

# Aislamiento y caracterización de *Acetobacter aceti* a partir de mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) y su aplicación en la agroindustria

Roxana García Culqui<sup>1</sup>; Lady Guevara Narváez<sup>2</sup>; Angélica Tigre León<sup>3</sup>; Michael Hachi Pazmiño<sup>4</sup>; Patricio Pérez Pérez<sup>5</sup>; Favián Bayas Morejón<sup>6</sup>

## Resumen

En Ecuador, el cacao es un cultivo clave, especialmente las variedades CCN-51 y Nacional, apreciadas por su aroma. La producción genera residuos como el mucílago, considerado desecho, pero con potencial de aprovechamiento. La fermentación es esencial en la postcosecha, donde microorganismos transforman azúcares del mucílago en compuestos que mejoran el sabor. Esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *Acetobacter aceti* a partir del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.), con el fin de optimizar el proceso de fermentación, en colaboración con Choco Warmi y con el apoyo financiero de la Fundación Maquita. Se evaluó el potencial de estas bacterias en aplicaciones agroindustriales, particularmente en la mejora de procesos fermentativos. El mucílago de la variedad Nacional presentó un pH de 4.20, acidez de 0.0128 meq NaOH/100 g, 18 °Brix y 81.54 % de humedad, mientras que la variedad CCN-51 mostró un pH de 3.83, acidez de 0.0106, 18.3 °Brix y 76.06 % de humedad. Se identificaron bacterias del género *Acetobacter* capaces de crecer en medio GYC suplementado con natamicina. Los análisis demostraron diferencias significativas en el crecimiento bacteriano entre ambas variedades de cacao. La cinética de crecimiento fue evaluada mediante el modelo de Gompertz, obteniéndose un rendimiento de liofilización del 6.66 %. El medio GYC con natamicina favoreció el crecimiento de *Acetobacter* en la variedad Nacional, alcanzando 110 UFC/mL a 30 °C. Los aislados fueron Gram negativos, aerobios, y la liofilización resultó eficaz para su preservación.

**Palabras clave:** Aislamiento, Caracterización, *Acetobacter aceti*, Mucílago de cacao, Agroindustria.

## Isolation and characterization of *Acetobacter aceti* from cocoa mucilage (*Theobroma cacao* L.) and its application in agroindustry

### Abstract

In Ecuador, cacao is a key crop, particularly the CCN-51 and Nacional varieties, renowned for their aroma. Cacao production generates by-products such as mucilage, typically considered waste, yet it holds potential for value-added applications. Fermentation is a crucial post-harvest step, during which microorganisms convert mucilage sugars into compounds that enhance flavor. This study aimed to isolate and characterize *Acetobacter aceti* strains from cacao mucilage (*Theobroma cacao* L.) to optimize the fermentation process, in collaboration with Choco Warmi and with financial support from Fundación Maquita. The agroindustrial potential of these bacteria was evaluated, particularly in improving fermentative processes. Mucilage from the Nacional variety exhibited a pH of 4.20, acidity of 0.0128 meq NaOH/100 g, 18 °Brix, and 81.54% moisture content, whereas the CCN-51 variety showed a pH of 3.83, acidity of 0.0106, 18.3 °Brix, and 76.06% moisture. *Acetobacter* strains capable of growing in GYC medium supplemented with natamycin were identified. Significant differences in bacterial growth were observed between the two cacao varieties. Growth kinetics were assessed using the Gompertz model, with a lyophilization yield of 6.66%. GYC medium with natamycin promoted the growth of *Acetobacter* in the Nacional variety, reaching 110 CFU/mL at 30 °C. The isolates were Gram-negative, aerobic, and lyophilization proved effective for their preservation.

**Keywords:** Isolation, Characterization, *Acetobacter aceti*, Cocoa mucilage, Agroindustry.

**Recibido:** 19 de diciembre de 2024

**Aceptado:** 13 de agosto de 2025

<sup>1</sup> Fondo Ecuatoriano Populorum Progressio, Regional Guaranda, CP:020110, Guaranda- Ecuador, roxanagarciaculqui@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0003-0011-166X>

<sup>2</sup> Fondo Ecuatoriano Populorum Progressio, Regional Guaranda, CP:020110, Guaranda- Ecuador, ladyanabelguevara@outlook.com, <https://orcid.org/0000-0002-8432-5739>

<sup>3</sup> Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Centro de Investigación en Microbiología Aplicada, Biotecnología y Fitoquímica (CIMABIF), CP:020150, Guaranda-Ecuador, rtigre@ueb.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0003-2984-9457>

<sup>4</sup> Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Centro de Investigación en Microbiología Aplicada, Biotecnología y Fitoquímica (CIMABIF), CP:020150, Guaranda-Ecuador, xhachi@ueb.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0002-4656-7593>

<sup>5</sup> Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Administrativas, Gestión Empresarial e Informática, CP: 020150, Guaranda, Ecuador, aperez@ueb.edu.ec, <https://orcid.org/0009-0000-0648-864X>

<sup>6</sup> Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Centro de Investigación en Microbiología Aplicada, Biotecnología y Fitoquímica (CIMABIF), CP:020150, Guaranda-Ecuador, fbayas@ueb.edu.ec, <https://orcid.org/0000-0003-2920-7155>

## I. INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos más importantes debido a su calidad y aroma distintivo, lo que le otorga una posición relevante en la economía nacional. Las principales zonas de producción están ubicadas en las provincias costeras y amazónicas, con variedades como el CCN-51, criollo y Nacional siendo las más destacadas. Estas variedades son apreciadas tanto a nivel nacional como internacional por el contenido de mucílago que rodea las almendras de cacao. Sin embargo, este mucílago, a pesar de sus cualidades, es considerado un residuo en la industria del cacao, lo que ha llevado a la búsqueda de métodos para su aprovechamiento en otros procesos productivos (Lara & Segarra, 2022; Olivares, 2022).

En 2021, Ecuador produjo aproximadamente 302,094 toneladas de cacao, lo que generó grandes cantidades de residuos. Se estima que el 56.2% de estos residuos son orgánicos, y el 43.8% son inorgánicos, lo que plantea un desafío ambiental significativo (Ministerio del Ambiente y Agua, 2020; SIPA, 2021a). La gestión adecuada de estos desechos, en particular el mucílago, podría contribuir tanto a la sostenibilidad ambiental como a mejorar los procesos de fermentación del cacao, optimizando su calidad (Calero, 2022; Olivares, 2022).

La fermentación del cacao es un proceso esencial en la postcosecha, pues permite que las almendras desarrollen los sabores y aromas característicos del chocolate. Durante la fermentación, los microorganismos, entre ellos levaduras, bacterias lácticas y acéticas, juegan un papel crucial al transformar los azúcares del mucílago en compuestos como etanol y ácido acético, que favorecen la formación de precursores del aroma y sabor del cacao (Paredes et al., 2022). Este proceso involucra múltiples etapas microbianas que incluyen la acción de levaduras como *Pichia kudriavzevii* y *Saccharomyces cerevisiae*, seguidas por bacterias lácticas como *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*, y finalmente bacterias acéticas como *Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans*, que convierten el etanol en ácido acético, descomponiendo el mucílago y mejorando la calidad de las almendras (Erazo, 2019).

La selección de bacterias presentes en el mucílago es una estrategia importante para comprender y controlar mejor el proceso de fermentación. Las bacterias

acéticas (BAA) se aíslan utilizando medios como el GYC y Carr, con el fin de identificar su impacto en el proceso fermentativo (Melgaço et al., 2018; Salazar, 2017; Rodríguez et al., 2023).

Este estudio se realizó en colaboración con la empresa chocolatera Choco Warmi, fundada en 2019 por un grupo de mujeres del recinto San Gerardo, en la provincia de Bolívar (Ecuador), quienes utilizan cacao seco para la producción artesanal de chocolate (Pérez et al., 2021). Además, este trabajo contó con el financiamiento de la Fundación Maquita y Ecosol, lo que permite profundizar en el conocimiento sobre los microorganismos que intervienen en la fermentación del cacao y su potencial para optimizar la calidad del producto final (Lange & Criollo, 2022).

La fermentación acética es un proceso bioquímico fundamental para la producción de ácido acético, un compuesto orgánico líquido, incoloro y de gran relevancia industrial. Este proceso se lleva a cabo mediante la fermentación de sustratos azucarados, como el mucílago de cacao, e involucra la oxidación del etanol generado previamente por levaduras y bacterias lácticas. Bajo condiciones aerobias, las bacterias acéticas principalmente del género *Acetobacter* transforman el etanol en ácido acético, etapa clave en la elaboración de vinagre y otros productos fermentados. Esta conversión representa un eslabón esencial en la cadena de valor de diversos procesos (Torres & Vera, 2019; Illescas, 2021).

Para aislar las bacterias acéticas, se utilizan medios de cultivo como el Agar Acetobacter, que contiene glucosa, extracto de levadura y carbonato de calcio. Sin embargo, a fin evitar el crecimiento de hongos y levaduras, se añade natamicina al medio. Además, el medio Carr modificado se utiliza para fomentar el crecimiento de *Acetobacter* en presencia de etanol, que inhibe el crecimiento de otras bacterias. El medio GYC, compuesto por glucosa, extracto de levadura y carbonato de calcio, también se emplea para identificar y aislar bacterias productoras de ácido acético (Dávalos, 2022; Wang, 2020).

El uso de bacterias acéticas no se limita a la producción de vinagre, ya que estas bacterias también están involucradas en la producción de alimentos fermentados como vinos, té de kombucha y otros productos agroindustriales. Además, su capacidad para producir celulosa las hace valiosas en la industria alimentaria y en la producción de biopolímeros (Lemus,

2020; Ricaurte, 2020; Dávalos, 2022).

La caracterización de las bacterias aisladas se realiza mediante pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa y rojo de metilo, las cuales permiten identificar sus propiedades metabólicas, evaluando funciones clave como la descomposición del peróxido de hidrógeno y la presencia de enzimas respiratorias (Duchi, 2022). La tinción de Gram también es esencial para clasificar las bacterias en gram-positivas o gram-negativas, lo que facilita su identificación y su manejo en procesos industriales (Fernández, 2022).

Por otro lado, el proceso de liofilización es fundamental para la conservación de las bacterias aisladas, permitiendo mantener sus propiedades metabólicas intactas a través de la eliminación de agua por desecación al vacío. Este método es ampliamente utilizado en la industria alimentaria para conservar productos fermentados y otros alimentos sensibles a la humedad (Ruiz, 2019).

Con este antecedente, el objetivo del presente estudio fue, aislar y caracterizar bacterias acéticas a partir del mucílago de cacao, lo que representa una oportunidad para optimizar el proceso de fermentación del cacao en la empresa Choco Warmi, a su vez mejoraría la calidad del chocolate producido.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta investigación, las muestras se recolectaron

en granjas del cantón Echeandía, específicamente del centro de acopio de cacao en el recinto San Gerardo

Las actividades de caracterización y aislamiento de las bacterias del género *Acetobacter spp.* presentes en el mucílago de cacao se realizaron en el laboratorio general de la Universidad Estatal de Bolívar.

El proceso de liofilización y viabilidad de las bacterias tuvo lugar en el laboratorio de Análisis de Alimentos y Fitoquímica y en el laboratorio de Bioquímica y Cromatografía del Vicerrectorado de Investigación y Vinculación.

### Factores en estudio

Se aplicó un diseño experimental que abordó la fase de recuperación y selección de bacterias fermentadoras del ácido acético presentes en el mucílago de cacao. El diseño utilizado fue AxBxC (2x2x2), con dos repeticiones por cada combinación. El Factor A se asoció a la variedad del cacao, con dos niveles (a1: CCN-51; a2: Nacional); el Factor B estuvo relacionado con la temperatura de incubación, con dos niveles (b1: 25 °C; b2: 30 °C) y el Factor C se refirió al medio de cultivo, con dos niveles (c1: Medio GYC + natamicina y c2: Medio Carr). La variable respuesta en este escenario fue el crecimiento (UFC/mL) de las bacterias aisladas del género *Acetobacter*, la combinación de factores para los tratamientos se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Combinación de tratamientos para el aislamiento del BAA

Tratamiento	Coeficiente	Niveles		
		Variedad de	T (°C)	Medio de cultivo
1	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	CCN - 51	25	Medio GYC + natamicina
2	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	CCN - 51	25	Medio Carr
3	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	CCN - 51	30	Medio GYC + natamicina
4	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub> c <sub>2</sub>	CCN - 51	30	Medio Carr
5	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	Nacional	25	Medio GYC + natamicina
6	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>2</sub>	Nacional	25	Medio Carr
7	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	Nacional	30	Medio GYC + natamicina
8	a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>2</sub>	Nacional	30	Medio Carr

### Manejo del experimento

#### Extracción de mucílago de cacao

El mucílago de cacao es una sustancia viscosa y blanquecina presente en varias partes de la almendra de cacao, considerada un residuo orgánico. El análisis de bacterias ácido-acéticas en el cacao implicó un proceso detallado que abarcó desde la cosecha hasta la

identificación bioquímica y la evaluación de la cinética de crecimiento de los microorganismos obtenidos

#### Recolección y selección de muestras de cacao:

Las muestras fueron recolectadas del centro de acopio del Recinto San Gerardo. El cacao fue cosechado

en función del grado de madurez, seleccionando mazorcas de cacao CCN-51, que presentaban un color rojizo, y mazorcas de la variedad Nacional, de color amarillo. En cuanto a la textura, ambas variedades presentaban una superficie rugosa pero suave. Posteriormente, se seleccionaron cuatro mazorcas de cada variedad. El peso promedio de las mazorcas de CCN-51 fue de 350 g, mientras que las mazorcas de la variedad Nacional pesaron un promedio de 272 g.

#### Preparación de las muestras

Las mazorcas de cacao se lavaron, cortaron y desgranaron manualmente, separando las almendras de la placenta. Luego, se extrajo el mucílago presionando 160 g de almendras de cada variedad: la CCN-51 produjo 100 mL, y la Nacional, 60 mL. El mucílago se almacenó en envases estériles para su análisis posterior.

#### Recuperación de bacterias ácido-acéticas:

El aislamiento de las bacterias se llevó a cabo utilizando dos tipos de medios de cultivo: Carr y GYC, siguiendo la normativa ISO 7218:2007.

**Medio de cultivo Carr:** El proceso inició con la recepción del mucílago de cacao, que fue diluido en agua estéril para ajustar la concentración de bacterias. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100  $\mu$ L de la muestra en placas con agar Carr, preparadas con extracto de levadura, agar, verde de bromocresol, natamicina y etanol, a pH 6,8. Las placas se sellaron y se incubaron a 25-30 °C, monitoreando el crecimiento bacteriano cada 24 horas

**Medio de cultivo GYC:** El mucílago de cacao se diluyó y se sembró en placas con el medio preparado con extracto de levadura, bactoagar, dextrosa, carbonato de calcio, etanol y natamicina. Al igual que con el medio Carr, las placas fueron selladas, etiquetadas y se incubaron a 25-30 °C, supervisando el crecimiento bacteriano.

#### Identificación bioquímica y microscópica

Las bacterias aisladas se sometieron a diversas pruebas bioquímicas y microscópicas para su identificación.

**Tinción de Gram:** Se utilizó para determinar si las bacterias eran grampositivas o gramnegativas.

**Prueba del rojo de metilo:** Se preparó el medio

RM-VP y se inoculó con las bacterias aisladas. Después de incubar a 30 °C por 24 horas, se añadió el indicador rojo de metilo. Un cambio de color a rojo indicaba un resultado positivo, mientras que la ausencia de cambio o un color amarillo señalaba un resultado negativo.

**Prueba de catalasa:** Se añadió peróxido de hidrógeno al portaobjetos que contenía la bacteria. La aparición de burbujas indicaba una reacción positiva, lo que sugería la presencia de la enzima catalasa.

**Prueba de oxidasa:** Utilizando tiras reactivas, se observó el cambio de color para identificar la actividad oxidasa. Un color azul indicaba una prueba oxidasa positiva.

#### Incremento de biomasa de bacterias ácido-acéticas

Para incrementar la biomasa de las bacterias, se empleó el medio *Acetobacter* agar, preparado con extracto de levadura, agar, glucosa y carbonato de calcio. Las bacterias aisladas se sembraron utilizando la técnica de agotamiento en placa. Las placas fueron selladas, etiquetadas e incubadas a 30 °C, monitoreando el crecimiento de las colonias.

#### Determinación de la cinética de crecimiento

Se preparó una solución estéril de agua salina (5%), la cual se utilizó para realizar diluciones seriadas de las muestras bacterianas. Las diluciones fueron sembradas en placas con medio para *Acetobacter* spp. (GYC). Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas, revisando las colonias cada 12 horas. Este proceso permitió observar el crecimiento de las bacterias a lo largo del tiempo.

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

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

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

$$N(t) = \frac{N_0}{1 + \frac{N_0 - N_{max}}{N_{max}} \cdot e^{-rt}}$$

**Donde:**

**n:** Número de generación; **t:** tiempo de incubación; **g:** tiempo generacional; **r:** Tasa de crecimiento; **N<sub>max</sub>:** Capacidad máxima de crecimiento; **N(t):** Población en el tiempo t; **N<sub>0</sub>:** Número inicial de microorganismos.

### Conservación de los aislados bacterianos

La conservación de los microorganismos se realizó mediante liofilización, un proceso que elimina el agua por congelación y sublimación a bajas presiones, evitando que los productos metabólicos bacterianos pasen a fase líquida. Para liofilizar bacterias de ácido láctico y acético, se siguieron pasos específicos establecidos en el laboratorio de investigación y vinculación.

### Viabilidad de las bacterias liofilizadas por espectrofotometría

Las bacterias liofilizadas de *Acetobacter* spp. se activaron en caldo nutriente, con caldos sin microorganismos usados como blancos. Se inocularon 0.05 g de aislados en 50 mL de caldo y se midió la absorbancia a 625 nm cada 3 horas durante 72 horas, incubando los medios a 30 °C.

### Análisis Estadístico

Para realizar los análisis de datos cuantitativos se utilizó programas estadísticos como Statgraphics mediante una estadística inferencial que se usa para probar hipótesis. Además, de programas básicos del paquete de office como Excel.

## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Características físico químicas del mucílago

Las bacterias ácido acéticas se aíslan del mucílago de cacao de la variedad Nacional, que presenta las siguientes características: pH de 4.20, acidez titulable de 0.0128 meq NaOH/100 g, grado Brix de 18, humedad

del 81.54% y contenido de cenizas del 1.29%. Según Santana et al. (2019), el mucílago de esta variedad tiene un pH de 3.57 y acidez titulable de 0.88. Jordan & Parra (2020) reportan un grado Brix de 17.40, humedad del 80.48% y cenizas del 2.15%.

En comparación, el mucílago de cacao CNN-51 tiene un pH de 3.83, acidez titulable de 0.0106 meq NaOH/100 g, grado Brix de 18.3, humedad del 76.06% y cenizas del 0.46%. Vera et al. (2023) obtuvieron un pH de 3.91 y un grado Brix de 16, mientras que Garcés (2021) reportó una humedad de 79.71% y Arreaga (2020) un contenido de cenizas del 0.40%. La metodología consistió en recolectar muestras de mucílago de cacao en el cantón Echeandía y realizar el aislamiento y caracterización de bacterias del género *Acetobacter* en laboratorios especializados. Se aplicó un diseño experimental AxBxC para evaluar factores como la variedad de cacao, temperatura de incubación y medio de cultivo. Las bacterias aisladas se analizaron bioquímicamente, y su crecimiento fue monitoreado y cuantificado para evaluar su viabilidad y rendimiento tras liofilización.

### Modelo experimental para las bacterias ácido acéticas

Para poder contabilizar el crecimiento de las colonias bacterianas ácido acéticas se realizó diluciones seriadas hasta la dilución: 10<sup>-6</sup>, donde hubo presencia de colonias aisladas.

### Aislamiento de *Acetobacter*

Tabla 2. Tratamientos para *Acetobacter*

Tratamiento	Variedad de cacao	T de incubación	Medio de cultivo	Crecimiento (UFC/mL)
1 R <sub>0</sub>	CCN-51	25	GYC+ natamicina	0
2 R <sub>0</sub>	CCN-51	25	Medio Carr	0
3 R <sub>0</sub>	CCN-51	30	GYC+ natamicina	0
4 R <sub>0</sub>	CCN-51	30	Medio Carr	0
5 R <sub>0</sub>	Nacional	25	GYC+ natamicina	50
6 R <sub>0</sub>	Nacional	25	Medio Carr	0
7 R <sub>0</sub>	Nacional	30	GYC+ natamicina	90
8 R <sub>0</sub>	Nacional	30	Medio Carr	0
1 R <sub>1</sub>	CCN-51	25	GYC+ natamicina	0
2 R <sub>1</sub>	CCN-51	25	Medio Carr	0
3 R <sub>1</sub>	CCN-51	30	GYC+ natamicina	0
4 R <sub>1</sub>	CCN-51	30	Medio Carr	0

5 R <sub>1</sub>	Nacional	25	GYC+ natamicina	30
6 R <sub>1</sub>	Nacional	25	Medio Carr	0
7 R <sub>1</sub>	Nacional	30	GYC+ natamicina	110
8 R <sub>1</sub>	Nacional	30	Medio Carr	0
1 R <sub>2</sub>	CCN-51	25	GYC+ natamicina	0
2 R <sub>2</sub>	CCN-51	25	Medio Carr	0
3 R <sub>2</sub>	CCN-51	30	GYC+ natamicina	0
4 R <sub>2</sub>	CCN-51	30	Medio Carr	0
5 R <sub>2</sub>	Nacional	25	GYC+ natamicina	25
6 R <sub>2</sub>	Nacional	25	Medio Carr	0
7 R <sub>2</sub>	Nacional	30	GYC+ natamicina	38
8 R <sub>2</sub>	Nacional	30	Medio Carr	0

La tabla 2 presenta la interacción entre variedad de cacao (CCN-51 y Nacional), temperatura de incubación y medios de cultivo, mostrando el crecimiento de *Acetobacter* en UFC/mL. En 0,0000001 mL de muestra hay 110 UFC, sin presencia en CCN-51. El análisis

estadístico evidencia diferencias significativas para "Variedad de cacao," "Medio de cultivo" e interacción AC (p=0,0001\*\*).

**Pruebas de múltiples rangos para crecimiento por medio de cultivo**

**Tabla 3.** Pruebas de rangos múltiples del Crecimiento por medio de cultivo para *Acetobacter*

Medio de cultivo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Medio Carr	12	0	4.02639	X
Medio GYC + natamicina	12	28.5833	4.02639	X

La Tabla 3 muestra un análisis LSD de Fisher, revelando una diferencia significativa de -28.5833 entre los medios de cultivo Carr y GYC + natamicina. Aunque Salazar (2017) recomendó Agar GYC para estas bacterias, Avendaño et al. (2021) observaron que aumentar la dextrosa en el medio AM favorece la

producción de ácido acético en *Acetobacter*. Rodríguez et al. (2023) sugirieron diluir el mucílago y sembrarlo en medio GYC, incubando a 30 ± 2 °C por 48 horas.

**Pruebas de múltiples rangos para crecimiento por variedad de cacao**

**Tabla 4.** Pruebas de rangos múltiples del Crecimiento por variedad de cacao para *Acetobacter*

Variedad de cacao	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Nacional	12	28.5833	4.02639	X
CCN - 51	12	0	4.02639	X

La Tabla 4 Se encontró una diferencia significativa de -28.5833 al comparar las variedades de cacao Nacional y CCN-51. Según Salazar (2017), se detectó la

presencia de *Acetobacter* en el mucílago fermentado del cacao Nacional o Chuncho, que se sembró en Agar GYC a 30°C durante 48 horas.



**Figura 1.** Gráfico de interacciones entre medio de cultivo y variedad de cacao *Acetobacter*

La Figura 1 muestra la interacción entre el tipo de medio de cultivo y la variedad de cacao, destacando un

mayor crecimiento en la variedad Nacional cuando se cultiva en el medio GYC + natamicina.

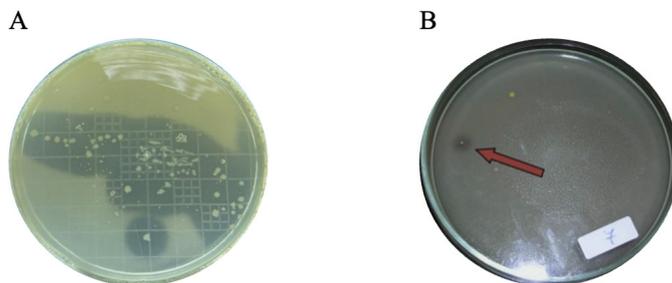


Figura 2. Dilución de *Acetobacter* A (Investigación) y B (Gerard, 2015)

La Figura 2 presenta las diluciones de *Acetobacter*, en donde la imagen de la placa A muestra un cultivo con una dilución de  $10^{-6}$  (R1 - A2B2C1), utilizando cacao Nacional en medio GYC a 30°C. Mientras que la imagen B, basada en el trabajo de Gerard (2015), muestra el aislamiento de BAA en medio GYC a la misma temperatura, analizando vinagres de fruta.

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

Los aislados bacterianos presentados a continuación, pertenecen a las cajas petri donde hubo presencia de bacterias con mayor crecimiento, las cuales se les sometió a pruebas bioquímicas y microscópicas de tinción de Gram.

Tabla 5. Identificación bioquímica de cepas aisladas BAA

Cepas aisladas	Tinción de Gram	Rojo de metilo	Catalasa	Oxidasa
R <sub>0</sub> - a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	-	+	-	-
R <sub>0</sub> - a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	-	-	+	-
R <sub>1</sub> - a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	-	-	+	-
R <sub>1</sub> - a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	-	+	+	-
R <sub>2</sub> - a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	-	-	-	-
R <sub>2</sub> - a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	-	-	-	-

**Nota:** En los análisis bioquímicos destinados a la identificación de BAL, se evidencia que la especie R<sub>1</sub> - a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>1</sub> satisface las especificaciones correspondientes para ser clasificada como una bacteria del género *Acetobacter* spp.

La Tabla 5 y la Figura 3 se evidencia que los aislados son Gram negativos bacilares. La prueba de rojo de metilo fue positiva, lo que indica que la bacteria realiza fermentación ácida mixta y produce ácido. La prueba de catalasa también fue positiva, evidenciando la

capacidad de descomponer peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lo que se manifestó con efervescencia. Sin embargo, la prueba de oxidasa fue negativa, indicando que la bacteria no produce esta enzima y, por lo tanto, no realiza respiración aeróbica.

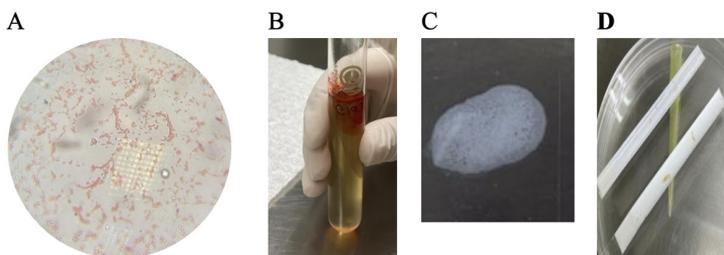


Figura 3. Identificación bioquímica de aisladas *Acetobacter* spp.

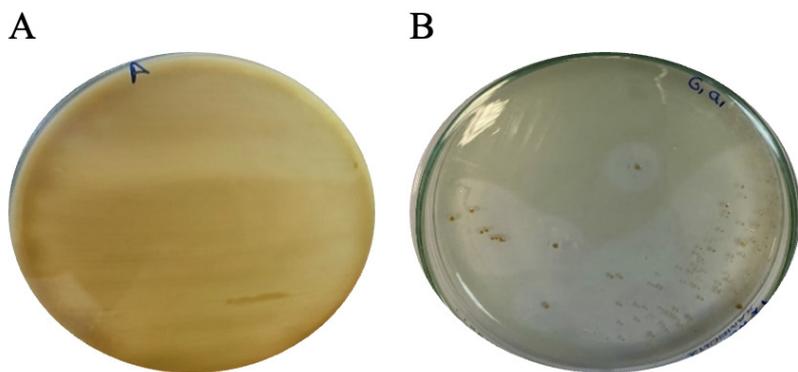
En la figura 3, Las imágenes A, B, C y D presentan los resultados de la investigación: tinción de Gram, prueba de rojo de metilo, prueba de catalasa y prueba de oxidasa, respectivamente. Según El-Askri et al. (2022), las bacterias acéticas de manzanas y uvas cultivadas en

medio GYC a 30 °C resultaron ser Gram negativas, con morfología en pares y cadenas. Rodríguez et al. (2023) y Duchi et al. (2023) confirmaron que *Acetobacter* sp. es Gram negativa, con colonias crema brillantes y puntiformes. Bioquímicamente, estas cepas son

catalasa positivas y oxidasa negativas, lo que indica un metabolismo aeróbico estricto.

**Incorporación de un sustrato con el propósito de potenciar el crecimiento de biomasa en las bacterias**

Al replicar bacterias *Acetobacter* spp., se sustituyó el agar GYC + natamicina por agar *Acetobacter*, el cual contenía una mayor cantidad de carbonato de calcio y glucosa. Esto resultó en una mayor abundancia de microorganismos, y se observó un aumento en su velocidad de crecimiento ver figura 4.



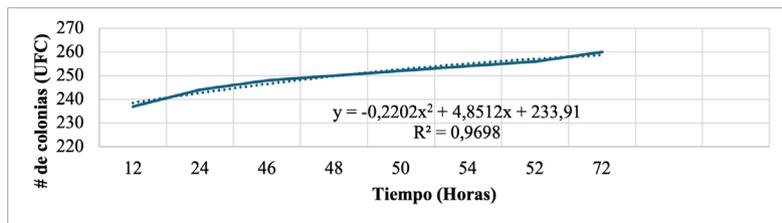
**Nota:** En la figura A, se observa la bacteria sembrada en *Acetobacter* agar, donde se evidencia un aumento de biomasa, mientras que, en la figura B la bacteria está sembrada en el agar GYC + natamicina.

**Figura 4.** Bacteria *Acetobacter* spp., en diferentes medios de cultivo

Kim et al. (2019) señalan que el agar *Acetobacter*, con altas concentraciones de glucosa y  $\text{CaCO}_3$ , favorece el crecimiento de bacterias ácido-acéticas (BAA) y limita el de otras especies. Orellana (2022) también usó este medio enriquecido, lo que incrementó la biomasa de BAA. Ricaurte (2020) reportó que el hongo de kombucha, con *Acetobacter aceti* y té verde, alcanzó 173.33 UFC/mL tras 96 horas.

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

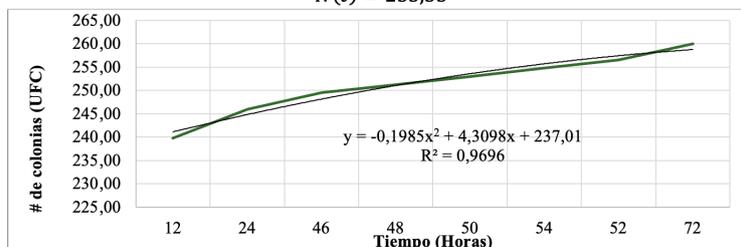
La cinética de crecimiento se realizó al aislado procedente de las condiciones de cultivo que resultaron ser mejores en la etapa de desarrollo de bacterias, en el cacao Nacional incubado a 30°C en medio *Acetobacter* agar. Para poder contabilizar las colonias fue necesario realizar diluciones con el 5% de NaCl en agua destilada, hasta la dilución  $10^{-3}$  donde se realizó el conteo de colonias.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento microbiano (*Acetobacter* spp.)

**Modelo matemático adaptado de Gompertz**

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



**Figura 6.** Cinética de crecimiento microbiano modelo matemático adaptado de Gompertz

La Figura 6 muestra la cinética de crecimiento de *Acetobacter* spp. según el modelo de Gompertz, donde la fase exponencial se extiende de las 12 a las 72 horas, sin observarse fases estacionarias ni de declive. Syed et al. (2020) también informaron que *Acetobacter xylinum* omitió la fase de latencia, iniciando directamente la fase exponencial desde el primer día hasta el día 12, manteniéndose luego en fase estacionaria sin una fase de declive evidente.

#### Uso de las bacterias liofilizadas en la agroindustria

Los aislados de *Acetobacter aceti* se emplea para la elaboración de té de kombucha, la cual es una bebida fermentada con un ligero sabor ácido, que presenta una vida útil prolongada sin perder sus características distintivas. Este té ofrece un potencial en el tratamiento de Síndrome metabólico y posee propiedades antiinflamatorias, hipoglucemiantes, antioxidantes y antihipertensivas (Ricaurte, 2020). Teniendo en cuenta a Núñez (2022), para la elaboración de vinagre a partir de naranja, es esencial fermentar la fruta y añadir la bacteria en una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, además, se requiere que el grado Brix de las naranjas esté en el rango de 8,3 – 9,4 y que la acidez titulable se encuentre entre 1,46 – 1,55.

#### IV. CONCLUSIONES

El medio GYC + natamicina resultó ser el más efectivo para el crecimiento de *Acetobacter* en la variedad de cacao Nacional, alcanzando 110 UFC/mL a 30 °C, mientras que el medio Carr no mostró crecimiento. La caracterización de los aislados reveló que eran Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos, lo que sugiere su capacidad aeróbica para producir ácido acético, útil en procesos agroindustriales.

La cinética de crecimiento de *Acetobacter* no presentó fase de adaptación ni muerte celular durante 72 horas, proporcionando información valiosa para la optimización de procesos industriales. Además, la liofilización demostró ser una técnica efectiva para la preservación de cepas de bacterias acéticas, con rendimientos consistentes que destacan su potencial para la conservación a largo plazo.

#### V. BIBLIOGRAFÍA

Avendaño, E., Oliveros, D., & Hilarión, W. (2021). La eliminación como un patrón fisiológico en los organis-

mos: el caso de la *Acetobacter*. *Mem. Congreso. Nac. Cienc. Biológicas*, 56(4), 244–246. [https://www.researchgate.net/profile/Edisson-Avendano-Rodriguez/publication/364277015\\_La\\_eliminacion\\_como\\_un\\_patron\\_fisiologico\\_en\\_los\\_organismos\\_el\\_caso\\_de\\_la\\_Acetobacter\\_-\\_ISSN\\_2500-7459\\_p244\\_-\\_246\\_vNA/links/64b64b42b9ed6874a52b9017/La-eliminacion-como-un-patron-fisiologico-en-los-organismos-el-caso-de-la-Acetobacter-ISSN-2500-7459-p244-246-vN-A.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Edisson-Avendano-Rodriguez/publication/364277015_La_eliminacion_como_un_patron_fisiologico_en_los_organismos_el_caso_de_la_Acetobacter_-_ISSN_2500-7459_p244_-_246_vNA/links/64b64b42b9ed6874a52b9017/La-eliminacion-como-un-patron-fisiologico-en-los-organismos-el-caso-de-la-Acetobacter-ISSN-2500-7459-p244-246-vN-A.pdf)

Calero, R. (2022). *Desarrollo de una aplicación móvil para determinar el grado de fermentación de los granos de cacao (theobroma cacao L.) aplicando técnicas de visión artificial basadas en deep learning* [Proyecto de Investigación]. Universidad Técnica de Cotopaxi.

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

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

Duchi, B., Flores, C., Salgado, I., & Sánchez, T. (2023). Microorganisms of agroindustrial use isolated from the soil of a primary forest of the Pungalá Parish in the Riobamba Canton. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3), 308–318. <https://dspace.esepoch.edu.ec:8080/server/api/core/bitstreams/319678f9-3cab-4e55-82db-71b531bb6b9d/content>

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

Erazo, C. (2019). *Diseño de un fermentador y secador*

- solar piloto, para dos variedades de cacao (*Theobroma cacao L.*), en el cantón el Empalme provincia Guayas. Universidad Internacional SEK. <https://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/3361>
- Fernández, S. (2022). *Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de ácido láctico (AL) a escala de planta piloto*. Universidad de Costa Rica. <https://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr/items/e1317a2b-c5ae-4940-bf28-55bfdeb7ca5e/full>
- Garcés, B. (2021). *Evaluación de las diferentes proporciones de mucílago de Cacao (*Theobroma cacao L.*) CCN-51 y jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) en la elaboración de jalea* [Universidad Nacional de Ucayali]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/fe293eaa-909d-4c48-b416-c5be38c2e996/content>
- Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas*. Universidad Politécnica de Valencia. <https://riunet.upv.es/entities/publication/1913388f-1782-44b4-80fc-451abd04be71>
- Illescas, L. (2021). *Elaboración de un vinagre a base de pomarrosa (*Syzgium jambos*) como una alternativa de consumo* [Universidad Agraria del Ecuador]. <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ILLES-CAS%20ANDRADE%20LISETTE%20ROCIO.pdf>
- Jordan, K., & Parra, M. del C. (2020). *Evaluación del mucílago de cacao (*Theobroma Cacao L.*) para la obtención de etanol de segunda generación*. Universidad Técnica de Machala.
- Kim, D.-H., Chon, J.-W., Kim, H., & Seo, K.-H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control*, 106, 0956–7135. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717>
- Lange, F., & Criollo, F. (2022). *Evaluación del aprovechamiento industrial del mucílago de cacao de la variedad ccn-51 y nacional a partir de su caracterización fisicoquímica*. Universidad de Guayaquil. <https://repositorio.ug.edu.ec/items/2d-7d1e15-d5d5-4944-a33e-21ee9ad175bf>
- Lara, K., & Segarra, M. (2022). *Propuesta de una bebida antioxidante a base de hojas y mucílago de *Theobroma cacao L.* fino de aroma*. Universidad de Guayaquil. <https://redi.cedia.edu.ec/document/299865>
- Lemus, S. (2020). *Optimización de un proceso de fermentación artesanal para elaboración de vinagre y estudio del inóculo empleado (Madre del vinagre)* [Ingeniería en Alimentos]. Universidad Autónoma de Puebla.
- Melgaço, A. C. C., Blohem Pessoa, W. F., Freire, H. P., Evangelista de Almeida, M., Santos Barbosa, M., Passos Rezende, R., Timenetsky, J., Miranda Marques, L., & Romano, C. C. (2018). Potential of Maintaining a Healthy Vaginal Environment by Two Lactobacillus Strains Isolated from Cocoa Fermentation. *Bio-Med Research International*, 2018, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2018/7571954>
- Ministerio del Ambiente y Agua. (2020, July 30). *Ambiente*. <https://www.ambiente.gob.ec/ecuador-impulsa-la-gestion-adecuada-de-residuos-organicos-en-las-ciudades/>
- Núñez, F. (2022). *Escalado de procesos fermentativos aerobios en biorreactores tipo tanque agitado: Escalado de la fermentación para la obtención de vinagre de naranja agria (*Citrus aurantium L.*) con *Acetobacter sp.** [Escuela Politécnica Nacional]. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/23098/1/CD%2012522.pdf>
- Olivares, W. (2022). *Propuesta de creación de empresa productora y comercializadora de jugo embotellado a base de mucílago de cacao*. [Universidad Católica De Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/19413/1/T-UCSG-PRE-ESP-IE-359.pdf>
- Orellana, A. (2022). *Aislamiento e identificación de microorganismos con interés agroindustrial a partir de muestras de suelo de bosques primarios del cantón Colta* [Escuela Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.espoche.edu.ec/bitstream/123456789/20237/1/96T00846.pdf>
- Paredes, N., Monteros-Altamirano, Á., Lima, L., Caice-

- do, C., Bastidas, S., Tinoco, L., Fernández, F., Vargas, Y., Pico, J., Subía, C., Burbano, A., Chanaluz, A., Sotomayor, D., Díaz, A., Intriago, J., Chancosa, C., Andrade, A., & Enríquez Geovanny. (2022). *Manual del cultivo de cacao sostenible para la Amazonía ecuatoriana* (1era ed.). Manual Nro. 125. <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5833>
- Pérez, M., Sampietro, M., Pazmiño, L., & Pulla, I. (2021). Bolívar 2021 Innova, Emprende, Produce. *Fundación Maquita - Prefectura de Bolívar - Universidad Estatal de Bolívar*, 1–52.
- Ramos, N. (2024). *Concentración de Acetobacter Aceti a diferente temperatura para la elaboración de vinagre de frambuesa (Rubus Idaeus) evaluando sus características fisicoquímicas* [Universidad Nacional de Cajamarca]. <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/6348>
- Ricaurte, A. (2020). *Determinación de la viabilidad del Acetobacter Aceti y Saccharomyces Cerevisiae presentes en el Medusomyces Gisevi (hongo kombucha) para una posible aplicación en la agroindustria, mediante la utilización de tres sustratos* [Escuela Superior Politécnica De Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/15506/1/27T00457.pdf>
- Rodríguez, L., Sánchez, D., Espinosa, M., & Coronado, R. (2023). Caracterización microbiológica, sensorial y bromatológica de la fermentación de cacao en los genotipos CCN 51 E ICS 95. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 22, 1–19. [https://www.researchgate.net/publication/376537514\\_Caracterizacion\\_microbiologica\\_sensorial\\_y\\_bromatologica\\_de\\_la\\_fermentacion\\_de\\_cacao\\_en\\_los\\_genotipos\\_CCN\\_51\\_E\\_ICS\\_95](https://www.researchgate.net/publication/376537514_Caracterizacion_microbiologica_sensorial_y_bromatologica_de_la_fermentacion_de_cacao_en_los_genotipos_CCN_51_E_ICS_95)
- Ruiz, M. (2019). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas con actividad inhibitoria de bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos*. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/103805>
- Salazar, L. (2017). *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao L. De la variedad "Chuncho" obtenida en Cuzco*, Perú [Universidad Peruana Cayetano Heredia]. [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1436/Aislamiento\\_SalazarAlvarez\\_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/1436/Aislamiento_SalazarAlvarez_Lilian.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Santana, P., Vera, J., Vallejo, C., & Álvarez, A. (2019). Mucílago de cacao, Nacional y Trinitario para la obtención de una bebida hidratante. *Universidad Ciencia Y Tecnología*, 4.
- Syed, S., Supang, J., & Mohd, M. (2020). The development of Acetobacter xylinum growth measurement through total protein analysis. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 24(2), 258–265.
- Torres, C., & Vera, G. (2019). *Efecto del porcentaje de ácido acético en la vida útil de una conserva de pollo desmenuzado en escabeche* [Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López]. <https://repositorio.esPAM.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/42000/1231/TAI177.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
- Vera, J., Vásquez, L., Alvarado, K., Mora, K., Intriago, F., Naga-Raju, M., Radice, M., & Vallejo, C. (2023). Mucílago de cacao (CCN-51) en la elaboración de almíbar de manzana con propiedades antioxidantes. *Revista Multidisciplinaria de Desarrollo Agropecuario, Tecnológico, Empresarial y Humanista*, 5(1), 1–10. <https://investigacion.utc.edu.ec/index.php/dateh/article/view/790>
- Wang, B. (2020). *Characteristics of Dominant Acetic Acid Bacteria and Yeasts in Kombucha Sold in New Zealand*. Massey University. <https://mro.massey.ac.nz/items/4e4662fo-1d4e-41d6-83b7-9f485c78214c>