



**“Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano”**

Serpa Gavilánez, Evelyn Marlein y Viteri Uribe, Brandon Fernando

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

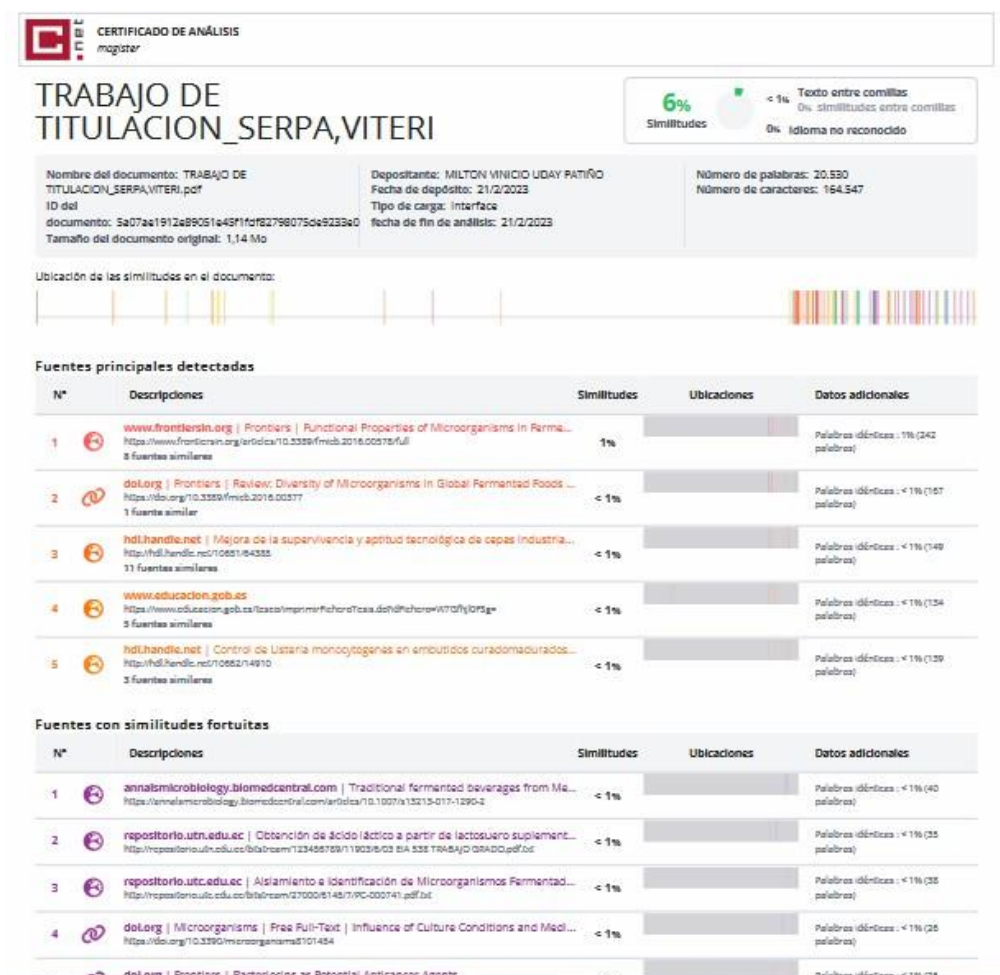
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ph.D. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee,

21 de Febrero 2023

## Reporte de verificación de contenido



Firma:



Firmado electrónicamente por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

PhD.Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

C. C.: 1205348673

Director del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

#### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano”** fue realizado por la señorita **Serpa Gavilánez, Evelyn Marlein** y el señor **Viteri Uribe, Brandon Fernando**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 21 febrero del 2023

Firma:



.....  
**PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee**

C. C.: 1205348673

**Director del Proyecto de Investigación**



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Nosotros, **Serpa Gavilánez, Evelyn Marlein y Viteri Uribe, Brandon Fernando**, con cédulas de ciudadanía N° 2300314255 y N° 2300689003, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano”** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 21 febrero del 2023**

Firmas

.....  
**Serpa Gavilánez, Evelyn Marlein**

C.C.: 2300314255

.....  
**Viteri Uribe, Brandon Fernando**

C.C.: 2300689003



**Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Nosotros, **Serpa Gavilánez, Evelyn Marlein y Viteri Uribe, Brandon Fernando**, con cédulas de ciudadanía N° 2300314255 y N° 2300689003, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 21 febrero del 2023**

Firmas

.....  
**Serpa Gavilánez, Evelyn Marlein**

C.C.: 2300314255

.....  
**Viteri Uribe, Brandon Fernando**

C.C.: 2300689003

### **Dedicatoria**

Dedico mi tesis a Dios, por brindarme cada día fuerza y sabiduría durante cinco años de carrera. A mis padres, Marlene y Carlos, por ser pilares fundamentales en este largo recorrido y su apoyo no solo económico, sino también emocional en circunstancias difíciles.

A mi abuelita Isabel, por sus oraciones y a mi tía Ruth, que a pesar de la distancia, siempre procuró por mi bienestar y salud.

Así mismo, dedico mi tesis a mi compañero Brandon Viteri por su ardua dedicación y comprensión durante estos años de estudio. A mi mejor amiga Lisseth Espinoza, por sus oraciones, consejos y apoyo emocional en todo tiempo.

**Evelyn Serpa**

### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi Dios por darme la fuerza y la compañía en todo momento, por no dejarme nunca, y enseñarme una vida más justa donde puedo ser participe, ser un ser amado y a si mismo dar luz a los que me necesiten.

A mis padres Narcisa Uribe y Edwin Viteri por apoyarme y esforzarse en brindarme todo para que siga en mis estudios por todo este largo camino de formación. Por ser mi luz en momentos de tempestad, por amarme tanto aun encima de ellos.

A mi hermana Carolina Viteri por estar junto a mí en cada momento, por quererme a su manera, tal cual, pero sobre todo por mirar siempre mi bienestar.

A mi familia Viteri-Uribe por enseñarme los valores que me hicieron mantenerme perseverante en cada meta, como lo es en este trabajo.

A mi futura compañera de vida Evelyn Serpa que desde que llego me ha enseñado tantas cosas, pero nunca rendirme, motivándome a dar lo mejor de mí. Por demostrarme que todo se puede hacer si estamos juntos. Con Dios todo es posible.

**Brandon Viteri**

## **Agradecimientos**

Hace algunos años se veía imposible llegar a la meta y hoy, agradezco a Dios por gratas bendiciones y permitirme vivir este momento tan importante. Agradezco a mis padres Marlene Gavilánez y Carlos Serpa por su arduo trabajo para formarme como persona y profesional. Su enseñanza ha sido de gran ayuda para mantener siempre la mirada fija a la meta.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a sus docentes que compartieron de su conocimiento durante mi formación. El camino aún es largo, pero es el primer paso para ejercer mi profesión con mucha dedicación. A mi tutora de tesis, pHD. Sugey Sánchez y a su esposo, el pHD. Juan Neira por su dedicación y por el conocimiento impartido. Así mismo, al Ing. Jhoan Plúa y a la Ing, Katty Medina por su amistad y colaboración durante el proyecto de investigación. A mi abuelita Isabel, tíos (David, Eugenio, Raúl, Fernán), tías (Ruth, Rosa, Norma) y a mis primos (Huberth y Mayra) doy las gracias porque en cada paso han estado presentes durante mi formación.

Agradezco a mi compañero de tesis Brandon Viteri que su esfuerzo se ve reflejado en este trabajo y el tiempo compartido ha sido de gran alegría. No hubiese sido posible este trabajo sin su aporte y Dios será recompensado en gran manera.

A mi amiga y hermana Lisseth Espinoza junto con su madre Marilú de Espinoza que me han apoyado y acogido como un miembro más de su familia. A mi amiga Lisseth Santamaría, que a pesar de la distancia y adversidad ha estado presente, a mi amiga Kelley Navas y a su madre por la amistad brindada. A Marcelo Ponce, Diana Zambrano, Jazmín Proaño, Alejandra Saavedra, Edwin Tapia y Carolina Cando por su apoyo incondicional en todo momento.

Por último, pero no menos importante, agradezco a mis mascotas, Toby, Estrellita y Dorami que con sus saltitos han dado alegría a mi corazón.

**Evelyn Serpa**



## **Agradecimientos**

El camino fue muy largo, pero agradezco a mi Dios por siempre cuidarme, por darme la oportunidad de servirle, por enseñarme que todo puede volverse algo extra si el está presente, porque él es el inicio y el mismo fin. A mis padres y hermana por darme su amor incondicional cada día de mi vida, estar siempre conmigo aun en las levantadas a las 5 am de camino a la Universidad, por siempre preguntar cómo me siento. Así como darme la oportunidad de convertirme en un profesional. Gracias por todo mami y papi son los mejores, los amo. A mi amada Evelyn por darme su amor, y felicidad cada día, por hacer de mis días más cálidos, y hacer que mi tristeza sea fugaz. Gracias por tu luz, sé que cumpliremos todo juntos.

A mi familia, por darme siempre apoyo. A mis amigos de la Universidad (Lisbeth, Alejandra, Diana, Carolina, Jazmín y Adriana) por hacer de mis días mas coloridos en la Universidad. También a mi tutora PhD. Sungey Sánchez al igual que el PhD. Juan Neira por ser tan amables en todo este proceso del presente trabajo, por impartir su conocimiento para avanzar con mi proceso universitario. Agradezco al Ingeniero Jhoan Plua por estar siempre dispuesto a ayudarme por aun no teniendo tiempo hacer lo posible por enseñarme. A la Ingeniera Katty Medina por mostrar siempre su ayuda y amistad, aunque quiebro los materiales de laboratorio. A los padres de Evelyn por siempre estar dispuestos a apoyarnos en cada mañana y tarde, por abrirme las puertas a su hogar. Los quiero mucho, Dios los bendiga.

A la familia de Evelyn en especial a su Tía Rosa, Mayra y todas los que viven en la Joya de los Sachas, por cuidarnos y hacer de su casa un verdadero hogar. Por darnos su tiempo, y hacer que nuestros días sean divertidos y felices.

Agradezco a todos mis docentes y a la Universidad de las fuerzas armadas ESPE, por todo este trayecto de formación. Agradezco a las mascotas Estrellita y Dorami por darme su amor.

**Brandon Viteri**

**Contenido del índice**

Caratula.....	1
Reporte de verificación de contenido.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	8
Contenido de índice.....	10
Índice de Tabla .....	16
Índice de Figura .....	18
Resumen.....	19
Abstract .....	20
Capítulo I.....	21
Introducción.....	21
Objetivos .....	23
Objetivo general .....	23
Objetivo específico .....	23
Hipótesis .....	24
Diseño AxByC .....	24
Hipótesis factor A (Sustratos) .....	24
Hipótesis factor B (Concentración del sustrato) .....	24
Hipótesis factor C (Tiempo) .....	24
Capítulo II.....	25

	11
Revisión literatura .....	25
Bebidas fermentadas tradicionales.....	25
Chontaduro.....	26
Generalidades .....	26
Taxonomía y morfología.....	27
Zona de producción.....	28
Zona de producción a nivel Nacional.....	29
Especies de chontaduro.....	30
Chicha de Chonta.....	31
Proceso de elaboración de la chicha de chonta.....	31
Microorganismos fermentadores .....	32
Probióticos.....	33
Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	34
Generalidades .....	34
Clasificación.....	34
Propiedades antimicrobianas.....	34
Mecanismo de acción de las bacteriocinas .....	37
Métodos de evaluación de actividad bacteriocina in vitro .....	38
Método de difusión en discos.....	38
Método de difusión en pozos de agar.....	39
Capítulo III.....	41
Metodología .....	41
Ubicación del área de investigación .....	41
Ubicación política .....	41
Ubicación ecológica.....	41
Ubicación geográfica.....	41

Materiales.....	42
Análisis fisicoquímicos de la chicha de chonta .....	42
pH .....	42
Acidez .....	42
Grados alcohólicos.....	43
Grados Brix.....	43
Densidad.....	43
Caracterización microbiológica.....	43
Replicación y purificación de colonias.....	44
Identificación microbiana.....	44
Tinción Gram .....	44
Pruebas bioquímicas.....	45
Prueba de catalasa.....	45
Prueba de oxidasa.....	45
Análisis estadístico.....	46
Niveles y factores de investigación.....	46
Interacción de tratamientos.....	46
Tipo de diseño.....	48
Modelo matemático del modelo experimental .....	48
Tabla de análisis de varianza.....	49
Análisis funcional.....	50
Variables a evaluar.....	50
Métodos .....	50
Primera parte:.....	50
Obtención de la materia prima.....	50
Caracterización fisicoquímica de la bebida fermentada.....	51

	13
pH.....	51
Acidez.....	51
Grados alcohólicos.....	51
Grados Brix.....	52
Densidad.....	52
Caracterización microbiológica de la bebida fermentada.....	52
Aerobios mesófilos, ácido lácticas, mohos y levaduras (según Norma INEN 1 529-5; Norma INEN 1 529-11).....	52
Aislamiento y replicación bacterias productoras de bacteriocinas.....	53
Identificación de colonias aisladas.....	53
Tinción gram.....	53
Prueba de catalasa.....	54
Prueba de oxidasa.....	54
Segunda parte.....	54
Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas.....	54
Obtención de la bacteriocina.....	55
Tercera parte.....	55
Ensayos de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas.....	55
Capítulo IV.....	56
Resultados.....	56
Caracterización de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”.....	56
Aislamiento de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro.....	57
Identificación de colonias aisladas.....	58

Crecimiento bacteriano en los sistemas de fermentación.....	59
Análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación bacteriana.....	59
Análisis Estadístico .....	60
Análisis de varianza para las variables a evaluar.....	60
Análisis de varianza para la variable Ph .....	60
Análisis de varianza para la variable Acidez .....	60
Análisis de varianza para la variable Absorbancia.....	61
Análisis de varianza para la variable °Brix.....	62
•Resultados de la evaluación de distintos tipos de sustratos (Glucosa-peptona y fructosa-peptona), en la producción de bacteriocinas (Tukey $p < 0.05$ ) .....	63
Prueba de significancia de Tukey de tipos de sustrato (Factor A) .....	63
•Resultados de la evaluación de la concentración de sustratos, en la producción de bacteriocinas (Tukey $p < 0.05$ ).....	64
Prueba de significancia de Tukey de la concentración del sustrato (Factor B) .....	64
•Resultados de la evaluación del tiempo, en la producción de bacteriocinas (Tukey $p < 0.05$ ) .....	66
Prueba de significancia de Tukey del tiempo (Factor C).....	66
•Resultados de la evaluación de Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo, en la producción de bacteriocinas (Tukey $p < 0.05$ ).....	68
Prueba de significancia de Tukey Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo (Interacción ABC) .....	68
Resultado de análisis de conglomerados .....	74
Análisis de componentes principales.....	76
Capítulo V .....	79

Discusión.....	79
Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro” .....	79
pH .....	79
Acidez .....	79
Grados alcohólicos y Brix.....	79
Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro.....	80
Análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación bacteriana.....	81
Análisis Estadístico .....	81
Tipo de sustratos (Factor A).....	81
Concentración del sustrato (Factor B) .....	83
Tiempo (Factor C) .....	85
Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo (Interacción ABC) .....	87
Capítulo VI .....	89
Conclusión .....	89
Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro” .....	89
Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro.....	89
Análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación bacteriana.....	89
Tipo de sustratos (Factor A) .....	90
Concentración del sustrato (Factor B).....	90
Tiempo (Factor C) .....	90

Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo (Interacción ABC) .....	90
Recomendaciones .....	91
Bibliografía .....	93

### Índice de Tabla

<b>Tabla 1</b> Cultivos iniciadores más utilizados en los procesos de fermentación .....	25
<b>Tabla 2</b> Taxonomía de <i>Bactris gasipaes</i> .....	27
<b>Tabla 3</b> Distribución geográfica de <i>Beactris gasipaes</i> , especificando las variación doméstica y silvestre .....	29
<b>Tabla 4</b> Clasificación de las bacteriocinas Grampositivas en función de su estructura y sus propiedades fisicoquímicas .....	35
<b>Tabla 5</b> Equipos, reactivos e insumos utilizados para la determinación de pH .....	42
<b>Tabla 6</b> Equipos, reactivos e insumos utilizados para la determinación de acidez .....	42
<b>Tabla 7</b> Equipos e insumos utilizados para la determinación de densidad .....	43
<b>Tabla 8</b> Equipos y reactivos utilizados para la determinación de densidad.....	43
<b>Tabla 9</b> Equipos, reactivos e insumos utilizados para la determinación de densidad.....	43
<b>Tabla 10</b> Equipos, reactivos e insumos utilizados para la caracterización microbiológica .....	43
<b>Tabla 11</b> Equipos, reactivos e insumos para replicar las colonias aisladas .....	44
<b>Tabla 12</b> Equipos, reactivos y insumos para la identificación morfológica mediante tinción gram .....	44
<b>Tabla 13</b> Equipos, reactivos e insumos para la prueba de catalasa.....	45
<b>Tabla 14</b> Equipos, reactivos e insumos para la prueba de oxidasa .....	45
<b>Tabla 15</b> Niveles y factores que se llevó a cabo en la investigación .....	46



<b>Tabla 16</b> Interacciones respectivas con sus respectivos tratamientos (Tipo de sustratos, concentración del sustrato y tiempo).....	46
<b>Tabla 17</b> Datos del análisis de varianza para comparar los parámetros de crecimiento de la cepa bacteriana .....	49
<b>Tabla 18</b> Propiedades fisicoquímicas de la chicha de chontaduro .....	56
<b>Tabla 19</b> Propiedades microbiológicas de la chicha de chontaduro .....	56
<b>Tabla 20</b> Colonias bacterianas aisladas de la bebida fermentada.....	57
<b>Tabla 21</b> Colonia 1 pruebas bioquímicas .....	58
<b>Tabla 22</b> Unidades arbitrarias del mejor tratamiento de cada tipo de sustrato .....	59
<b>Tabla 23</b> Análisis de varianza para la variable pH .....	60
<b>Tabla 24</b> Análisis de varianza para la variable Acidez .....	60
<b>Tabla 25</b> Análisis de varianza para la variable Absorbancia.....	61
<b>Tabla 26</b> Análisis de varianza para la variable °Brix .....	62
<b>Tabla 27</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor A) .....	63
<b>Tabla 28</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor B) .....	64
<b>Tabla 29</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor C) .....	66
<b>Tabla 30</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción ABC).....	68
<b>Tabla 31</b> Matriz de correlación de componentes principales .....	76
<b>Tabla 32</b> Matriz de componentes.....	77
<b>Tabla 33</b> Tabla de comunalidades.....	77

## Índice de Figura

<b>Figura 1</b> A) Distribución de los frutos del chontaduro y B) Raíz del chontaduro.....	28
<b>Figura 2</b> Distribución geográfica de <i>Bactris gasipaes</i> en las provincias de Ecuador.....	30
<b>Figura 3</b> Proceso de elaboración de la chicha de chontaduro.....	31
<b>Figura 4</b> Mapa de ubicación geográfica del área de investigación.....	41
<b>Figura 5</b> Regresión Simple: Hora vs. Absorbancia .....	59
<b>Figura 6</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor A: Tipo de sustrato) .....	63
<b>Figura 7</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor B: Concentración del sustrato).....	65
<b>Figura 8</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor C: Tiempo) ...	66
<b>Figura 9</b> Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción ABC: Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo).....	71
<b>Figura 10</b> Dendograma de los tratamientos en estudio.....	74
<b>Figura 11</b> Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales.....	76
<b>Figura 12</b> Gráfico de componentes principales.....	78

## Resumen

La chicha de chontaduro es una bebida tradicional de la Amazonía que prepara la población Shuar. Es espesa y se fermenta por 24 a 48 horas dependiendo del consumidor. Las bacteriocinas son metabolitos (péptidos) antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias que actúan contra microorganismos responsables del deterioro de alimentos y causantes de enfermedades. Debido a esto, se suelen utilizar para la biopreservación, la acción antimicrobiana clínica, pero en especial, para el control de fermentaciones. Las bacteriocinas pueden ser obtenidas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin embargo, las que se producen por las bacterias ácido lácticas (BAL) son las que más se utilizan en la industria de alimentos, que resultan luego de la fermentación de los carbohidratos presentes en los medios de cultivo. La presente investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano. El aislamiento se realizó del tercer día de fermentación de la bebida, la chicha de chontaduro tiene bajos niveles de grados brix y alcohol. Cumple los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos impuesto por las normas INEN, tiene un alto contenido de bacterias ácido lácticas. Ya identificada la colonia BAL, se realizó sistemas de fermentaciones con distintos tipos de sustratos (Glucosa-peptona y Fructosa-peptona) a diferentes concentraciones (0,5%,2%,5% y 7%) y mediciones de los parámetros cinéticos a diferentes horas (0, 24, 48 y 72), para determinar diferencias significativas se realizó un diseño trifactorial que permitió determinar el mejor tratamiento (Fructosa-peptona+5%+72 horas) que produce mayor producción de bacteriocinas. Para evaluar la actividad antimicrobiana se realizó el método de difusión de pozos utilizando tres bacterias patógenas (*Lysinibacillus macroides*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) donde se obtuvo mayor halo de inhibición para Fructosa-peptona+5%+72 horas en el patógeno (*Lysinibacillus macroides*).

*Palabras claves:* Bacteriocinas, BAL, fermentación, parámetros cinéticos.

### Abstract

Chicha de chontaduro is a traditional Amazonian beverage prepared by the Shuar people; it is a thick drink, the preparation of chicha de chonta can be fermented for 24 to 48 hours depending on the consumer. Bacteriocins are antimicrobial metabolites (peptides) produced by a large number of bacteria that act against microorganisms responsible for food spoilage and causing diseases. Because of this, they are often used for biopreservation, clinical antimicrobial action but especially for fermentation control. Bacteriocins can be obtained from Gram-positive and Gram-negative bacteria; however, those produced by lactic acid bacteria (LAB) are the most commonly used in the food industry, resulting from the fermentation of carbohydrates present in culture media. The present research aimed to isolate and characterize bacteriocin-producing bacteria in the traditional fermented beverage from the Ecuadorian Amazon region (Chicha de chontaduro) considering different types of substrates, for its application as an antimicrobial agent. The isolation was performed on the third day of fermentation of the beverage, chicha de chontaduro has low levels of brix and alcohol. It meets the physicochemical and microbiological parameters imposed by INEN standards and has a high content of lactic acid bacteria. Once the BAL colony was identified, fermentation systems were carried out with different types of substrates (Glucose-peptone and Fructose-peptone) at different concentrations (0.5%, 2%, 5% and 7%) and measurements of kinetic parameters at different hours (0, 24, 48 and 72 hours). To determine significant differences, a trifactorial design was used to determine the best treatment (Fructose-peptone+5%+72 hours), which produces the highest production of bacteriocins. To evaluate the antimicrobial activity, the well diffusion method was performed using three pathogenic bacteria (*Lysinibacillus macroides*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*) where a greater inhibition halo was obtained for Fructose-peptone+5%+72 hours in the pathogen (*Lysinibacillus macroides*).

*Key words:* Bacteriocins, LAB, fermentation, kinetic parameters.

## Capítulo I

### Introducción

La revolución industrial no sólo permitió transformar el ámbito social, económico y tecnológico sino también áreas como la microbiología. Aunque los avances eran visibles, la sociedad tuvo mayor entendimiento a mediados del siglo XIX y con ello progresos en los procesos de fermentación (Caplice y Fitzgerald, 1999). Desde la antigüedad estos procesos eran utilizados por el ser humano para alargar la vida útil de los alimentos y beneficios a la salud. En la industria alimentaria, la palabra “fermentación” se refiere a un proceso biológico, específicamente microbiano, que genera cambios deseables en las materias primas utilizadas para la elaboración de ciertos alimentos cotidianos. Es decir, la fermentación es la consecuencia del metabolismo aeróbico como anaeróbico de las bacterias siendo la fermentación alcohólica y la fermentación acética las más comunes (Nout, 2014; Grijalva Vallejos, 2019).

En el proceso de fermentación se produce un mecanismo de acción, la síntesis de metabolitos (etanol, ácidos orgánicos o péptidos microbianos/bacteriocinas) generados por las bacterias fermentadoras, que ayudan a inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o degradadores, mejoran el valor nutricional, organoléptico de los alimentos y reducen costos energéticos para la preparación de estos (Bourdichon et al., 2012; Anagnostopoulos y Tsaltas, 2019).

En los últimos 30 años, las bacteriocinas han generado un gran interés tanto en la comunidad científica como en el sector industrial. Se han desarrollado diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, mecanismo de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación segura en la bioconservación de alimentos (Vásquez et al., 2009) ya que actualmente, las personas buscan alimentos sin preservantes químicos y más saludables para su consumo (Terefe, 2016).

Para las bebidas fermentadas es común utilizar como materia prima cereales, siendo el trigo, maíz, cebada y arroz una fuente de nutrientes para las personas (Tamang et al., 2016). A través del mundo hay tres culturas tradicionales que elaboran alimentos fermentados con cereales: 1) Cultura oriental: arroz cocido, 2) Cultura australiana y occidental: panes y hogazas a base de cebada y trigo y 3) las cultura africana y Latinoamericana, bebidas y panes a base de sorgo y maíz (Anagnostopoulos & Tsaltas, 2019).

La bebida fermentada ocupada en el presente trabajo es la chicha de chonta obtenida de la Comuna Kichwa Juan Montalvo en la Joya de los Sachas, Ecuador. Esta bebida no solo se encuentra en la región Amazónica del Ecuador sino también puede encontrarse en varios países de la región Andina como Perú y Bolivia, y en regiones bajas de Brasil, Colombia, Venezuela, Chile y Argentina (Chaves-López et al., 2014; Faria-Oliveira et al., 2015).

La chicha de chontaduro no ha sido estudiada a gran profundidad por lo que se analizaron los parámetros microbiológicos para obtener más información sobre las bacterias fermentativas y parámetros fisicoquímicos que determinan la seguridad alimentaria de la bebida. Estas bacterias fermentativas pueden emplearse para preservar alimentos por lo cual, es importante su multiplicación y, por ende, se elaboraron sistemas de fermentación con la bacteria aislada e identificada, con el fin de determinar el mejor sustrato (Carbono-Nitrógeno) para su crecimiento y producción de bacteriocinas para su posterior aplicación según los beneficios antimicrobianos e implementarse en la industria alimentaria.

## Objetivos

### Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano.

### Objetivo específico

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro)
- Evaluar distintos tipos de sustratos (Glucosa-peptona y fructosa-peptona), en la producción de bacteriocinas.
- Establecer las concentraciones adecuadas de sustrato, en la producción de bacteriocinas.
- Determinar el tiempo óptimo requerido, en la producción de bacteriocinas.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas de la bebida fermentada tradicional (Chicha de chontaduro), en distintos microorganismos patógenos (Hongos y bacterias).

## Hipótesis

### Diseño AxBxC

#### Hipótesis factor A (Sustratos)

- H0: Los dos tipos de sustratos no influyen en los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocina
- H1: Los dos tipos de sustratos influyen en los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocina

#### Hipótesis factor B (Concentración del sustrato)

- H0: La concentración del sustrato no influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocinas
- H1: La concentración del sustrato influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de las bacteriocinas

#### Hipótesis factor C (Tiempo)

- H0: El tiempo no influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de bacteriocinas
- H1: El tiempo influyen con los parámetros cinéticos microbianos y producción de las bacteriocinas



## Capítulo II

### Revisión literatura

#### Bebidas fermentadas tradicionales

Desde la antigüedad, los alimentos se han conservado gracias a procesos fermentativos y a sus microorganismos fermentadores, procedentes del microbiota natural o de un cultivo iniciador, quienes mejoran las propiedades físicas, químicas y nutricionales de los alimentos (Jans et al., 2017). Generalmente, se emplea un cultivo iniciador (Tabla 1) debido a su eficacia y a que no se deshace como ocurre durante el preprocesamiento de la microflora natural (Sangwan et al., 2014).

**Tabla 1**

*Cultivos iniciadores más utilizados en los procesos de fermentación*

Microorganismos	Ejemplos	Producto
Levadura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. rouxii</i> , <i>S. ellipsoideus</i>	2 Etanol + 2 CO <sub>2</sub> por molécula de hexosa
Homofermentativo	<i>Pediococcus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Vagococcus</i> , some <i>Lactobacilli</i>	2 ATP + 2 Lactato por molécula de glucosa
Heterofermentativo	<i>Carnobacterium</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactosphaera</i> , <i>Weissells</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides subspecies cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides subspecies lactis</i> , some <i>Lactobacilli</i>	1 ATP + 1 Lactato + 1 Etanol + 1 CO <sub>2</sub> por molécula de glucosa
Moldes	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Erwinia dissolvens</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i>	Variable

Nota: Obtenido de (Sangwan et al., 2014)

A nivel mundial existen aproximadamente 3500 alimentos fermentados tradicionales elaborados a base de cereales (para la producción de cerveza), legumbres, tubérculos y frutas (para producción de vinos), en los que intervienen las bacterias, levaduras y mohos (Romero-Luna et al., 2017). Los alimentos fermentados pueden ser producidos industrialmente (vino, queso, cerveza, pan y yogur) siendo accesibles para las personas, pero los alimentos fermentados tradicionalmente, son autóctonos de un determinado grupo social o etnia y se elaboran de manera artesanal o semi comercial (Olivares-Illana et al., 2002).

Otro producto de gran relevancia en etnias y comunidades son las bebidas fermentadas siendo la uva (*Vitis vinifera*) el primer alimento fermentado para la producción de vino dado que sus características óptimas y susceptibilidad a la contaminación facilitan el proceso de fermentación (Hugenholtz, 2013; Ramírez-Guzmán et al., 2019). Para la preparación de bebidas fermentadas tradicionales se emplean técnicas antiguas propias de la cultura y las materias primas en su mayoría son sembradas y cultivadas en casa. En cuanto a los equipos, suelen ser rudimentarios, como ollas de barro, y la manipulación y el consumo a menudo se realizan condiciones sanitarias deficientes.

## **Chontaduro**

### **Generalidades**

El chontaduro con nombre científico *Bactris gasipaes* (nombrada como pejibaye, pupunha y tembé) es la única palma nativa domesticada del neotrópico, por su interés en sus frutos comestibles. La arqueología sugiere que en la época precolombina los pueblos amerindios domesticaron esta especie (Patiño, 1992) y actualmente se sigue plantando en fincas familiares. La domesticación se ha centrado en mejorar características agronómicas del fruto como el color, forma, tamaño, composición química y sabor, generando variaciones genéticas, bioquímicas y morfológicas (Clement, 1998). Esta especie se encuentra presente en las regiones subtropicales y tropicales del neotrópico (Escobar Acevedo et al., 1996; Valencia et al., 2013).

## Taxonomía y morfología

En la tabla 2 se describe la taxonomía del chontaduro obtenido de la base de datos en línea “Sistema Integrado de Información Taxonómica” (ITIS, 2020). Es una variedad de palmera de la familia Arecaceae, del género *Bactris ex. Scop* y especie *Bactris gasipaes Kunth*.

**Tabla 2**

*Taxonomía de Bactris gasipaes*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Arecales
<b>Familia</b>	Areceae
<b>Género</b>	<i>Bactris ex. Scop.</i>
<b>Especie</b>	<i>Bactris gasipaes Kunth</i>

Nota: Obtenido de (ITIS, 2020)

En referencia a la morfología de *Bactris gasipaes*, el tallo tiene un diámetro aproximadamente entre 10-25 cm y de altura de 25 metros, siendo de forma cilíndrica, cubierto de espinas de color negro entre 5-15 cm de largo en los entrenudos. En cuanto a hojas el chontaduro, en su edad fructífera contiene entre 15-20 hojas. La hoja tiene una base peciolar, foliolos, raquis foliar y espinas, aunque algunas palmas no tienen espinas, lo cual no es un aspecto necesario para su reconocimiento (Mora Urpí et al., 1997; Reyes Franco et al., 2019)

Los frutos son drupas cubiertas por una capa amilácea, los frutos se ordenan en racimos, de color amarillo a rojo cuando está maduro y verde cuando está inmaduro, con una sola semilla por drupa (Figura 1A). La raíz, su crecimiento es superficial, son laterales y forman una red tupida de aproximadamente 10 metros de diámetro (Figura 1B) (Zuluaga Peláez et al., 1996; Valencia et al., 2013).

## Figura 1

A) Distribución de los frutos del chontaduro y B) Raíz del chontaduro.



Nota: Obtenido de (Reyes Franco et al., 2019).

### Zona de producción

El origen de esta palma se presume que es en la región occidental en la cuenca amazónica, en la época precolombina se distribuía desde el centro de Bolivia hasta el noroeste de Honduras, con desembocadura en el río Amazonas y Guayanas hasta la costa del Pacífico de Colombia y Ecuador. Aunque se puede registrar que esta palma se extiende algunas islas del Caribe y hacia el norte de México, también ha sido llevada a otros países fuera del continente (Mora Urpí et al., 1997).

En la tabla 3 se puede conocer la distribución geográfica del chontaduro en América Latina, según al reconocimiento de sus dos variaciones, se puede describir que la variación domesticada está presente desde el noroccidente de Honduras hasta el centro de Bolivia y desde el estuario del Amazonas hasta la costa pacífica de Ecuador y Colombia. Con ayuda de datos de herbarios y bancos de germoplasma se puede tener estos resultados, sin embargo, la variación silvestre se encuentra en la costa caribeña, el occidente de Venezuela, estribaciones

andinas occidentales de Ecuador y Colombia; y en las estribaciones andinas orientales amazónicas de Bolivia, Perú y Brasil (Valencia et al., 2013).

**Tabla 3**

*Distribución geográfica de *Beactris gasipaes*, especificando las variación doméstica y silvestre*

<b>País</b>	<b>Variación de <i>Bactris gasipaes</i></b>
Honduras	Variación domesticada
Nicaragua	Variación domesticada
Panamá	Variación domesticada
Costa Rica	Variación domesticada
Bolivia	Variación domesticada y silvestre
Venezuela	Variación silvestre
Colombia	Variación domesticada y silvestre
Perú	Variación silvestre
Ecuador	Variación domesticada y silvestre
Brasil	Variación silvestre

Nota: Obtenido de (Valencia et al., 2013).

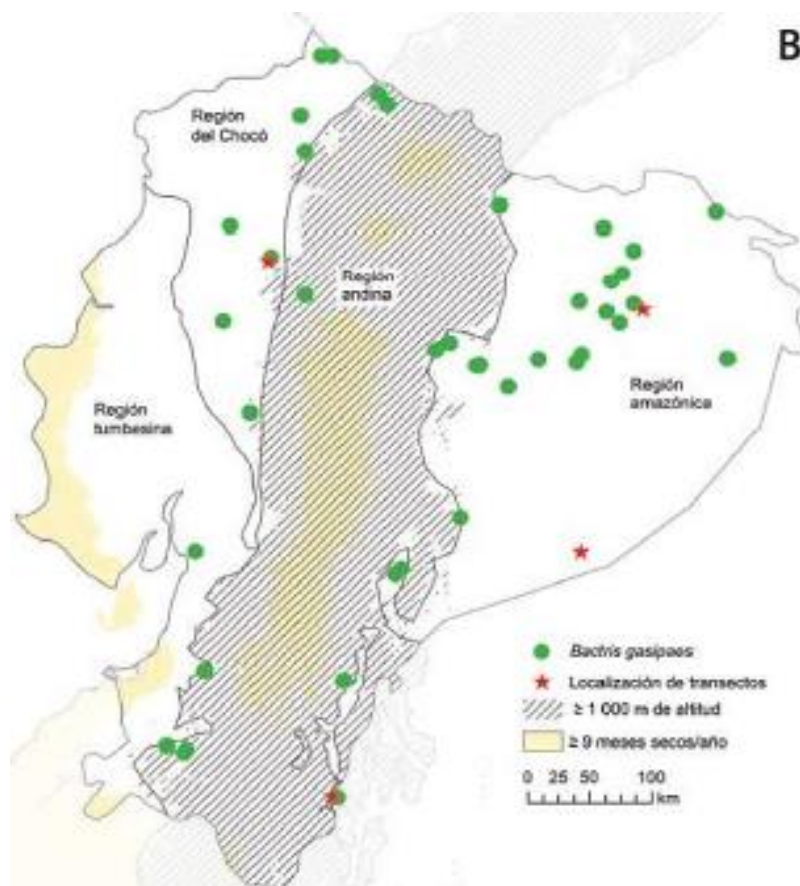
### **Zona de producción a nivel Nacional**

En Ecuador la especie palma de chontaduro puede encontrarse en los bosques de la región Litoral debido a su clima húmedo, subtropical y tropicales con una altitud de 50-1300 m.s.n.m. Aunque las provincias de El Oro, Manabí y Los Ríos poseen bosques semisecos, esto no es un impedimento para la producción de palma. En cuanto a la región Sierra, la chonta si puede crecer en bosques semisecos de la provincia de Loja.

La palma de chontaduro crece en bajas densidades dentro de pequeños remanentes de vegetación y bosques secundarios (Valencia et al., 2013). En la Figura 2 se observa la distribución geográfica de *Bactris gasipaes* en el Ecuador.

## Figura 2

Distribución geográfica de *Bactris gasipaes* en las provincias de Ecuador.



Nota: Tomado del Libro “Palmas ecuatorianas: Biología y uso sostenible” (Valencia et al., 2013).

## Especies de chontaduro

En la actualidad se reconocen dos variedades de *Bactris gasipaes*. La variedad *gasipaes*, localmente denominada como palma de chonta o chontaduro, constituye la forma domesticada por sus frutos, distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del neotrópico. Mientras que, la otra variedad, es la chichagui, localmente llamada como chontilla, es la

pariente silvestre y no suele ser cultivada. La variedad chichagui fue anteriormente identificada como *Bactris macana* o *Bactris dahlgreniana*. Ambas variedades son morfológicamente idénticas, pero con la diferencia en el tamaño del fruto, el cual cuyo volumen promedio es de 70 cm<sup>3</sup> en la variedad *gasipaes* y de apenas 2–5 cm<sup>3</sup> en la variedad chichagui (Valencia et al., 2013).

### **Chicha de Chonta**

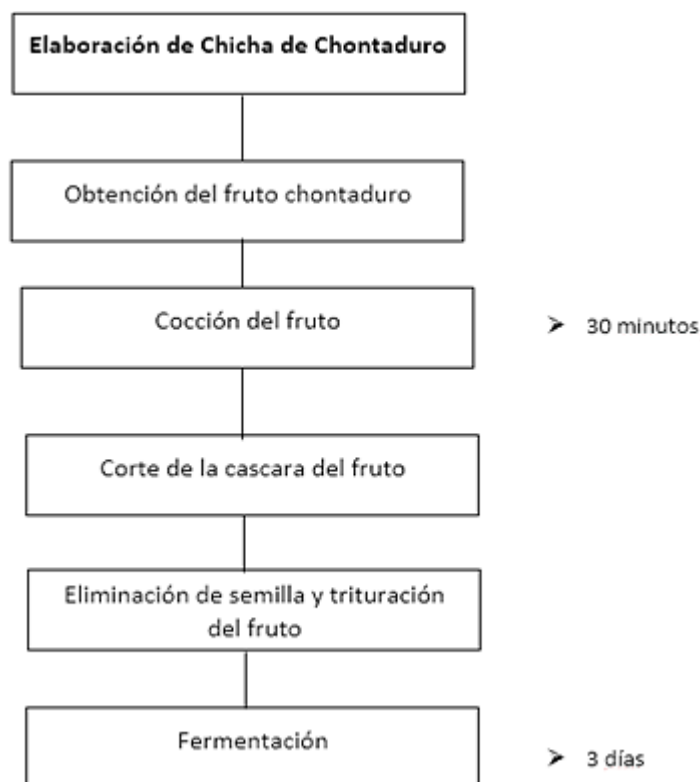
La bebida tradicional del pueblo indígena Shuar es la *nijamanchi* o también denominado chicha por los indígenas de la Sierra. Según Vallejo Yucci et al., (2017), informa que la chicha de chonta es una bebida tradicional de la Amazonía que prepara la población Shuar entre los meses de marzo y junio, siendo la época en que se da el fruto de chontaduro, este brebaje es muy simbólico de la cultura ecuatoriana. La chicha de chonta es una bebida espesa, que se sirve en los pilches hondos llamados “mukawas” que se utilizan como instrumento para beber de esta chicha. La preparación de la chicha de chonta puede ser fermentada, por 24 a 48 horas dependiendo del consumidor, al cual solo se le agrega agua para ser consumida.

### **Proceso de elaboración de la chicha de chonta**

La elaboración de la chicha de chonta varía según la comunidad amazónica. Antiguamente para triturar se masticaba, pero en la actualidad las comunidades son mestizas por lo cual, esa tradición se ha ido perdiendo y ya no se aplica el masticado durante el proceso debido a la higiene.

### **Figura 3**

*Proceso de elaboración de la chicha de chontaduro.*



Nota: Elaboración propia.

Como se observa en la figura 3, las comunidades realizan la chicha con el mosto obtenido al triturar manualmente y se deja fermentar en recipientes tapados (baldes) para poder consumirla al siguiente día. Si se desea la bebida con mayores grados alcohólicos, se puede dejar fermentando por más tiempo.

### **Microorganismos fermentadores**

Los alimentos fermentados incluyen propiedades funcionales que son únicas dándole un valor agregado y que contiene algunos beneficios para la salud de quien los consume por causa de presencia de microorganismos funcionales, que tienen propiedades antimicrobianas, antioxidantes, producción de péptido y probióticas, entre otras (Tamang et al., 2016). Dentro de las bacterias asociadas con las bebidas alcohólicas y alimentos fermentados, se encuentran las bacterias ácido lácticas (BAL), incluidas especies de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissela*, *Lactococcus*, entre otros (Axelsson et al., 2012; Holzapfel & Wood, 2014). Además se han aislados de bebidas fermentadas varios géneros de levaduras como



*Schizosaccharomyces, Debaryomyces, Candida, Hansenula, Geotrichum, Rhodotorula, Pichia, Kluyveromyces, Saccharomycopsis, Wickerhamomyces, Saccharomyces, Zygosaccharomyces* y *Torulopsis*. Especies de Hongos como *Aspergillus, Actinomucor, Monascus, Amylomyces, Penicillium, Neurospora, Ustilago, Rhizopus* y *Mucor* de igual manera como iniciadores de bebidas fermentadas y de amimolíticos no alimentarios asiáticos (Tamang et al., 2009; Chen et al., 2014; Lv et al., 2013 ).

### **Probióticos**

Los probióticos son microorganismos vivos benéficos para la salud de quien los consume en cantidades adecuadas para su efecto. Los organismos probióticos que se utilizan en los alimentos tienen la capacidad de resistir la exposición a la bilis, jugos gástricos, y poder colonizar y proliferar en el tracto digestivo (Saad et al., 2013). Son utilizados comúnmente como bioingredientes en varios alimentos fermentados funcionales como en yogures, quesos, entre otros. Dentro de las bacterias probióticas que se usan más son las bacterias ácido-lácticas (BAL), géneros como *Enterococcus, Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Aunque las levaduras y otros microorganismos también han desarrollado efecto probiótico (Ouwehand et al., 2002; Chávarri et al., 2010).

Existe una gama de productos que contienen probióticos, incluyen los suplementos y alimentos consumidos cotidianamente siendo los productos lácteos fermentados con la mayor fuente de cepas probióticas de *Lactobacillus* (Bernardeau et al., 2006 ; Tamang, 2015); sin embargo, el género *Lactobacillus* también se ha implementado en la industria alimentaria para proveer de probióticos a jugos de frutas, productos cárnicos, alimentos mínimamente procesados como vegetales con el fin de alargar su vida útil (Ranadheera et al., 2010). Un breve ejemplo son las propiedades probióticas de *Lactobacillus plantarum*, del cual se obtuvo de un producto vegetal fermentado coreano Kimchi, el cual previene el crecimiento de *Helicobacter pylori* (Lim & Im, 2009; Ji et al., 2013).

## **Bacterias ácido lácticas (BAL)**

### **Generalidades**

Las BAL son un grupo heterogéneo de microorganismos anaeróbicos, con catalasa y oxidasa negativa, que crecen en ambientes con pH ácido (4 a 4.5). Es común que las BAL presenten forma de cocos o bastoncillos, forman parte de los grampositivos, no esporulados, que se distinguen por su metabolismo fermentativo del azúcar, en donde el ácido láctico es el producto principal generado por el consumo del azúcar. Son conocidas por su potencial para producir compuestos antimicrobianos y otros productos de valor añadido siendo de gran interés para la industria alimentaria (Khalid, 2011).

### **Clasificación**

En las BAL hay un grupo central conformado por cuatro géneros, entre ellas están *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*; luego aparecieron nuevos géneros como *Weissella*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Enterococcus*, *Dolosigranulum*, *Vagococcus*, *Carnobacterium*, *Alloiococcus* y *Aerococcus*. De estas, la *Carnobacterium* y *Lactobacilli* son bacilos y los demás géneros son cocos (Liu et al., 2009). Según Qiao et al. (2022) señala la existencia de 300 especies de BAL clasificadas en 7 géneros. Dentro de la familia *Lactobacillaceae* se enuncian 31 géneros en el que destacan los *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Convivina*, entre otros.

Las BAL se han clasificado en diferentes géneros debido a su morfología, modo de fermentación de los carbohidratos, la tolerancia ácida o alcalina, la configuración del ácido láctico producido, la capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y el crecimiento a diferentes temperaturas (Calo Mata et al., 2007).

### **Propiedades antimicrobianas**

Un gran número de BAL aisladas de vegetales, frutas fermentadas o productos lácteos producen durante su crecimiento metabolitos, denominados bacteriocinas, con capacidad antimicrobiana contra distintas bacterias, hongos, parásitos, virus y estructuras naturales

resistentes (Yang et al., 2014; Graham et al., 2017; Martín-Escolano et al., 2019). Las bacteriocinas son proteínas o péptidos tóxicos sintetizados por el ribosoma y se liberan extracelularmente en la fase de crecimiento tardío y estacionario temprano (Sahoo et al., 2015; Zheng et al., 2019). El tamaño de las bacteriocinas producidas por bacterias gramnegativas oscila entre los 449 a 629 aminoácidos mientras que el tamaño de las bacteriocinas de bacterias gram positivas es de 70 aminoácidos o menos (Jack et al., 1995; Riley & Wertz, 2002).

Entre los principales géneros de bacterias Gram Positivas sintetizadoras de bacteriocinas se encuentran: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Microbacterium*, *Aerococcus*, *Leptosphaeria*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* y *Vagococcus*. La mayoría de las bacteriocinas de las BAL son péptidos catiónicos pequeños (<10 kDa), estables al calor, anfifílicos y permeabilizadores de membrana. Debido a que existen una gran variedad de bacteriocinas, se han agruparon en tres clases principales en función de sus propiedades estructurales y fisicoquímicas (Tabla 4)

**Tabla 4**

*Clasificación de las bacteriocinas Grampositivas en función de su estructura y sus propiedades fisicoquímicas*

Clase	Característica	Subclase	Ejemplos
Clase I Lantibióticos	Péptidos pequeños (<5 KDa) estables al calor y formados por modificación postraduccional y que contienen aminoácidos tioéter policíclicos característicos (lantionina,	Ia: Moléculas de 2 a 4 KDa en forma de tornillo que poseen flexibilidad y carga positiva.	Nisina: Secretada por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> o <i>cremoris</i>
		Ib: Moléculas globulares de 2 a 3	Mersacidina producida por <i>Bacillus</i> spp.

	metil-lantionina) o insaturados (deshidroalanina, ácido 2-aminoisobutírico)	kDa sin carga neta o carga neta negativa	
Clase II No Lantibióticos	Contiene péptidos pequeños termoestables no modificados con peso molecular menor a 10 kDa. No contienen lantionina en el péptido.	Ila: Péptidos activos contra <i>Listeria</i>	Pediocina PA-1 ( <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> )
			Sakacina A ( <i>Lactobacillus</i> )
		IIb: Contiene dos péptidos mejorando la actividad antimicrobiana	Lactacina F ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> )
		IIc: Bacteriocinas de forma circular	Gassericina A ( <i>Lactobacillus gasserii</i> )
Clase III	Proteínas termolábiles grandes (>10 KDa) con actividad y estructura compleja.	Enzimas bacteriolíticas: actúan por hidrólisis de componentes del peptidoglicano	Lisostafina ( <i>Staphylococcus simulans</i> )
		Enzimas no líticas: Relacionadas con la alteración de la membrana	Helveticina-J ( <i>Lactobacillus helveticus</i> )

Nota: Obtenido de (Kawai et al., 2004; Cotter et al., 2005; Sahl & Bierbaum, 1998; Kaur & Kaur, 2015; Preciado et al., 2016; Mak, 2018)

Aunque se pueden encontrar distintas bacteriocinas, la más estudiada por su alta actividad antimicrobiana es la nisina, además, ha tenido un gran éxito comercial (Tamang et al., 2009; Grosu-Tudor & Zamfir, 2013). Para la producción de nisina y otras bacteriocinas se utiliza la técnica *in vitro* controlando el pH, tiempo y temperatura para que el producto final sea seguro y de calidad. Especies de BAL aisladas de kimchi muestran potencial actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (Lee & Lee, 2009). Según (Patel et al., 2014) aisló *Weissella cibaria* de un producto de repollo fermentado de india, esta cepa bacteriana muestra actividad antimicrobiana contra patógenos Gramnegativos y Grampositivos. Múltiples especies de BAL aisladas de vegetales y frutas fermentadas tradicionales de Rumania, poseen actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Bacillus* y *Salmonella* (Grosu-Tudor & Zamfir, 2013).

Los microorganismos que producen bacteriocinas no solo tienen actividad antimicrobiana, sino que pueden también contribuir a dar un valor agregado al producto que se le agrega, ya sea dando textura, valor nutricional y sabor (Gaggia et al., 2011).

### **Mecanismo de acción de las bacteriocinas**

Las bacteriocinas reconocen a un receptor específico o general en una célula y se unen para mitigar la interacción de la membrana formando poros. Este suceso ocasiona que la célula sea permeable conduciendo a la muerte de microorganismos patógenos (Hassan et al., 2012). La producción de bacteriocinas es el sistema de control y se compone de tres elementos: un péptido que induce (o un factor activador de feromonas), histidina quinasa transmembrana (un receptor de feromonas) y un regulador de respuesta. Las bacteriocinas suelen ser sintetizadas por las BAL como péptidos inactivos con una guía de secuencia N-terminal y son transportadas a la superficie celular en la fase de crecimiento exponencial para activarse por medio de un proceso enzimático. Los transportadores contienen una parte peptídica N-terminal, responsable de la escisión del péptido guía, así como una parte C-terminal, responsable de la hidrólisis del trifosfato de adenosina y del suministro de energía. La clase II utiliza proteínas accesorias en la

translocación de la membrana, escindir la pestaña del péptido o ambas cosas. La clase III, la porción N-terminal de estas bacteriocinas, es homóloga a una endopeptidasa involucrada en la síntesis de la pared celular (Kumariya et al., 2019).

### **Métodos de evaluación de actividad bacteriocina in vitro**

Existe una variedad de métodos para evaluar la actividad antimicrobiana entre microorganismos. Los métodos más conocidos y básicos son la difusión en disco y los métodos de dilución en caldo o agar. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de un extracto o compuesto puro se puede utilizar una variedad de métodos de laboratorio siendo el de difusión en disco y con dilución en caldo en agar los más comunes (Balouiri et al., 2016).

### **Método de difusión en discos**

Se desarrolló en 1940 y es una prueba de rutina en laboratorios para analizar la susceptibilidad antimicrobiana. Aunque no todas las bacterias pueden analizarse con exactitud, su estandarización ha permitido probar con ciertas bacterias patógenos tales como *Streptococos*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus parainfluenzae*. Para ello, los medios de cultivo empleados son específicos, se toma en cuenta las condiciones de incubación y los criterios interpretativos de los halos de inhibición (Heatley, 1994).

Para este proceso, las cajas Petri se inoculan en Agar Muller Hinton con el microorganismo antagónico. A continuación, se colocan sobre la superficie del agar discos de papel filtro (6mm de dm) que contiene el microorganismo a evaluar. Por último, las cajas de agar se incuban en condiciones adecuadas según el microorganismo de prueba. Para evaluar el antagonismo, se miden los diámetros de las zonas de inhibición o deterioro del microorganismo por la acción del otro (Balouiri et al., 2016).

### **Método de difusión en pozos de agar**

Para la evaluación de la actividad antagónica, esta técnica es ideal para extractos microbianos (Magaldi et al., 2004; Valgas et al., 2007). El procedimiento para seguir es similar al método de difusión en disco, la superficie de la placa de agar se inocula esparciendo un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar. Luego, se perfora asépticamente un agujero con el sacabocados y se introduce en el pozo entre 20–100  $\mu$ L del agente antimicrobiano. Finalmente, las cajas inoculadas se incuban en óptimas condiciones del microorganismo. El agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar e inhibe el crecimiento de la cepa microbiana probada, por ende, se mide el halo de inhibición (Balouiri et al., 2016).

### **Aplicaciones de las bacteriocinas**

Las BAL sintetizan bacteriocinas empleadas en la industria alimentaria como aditivo para la biopreservación, la extensión de la vida útil, los antimicrobianos clínicos y el control microbiano durante la fermentación. Actualmente, la nisina (en una forma parcialmente purificada) y la pedicina PA-1/AcH han sido autorizadas para su uso como bioconservadores (De Vuyst & Vandamme 1994; Schnürer & Magnusson 2005). Las bacteriocinas se han utilizado como agentes antibotulínico en el proceso de elaboración del queso y productos cárnicos. Se emplea en salsas, alimentos enlatados y encurtidos (Leroy & De Vuyst 2004). Además, las bacteriocinas agregarse en películas hechas con proteínas biodegradables para envasar alimentos (Preciado et al., 2016). Es importante tener en cuenta la temperatura en la cual se conservan los productos cárnicos ya que estudios han demostrado que el punto de congelación ayuda a mantener la alta calidad microbiológica de la carne, inhibiendo especies de bacterias patógenas (Ercolini et al., 2010).

Según And y Hoover (2003), se puede incorporar las bacteriocinas en los alimentos por medio de tres métodos. El primero es la inoculación directa de BAL en los alimentos para que sintetizen las bacteriocinas. El segundo método consiste en la incorporación al alimento de bacteriocinas purificadas o semipurificadas para la conservación de alimentos y el tercero

utiliza un producto previamente fermentado que produce bacteriocina como ingrediente del alimento procesado. La bacteriocina obtenida por técnica *ex situ* se puede aplicar a un sustrato alimentario o en preparaciones inmovilizadas para que las bacteriocinas se adhieran al soporte para evitar la inactivación por procesos enzimáticos o por interacción de los componentes de los alimentos (Ercolini et al., 2006; Preciado et al., 2016).



## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del área de investigación

##### *Ubicación política*

País:	Ecuador
Provincia:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón:	Santo Domingo
Parroquia:	Luz de América
Sector:	Vía Quevedo, Km 24

##### *Ubicación ecológica*

Zona de vida:	Ecológica
Altitud:	Bosque Húmedo Tropical
Temperatura:	25 °C
Precipitación:	2860 mm/año
Humedad relativa:	85%
Heliofania:	680 horas luz/año
Suelos:	Franco arenosos

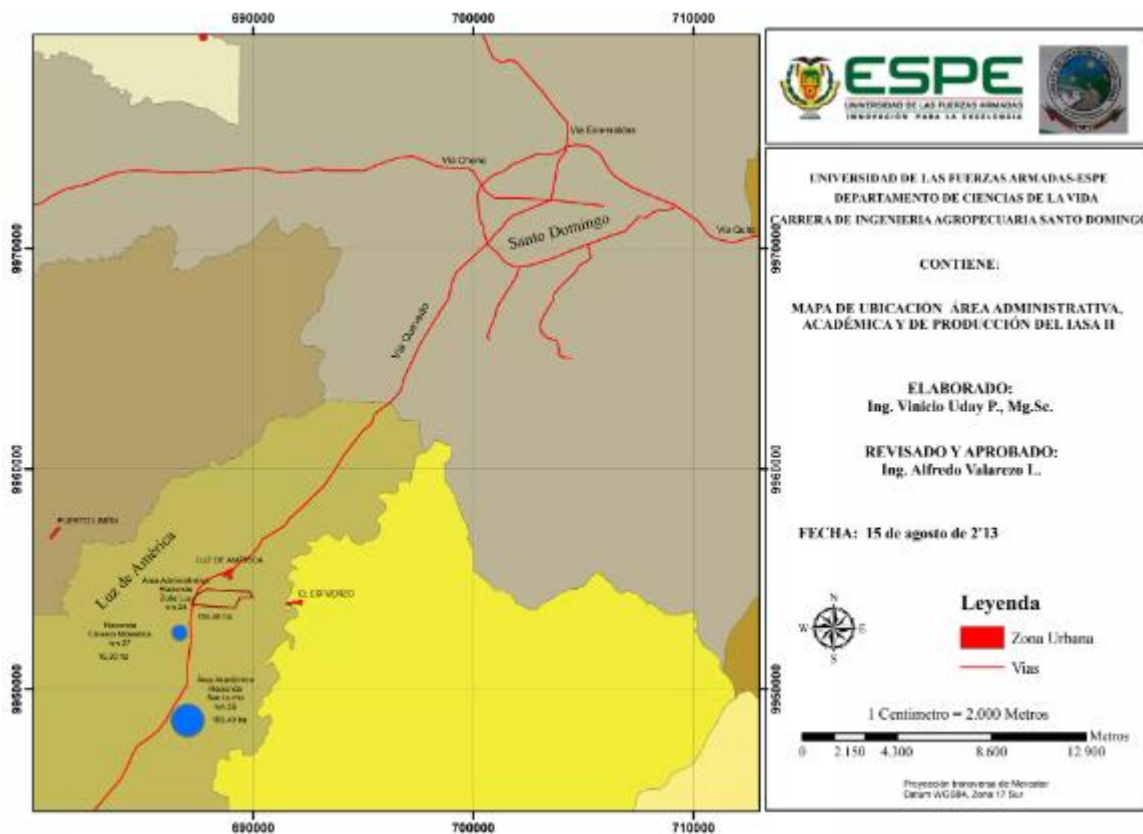
##### *Ubicación geográfica*

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología, Bromatología y Biociencias de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, sede Santo Domingo.

Latitud:	00° 24' 36"
Longitud:	00° 24' 36"
Altitud:	270 msnm

#### Figura 4

*Mapa de ubicación geográfica del área de investigación*



## Materiales

### Análisis fisicoquímicos de la chicha de chonta

#### pH

**Tabla 5**

*Equipos, reactivos e insumos utilizados para la determinación de pH*

Equipos	Reactivo	Insumos
Potenciómetro	Agua destilada	Probeta 100 mL
		Vaso de precipitación 10 mL

#### Acidez

**Tabla 6** *Equipos, reactivos e insumos utilizados para la determinación de acidez*

Equipos	Reactivo	Insumos
Potenciómetro	Na(OH) 0,1N	Probeta 25 mL

Kit de titulación	Balón aforado 250 mL
Plato agitador	Vaso de precipitación 25 mL
	Pipeta plástica
	Magneto

### Grados alcohólicos

**Tabla 7**

*Equipos e insumos utilizados para la determinación de densidad*

Equipos	Insumos
Alcoholímetro	Probeta 100 mL

### Grados Brix

**Tabla 8**

*Equipos y reactivos utilizados para la determinación de densidad*

Equipos	Reactivos
Refractómetro	Agua destilada

### Densidad

**Tabla 9**

*Equipos, reactivos e insumos utilizados para la determinación de densidad*

Equipos	Reactivo	Insumos
Picnómetro 10 mL	Agua destilada	Probeta 10 mL
Balanza analítica		

### Caracterización microbiológica

**Tabla 10**

*Equipos, reactivos e insumos utilizados para la caracterización microbiológica*

Equipos	Reactivo	Insumos
---------	----------	---------

Cámara de flujo laminar	Agua destilada	Tubos de ensayo
Balanza analítica	Agua peptona	Pipeta 10mL
Plancha agitadora	Agar MRS	Micropipeta 1000 µL
Autoclave	Alcohol 96% y 70%	Asa bacteriológica
Vortex	Petrifilm de Mohos y Levaduras, Aerobios y ácido lácticas	Mechero de alcohol
Incubadora		Cajas petri
		Parafilm y funas ziploc
		Frasco Boeco
		Magneto

### Replicación y purificación de colonias

**Tabla 11** Equipos, reactivos e insumos para replicar las colonias aisladas

Equipos	Reactivo	Insumos
Cámara de flujo laminar	Agua destilada	Asa bacteriológica
Balanza analítica	Agar MRS	Mechero de alcohol
Plancha agitadora	Alcohol 96% y 70%	Cajas petri
Autoclave		Parafilm y funas ziploc
Incubadora		Frasco Boeco
		Magneto

### Identificación microbiana

#### Tinción Gram

**Tabla 12**

*Equipos, reactivos e insumos para la identificación morfológica mediante tinción gram*

Equipos	Reactivo	Insumos
Microscopio óptico	Agua destilada	Portaobjetos
Cámara de flujo laminar	Cristal Violeta	Asa bacteriológica

Lugol  
Safranina  
Aceite de inmersión

Mechero de alcohol  
Parafilm

## Pruebas bioquímicas

### Prueba de catalasa

**Tabla 13**

*Equipos, reactivos e insumos para la prueba de catalasa*

Equipos	Reactivos	Insumos
Cámara de flujo laminar	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30%	Portaobjetos
		Mechero
		Asa bacteriológica
		Pipeta pasteur

### Prueba de oxidasa

**Tabla 14**

*Equipos, reactivos e insumos para la prueba de oxidasa*

Equipos	Reactivos	Insumos
Cámara de flujo laminar	Reactivo de kovacs	Portaobjetos
	KOH al 3%	Mechero
		Asa bacteriológica
		Papel filtro
		Caja petri
		Pipetas pasteur

## Análisis estadístico

### Niveles y factores de investigación

El siguiente estudio se clasificó por niveles y factores de experimento.

**Tabla 15**

*Niveles y factores que se llevó a cabo en la investigación*

<b>Factores</b>	<b>Niveles</b>
Tipo de sustrato(A)	A0: Glucosa-peptona
	A1: Fructosa-peptona
Concentración del sustrato(B)	B0: 0,5%
	B1: 2%
	B2: 5%
	B3:7%
Tiempo(C)	C0: 0 horas
	C1: 24 hora
	C2:48 horas
	C3:72 horas

### Interacción de tratamientos

**Tabla 16**

*Interacciones respectivas con sus respectivos tratamientos (Tipo de sustratos, concentración del sustrato y tiempo)*

<b>Tratamiento</b>	<b>Interacción</b>	<b>Combinación</b>
--------------------	--------------------	--------------------

---

T1	A0B0C0	Glucosa-Peptona + 0,5% + 0h
T2	A0B0C1	Glucosa-Peptona + 0,5% + 24h
T3	A0B0C2	Glucosa-Peptona + 0,5% + 48h
T4	A0B0C3	Glucosa-Peptona + 0,5% + 72h
T5	A0B1C0	Glucosa-Peptona + 2% + 0h
T6	A0B1C1	Glucosa-Peptona + 2% + 24h
T7	A0B1C2	Glucosa-Peptona + 2% + 48h
T8	A0B1C3	Glucosa-Peptona + 2% + 72h
T9	A0B2C0	Glucosa-Peptona + 5% + 0h
T10	A0B2C1	Glucosa-Peptona + 5% + 24h
T11	A0B2C2	Glucosa-Peptona + 5% + 48h
T12	A0B2C3	Glucosa-Peptona + 5% + 72h
T13	A0B3C0	Glucosa-Peptona + 7% + 0h
T14	A0B3C1	Glucosa-Peptona + 7% + 24h
T15	A0B3C2	Glucosa-Peptona + 7% + 48h
T16	A0B3C3	Glucosa-Peptona + 7% + 72h
T17	A1B0C0	Fructosa-Peptona + 0,5% + 0h
T18	A1B0C1	Fructosa-Peptona + 0,5% + 24h

T19	A1B0C2	Fructosa-Peptona + 0,5%+ 48h
T20	A1B0C3	Fructosa-Peptona + 0,5% + 72h
T21	A1B1C0	Fructosa-Peptona + 2% + 0h
T22	A1B1C1	Fructosa-Peptona + 2% + 24h
T23	A1B1C2	Fructosa-Peptona + 2% + 48h
T24	A1B1C3	Fructosa-Peptona + 2% + 72h
T25	A1B2C0	Fructosa-Peptona + 5% + 0h
T26	A1B2C1	Fructosa-Peptona + 5% + 24h
T27	A1B2C2	Fructosa-Peptona + 5% + 48h
T28	A1B2C3	Fructosa-Peptona + 5% + 72h
T29	A1B3C0	Fructosa-Peptona + 7% + 0h
T30	A1B3C1	Fructosa-Peptona + 7% + 24h
T31	A1B3C2	Fructosa-Peptona + 7% + 48h
T32	A1B3C3	Fructosa-Peptona + 7% + 72h

---

### Tipo de diseño

En el presente estudio se aplicó un diseño trifactorial AxBxC (ANOVA DBCA) en los parámetros de crecimiento de las bacterias, obteniendo en total 32 tratamientos con tres repeticiones.

### Modelo matemático del modelo experimental

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ij} + BC_{ij} + ABC_{ijk} + R1 + E_{ijk1}$$



Donde:

$Y$ : Variable respuesta de la unidad experimental

$\mu$ : efecto global

$A_i$ : efecto de nivel  $i$ -ésimo del factor A

$B_j$ : efecto de nivel  $j$ -ésimo del factor B

$C_k$ : efecto de nivel  $k$ -ésimo del factor B

$AB_{ij}$ : efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

$AC_{ij}$ : efecto de la interacción doble del factor A por el factor C

$BC_{ij}$ : efecto de la interacción doble del factor B por el factor C

$ABC_{ijk}$ : efecto de la interacción triple de los factores A,B,C

$R_1$ : efecto de la replicación del experimento

$E_{ijk_1}$ : error aleatorio

### Tabla de análisis de varianza

**Tabla 17**

*Datos del análisis de varianza para comparar los parámetros de crecimiento de la cepa bacteriana*

Fuentes de variación	Grados de libertad
Bloque	3
Tipo de sustrato	1
Concentración del sustrato	3
Tiempo	3
Interacción A*B	3
Interacción A*C	3
Interacción B*C	9
Interacción A*B*C	9

Error experimental	64
Total	95

---

### **Análisis funcional**

Se aplicará la prueba de Tukey al 5% para evaluar la prueba de significancia.

### **Variables a evaluar**

- pH
- Acidez (ácido láctico)
- Densidad celular
- Grados brix

### **Métodos**

El siguiente proyecto constó de tres partes:

- Primera parte: Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”.
- Segunda parte: Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas
- Tercera parte: Ensayos de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas.

### **Primera parte:**

#### **Obtención de la materia prima**

La bebida fermentada chicha de chonta utilizada en el presente proyecto de investigación se obtuvo de la Comuna Kichwa Juan Montalvo, ubicada en el cantón La Joya de los Sachas, de la provincia de Orellana, en la Amazonía ecuatoriana.

## Caracterización fisicoquímica de la bebida fermentada

### pH

La medición del pH se basó con la norma INEN: 2 325, (2002). En un vaso de precipitación con 10 ml de la muestra, se introdujo el electrodo del medidor de pH, finalmente se anotó el resultado obtenido.

### Acidez

Para medir la acidez se utilizó la norma INEN 381 (1985). Inicialmente para la preparación de la muestra se agregó en un balón de aforo (250 ml), 25 ml de la chicha de chontaduro y se aforó con agua destilada. A continuación, se apartó en un vaso de precipitación 25 ml de la disolución preparada, previamente se armó un equipo de titulación y en la bureta se agregó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N. Se fue añadiendo NaOH hasta llegar un pH de 7, después se agregó gota a gota el reactivo hasta llegar a un pH de máximo 8,3. Por interpolación se obtuvo el volumen de NaOH necesario para llegar a un pH de 8,1. Con el valor obtenido se calculó la acidez titulable, utilizando la siguiente ecuación:

$$A = \frac{(V_1 N_1 M) 10}{V_2}$$

Siendo

A= gramos de ácido en 1 litro de producto.

V<sub>1</sub>= cm<sup>3</sup> de NaOH usados para la titulación.

N<sub>1</sub>= normalidad de la solución de NaOH.

M= peso molecular del ácido considerado como referencia (0,09 ácido láctico).

V<sub>2</sub>= volumen de muestra diluida utilizada.

### Grados alcohólicos

Los grados alcohólicos, se determinaron según las normas INEN 340, se colocó 100 mL de muestra en una probeta, luego se añadió el alcoholímetro y se dejó reposar hasta que el equipo floto, por último, se anotó el valor indicado con la línea de flotación.

### **Grados Brix**

Para los grados Brix se utilizó un refractómetro de 45°, previamente se calibró el equipo con agua destilada. Luego se colocó una gota de la muestra de la chicha de chontaduro en el equipo y se anotó el resultado.

### **Densidad**

Para la densidad, se pesó tres veces el picnómetro: picnómetro vacío ( $c_1$ ), el picnómetro con agua destilada ( $c_2$ ) y el picnómetro con la muestra ( $c_3$ ). Con la siguiente formulas se calculó de la densidad:

$$P = \frac{c_3 - c_1}{c_2 - c_1} * p \text{ agua}$$

### **Caracterización microbiológica de la bebida fermentada**

#### **Aerobios mesófilos, ácido lácticas, mohos y levaduras (según Norma INEN 1 529-5; Norma INEN 1 529-11)**

Para saber la presencia de aerobios mesófilos, se utilizó placas Petrifilm. Como primer paso, se preparó diluciones seriadas de la Chicha de Chontaduro utilizando como diluyente agua de peptona. El agua peptona se dispensó en tubos hasta la dilución  $10^{-4}$ . A continuación, se colocó la placa Petrifilm en una superficie plana, se levantó el film superior de la placa y se agregó 1 mL de la disolución  $10^{-4}$  en el centro del film con ayuda de una micropipeta. Se dejó caer el film superior, sin hacer ninguna presión y evitando la formación de burbujas. Todo este proceso se realizó en una cámara de flujo laminar.

El mismo procedimiento se realizó tanto para ácido lácticas, mohos y levaduras, con la diferencia que para mohos y levaduras se dejó en una incubadora a temperatura ambiente (25 °C) por 72 horas mientras que, los petrifilm de ácido lácticas y aerobios, se dejaron en una incubadora a 37°C durante 48 horas. Finalmente, las placas petrifilm se leyeron utilizando el contador de colonias y para determinar las unidades formadoras de colonias, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Recuento(UFC mL)} = \frac{C * I}{V}$$

Siendo:

C=número de colonias

I= inverso del factor de dilución

Vi=Volumen inoculado

### **Aislamiento y replicación bacterias productoras de bacteriocinas**

En el tercer día de fermentación, se tomó una cantidad pequeña del fermentado, se realizó diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  utilizando agua de peptona al 1,5%. Luego se repartieron 9 ml en cuatro tubos y con una micropipeta se inoculó 1 ml de la muestra de la chicha fermentada. De la dilución  $10^{-4}$ , se tomó 1 mL por medio de una micropipeta para cada caja petri que contenía 25 mL de agar MRS. Al finalizar, las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Luego de 48 horas se realizaron nuevas siembras empleando el método de estrías para purificar las colonias.

### **Identificación de colonias aisladas**

#### **Tinción gram**

Previamente se esterilizó todos los materiales a utilizar para no contaminar las placas con las colonias. Primero se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos, luego con un asa bacteriológica se tomó una pequeña cantidad de la muestra bacteriana y se esparció por el portaobjetos. Para fijar la muestra al portaobjeto se utilizó un mechero. Cuando la muestra secó, se cubrió con cristal violeta por 60 segundos. Luego se añadió lugol de igual manera por 60 segundos. Posterior a esto, alcohol cetona durante 15 segundos. Finalmente, se colocó safranina y se dejó por 60 segundos. En cada etapa se realizó un lavado con agua destilada y se secó con el mechero. Para visualizar las placas se utilizó un microscopio óptico a una resolución de 100x (Salazar Alvarez, 2017).

### **Prueba de catalasa**

Sobre un portaobjetos se colocó con una pipeta pasteur, una gota de peróxido de hidrógeno. Seguidamente, se tomó una porción de la muestra con un asa bacteriológica. Finalmente se observó la reacción producida aproximadamente 20 seg. Si la colonia es positiva produce burbujas como reacción (Salazar Alvarez, 2017).

### **Prueba de oxidasa**

Para la prueba se utilizaron porciones de papel filtro estéril y se colocaron en una caja Petri para evitar derrames del reactivo. Se agregaron 3 gotas del reactivo Kovacs y seguidamente se tomó una porción de muestra bacteriana para añadirla sobre el papel filtro en el reactivo. Los resultados se evidenciaron transcurridos unos segundos siendo la coloración rosada, púrpura o negra un resultado positivo, de lo contrario el resultado es negativo (Macfarland, 1990).

### **Segunda parte**

#### **Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas**

El procedimiento para los sistemas de fermentación se basó en la investigación de (Jurado Gámez et al., 2013). Cada sistema de fermentación se construyó en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo MRS. Inicialmente en un matraz de 250 mL se añadieron 200 mL de caldo MRS con 2 mL de muestra de cultivo a una razón de 1% v/v. En cada uno de los tratamientos se añadió el sustrato (Glucosa-peptona y fructosa-peptona) a una razón de 0,5%, 2%, 5% y 7 % p/v. Finalmente la fermentación discontinua se realizó a 37 ° C, sin agitación durante 72 h.

De cada tratamiento de fermentación se recolectaron los siguientes parámetros cinéticos: %ácido láctico, pH, densidad óptica a 550nm y grados brix, en diferentes intervalos de tiempo (0, 24, 48, 72 horas) (Cavicchioli et al., 2019).

### **Obtención de la bacteriocina**

Siguiendo la metodología de Fuentes y et al, 2016, al tercer día del sistema de fermentación los medios de cultivo de cada tratamiento se centrifugaron a 10000 rpm por 20 minutos. Se ajustó el pH entre 6-6,5 con NaOH 1N para inhibir el efecto de ácidos orgánicos y se filtró el sobrenadante empleando membranas de papel filtro previamente estériles. Finalmente se obtuvo un extracto libre de células (bacteriocina) (Fuentes Fanegas et al., 2017).

### **Tercera parte**

#### **Ensayos de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas.**

Para realizar el ensayo de actividad antimicrobiana de la bacteriocina obtenida, se emplearon tres microorganismos patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Lysinibacillus macroides* y *Bacillus cereus* de manera separada en el medio Muller-Hinton Agar.

La actividad bactericida se expresó en AU/mL, donde AU son unidades arbitrarias. Se realizaron diluciones de base 2 con las bacteriocinas y se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{Au}{mL} = a^b \times 100$$

En donde a=2 siendo el factor de dilución y b= valor de la dilución más alta que muestra una zona de inhibición de 2 mm al menos (Gutiérrez Cortés et al., 2018).

Para evaluar la actividad bactericida, se utilizó el método de difusión de pozos siguiendo el proceso descrito por Balouiri (2016). La superficie de la placa del medio Müller-Hinton Agar se inoculó esparciendo un volumen del inóculo microbiano patógeno sobre la superficie. Posteriormente, con un sacabocados se perforó un agujero de 5 mm de diámetro en el medio, luego se introdujo en el pozo 15 µL de bacteriocina. Las placas se incubaron a condiciones adecuadas de cada microorganismo y finalmente, se midieron los halos de inhibición (mm).

## Capítulo IV

### Resultados

#### Caracterización de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”.

La caracterización de las propiedades fisicoquímicas se muestra en la tabla 18 obtenida de la bebida fermentada estudiada.

**Tabla 18**

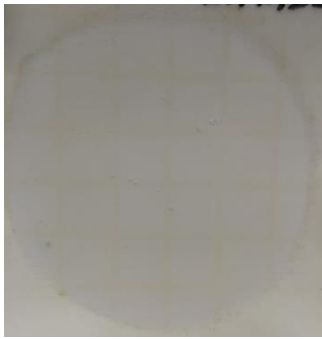
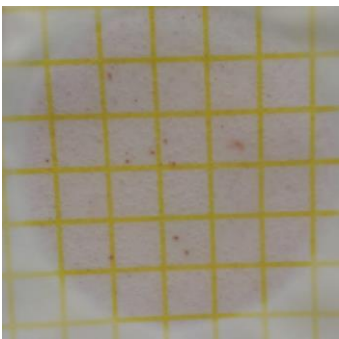
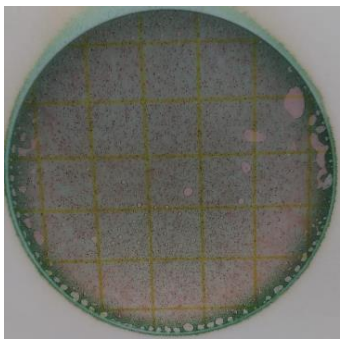
*Propiedades fisicoquímicas de la chicha de chontaduro*

Acidez	pH	Densidad	°Alcohólicos	°Brix
0,2294	4,5	0,998 g/mL	<5°	3

La caracterización microbiológica de la bebida fermentada se muestra en la tabla 19. Aunque la bebida es elaborada de manera artesanal por los grupos étnicos quechuas, los datos UFC demuestran que es segura para el consumo debido a su bajo valor en mohos y levaduras. Adicionalmente, tiene un valor incontable de colonias en el petrifilm de ácido lácticas asegurando la presencia de bacterias lácticas en la bebida tradicional.

**Tabla 19**

*Propiedades microbiológicas de la chicha de chontaduro*

Mohos y levaduras	Aerobios	Ácido lácticas
		
1E+4 UFC/mL	2,17E+6 UFC/mL	3E+6 UFC/mL



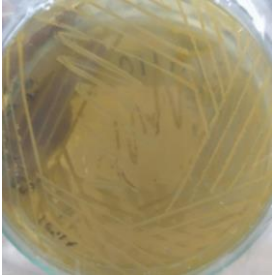


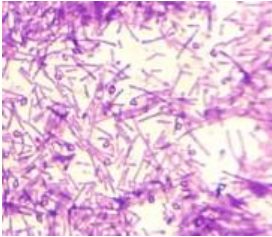
## Aislamiento de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro

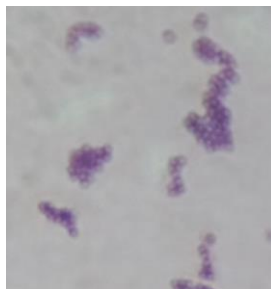
El aislamiento se realizó de la dilución  $10^{-4}$  en Medio Agar-MRS por el método de estrías. Se obtuvieron 3 cepas bacterianas, todas las colonias crecieron en menos de 24 horas, son cremosas con variaciones de color entre rosado-amarilleno, gris y blanquecina amarillentas.

En la tabla 20 se visualizan los resultados de la tinción Gram y la prueba de catalasa realizadas para elegir la colonia con características similares a las BAL.

**Tabla 20**

*Colonias bacterianas aisladas de la bebida fermentada*

Colonias	Tinción Gram	Características
 Colonia 1		Bacilos, Colonias blanquecinas/amarillentas, Gram (+) y catalasa (-)
 Colonia 2		Colonias rosadas-amarillentas, catalasa (-) y Gram (+)



Cocos, Colonias grises,  
Gram (+) y catalasa (-)




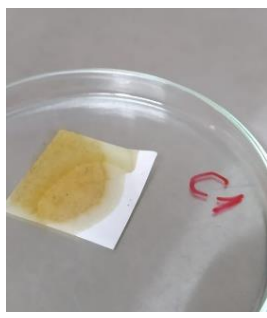
Colonia 3

### Identificación de colonias aisladas

Los resultados de las pruebas bioquímicas confirmaron que la colonia 1 pertenece a un género de las bacterias ácido láctica debido a que la tinción Gram es positiva con catalasa y oxidasa negativa. Además, la morfología observada en el microscopio óptico a 100x es de un bacilo.

#### Tabla 21

*Colonia 1 pruebas bioquímicas*

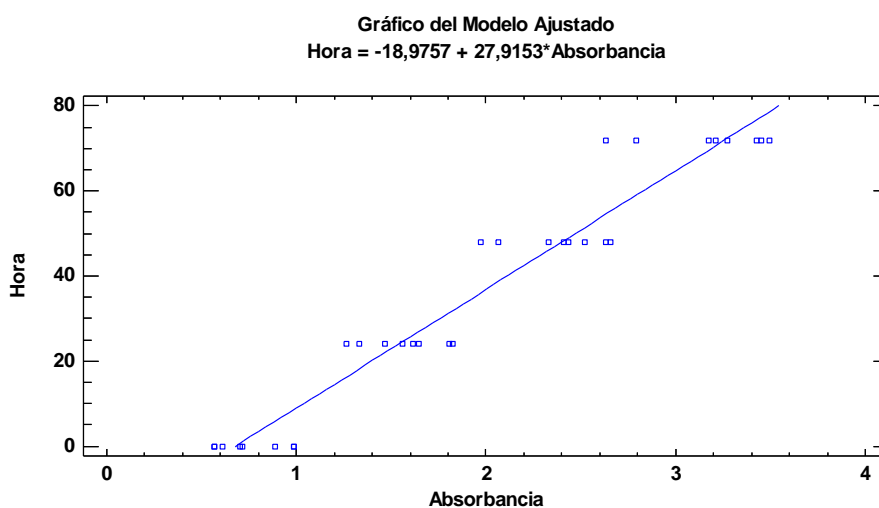
Colonia	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
 Colonia 1	 (+)	 Negativo	 Negativo

### Crecimiento bacteriano en los sistemas de fermentación

Se evaluó el crecimiento de la colona 1 en sistemas de fermentación a través del tiempo. En la figura 5, se observa la absorbancia que varía con el tiempo (0, 24,48 y 72 horas). Existe correlación entre el tiempo y absorbancia con un coeficiente de 0,97028.

#### Figura 5

*Regresión Simple: Hora vs. Absorbancia*



### Análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación bacteriana.

La tabla 22, se evidenció la actividad antimicrobiana (Halos de inhibición), alrededor de los pozos sobre cada bacteria patógena. La bacteriocina que se empleo fue de la mejor fermentación de cada sustrato en función de sus parámetros cinéticos microbianos.

**Tabla 22**

*Unidades arbitrarias del mejor tratamiento de cada tipo de sustrato*

Tratamiento	<i>Lysinibacillus macroides</i> (AU/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (AU/mL)	<i>Bacillus cereus</i> (AU/mL)
Glucosa-peptona+5%+72 horas	263,9	214,3	229,7

Fructosa-peptona+7%+72 horas	324,9	263	246,2
------------------------------	-------	-----	-------

## Análisis Estadístico

### Análisis de varianza para las variables a evaluar

#### Análisis de varianza para la variable Ph

**Tabla 23**

*Análisis de varianza para la variable pH*

FV	GI	SC	CM	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Sustrato	1	0,775801	0,775801	1042,11	0,0000
B:Concentracion(%)	3	4,20489	1,40163	1882,76	0,0000
C:Tiempo	3	66,979	22,3263	29990,15	0,0000
D:Réplica	2	0,00457708	0,00228854	3,07	0,0533
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	3	0,276561	0,0921872	123,83	0,0000
AC	3	0,214211	0,0714038	95,91	0,0000
BC	9	0,423093	0,0470103	63,15	0,0000
ABC	9	0,132043	0,0146714	19,71	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	62	0,0461563	0,000744456		
TOTAL (CORREGIDO)	95	73,0563			

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable pH (la tabla 23), se observó que en: tipo de sustrato (Factor A), Concentración % (Factor B), Tiempo (Factor C), y las Interacciones (A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C) existe diferencia significativa, sin embargo, en las repeticiones no hay diferencia significativa.

#### Análisis de varianza para la variable Acidez

**Tabla 24**

*Análisis de varianza para la variable Acidez*

FV	GI	SC	CM	Razón-F	Valor-P
----	----	----	----	---------	---------

EFECTOS PRINCIPALES					
A:Sustrato	1	0,06993	0,06993	278,25	0,0000
B:Concentracion(%)	3	0,210328	0,0701094	278,96	0,0000
C:Tiempo	3	0,134785	0,0449282	178,77	0,0000
D:Réplica	2	0,000340562	0,000170281	0,68	0,5116
INTERACCIONES					
AB	3	0,0226427	0,00754757	30,03	0,0000
AC	3	0,0231989	0,00773295	30,77	0,0000
BC	9	0,039051	0,004339	17,26	0,0000
ABC	9	0,0196913	0,00218792	8,71	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	62	0,0155821	0,000251324		
TOTAL (CORREGIDO)	95	0,535549			

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza de acidez (la tabla 24), se observó que en: tipo de sustrato (Factor A), Concentración % (Factor B), Tiempo (Factor C), y las Interacción (A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C) se determinó diferencia significativa, respecto a las repeticiones no hay diferencia significativa.

#### **Análisis de varianza para la variable Absorbancia**

**Tabla 25**

*Análisis de varianza para la variable Absorbancia*

FV	GI	SC	CM	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Sustrato	1	0,582817	0,582817	16255,51	0,0000
B:Concentracion(%)	3	3,40162	1,13387	31625,19	0,0000
C:Tiempo	3	78,5059	26,1686	729876,98	0,0000
D:Réplica	2	0,00004375	0,000021875	0,61	0,5465
INTERACCIONES					
AB	3	0,325408	0,108469	3025,35	0,0000
AC	3	0,0673417	0,0224472	626,08	0,0000
BC	9	0,448654	0,0498505	1390,39	0,0000
ABC	9	0,0811333	0,00901481	251,43	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	62	0,00222292	0,0000358535		

TOTAL (CORREGIDO) 95 83,4152

---

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza para la variable Absorbancia (la tabla 25), se observó que en: tipo de sustrato (Factor A), Concentración % (Factor B), Tiempo (Factor C), Interacción (A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C) existe diferencia significativa, en cambio las repeticiones no hay diferencia significativa.

#### **Análisis de varianza para la variable °Brix**

**Tabla 26**

*Análisis de varianza para la variable °Brix*

<b>FV</b>	<b>GI</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Sustrato	1	5,86082	5,86082	228,38	0,0000
B:Concentracion(%)	3	506,393	168,798	6577,61	0,0000
C:Tiempo	3	45,3005	15,1002	588,41	0,0000
D:Réplica	2	0,0421938	0,0210969	0,82	0,4442
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	3	18,3101	6,10336	237,83	0,0000
AC	3	0,486375	0,162125	6,32	0,0008
BC	9	1,34848	0,149831	5,84	0,0000
ABC	9	7,52689	0,836321	32,59	0,0000
ERROR EXPERIMENTAL	62	1,59107	0,0256625		
TOTAL (CORREGIDO)	95	586,859			

---

En cuanto a los resultados obtenidos del análisis de varianza de la variable Brix (tabla 26), se observó que en: tipo de sustrato (Factor A), Concentración % (Factor B), Tiempo (Factor C), Interacción (A\*B, A\*C, B\*C y A\*B\*C) se dio diferencia significativa, sin embargo, en las repeticiones no hay diferencia significativa.

•Resultados de la evaluación de distintos tipos de sustratos (Glucosa-peptona y fructosa-peptona), en la producción de bacteriocinas (Tukey  $p < 0.05$ )

Prueba de significancia de Tukey de tipos de sustrato (Factor A)

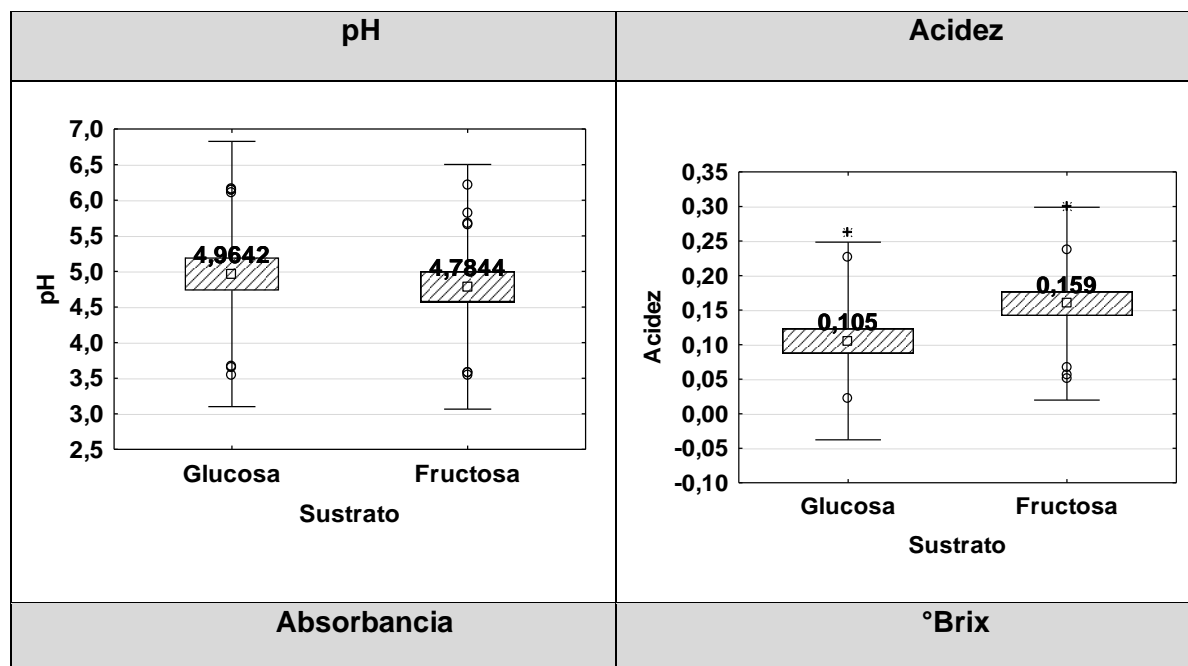
Tabla 27

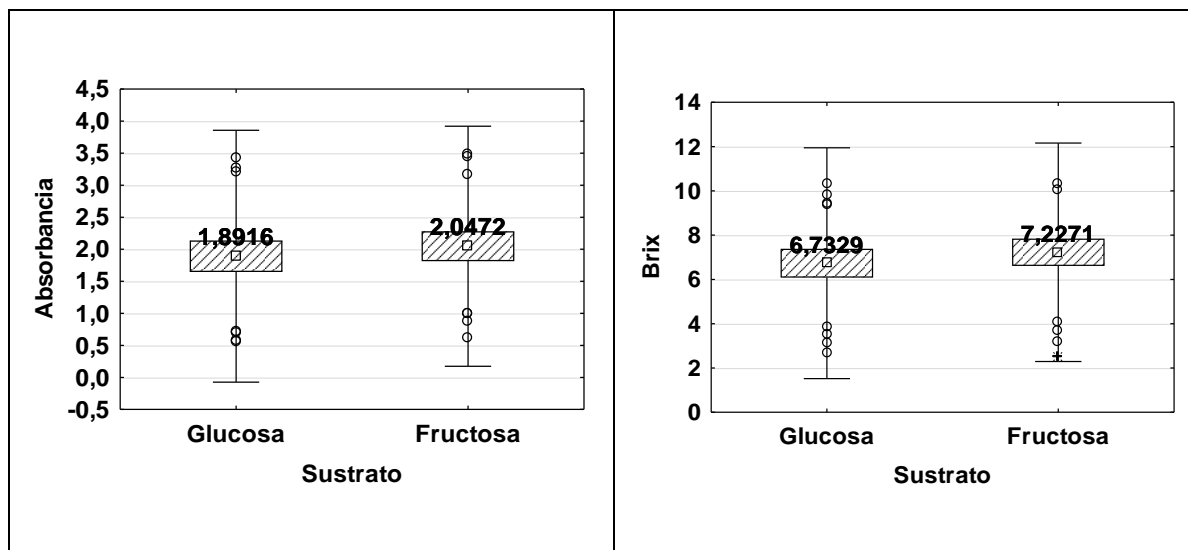
Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor A)

Tipo de sustrato	pH	Acidez	Absorbancia	°Brix
A0: Glucosa-peptona	4,96 <sup>B</sup>	0,11 <sup>A</sup>	1,89 <sup>A</sup>	6,73 <sup>A</sup>
A1: Fructosa-peptona	4,78 <sup>A</sup>	0,16 <sup>B</sup>	2,05 <sup>B</sup>	7,23 <sup>B</sup>

Figura 6

Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor A: Tipo de sustrato)





La figura 6, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente a los parámetros cinéticos microbianos de los sistemas de fermentación para el factor A (Tipo de sustrato). Para lo cual se observó diferencia significativa en pH, donde se obtuvo el mayor contenido en el grupo (**A0**: Glucosa-peptona 4,96 pH), mientras que el menor contenido fue dado por el grupo **A1**: Fructosa-peptona 4,78 pH. En acidez se observó el mayor contenido para el grupo **A1**: Fructosa-peptona 0,16 acidez, en tanto se obtuvo para el grupo **A0**: Glucosa-peptona 0,11 acidez el menor contenido. En absorbancia, se observó mayor valor en el grupo **A1**: Fructosa-peptona 2,05, con respecto a **A0**: Glucosa-peptona (1,89 absorbancia). En cuanto a grados Brix se obtuvo mayor contenido en el grupo **A1**: Fructosa-peptona 7,23 °Brix, frente a **A0**: Glucosa-peptona 6,73 °Brix.

las concentraciones adecuadas de sustrato, en la producción de bacteriocinas

**•Resultados de la evaluación de la concentración de sustratos, en la producción de bacteriocinas (Tukey  $p < 0,05$ )**

**Prueba de significancia de Tukey de la concentración del sustrato (Factor B)**

**Tabla 28**

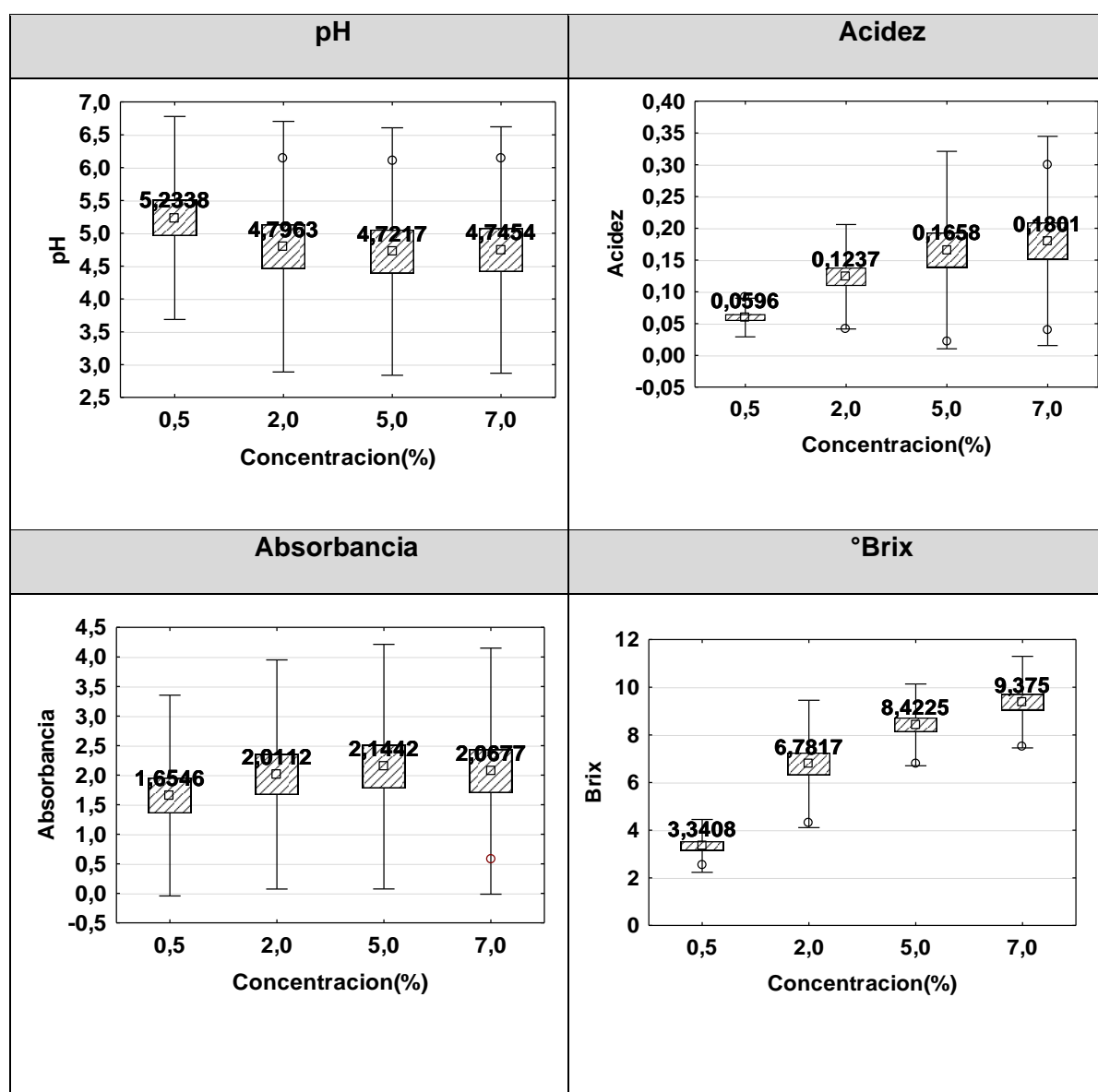
*Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor B)*



Concentración del sustrato	pH	Acidez	Absorbancia	°Brix
B0: 0,5%	5,23 <sup>B</sup>	0,06 <sup>A</sup>	1,65 <sup>A</sup>	3,34 <sup>A</sup>
B1: 2%	4,80 <sup>A</sup>	0,12 <sup>B</sup>	2,01 <sup>B</sup>	6,78 <sup>B</sup>
B2: 5%	4,72 <sup>A</sup>	0,17 <sup>C</sup>	2,14 <sup>C</sup>	8,42 <sup>C</sup>
B3: 7%	4,75 <sup>A</sup>	0,18 <sup>C</sup>	2,07 <sup>BC</sup>	9,38 <sup>D</sup>

**Figura 7** Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor B:

Concentración del sustrato)



La figura 7, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente a los parámetros cinéticos microbianos de los sistemas de fermentación para el factor B (Concentración del sustrato). Se observó diferencia significativa en pH, donde se obtuvo el mayor contenido en el grupo (**B0**: 0,5% 5,23 pH), respecto al grupo (**B1**: 2% 4,80 pH; **B3**: 7% 4,75 pH; **B2**: 5% 4,72 pH). En cuanto a los resultados obtenidos en la variable acidez se observó el mayor contenido para el grupo (**B3**: 7% 0,18 acidez; **B2**: 5% 0,17 acidez), en tanto se obtuvo para el grupo (**A0**: 0,5% 0,06 acidez) el menor contenido. En absorbancia se observó que el mayor contenido se dio para el grupo (**B2**: 5% 2,14; **B3**: 7% 2,07), respecto para el grupo (**B0**: 0,5% 1,65 absorbancia). La variable Brix se obtuvo que el mayor contenido se dio en el grupo (**B3**: 7% 9,38 °Brix), mientras que el menor contenido se observó para el grupo (**B0**: 0,5% 3,34 °Brix).

**•Resultados de la evaluación del tiempo, en la producción de bacteriocinas (Tukey  $p < 0,05$ )**

**Prueba de significancia de Tukey del tiempo (Factor C)**

**Tabla 29**

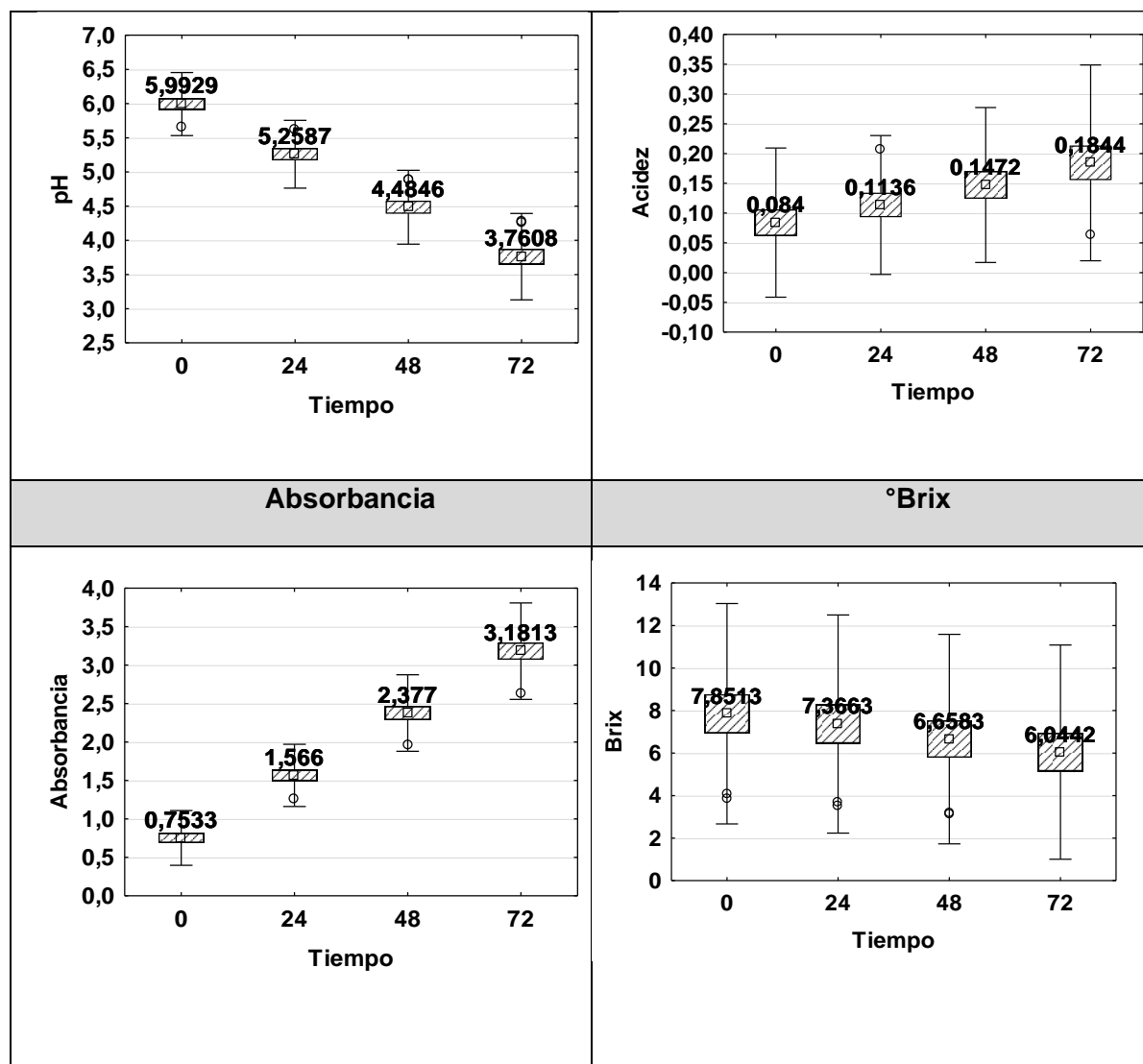
*Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor C)*

Tiempo	pH	Acidez	Absorbancia	°Brix
C0: 0 horas	5,99 <sup>D</sup>	0,08 <sup>A</sup>	0,75 <sup>A</sup>	7,85 <sup>D</sup>
C1: 24 horas	5,26 <sup>C</sup>	0,11 <sup>B</sup>	1,57 <sup>B</sup>	7,37 <sup>C</sup>
C2: 48 horas	4,48 <sup>B</sup>	0,15 <sup>C</sup>	2,38 <sup>C</sup>	6,66 <sup>B</sup>
C3: 72 horas	3,76 <sup>A</sup>	0,18 <sup>D</sup>	3,18 <sup>D</sup>	6,04 <sup>A</sup>

**Figura 8**

*Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Factor C: Tiempo)*

pH	Acidez
----	--------



La figura 8, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente a los parámetros cinéticos microbianos de los sistemas de fermentación para el factor C (Tiempo). Para lo cual se determinó diferencia significativa en pH, donde se obtuvo el mayor valor en el grupo (**C0**: 0 horas 5,99 pH), respecto a (**C3**: 72 horas 3,76 pH). La variable acidez se observó el mayor valor para el grupo (**C3**: 72 horas 0,18 acidez), en tanto se obtuvo para el grupo (**C0**: 0 horas 0,08 acidez) el menor valor. La absorbancia se observó que el mayor valor se dio para el grupo (**C3**: 72 horas 3,18), respecto (**C0**: 0 horas 0,75 absorbancia). En

cuanto a la variable Brix se obtuvo el mayor valor en el grupo (**C0**: 0 horas 7,85 °Brix), en tanto que para el grupo (**C3**: 72 horas 6,04 °Brix) el menor valor.

•**Resultados de la evaluación de Tipo de sustrato\*concentración del sustrato\*tiempo, en la producción de bacteriocinas (Tukey  $p<0.05$ )**

**Prueba de significancia de Tukey Tipo de sustrato\*concentración del sustrato\*tiempo (Interacción ABC)**

**Tabla 30**

*Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción ABC)*

Interacciones	Ph	Acidez	Absorbancia	°Brix
<b>a0b0c0: Glucosa-Peptona + 0,5% + 0h</b>	6,16 <sup>MN</sup>	0,04 <sup>ABC</sup>	0,57 <sup>A</sup>	3,87 <sup>DEF</sup>
<b>a0b0c1: Glucosa-Peptona + 0,5% + 24h</b>	5,63 <sup>JK</sup>	0,05 <sup>ABCD</sup>	1,27 <sup>F</sup>	3,53 <sup>CD</sup>
<b>a0b0c2: Glucosa-Peptona + 0,5% + 48h</b>	4,89 <sup>G</sup>	0,06 <sup>ABCD</sup>	1,97 <sup>JK</sup>	3,13 <sup>BC</sup>
<b>a0b0c3: Glucosa-Peptona + 0,5% + 72h</b>	4,26 <sup>D</sup>	0,06 <sup>ABCD</sup>	2,63 <sup>S</sup>	2,70 <sup>AB</sup>
<b>a0b1c0: Glucosa-Peptona + 2% + 0h</b>	6,15 <sup>MN</sup>	0,04 <sup>ABC</sup>	0,71 <sup>C</sup>	7,30 <sup>IJK</sup>
<b>a0b1c1: Glucosa-Peptona + 2% + 24h</b>	5,31 <sup>I</sup>	0,08 <sup>BCDE</sup>	1,56 <sup>I</sup>	6,47 <sup>H</sup>

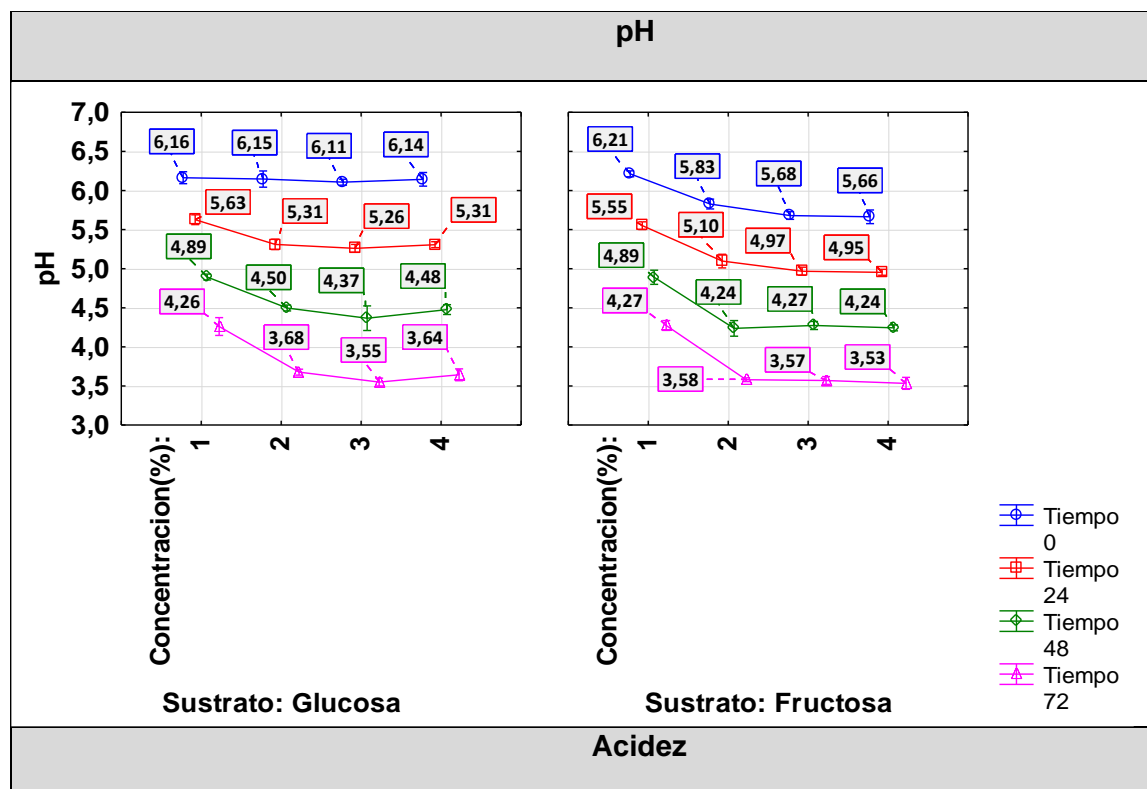
<b>a0b1c2: Glucosa-Peptona + 2% + 48h</b>	4,50 <sup>F</sup>	0,12 <sup>EFGH</sup>	2,43 <sup>Q</sup>	5,37 <sup>G</sup>
<b>a0b1c3: Glucosa-Peptona + 2% + 72h</b>	3,68 <sup>C</sup>	0,16 <sup>HIJ</sup>	3,27 <sup>X</sup>	4,32 <sup>F</sup>
<b>a0b2c0: Glucosa-Peptona + 5% + 0h</b>	6,11 <sup>M</sup>	0,02 <sup>A</sup>	0,71 <sup>C</sup>	9,41 <sup>ST</sup>
<b>a0b2c1: Glucosa-Peptona + 5% + 24h</b>	5,26 <sup>I</sup>	0,09 <sup>BCDE</sup>	1,62 <sup>J</sup>	8,54 <sup>OP</sup>
<b>a0b2c2: Glucosa-Peptona + 5% + 48h</b>	4,37 <sup>E</sup>	0,16 <sup>HIJ</sup>	2,52 <sup>R</sup>	7,73 <sup>KLM</sup>
<b>a0b2c3: Glucosa-Peptona + 5% + 72h</b>	3,55 <sup>A</sup>	0,26 <sup>NO</sup>	3,42 <sup>Y</sup>	6,80 <sup>HI</sup>
<b>a0b3c0: Glucosa-Peptona + 7% + 0h</b>	6,14 <sup>MN</sup>	0,04 <sup>AB</sup>	0,57 <sup>BC</sup> D	10,3 <sup>U</sup>
<b>a0b3c1: Glucosa-Peptona + 7% + 24h</b>	5,31 <sup>I</sup>	0,10 <sup>DEFG</sup>	1,47 <sup>H</sup>	9,80 <sup>TU</sup>
<b>a0b3c2: Glucosa-Peptona + 7% + 48h</b>	4,48 <sup>F</sup>	0,16 <sup>HIJ</sup>	2,33 <sup>O</sup>	9,40 <sup>ST</sup>
<b>a0b3c3: Glucosa-Peptona + 7% + 72h</b>	3,64 <sup>BC</sup>	0,23 <sup>LMN</sup>	3,21 <sup>W</sup>	9,07 <sup>QRS</sup>
<b>a1b0c0: Fructosa-Peptona + 0,5% + 0h</b>	6,21 <sup>N</sup>	0,05 <sup>ABCD</sup>	0,61 <sup>B</sup>	4,10 <sup>EF</sup>

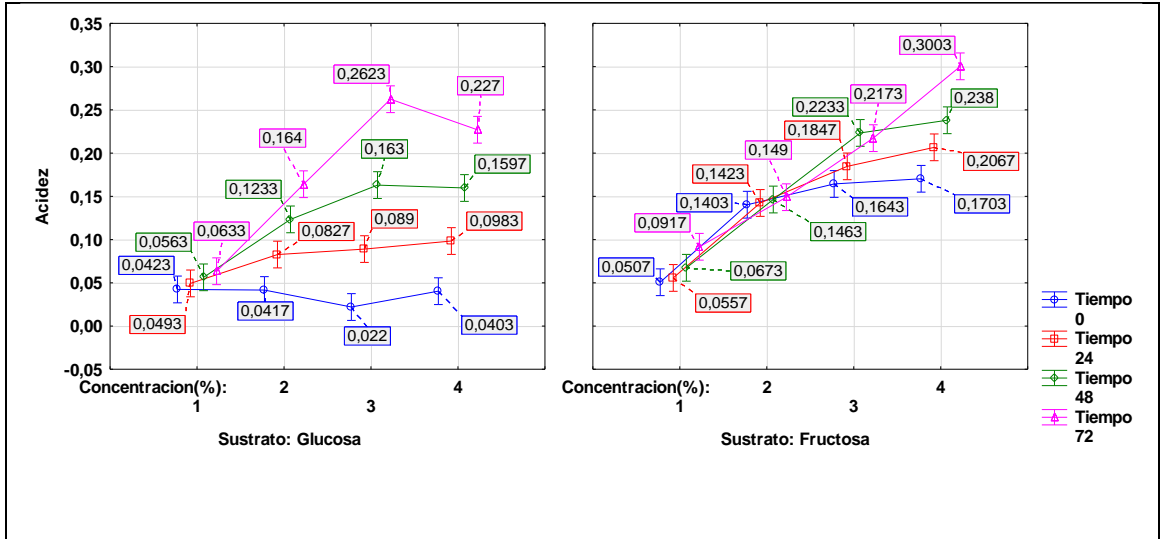
<b>a1b0c1: Fructosa-Peptona + 0,5% + 24h</b>	5,55 <sup>J</sup>	0,06 <sup>ABCD</sup>	1,33 <sup>G</sup>	3,70 <sup>DE</sup>
<b>a1b0c2: Fructosa-Peptona + 0,5%+ 48h</b>	4,89 <sup>G</sup>	2,08 <sup>N</sup>	1,97 <sup>M</sup>	3,17 <sup>BC</sup>
<b>a1b0c3: Fructosa-Peptona + 0,5% + 72h</b>	4,27 <sup>D</sup>	0,09 <sup>CDEF</sup>	2,79 <sup>U</sup>	2,53 <sup>A</sup>
<b>a1b1c0: Fructosa-Peptona + 2% + 0h</b>	5,83 <sup>L</sup>	0,14 <sup>FGHI</sup>	0,89 <sup>D</sup>	8,20 <sup>MNO</sup>
<b>a1b1c1: Fructosa-Peptona + 2% + 24h</b>	5,1 <sup>H</sup>	0,14 <sup>FGHI</sup>	1,65 <sup>K</sup>	8 <sup>LMN</sup>
<b>a1b1c2: Fructosa-Peptona + 2% + 48h</b>	4,24 <sup>D</sup>	0,15 <sup>GHI</sup>	2,41 <sup>P</sup>	7,43 <sup>JK</sup>
<b>a1b1c3: Fructosa-Peptona + 2% + 72h</b>	3,58 <sup>AB</sup>	0,15 <sup>GHI</sup>	3,17 <sup>V</sup>	7,17 <sup>IJ</sup>
<b>a1b2c0: Fructosa-Peptona + 5% + 0h</b>	5,68 <sup>K</sup>	0,16 <sup>HJI</sup>	0,99 <sup>E</sup>	9,33 <sup>RST</sup>
<b>a1b2c1: Fructosa-Peptona + 5% + 24h</b>	4,97 <sup>G</sup>	0,18 <sup>IJKL</sup>	1,81 <sup>L</sup>	8,87 <sup>PQR</sup>
<b>a1b2c2: Fructosa-Peptona + 5% + 48h</b>	4,27 <sup>D</sup>	0,22 <sup>LMN</sup>	2,63 <sup>S</sup>	8,47 <sup>NOP</sup>
<b>a1b2c3: Fructosa-Peptona + 5% + 72h</b>	3,57 <sup>AB</sup>	0,22 <sup>KLM</sup>	3,45 <sup>Z</sup>	8,23 <sup>MNO</sup>

	5,66 <sup>K</sup>	0,17 <sup>HJK</sup>	0,99 <sup>E</sup>	10,30 <sup>U</sup>
<b>a1b3c0: Fructosa-Peptona + 7% + 0h</b>				
	4,95 <sup>G</sup>	0,21 <sup>JKLM</sup>	1,82 <sup>L</sup>	10,03 <sup>U</sup>
<b>a1b3c1: Fructosa-Peptona + 7% + 24h</b>				
	4,24 <sup>D</sup>	0,24 <sup>MN</sup>	2,66 <sup>T</sup>	8,57 <sup>OPQ</sup>
<b>a1b3c2: Fructosa-Peptona + 7% + 48h</b>				
	3,53 <sup>A</sup>	0,30 <sup>O</sup>	3,49 <sup>a</sup>	7,53 <sup>JKL</sup>
<b>a1b3c3: Fructosa-Peptona + 7% + 72h</b>				

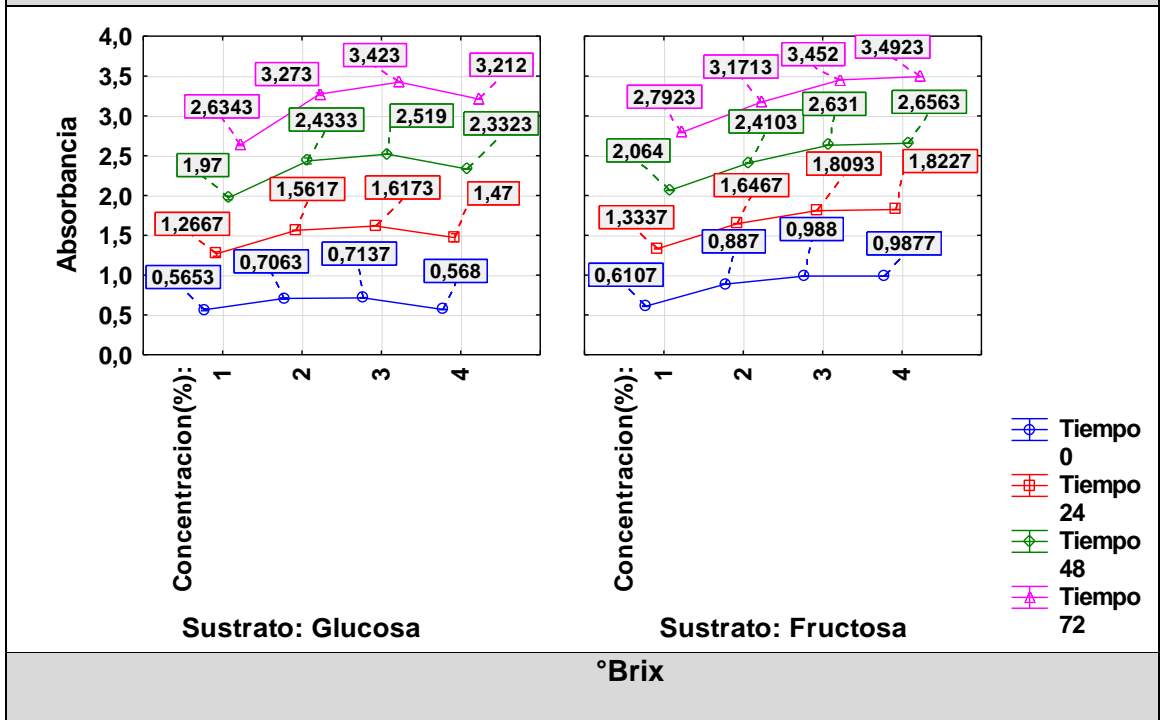
Figura 9

Prueba de significación de Tukey para los factores en estudio (Interacción ABC: Tipo de sustrato\*concentración del sustrato\*tiempo)



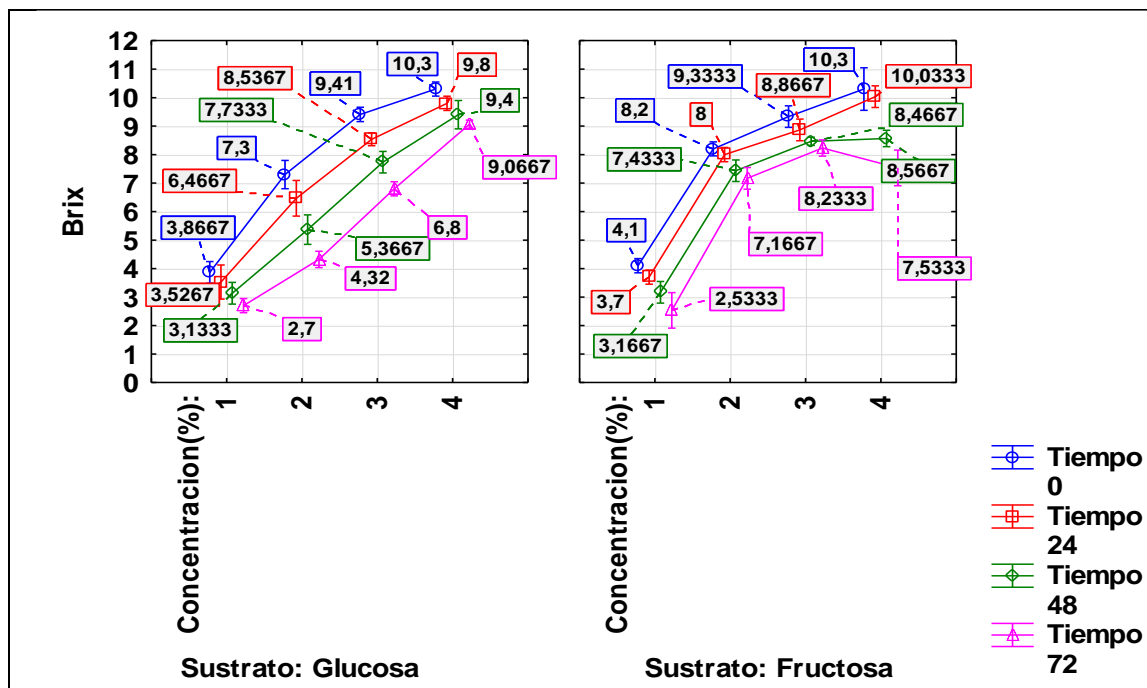


**Absorbancia**



**°Brix**





La figura 9, muestra los valores de la prueba de significación Tukey ( $p < 0,05$ ) agrupados de las variables evaluadas correspondiente a los parámetros cinéticos microbianos de los sistemas de fermentación para la interacción ABC (Tipo de sustrato\*concentración del sustrato\*tiempo).

Para lo cual se determinó diferencia significativa en pH, donde se obtuvo el mayor contenido en el grupo (**a1b0c0**: Fructosa-Peptona+0,5%+0horas 6,21; **a0b0c0**: Glucosa-Peptona+0,5%+0horas 6,16 pH), mientras que el menor contenido fue dado por el grupo (**a0b2c3**: Glucosa-Peptona+5%+72horas 3,55 pH; **a1b3c3**: Fructosa-Peptona+7%+72horas 3,53 pH).

En referencia a los resultados obtenidos en la variable acidez se observó el mayor contenido para el grupo (**a1b3c3**: Fructosa-Peptona+7%+72horas 0,30 acidez; **a0b2c3**: Glucosa-Peptona+5%+72horas 0,26 acidez), en tanto se obtuvo para el grupo (**a0b0c0**: Glucosa-Peptona+0,5%+0horas 0,04 acidez; **a0b1c0**: Glucosa-Peptona+2%+0horas 0,04 acidez; **a0b3c0**: Glucosa-Peptona+7%+0horas 0,04 acidez; **a0b2c0**: Glucosa-Peptona+5%+0horas 0,02 acidez) el menor contenido.

Con respecto a los resultados para la variable absorbancia se observó que el mayor contenido se dio para el grupo (**a1b3c3**: Fructosa-Peptona+7%+72horas 3,49; **a1b2c3**: Fructosa-Peptona+5%+72horas 3,45; **a0b2c3**: Glucosa-Peptona+5%+72horas 3,42), caso contrario se observó para el grupo (**a1b0c0**: Fructosa-Peptona+0,5%+0horas 0,61; **a0b3c0**: Glucosa-Peptona+7%+0horas 0,57; **a0b0c0**: Glucosa-Peptona+0,5%+0horas 0,57) que presento el menor contenido.

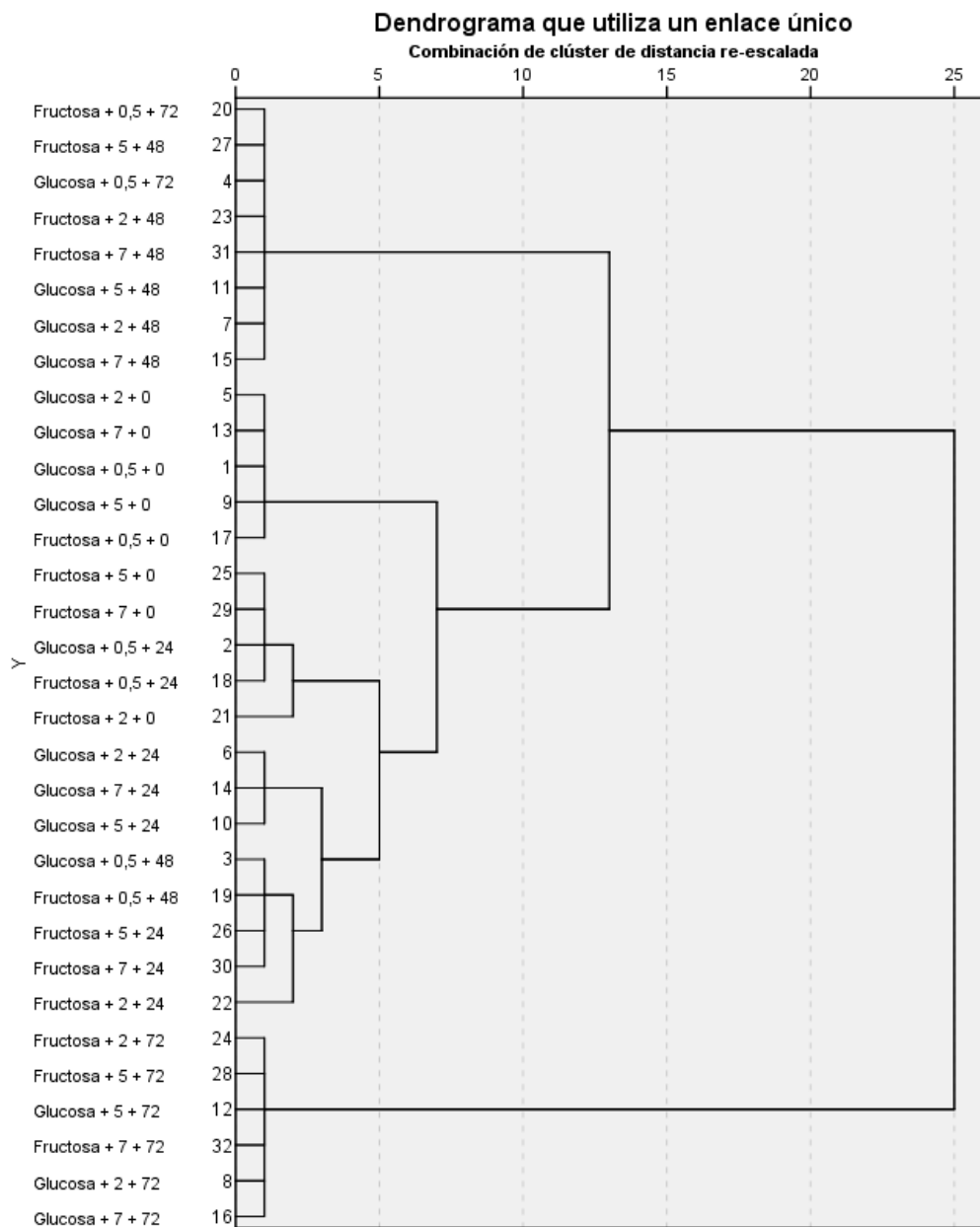
En cuanto a los resultados para la variable Brix se obtuvo que el mayor valor se dio en el grupo (**a1b3c0**: Fructosa-Peptona+7%+0horas 10,30 °Brix; **a0b3c0**: Glucosa-Peptona+7%+0horas 10,30 °Brix; **a1b3c1**: Fructosa-Peptona+7%+24horas 10,03 °Brix), mientras que el menor valor se observó para el grupo (**a1b0c2**: Fructosa-Peptona+0,5%+48horas 3,17 °Brix; **a0b0c2**: Glucosa-Peptona+0,5%+48horas 3,13 °Brix; **a0b0c3**: Glucosa-Peptona+0,5%+72horas 2,70 °Brix; **a1b0c3**: Fructosa-Peptona+0,5%+72horas 2,53 °Brix).

### **Resultado de análisis de conglomerados**

La figura 10, se observa el dendograma mediante un clúster jerárquico que muestra similitudes entre los tratamientos de estudio. Se obtuvo mayor relación entre los tratamientos Fructosa-peptona+0,5%+72horas, Fructosa-peptona+5%+48horas, Glucosa-peptona+0,5%+72horas, Fructosa-peptona+2%+48horas, Fructosa-peptona+7%+48horas, Glucosa-peptona+5%+48horas, Glucosa-peptona+2%+48horas y Glucosa peptona+7%+48horas.

### **Figura 10**

*Dendograma de los tratamientos en estudio.*



Por otra parte, los tratamientos que tienen menor proximidad de los demás tratamientos son Fructosa-peptona+2%+72horas, Fructosa-peptona+5%+72horas, Fructosa-peptona+7%+72horas, Glucosa-peptona+5%+72horas, Glucosa-peptona+2%+72horas y Glucosa-peptona+7%+72horas.

## Análisis de componentes principales

**Tabla 31**

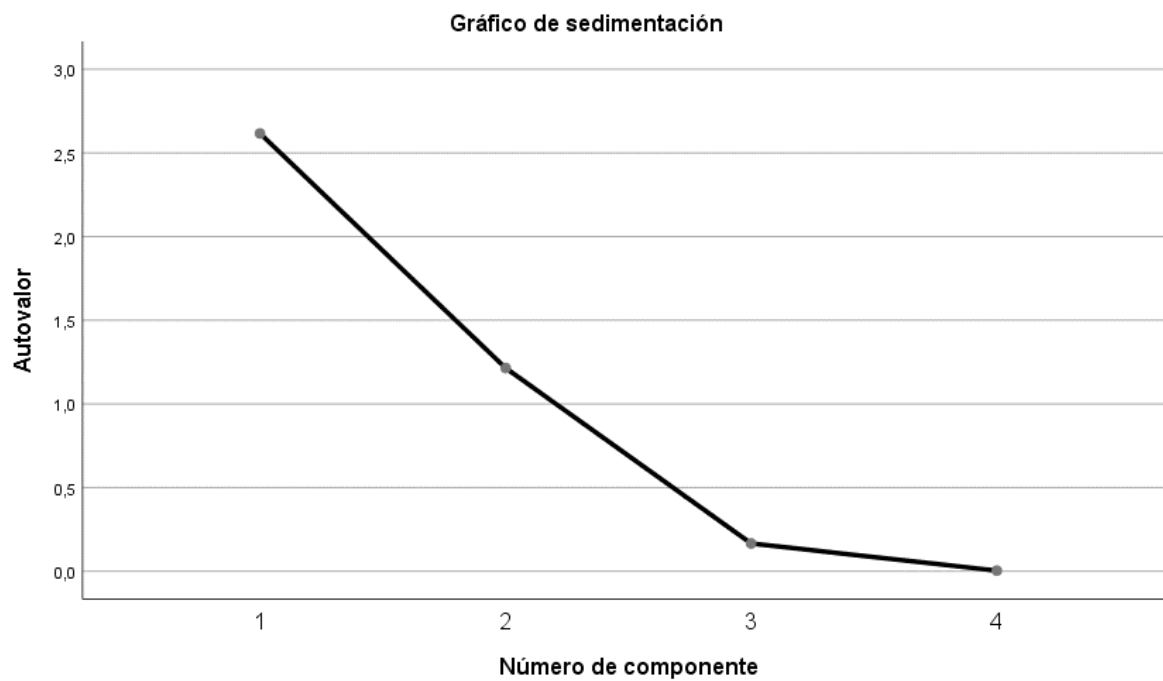
*Matriz de correlación de componentes principales*

Matriz de correlaciones				
	pH	Acidez	Absorbancia	°Brix
pH	1,000	-,710	-,995	,048
Acidez	-,710	1,000	,685	,444
Absorbancia	-,995	,685	1,000	-,099
°Brix	,048	,444	-,099	1,000

La tabla 31, se puede observar que las variables absorbancia (Densidad óptica) y acidez con una mayor correlación positiva (0,685), caso contrario tiene una correlación negativa la variable pH y absorbancia (-0,995).

**Figura 11**

*Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales*



**Tabla 32***Matriz de componentes*

<b>Matriz de componentes <sup>a</sup></b>		
	<b>Componentes</b>	
	1	2
<b>pH</b>	-,964	,226
<b>Acidez</b>	,869	,383
<b>Absorbancia</b>	,953	-,275
<b>°Brix</b>	,152	,970

La figura 11, se detalla los análisis de los 4 componentes evaluados durante el sistema de fermentación. Tal como se puede observar en el gráfico de sedimentación, las dos primeras componentes son útiles en este estudio, por ende, se toman 2 componentes principales para el análisis. También mediante los valores de varianza se pudo determinar el número de componentes principales los cuales deben ser mayor a 1.

La tabla 32 ayuda a determinar cada componente principal extraída tomando en cuenta la dirección y magnitud de los coeficientes de las variables, reconociendo que se cuenta el valor absoluto de los mismos, lo cual nos da una idea de lo significativo de cada componente con las variables estudiadas. Tomando en cuenta que entre mayor sea el valor absoluto es mayor explicada la variable para un determinado componente. En la primera componente se explica muy bien las variables pH, Acidez y absorbancia. Mientras que para la segunda componente explica la variable Brix.

**Tabla 33** *Tabla de comunalidades*

<b>Comunalidades</b>		
	<b>Inicial</b>	<b>Extracción</b>
<b>pH</b>	1,000	,981
<b>Acidez</b>	1,000	,902
<b>Absorbancia</b>	1,000	,984

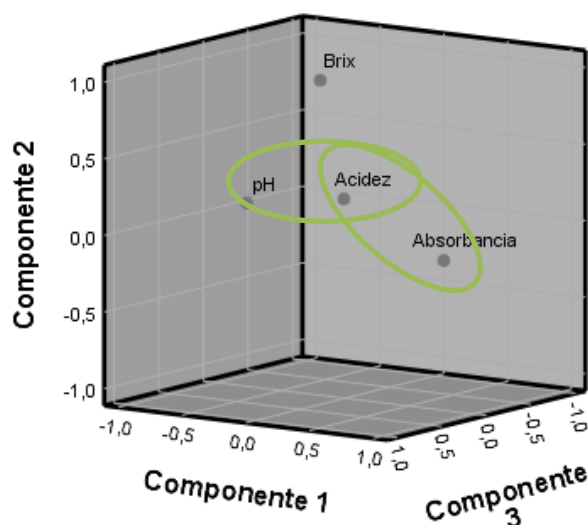
<b>°Brix</b>	1,000	,964
--------------	-------	------

La tabla 33 referente a las comunalidades, se puede observar el porcentaje que cada componente puede explicar de cada variable estudiada. La correlación entre las 2 componentes extraídas para la interpretación de cada una de las variables estudiadas es significativa para la explicación de la variabilidad de datos. El análisis de los componentes principales logra explicar el 98% de pH y absorbancia.

### Figura 12

*Gráfico de componentes principales.*

**Gráfico de componente en espacio rotado**



La figura 12 se obtuvo toda la información agrupada de las correlaciones entre las variables, se observó que las variables pH y absorbancia tienen relación inversa. Así mismo pH con acidez. Mientras que las variables Acidez y Absorbancia tienen una leve relación directa.

## Capítulo V

### Discusión

#### **Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”**

##### **pH**

En el estudio de (Guanoluisa & Lanchimba, 2021) se obtuvo un valor de 3,96 con respecto al pH de la chicha de chontaduro mientras que, en la presente investigación, se obtuvo 4,5. Esta variación de pH se debe a que la bebida se adquirió de la comuna a diferencia de los autores, Guanoluisa y Lanchimba, que prepararon su propia bebida en mejores condiciones, con instrumentos esterilizados. Sin embargo, en el trabajo de (Saigua Chilig & Sánchez Paredes, 2021), el pH es de 4,63, similar al del presente estudio.

En referencia a la Norma Técnica NTE INEN 2262:2013 sobre bebidas alcohólicas, el rango de pH es 3,8 a 4,8 encontrándose esta bebida estudiada dentro de los parámetros establecidos.

##### **Acidez**

En el trabajo Evaluación y caracterización de ácidos orgánicos presentes en cuatro bebidas fermentadas realizado por (Guanoluisa & Lanchimba, 2021), la chicha de chonta obtuvo 0,3 de acidez mientras que, la empleada en este trabajo es de 0,23 cumpliendo con el valor establecido por la Norma Técnica NTE INEN 2262:2013 para bebidas fermentadas (valor máximo 0,3).

##### **Grados alcohólicos y Brix**

Los autores (Guanoluisa & Lanchimba, 2021) obtuvieron 2,5 grados alcohólicos en la chicha de chonta, en cambio en la presente investigación se obtuvo 3 grados alcohólicos igual a lo reportado por (Saigua & Sánchez, 2021), Debido a que la chicha de chontaduro es producida

por el consumo de azúcares por medio de los microorganismos, contiene un bajo nivel de grados alcohólicos (Tipantuña Chiluisa, 2020), estando entre 2,5 a 3 como lo reportan los dos trabajos.

En cuanto a los grados brix el resultado es 3 mientras que (Guanoluisa & Lanchimba, 2021) en su trabajo obtuvo 3,5 grados Brix, por tal motivo, la chicha de chonta no presenta grado Alcohólico muy alto a las 72 horas de fermentación. Si se desea tener mayor grado alcohólico, los grados brix deben subir a 5 – 22 como lo reporta (Saigua & Sánchez, 2021).

En relación a la caracterización microbiológica de la bebida fermentada, mostro un nivel muy inferior de Mohos y levaduras:  $1E+4$  UFC/mL, lo cual demuestra que es una bebida fermentada segura para el consumo. Adicionalmente, tiene un valor incontable de colonias en el petrifilm de ácido lácticas:  $3E+6$  UFC/mL asegurando la presencia de bacterias lácticas en la bebida tradicional, (Murillo & Chiluisa, 2019) en su estudio de la chicha de chontaduro pudo aislar 14 bacterias ácidos lácticas demostrando que existen una diversidad de BAL en la bebida tradicional.

### **Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro**

Según Sánchez (2010) las bebidas fermentadas tienen un ecosistema de microorganismos que dan valor agregado influyendo en las propiedades organolépticas de las bebidas tradicionales, además de alargar su vida útil, ayudando a una degradación tardía de la bebida.

En el presente estudio se aislaron tres cepas bacterianas de la chicha de chontaduro por el método de estría utilizando Agar MRS, en cuanto una colonia era blanquecina-amarillenta, con morfología de bacilo y tinción gram (+). Según Murillo & Pullupaxi (2019), la colonia perteneciente a las bacterias ácidos lácticas obtenidas de la misma bebida fermentada, son microorganismos no esporulados de un color crema-amarilla con textura pastosa, con características de tinción gram positiva y en su mayoría presentan en forma de bacilo.



En cuanto a la identificación, la bacteria seleccionada (colonia 1) cumplió los requisitos de ser una bacteria ácido láctica como lo menciona (Khalid,2011) con catalasa y oxidasa negativa, que crecen en ambientes con pH ácido (4 a 4.5). En la investigación de Murillo y Pullupaxi, las bacterias tienen una morfología similar(bacilos), los géneros identificados por los autores: *Bacillus*, *Lactobacillus brevis*, *Sporolactobacillus* y *Lactobacillus casei*. Por tal motivo la bacteria pertenece al grupo BAL, productoras de bacteriocinas.

### **Análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación bacteriana.**

Para obtener bacteriocinas se usan comúnmente bacterias ácido lácticas (BAL) por su actividad antimicrobiana de inhibir o destruir a otras bacterianas de especies cercanas por lo cual, la industria alimentaria suele emplear para prevenir la degradación de alimentos que causan los microorganismos patógenos (Snyder et al, 2014). La actividad antimicrobiana (halos de inhibición) de la cepa bacteriana fue mayor en el tratamiento Fructosa-peptona+5%+72 hora para las tres bacterias patógenas ( *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus macroides*), teniendo concordancia con el crecimiento bacteriano que fue el mejor. De igual manera, Reddy y colaboradores (2008) menciona que en una fermentación el pH puede descender hasta 4 o menos, como sucedió en la presente investigación para Fructosa-peptona+5%+72 hora, produciendo inhibición de microorganismos patógenos entre otros, permitiendo prolongar la vida útil de un alimento. Respecto al tiempo, el estudio de Rivera (2014) reporta concentraciones elevadas en bacteriocinas al final de la etapa fermentativa.

Las bacteriocinas demostraron ser una gran alternativa para preservar los alimentos, además las BAL tiene beneficios para la salud por la inhibición de patógenos (Monar et al., 2014).

### **Análisis Estadístico**

#### **Tipo de sustratos (Factor A)**

En el estudio de (García et al., 2013) titulado Uso y análisis químicos de distintos sustratos para el desarrollo de biomasa bacteriana, menciona que utilizar una fuente extra de carbono es favorable cuando se necesita tener mayor crecimiento bacteriano, pero no es recomendable si el objetivo es producir ácido láctico, y recalca la importancia de utilizar fuentes de nitrógeno para favorecer la producción de ácido láctico. Por tal razón, se empleó nitrógeno (peptona) y carbono (glucosa y fructosa) de manera equilibrada para aumentar la producción de ácido láctica y, por ende, el crecimiento de las bacterias productoras de bacteriocinas.

Con respecto al tipo de sustrato (Factor A) para los parámetros cinéticos, en cuanto al pH se evidenció que existe diferencia significativa en los valores obtenidos. Para Fructosa-peptona se observó el valor más bajo de (4,78 pH) en comparación con Glucosa-peptona (4,96 pH) siendo entre 4 a 4,5 el pH óptimo de crecimiento de las bacterias ácido lácticas. Sin embargo, hay cepas que pueden crecer hasta un pH de 9 (Fula Arguello, 2010). El pH mide la acidez de una solución, entre más tiempo estén en fermentación las bacterias lácticas, más bajo es el pH debido al crecimiento bacteriano y mayor producción de ácido láctico (Weinberg y Muck, 1996).

Respecto a la acidez, existió diferencia significativa, presentando el sustrato Glucosa-peptona 0,11 de acidez mientras que, el sustrato Fructosa-peptona obtuvo 0,16 de acidez siendo este último el mejor valor. Estos resultados tienen relación inversamente proporcional, el pH disminuye, si la acidez aumenta. Dichos valores son diferentes al trabajo de Uribe-Aveiga (2021) titulado Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchilas, donde obtuvo con el sustrato Glucosa 0,9 de acidez y Fructosa 0,10, debido a que también se agregó una fuente de nitrógeno (peptona) y no solo una fuente de carbono como en el trabajo de Uribe-Aveiga, teniendo así las bacterias más materia prima que degradar.

La absorbancia presentó diferencia significativa, con la mejor absorbancia en Fructosa-peptona: 2,05 respecto Glucosa-peptona: 1,89, lo cual indica mayor crecimiento de BAL en el

sustrato fructosa. En el estudio de Uribe-Aveiga (2021) se evidencia el mismo resultado para las bacterias ácido lácticas, teniendo mayor crecimiento bacteriano para fructosa en comparación de glucosa. Como anteriormente se mencionó, los resultados de absorbancia con la acidez tienen relación debido a que mayor crecimiento bacteriano, mayor ácido láctico producido.

En cuanto a los grados brix, en Fructosa-peptona se obtuvo 7,23, en comparación con Glucosa-peptona 6,73. Según (Reddy et al., 2008), el crecimiento reduce tanto el contenido de carbohidratos de los alimentos que fermentan como el pH por la producción de ácido láctico.

La predisposición de la bacteria aislada es por el sustrato fructosa-peptona, por lo cual se ve un menor pH, mayor acidez y absorbancia, en comparación con el sustrato Glucosa-peptona. Dichos resultados se asemejan a los resultados de (Jawan et al., 2020) en la fermentación teniendo como mejor sustrato a fructosa en comparación con otras fuentes de carbono: sacarosa, galactosa, sorbitol, glucosa, manitol, lactosa y maltosa probadas en dicho estudio. Según (Endo, 2012) en su trabajo titulado las bacterias fructófilas del ácido láctico habitan en nichos ricos en fructosa en la naturaleza, menciona que las bacterias fructófilas del ácido láctico, prefieren el sustrato fructosa a cambio de la glucosa, para su posterior crecimiento, esto se debe a que las bacterias aisladas provienen de una bebida fermentada de un fruto que es rico en fructosa.

### **Concentración del sustrato (Factor B)**

En el estudio (Ossa et al, 2010) menciona que los microorganismos necesitan los nutrientes necesarios para su metabolismo, transformándose en biomasa. Sin embargo, existen más factores como la concentración del sustrato, la cual afecta el nivel de crecimiento y productos generados en el metabolismo siendo importante su evaluación. La investigación de (Hernández-Rosas et al., 2021) afirma que, además de las fuentes de carbono y nitrógeno, es importante tomar en cuenta la concentración y la relación de los mismos en diferentes

condiciones. Por ende, se estudió los sustratos a diferentes concentraciones (0,5%, 2%, 5% y 7 % p/v).

El pH del Factor B (concentración del sustrato) presentó diferencia significativa en los valores obtenidos. Para la concentración 5% p/v se obtuvo el contenido más bajo: 4,72 (mejor resultado) en comparación a las concentraciones 0,5%, 2 % y 7%, variando ampliamente la concentración 0,5% con un pH de 5,23 debido a un bajo porcentaje de sustrato, por consiguiente, la escasez de nutrientes limita la producción de ácido láctico y crecimiento bacteriano. En el trabajo de Uribe-Aveiga (2021), se utilizó la concentración de 5% p/v para los sustratos (Glucosa y Fructosa), teniendo un valor de 4,09 pH (promedio del pH en el sustrato Fructosa y Glucosa). Dicho valor se encuentra en el rango de 4 en pH que se asemeja al obtenido en el presente estudio.

Los resultados de la acidez evidenciaron diferencia significativa, con mayor acidez para la concentración del 7% (0,18) y 5% (0,17), coincidiendo con los valores bajos de pH; teniendo la concentración 0,5% menor acidez (0,06) debido a su concentración baja de sustrato la cual no provee los suficientes nutrientes al medio para que las bacterias puedan metabolizar ácido láctico. La absorbancia también tuvo diferencia significativa, con mayor crecimiento bacteriano en la concentración 5% p/v (2,14) por el bajo pH y mayor producción de ácido láctico el cual generó mayor crecimiento de BAL. En el trabajo de Uribe-Aveiga (2021) se obtuvo 0,11 de acidez y de absorbancia 1,63 (promedio de acidez en el sustrato Fructosa y Glucosa), siendo diferentes los resultados al presente trabajo por la adición de peptona como fuente de nitrógeno, aumentando la producción de ácido láctico (García et al., 2013).

Los grados brix de la concentración 7% fue de 9,38 mientras que la concentración 0,5% obtuvo un valor de 3,34, evidenciándose una diferencia con respecto al valor inicial. Uribe-Aveiga, 2021 obtuvo como resultado mayores grados brix (9,43), debido a que las bacterias no consumen carbohidratos simples o azúcares para obtener energía, limitando el crecimiento de bacterias (Deutscher, 2008). Así mismo Papadimitriou en el 2016, menciona que en un medio

con pH bajo y una alta concentración de carbohidratos, las BAL disminuyen la síntesis de ácido láctico viéndose afectado su crecimiento.

La bacteria utilizada obtuvo mejores resultados con la concentración de 5% p/v por su pH, acidez y grados brix bajos siendo una concentración ideal para aumentar la cinética de crecimiento. Una mayor concentración inicial en la formulación del medio puede generar inhibición del crecimiento bacteriano como lo menciona (Burgos-Rubio et al., 2000) por tal razón, el índice de crecimiento de la concentración 7% bajó en comparación con la concentración 5%. En el estudio de Ossa y colaboradores (2010) también se menciona la influencia del exceso o deficiencia del sustrato en el crecimiento celular dado que al escasear la fuente de carbono las BAL entraron rápidamente a la fase de latencia y muerte disminuyendo la producción de biomasa. Como en el proceso de fermentación los microorganismos compiten por las fuentes de energía y nutrientes, en la fase inicial compiten por los aminoácidos libres y péptidos pequeños disponibles, pero en las últimas fases de la fermentación la competencia es por los péptidos liberados por la acción de las enzimas proteolíticas.

Según Serrazanetti y colaboradores (2013), en el estudio titulado Estreses Dinámicos de Bacterias Ácido Lácticas Asociados a Procesos de Fermentación se evidencia que las condiciones hiperosmóticas impuestas por el estrés del azúcar son menos perjudiciales siendo solo transitorias porque las células tienen la capacidad de equilibrar las concentraciones extra e intracelulares.

### **Tiempo (Factor C)**

En el trabajo titulado Comparación de la producción de bacteriocinas a partir de cepas de *Enterococcus faecium* en suero de queso y medio MRS comercial optimizado (Schirru et al., 2014), menciona que además de los componentes del medio cultivo, existen otros factores como el tiempo que influyen en la producción de bacteriocinas. Por tal motivo se estudió el tiempo como un factor para determinar los parámetros cinéticos de la bacteria y producción de bacteriocinas.

El factor tiempo (Factor C) para los parámetros cinéticos, en cuanto al pH observó diferencia significativa en los resultados obtenidos para cada variable (pH, acidez, absorbancia y grados brix). En cuanto al pH se observó el mejor tiempo a las 72 horas: 3,76 pH, en comparación con el más alto que es el de 0 horas: 5,99 pH, debido a que la bacteria está en una fase de adaptación para el consumo del sustrato y pasar al crecimiento exponencial. La razón por la que resisten a pH bajos es debido a lo mencionado por Martínez y Rodríguez (1996) que tienen las bacterias ácido lácticas propiedades fisicoquímicas que ayuda a resistir a los tratamientos térmicos además de cambios de pH que sufren los alimentos durante su proceso de fabricación.

En relación con la acidez se obtuvo diferencia significativa, teniendo en cuenta que el mejor tiempo para la producción de ácido láctico fue a las 72 horas: 0,18 respecto a las concentraciones (0, 24, 48 horas), lo cual tiene relación con el pH debido a que existe en el medio mayor ácido láctico, mientras que la menor acidez fue a las 0 horas (0,08) donde la bacteria estaba adaptándose para consumir el sustrato para metabolizar. Según Even y colaboradores (2002), las bacterias ácido lácticas son tolerantes a los ácidos, aunque la acumulación de ácido láctico puede influir en la última etapa de crecimiento, debido a la autoacidificación que presentan y no por agotamiento de nutrientes, lo cual al ser un ambiente ácido puede provocar la muerte celular, lo que en el presente trabajo no sucedió debido a que su crecimiento aún estaba en su etapa exponencial a las 72 horas. Los resultados de acidez pueden deberse a que la concentración de nitrógeno era muy baja a comparación de la fuente de carbono (García et al., 2013).

Respecto a la absorbancia existe diferencia significativa en los resultados, donde la cepa bacteriana presenta fase de adaptación de 2 horas aproximadamente compartiendo este resultado con (Brinques et al, 2010) donde se dio en menos de 6 horas. La fase exponencial se reporta aún a las 72 horas, esto se puede deber a la concentración del sustrato y a la cepa bacteriana, aunque cabe destacar que la bacteria no produce tanto ácido láctico entre las 48

horas y 72 horas, debido a que para estas horas la fuente de nitrógeno era mínima, y en el medio quedaba fuente de carbono lo cual generó que la bacteria aun siga creciendo. En el estudio de (Rezvani et al., 2017) titulado Modelos cinéticos de crecimiento de cinco especies de *Lactobacillus* y consumo de lactosa en cultivo sumergido discontinuo, obtuvo mayor crecimiento bacteriano de la bacteria *L. delbrueckii* subsp. *lactis* después de 48 horas, como sucedió en el presente estudio (72 horas).

Los grados brix existieron diferencia significativa, generando un consumo moderado por parte de la bacteria en los sustratos seleccionados, a un tiempo de 0 horas:7,85 grados brix hasta las 72 horas: 6,04, lo cual indica que la bacteria aún estaba metabolizando las fuentes del medio. Lo cual indica que la bacteria siguió en una etapa de crecimiento.

#### **Tipo de sustrato\*concentración del sustrato\*tiempo (Interacción ABC)**

Para las interacciones del factor A (Tipo de sustrato), B (Concentración del sustrato) y C(Tiempo), Según (Alquicira, 2006) la composición del medio de cultivo, como el tipo de sustrato y las concentraciones de las fuentes de nitrógeno y carbono tienen un efecto clave en la producción de bacteriocinas. Existieron diferencias significativas en el pH, con menor pH se tiene a los tratamientos Glucosa-peptona+5%+72 horas (3,55) y Fructosa-peptona+7%+72 horas (3,53), esto se debe a que la cepa bacteriana prefiere fructosa en su mayor concentración, al término de 72 horas aún sigue creciendo lo cual produce que su acidez disminuye. Teniendo una relación inversa entre la absorbancia y el pH. En cambio, se obtuvo un mayor valor de pH en el grupo Fructosa-Peptona+0,5%+0 horas (6,21) evidenciando que la bacteria prefiere un medio más suplementado, además este valor se dio debido a que la bacteria aún estaba en un proceso de adaptación.

Para la acidez se observa diferencia significativa en los resultados, teniendo con mayor producción al grupo Fructosa-peptona+7%+72 horas (0,30), indicando que la bacteria produce mayor ácido láctico a través del tiempo, y que a mayor concentración del sustrato fructosa

tendrá mayor producción de ácido láctico, esto hasta llegar una etapa de muerte provocada por el estrés osmótico autoacidificandose (Serrazanetti et al., 2013; Papadimitriou et al., 2016).

En cuanto a la absorbancia se muestra diferencia significativa, teniendo en cuenta que la cepa bacteriana creció más en el tratamiento Fructosa-peptona+7%+72 horas (3,49), lo cual demostró que el crecimiento bacteriano esta correlacionado con la acidez. Sin embargo, el pH con la absorbancia contiene una relación muy estrecha inversamente proporcional. Los grados brix concuerdan teniendo al tratamiento de menor valor: Fructosa-peptona+0,5%+72 horas (2,53 grados brix) debido a que contiene la menor concentración, y que la bacteria consume los nutrientes en el mayor rango de tiempo estudiado.



## Capítulo VI

### Conclusión

#### **Caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida tradicional fermentada “chicha de chontaduro”**

La chicha de chontaduro cumple los parámetros fisicoquímicos establecidos por las normas INEN 2262 para bebidas alcohólicas, con un pH ácido de 4,5, y acidez elevada (0,23), por presencia de bacterias ácidas lácticas. Los grados alcohólicos (3) son muy bajos por causa de los grados brix (3). En referencia a las características microbiológicas, presentó un nivel muy bajo en Mohos y levaduras de  $1E+4$  UFC/mL y colonias incontables tanto para aerobios ( $2,17E+6$  UFC/mL) como bacterias ácido lácticas ( $3E+6$  UFC/mL) demostrando que es una bebida segura para el consumo.

#### **Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de la chicha de chontaduro**

Se identificó una colonia que presenta características morfológicas similares a la familia de BAL: Blanquecina amarillenta, forma de bacilo y pruebas bioquímicas: Gram Positiva, oxidasa y catalasa negativa descritas para estas bacterias. Además, la colonia creció en un ambiente con un pH ácido de entre 4 y 4,5.

#### **Análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación bacteriana**

El mejor tratamiento es Fructosa-peptona a una concentración del 5% a 72 horas debido a que tiene mayor halo de inhibición en las tres bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*: 263 Au/mL, *Bacillus cereus*: 246 Au/mL y *Lysinibacillus macroides*: 324,9Au/mL), se concluye que la cepa bacteriana aislada produce mayores bacteriocinas a una concentración del 5%, debido a que la concentración del 7% se genera un leve estrés osmótico. La bacteria patógena en donde se dio mayor halo de inhibición es *Lysinibacillus macroides*: 263 Au/mL, es una bacteria gramnegativa.

### **Tipo de sustratos (Factor A)**

En cuanto a los resultados obtenidos de los parámetros cinéticos (pH:4,78, acidez:0,16, absorbancia:2,05 y grados brix:7,23) en la fermentación, se concluye que el mejor sustrato es Fructosa-peptona. La predisposición de la bacteria aislada es por el sustrato Fructosa-peptona, esto se debe a que la bacteria aislada proviene de una bebida fermentada de un fruto (Chonta) rico en fructosa. El medio MRS tiene fuentes de carbono, sin embargo, utilizar una fuente extra de carbono y nitrógeno en el medio fermentativo favorece a un mayor crecimiento bacteriano y producción de ácido láctico, debido a que brinda más nutrientes y energía a la bacteria.

### **Concentración del sustrato (Factor B)**

La concentración del sustrato afecta a los parámetros cinéticos de la bacteria, la cepa bacteriana utilizada obtuvo mejores resultados a la concentración de 5% p/v, en base al pH:4,72, acidez:0,17, absorbancia:2,07 y grados brix:9,38. Una mayor concentración puede afectar al crecimiento bacteriano debido al estrés bacteriano, aunque el estrés del exceso de azúcar es menos perjudicial, hasta puede ser transitoria por la adaptación de la bacteria. La fuente de carbono ayuda al crecimiento bacteriano, en cambio la fuente de nitrógeno ayuda a una mayor producción de ácido láctico, las dos fuentes deben tener un equilibrio para una mejor producción de bacteriocinas.

### **Tiempo (Factor C)**

El tiempo es un factor influyente en la producción de bacteriocinas. En base al (pH:3,76, acidez:0,18, absorbancia:3,18 y grado brix:6,04), se concluye que el mejor tiempo para que se den condiciones óptimas es a las 72 horas, debido a que aún sigue la bacteria en etapa exponencial, generando mayor producción de bacteriocinas. Mencionar que a las 72 horas la concentración de ácido láctico fue constante debido al agotamiento de la fuente de nitrógeno.

### **Tipo de sustrato\*concentración del sustrato\*tiempo (Interacción ABC)**

El mejor tratamiento fue Fructosa.peptona+7%+72 horas, ofrece mayor producción de bacteriocinas y mayor eficiencia en la fermentación, según los parámetros cinéticos obtenidos

(pH:3,53, acidez: 0,30, absorbancia:3,49 y grados brix:7,53). Debido a que aún se encuentra en fase exponencial el crecimiento bacteriano, además de tener un pH muy ácido no permitiendo el crecimiento de más bacterias, al ser tolerante a ambientes ácidos, aunque puede suceder autoacidificación lo cual puede provocar muerte celular, lo cual en el presente trabajo no sucedió. El crecimiento bacteriano para cualquier tipo de bacteria depende principalmente de la composición del medio, concentración del medio de sustrato, pH, temperatura y presencia de inhibidores. La variable pH tiene una correlación inversa con la absorbancia (a menor pH mayor crecimiento bacteriano). Mientras que a mayor crecimiento bacteriano mayor acidez, aunque estos dos parámetros no se correlacionan mucho.

### **Recomendaciones**

Al haber encontrado un exceso de colonias de bacterias ácido-lácticas en el petrifilm ( $3E+6$  UFC/mL), se recomienda usar la bebida chicha de chontaduro para posteriores investigaciones acerca de aislamiento de BAL y producción de bacteriocinas en el área de la industria alimentaria.

Para la siembra de bacterias, realizar diluciones de la bebida fermentada en agua de peptona y ocupar la dilución  $10^{-4}$ , debido a que contiene menor cantidad de bacterias para poder realizar un mejor aislamiento. Para evitar que las placas tengan aglomeraciones excesivas de colonias.

Se recomienda utilizar el medio Muller Agar Hinton para evaluar la actividad antimicrobiana, debido a que es un medio específicamente para realizar pruebas de susceptibilidad a antibióticos, además que en él pueden crecer la mayoría de los microorganismos a enfrentar.

Si las bacterias aisladas son de un producto generado por frutas, se recomienda utilizar un medio suplementado con Fructosa-peptona para tener mejor rendimiento, tanto en el crecimiento de la bacteria como en la producción de ácido láctico.

En base al presente estudio los parámetros cinéticos microbianos y actividad antimicrobiana de la chicha de chontaduro se recomienda al sustrato fructosa-peptona como medio de crecimiento óptimo para las bacterias aisladas.

Al haber encontrado que el mejor tratamiento es a la concentración del 5% p/v se recomienda usar hasta esta concentración para las fuentes de carbono-nitrógeno como máximo porque un medio suplementado al exceso puede causar estrés bacteriano, autoacidificándose inhibiendo el crecimiento bacteriano.

Las bacterias llegan a una etapa de muerte por lo cual se debe tener en cuenta el tiempo de fermentación para cada cepa bacteriana utilizada en un proceso de fermentación, como en el caso de la presente investigación que aún seguía en etapa exponencial a las 72 horas.

Para obtener mayor producción de bacteriocinas con bacterias aisladas de la bebida fermentada de chicha de chontaduro, realizar un medio fermentativo suplementado con Fructosa-peptona al 7%, por 72 horas.

## Bibliografía

- Alquicira, P. L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133 [Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana]. BINDANI.  
[https://bindani.izt.uam.mx/catalog?f%5Bsubject\\_sim%5D%5B%5D=Bacteriocinas&locale=es](https://bindani.izt.uam.mx/catalog?f%5Bsubject_sim%5D%5B%5D=Bacteriocinas&locale=es)
- Anagnostopoulos, D.A., & Tsaltas, D. (2019). Fermented foods and beverages en: C. Galanakis (Ed.), *Innovations in Traditional Foods* (pp. 257-291). Woodhead Publishing.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00010-1>
- And, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82–100. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>
- Axelsson, L., Rud, I., Naterstad, K., Blom, H., Renckens, B., Boekhorst, J., Kleerebezem, M., van Hijum, S., & Siezen, R. J. (2012). Genome sequence of the naturally plasmid-free *Lactobacillus plantarum* strain NC8 (CCUG 61730). *Journal of bacteriology*, 194(9), 2391–2392. <https://doi.org/10.1128/JB.00141-12>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bernardeau, M., Guguen, M., & Vernoux, J. P. (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(4), 487–513. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., & Hansen,

- E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International journal of food microbiology*, 154(3), 87–97.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Brinques, G. B., do Carmo Peralba, M., & Ayub, M. A. (2010). Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(2), 205–212.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-009-0665-1>
- Burgos-Rubio, C. N., Okos, M. R., & Wankat, P. C. (2000). Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology progress*, 16(3), 305–314. <https://doi.org/10.1021/bp000022p>
- Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (2007). Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 43-63. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0021-2>
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00082-3)
- Cavicchioli, V. Q., Todorov, S. D., Iliev, I., Ivanova, I., Drider, D., & Nero, L. A. (2019). Physiological and molecular insights of bacteriocin production by *Enterococcus hirae* ST57ACC from Brazilian artisanal cheese. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 50(2), 369–377.  
<https://doi.org/10.1007/s42770-019-00068-4>
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive*

- Reviews in Food Science and Food Safety, 13(5), 1031-1048.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- Chen, B., Wu, Q., & Xu, Y. (2014). Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. *International journal of food microbiology*, 179, 80–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.011>
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. D. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- Clement, C. R. (1988). Domestication of the Pejibaye Palm (*Bactris gasipaes*): Past and Present. *Advances in Economic Botany*, 6, 155–174.  
<http://www.jstor.org/stable/43927527>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature reviews. Microbiology*, 3(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (pp. 91–142). Springer US.  
[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2668-1\\_3](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2668-1_3)
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.007>
- Endo A. (2012). Fructophilic lactic acid bacteria inhabit fructose-rich niches in nature. *Microbial ecology in health and disease*, 23, 10.3402/mehd.v23i0.18563.  
<https://doi.org/10.3402/mehd.v23i0.18563>
- Ercolini, D., Ferrocino, I., La Storia, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., & Villani, F. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food microbiology*, 27(1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.09.006>

- Ercolini, D., Stora, A., Villani, F., & Mauriello, G. (2006). Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 765–772.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02825.x>
- Escobar Acevedo, Carlos Julio Zuluaga Peláez, John Jairo Martínez Hurtado, Alavaro. (1996). El cultivo de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA.  
<http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4909/2/EI%20cultivo%20de%20chontaduro.pdf>
- Even, S., Lindley, N. D., Loubière, P., & Cocaign-Bousquet, M. (2002). Dynamic response of catabolic pathways to autoacidification in *Lactococcus lactis*: transcript profiling and stability in relation to metabolic and energetic constraints. *Molecular Microbiology*, 45(4), 1143–1152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03086.x>
- Faria-Oliveira, F., Diniz, R.H.S., Godoy-Santos, F., Piló, F.B., Mezadri, H., Castro, I.M., & Brandão, R.L. (2015). The role of yeast and lactic acid bacteria in the production of fermented beverages in South America. En E. Eissa (Ed.), *Food Production and Industry* (pp. 107-135). InTechopen. <https://www.intechopen.com/chapters/48827>
- Fuentes Fanegas, M., Londoño Zapata, A., Durango Zuleta, M., Gutiérrez Buriticá, M., Ochoa Agudelo, S., & Sepúlveda Valencia, J. (2017). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido láctico autóctonas aisladas de queso doble crema y queso colombiano. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 45-55.  
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)45-55](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)45-55)
- Fula Arguello, A. (2010). Desarrollo de una bebida fermentada con adición de cocción de maíz [Trabajo de Grado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional UN.  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/70204>



- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., & Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 22, S58–S66. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.003>
- García, C., Arrázola, G., & Villalba, M. (2013). PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LACTICO DE LACTOSUERO SUPLEMENTADO UTILIZANDO *Lactobacillus casei*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 136-143. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612013000100017&lng=en&tIng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612013000100017&lng=en&tIng=es)
- Graham, C. E., Cruz, M. R., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2017). *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4507–4512. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620432114>
- Grijalva Vallejos, N. J. (2019). Caracterización bioquímica y tecnológica de levaduras aisladas de bebidas fermentadas tradicionales del Ecuador [Tesis doctoral, Universitat de València]. <https://roderic.uv.es/handle/10550/72567>
- Grosu-Tudor, S. S., & Zamfir, M. (2013). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from Romanian fermented vegetables. *Food Biotechnology*, 27(3), 235–248. <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.811082>
- Guanoluisa, T. M., Lanchimba, L. A. (2021). Estudio reológico de las chichas de yuca (manihot esculenta crantz) y chonta (bactris gasipaes) con preparados enzimáticos [Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Digital Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8004>
- Gutiérrez Cortés, C., Suárez, H., Buitrago, G., Neron, L. A., & Dimitrov Todorov, S. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. *Annals of Microbiology*, 68, 383–398. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>

- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of applied microbiology*, 113(4), 723–736.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
- Heatley N. G. (1944). A method for the assay of penicillin. *The Biochemical journal*, 38(1), 61–65. <https://doi.org/10.1042/bj0380061>
- Hernandez-Rosas, F., Castilla-Marroquín, J., Loeza-Corte, J., Lizardi-Jimenez, M., & Hernández Martínez, R. (2021). The importance of carbon and nitrogen sources on exopolysaccharide synthesis by lactic acid bacteria and their industrial importance. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 20(3), Bio2429.  
<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2429>
- Holzappel, W. H., & Wood, B. J. B. (2014). *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons Ltd. <https://www.wiley.com/en-us/Lactic+Acid+Bacteria:+Biodiversity+and+Taxonomy-p-9781444333831>
- Hugenholtz J. (2013). Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Current opinion in biotechnology*, 24(2), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.01.001>
- INEN. (1995). CONSERVAS VEGETALES DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE MÉTODO POTENCIOMÉTRICO DE REFERENCIA. (NTE INEN 381).  
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.pdf>
- INEN. (1998). CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. DETECCIÓN - Primera Edición. (NTE INEN 1 529-11).  
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-11.pdf>
- INEN. (2002). BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. DETERMINACIÓN DEL pH - Primera Revisión. (NTE INEN 2 325:2002).  
<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2325.pdf>

- INEN. (2006). CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP. - Primera Edición. (NTE INEN 1 529-5). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>
- INEN. (2013). BEBIDAS ALCOHOLICAS. CERVEZA. REQUISITOS - Primera revisión. (NTE INEN 2262). [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_340-2.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_340-2.pdf)
- INEN. (2016). BEBIDAS ALCOHÓLICAS. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCOHOL ETÍLICO. MÉTODO DEL ALCOHOLÍMETRO DE VIDRIO - Segunda revisión. (NTE INEN 340). [https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_340-2.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_340-2.pdf)
- Jack, R. W., Tagg, J. R., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, 59(2), 171–200. <https://doi.org/10.1128/mr.59.2.171-200.1995>
- Jans, C., Meile, L., Kaindi, D. W. M., Kogi-Makau, W., Lamuka, P., Renault, P., Kreikemeyer, B., Lacroix, C., Hattendorf, J., Zinsstag, J., Schelling, E., Fokou, G., & Bonfoh, B. (2017). African fermented dairy products - Overview of predominant technologically important microorganisms focusing on African *Streptococcus infantarius* variants and potential future applications for enhanced food safety and security. *International journal of food microbiology*, 250, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.012>
- Jawan, R., Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Mustafa, S., Halim, M., & Ariff, A. B. (2020). Influence of Culture Conditions and Medium Compositions on the Production of Bacteriocin-Like Inhibitory Substances by *Lactococcus lactis* Gh1. *Microorganisms*, 8(10), 1454. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101454>
- Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, J., Lee, H., Shin, H., Kim, B., Franz, C. M., & Holzapfel, W. H. (2013). Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. *Food Control*, 31(2), 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.034>
- Jurado Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y*

- Zootecnia, 7(2), 37-53.  
<https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4379/4020>
- Kaur, S., & Kaur, S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Frontiers in pharmacology*, 6, 272. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
- Kawai, Y., Kemperman, R., Kok, J., & Saito, T. (2004). The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Current protein & peptide science*, 5(5), 393–398.  
<https://doi.org/10.2174/1389203043379549>
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1, 1-13. <https://innspub.net/an-overview-of-lactic-acid-bacteria/>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial pathogenesis*, 128, 171–177.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lee, H.-R., & Lee, J.-M. (2009, Febrero 28). Anti-stress Effects of Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 18(1), 25-30.  
<https://koreascience.kr/article/JAKO200909651055610.page>
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Lim, S. M., & Im, D. S. (2009). Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19(2), 178–186. <https://doi.org/10.4014/jmb.0804.269>
- Liu, J. Y., Li, A. H., Ji, C., & Yang, W. M. (2009). First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary microbiology*, 136(3-4), 314–320.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.027>

- Lv, X. C., Huang, X. L., Zhang, W., Rao, P. F., & Ni, L. (2013). Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Control*, 34(1), 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.020>
- Macfarland. J. 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Hartung de Capriles, C., Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., & Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>
- Mak, P. (2018). Staphylococcal Bacteriocins en V. Savini (Ed.), *Pet-To-Man Travelling Staphylococci* (pp. 161–171). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00013-3>
- Martín-Escolano, R., Cebrián, R., Martín-Escolano, J., Rosales, M. J., Maqueda, M., Sánchez-Moreno, M., & Marín, C. (2019). Insights into Chagas treatment based on the potential of bacteriocin AS-48. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 10, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.03.003>
- Martínez, B. & Rodríguez, A. (1996). Título del trabajo académico en cursiva [Tesis doctoral, Universidad de Oviedo]. Digital.CSIC. <http://hdl.handle.net/10261/8416>.
- Mora-Urpí, J. M., Weber, J. C., & Clement, C. R. (1997). Peach Palm, *Bactris Gasipaes* Kunth. IPGRI. [https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/104964/Peach\\_palm\\_Bactris\\_gasipaes\\_Kunth\\_155.pdf?sequence=3&isAllowed=y](https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/104964/Peach_palm_Bactris_gasipaes_Kunth_155.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Murillo, E. L., & Pullupaxi. L. S. (2019). Aislamiento e Identificación de Microorganismos Fermentadores de una Bebida Ancestral fermentada (chicha) a partir de Chonta (*bactris gasipaes* h.b.k) [Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Técnica de Cotopaxi].

Repositorio Digital Universidad Técnica de Cotopaxi.

<http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6145>

Nout, M.J.R. (2014). Food technologies: Fermentation en: Y. Motarjemi, G. Moy, & E. Tood (Eds.), *Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 3, pp. 168-177). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00270-5>

Olivares-Illana, V., Wachter-Odarte, C., Le Borgne, S., & López-Munguía, A. (2002).

Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: a *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28(2), 112–117.

<https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000224>

Ossa, J. A., Vanegas, M. C., & 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*, 13(1), 97-104.

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262010000100011&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000100011&lng=en&tlng=es)

Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279–289

Qiao, N., Wittouck, S., Mattarelli, P., Zheng, J., Lebeer, S., Felis, G. E., & Gänzle, M. G. (2022).

After the storm-Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae. *JDS communications*, 3(3), 222–227. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M.,

Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turróni, F., van Sinderen, D.,

Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress

Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 80(3), 837–890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>

- Patel, A., Prajapati, J. B., Holst, O., & Ljungh, A. (2014). Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, 5, 27–33.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.10.002>
- Patiño, V. M. (1992). An Ethnobotanical Sketch of the Palm *Bactris (Guilielma) gasipae*. *Principios*, 36(3), 143–147. <https://palms.org/wp-content/uploads/2016/05/vol36n3p143-147.pdf>
- Preciado, G. M., Michel, M. M., Villarreal-Morales, S. L., Flores-Gallegos, A. C., Aguirre-Joya, J., Morlett-Chávez, J., Aguilar, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2016). Bacteriocins and its use for multidrug-resistant bacteria control en: L. Versteeg-buschman (Ed.), *Antibiotic Resistance* (pp. 329–349). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00016-2>
- Ranadheera, R., Baines, S., & Adams, M. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., & Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnology advances*, 26(1), 22–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.004>
- Reyes Franco, H. M., Reyes Cuesta, R., Bastidas Pérez, S., Tolosa Montaña, W., Lohr, B. L., Gaviria Vega, J., & Moreno Caicedo, L. P. (2019). Prácticas de manejo sostenible para el cultivo de chontaduro. Repositorio Institucional Agrosavia.  
<http://hdl.handle.net/20.500.12324/35027>
- Rezvani, F., Ardestani, F., & Najafpour, G. (2017). Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 48(2), 251–258.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.007>

- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5-6), 357–364. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01421-9](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01421-9)
- Romero-Luna, H.E., Hernández-Sánchez, H., & Dávila-Ortiz, G. (2017) Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source. *Annals of Microbiology*, 67, 577–586. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1290-2>
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
- Sahl, H. G., & Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*, 52, 41–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.41>
- Sahoo, T. K., Jena, P. K., Patel, A. K., & Seshadri, S. (2015). Purification and Molecular Characterization of the Novel Highly Potent Bacteriocin TSU4 Produced by *Lactobacillus animalis* TSU4. *Applied biochemistry and biotechnology*, 177(1), 90–104. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1730-z>
- Saigua, P. E., & Sánchez, M.B. (2021). Evaluación y caracterización de ácidos orgánicos presentes en cuatro bebidas ancestrales fermentadas con preparados enzimáticos [Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Digital Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8175>
- Salazar Alvarez, G. L. (2017). Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de *Theobroma cacao* L. de la variedad “Chuncho” obtenida en Cuzco, Perú [Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. Repositorio Institucional Universidad Peruana Cayetano Heredia. <https://hdl.handle.net/20.500.12866/1436>



- Sangwan, S., Kumar, S., & Goyal, S. (2014). Maize Utilisation in Food Bioprocessing: An Overview en: D. Chaudhary, S. Kumar & S. Langyan (Eds), *Maize: Nutrition Dynamics and Novel Uses*. Springer, New Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1623-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1623-0_10)
- Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Fancello, F., de Melo Franco, B. D. G., de Souza Oliveira, R. P., & Todorov, S. D. (2014). Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, 64(1), 321–331. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0667-0>
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1–3), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>
- Serrazanetti, D. I., Gottardi, D., Montanari, Ch., Gianotti, A.}. (2013). Dynamic Stresses of Lactic Acid Bacteria Associated to Fermentation Processes en J. Marcelino Kongo (Ed.), *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. IntechOpen.
- Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS). (2020, Noviembre 08). ITIS - Report: *Bactris gasipaes*. Integrated Taxonomic Information System. Retrieved December 14, 2022, from [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=506706#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=506706#null)
- Steinkraus, K.H. (1995). *Handbook of Indigenous Fermented Foods, Revised and Expanded (2nd Edition)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203752821>
- Tamang, J. P. (2015). *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*. Taylor & Francis.
- Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2009). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *International journal of food microbiology*, 135(1), 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.016>

- Tamang, J. P., Watanabe, K., & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in microbiology*, 7, 377.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Terefe, N. (2016). Food fermentation en: G. Smithers (Ed.), Reference Module in Food Science. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03420-X>
- Tipantuña Chiluisa, N. V.(2020). Cinética del crecimiento de microorganismos durante el proceso de fermentación de una bebida ancestral elaborada a partir de chonta (*Bactris gasipaes*). [Trabajo de Fin de Carrera, Universidad Técnica de Cotopaxi]. Repositorio Digital Universidad Técnica de Cotopaxi. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/6705>
- Uribe-Aveiga, B. N. (2021). Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá). [Trabajo de Fin de Carrera, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. Repositorio de la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE/ 03. Sede Santo Domingo. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/25911>
- Valencia, R., Montúfar, R., Navarrete, H., & Balslev, H. (2013). Palmas ecuatorianas: biología y uso sostenible. Quito, Ecuador: Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://dspace.uhemisferios.edu.ec:8080/xmlui/handle/123456789/469>.
- Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology*, 38(2), 369-380.<https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>
- Vallejo Yucci, T. E., León, P., & Torres, D. (2017). Fiesta de la chonta y su impacto en el turismo comunitario del pueblo shuar. *Killkana Social*, 1(3), 9–14.  
<https://doi.org/10.26871/killkanasocial.v1i3.57>
- Vásquez M, Sandra Milena, Suárez M, Héctor, & Zapata B, Sandra. (2009). USE OF ANTIMICROBIAN SUBSTANCES PRODUCED BY ACID LACTIC BACTERIAS ON

MEAT CONSERVATION. *Revista chilena de nutrición*, 36(1), 64-71.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>

Weinberg, Z..G., & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews*, 19(1), 53–68.

[https://doi.org/10.1016/0168-6445\(96\)00025-3](https://doi.org/10.1016/0168-6445(96)00025-3)

Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, 5, 241.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00241>

Zuluaga, J. J., Martínez, A. & Escobar, C. J. (1996). El cultivo de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Repositorio Institucional Agrosavia. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/33083>

Zheng, J., Gänzle, M. G., Lin, X. B., Ruan, L., & Sun, M. (2015). Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environmental microbiology*, 17(6), 2133–2143.

<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12662>