



“Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá)”

Uribe Aveiga, Briggith Nathaly

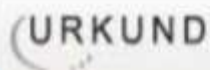
Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Sánchez LLaguno, Sungey Naynee, Ph.D.

07 de septiembre del 2021



Document [TESIS Srta. URIBE AVEIGA BRIGGITH NATHALY.docx](#) (D111984041)

Submitted 2021-09-02 11:06 (-05:00)

Submitted by Juan Alejandro Neira Mosquera (neiramosquera@uteq.edu.ec)

Receiver neiramosquera.uteq@analysis.orkund.com

8% of this approx. 36 pages long document consists of text present in 8 sources.

Firma:



Firma electrónica por:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

.....
Sungey Naynee Sánchez Llaguno, Ph.D.

C. C.:1205348673

Directora de proyecto de investigación



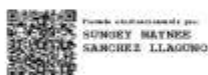
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación "**Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá)**", fue realizado por la señorita **Uribe Aveiga Briggith Nathaly**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 07 de septiembre de 2021

Firma:



.....
Sungey Naynee Sánchez Llaguno, Ph.D.

C. C.:1205348673

Directora de proyecto de investigación



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Uribe Aveiga Briggith Nathaly**, con cédula de ciudadanía N°2350041352, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: es de mi autoría y responsabilidad, **"Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá)"**, 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, 07 de septiembre de 2021

Firma

Uribe Aveiga Briggith Nathaly

C.C.: 2350041352



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Uribe Aveiga Briggith Nathaly**, con cédula de ciudadanía N° 2350041352, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá)"**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 07 de septiembre de 2021

Firma

Uribe Aveiga Briggith Nathaly

C.C.:2350041352

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia por apoyarme durante este largo camino de preparación académica y estar junto a mí siempre.

A mi abuelita Rosario, la vida no ha sido la misma desde tu partida.

Briggith.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por permitirme cumplir un paso más dentro de mi formación académica y nunca abandonarme.

Agradezco a mi familia por apoyarme en cada decisión. A mi mamá por cuidarme y tratar de desvelarse en aquellas madrugadas de estudio, aunque fuese en vano. A mi papá por considerarme la mejor de todas. A mi hermana Majo por acolitarme en cada aventura. A mi hermano Javier por siempre esperarme y recibirme con alegría y añoranza cada tarde luego de la universidad. A mis hermanos Matías y Pepe, por alegrarme con sus ocurrencias.

A mis amigos del colegio, Diana, Dahira, Juan, Josué, aunque hayamos tomado distintos caminos siempre han estado conmigo presentes.

A mis amigos de la universidad, sin ustedes la experiencia de esta etapa no hubiese podido ser mejor, gracias por siempre creer en mi aunque ni yo misma lo haga. Gracias Jessi, Angela, Gene, Joss, Jonny, Nico, Tefy, y la lista sigue pero no me alcanzaría para nombrarlos a todos, muchas gracias.

Agradezco a mis docentes y demás trabajadores de la universidad, que con paciencia me han ayudado en mi formación académica. A mi tutora PhD Sungey Sánchez por aceptarme bajo su tutela y por todo el apoyo brindado, así como al PhD Juan Neira por toda la guía y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

Por ultimo pero no menos importante, agradezco a la comuna Tsáchila Chigüilpe por ayudarme en la realización de esta investigación, por permitirme utilizar parte de sus saberes ancestrales en pro de la ciencia.

Briggith.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| Carátula..... | 1 |
| Análisis Urkund | 2 |
| Certificación..... | 3 |
| Responsabilidad de autoría | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria | 6 |
| Agradecimiento | 7 |
| Resumen..... | 14 |
| Abstract | 15 |
| Capítulo I..... | 16 |
| Introducción..... | 16 |
| Objetivos | 17 |
| Objetivo general | 17 |
| Objetivos específicos..... | 17 |
| Hipótesis | 18 |
| I Hipótesis nula | 18 |
| II Hipótesis alternativa..... | 18 |
| Capitulo II | 19 |
| Revisión de Literatura..... | 19 |
| Bebidas tradicionales fermentadas | 19 |
| Malá | 20 |
| Proceso de elaboración de malá | 21 |
| Microorganismos fermentadores | 23 |
| Probióticos..... | 24 |
| Bacteriocinas..... | 25 |
| Mecanismo de acción de las bacteriocinas..... | 27 |
| Métodos de evaluación de actividad bacteriocina <i>in vitro</i> | 28 |
| Método de difusión en disco de agar | 28 |
| Método de gradiente antimicrobiano | 28 |

| | |
|--|----|
| Método de difusión de pozos | 28 |
| Método de difusión de tapón..... | 29 |
| Método de comida envenenada..... | 29 |
| Método de dilución en caldo | 29 |
| Cromatografía de capa fina (TLC) –bioautografía | 30 |
| Prueba de tiempo muerto | 30 |
| Aplicaciones de las bacteriocinas | 31 |
| Capitulo III | 32 |
| Metodología | 32 |
| Ubicación del area de Investigación | 32 |
| Ubicación política..... | 32 |
| Ubicación geográfica | 32 |
| Ubicación ecológica..... | 33 |
| Materiales..... | 34 |
| pH..... | 34 |
| Grados alcohólicos | 34 |
| Determinación de acidez | 34 |
| Densidad | 34 |
| Grados Brix..... | 35 |
| Caracterización microbiológica | 35 |
| Tinción Gram | 35 |
| Ensayo de catalasa | 35 |
| Sistemas de fermentación | 36 |
| Parámetros cinéticos | 36 |
| Obtención de bacteriocina | 36 |
| Ensayos <i>in vitro</i> | 36 |
| Métodos..... | 37 |
| Caracterización fisicoquímica de la bebida fermentada | 37 |
| Caracterización microbiológica de la bebida fermentada | 38 |
| Establecimiento de un sistema de fermentación y producción de bacteriocina | 40 |
| Ensayos de actividad bacteriocina..... | 42 |
| Diseño experimental | 43 |
| Análisis estadístico | 44 |
| Variables a evaluar | 45 |
| Capítulo IV | 46 |

| | |
|--|----|
| Resultados | 46 |
| Caracterización de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la bebida fermentada (malá). | 46 |
| Aislamiento de bacterias con potencial bacteriocina a partir de la bebida fermentada (malá). | 47 |
| Secuenciación | 48 |
| Estudio del comportamiento de los parámetros cinéticos microbianos | 49 |
| Análisis de la actividad bacteriocina subproducto del proceso de fermentación bacteriana..... | 55 |
| Análisis estadístico | 56 |
| Análisis de varianza para las variables de estudio..... | 56 |
| Análisis de varianza para la variable Acidez | 56 |
| Análisis de varianza para la variable pH | 57 |
| Análisis de varianza para la variable ° Brix | 58 |
| Análisis de varianza para la variable OD..... | 59 |
| Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición para <i>E. coli</i> | 60 |
| Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición para <i>R. stolonifer</i> | 61 |
| Prueba de significancia de Tukey del Factor A | 62 |
| Prueba de significancia de Tukey del Factor B | 64 |
| Prueba de significancia de Tukey de la interacción AxB | 66 |
| Resultado de gráficos de superficie de respuesta..... | 69 |
| Gráfico de superficie de respuesta de la variable Acidez | 69 |
| Gráfico de superficie de respuesta de la variable ° Brix. | 70 |
| Gráfico de superficie de respuesta de la variable pH | 71 |
| Gráfico de superficie de respuesta de la variable Densidad Óptica | 72 |
| Gráfico de superficie de respuesta de la variable Zona de Inhibición en <i>E. coli</i> | 73 |
| Gráfico de superficie de respuesta de la variable Zona de Inhibición en <i>R. stolonifer</i> | 74 |
| Resultado de análisis de conglomerados..... | 75 |
| Análisis de componentes principales | 76 |
| Capitulo V..... | 80 |
| Discusión..... | 80 |
| Capitulo vi | 96 |
| Conclusiones y Recomendaciones..... | 96 |
| Bibliografía | 98 |

Índice de tablas

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabla 1 | Ejemplos de bacteriocinas y sus características. | 26 |
| Tabla 2. | Recursos utilizados para la determinación de pH | 34 |
| Tabla 3. | Recursos utilizados para la determinación de grados alcohólicos..... | 34 |
| Tabla 4. | Recursos utilizados para la determinación de acidez..... | 34 |
| Tabla 5. | Recursos utilizados para determinación de la densidad..... | 34 |
| Tabla 6. | Recursos utilizados para la determinación de grados Brix | 35 |
| Tabla 7. | Recursos utilizados para la caracterización microbiológica..... | 35 |
| Tabla 8. | Recursos utilizados para tinción Gram..... | 35 |
| Tabla 9. | Recursos utilizados para el ensayo de catalasa..... | 35 |
| Tabla 10 | Recursos utilizados para la implementación de sistemas de fermentación. | 36 |
| Tabla 11 | Recursos utilizados para el Registro de parámetros cinéticos. | 36 |
| Tabla 12 | Recursos utilizados para la obtención de extractos libres de células - bacteriocina. | 36 |
| Tabla 13 | Recursos utilizados para los ensayos de actividad bacteriocina. | 36 |
| Tabla 14. | Factores y niveles a probar en los parámetros de crecimiento de las bacterias aisladas..... | 43 |
| Tabla 15. | Tratamientos a comparar en los parámetros de crecimiento de las bacterias. | 43 |
| Tabla 16. | Esquema del análisis de varianza para comparar los parámetros de crecimiento de las bacterias. | 44 |
| Tabla 17 | Parámetros físico-químicos de la chicha..... | 46 |
| Tabla 18 | Parámetros microbiológicos de la chicha. | 46 |
| Tabla 19 | Cepas bacterianas aisladas de la bebida fermentada. | 47 |
| Tabla 20 | Resultados de la secuenciación. | 48 |
| Tabla 21 | Unidades Arbitrarias de los tratamientos estudiados. | 55 |
| Tabla 22 | Análisis de varianza para la variable Acidez..... | 56 |
| Tabla 23 | Análisis de varianza para la variable pH | 57 |
| Tabla 24 | Análisis de varianza para la variable ° Brix..... | 58 |
| Tabla 25 | Análisis de varianza para la variable OD. | 59 |
| Tabla 26 | Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición para E. coli. | 60 |
| Tabla 27 | Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición en R. stolonifer..... | 61 |
| Tabla 28 | Resultados de Tukey del Factor A (Colonia) | 62 |
| Tabla 29 | Resultados de Tukey del Factor B (Fuente de carbono)..... | 64 |

| | |
|--|----|
| Tabla 30 Resultados de Tukey para la interacción AxB (Colonia x Fuente de carbono). | 66 |
| Tabla 31 Matriz de correlación de componentes principales..... | 76 |
| Tabla 32 Matriz de componentes..... | 77 |
| Tabla 33 Tabla de comunalidades..... | 78 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Mujeres Nativas elaborando malá durante la fiesta Kasama. | 21 |
| Figura 2 Proceso de elaboración de malá. Elaboración propia. | 22 |
| Figura 3 Mecanismos de funcionalidad probiótica de las bacteriocinas. | 27 |
| Figura 4. Mapa de ubicación geográfica del área de investigación. | 33 |
| Figura 5 Cambios de pH en la colonia 1. | 49 |
| Figura 6 Cambios de pH en la colonia 2. | 49 |
| Figura 7 Cambios de pH en la colonia 3. | 50 |
| Figura 8 Cambios de % de ácido láctico en la colonia 1. | 50 |
| Figura 9 Cambios de % de ácido láctico en la colonia 2. | 51 |
| Figura 10 Cambios de % de ácido láctico en la colonia 3. | 51 |
| Figura 11 Cambios de ° Brix en la colonia 1. | 52 |
| Figura 12 Cambios de ° Brix en la colonia 2. | 52 |
| Figura 13 Cambios de ° Brix en la colonia 3. | 53 |
| Figura 14 Cambios de OD la colonia 1. | 53 |
| Figura 15 Cambios de OD la colonia 2. | 54 |
| Figura 16 Cambios de OD la colonia 3. | 54 |
| Figura 17. Gráfico de superficie de respuesta para Acidez. | 69 |
| Figura 18 Gráfico de superficie de respuesta para ° Brix. | 70 |
| Figura 19 Gráfico de superficie de respuesta para pH. | 71 |
| Figura 20 Gráfico de superficie de respuesta para OD. | 72 |
| Figura 21 Gráfico de superficie de respuesta para Zona de Inhibición en <i>E. coli</i> | 73 |
| Figura 22 Gráfico de superficie de respuesta para Zona de Inhibición en <i>R. stolonifer</i> | 74 |
| Figura 23 Dendrograma de los tratamientos estudiados. | 75 |
| Figura 24 Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales. | 76 |
| Figura 25 Gráfico de componentes principales. | 79 |

RESUMEN

Las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular que exhiben propiedades antimicrobianas, los cuales son sintetizados por los ribosomas por una amplia gama de bacterias. Se han reportado múltiples bacterias productoras de bacteriocinas aisladas de diferentes orígenes, y entre los más interesantes se encuentran los alimentos fermentados. En la siguiente investigación se caracterizó una bebida fermentada (malá) de una nacionalidad autóctona ecuatoriana, los Tsáchilas, con el objetivo de aislar bacterias capaces de producir sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina en contra de *E. coli* y *R. stolonifer*. Además se evaluaron distintas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa) para evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento de tres bacterias aisladas (*Bacillus licheniformis*, *Oceanobacillus* sp y *Staphylococcus sciuri*) mediante un diseño de bloques al azar con arreglo factorial AxB, para identificar diferencias significativas entre los tratamientos estudiados se aplicó la prueba de Tukey ($p > 0.05$). Se encontró que los resultados de pH, acidez, densidad óptica y grados Brix fueron mejores en *Bacillus licheniformis* en medio suplementado con sacarosa. En cuanto a la actividad inhibitoria, la mejor interacción encontrada fue de *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus sciuri* con fructosa, por separado. Se recomienda continuar con investigaciones acerca del potencial antimicrobiano de *Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus sciuri*, con medios ricos en fructosa y sacarosa.

Palabras clave:

- **BACTERIOCINA**
- **FUENTE DE CARBONO**
- **BEBIDA FERMENTADA**
- ***BACILLUS LICHENIFORMIS***
- ***STAPHYLOCOCCUS SCIURI***

ABSTRACT

Bacteriocins are low molecular weight peptides that exhibit antimicrobial properties, which are synthesized by ribosomes by a wide range of bacteria. Multiple isolated bacteriocin-producing bacteria of different origins have been reported, and among the most interesting are fermented foods. In the following investigation, a fermented beverage (malá) from an indigenous Ecuadorian nationality, the Tsáchilas, was characterized with the aim of isolating bacteria capable of producing bacteriocin-type inhibitory substances against *E. coli* and *R. stolonifer*. In addition, different carbon sources (glucose, sucrose, lactose, fructose) were evaluated to estimate the kinetic growth parameters of three isolated bacteria (*Bacillus licheniformis*, *Oceanobacillus sp* and *Staphylococcus sciuri*) by a randomized block design with AxB factorial arrangement, to identify significant differences between the studied treatments, the Tukey test ($p>0.05$) was applied. It was found that the results of pH, acidity, optical density and ° Brix were better in *Bacillus licheniformis* in a medium supplemented with sucrose. Regarding the inhibitory activity, the best interaction found was of *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus sciuri* with fructose, separately. It is recommended to continue with research on the antimicrobial potential of *Bacillus licheniformis* and *Staphylococcus sciuri*, with media rich in fructose and sucrose.

Key words:

- **BACTERIOCIN**
- **CARBON SOURCE**
- **FERMENTED BEVERAGE**
- ***BACILLUS LICHENIFORMIS***
- ***STAPHYLOCOCCUS SCIURI***

CAPÍTULO I

Introducción

La fermentación es un proceso que históricamente se ha usado ya sea para la preservación de alimentos así como para el mejoramiento de sus propiedades organolépticas. Las bebidas fermentadas son aquellas producidas mediante el crecimiento controlado de microorganismos y la conversión de componentes alimentarios por mecanismos enzimáticos, dentro de parámetros ambientales específicos. (Dimidi, Cox, Rossi, & Whelan, 2019)

Como sustratos para la elaboración de bebidas fermentadas se han usado distintos alimentos como leche, frutas, vegetales y cereales. Estos últimos podrían ser mayormente considerados para el diseño de bebidas fermentadas con características probióticas si estas formulaciones cumplen con los requisitos funcionales y tienen características fisicoquímicas y propiedades organolépticas aceptables. (Salmerón, 2017)

En las culturas antiguas alrededor del mundo, se han registrado una gran variedad de bebidas fermentadas alcohólicas, como *chang* en China, *pulque* en México, *chicha* en Colombia, Ecuador y Perú, entre otras. (Rizo, y otros, 2018). Cabe recalcar que en Ecuador, país multiétnico y plurinacional, existen distintas bebidas fermentadas propias de cada pueblo, sin embargo poca investigación se ha hecho en torno a sus propiedades microbiológicas y fisicoquímicas, existiendo un gran sesgo de información en cuanto a las bebidas tradicionales existentes.

En Santo Domingo, existe una nacionalidad única en el mundo, los *Tsáchilas*. Este pueblo cuenta con su bebida típica que es el *malá*, la cual es una bebida fermentada a base de caña de azúcar y maíz, cultivados en la zona. Es una bebida

sagrada que se toma en festividades tales como la fiesta *Kasama* o Nuevo Amanecer. (Espinosa, 2019)

Las bebidas fermentadas no solo constituyen un patrimonio cultural o un punto de turismo; el estudio microbiológico de estas puede permitir conocer a fondo sus procesos fermentativos, reconocer las especies bacterias nativas responsables del proceso y las propiedades fisicoquímicas que influyen en la elaboración de estas bebidas. El malá es una bebida consumida en festividades importantes dentro de la nacionalidad Tsáchila pero debido a su inexistente investigación sobre la misma aún no se tiene claro todos estos parámetros, no se reconocen las bacterias responsables del proceso y la conservación de esta bebida podría correr un riesgo debido a la falta de información microbiológica. Además es importante identificar los compuestos bioactivos que pueden generarse a partir de estos procesos fermentativos y establecer sus beneficios dentro de la bebida preparada.

Objetivos

Objetivo general

Aislar y caracterizar bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá).

Objetivos específicos

- Caracterizar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la bebida fermentada (malá).
- Estudiar el comportamiento de los parámetros cinéticos microbianos y actividad antimicrobiana de tres cepas de bacterias aisladas de la bebida fermentada (malá).
- Evaluar los parámetros de crecimiento y producción de bacteriocina en base a cuatro fuentes de carbono distintas.

Hipótesis

I Hipótesis nula

- **H0:** Las cepas bacterianas estudiadas no influyen en los parámetros cinéticos microbianos y la actividad antimicrobiana.
- **H0:** Las cuatro fuentes de carbono empleadas no influyen en los parámetros de crecimiento y producción de bacteriocina.

II Hipótesis alternativa

- **H1:** Las cepas bacterianas estudiadas influyen en los parámetros cinéticos microbianos y la actividad antimicrobiana.
- **H1:** Las cuatro fuentes de carbono empleadas influyen en los parámetros de crecimiento y producción de bacteriocina.

CAPITULO II

Revisión de Literatura

Bebidas tradicionales fermentadas

La fermentación es un proceso que ha sido ampliamente utilizado por siglos enteros por la humanidad con el fin de procesar y preservar los alimentos. Este proceso consiste en el desarrollo de las actividades metabólicas de los microorganismos que a su vez mejoran la seguridad y propiedades sensoriales y nutricionales (olor, sabor, textura) de la materia prima, ya sean carne, vegetales, frutas, productos lácteos, cereales, etc. (Romero-Luna, Hernández-Sánchez, & Dávila-Ortiz, 2017)

Se ha visto el vasto desarrollo de productos fermentados a nivel industrial como yogurt, cerveza, vino, pan, entre otros, que han sido estudiados a profundidad y por lo tanto se tiene una amplia literatura científica acerca de estos productos. Por otro lado, también existen un sinnúmero de productos fermentados tradicionales, que son producidos de forma artesanal por determinados grupos étnicos utilizando técnicas ancestrales y equipos rudimentarios a partir de materias primas disponibles localmente, como parte de su cultura gastronómica. (Bikila, 2020)

Específicamente las bebidas fermentadas de estos grupos suelen tener muchas aplicaciones ya sea como alimento, medicina, reuniones sociales o en ritos religiosos. Se conoce que estas bebidas al ser fermentadas contienen una gran diversidad microbiológica que las enriquecen con múltiples nutrientes y probióticos. Alrededor del mundo se conocen varias bebidas fermentadas tradicionales tales como *pulque*, *colonche*

en México, *tella*, *areki* en Etiopia, *jann*, *apong* en India, *jiuniang*, *baijiu* en China, *chicha* en Ecuador.

Malá

Dentro de las nacionalidades de Ecuador, existe la chicha como bebida representativa de sus pueblos y nacionalidades. Cada uno de ellos le llama de forma distinta, en el caso de la comunidad Tsáchila, ubicada en Santo Domingo, la chicha es conocida como *malá* en su idioma *tsáfiqui*.

El malá es la bebida representativa de esta comunidad, se bebe en ocasiones especiales por ello se la conoce como una bebida de festejo. Especialmente se la consume durante la fiesta *Kasama* o “Nuevo Amanecer” que se celebra a mediados de abril. En esta festividad se celebra la culminación de un año y se espera comenzar uno nuevo con abundancia y prosperidad para las comunas. Se realizan varias actividades como representaciones artísticas, musicales, juegos, danza, comida, rituales de purificación y no puede faltar el malá. Además de esta celebración, la chicha de los Tsáchilas también es consumida en demás días festivos y reuniones especiales como los matrimonios, y durante las mingas comunitarias porque se la considera como una bebida para compartir.

Al ser una bebida fermentada se generan grados alcohólicos durante su proceso de reposo por ello, entre más tiempo tenga la bebida, mayor concentración de alcohol tendrá, en el caso de los niños también pueden tomarla, sin embargo para disminuir el grado alcohólico se le agrega jugo de caña de azúcar.



Figura 1 Mujeres Nativas elaborando malá durante la fiesta Kasama.

Proceso de elaboración de malá

De forma general, el principal ingrediente es el jugo de caña. Los vegetales son ampliamente variados en sus versiones de la chicha. Existe el *pa-ko malá* que se realiza con choclo tierno cocinado, *lum malá* hecho a base de maduro y es la chicha más dulce de todas; también *agüe malá* con chonta, *cuchu malá* con yuca, *urú malá* con yuca y choclo, y el *yo malá* utilizado específicamente en rituales y es conocido como chicha del sol.

En el caso del *pa-ko malá*, su proceso de elaboración (Figura 2) empieza con la extracción del jugo de caña de azúcar en el trapiche, molino rudimentario hecho con pambil, bambú o caña. Mientras tanto se recolecta el choclo tierno y es cocinado. Una vez enfriado se le agrega un hongo rosado conocido como *pa-ko ayan* que es recogido

del palo quemado de chonta, el cual aparece en su tallo luego de 7-15 días. Se envuelve una hoja de bijao y se deja reposar por una semana donde se produce mayor crecimiento del hongo, posteriormente se añade el jugo de caña de azúcar y se deja fermentar por los días que sean necesarios. Al cabo de tres días ya se puede consumir la bebida pero con un tenue sabor alcohólico.



Figura 2 Proceso de elaboración de malá. Elaboración propia.

Microorganismos fermentadores

Los alimentos fermentados de forma tradicional contienen tanto microorganismos funcionales como no funcionales. Los microorganismos beneficiosos son los encargados de transformar las biomoléculas de las materias primas, ya sean de origen vegetal como animal, durante el proceso de fermentación, produciendo ciertas características únicas en el alimento, por ejemplo mediante la mejora de la biodisponibilidad de nutrientes, la intensificación de ciertas cualidades sensoriales en los alimentos, además de presentar efectos bioconservantes y mediante la producción de metabolitos previenen el crecimiento de patógenos, degradan componentes tóxicos y aseguran la calidad alimentaria, estimulan las propiedades probióticas y ayudan a la salud. (Tamang, Shin, Jung, & Chae, 2016)

Las bacterias mayormente conocidas que producen todos estos beneficios son las bacterias ácido lácticas (BAL), quienes están presentes en una amplia variedad de alimentos y bebidas fermentadas. Los géneros de BAL más estudiados son *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, entre otros. Así mismo especies del género *Bacillus* también se encuentran presentes en alimentos fermentados especialmente a base de leguminosas. Del queso se aíslan especies de *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* y *Propionibacterium*; así como de productos cárnicos fermentados se aíslan especies de *Arthrobacter* y *Hafnia*. (Tamang, Shin, Jung, & Chae, 2016)

Por otro lado, también se pueden encontrar varios géneros de levaduras en alimentos fermentados como *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Zygosaccharomyces*, entre otros. (Tamang, Shin, Jung, & Chae, 2016)

Los hongos, por su parte, se han utilizado en platos tradicionales especialmente de Asia Oriental, como *Aspergillus oryzae*, utilizado para la fermentación de soja para obtener miso, y arroz para obtener sake. Dentro de este grupo también se encuentran los géneros *Amylomyces*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Neurospora*, entre otros. (Morocho & Leiva-Mora, 2019)

Probióticos

En la actualidad se consumen microorganismos beneficiosos a través de varios alimentos aunque ni siquiera sea de forma consciente. Estos alimentos están suplementados con probióticos, los cuales son microorganismos vivos que son ingeridos en cantidades suficientes para tener un impacto positivo en la salud de los consumidores, no solo a nivel nutricional, también afectan la microbiota natural del cuerpo, el epitelio intestinal y al sistema inmunológico. (Wieërs, y otros, 2020)

Actualmente, se conoce que los probióticos integran una industria de millones de dólares, siendo uno de los nichos de mercado más amplio en la industria alimentaria al tener un amplio ratio de consumo en todo el mundo. Entre los alimentos preferidos por los consumidores se encuentran el yogurt, quesos, helados, barras nutritivas, cereales y formulas infantiles. De forma comercial, los probióticos se venden en píldoras liofilizadas de fácil manipulación y consumo. (Suez et al, 2019). (Suez, Zmora, Segal, & Elinav, 2019)

Los alimentos con probióticos son tan populares por tener respaldo de médicos y nutricionistas. Entre los beneficios que presentan en la salud están el control y prevención de la diarrea, enfermedades de inflamación intestinal, alergias, enfermedades respiratorias, estreñimiento, infecciones en las vías urinarias, infección por *H. pylori*, altos niveles de colesterol en la sangre y también se evidencian beneficios contra el cáncer. (Min, Bunt, Mason, & Hussain, 2018)

Las bacterias probióticas comúnmente empleadas en la industria alimentaria son las ácido lácticas, estas pueden ser obtenidas de diferentes orígenes además de que se ha documentado que mediante procesos de fermentación, estas bacterias no solo son capaces de ayudar a la conservación de los alimentos sino que también aumentan la digestibilidad de ciertos alimentos, además mejoran las propiedades del producto tanto como sabor, olor y textura. Entre los géneros más usados se encuentran *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp, los cuales se conocen como GRAS (“Generalmente reconocidos como seguros”) por agencias reguladoras. Entre las especies de *Lactobacillus* están *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*. (Min, Bunt, Mason, & Hussain, 2018)

Así mismo, es importante tener presentes ciertas consideraciones para con los probióticos con el fin de tener una beneficio claro en la salud. En primer lugar, un probiótico debe ser previamente documentado científicamente como válido y seguro para la salud. Además debe presentar una buena tecnología para su producción, evitando la pérdida de viabilidad y funcionalidad del alimento. Es necesario que existan altas tasas de supervivencia y reproducción durante el procesamiento y el almacenamiento de los productos. (Gupta & Abu-Ghannam, 2012). Además, se debe tener en cuenta el correcto uso individual o combinación de los probióticos, ya que dependiendo de las cantidades y tipos de subproductos de sus metabolismos luego de la fermentación, podría haber una afectación en la calidad del producto alimenticio. Se recomienda que un alimento contenga al menos 10^6 UFC/g-ml de células viables en el alimento. (Min, Bunt, Mason, & Hussain, 2018)

Bacteriocinas

Dentro de los subproductos del metabolismo de las bacterias, existen múltiples metabolitos que han sido considerablemente estudiados, entre ellos se encuentran las

bacteriocinas. Las bacteriocinas son polipéptidos de molécula pequeña que tienen propiedades antisépticas, antimicrobianas y anticancerígenas, los cuales son sintetizados por los ribosomas por una amplia gama de bacterias. Debido a esto se conoce el potencial de estos péptidos para inhibir el crecimiento de varios microorganismos patógenos. Estas bacteriocinas son clasificadas en dos grupos importantes: clase I aquellas que pasan por modificaciones postraduccionales y péptidos de clase II que permanecen sin modificar. Del mismo modo, cada grupo puede subdividirse; la clase I se divide en lantibióticos (con anillos de lantionina), glicocinas (con glucopéptidos), botromicinas (con amidina macrocíclica), tiopéptidos (contiazol y otros deshidroaminoácidos), sactibióticos (con enlaces S- α -C), y linaridinas (péptidos lineales deshidratados). Por otro lado, la clase II se divide en: IIa que son del tipo pediocina similares a PA-1. La clase IIb son bacteriocinas compuestas por dos péptidos no modificados. La clase IIc son péptidos circulares. La clase IId contiene demás péptidos individuales no modificados, lineales, diferentes a la pediocina. (Zheng & Sonomoto, 2018) Algunos ejemplos de bacteriocinas se encuentran referenciados en la tabla 1.

Tabla 1 Ejemplos de bacteriocinas y sus características.

| Bacteriocina | Mecanismo de acción | Receptor | Bacteria productora | Espectro de acción |
|----------------|---|------------------------------------|----------------------------|---|
| Nisina | | Lipidos II | <i>L. lactis</i> | Bacterias Gram positivas |
| Pediocina PA-1 | Permeabilización de membrana por formación de poros | Permeasa manosa | <i>P. pentosaceus</i> | Bacterias Gram positivas y Gram negativas |
| Leucocina | | Permeasa manosa | <i>Leuconostoc gelidum</i> | Bacterias Gram positivas y Gram negativas |
| Plantaricina | | Undecaprenil pirofosfato fosfatasa | <i>L. plantarum</i> | Bacterias Gram positivas |
| Helveticina | | Desconocido | <i>L. helveticus</i> | Bacterias Gram negativas |
| Thuricina | Desconocido | Desconocido | <i>B. thuringiensis</i> | Bacterias Gram positivas |

Fuente: Kumariya et al, 2019

La funcionalidad de las bacteriocinas dentro de los microorganismos productores puede tener varios objetivos por ejemplo ayudar a la funcionalidad probiótica del microorganismo que las producen. También pueden actuar como péptidos colonizadores que facilitan la inducción o dominio de un microorganismo en un nicho ocupado. Como ya se mencionó, las bacteriocinas tienen la propiedad antimicrobiana que inhibe de forma directa el crecimiento de microorganismos competidores. Además, las bacteriocinas pueden actuar como péptidos de señalización a través de *quorum sensing* y mediante la intercomunicación entre bacterias dentro de un nicho microbiano o señalizando células del sistema inmune del hospedador (Figura 3). (Dobson, Cotter, Ross, & Hill, 2012)

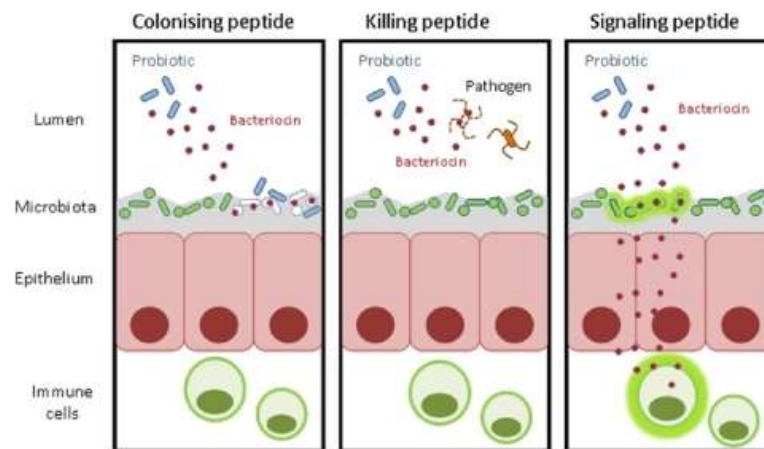


Figura 3 Mecanismos de funcionalidad probiótica de las bacteriocinas. Tomado de: Dobson et al, 2012.

Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Las membranas celulares de las bacterias están compuestas por fosfolípidos, lipopolisacáridos, y polímeros como el peptidoglicano, los cuales le confieren la propiedad aniónica a su superficie y sirven como objetivo a las bacteriocinas catiónicas a través de interacciones electrostáticas, atravesando la bicapa lipídica del microorganismo. Las bacteriocinas promueven la permeabilidad de la membrana celular presuntamente a través de la formación de poros de iones provocando la disipación de la fuerza motriz del protón y el consecuente agotamiento de ATP intracelular. Luego de la perforación de la

membrana, los péptidos se auotasocian o polimerizan formando complejos con alguna molécula de acoplamiento con la membrana provocando la fuga de sustratos intracelulares y la muerte final. No hay evidencia científicamente suficiente que sustente que la acción bacteriocina dependa de su concentración. (Kumariya, y otros, 2019)

Métodos de evaluación de actividad bacteriocina *in vitro*

Método de difusión en disco de agar

Los más empleados son los métodos de difusión, entre ellos el método de difusión en disco de agar es una técnica bastante popular. Se basa en inocular un microorganismo antagonico en cajas Petri para luego colocar sobre su agar, discos de papel filtro con el compuesto a poner a prueba a una concentración determinada, luego de incubarlas a condiciones específicas, se mide los diámetros de las zona de inhibición del crecimiento del patógeno. (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016)

Método de gradiente antimicrobiano

Otro de los métodos de cuantificación de actividad antimicrobiana es el método de gradiente antimicrobiano. Este se basa en la creación de un gradiente de concentración del compuesto a ensayar en el medio sólido inoculado con el microorganismo a testear, depositando sobre este, de un extremo a otro, una tira empapada con el agente antimicrobiano. Los resultados se miden por el tamaño de la elipse de inhibición en el agar. (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016)

Método de difusión de pozos

En el método de difusión de pozos de agar se procede a inocular microorganismos a testear sobre la superficie de agar de manera uniforme en toda la caja Petri, para luego proceder a realizar pocillos de aproximadamente 7 mm de diámetro y 4 mm de profundidad para dispensar sobre ellos un determinado volumen del compuesto

antimicrobiano. Luego del tiempo de incubación necesario, se procede a observar la zona de inhibición sobre el agar. (Nalawade, Bhat, & Sogi, 2016)

Método de difusión de tapón

El método de difusión de tapones es muy similar a la prueba de discos, a diferencia del último, este método se basa en previamente dejar crecer al microorganismo productor de la sustancia antimicrobiana en su medio específico en condiciones favorables por un tiempo determinado. Para luego proceder a cortar pequeños cortes de agar asépticamente para proceder a colocarlos en una superficie de agar inoculada con el organismo que se requiere testear. Después de la incubación, se observa la actividad antimicrobiana mediante la medición de los halos de inhibición. (Botta, Saladino, Barghini, Fenice, & Pasqualetti, 2020)

Método de comida envenenada

El método de comida envenenada es usado para evaluar el potencial antifúngico de un compuesto. Este método inicia con la incorporación del compuesto antifúngico en medio agar fundido a una concentración deseada, para luego ser vertido en placas e incubado por una noche. Luego se procede a la inoculación de un disco de micelio del hongo a prueba en el centro de la caja Petri. Luego del tiempo de incubación requerido se miden los diámetros de crecimiento del hongo. (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016)

Método de dilución en caldo

Este es uno de los métodos de ensayos antimicrobianos más básicos y sencillos dentro del laboratorio. Este método consiste en la preparación de diluciones del compuesto antimicrobiano en un medio líquido en tubos o microplacas, para proceder a su inoculación con un microorganismo problema crecido en su medio específico y con una turbidez ajustada a 0.5 McF, en cantidades exactas en cada tubo o pocillo que contiene el agente antimicrobiano. Luego de su incubación en condiciones favorables, los

tubos o pocillos se leen visualmente observando la turbidez del medio como indicador de crecimiento microbiano. (Azrad, Tkhawkho, Isakovich, Nitzan, & Peretz, 2018)

Cromatografía de capa fina (TLC) –bioautografía

Existen métodos poco más complejos como la cromatografía de capa fina (CCF) combinada con autobiografía, la cual permite aislar, localizar y evaluar los componentes bioactivos de organismos, con resultados altamente sensibles y específicos. CCF es un tipo de técnica de cromatografía que separa componentes de una mezcla biológica a través de diferentes capacidades de adsorción de los componentes en la fase estacionaria, logrando la separación de los mismos. Mientras que la bioautografía es un método que emplea componentes bioactivos para reaccionarlos con sustratos específicos formando contrastes de colores permitiendo su identificación y cuantificación. Esta combinación de técnicas permite determinar la presencia, ausencia o potencial de la actividad biológica de un compuesto mediante la aparición de manchas con diferentes colores en la placa del equipo. (Wang, y otros, 2021)

Prueba de tiempo muerto

Este tipo de método es uno de los más prácticos para determinar el efecto antimicrobiano de un determinado compuesto. Permite tener información detallada sobre la interacción dinámica entre el compuesto bactericida y la cepa microbiana problema. Consiste en tomar alícuotas de caldo con el microorganismo a testear y añadirles tubos con concentraciones distintas de los compuestos antimicrobianos. Luego se toma pequeñas alícuotas de estas suspensiones en distintos intervalos de tiempo para realizar diluciones seriadas y sembrar en agar. Luego se realiza el conteo de las unidades formadoras de colonias. Junto con un control sin la inclusión del compuesto antimicrobiano. (Alayande, Pohl, & Ashafa, 2017)

Aplicaciones de las bacteriocinas

Dentro del campo de la biomedicina y la industria alimentaria, las bacteriocinas han sido puestas en la mira por su interesante potencial antagónico ante cepas patógenas. Por su modo específico de actuar en contra de sus objetivos bacterianos, se consideran una alternativa a los medicamentos convencionales en la lucha contra bacterias patógenas gastrointestinales como *E. coli*, *Salmonella*, *H. pylori*, en problemas dermatológicos y una alternativa a los antibióticos. En el ámbito alimentario, las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas han sido consideradas por sus efectos antimicrobianos naturales, los cuales son seguros y viables para su aplicación en los alimentos. Se registra actividad potencial contra *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*; patógenos transmitidos por alimentos. Sin embargo, las bacteriocinas presentan un estrecho espectro de inhibición y se corre el riesgo de desarrollo de resistencia a su efecto antimicrobiano con su prolongado uso, por ello el descubrimiento de nuevas bacteriocinas con potenciales antagónicos contra cepas patógenas es aún un desafío en la industria de alimentos. Actualmente, la única bacteriocina aprobada para su uso a nivel comercial es la nisina. Es necesaria la inversión en investigación y desarrollo de estrategias de producción de bacteriocinas para mayores aplicaciones. (Chanos & Mygind, 2016) (Jamaluddin, Stuckey, Ariff, & Faizal Wong, 2017)

Otro problema a considerar en la producción comercial de bacteriocinas es el alto costo de su producción, debido principalmente a dos causas: el alto costo del medio de crecimiento y los procesos de separación de las bacteriocinas de la mezcla compleja resultante de la fermentación, ya que son necesarias técnicas y equipos complejos para hacerlo como la cromatografía, membranas de filtración, sistemas bifásicos acuosos, entre otras. Una alternativa a estos costos podría ser la utilización de residuos agroindustriales. (Jamaluddin, Stuckey, Ariff, & Faizal Wong, 2017)

CAPITULO 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 23 1/2

Ubicación Geográfica

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de los Alimentos de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, sede Santo Domingo.

Latitud: 00° 24´ 36"
Longitud: 79° 18´ 43"
Altitud: 270 msnm

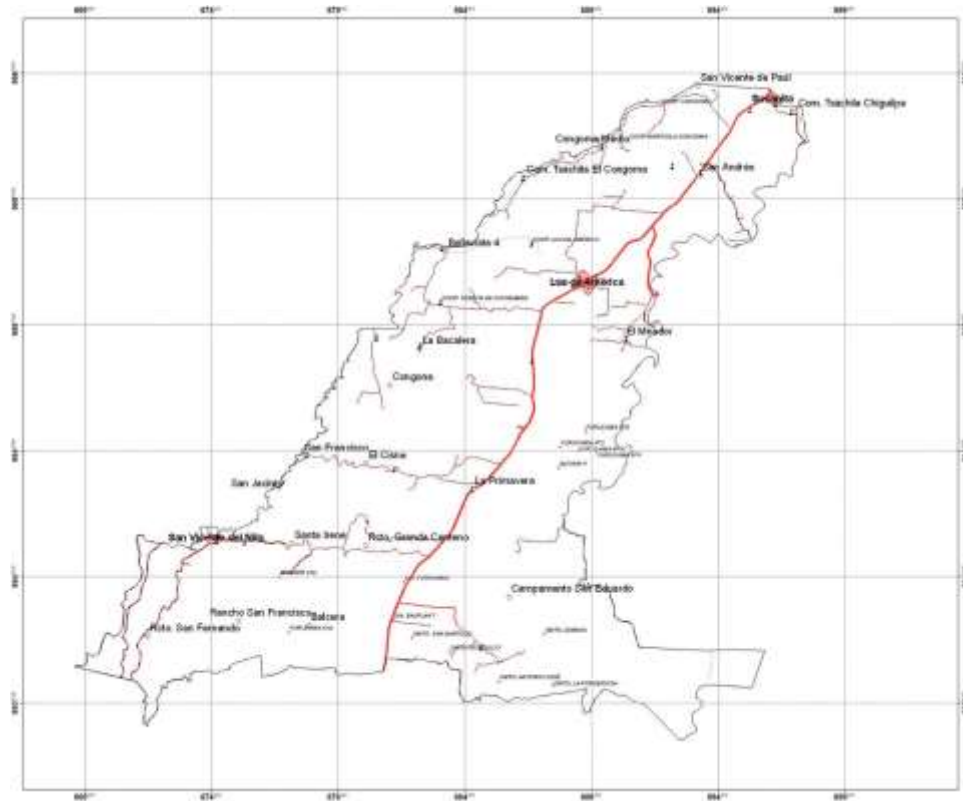


Figura 4. Mapa de ubicación geográfica del área de investigación. Fuente: GAD Provincial Santo Domingo de los Tsáchilas - Dirección de Planificación Territorial.

Ubicación Ecológica

| | |
|--------------------|------------------------|
| Zona de vida: | Bosque húmedo tropical |
| Altitud: | 224 msnm |
| Temperatura media: | 24,6 °C |
| Precipitación: | 2860 mm año |
| Humedad relativa: | 85 % |
| Heliofanía: | 680 horas luz año |
| Suelos: | Franco Arenoso |

Fuente: Estación Agro-meteorológica “Puerto Ila”, Quevedo (Km 35).

Materiales

pH

Tabla 2. Recursos utilizados para la determinación de pH

| Equipos | Materiales |
|---------------|--------------------------------|
| Potenciómetro | Vaso de precipitación de 200ml |

Grados alcohólicos

Tabla 3. Recursos utilizados para la determinación de grados alcohólicos

| Instrumental |
|--------------------------|
| Alcoholímetro Probeta |

Determinación de acidez

Tabla 4. Recursos utilizados para la determinación de acidez

| Instrumental | Reactivos |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Balanza analítica | Hidróxido de sodio 0,1N |
| Vaso de precipitación de 250ml | Solución indicadora de fenolftaleína |
| Bureta de 25ml | Agua destilada |

Densidad

Tabla 5. Recursos utilizados para determinación de la densidad

| Instrumental | Reactivos |
|-------------------|----------------|
| Picnómetro | Agua destilada |
| Balanza analítica | |

Grados Brix

Tabla 6. Recursos utilizados para la determinación de grados Brix

| Equipos |
|---------------|
| Refractómetro |

Caracterización microbiológica

Tabla 7. Recursos utilizados para la caracterización microbiológica

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|-------------------------|--------------------|----------------|
| Cámara de flujo laminar | Pipetas | Agua destilada |
| Balanza analítica | Tubos de ensayo | Agua peptonada |
| Plancha Agitadora | Asa bacteriológica | Agar MRS |
| Autoclave | Asas de vidrio | Agar Sabouraud |
| Incubadora | Mechero de alcohol | Agar EMB |
| | Probeta de 100ml | Agar Nutritivo |
| | Cajas Petri | |

Tinción Gram

Tabla 8. Recursos utilizados para tinción Gram

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|-------------|--------------------|---------------------|
| Microscopio | Portaobjetos | Agua destilada |
| | Asa bacteriológica | Cristal Violeta |
| | Mechero de alcohol | Lugol |
| | | Safranina |
| | | Aceite de inmersión |

Ensayo de catalasa

Tabla 9. Recursos utilizados para el ensayo de catalasa

| Materiales | Reactivos |
|--------------------|------------------------------|
| Portaobjetos | Peróxido de hidrogeno al 30% |
| Gotero | |
| Asa bacteriológica | |

Sistemas de fermentación

Tabla 10 Recursos utilizados para la implementación de sistemas de fermentación.

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|------------|--------------------------|---|
| Incubadora | Matraz Erlenmeyer 250 ml | Caldo MRS Glucosa Sacarosa Lactosa Fructosa |

Parámetros cinéticos

Tabla 11 Recursos utilizados para el Registro de parámetros cinéticos.

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|-------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| pH metro | Bureta | Hidróxido de sodio 0.1N |
| Espectrofotómetro | Celdas de cuarzo Refractómetro | |

Obtención de bacteriocina

Tabla 12 Recursos utilizados para la obtención de extractos libres de células - bacteriocina.

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|----------------|---|-------------------------|
| Centrifugadora | Tubos de centrifugación | Hidróxido de sodio 0.1N |
| pH metro | Papel filtro Matraz Erlenmeyer Embudo | |

Ensayos *in vitro*

Tabla 13 Recursos utilizados para los ensayos de actividad bacteriocina.

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|-------------------------|--|----------------|
| Cámara de flujo laminar | Cajas Petri | Agar Nutritivo |
| Incubadora | Micropipetas Discos de papel filtro | PDA |

Métodos

El siguiente proyecto constó de tres partes:

- Primera etapa: Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la bebida fermentada.
- Segunda etapa: Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriano y producción de bacteriocina.
- Tercera etapa: Ensayos de actividad bacteriocina.

Obtención de la materia prima

La bebida fermentada (malá) utilizada en el siguiente trabajo fue obtenida de la Comuna Tsáchila Chigüilpe, ubicada en el kilómetro 7 de la Vía Santo Domingo – Quevedo, margen izquierdo, 2 km adentro.

Caracterización fisicoquímica de la bebida fermentada

Grados alcohólicos (según Norma INEN 340)

Se colocó la muestra en una probeta limpia y seca, luego se introdujo el alcoholímetro suavemente por 10 minutos, dejando reposar hasta que desaparecieron las burbujas de aire que se forman en el seno del líquido y se efectuó la lectura en el alcoholímetro.

Densidad

Se pesó el picnómetro vacío (m_1), luego se pesó el picnómetro llenado con agua destilada (m_2). Finalmente se llenó el picnómetro con la muestra y fue pesado (m_3). Para el cálculo de la densidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\rho = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} * \rho_{agua}$$

° Brix

Se colocó una gota de la muestra en el refractómetro (Atago) y se realizó la lectura.

Acidez

Se colocó 250 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500ml, al cual se le añadió 25ml de muestra y 5 gotas de la solución de fenolftaleína. Se procedió a titular con ayuda de una bureta con hidróxido de sodio 0,1 N. Se calculó la acidez con la siguiente fórmula.

$$A = \frac{V_{NaOH} * N_{NaOH} * PE}{V_m}$$

Donde:

A= acidez

V_{NaOH} = volumen de NaOH consumidos

N_{NaOH} = normalidad de NaOH utilizado

PE= peso equivalente del ácido acético (60g/Eq)

V_m = volumen de muestra

pH

Se determinó el pH con la ayuda del potenciómetro (Mettler Toledo).

Caracterización microbiológica de la bebida fermentada

En primer lugar, se realizaron diluciones seriadas, para ello se tomaron 10ml de muestra y se añadieron 90ml de agua peptonada en un matraz. Se homogenizó la mezcla agitando por 10 segundos (dilución 10^{-1}). Para la dilución 10^{-2} , se tomó 1ml de la dilución

anterior y se agregó 9ml de agua peptonada en un tubo de ensayo y así sucesivamente para las siguientes diluciones hasta 10^{-4} .

Recuento total de aerobios mesófilos (según Norma INEN 1529-5)

Se depositó 1ml de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) en una caja Petri y se procedió a verter 12ml de agar nutritivo en cada caja Petri. Se agitaron suavemente para permitir la mezcla del medio con la muestra. Se dejó reposar las placas para que se solidifique el agar. Se incubó (Incubadora Memmert) a 30°C por 48 horas. Se seleccionaron las placas de dos diluciones consecutivas que presentaron entre 15 y 300 colonias y se contó todas las colonias que hayan crecido en el medio. Para el cálculo del número de aerobios mesófilos se aplicó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n1 + 0.1n2)d}$$

Donde:

Σc = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas

V = Volumen inoculado en cada caja Petri

n1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada

n2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada

d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir)

Coliformes (según Norma INEN 1529-7)

Se tomó 1ml de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) en una caja Petri y se añadió 10 ml de agar EMB, agitando suavemente. Se dejó reposar para que se solidifique, luego se vertió 4ml de agar. Una vez enteramente solidificado se incubó a 30°C por 24 horas.

Mohos y levaduras (según Norma INEN 1 529-11)

Se inoculó 1ml de muestra, en cada uno de dos tubos que contengan 15ml de agar Sabouraud y se extendió con un asa de vidrio. Se incubó a 25°C por 5 días.

Bacterias ácido lácticas (según el método de Reuben et al, 2019; Ünlü, et al, 2015)

Se tomó 1ml de cada disolución (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) en una caja Petri y se añadió 15ml de agar MRS. Se incubó a 37°C por 72 horas.

Se seleccionaron las placas que mostraron colonias blancas y cremosas y se aislaron mediante transferencias sucesivas en medio MRS. Las colonias individuales recogidas de las placas se inocularon en caldo MRS y crecieron hasta que alcanzaron la fase de crecimiento exponencial media o tardía (A600 de 1,5–3,5) para ser inoculadas en los sistemas de fermentación. (Reuben, Roy, Sarkar, Alam, & Jahid, 2019) (Ünlü, Nielsen, & Ionita, 2015)

Establecimiento de un sistema de fermentación y producción de bacteriocina**Caracterización e Identificación bacteriana*****Tinción Gram (según Tripathi, 2021).***

Se tomó una pequeña cantidad de colonia con el asa bacteriológica y se colocó en una gota de agua destilada sobre un portaobjetos. Se extendió la colonia hasta obtener una película delgada uniforme, se fijó pasando el portaobjetos por un mechero de alcohol suavemente. Se agregaron dos gotas de cristal violeta sobre el portaobjeto y se esperó 1 minuto, luego se enjuagó con agua destilada suavemente. Se agregaron 2 gotas de lugol por 1 minuto, se enjuagó con agua destilada. Se agregaron 2 gotas de alcohol-cetona por 15 segundos, se enjuagó. Se agregaron 2 gotas de safranina por 1 minuto, se enjuagó.

Se dejó secar el exceso de agua del portaobjetos al aire. Finalmente, se colocó el portaobjetos en el microscopio y observó. (Tripathi & Sapra, 2021)

Morfología celular

Se observaron las colonias en las placas considerando forma, color, opacidad y consistencia.

Caracterización molecular

Las colonias aisladas fueron secuenciadas para el gen 16S ARNr por la empresa Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias obtenidas fueron analizadas por la herramienta BLAST de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Crecimiento en sistema de fermentación

Los sistemas de fermentación se construyeron en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo (MRS). En un matraz de 250ml se añadió 200ml de caldo MRS con 2ml de muestra de cultivo (1% v/v). En cada uno de los tratamientos se añadió la fuente de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa) a una razón de 5% p/v. (Jaramillo, Melendez, & Sanchez, 2010) La fermentación discontinua se realizó a 37 ° C, sin agitación durante 72 h.

Registro de parámetros cinéticos microbianos

Las muestras del medio se recolectaron en diferentes intervalos de tiempo (0, 4, 23, 27h) para su medición de pH, grados brix, % de ácido láctico y espectrofotometría a 600 nm para determinar la densidad óptica. (Cavicchioli, y otros, 2019)

Obtención de bacteriocina (según Fuentes y et al, 2016).

Los medios de cultivo con las bacterias aisladas se centrifugaron a 1000 rpm por 20 minutos. Se filtraron los sobrenadantes con membranas de papel filtro estéril en

matraces. El pH de los sobrenadantes fueron ajustados a 6,5 con NaOH 1N. (Fuentes, Londoño, Durango, & etc, 2016)

Ensayos de actividad bacteriocina

Para testear la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células que contienen bacteriocina, se empleó *E. coli* y *Rhizopus stolonifer*, de manera separada.

Método de difusión de discos (según Balouiri et al, 2016).

La actividad antimicrobiana se expresó como unidades arbitrarias por mililitro (AU / mL), para ello se realizó diluciones sucesivas en base 2 con los sobrenadantes con bacteriocina, y se calcularon con la siguiente ecuación:

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

Donde es a= 2 (factor de dilución) y b = valor de la dilución más alta que muestra al menos una zona de inhibición de 2 mm. (Gutiérrez-Cortés, Suarez, Buitrago, Nero, & Todorov, 2018)

Para ello se inoculó el patógeno a testear en cajas Petri con su medio respectivo (Agar nutriente para *E. coli* y PDA para *R. stolonifer*), esparciendo 100 µl del inóculo microbiano sobre toda la superficie. Se colocó sobre la superficie del agar los discos de papel de filtro (de 5 mm de diámetro), que contienen el sobrenadante libre de células con bacteriocina (100ul). Se incubaron las cajas Petri en condiciones adecuadas. Luego del tiempo requerido de incubación, se examinaron para determinar las zonas de inhibición de crecimiento.

Diseño experimental

Factores a probar

Tabla 14. Factores y niveles a probar en los parámetros de crecimiento de las bacterias aisladas.

| Factores | Niveles |
|-----------------------|--|
| Colonia (A) | A1: <i>Bacillus licheniformis</i> A2: <i>Oceanobacillus</i> A3: <i>Staphylococcus sciuri</i> |
| Fuente de carbono (B) | B1: Glucosa B2: Sacarosa B3: Lactosa B4: Fructosa |

Tratamientos a comparar

Tabla 15. Tratamientos a comparar en los parámetros de crecimiento de las bacterias.

| Tratamientos | Código |
|--------------|--------|
| T1 | A1B1 |
| T2 | A1B2 |
| T3 | A1B3 |
| T4 | A1B4 |
| T5 | A2B1 |
| T6 | A2B2 |
| T7 | A2B3 |
| T8 | A2B4 |
| T9 | A3B1 |
| T10 | A3B2 |
| T11 | A3B3 |
| T12 | A3B4 |

Tipo de diseño

Para la presente investigación se utilizará un diseño de bloques al azar con arreglo factorial AxB en los parámetros de crecimiento de las bacterias, en donde A (Colonia), B

(Fuente de carbono), con los niveles en A=3; B=4; dando como resultado un total de 12 tratamientos con tres repeticiones.

Análisis estadístico

Modelo matemático para para comparar los parámetros cinéticos

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + S_j + T_k + ST_{jk} + E$$

Donde:

Y: Variable respuesta de la unidad experimental

U: Media general del experimento

B_i: Efecto de los bloques

S_j: Efecto del j-ésimo nivel del factor *Colonia*

T_k: Efecto del k-ésimo nivel del factor *Fuente de carbono*

ST_{jk}: Interacción del j-ésimo nivel del factor *BAL* con el k-ésimo nivel del factor *Fuente de carbono*.

E: Efecto del error experimental

Esquema del análisis de varianza

Tabla 16. Esquema del análisis de varianza para comparar los parámetros de crecimiento de las bacterias.

| Fuentes de variación | Grados de Libertad |
|----------------------|--------------------|
| Bloque | 2 |
| Colonia | 2 |
| Fuente de carbono | 3 |
| Interacción A*B | 6 |
| Error experimental | 22 |
| Total | 35 |

Coeficiente de variación

$$CV = \frac{\sqrt{CMe}}{\bar{x}} \times 100$$

Dónde:

CV = Coeficiente de variación

CMe = Cuadrado medio del error

\bar{x} = Media general del experimento

Análisis funcional

Para evaluar la prueba de significancia se empleará la prueba de Tukey a nivel de significancia del 5%.

Variables a evaluar

- pH
- Densidad celular (OD)
- Acidez (% de ácido láctico)
- Grados Brix
- Diámetro de inhibición (mm)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Caracterización de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la bebida fermentada (malá).

En la tabla 17 se observan los parámetros fisicoquímicos analizados en la bebida fermentada.

Tabla 17 Parámetros físico-químicos de la chicha.

| pH | ° Alcohólico | Densidad | ° Brix | Acidez |
|-----------|---------------------|-----------------|---------------|---------------|
| 3,15 | 0,5° | 1,01 g/ml | 6.5 | 0,8 % |

En la tabla 18 se observan los parámetros microbiológicos analizados en la bebida fermentada. Aunque se trate de una bebida realizada de forma rudimentaria se puede establecer que es una bebida segura. Además el contenido de bacterias ácido lácticas es alto en relación con las otras bacterias asegurando la producción de ácido láctico que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos.


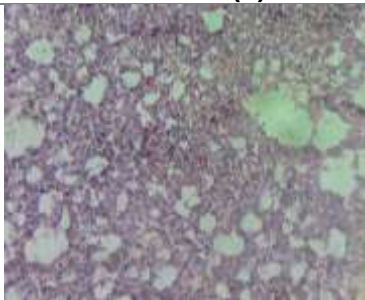

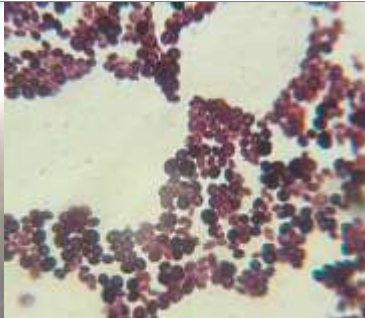

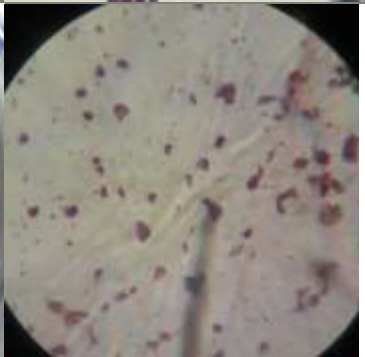
Tabla 18 Parámetros microbiológicos de la chicha.


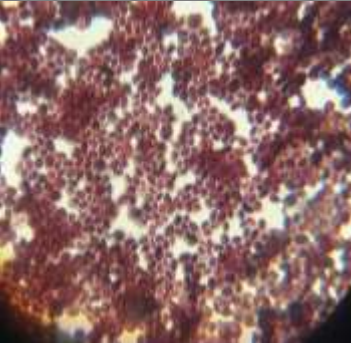

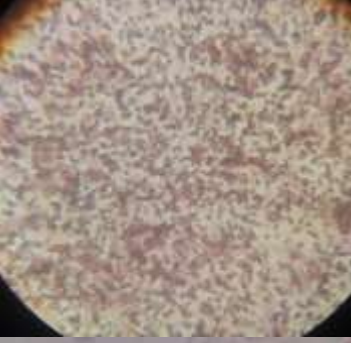


| Coliformes | Aerobios | Mohos y levaduras | BAL |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------|
| $<1,0 \times 10^1$ U.F.C | $0,8 \times 10^1$ U.F.C | $4,5 \times 10^1$ U.F.C | 3×10^1 U.F.C |

Aislamiento de bacterias con potencial bacteriocina a partir de la bebida fermentada (malá).

Se logró aislar 6 colonias diferentes a partir de los aislados realizados en el medio agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Este al ser un medio selectivo para *Lactobacillus* se espera que crezcan bacterias de este tipo. Todas las colonias aisladas presentaron un relieve cremoso blanco/amarillento con buen y rápido crecimiento en las cajas Petri. Los resultados de la tinción Gram realizada a cada una de las colonias se detallan en la tabla 19.

Tabla 19 Cepas bacterianas aisladas de la bebida fermentada.

| # | CEPA | TINCIÓN GRAM (+) | CARACTERÍSTICAS |
|---|---|--|---|
| 1 |  |  | Bacilos Colonias cremosas blanquecinas Catalasa: - |
| 2 |  |  | Cocos Colonias cremosas blanquecinas con medio amarillento. Catalasa: - |
| 3 |  |  | Colonias amarillentas pálidas, cremosas. Catalasa: - |

| | | | |
|---|--|---|--|
| 4 |  |  | Cocos Colonias blanquecinas lechosas, diversos surcos. Catalasa: - |
| 5 |  |  | Cocos pequeños Colonias blanquecinas, casi transparentes, no cremosas. Catalasa: - |
| 6 |  |  | Cocos pequeños Colonias amarillentas, formación de surcos medio. Catalasa: - |

De las cepas aisladas se escogieron: C1, C4, C5.

Secuenciación

Los resultados de la secuenciación y análisis en la herramienta BLAST dieron como resultado las siguientes especies:

Tabla 20

Resultados de la secuenciación.

| Código | Bacteria | Homología |
|--------|-------------------------------|-----------|
| C1 | <i>Bacillus licheniformis</i> | 99% |
| C4 | Oceanobacillus sp | 97% |
| C5 | <i>Staphylococcus sciuri</i> | 99% |

Estudio del comportamiento de los parámetros cinéticos microbianos

En las figuras del 5 al 16, se observan el registro de los parámetros cinéticos dentro de los sistemas de fermentación de las bacterias seleccionadas con las distintas fuentes de carbono durante 27 horas, en ciertos intervalos de tiempo.

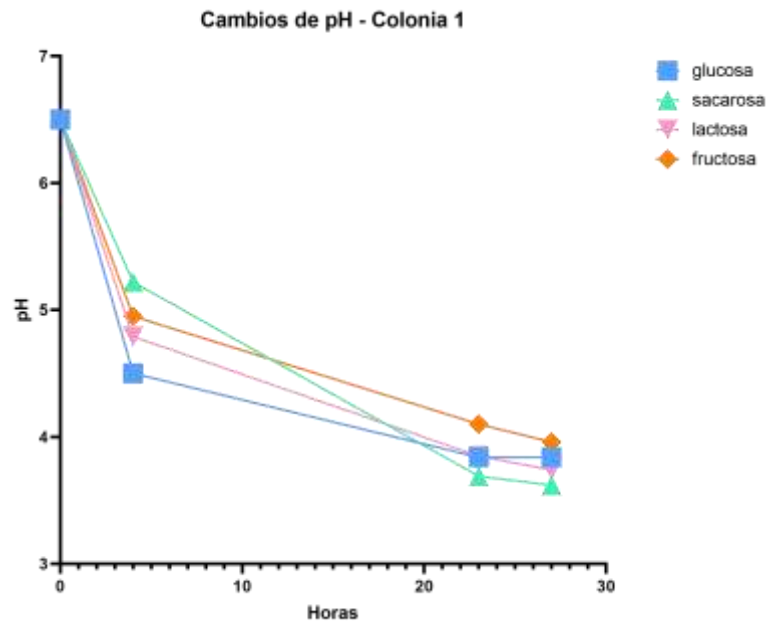


Figura 5 Cambios de pH en la colonia 1.

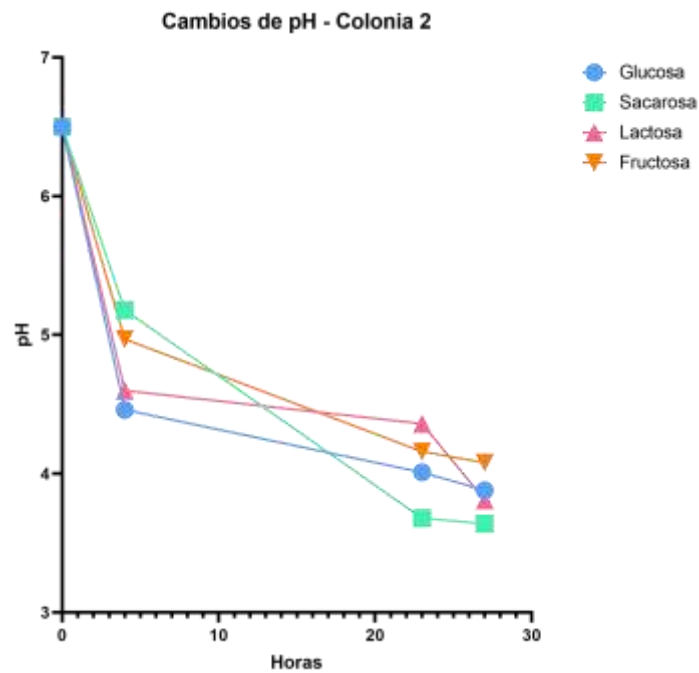


Figura 6 Cambios de pH en la colonia 2.

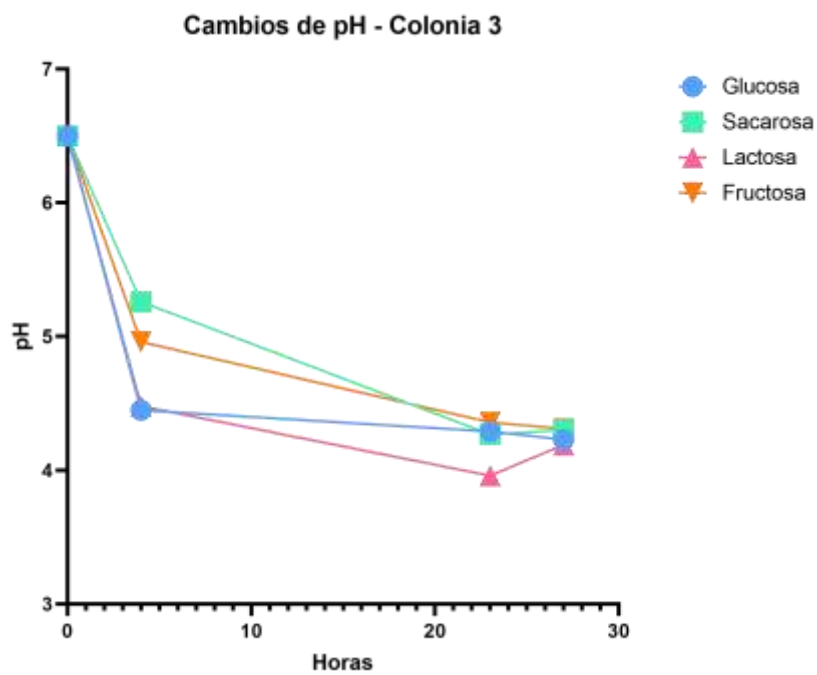


Figura 7 Cambios de pH en la colonia 3.

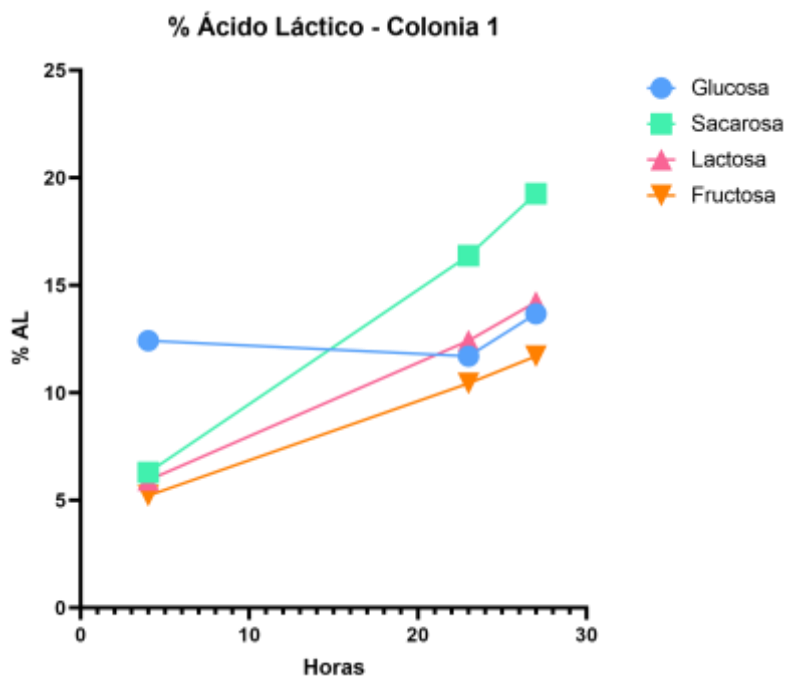


Figura 8 Cambios de % de ácido láctico en la colonia 1.

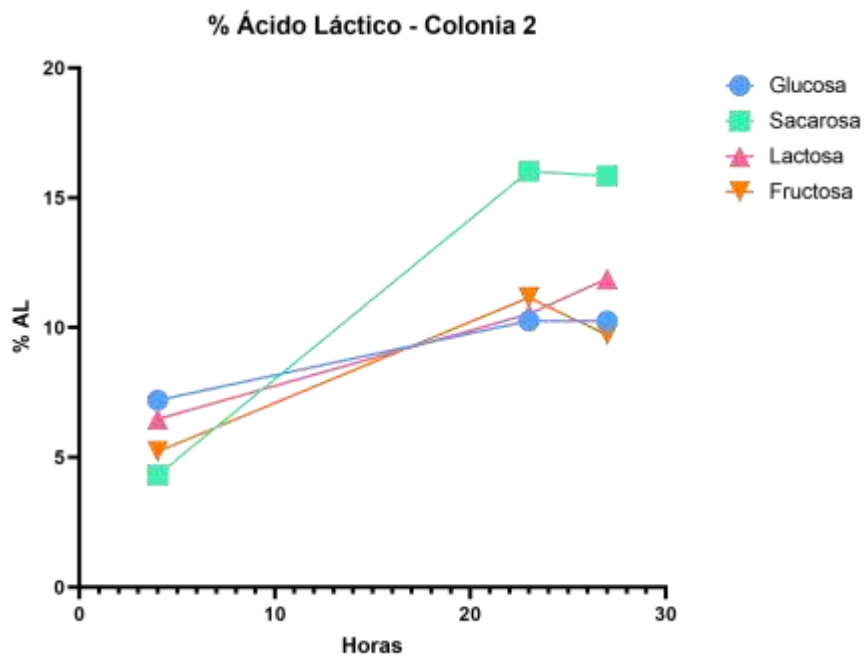


Figura 9 Cambios de % de ácido láctico en la colonia 2.

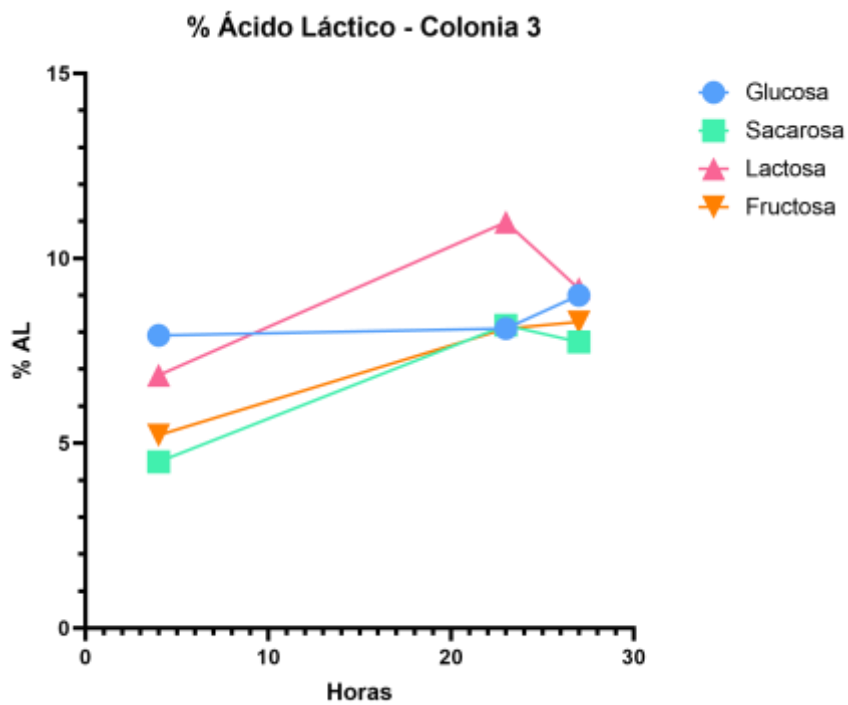


Figura 10 Cambios de % de ácido láctico en la colonia 3.

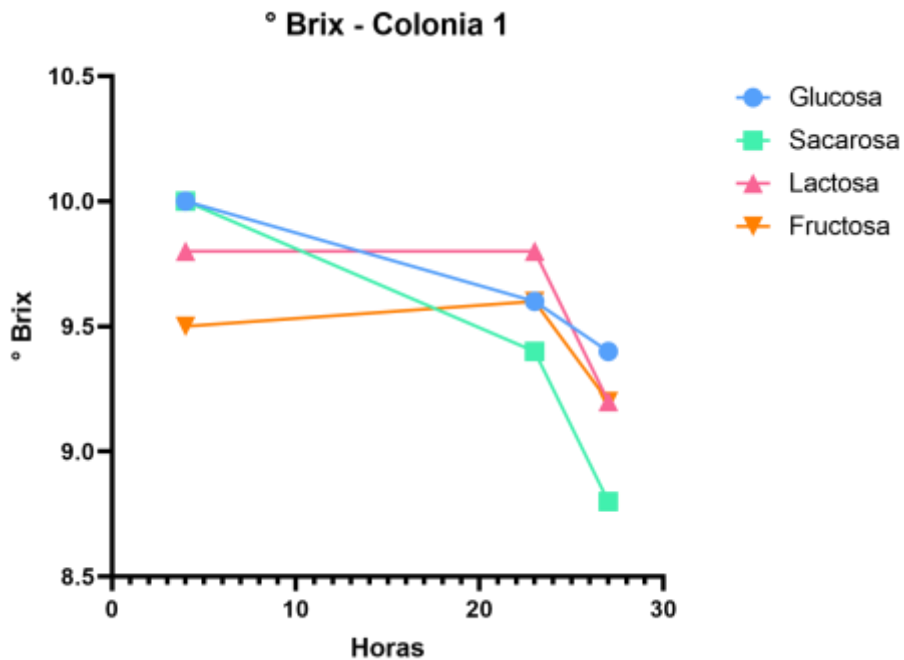


Figura 11 Cambios de ° Brix en la colonia 1.

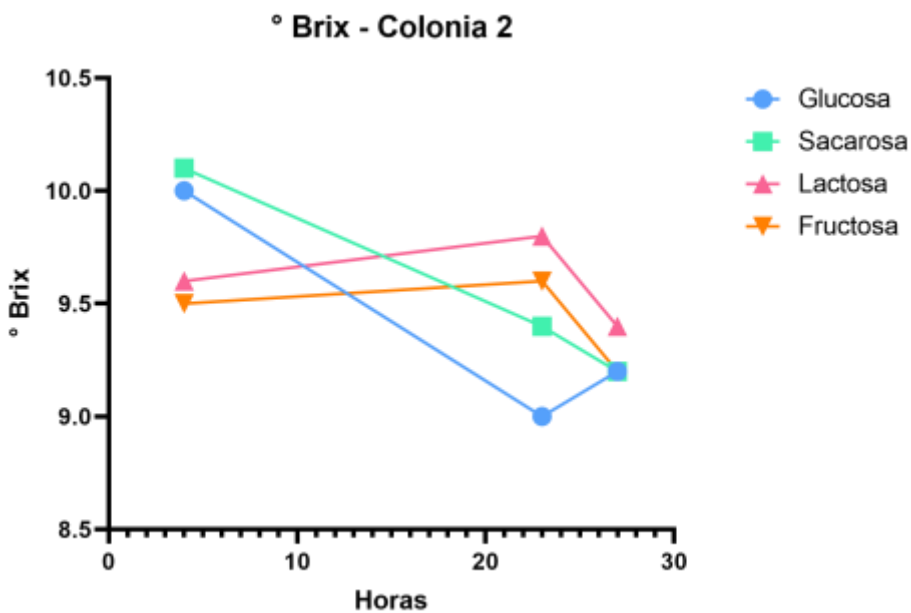


Figura 12 Cambios de ° Brix en la colonia 2.

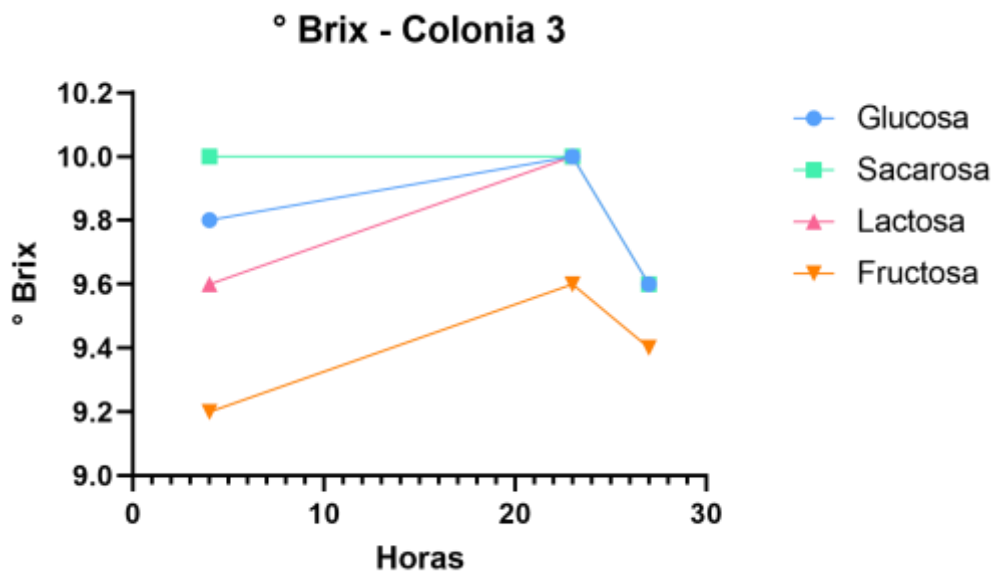


Figura 13 Cambios de ° Brix en la colonia 3.

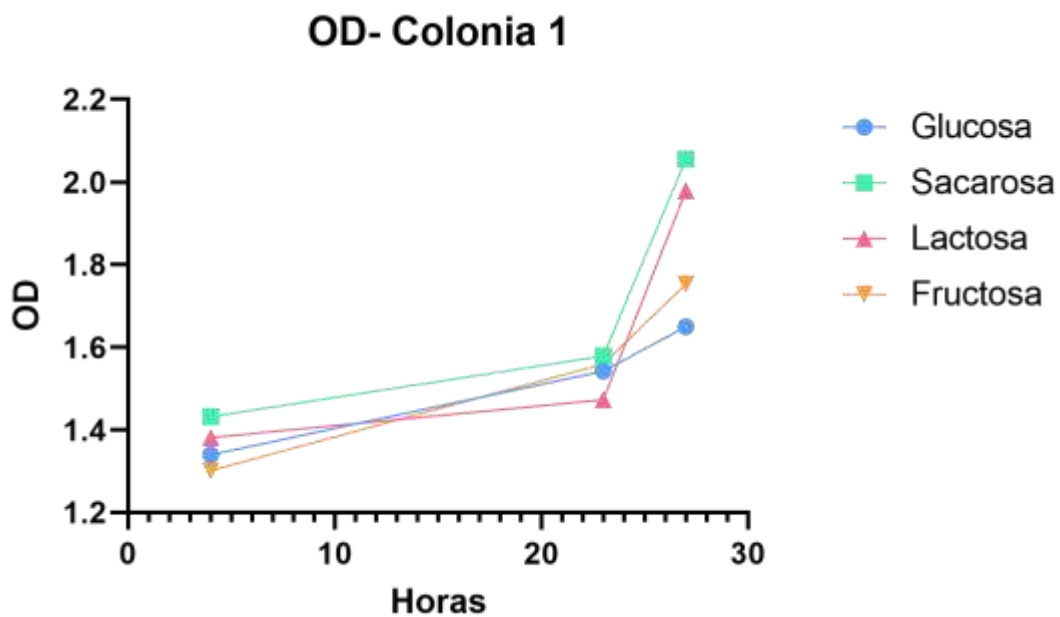


Figura 14 Cambios de OD la colonia 1.

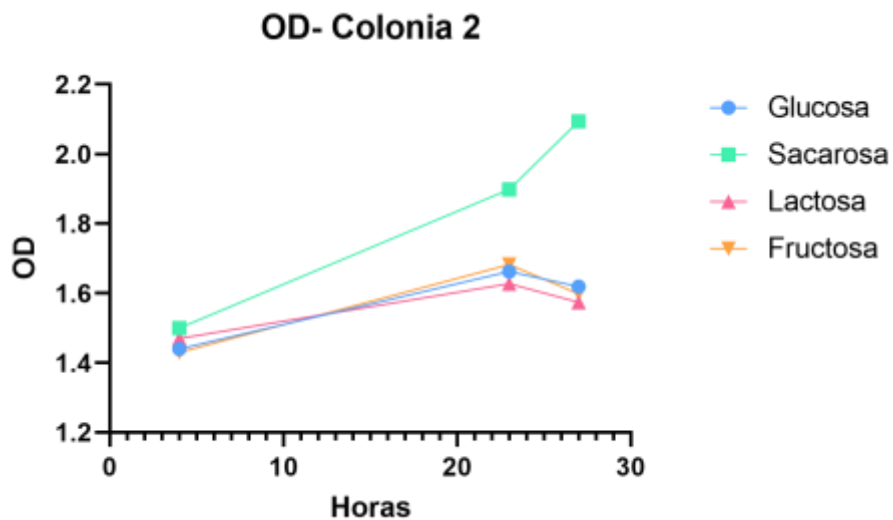


Figura 15 Cambios de OD la colonia 2.

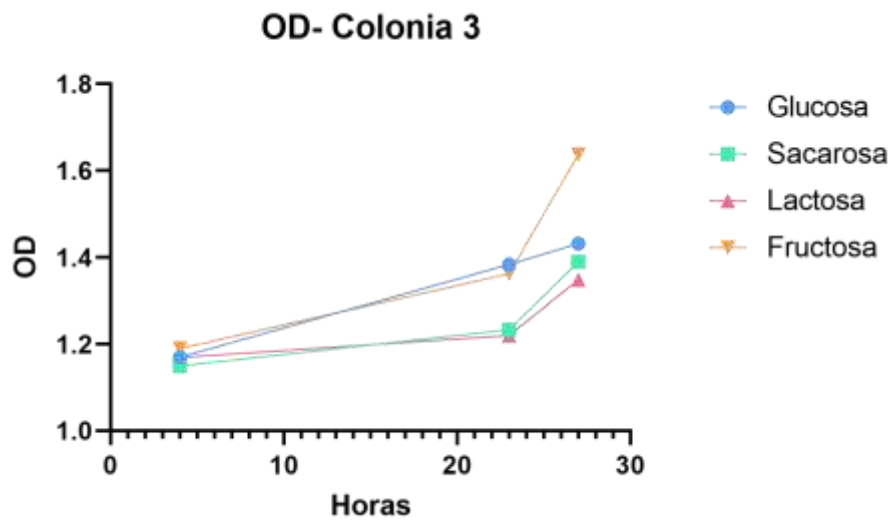


Figura 16 Cambios de OD la colonia 3.

Análisis de la actividad bacteriocina subproducto del proceso de fermentación bacteriana.

Se pudo evidenciar halos de inhibición alrededor de los discos de papel sobre el agar con los patógenos a testear.

Tabla 21 Unidades Arbitrarias de los tratamientos estudiados.

| Tratamiento | <i>E. coli</i> (AU/ml) | <i>R. stolonifer</i> (AU/ml) |
|-----------------------------|---|---|
| Colonia 1 + Glucosa | 3200 | 3200 |
| Colonia 1 + sacarosa | 200 | 3200 |
| Colonia 1 + Lactosa | 3200 | 3200 |
| Colonia 1 + Fructosa | 3200 | 1600 |
| Colonia 2 + Glucosa | 3200 | 200 |
| Colonia 2 + Sacarosa | 3200 | 200 |
| Colonia 2 + Lactosa | 200 | 200 |
| Colonia 2 + Fructosa | 1600 | 3200 |
| Colonia 3 + Glucosa | 200 | 400 |
| Colonia 3 + Sacarosa | 3200 | 200 |
| Colonia 3 + Lactosa | 3200 | 1600 |
| Colonia 3 + Fructosa | 3200 | 400 |

Las unidades arbitrarias por mililitro brindan un panorama general de la actividad de la bacteriocina sin embargo no existe mayor distinción entre tratamientos porque se basa en la dilución más alta y no en datos más precisos, por ello se realizó el análisis estadístico tomando en cuenta el diámetro del halo de inhibición.

Análisis estadístico

Análisis de varianza para las variables de estudio

Análisis de varianza para la variable Acidez

Tabla 22 Análisis de varianza para la variable Acidez

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | de Cuadrados Medios | F | Valor p |
|--------------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|----------------|
| Colonia | 2 | 175,216 | 87,608 | 291,61 | 0,000* |
| Fuente | 3 | 92,282 | 30,761 | 102,39 | 0,000* |
| Colonia*Fuente | 6 | 69,820 | 11,637 | 38,73 | 0,000* |
| Repeticiones | 2 | 0,478 | 0,239 | 0,8 | 0,4635 |
| Error | 22 | 6,609 | 0,3 | | |
| Total | 35 | 344,406 | | | |
| Coeficiente de variación 4,73 | | | | | |

En la tabla 22 de análisis de varianza para la variable Acidez se puede apreciar que existe diferencia significativa en el Factor A (Colonia), Factor B (Fuente de Carbono) y en la interacción AxB. Mientras que en repetición no existe diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable pH

Tabla 23 Análisis de varianza para la variable pH

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | de Cuadrados Medios | F | Valor p |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|----------------|
| Colonia | 2 | 1,041 | 0,5205 | 87,8 | 0,000* |
| Fuente | 3 | 0,3927 | 0,1309 | 22,08 | 0,000* |
| Colonia*Fuente | 6 | 0,3782 | 0,063 | 10,63 | 0,000* |
| Repeticiones | 2 | 0,0315 | 0,0158 | 2,66 | 0,0923 |
| Error | 22 | 0,1304 | 0,0059 | | |
| Total | 35 | 1,9738 | | | |
| Coefficiente de variación | 1,915 | | | | |

En la tabla 23 de análisis de varianza para la variable pH se puede apreciar que existe diferencia significativa en el Factor A (Colonia), Factor B (Fuente de Carbono) y en la interacción AxB. Mientras que en repetición no existe diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable ° Brix

Tabla 24 Análisis de varianza para la variable ° Brix.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | de Cuadrados Medios | F | Valor p |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|----------------|
| Colonia | 2 | 0,826 | 0,413 | 21 | 0,000* |
| Fuente | 3 | 0,473 | 0,158 | 8 | 0,000* |
| Colonia*Fuente | 6 | 0,289 | 0,048 | 2,4 | 0,0579 |
| Repeticiones | 2 | 0,027 | 0,013 | 0,7 | 0,518 |
| Error | 22 | 0,433 | 0,02 | | |
| Total | 35 | 2,048 | | | |
| Coefficiente de variación | 1,487 | | | | |

En la tabla 24 de análisis de varianza para la variable ° Brix se puede apreciar que existe diferencia significativa en el Factor A (Colonia), Factor B (Fuente de Carbono) y en la interacción AxB. Mientras que en repetición no existe diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable OD

Tabla 25 Análisis de varianza para la variable OD.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | de Cuadrados Medios | F | Valor p |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|----------------|
| Colonia | 2 | 1,0634 | 0,5317 | 383,39 | 0,000* |
| Fuente | 3 | 0,314 | 0,1049 | 75,67 | 0,000* |
| Colonia*Fuente | 6 | 0,6235 | 0,1039 | 74,93 | 0,000* |
| Repeticiones | 2 | 0,0001 | 0,0000 | 0,04 | 0,96561 |
| Error | 22 | 0,0305 | 0,0014 | | |
| Total | 35 | 2,0323 | | | |
| Coefficiente de variación | 2,24 | | | | |

En la tabla 25 de análisis de varianza para la variable Densidad Óptica se puede apreciar que existe diferencia significativa en el Factor A (Colonia), Factor B (Fuente de Carbono) y en la interacción AxB. Mientras que en repetición no existe diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición para *E. coli*

Tabla 26 Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición para *E. coli*.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | de Cuadrados Medios | F | Valor p |
|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|----------------|
| Colonia | 2 | 0,056 | 0,028 | 0,37 | 0,695121 |
| Fuente | 3 | 26,694 | 8,898 | 118,443 | 0,00000* |
| Colonia*Fuente | 6 | 27,722 | 4,620 | 61,501 | 0,00000* |
| Repeticiones | 2 | 0,514 | 0,257 | 3,420 | 0,050892 |
| Error | 22 | 1,653 | 0,075 | | |
| Total | 35 | 56,639 | | | |
| Coefficiente de variación | 4,24 | | | | |

En la tabla 26 de análisis de varianza para la variable Zona de Inhibición de *E. coli* se puede apreciar que existe diferencia significativa en el Factor B (Fuente de Carbono) y en la interacción AxB. Mientras que en repetición y Factor A (Colonia), no existe diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición para *R. stolonifer*.

Tabla 27 Análisis de varianza para la variable Zona de inhibición en *R. stolonifer*.

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | de Cuadrados Medios | F | Valor p |
|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|----------|----------------|
| Colonia | 2 | 29,094 | 14,292 | 9,154 | 0,00128 |
| Fuente | 3 | 12,875 | 4,292 | 2,7008 | 0,0703 |
| Colonia*Fuente | 6 | 8,781 | 1,464 | 0,921 | 0,4988 |
| Repeticiones | 2 | 7,042 | 3,521 | 2,2157 | 0,1328 |
| Error | 22 | 34,958 | 1,589 | | |
| Total | 35 | 23,187 | | | |
| Coeficiente de variación | 19,64 | | | | |

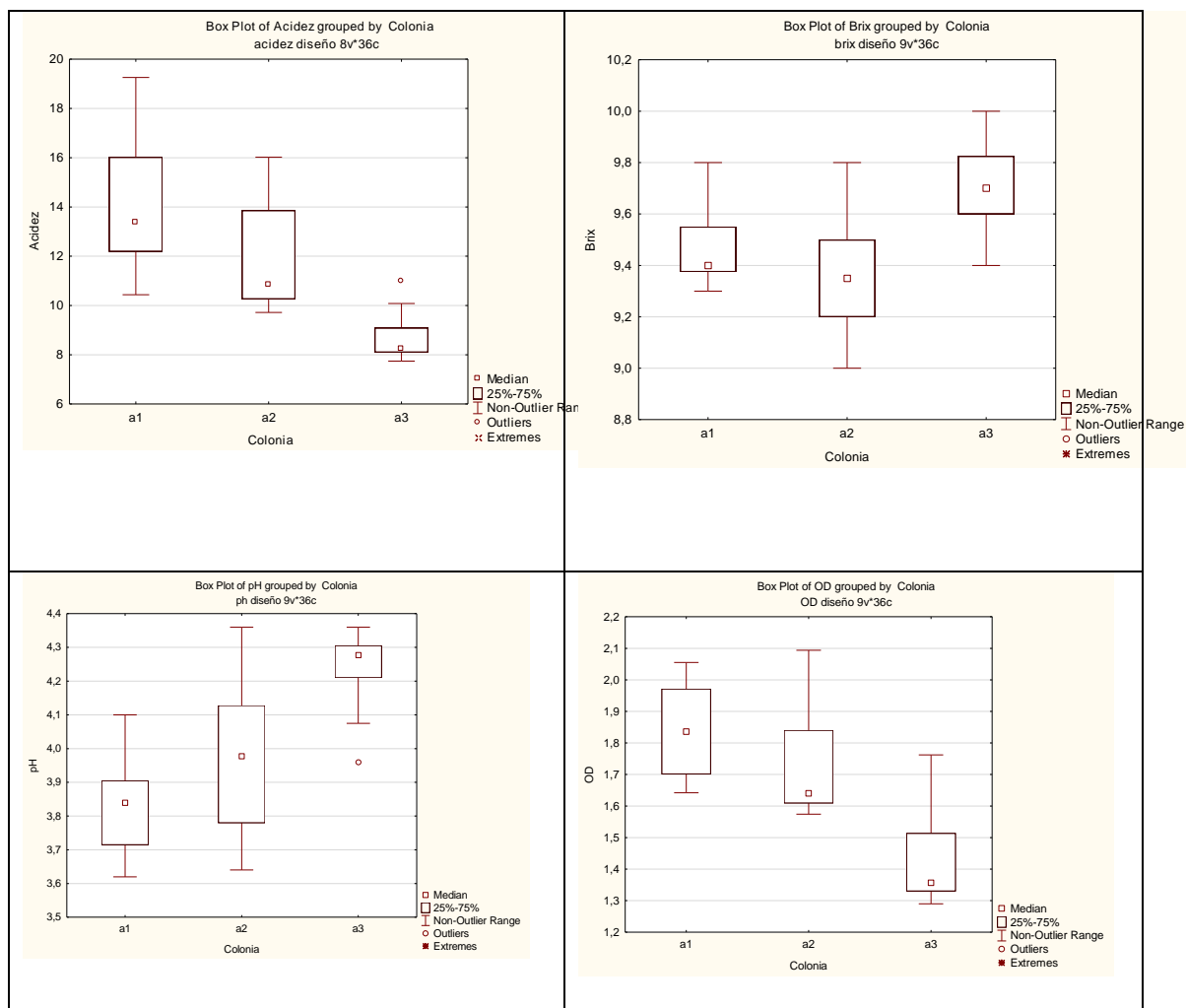
En la tabla 27 de análisis de varianza para la variable Zona de Inhibición de *R. stolonifer* se puede apreciar que existe diferencia significativa en el Factor A (Colonia) y en la interacción AxB. Mientras que en repetición y Factor B (Fuente de Carbono) y no existe diferencia significativa.

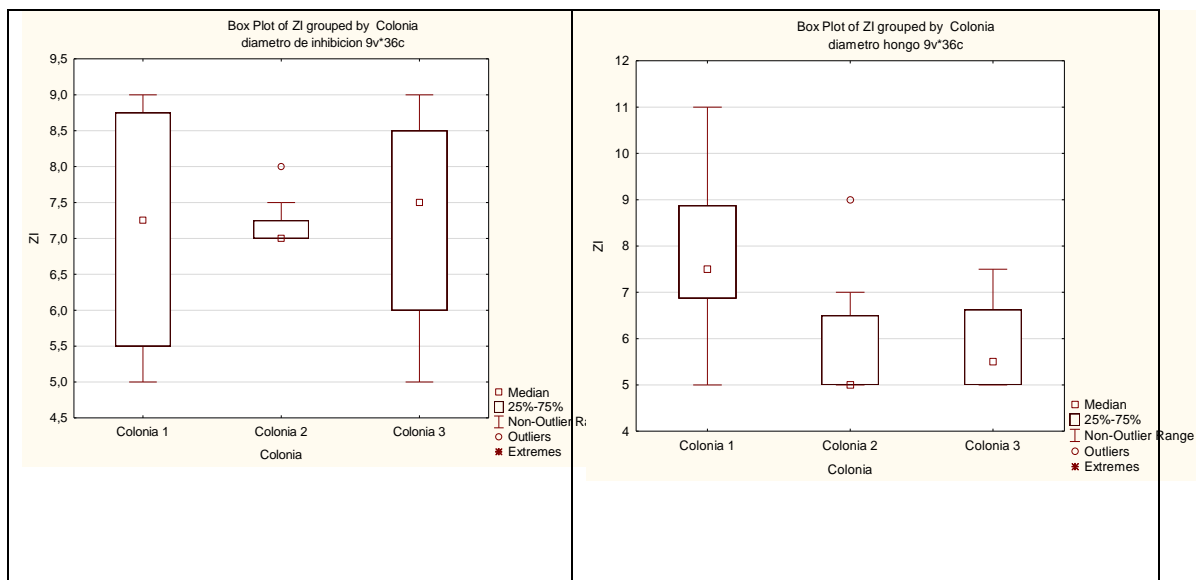
Prueba de significancia de Tukey $p < 0.05$ para los factores en estudio

Prueba de significancia de Tukey del Factor A

Tabla 28 Resultados de Tukey del Factor A (Colonia)

| Niveles | Acidez | ° Brix | pH | OD | E. coli | R. stolonifer |
|---------|-------------------------|------------|------------|------------|-----------|---------------|
| a1 | Colonia 1 14,058 (c) | 9,465 (a) | 3,83 (a) | 1,8391 (c) | 7,166 (a) | 7,687 (b) |
| a2 | Colonia 2 11,958 (b) | 9,35 (a) | 3,965 (b) | 1,7317 (b) | 7,166 (a) | 5,750 (a) |
| a3 | Colonia 3 8,6962 (a) | 9,7125 (b) | 4,2387 (c) | 1,4329 (a) | 7,250 (a) | 5,812 (a) |



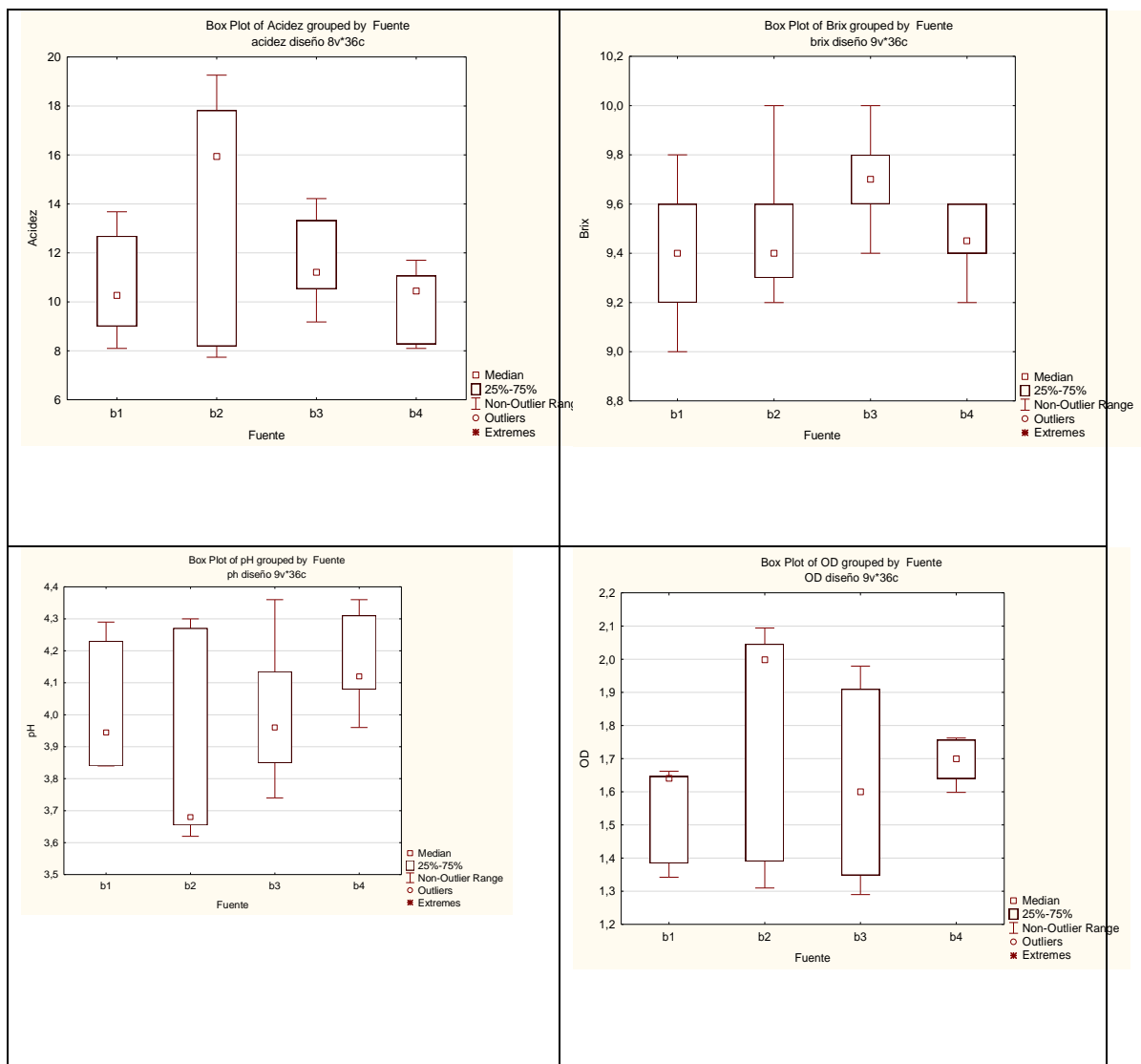


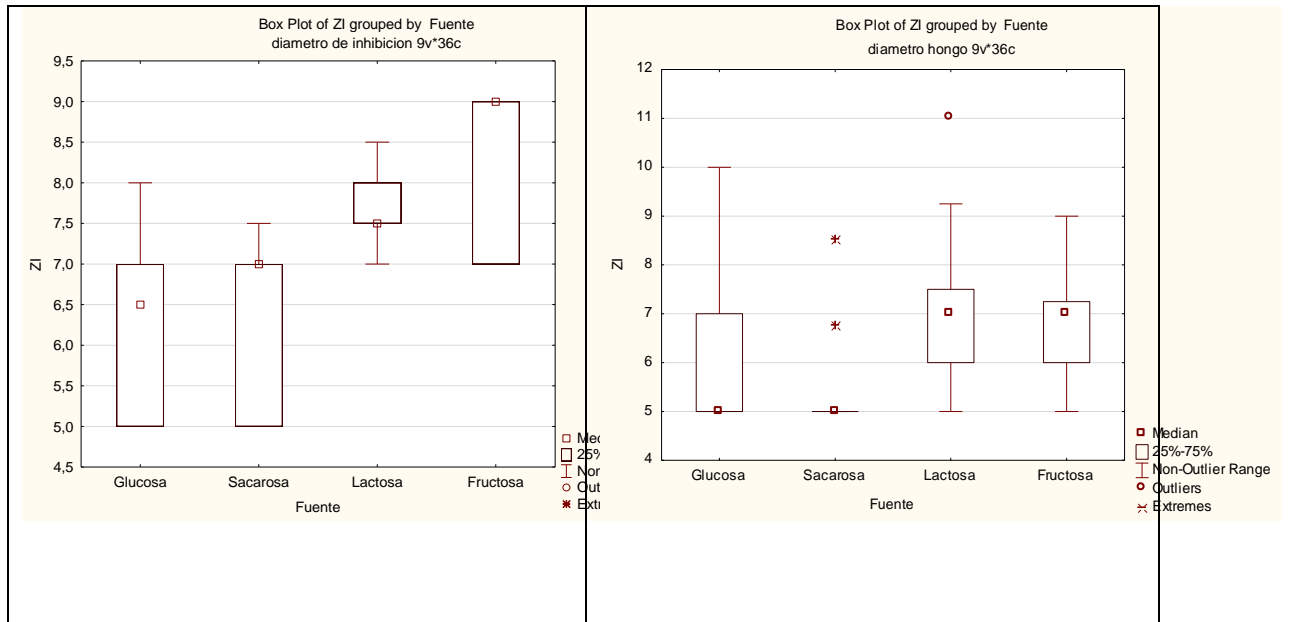
En la tabla 28, con respecto a los resultados de la prueba de Tukey para el Factor A (Colonia) se puede observar que la colonia 1 (14,0583 %) presentó mayor acidez que Colonia 2 (11,95875%) y colonia 3 (8,69625%). En cuanto a ° Brix, Colonia 1 (9,465) y Colonia 2 (9,35) presentaron resultados similares y menores en comparación con colonia 3 (9,7125). Con respecto a pH colonia 1 (3,83) presentó menor valor que colonia 2 (3,965) y colonia 3 (4,2387). Para la densidad óptica, la colonia 1 (1,8391) tuvo mayor OD que colonia 2 (1,7317) y colonia 3 (1,4329). En cuanto a la zona de inhibición de *E. coli*, todas las colonias presentaron resultados similares. Para la zona de inhibición de *R. stolonifer*, la colonia 1 (7,687 mm) tuvo mayores resultados que colonia 2 (5,750 mm) y colonia 3 (5,812 mm).

Prueba de significancia de Tukey del Factor B

Tabla 29 Resultados de Tukey del Factor B (Fuente de carbono).

| | Niveles | Acidez | ° Brix | pH | OD | E. coli | <i>R. stolonifer</i> |
|-----------|----------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|----------------------|
| b1 | Glucosa | 10,611 (a) | 9,4 (a) | 4,015 (a) | 1,5498 (a) | 6,333 (a) | 6,166 (a) |
| b2 | Sacarosa | 14,127 (c) | 9,483 (a) | 3,867 (b) | 1,8018 (d) | 6,389 (a) | 5,583 (a) |
| b3 | Lactosa | 11,646 (b) | 9,7 (b) | 4,001 (a) | 1,6213 (b) | 7,722 (b) | 7,166 (a) |
| b4 | Fructosa | 9,9000 (a) | 9,45 (a) | 4,161 (c) | 1,6986 (c) | 8,333 (c) | 6,750 (a) |



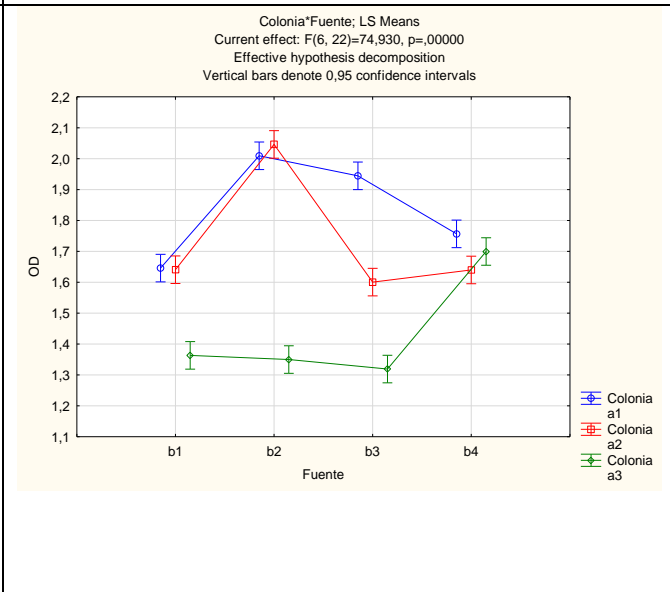
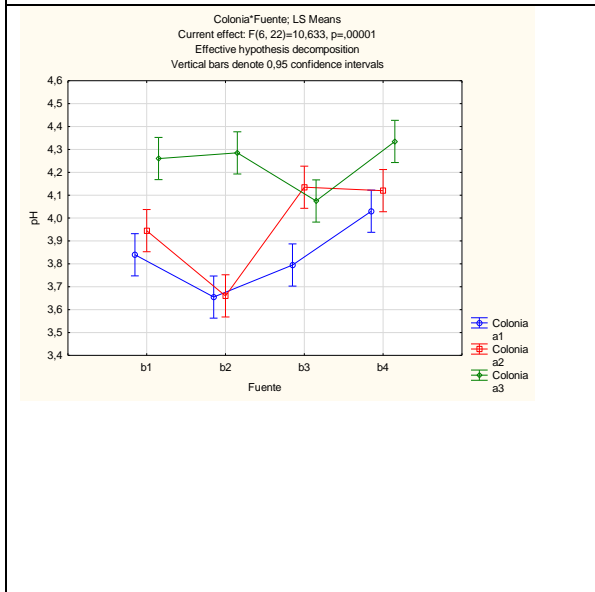
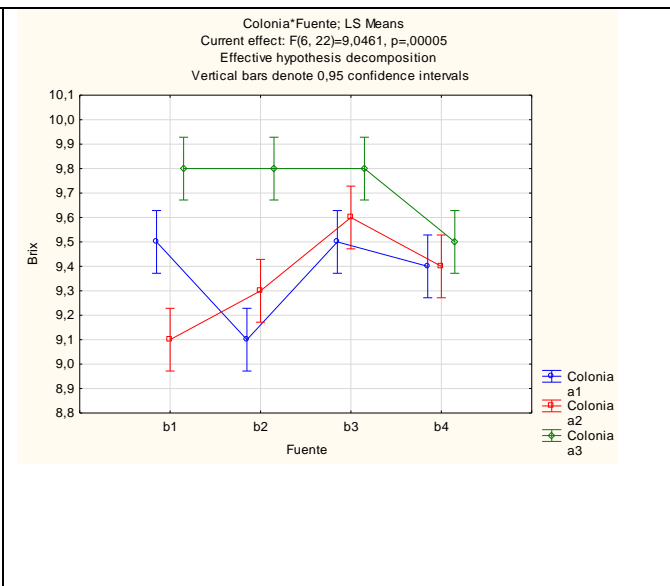
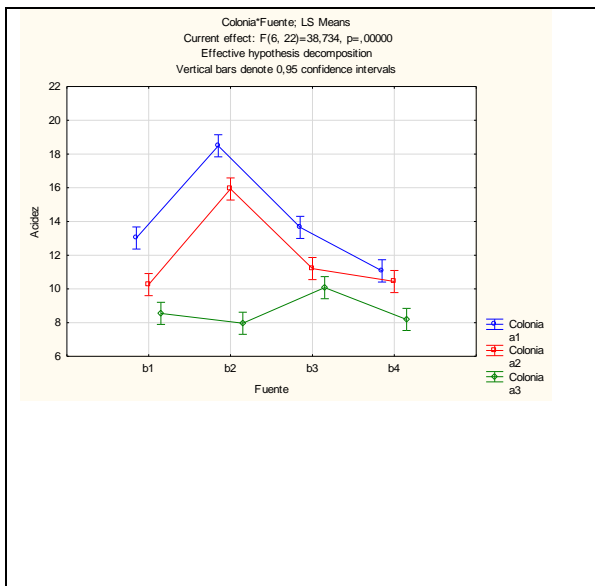


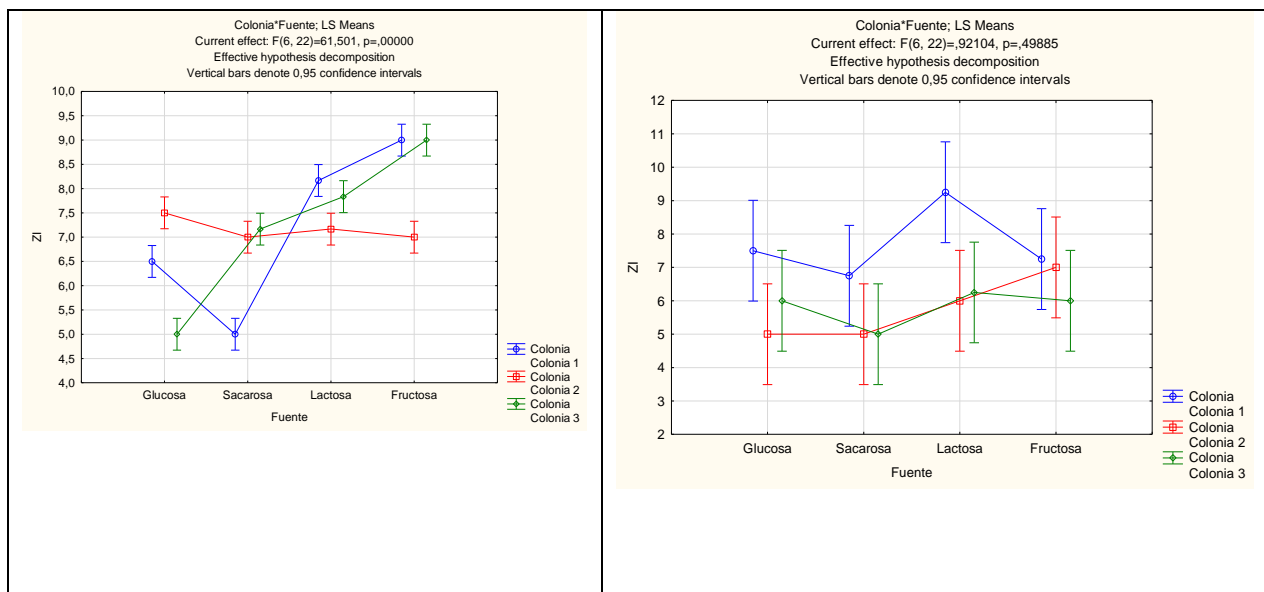
En la tabla 29, se pueden observar los resultados de la prueba de Tukey para el Factor B (Fuente de carbono), percibiendo que en cuanto a acidez, sacarosa tuvo mayor porcentaje (14,127%) que lactosa (11,646%), glucosa (10,611%) y fructosa (9,9000%). Para ° Brix, lactosa (9,7) tuvo mayores valores que sacarosa (9,483), fructosa (9,45) y glucosa (9,4). Los valores de pH fueron más bajos con sacarosa (3,867) mientras que con fructosa (4,161) fueron altos. Con respecto a la densidad óptica, sacarosa (1,8018) tuvo mayor OD y glucosa (1,5498) tuvo el menor. Para la zona de inhibición en *E. coli*, fructosa (8,333) mostró mayor diámetro que glucosa (6,333) y sacarosa (6,389). Para la zona de inhibición de *R. stolonifer*, todos los niveles fueron similares.

Prueba de significancia de Tukey de la interacción AxB

Tabla 30 Resultados de Tukey para la interacción AxB (Colonia x Fuente de carbono).

| | | Acidez | | brix | | pH | | OD | | E. coli | | R. stolonifer | |
|----|----|---------------|----|-------------|------|-----------|-----|-----------|----|----------------|-----|----------------------|----|
| a1 | b1 | 13,0233 | d | 9,4 | abc | 3,84 | def | 1,646 | ac | 6,500 | a | 7,50 | ab |
| a1 | b2 | 18,48667 | f | 9,35 | ac | 3,655 | d | 2,0095 | d | 5,000 | e | 6,75 | ab |
| a1 | b3 | 13,6533 | d | 9,65 | abd | 3,795 | de | 1,9445 | d | 8,167 | d | 9,25 | b |
| a1 | b4 | 11,07 | a | 9,45 | abcd | 4,03 | ae | 1,7565 | c | 9,000 | f | 7,25 | ab |
| a2 | b1 | 10,26 | a | 9,10 | c | 3,945 | aef | 1,6405 | a | 7,500 | bcd | 5,00 | a |
| a2 | b2 | 15,93 | e | 9,30 | ac | 3,66 | d | 2,046 | d | 7,000 | ab | 5,00 | a |
| a2 | b3 | 11,205 | a | 9,60 | abd | 4,135 | abc | 1,6005 | a | 7,166 | abc | 6,00 | ab |
| a2 | b4 | 10,44 | a | 9,40 | abc | 4,12 | abc | 1,64 | a | 7,00 | ab | 7,00 | ab |
| a3 | b1 | 8,55 | bc | 9,70 | abd | 4,26 | bc | 1,363 | b | 5,00 | e | 6,00 | ab |
| a3 | b2 | 7,965 | b | 9,80 | bd | 4,285 | bc | 1,35 | b | 7,166 | abc | 5,00 | a |
| a3 | b3 | 10,080 | a | 9,85 | d | 4,075 | ab | 1,319 | b | 7,833 | cd | 6,25 | ab |
| a3 | b4 | 8,19 | b | 9,50 | abcd | 4,335 | c | 1,6995 | ac | 9,00 | f | 6,00 | ab |





En la tabla 30, se pueden observar los resultados de la prueba de Tukey para la interacción AxB (Colonia x Fuente de carbono), encontrándose que para la variable acidez el grupo F (colonia 1- Sacarosa 18,48667%) tuvo valores más altos en comparación con el grupo B (Colonia 3 – Sacarosa 7,965% y Colonia 3 – fructosa 8,19%). Para ° Brix, el grupo d (Colonia 3 – lactosa 9,85) tuvo mayores resultados que el grupo c (colonia 2 – glucosa). en cuanto a pH, el grupo c (colonia 3 – fructosa 4,335) tuvo mayor valor que el grupo D (3,655). Para la densidad óptica, el grupo D (colonia 2- sacarosa 2,046 y colonia 1- sacarosa 2,0095) presento mayores resultados que el grupo b (colonia 3 – glucosa 1,363; colonia 3- sacarosa 1,35 y colonia 3- lactosa 1,319) con menores resultados. Para la zona de inhibición en *E. coli*, el grupo F (colonia 1- fructosa 9mm y colonia 3- fructosa 9 mm) tuvo más altos valores que el grupo E (colonia 1- sacarosa 5 mm y colonia 3 – glucosa 5 mm). Con respecto a la zona de inhibición de *R. stolonifer*, el grupo el grupo B (colonia 1- lactosa 9 mm) tuvo mayores valores que el grupo A (colonia 2- glucosa 5mm, colonia 2- sacarosa 5mm y colonia 3-sacarosa 5mm).

Resultado de gráficos de superficie de respuesta

Gráfico de superficie de respuesta de la variable Acidez

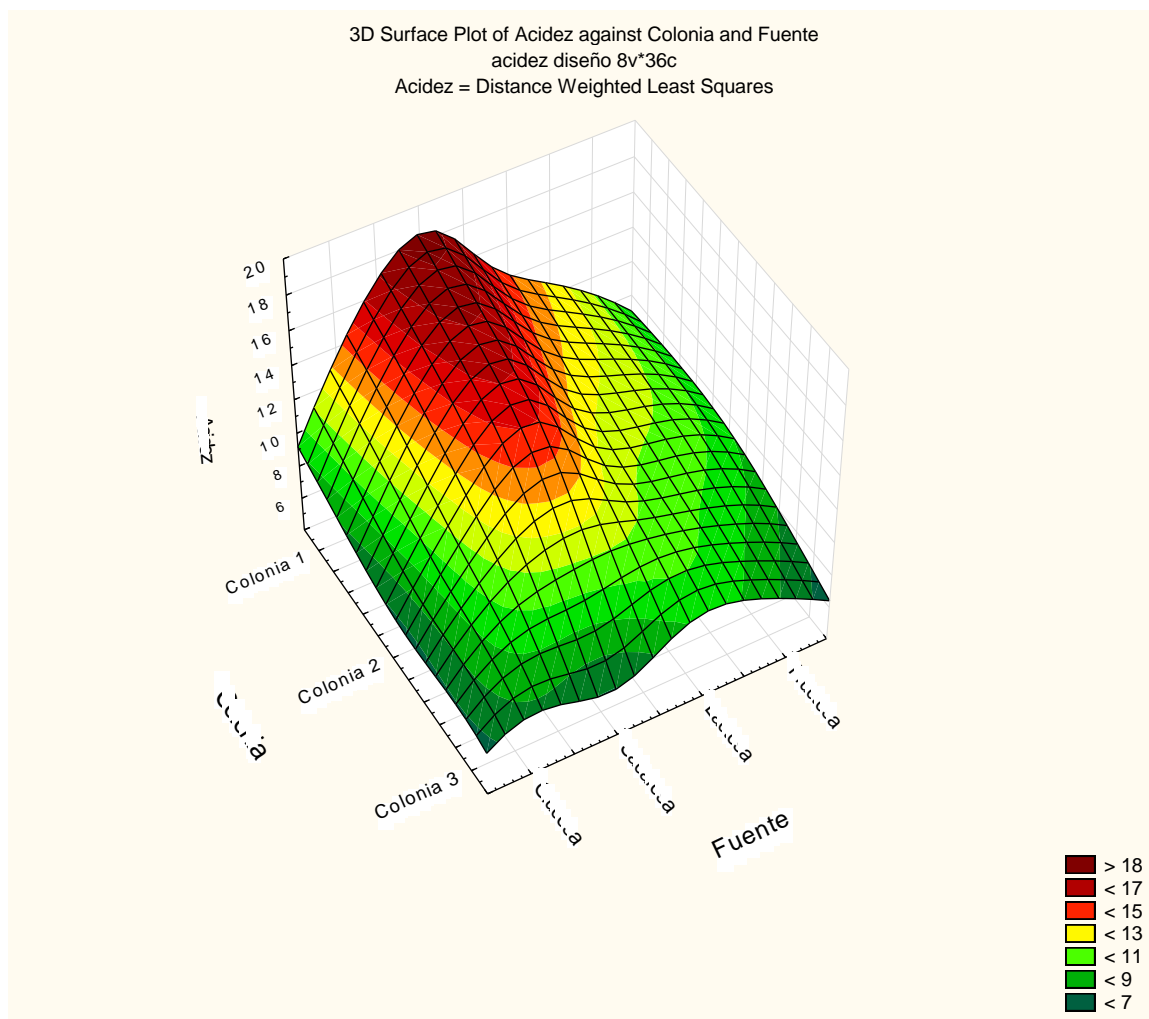


Figura 17. Gráfico de superficie de respuesta para Acidez.

En la figura 17 se puede observar que los valores más altos de acidez se encuentran en la parte inferior central de la gráfica que coincide con colonia 1 y sacarosa, mientras que los valores más bajos se encuentran en la parte superior de la superficie, coincidiendo con colonia 3 tanto con sacarosa como con fructosa y glucosa.

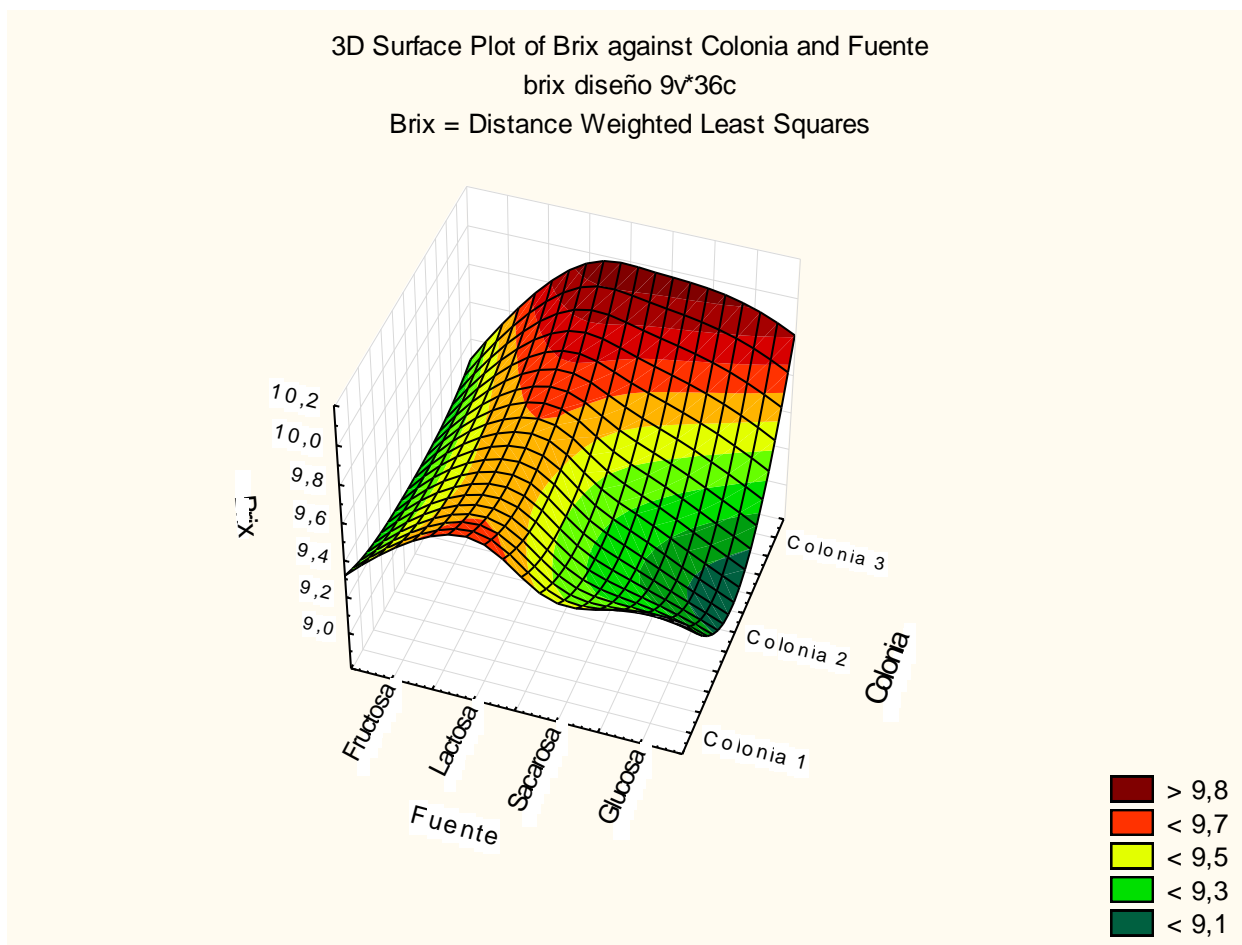
Gráfico de superficie de respuesta de la variable ° Brix.

Figura 18 Gráfico de superficie de respuesta para ° Brix

En el gráfico de superficie de la figura 18 se observan mayores valores de ° Brix en colonia 3 y lactosa, mientras que entre la colonia 2 y glucosa están los valores más bajos, según la gráfica.

Gráfico de superficie de respuesta de la variable pH

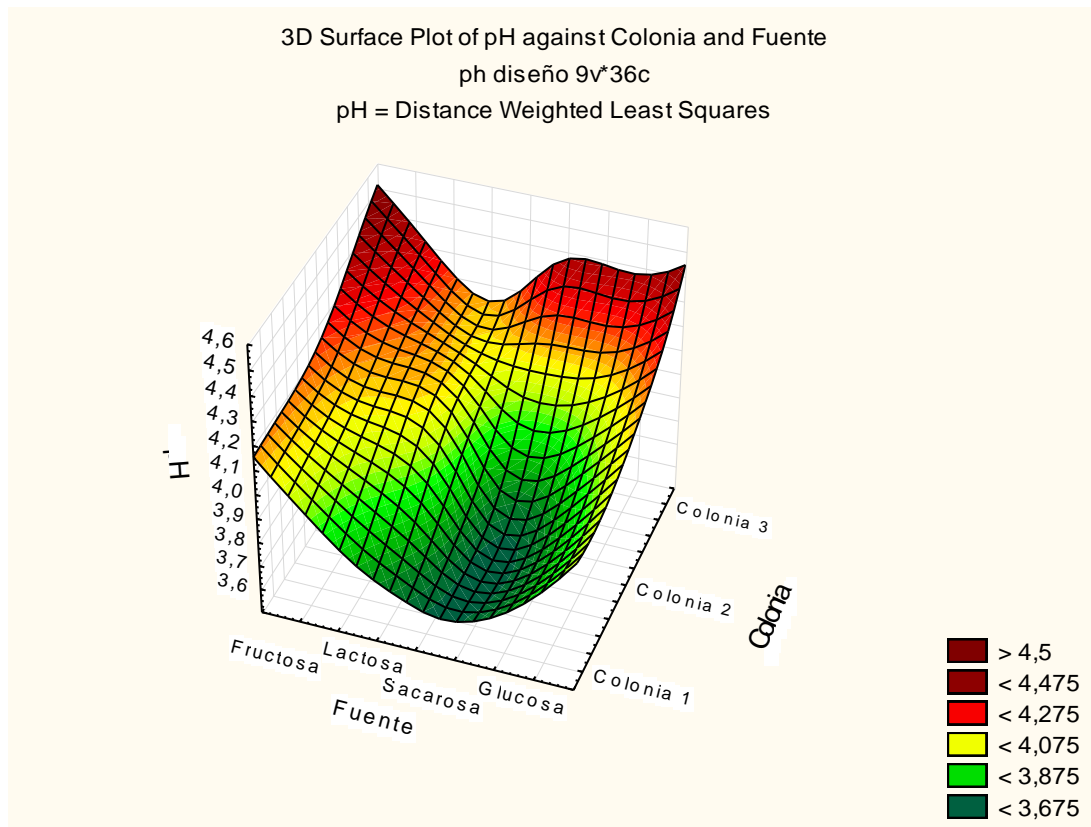


Figura 19 Gráfico de superficie de respuesta para pH

En la figura 19, se observan valores más altos en la parte superior de la gráfica coincidiendo con la colonia 3, especialmente con fructosa y glucosa. Mientras que los valores más bajos de pH se evidencian en la parte inferior de la superficie coincidiendo con colonia 1 y sacarosa.

Gráfico de superficie de respuesta de la variable Densidad Óptica

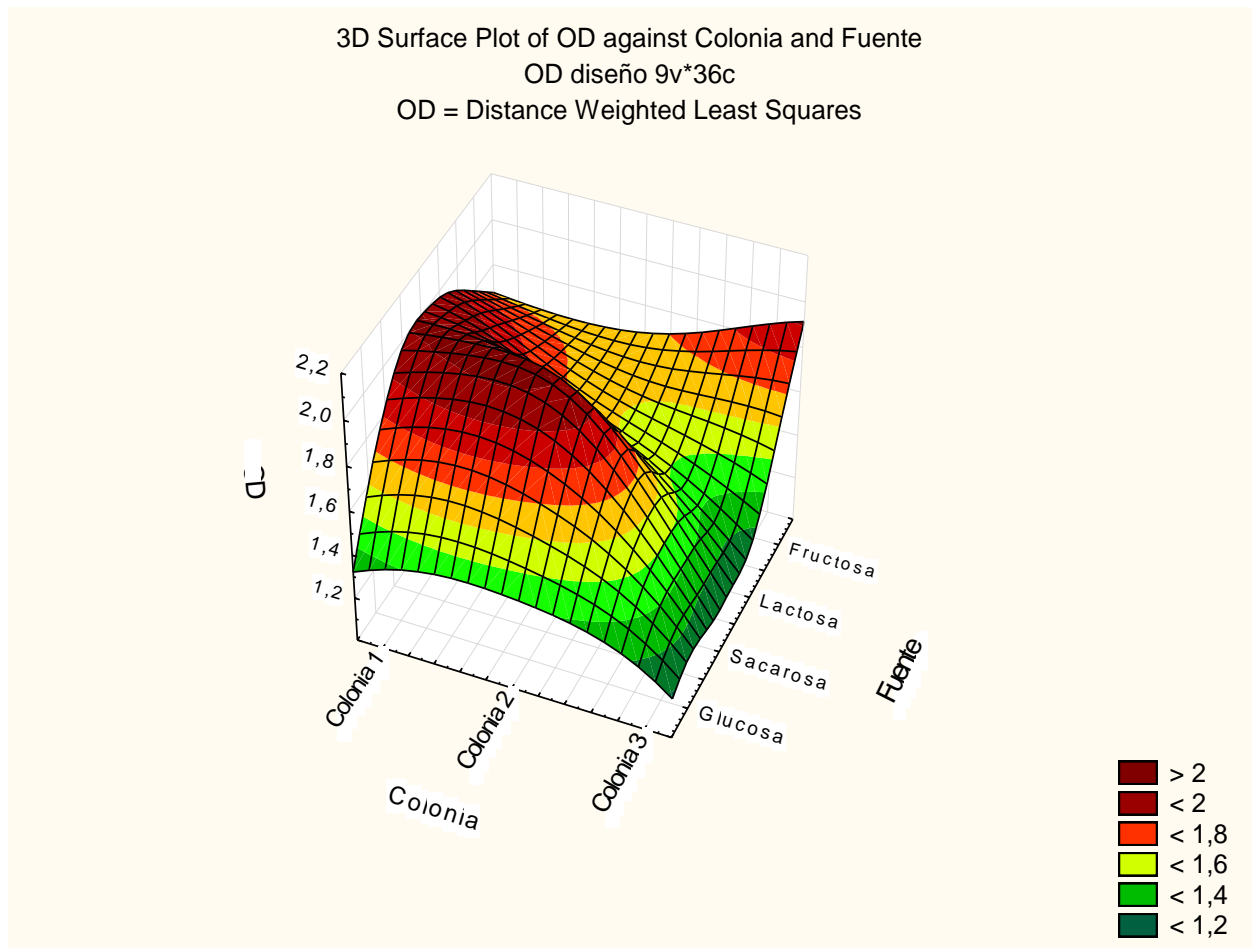


Figura 20 Gráfico de superficie de respuesta para OD

En la figura 20, se muestran valores altos de OD en la parte central izquierda de la superficie, coincidiendo con colonia 2 y sacarosa, además de colonia 1 y sacarosa. Mientras que los valores más bajos se ubican en la parte derecha de la superficie coincidiendo con colonia 3 tanto con glucosa, sacarosa 1,35 y lactosa 1,319.

Gráfico de superficie de respuesta de la variable Zona de Inhibición en *E. coli*.

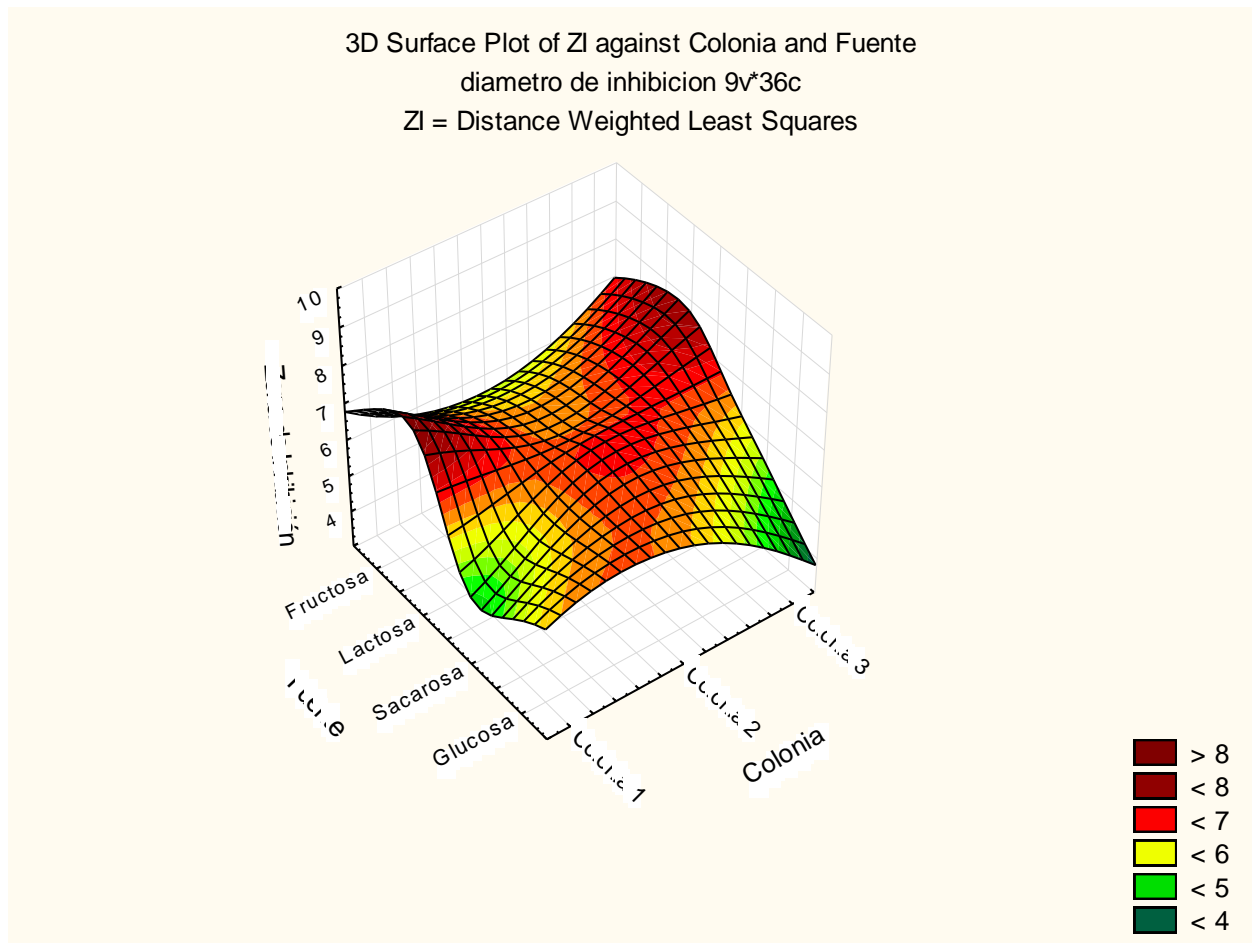


Figura 21 Gráfico de superficie de respuesta para Zona de Inhibición en *E. coli*.

En la figura 21, se observa amplia dispersión de valores altos en toda la superficie, denotando que los resultados han sido parejos entre la mayoría de los tratamientos. Sin embargo hay que destacar la marcada mancha roja en la colonia 1 y 3 con fructosa, siendo estos los valores más altos. Por otro lado, los valores más bajos se encuentran en la colonia 1 y sacarosa, así como también en colonia 3 y glucosa.

Gráfico de superficie de respuesta de la variable Zona de Inhibición en *R. stolonifer*.

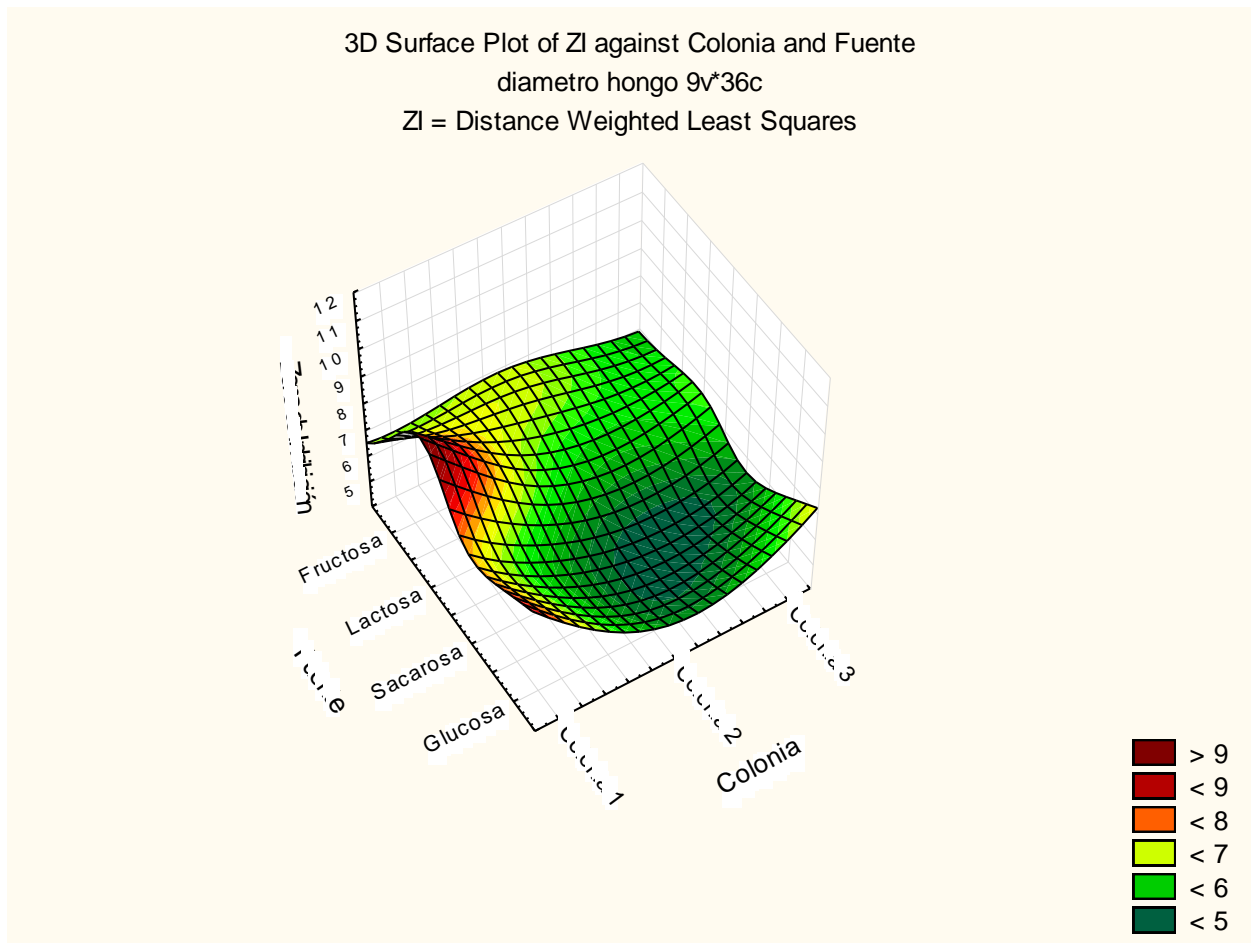


Figura 22 Gráfico de superficie de respuesta para Zona de Inhibición en *R. stolonifer*.

En la figura 22, se puede notar una similitud en los colores verdes en toda la superficie demostrando la poca efectividad que se tuvo con esta variable, sin embargo se puede expresar que los valores más altos se encuentran en colonia 1 y lactosa. Mientras que la colonia 2 con glucosa y sacarosa, así como la colonia 3 y sacarosa, fueron los tratamientos con menores resultados.

Resultado de análisis de conglomerados

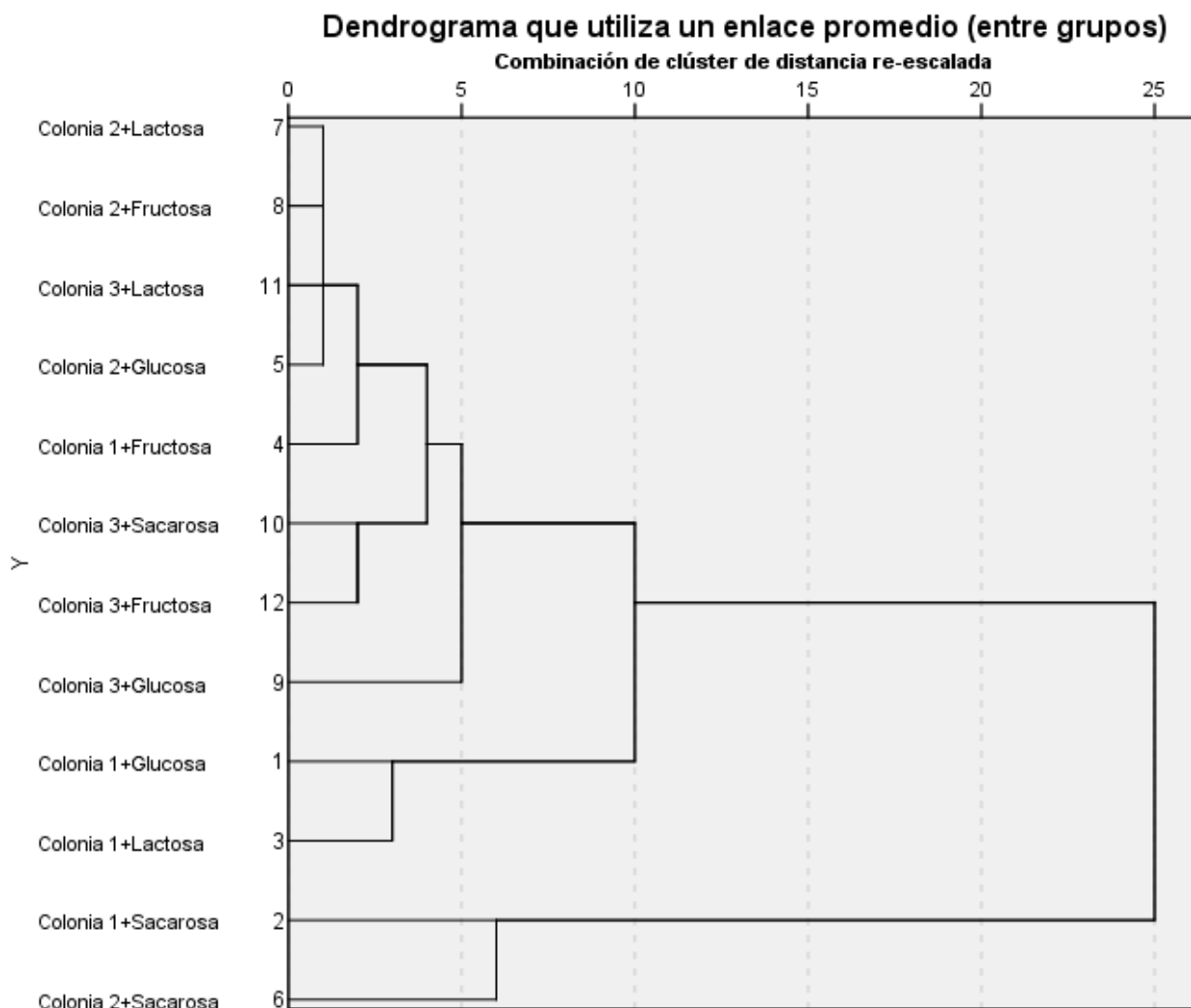


Figura 23 Dendrograma de los tratamientos estudiados.

En la figura 23, se representa el dendrograma mediante un cluster jerárquico que muestra las proximidades entre los tratamientos en estudio. Se puede observar estrecha relación entre Colonia 2+Lactosa, Colonia 2+Fructosa, Colonia 3+Lactosa y Colonia 2+Glucosa.

Por otra parte, el tratamiento Colonia 3+Fructosa tuvo menor proximidad con Colonia 1+Sacarosa.

Análisis de componentes principales

Tabla 31 Matriz de correlación de componentes principales

| Matriz de correlaciones | | | | | | |
|------------------------------|-------|--------|-------|--------|----------|-------|
| | pH | ° Brix | OD | Acidez | Bacteria | Hongo |
| pH | 1,000 | ,376 | -,728 | -,912 | ,238 | -,232 |
| ° Brix | ,376 | 1,000 | -,523 | -,350 | ,043 | ,154 |
| OD | -,728 | -,523 | 1,000 | ,803 | ,043 | ,206 |
| Acidez | -,912 | -,350 | ,803 | 1,000 | -,354 | ,221 |
| Zona de inhibición: Bacteria | ,238 | ,043 | ,043 | -,354 | 1,000 | ,034 |
| Zona de inhibición: Hongo | -,232 | ,154 | ,206 | ,221 | ,034 | 1,000 |

En la tabla 31, se puede observar que entre las variables acidez y densidad óptica OD existe una fuerte correlación (0,803) mientras que la variable pH tiene una ligera correlación con ° Brix y Zona de inhibición en *E. coli* (0,376 y 0,2).

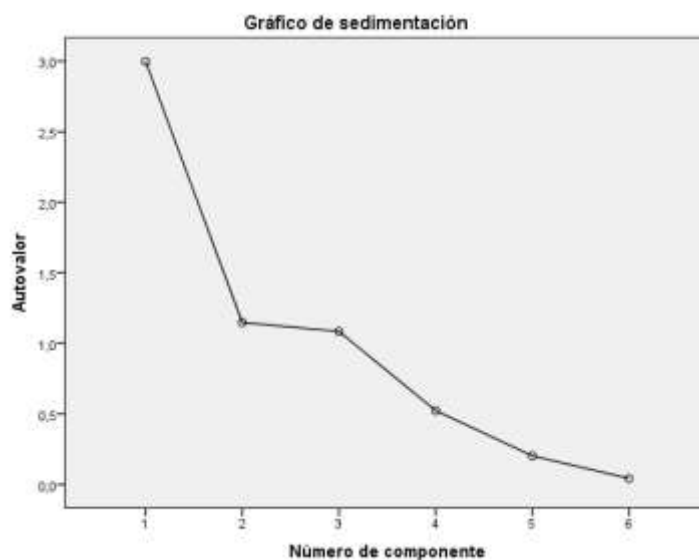


Figura 24 Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales.

Tabla 32 Matriz de componentes

| Matriz de componente^a | | | |
|---|-------------------|----------|----------|
| | Componente | | |
| | 1 | 2 | 3 |
| pH | -,925 | -,091 | ,059 |
| ° Brix | -,559 | ,625 | -,209 |
| OD | ,887 | -,054 | ,316 |
| Acidez | ,952 | ,095 | -,152 |
| Zona de inhibición: Bacteria | -,268 | -,009 | ,934 |
| Zona de inhibición: Hongo | ,257 | ,858 | ,205 |

Método de extracción: análisis de componentes principales.

a. 3 componentes extraídos.

La figura 24 determina el número de componentes principales útiles en este estudio para ser extraídas. Tal como se puede observar en el gráfico de sedimentación, las tres primeras componentes son requeridas para ser utilizadas en este estudio, por ende se toman 3 componentes principales para el análisis. También es posible determinar el número de componentes principales mediante los valores de varianza, los cuales deben ser mayor a 1 para poder explicar más de una variable por si sola.

La tabla 32 permite interpretar cada componente principal extraída tomando en cuenta la magnitud y la dirección de cada uno de los coeficientes de las variables. Tomando en cuenta el valor absoluto de los mismos, se puede tener una idea de cuan significativa es la componente para cada variable. Entre más alto sea el valor absoluto mejor explicada la variable en una determinada componente, por ende se puede observar que la primera componente explica muy bien las variables pH, OD y acidez, mientras que la segunda componente explica ° Brix y zona de inhibición en el hongo, y la tercera componente detalla mejor zona de inhibición de la bacteria.

Tabla 33 Tabla de comunalidades.

| | Comunalidades | |
|-------------------------------------|----------------------|------------|
| | Inicial | Extracción |
| pH | 1,000 | ,867 |
| ° Brix | 1,000 | ,747 |
| OD | 1,000 | ,888 |
| Acidez | 1,000 | ,939 |
| Zona de inhibición: Bacteria | 1,000 | ,945 |
| Zona de inhibición: Hongo | 1,000 | ,845 |

En la tabla 33 de comunalidades, se puede apreciar el porcentaje que estas componentes pueden explicar de cada variable. La correlación entre las 3 componentes principales extraídas para la interpretación de cada una de las variables de este estudio es óptima para la explicación de la variabilidad de los datos; por ejemplo, el análisis de componentes principales logra explicar el 95% de la información de la variable zona de inhibición en *E. coli*.

Gráfico de componente en espacio rotado

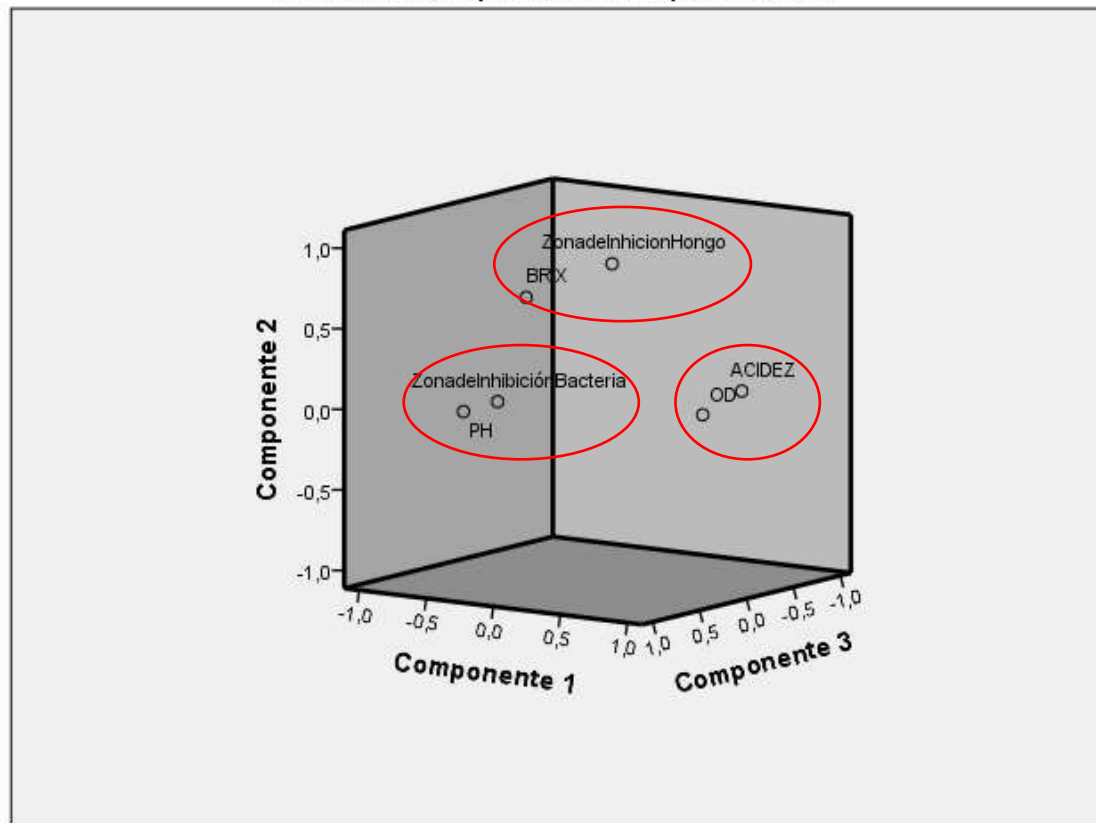


Figura 25 Gráfico de componentes principales

La figura 25 resume toda la información recopilada de las correlaciones entre las variables, obteniéndose que acidez y Densidad Óptica mantienen una estrecha relación. Así mismo, se puede observar que ° Brix se relaciona con la Zona de Inhibición en el Hongo. Y por último se evidencia estrecha correlación entre pH y Zona de Inhibición en *E. coli*.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

Las especies del género *Bacillus* spp. poseen características fisiológicas únicas así como una amplia capacidad de producción de enzimas, antibióticos y metabolitos, los cuales son utilizados en biomedicina, producción de fármacos, aplicaciones agrícolas e industriales. Su utilización como probióticos ha sido ampliamente consumido, especialmente a nivel de sus esporas, ya sea para uso animal o humano, comercializados en muchos países como Estados Unidos, Australia y demás países de América del Sur y Europa. (Celandroni, y otros, 2019)

Las formulaciones probióticos contienen diversas sustancias antimicrobianas, como bacteriocinas, biosurfactante, exopolisacárido, sideróforo, ácidos grasos de cadena corta y ácidos orgánicos, los cuales modulan los trastornos gastrointestinales por efecto antimicrobiano y antiadherente contra distintas cepas patógenas, además de funcionar como inmunomodulares, anticancerígenos y reducen el colesterol. (Lee, Kim, & Paik, 2019)

Especies del género *Bacillus* se pueden encontrar de forma extendida en la naturaleza como en el suelo, aire, alimentos fermentados y en el intestino humano. Tienen la ventaja de rápida adaptación a condiciones ambientales extremas y rápida esporulación. Sin embargo, se conoce que ciertas cepas pueden transferir genes de resistencia a antimicrobianos, además producen enterotoxinas y aminos biogénicas. (Lee, Kim, & Paik, 2019)

Bacillus licheniformis es una especie probiótica grampositiva formadora de endosporas, que se ha reportado principalmente en el suelo, también en alimentos fermentados tradicionales, tal como este estudio. Esta especie se ha utilizado principalmente como probiótico en simbiosis con otras cepas de *Bacillus*. (Lee, Kim, & Paik, 2019)

Así mismo se han reportado que productos fermentados con *Bacillus licheniformis* mejoran el crecimiento, ganancia de peso y perfiles hematológicos tanto en aves y lechones, regulando la composición de la microbiota intestinal. Varios estudios se han realizado con esta especie como probiótico en camarones, peces, ganado y pollos de engorde, mientras que existe muy poca evidencia de su actividad en humanos. (Cheng, Horng, Dybus, & Yu, 2021)

Por otro lado, en el estudio de (Yang, y otros, 2014) observaron que la pasta fermentada de soja con *Bacillus licheniformis* evita la acumulación de β -amiloides en el cerebro causante de Alzheimer, mejora la homeostasis de la glucosa y previene la diabetes.

La segunda colonia fue identificada a nivel género, siendo este *Oceanobacillus* spp. Este género se caracteriza por ser bacterias aeróbicas, en forma de bastón, formadoras de esporas, halófilas, aisladas de varios entornos. Al principio se clasificaron como miembros del género *Bacillus*, pero debido a comparaciones de genes 16s ARNr y características quimiotaxonómicas se formó este género independiente. (Nam, W., & Lee, 2008)

Este género se encuentra especialmente en suelos marinos, en entornos de aguas profundas, algas marinas, lagos salados, aguas residuales, sedimentos marinos, peces y mariscos, así también se han encontrado en alimentos fermentados como *kimchi*,

gochujang, *Baijiu*, licores fermentados y pasta de camarones fermentados. (Namwong, Tanasupawat, Lee, & Lee, 2009)

La tercera colonia corresponde a *Staphylococcus sciuri*. Los estafilococos son bacterias Gram positivas, aeróbicas, en forma de cocos, formadores de endosporas; comúnmente conocidos como patógenos responsables de múltiples infecciones en seres humanos. Se pueden encontrar en la microbiota normal de la piel en humanos y animales, así como en el suelo, agua, plantas y rizosfera. (Alijani, Amini, Ashengroph, & Bahramnejad, 2019)

La presencia de esta bacteria en alimentos fermentados se considera como un contaminante debido a condiciones del entorno y por esterilización incompleta. (Wu, Zhang, Shi, & al., 2013)

Sin embargo, otros autores suponen la presencia de esta bacteria en alimentos fermentados como modulador esencial del sabor y el aroma de forma positiva, así también se ha utilizado como cultivo iniciador en la producción de queso. (Parkouda, y otros, 2010)

Se puede considerar que debido a su estatus como bacteria patógena, no existe suficiente documentación científica sobre fermentaciones con *S. sciuri*, y no se explora extensamente su potencial antimicrobiano ni su papel como cultivo iniciador en comparación con las bacterias ácido lácticas comúnmente conocidas. (Van der Veken, y otros, 2020)

Con respecto a las cepas bacterianas (Factor A)

En cuanto a los niveles de acidez, o porcentaje de ácido láctico, se observó que *Bacillus licheniformis* (14,058%) tuvo mayores valores en comparación con *Oceanobacillus* spp (11,958%) y *Staphylococcus sciuri* (8,6962%).

Se ha informado que algunas de las especies del género *Bacillus* también producen ácido láctico en cantidades considerables a través de procesos fermentativos, como *Bacillus licheniformis*. (Wang, Zhao, Chamu, & Shanmugam, 2011)

Oceanobacillus sp es un género que se caracteriza por poseer especies alcalifílicas, que sin embargo pueden producir ácido láctico en buenos ratios. Se considera que este tipo de bacterias pudieron haber evolucionado de forma diferente de las bacterias ácido lácticas comunes por ende sus metabolitos tendrían ciertas características diferentes. Debido a esto es necesario aislar y optimar el crecimiento de este tipo de bacterias para futuras aplicaciones industriales. (Yokaryo & Tokiwa, 2014)

Staphylococcus sciuri es una bacteria que no se caracteriza por la producción de ácido láctico, en el estudio de (Hartmann, Wilke, & Erdmann, 2011) fue una de las cepas con menor producción de ácido láctico de entre las estudiadas.

En cuanto a pH, *B. licheniformis* (3,83) demostró menores valores de pH, en comparación con *Oceanobacillus* spp (3,965) y *Staphylococcus sciuri* (4,2387). Estos valores coinciden con los niveles inversos de acidez, esto es debido a que los dos primeros son mejores productores de ácido láctico en comparación del estafilococo.

Especies de *Bacillus* spp. presentan alta estabilidad al calor y capacidad para sobrevivir en pH bajo. (Niu, y otros, 2019) En el estudio de (Hsu, Yi, Lee, & Liu, 2018), *B. licheniformis* sobrevivió después de la incubación a pH 2.0 o 3.0.

Oceanobacillus spp es un género de bacterias generalmente alcalifílicas, que poseen un rango de crecimiento de pH entre 4.5 a 10 (Lee, y otros, 2013). En el estudio de (Yokaryo & Tokiwa, 2014) registraron reducción de pH luego de 24 horas a 5 debido a la producción de los ácidos orgánicos en el medio de fermentación.

En el caso de *Staphylococcus sciuri* no presenta un amplio potencial de decrecimiento de pH en el medio, ya que se mantiene estable en pH de entre 5 a 6, además coincide con su baja capacidad para producir de ácido láctico durante la fermentación. (Wei, y otros, 2013)

La medida de los grados Brix permite dar una mirada a los azúcares disueltos en los medios de fermentación. En este caso fue importante tomarlos en cuenta para conocer el flujo de consumo de las fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa) por parte de cada una de las bacterias. Esto nos da un análisis de la capacidad que tienen estas cepas de consumir estos azúcares.

En cuanto a los grados Brix, se obtuvo que *Oceanobacillus* spp (9,35) y *Bacillus licheniformis* (9,485) no tuvieron diferencias significativas entre sí, presentando menores valores en comparación con *Staphylococcus sciuri* (9,7125).

Estos resultados sugerirían que *Oceanobacillus* spp y *Bacillus licheniformis* son bacterias con mayor disposición de consumo de estos azúcares.

En el caso de *Staphylococcus sciuri* presentó mayores valores de ° Brix al final de la fermentación, esto podría deberse a que esta bacteria tiene mayor predisposición de consumo de medios enriquecidos con péptidos, proteínas, amino ácidos y demás sustancias nitrogenadas complejas, tales como agar de soya trípico, Columbia Agar, agar infusión de cerebro y corazón.

La densidad óptica es un método de medición relativo del crecimiento bacteriano. Es un procedimiento rápido y sencillo que permite la comparación en la turbidez de los medios de cultivo. En este caso *Bacillus licheniformis* (1,8391) presentó una OD mayor que *Oceanobacillus* spp (1,7317) y *Staphylococcus sciuri* (1,4329).

Estos resultados podrían deberse a que el medio de cultivo utilizado para todas las cepas fue MRS (Man, Rogosa y Sharpe), con suplementación de diferentes fuentes de carbono, siendo óptimo para *Bacillus licheniformis* al ser una bacteria con mínimos requerimientos nutricionales en comparación con *Oceanobacillus* spp y *Staphylococcus sciuri*. Estos dos últimos se caracterizan por necesariamente utilizar medios con moderadas/altas concentraciones de sal.

La sal en el medio de cultivo ayuda a mantener el equilibrio osmótico y ayuda a regular el potencial de membrana celular al proporcionar iones de sodio, potasio y calcio.

Oceanobacillus spp es una bacteria halotolerante y alcalifilica, por ende el contenido de sal y el pH influyeron en gran medida en su crecimiento dentro de los sistemas de fermentación. Debido a que son facultativamente alcalifílico se podría determinar que el bajo contenido de sal y minerales fue el causante principal que no tuviera mayor crecimiento. (Osimani, y otros, 2019)

En el caso de *Staphylococcus sciuri*, sus medios de cultivo también se caracterizan por tener altos contenidos de péptidos y amino ácidos, así como considerables cantidades de NaCl. El medio empleado en este estudio si contiene todos estos requerimientos, sin embargo es posible que esta especie requiera de mayores concentraciones.

En los niveles de actividad bacteriocina en *E. coli* de las cepas estudiadas se pudo determinar que entre estas no existen diferencias significativas, concluyendo entonces que las tres cepas producen similar actividad antibacteriana. En cuanto a su actividad contra *R. stolonifer* se evidenció que *Bacillus licheniformis* si presentó diferencia debido a su mayor potencial de inhibición que las dos restantes bacterias.

Es importante reconocer que de forma general el género *Bacillus* sp posee una gran cantidad de péptidos antimicrobianos con distintas estructuras químicas básicas. En el caso específico de *Bacillus licheniformis*, se han reportado ciertas bacteriocinas como bacilocina 490, bacitracina, liquenicidina y liquenina. Debido a su capacidad de producción de compuestos antimicrobianos y formación de esporas, estas bacterias poseen doble ventaja para su supervivencia en diversos hábitats de la naturaleza. (Smitha & Bhat, 2013)

Al contrario de las bacterias ácido lácticas comunes, las especies de *Bacillus* poseen una amplia actividad inhibidora de múltiples bacterias patógenas. Por ello se han realizado amplias investigaciones científicas sobre bacteriocinas producidas por especies de *Bacillus* en productos alimenticios con el fin de dar una mayor proyección de estas en aplicaciones alimentarias, así como en estudios clínicos. (Shobharani, Padmaja, & Halami, 2015). Debido a todo esto, es importante considerar que la presencia de este tipo de bacterias en los alimentos no siempre indica deterioro o intoxicación alimentaria, puesto que muchas de estas se utilizan en la producción de alimentos para humanos y animales de forma segura. (Smitha & Bhat, 2013)

(Vadakedath & Halami, 2019) mencionan que *Bacillus licheniformis* es capaz de inhibir el crecimiento de una amplia variedad de patógenos. Los estudios de su actividad

antimicrobiana tanto *in vivo* como *in vitro* mostraron que esta especie es segura para su aplicación en la industria alimentaria.

En el estudio de (Halami, 2019) se demostró la capacidad de *Bacillus licheniformis* para producir antibióticos similares a la subtilina, encontrándose con una bacteriocina similar a la subtilina, la cual denominó sublicenina, este compuesto mostró una fuerte actividad antibacteriana contra patógenos transmitidos por alimentos además de bacterias ácido lácticas resistentes a antibióticos.

Hasta hace poco, los estudios entorno a las bacteriocinas se limitaba a evaluar la actividad antibacteriana, y muy poco a evaluar su actividad contra hongos. Sin embargo, debido a su amplio espectro de acción, en la actualidad se tienen más estudios respecto a estos microorganismos. Varias especies de *Bacillus* sp. han sido reportadas como productoras de bacteriocinas eficaces contra hongos. En el estudio de (Dehghanifar, Keyhanfar, & Emtiazi, 2019) demostraron que cepas de *Bacillus pumilus* presentaron actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani* y se seleccionaron para futuras investigaciones. Así también las preparaciones de sobrenadantes libres de células de las cepas de *Bacillus* sp probadas en estudios de (Fira, Dimkić, Berić, Lozo, & Stanković, 2018) fueron activas contra muchos patógenos fúngicos y bacterianos, tanto *in vitro* como *in vivo*., siendo esta una alternativa para el biocontrol de patógenos en plantas. En cuanto a *Bacillus licheniformis*, el trabajo de (He, Chen, & Liu, 2006) se evidenció la eficacia de bacteriocinas de esta especie contra varias especies de bacterias Gram-positivas y patógenos fúngicos, como *Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Guignardia* sp. entre otras.

Hasta la actualidad no se han reportado estudios sobre producción de bacteriocinas para especies de *Oceanobacillus* sp. En el trabajo de (Chen, y otros, 2018) se identificaron tres compuestos activos (butiramidas y benzoato de bencilo) a partir de

Oceanobacillus, que exhibieron actividad inhibitoria de detección de quorum contra compuestos tóxicos producidos por *C. violaceum* (violaceína) y *P. aeruginosa* (piocianina). Este reporte supondría una evidencia de la capacidad de este género para la producción de metabolitos activos con capacidad de inhibición de bacterias y sus componentes tóxicos. Por lo anterior, se recomienda realizar mayor caracterización y aislamiento de nuevas cepas de *Bacillus* sp con el fin de elucidar su potencial antimicrobiano.

Staphylococcus sciuri es considerada como una bacteria patogénica, pero esta también es capaz de producir bacteriocina y su actividad antimicrobiana ha sido probada en distintos estudios como en el de (Carson, Barkema, Naushad, & De Buck, 2017) que determinaron la capacidad inhibitoria de distintos aislados de estafilococos no aureus, encontrando que *Staphylococcus sciuri* y otros estafilococos demostraron capacidad de inhibición del crecimiento de *S. aureus* bovino en vitro.

En el estudio de (Hartmann, Wilke, & Erdmann, 2011), *Staphylococcus sciuri* demostró eficacia en contra de varias bacterias Gram positivas como *Brochothrix thermosphacta*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus*, *Leuconostoc carnosum*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

Por otro lado, (Van der Veken, y otros, 2020) explica que aún es esencial comprobar la proliferación suficiente de *Staphylococcus sciuri* en productos fermentados mientras demuestra su actividad antibacteriana, ya que esta podría verse afectada por las condiciones de crecimiento, por la composición del medio, por el pH y la temperatura.

No existen registros de actividad inhibitoria de *Staphylococcus sciuri* aplicada en hongos hasta la presente fecha.

Con respecto a la fuente de carbono (Factor B)

Es necesario hacer hincapié en como la composición del medio de cultivo puede afectar a la producción de compuestos antimicrobianos y demás metabolitos durante la fermentación. Por ello la determinación del tipo y componentes del medio a emplear es un paso importante en los estudios microbiológicos. Siendo esta una estrategia fundamental en el diseño del proceso fermentativo para la determinación de la actividad antimicrobiana. (Bolocan, y otros, 2017) recalcan la importancia del uso de distintos medios de cultivo para aislar bacterias productoras de bacteriocinas, ya que en su estudio solamente pudieron aislar 4 de las 11 cepas usando medio MRS o M17, los cuales son los medios más representativos en este tipo de aislamiento a partir de champiñones, pero pueden limitar el aislamiento de más o nuevas bacterias productoras de bacteriocinas. Por ello también usaron otros medios alternativos como agar Luria-Bertani (LB), agar triptona soja (TSA), agar BHI, agar de selección de Lactobacillus (LBS), agar LM17 y agar de leche desnatada para recuento en placa. Está claro que esta sugerencia ha pasado por alto en este estudio por ende es recomendable implementarla para futuras investigaciones.

El tipo o composición del medio de cultivo, especialmente las fuentes de nitrógeno y carbono, siempre influye en la producción de bacteriocina y demás parámetros durante la fermentación. Así también los medios bajos en ciertos nutrientes pueden facilitar el aislamiento de bacterias que pueden producir nuevos compuestos antimicrobianos. (Bolocan, y otros, 2017)

Con respecto a Acidez, se observó que sacarosa (14,127%) mostró mayores valores mientras que fructosa (9,9%) tuvo los valores más bajos. Esto podría deberse a la inclinación de las bacterias por la sacarosa. En el estudio de (Rizo-Porro, González-Fernández, Pérez-Martínez, & Beltrán Ramos-Sánchez, 2015) se determinó que la mejor fuente de carbono para el cultivo de un probiótico para camarones era la sacarosa.

En cuanto a pH, la predisposición de las bacterias por la sacarosa observada en los niveles de acidez coincide con el pH, ya que la sacarosa (3,867) presentó menores valores.

Estos resultados coinciden también en la inclinación de las bacterias por la sacarosa en los valores de densidad óptica, ya que con esta fuente de carbono (sacarosa: 1,8018) se observó mejor crecimiento.

En cuanto a grados Brix, se evidenció que en los tratamientos con lactosa (9,7) este fue el carbohidrato con menor disposición de consumo por parte de las bacterias. Considerando que las bacterias no son especialmente inclinadas hacia la fermentación ácido láctica, especialmente *Staphylococcus sciuri*, se esperaría que no consuman lactosa de forma rápida.

No existen mayores reportes científicos a nivel molecular de esta bacteria en cuanto a su fermentación de lactosa pero podría considerarse que esta bacteria no puede transportar la lactosa dentro de la célula, probablemente por la falta del operón Lac, responsable del transporte de la lactosa a través de la membrana celular de los microorganismos.

En cuanto a la actividad inhibitoria en *E. coli*, fructosa (8,333mm) presentó mejor producción de bacteriocina. En el trabajo de (Jawan, y otros, 2020) evaluaron distintas condiciones de cultivo como pH, edad del inóculo y composición del medio, entre estos la fuente de carbono para producción de sustancias inhibitoras del tipo bacteriocina por *Lactococcus lactis Gh1*. Encontrándose que la producción más alta de estas sustancias se evidenció en la fermentación con fructosa en comparación con las demás fuentes de carbono utilizadas, entre otras, glucosa, sacarosa, lactosa. Así mismo estudiaron un medio BHI modificado reemplazando las fuentes de carbono por fructosa, encontrándose que la producción de sustancias inhibitoras del tipo bacteriocina fue mayor en comparación con el medio BHI comercial.

En la matriz de componentes se observó una ligera correlación entre pH y zona de inhibición en *E. coli*. (Yang, y otros, 2014) determinaron que el pH influye en gran medida en la producción de bacteriocina. Esto podría deberse a la dependencia de la expresión de genes sintetizadores de bacteriocinas al pH. Sin embargo, estudios revelaron que mayores ratios de producción de bacteriocina se observan a niveles de temperaturas y pH inferiores a los del crecimiento bacteriano óptimo. Esto indicaría que una alta producción de bacteriocina puede darse en condiciones fuera del rango óptimo para el crecimiento de las bacterias sin embargo es necesario realizar un estudio más afondo para determinar la validez de esta hipótesis.

Así mismo (Yang, y otros, 2014) explican que un pH final en la fermentación, inapropiado para el crecimiento de la bacteria en estudio, promovió el aumento de nisina y pediocina, ya que la caída del pH mejoraba la producción de bacteriocina por

procesamiento posttraduccional y aumentaba la eficacia de consumo de nutrientes en el medio. Sin embargo en este estudio fructosa tuvo la menor caída de pH de entre todas las fuentes de carbono pero mostró una mejor actividad inhibidora en *E. coli*, esto podría deberse a que el rango de pH de las demás fuentes de carbono cayó demasiado inhibiendo toda producción de bacteriocina en estas.

En cuanto a la actividad inhibidora de *R. stolonifer*, no se encontraron diferencias significativas entre las fuentes de carbono empleadas en este trabajo. Ciertos estudios percibieron que la producción de metabolitos antimicrobianos era dependiente del pH, sin embargo la actividad antifúngica no se relacionaba necesariamente con niveles de pH bajos. (Yang, y otros, 2014)

La glucosa es una de las fuentes de carbono con mayor rango de empleabilidad en los medios de cultivos microbianos ya que mejora los ratios de crecimiento bacteriano, sin embargo en el presente estudio no se demostraron los mejores resultados con esta fuente, tal y como se presentó en el trabajo de (Carvalho, y otros, 2004) sin embargo se recomienda investigar nuevamente la influencia de este carbohidrato en este tipo de bacterias o verificar el estado del reactivo empleado.

Con respecto a la interacción (AxB)

En los niveles de acidez, se encontró que el tratamiento de *Bacillus licheniformis* en medio sacarosa (18,48667%) tuvo mayores valores de acidez; mientras que los menores valores se encontraron con *Staphylococcus sciuri* en sacarosa. Siendo estos resultados coincidentes con los de los factores por separado, analizados con anterioridad. En el caso de *Staphylococcus sciuri* y su bajo nivel de acidez en medio con sacarosa podría deberse a su falta de capacidad fermentativa con este disacárido, ya que la mayoría de los medios de cultivo para esta bacteria están suplementados con carbohidratos simples/monosacáridos como la glucosa.

En cuanto a pH, se observó que las interacciones con *Bacillus licheniformis* tienen menores niveles de pH, como ya se informó anteriormente, esta cepa si demostró mejor capacidad de fermentación y producción de ácido láctico en comparación con las demás bacterias empleadas en este estudio. No así con *Staphylococcus sciuri* en fructosa que presentó mayores niveles de pH por ende menor fermentación ácido láctica.

Con respecto a grados Brix, la interacción entre *Oceanobacillus* sp y glucosa (9,10) tuvo los menores valores en esta variable, en comparación con *Staphylococcus sciuri* en lactosa (9,85), esto corroboraría la nula exigencia de lactosa en el medio por parte de esta bacteria, ya que no se encuentra entre los requerimientos nutricionales esenciales de este estafilococo.

En cuanto a densidad óptica, los tratamientos de *Bacillus licheniformis* con sacarosa (2,0095); *Bacillus licheniformis* con lactosa (1,9445) y *Oceanobacillus* sp con sacarosa (2,046) fueron los tratamientos con mayor crecimiento/turbidez en el medio,

mientras que los tratamientos con *Staphylococcus sciuri* con glucosa (1,363); con sacarosa (1,319) y con lactosa (1,35) fueron los de menor crecimiento/turbidez en el medio.

En cuanto a la actividad bacteriocina, los tratamientos con *Bacillus licheniformis* con fructosa (9mm) y *Staphylococcus sciuri* con fructosa (9mm) fueron los mejores resultados. Recalcándose la relevancia de la fructosa en la producción de bacteriocinas, ya mencionada anteriormente, especialmente en este tipo de bacterias, ya que en cuanto a *Oceanobacillus* sp el panorama de producción de sustancias antimicrobianas no es del todo claro.

Mientras que *Bacillus licheniformis* con sacarosa (5mm) y *Staphylococcus sciuri* con glucosa (5mm) demostraron menor zona de inhibición en *E. coli*. Estos resultados deberían ser sometidos a revisión y nueva evaluación, ya que ambas cepas son reconocidas como productoras de bacteriocinas, en comparación con *Oceanobacillus* sp que no es el caso, además estas fuentes de carbono (sacarosa y glucosa) son consideradas necesarias para el crecimiento de estas bacterias, así como los resultados favorecedores con estas fuentes en las variables analizadas anteriormente. Puede ser debido a una incorrecta manipulación del medio de cultivo o algún error en el proceso de obtención de la bacteriocina.

Para la actividad antimicrobiana contra *R. stolonifer*, el tratamiento de *Bacillus licheniformis* con lactosa presentó mejores zonas de inhibición. Esto reiteraría la capacidad de esta bacteria por el consumo de lactosa a diferencia de *Staphylococcus sciuri*, el cual en su tratamiento con lactosa (5mm) fue de muy bajo rendimiento para la inhibición de este hongo.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Factor A (Colonias)

En base a la producción de ácido láctico, pH, densidad óptica y producción de sustancias de tipo bacteriocina, se concluye que *Bacillus licheniformis* fue la colonia con mejor rendimiento. Así mismo sus mediados valores de consumo de azúcares determinados por ° Brix son una representación de la menor necesidad de consumo de fuentes de carbono.

También se concluye que aunque *Staphylococcus sciuri* tuvo menores resultados en acidez, densidad óptica, si reflejó buen espectro de acción antimicrobiana.

Factor B (Fuentes de carbono)

En cuanto a los resultados de acidez, ° Brix, pH y densidad óptica, se concluye que sacarosa fue la fuente de carbono que presentó mejores resultados en el medio.

Con respecto a la actividad inhibitoria, se concluye que los medios suplementados con fructosa tuvieron mejores rendimientos.

Interacción AxB

En base a los resultados de pH, acidez, densidad óptica y grados Brix, se concluye que la mejor interacción fue la de *Bacillus licheniformis* en medio suplementado con sacarosa.

En cuanto a la actividad inhibitoria, se concluye que la mejor interacción encontrada fue tanto de *Bacillus licheniformis* como *Staphylococcus sciuri* con fructosa.

Recomendaciones

En base al estudio de los parámetros cinéticos microbianos y actividad antimicrobiana de tres cepas de bacterias aisladas de la bebida fermentada (malá), se recomienda *Bacillus licheniformis* como organismo modelo.

Con respecto a las cuatro fuentes de carbono distintas estudiadas, se recomienda sacarosa por presentar mejores valores en los parámetros de crecimiento y fructosa por sus óptimos resultados para la actividad antimicrobiana.

A pesar de considerarse como un patógeno, es recomendable utilizar *S. sciuri* como cultivo iniciador en productos fermentados pero es necesario estudiar exhaustivamente su rol durante la fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alayande, K., Pohl, C., & Ashafa, A. (2017). Time-kill kinetics and biocidal effect of *Euclea crispa* leaf extracts against microbial membrane. *Asian Pac J Trop Med*, 390-399.
- Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. (2019). Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. *International Journal of Food Microbiology*.
- Azrad, M., Tkhawkho, L., Isakovich, N., Nitzan, O., & Peretz, A. (2018). Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: comparison between Etest and a broth dilution method. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 23.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 71-79.
- Bikila, W. (2020). Microbiology of Ethiopian Traditionally Fermented Beverages and Condiments. *International Journal of Microbiology*, 8.
- Bolocan, A., Pennone, V., O'Connor, P., Coffey, A., Nicolau, A., McAuliffe, O., & Jordan, K. (2017). Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *J Appl Microbiol*, 279-293.
- Botta, L., Saladino, R., Barghini, P., Fenice, M., & Pasqualetti, M. (2020). Production and identification of two antifungal terpenoids from the *Posidonia oceanica* epiphytic Ascomycota *Mariannaea humicola* IG100. *Microbial cell factories*, 184.

- Carson, D. A., Barkema, H. W., Naushad, S., & De Buck, J. (2017). Bacteriocins of Non-aureus Staphylococci Isolated from Bovine Milk. *Applied and environmental microbiology*, 1015-1017.
- Carvalho, A., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F., & Gibbs, P. (2004). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnol Prog.* , 248-254.
- 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* , 369-377.
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., & Ghelardi, E. (2019). Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PloS one*, 14.
- Chanos, P., & Mygind, T. (2016). Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4297-4308.
- Chen, X., Chen, J., Yan, Y., Chen, S., Xu, X., Zhang, H., & Wang, H. (2018). Quorum sensing inhibitors from marine bacteria *Oceanobacillus* sp. XC22919. *Natural Product Research*, 1-5.
- Cheng, Y. H., Horng, Y. B., Dybus, A., & Yu, Y. H. (2021). *Bacillus licheniformis*-Fermented Products Improve Growth Performance and Intestinal Gut Morphology in Broilers under *Clostridium perfringens* Challenge. *The journal of poultry science*, 30-39.

- Dehghanifar, S., Keyhanfar, M., & Emtiazi, G. (2019). Production and partial purification of thermostable bacteriocins from *Bacillus pumilus* ZED17 and DFAR8 strains with antifungal activity. *Molecular biology research communications*, 41-49.
- Dimidi, E., Cox, S., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and environmental microbiology*, 1-6.
- Espinosa, M. (01 de abril de 2019). *El Comercio*. Obtenido de <https://www.elcomercio.com/tendencias/chicha-malase-santo-domingo>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. . *Journal of Biotechnology*.
- Fuentes, M., Londoño, A., Durango, M., & etc. (2016). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 45-55.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2012). Probiotic Fermentation of Plant Based Products: Possibilities and Opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 183-199.
- Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. . *Annals of Microbiology*, 383-398.

- Halami, P. M. (2019). Sublichenin, a new subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512T with antibacterial activity. *Microbial Pathogenesis*, 139–146.
- Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 192-199.
- He, L., Chen, W., & Liu, Y. (2006). Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiol Res*, 321-326.
- Hsu, T. C., Yi, P. J., Lee, T. Y., & Liu, J. R. (2018). Probiotic characteristics and zearalenone-removal ability of a *Bacillus licheniformis* strain. *PLoS one*.
- Jamaluddin, N., Stuckey, D. C., Ariff, A. B., & Faizal Wong, F. W. (2017). Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13.
- Jaramillo, D., Melendez, A., & Sanchez, O. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*. *Rev. Venez.Cienc. Tecnol. Aliment.* , 193-209.
- 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*, 1454.
- 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*.

- Lee, D., K. H., Weerawongwiwat, V., Kim, B., Choi, Y., & Kim, W. (2013). *Oceanobacillus chungangensis* sp. nov., isolated from a sand dune. *Int J Syst Evol Microbiol.* , 3666-3671.
- Lee, N. K., Kim, W. S., & Paik, H. D. (2019). *Bacillus* strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. *Food science and biotechnology*, 1297-1305.
- Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2018). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 1-16.
- Morocho, T., & Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola*, 93-103.
- Nalawade, T. M., Bhat, K. G., & Sogi, S. (2016). Antimicrobial Activity of Endodontic Medicaments and Vehicles using Agar Well Diffusion Method on Facultative and Obligate Anaerobes. *International journal of clinical pediatric dentistry*, 335-341.
- Nam, J., W., B., & Lee, D. (2008). *Oceanobacillus caeni* sp. nov., isolated from a *Bacillus*-dominated wastewater treatment system in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 1109-1113.
- Namwong, S., Tanasupawat, S., Lee, K., & Lee, J. (2009). *Oceanobacillus kapialis* sp. nov., from fermented shrimp paste in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2254-2259.
- Niu, K. M., Kothari, D., Lee, W. D., Lim, J. M., Khosravi, S., Lee, S. M., . . . Kim, S. K. (2019). Autochthonous *Bacillus licheniformis*: Probiotic potential and survival ability in low-fishmeal extruded pellet aquafeed. *MicrobiologyOpen*.

- Osimani, A., Ferrocino, I., Agnolucci, M., Cocolin, L., Giovannetti, M., Cristani, C., & Aquilanti, L. (2019). Unveiling hákarl: A study of the microbiota of the traditional Icelandic fermented fish. *Food Microbiology*.
- Parkouda, C., Thorsen, L., Compaoré, C. S., Nielsen, D. S., Tano-Debrah, K., Jensen, J., & Jakobsen, M. (2010). Microorganisms associated with Maari, a Baobab seed fermented product. *International Journal of Food Microbiology*, 292-301.
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R. U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC microbiology*, 253.
- Rizo, G. D., Farrés, A., Díaz-Ruiz, G., Sánchez, S., Wachter, C., & Rodríguez-Sanoja, R. (2018). Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- Rizo-Porro, M., González-Fernández, N., Pérez-Martínez, A., & Beltrán Ramos-Sánchez, L. (2015). Diseño de un medio de cultivo con base en sacarosa para la producción de un probiótico para camarones. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 8-16.
- Romero-Luna, H., Hernández-Sánchez, H., & Dávila-Ortiz, G. (2017). Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source. *Ann Microbiol*, 577-586.
- Salmerón, I. (2017). Fermented cereal beverages: from probiotic, prebiotic and synbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 114-124.

- Shobharani, P., Padmaja, R. J., & Halami, P. M. (2015). Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512. . *Research in Microbiology*, 546–554.
- Smitha, S., & Bhat, S. (2013). Thermostable Bacteriocin BL8 from *Bacillus licheniformis* isolated from marine sediment. *J Appl Microbiol*, 688-694.
- Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*.
- Tamang, J., Shin, D., Jung, S., & Chae, S. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Tripathi, N., & Sapra, A. (23 de Febrero de 2021). *Treasure Island* . Obtenido de Gram Staining: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Ünlü, G., Nielsen, B., & Ionita, C. (2015). Production of Antilisterial Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Dairy-Based Media: A Comparative Study. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 259-274.
- Vadakedath, N., & Halami, P. M. (2019). Characterization and mode of action of a potent bio-preservative from food-grade *Bacillus licheniformis* MCC 2016. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 1-10.
- Van der Veken, D., Benhachemi, R., Charmpi, C., Ockerman, L., Poortmans, M., Van Reckem, E., . . . Leroy, F. (2020). Exploring the Ambiguous Status of Coagulase-Negative Staphylococci in the Biosafety of Fermented Meats: The Case of Antibacterial Activity Versus Biogenic Amine Formation. *Microorganisms*, , 167.
- Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B., & Kuang, H. (2021). An Evolving Technology That Integrates Classical Methods with Continuous Technological

- Developments: Thin-Layer Chromatography Bioautography. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 4647.
- Wang, Q., Zhao, X., Chamu, J., & Shanmugam, K. T. (2011). Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresource Technology*, 8152–8158.
- Wei, C.-L., Chao, S.-H., Tsai, W.-B., Lee, P.-S., Tsau, N.-H., Chen, J.-S., & ... Tsai, Y.-C. (2013). Analysis of bacterial diversity during the fermentation of inyu, a high-temperature fermented soy sauce, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and the plate count method. *Food Microbiology*, 252–261.
- Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., P. d., Dequenne, I., . . . Cani, P. D. (2020). How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9.
- Wu, J., Zhang, J., Shi, P., & al., e. (2013). Bacterial community involved in traditional fermented soybean paste dajiang made in northeast China. *Ann Microbiol* , 1417-1421.
- Yang, H. J., Kwon, D. Y., Kim, H. J., Kim, M. J., Jung, D. Y., Kang, H. J., & ... Park, S. (2014). Fermenting soybeans with *Bacillus licheniformis* potentiates their capacity to improve cognitive function and glucose homeostasis in diabetic rats with experimental Alzheimer's type dementia. *European Journal of Nutrition*, 77-88.
- Yokaryo, H., & Tokiwa, Y. (2014). Isolation of alkaliphilic bacteria for production of high optically pure L-(+)-lactic acid. . *The Journal of General and Applied Microbiology*, 270–275.

Zheng, S., & Sonomoto, K. (2018). Diversified transporters and pathways for bacteriocin secretion in gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4243–4253.