 50,33%

Modelo Lineal General: Δ E versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. CASEI. FRESCO. SAKEI
EMPAQUE	fixed	2	AT. V
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for Delta E, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	1381,0	1381,0	460,3	18,65	0,000
EMPAQUE	1	551,9	551,9	551,9	22,36	0,000
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	690,4	690,4	230,1	9,32	0,000

TIEMPO	6	11320,9	11320,9	1886,8	76,44	0,000
Error	322	7948,0	7948,0	24,7		
Total	335	21892,2				

S = 4,96822 R-Sq = 63,69% R-Sq(adj) = 62,23%

Modelo Lineal General: Módulo de Elasticidad versus Tratamiento. Empaque. Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
TRATAMIENTO	fixed	4	CASA. Casei. Fresco. Sakei
EMPAQUE	fixed	2	AT. VACIO
TIEMPO	fixed	7	0. 10. 20. 30. 40. 50. 60

Analysis of Variance for Módulo de Elasticidad Ed, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
TRATAMIENTO	3	31586	31586	10529	12,82	0,000
EMPAQUE	1	10212	10212	10212	12,44	0,001
TRATAMIENTO*EMPAQUE	3	4236	4236	1412	1,72	0,165
TIEMPO	6	497015	497015	82836	100,88	0,000
Error	154	126456	126456	821		
Total	167	669505				

S = 28,6556 R-Sq = 81,11% R-Sq(adj) = 79,52%

Tabla A2. Análisis Postanova por el método de Tukey (Nivel de confianza al 95%). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes

Contenido de Humedad (%)	<table><tr><th>Tiempo</th><th>N</th><th>Media</th><th>Agrupación</th></tr><tr><td>30</td><td>24</td><td>83,8</td><td>A</td></tr><tr><td>60</td><td>24</td><td>83,0</td><td>A B</td></tr><tr><td>0</td><td>24</td><td>82,1</td><td>B</td></tr></table>	Tiempo	N	Media	Agrupación	30	24	83,8	A	60	24	83,0	A B	0	24	82,1	B	<table><caption>Main Effects Plot for %Humedad</caption><thead><tr><th>Tiempo</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>82,1</td></tr><tr><td>30</td><td>83,8</td></tr><tr><td>60</td><td>83,0</td></tr></tbody></table>	Tiempo	Mean	0	82,1	30	83,8	60	83,0																																													
Tiempo	N	Media	Agrupación																																																																				
30	24	83,8	A																																																																				
60	24	83,0	A B																																																																				
0	24	82,1	B																																																																				
Tiempo	Mean																																																																						
0	82,1																																																																						
30	83,8																																																																						
60	83,0																																																																						
pH	<table><tr><th>Tiempo</th><th>N</th><th>Media</th><th>Agrupación</th></tr><tr><td>0</td><td>24</td><td>3,9</td><td>A</td></tr><tr><td>30</td><td>24</td><td>3,9</td><td>A</td></tr><tr><td>50</td><td>24</td><td>3,7</td><td>B</td></tr><tr><td>20</td><td>24</td><td>3,5</td><td>C</td></tr><tr><td>10</td><td>24</td><td>3,4</td><td>C D</td></tr><tr><td>60</td><td>24</td><td>3,4</td><td>D</td></tr><tr><td>40</td><td>24</td><td>3,4</td><td>D</td></tr></table>	Tiempo	N	Media	Agrupación	0	24	3,9	A	30	24	3,9	A	50	24	3,7	B	20	24	3,5	C	10	24	3,4	C D	60	24	3,4	D	40	24	3,4	D	<table><caption>Main Effects Plot for pH</caption><thead><tr><th>Tratamientos</th><th>Empaque</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>CASA</td><td></td><td>3,48</td></tr><tr><td>CASEI</td><td></td><td>3,60</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td></td><td>3,65</td></tr><tr><td>SAKAI</td><td></td><td>3,62</td></tr><tr><td></td><td>ATM</td><td>3,60</td></tr><tr><td></td><td>VACIO</td><td>3,60</td></tr></tbody></table> <table><caption>Main Effects Plot for pH</caption><thead><tr><th>Tiempo</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>3,90</td></tr><tr><td>10</td><td>3,45</td></tr><tr><td>20</td><td>3,55</td></tr><tr><td>30</td><td>3,90</td></tr><tr><td>40</td><td>3,40</td></tr><tr><td>50</td><td>3,65</td></tr><tr><td>60</td><td>3,42</td></tr></tbody></table>	Tratamientos	Empaque	Mean	CASA		3,48	CASEI		3,60	FRESCO		3,65	SAKAI		3,62		ATM	3,60		VACIO	3,60	Tiempo	Mean	0	3,90	10	3,45	20	3,55	30	3,90	40	3,40	50	3,65	60	3,42
Tiempo	N	Media	Agrupación																																																																				
0	24	3,9	A																																																																				
30	24	3,9	A																																																																				
50	24	3,7	B																																																																				
20	24	3,5	C																																																																				
10	24	3,4	C D																																																																				
60	24	3,4	D																																																																				
40	24	3,4	D																																																																				
Tratamientos	Empaque	Mean																																																																					
CASA		3,48																																																																					
CASEI		3,60																																																																					
FRESCO		3,65																																																																					
SAKAI		3,62																																																																					
	ATM	3,60																																																																					
	VACIO	3,60																																																																					
Tiempo	Mean																																																																						
0	3,90																																																																						
10	3,45																																																																						
20	3,55																																																																						
30	3,90																																																																						
40	3,40																																																																						
50	3,65																																																																						
60	3,42																																																																						

Azúcares Totales (%)	<table><tr><td>TIEMPO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>0</td><td>16</td><td>23,4</td><td>A</td></tr><tr><td>30</td><td>16</td><td>20,7</td><td>A B</td></tr><tr><td>10</td><td>16</td><td>20,3</td><td>A B C</td></tr><tr><td>40</td><td>16</td><td>17,9</td><td>B C</td></tr><tr><td>20</td><td>16</td><td>17,4</td><td>B C</td></tr><tr><td>50</td><td>16</td><td>17,3</td><td>B C</td></tr><tr><td>60</td><td>16</td><td>16,7</td><td>C</td></tr></table>	TIEMPO	N	Media	Agrupación	0	16	23,4	A	30	16	20,7	A B	10	16	20,3	A B C	40	16	17,9	B C	20	16	17,4	B C	50	16	17,3	B C	60	16	16,7	C	Main Effects Plot for %Azucares Totales Fitted Means																																																																	
TIEMPO	N	Media	Agrupación																																																																																																
0	16	23,4	A																																																																																																
30	16	20,7	A B																																																																																																
10	16	20,3	A B C																																																																																																
40	16	17,9	B C																																																																																																
20	16	17,4	B C																																																																																																
50	16	17,3	B C																																																																																																
60	16	16,7	C																																																																																																
Azúcares Reductores (%)	<table><tr><td>TIEMPO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>30</td><td>16</td><td>10,0</td><td>A</td></tr><tr><td>20</td><td>16</td><td>8,6</td><td>A B</td></tr><tr><td>40</td><td>16</td><td>8,4</td><td>B</td></tr><tr><td>50</td><td>16</td><td>7,7</td><td>B C</td></tr><tr><td>10</td><td>16</td><td>6,4</td><td>C D</td></tr><tr><td>60</td><td>16</td><td>4,8</td><td>D E</td></tr><tr><td>0</td><td>16</td><td>4,3</td><td>E</td></tr></table>	TIEMPO	N	Media	Agrupación	30	16	10,0	A	20	16	8,6	A B	40	16	8,4	B	50	16	7,7	B C	10	16	6,4	C D	60	16	4,8	D E	0	16	4,3	E	Main Effects Plot for %Azucares Reductores Fitted Means																																																																	
TIEMPO	N	Media	Agrupación																																																																																																
30	16	10,0	A																																																																																																
20	16	8,6	A B																																																																																																
40	16	8,4	B																																																																																																
50	16	7,7	B C																																																																																																
10	16	6,4	C D																																																																																																
60	16	4,8	D E																																																																																																
0	16	4,3	E																																																																																																
Luminosidad (L*).	<table><tr><td>TRATAMIENTO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>84</td><td>32,1</td><td>A</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>84</td><td>32,1</td><td>A</td></tr><tr><td>CASA</td><td>84</td><td>30,8</td><td>A B</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>84</td><td>30,0</td><td>B</td></tr></table> <table><tr><td>TRATAMIENTO</td><td>EMPAQUE</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>V</td><td>42</td><td>34,4</td><td>A</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>V</td><td>42</td><td>33,2</td><td>A B</td></tr><tr><td>CASA</td><td>V</td><td>42</td><td>32,0</td><td>A B C</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>AT</td><td>42</td><td>31,1</td><td>B C</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>V</td><td>42</td><td>30,3</td><td>B C</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>AT</td><td>42</td><td>29,7</td><td>C</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>AT</td><td>42</td><td>29,7</td><td>C</td></tr><tr><td>CASA</td><td>AT</td><td>42</td><td>29,6</td><td>C</td></tr></table> <table><tr><td>TIEMPO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>0</td><td>48</td><td>35,2</td><td>A</td></tr><tr><td>10</td><td>48</td><td>34,3</td><td>A</td></tr><tr><td>30</td><td>48</td><td>31,5</td><td>B</td></tr><tr><td>20</td><td>48</td><td>31,3</td><td>B</td></tr><tr><td>40</td><td>48</td><td>29,9</td><td>B</td></tr><tr><td>50</td><td>48</td><td>29,5</td><td>B C</td></tr><tr><td>60</td><td>48</td><td>27,1</td><td>C</td></tr></table>	TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación	SAKEI	84	32,1	A	CASEI	84	32,1	A	CASA	84	30,8	A B	FRESCO	84	30,0	B	TRATAMIENTO	EMPAQUE	N	Media	Agrupación	CASEI	V	42	34,4	A	SAKEI	V	42	33,2	A B	CASA	V	42	32,0	A B C	SAKEI	AT	42	31,1	B C	FRESCO	V	42	30,3	B C	FRESCO	AT	42	29,7	C	CASEI	AT	42	29,7	C	CASA	AT	42	29,6	C	TIEMPO	N	Media	Agrupación	0	48	35,2	A	10	48	34,3	A	30	48	31,5	B	20	48	31,3	B	40	48	29,9	B	50	48	29,5	B C	60	48	27,1	C	Main Effects Plot for L Fitted Means
TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación																																																																																																
SAKEI	84	32,1	A																																																																																																
CASEI	84	32,1	A																																																																																																
CASA	84	30,8	A B																																																																																																
FRESCO	84	30,0	B																																																																																																
TRATAMIENTO	EMPAQUE	N	Media	Agrupación																																																																																															
CASEI	V	42	34,4	A																																																																																															
SAKEI	V	42	33,2	A B																																																																																															
CASA	V	42	32,0	A B C																																																																																															
SAKEI	AT	42	31,1	B C																																																																																															
FRESCO	V	42	30,3	B C																																																																																															
FRESCO	AT	42	29,7	C																																																																																															
CASEI	AT	42	29,7	C																																																																																															
CASA	AT	42	29,6	C																																																																																															
TIEMPO	N	Media	Agrupación																																																																																																
0	48	35,2	A																																																																																																
10	48	34,3	A																																																																																																
30	48	31,5	B																																																																																																
20	48	31,3	B																																																																																																
40	48	29,9	B																																																																																																
50	48	29,5	B C																																																																																																
60	48	27,1	C																																																																																																

Croma (C_{ab}[*]).	<table><tr><td>EMPAQUE</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>V</td><td>168</td><td>28,3</td><td>A</td></tr><tr><td>AT</td><td>168</td><td>25,3</td><td>B</td></tr></table> <table><tr><td>TIEMPO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>0</td><td>48</td><td>36,3</td><td>A</td></tr><tr><td>10</td><td>48</td><td>34,4</td><td>A</td></tr><tr><td>30</td><td>48</td><td>24,3</td><td>B</td></tr><tr><td>20</td><td>48</td><td>24,2</td><td>B</td></tr><tr><td>50</td><td>48</td><td>23,7</td><td>B C</td></tr><tr><td>40</td><td>48</td><td>23,3</td><td>B C</td></tr><tr><td>60</td><td>48</td><td>21,2</td><td>C</td></tr></table>	EMPAQUE	N	Media	Agrupación	V	168	28,3	A	AT	168	25,3	B	TIEMPO	N	Media	Agrupación	0	48	36,3	A	10	48	34,4	A	30	48	24,3	B	20	48	24,2	B	50	48	23,7	B C	40	48	23,3	B C	60	48	21,2	C	Main Effects Plot for C* Fitted Means <table><caption>TRATAMIENTO</caption><thead><tr><th>TRATAMIENTO</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>CASA</td><td>25.5</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>27.0</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>26.5</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>27.5</td></tr></tbody></table><table><caption>EMPAQUE</caption><thead><tr><th>EMPAQUE</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>AT</td><td>25.0</td></tr><tr><td>V</td><td>28.0</td></tr></tbody></table><table><caption>TIEMPO</caption><thead><tr><th>TIEMPO</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>36.5</td></tr><tr><td>10</td><td>34.5</td></tr><tr><td>20</td><td>24.0</td></tr><tr><td>30</td><td>24.0</td></tr><tr><td>40</td><td>23.5</td></tr><tr><td>50</td><td>23.5</td></tr><tr><td>60</td><td>21.5</td></tr></tbody></table>	TRATAMIENTO	Mean	CASA	25.5	CASEI	27.0	FRESCO	26.5	SAKEI	27.5	EMPAQUE	Mean	AT	25.0	V	28.0	TIEMPO	Mean	0	36.5	10	34.5	20	24.0	30	24.0	40	23.5	50	23.5	60	21.5																				
EMPAQUE	N	Media	Agrupación																																																																																															
V	168	28,3	A																																																																																															
AT	168	25,3	B																																																																																															
TIEMPO	N	Media	Agrupación																																																																																															
0	48	36,3	A																																																																																															
10	48	34,4	A																																																																																															
30	48	24,3	B																																																																																															
20	48	24,2	B																																																																																															
50	48	23,7	B C																																																																																															
40	48	23,3	B C																																																																																															
60	48	21,2	C																																																																																															
TRATAMIENTO	Mean																																																																																																	
CASA	25.5																																																																																																	
CASEI	27.0																																																																																																	
FRESCO	26.5																																																																																																	
SAKEI	27.5																																																																																																	
EMPAQUE	Mean																																																																																																	
AT	25.0																																																																																																	
V	28.0																																																																																																	
TIEMPO	Mean																																																																																																	
0	36.5																																																																																																	
10	34.5																																																																																																	
20	24.0																																																																																																	
30	24.0																																																																																																	
40	23.5																																																																																																	
50	23.5																																																																																																	
60	21.5																																																																																																	
Tono (h_{ab}[*]).	<table><tr><td>TRATAMIENTO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>84</td><td>82,0</td><td>A</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>84</td><td>81,5</td><td>A</td></tr><tr><td>CASA</td><td>84</td><td>80,0</td><td>B</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>84</td><td>77,2</td><td>C</td></tr></table> <table><tr><td>EMPAQUE</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>V</td><td>168</td><td>80,8</td><td>A</td></tr><tr><td>AT</td><td>168</td><td>79,6</td><td>B</td></tr></table> <table><tr><td>TIEMPO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>0</td><td>48</td><td>83,8</td><td>A</td></tr><tr><td>10</td><td>48</td><td>82,6</td><td>A</td></tr><tr><td>20</td><td>48</td><td>79,8</td><td>B</td></tr><tr><td>50</td><td>48</td><td>79,8</td><td>B</td></tr><tr><td>40</td><td>48</td><td>79,5</td><td>B</td></tr><tr><td>30</td><td>48</td><td>78,7</td><td>B C</td></tr><tr><td>60</td><td>48</td><td>77,0</td><td>C</td></tr></table>	TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación	SAKEI	84	82,0	A	CASEI	84	81,5	A	CASA	84	80,0	B	FRESCO	84	77,2	C	EMPAQUE	N	Media	Agrupación	V	168	80,8	A	AT	168	79,6	B	TIEMPO	N	Media	Agrupación	0	48	83,8	A	10	48	82,6	A	20	48	79,8	B	50	48	79,8	B	40	48	79,5	B	30	48	78,7	B C	60	48	77,0	C	Main Effects Plot for h* Fitted Means <table><caption>TRATAMIENTO</caption><thead><tr><th>TRATAMIENTO</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>CASA</td><td>79.5</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>81.5</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>76.5</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>82.0</td></tr></tbody></table><table><caption>EMPAQUE</caption><thead><tr><th>EMPAQUE</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>AT</td><td>79.5</td></tr><tr><td>V</td><td>80.5</td></tr></tbody></table><table><caption>TIEMPO</caption><thead><tr><th>TIEMPO</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>83.5</td></tr><tr><td>10</td><td>82.5</td></tr><tr><td>20</td><td>79.5</td></tr><tr><td>30</td><td>78.5</td></tr><tr><td>40</td><td>79.5</td></tr><tr><td>50</td><td>79.5</td></tr><tr><td>60</td><td>77.0</td></tr></tbody></table>	TRATAMIENTO	Mean	CASA	79.5	CASEI	81.5	FRESCO	76.5	SAKEI	82.0	EMPAQUE	Mean	AT	79.5	V	80.5	TIEMPO	Mean	0	83.5	10	82.5	20	79.5	30	78.5	40	79.5	50	79.5	60	77.0
TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación																																																																																															
SAKEI	84	82,0	A																																																																																															
CASEI	84	81,5	A																																																																																															
CASA	84	80,0	B																																																																																															
FRESCO	84	77,2	C																																																																																															
EMPAQUE	N	Media	Agrupación																																																																																															
V	168	80,8	A																																																																																															
AT	168	79,6	B																																																																																															
TIEMPO	N	Media	Agrupación																																																																																															
0	48	83,8	A																																																																																															
10	48	82,6	A																																																																																															
20	48	79,8	B																																																																																															
50	48	79,8	B																																																																																															
40	48	79,5	B																																																																																															
30	48	78,7	B C																																																																																															
60	48	77,0	C																																																																																															
TRATAMIENTO	Mean																																																																																																	
CASA	79.5																																																																																																	
CASEI	81.5																																																																																																	
FRESCO	76.5																																																																																																	
SAKEI	82.0																																																																																																	
EMPAQUE	Mean																																																																																																	
AT	79.5																																																																																																	
V	80.5																																																																																																	
TIEMPO	Mean																																																																																																	
0	83.5																																																																																																	
10	82.5																																																																																																	
20	79.5																																																																																																	
30	78.5																																																																																																	
40	79.5																																																																																																	
50	79.5																																																																																																	
60	77.0																																																																																																	
Diferencia de color (ΔE).	<table><tr><td>TRATAMIENTO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>84</td><td>15,1</td><td>A</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>84</td><td>14,8</td><td>A</td></tr><tr><td>CASA</td><td>84</td><td>13,3</td><td>A</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>84</td><td>10,0</td><td>B</td></tr></table> <table><tr><td>EMPAQUE</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>AT</td><td>168</td><td>14,5</td><td>A</td></tr><tr><td>V</td><td>168</td><td>12,0</td><td>B</td></tr></table> <table><tr><td>TIEMPO</td><td>N</td><td>Media</td><td>Agrupación</td></tr><tr><td>60</td><td>48</td><td>19,7</td><td>A</td></tr><tr><td>50</td><td>48</td><td>16,1</td><td>B</td></tr><tr><td>40</td><td>48</td><td>15,1</td><td>B C</td></tr><tr><td>30</td><td>48</td><td>15,0</td><td>B C</td></tr><tr><td>20</td><td>48</td><td>14,9</td><td>B C</td></tr><tr><td>10</td><td>48</td><td>12,1</td><td>C</td></tr><tr><td>0</td><td>48</td><td>0,0</td><td>D</td></tr></table>	TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación	FRESCO	84	15,1	A	CASEI	84	14,8	A	CASA	84	13,3	A	SAKEI	84	10,0	B	EMPAQUE	N	Media	Agrupación	AT	168	14,5	A	V	168	12,0	B	TIEMPO	N	Media	Agrupación	60	48	19,7	A	50	48	16,1	B	40	48	15,1	B C	30	48	15,0	B C	20	48	14,9	B C	10	48	12,1	C	0	48	0,0	D	Main Effects Plot for Delta E Fitted Means <table><caption>TRATAMIENTO</caption><thead><tr><th>TRATAMIENTO</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>CASA</td><td>13.5</td></tr><tr><td>CASEI</td><td>14.5</td></tr><tr><td>FRESCO</td><td>15.0</td></tr><tr><td>SAKEI</td><td>10.0</td></tr></tbody></table><table><caption>EMPAQUE</caption><thead><tr><th>EMPAQUE</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>AT</td><td>14.5</td></tr><tr><td>V</td><td>12.0</td></tr></tbody></table><table><caption>TIEMPO</caption><thead><tr><th>TIEMPO</th><th>Mean</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>0.0</td></tr><tr><td>10</td><td>12.0</td></tr><tr><td>20</td><td>14.5</td></tr><tr><td>30</td><td>14.5</td></tr><tr><td>40</td><td>14.5</td></tr><tr><td>50</td><td>15.5</td></tr><tr><td>60</td><td>19.5</td></tr></tbody></table>	TRATAMIENTO	Mean	CASA	13.5	CASEI	14.5	FRESCO	15.0	SAKEI	10.0	EMPAQUE	Mean	AT	14.5	V	12.0	TIEMPO	Mean	0	0.0	10	12.0	20	14.5	30	14.5	40	14.5	50	15.5	60	19.5
TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación																																																																																															
FRESCO	84	15,1	A																																																																																															
CASEI	84	14,8	A																																																																																															
CASA	84	13,3	A																																																																																															
SAKEI	84	10,0	B																																																																																															
EMPAQUE	N	Media	Agrupación																																																																																															
AT	168	14,5	A																																																																																															
V	168	12,0	B																																																																																															
TIEMPO	N	Media	Agrupación																																																																																															
60	48	19,7	A																																																																																															
50	48	16,1	B																																																																																															
40	48	15,1	B C																																																																																															
30	48	15,0	B C																																																																																															
20	48	14,9	B C																																																																																															
10	48	12,1	C																																																																																															
0	48	0,0	D																																																																																															
TRATAMIENTO	Mean																																																																																																	
CASA	13.5																																																																																																	
CASEI	14.5																																																																																																	
FRESCO	15.0																																																																																																	
SAKEI	10.0																																																																																																	
EMPAQUE	Mean																																																																																																	
AT	14.5																																																																																																	
V	12.0																																																																																																	
TIEMPO	Mean																																																																																																	
0	0.0																																																																																																	
10	12.0																																																																																																	
20	14.5																																																																																																	
30	14.5																																																																																																	
40	14.5																																																																																																	
50	15.5																																																																																																	
60	19.5																																																																																																	

