



Aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (*Agave americana*), “azul” y “blanco”, para su aplicación como agente antimicrobiano.

Mora Rosero, Nathaly Michelle y Rosero Ganchozo, Diana Leticia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

PhD. Sungey Naynee, Sánchez Llaguno

29 Agosto 2022

Reporte de verificación de contenido



Firma:



Firma electrónicamente por:
SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO

.....
Sánchez Llaguno Sungey Naynee
Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (Agave americana), azul y blanco, para su aplicación como agente antimicrobiano**” fue realizado por las señoritas **Mora Rosero Nathaly Michelle** y **Rosero Ganchozo Diana Leticia**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 29 de agosto del 2022

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ LLAGUNO**

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

C.C.: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Nosotras **Mora Rosero Nathaly Michelle** y **Rosero Ganchozo Diana Leticia**, con cédula de ciudadanía n° 1724902703 y 2300000805 declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular **“Aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (Agave americana), azul y blanco, para su aplicación como agente antimicrobiano”** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 29 de agosto del 2022

Firma:

Mora Rosero Nathaly Michelle

C.C.: 1724902703

Firma:

Rosero Ganchozo Diana Leticia

C.C.: 2300000805



Departamento de Ciencias de la Vida

Carrera de ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Nosotras **Mora Rosero Nathaly Michelle** y **Rosero Ganchozo Diana Leticia**, con cédula de ciudadanía nº 1724902703 y 2300000805, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (Agave americana), azul y blanco, para su aplicación como agente antimicrobiano”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterio son de nuestras responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 29 de agosto del 2022

Firma:

Mora Rosero Nathaly Michelle

C.C.: 1724902703

Firma:

Rosero Ganchozo Diana Leticia

C.C.: 2300000805

Dedicatoria

A mis padres porque han confiado en mí y me han apoyado durante todo mi proceso académico. A mi hermano, mi abuelita, mis tías y primos que me animan siempre a seguir adelante.

Nathaly M.

A Dios, por forjar mi camino. A mi abuela, por ser persistente en todo momento. A mi padre, el que desde el cielo me guía y me acompaña.

Diana R.

Agradecimiento

Un agradecimiento sincero a mis padres por su apoyo incondicional y por haberme inculcado valores de superación, dedicación y responsabilidad que me han servido para culminar con éxitos mi carrera.

A mi abuelita quien con su cariño y oraciones supo encaminarme para que concluya con mis estudios y sea una buena mujer.

A aquellos profesores que han sabido impartir correctamente sus materias, ya que gracias a ellos expandí mis conocimientos y pude disfrutar de la carrera.

A mis compañeros de clase y amigos quienes sin importar las circunstancias estuvieron para motivarme y apoyarme en todo aspecto durante el desarrollo de este proyecto.

Nathaly M.

Agradezco a Dios por poseerme de sabiduría y fortaleza a lo largo de mi carrera universitaria, por mostrarme el camino correcto y haberme llenado con su espíritu permitiendo que cumpla con mis objetivos. Gracias también por la familia que tengo y por ponerme en camino a profesores excelentes.

A mi abuela, por ser el pilar fundamental en mi vida, por su persistencia y por su gran amor.

A mi querida María Toapanta, por mostrarme que el estudio es un fuerte para salir adelante, por enseñarme que podía ser mejor cada día, por confiar en mí.

A mis docentes universitarios, por compartirme sus conocimientos durante el trayecto de mi preparación profesional, y de manera especial a la Doctora Sungey tutora de mi proyecto de titulación, quien siempre estuvo presta a brindarme apoyo.

A mis amigos Harrison y Brandon, por ayudarnos sin dudarlos cuando se presentaron inconvenientes. A Nathaly por la paciencia que me tuvo.

Agradezco a todos ellos la culminación de mi carrera, porque han sembrado en mí una semilla de superación y triunfo. Agradezco el poder disfrutar de la vida todos los días.

Diana R.

Índice de Contenidos

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimiento	8
Índice de Tablas.....	17
Índice de Figuras	20
Resumen	22
Abstract.....	23
Capítulo I	24
Introducción	24
Objetivos.....	26
Objetivo General	26
Objetivos Específicos	26
Hipótesis	27
Diseño AxB	27
Hipótesis Factor A (Especies de Penco).....	27
Hipótesis Factor B (Estados de fermentación).....	27
Hipótesis Interacción AxB (Especies de penco*Microorganismos patógenos)	27

Diseño AxBxC	28
Hipótesis Factor A (Especies de Penco).....	28
Hipótesis Factor B (Microorganismo patógenos)	28
Hipótesis Factor C (Tipo de solución).....	28
Hipótesis Interacción AxB (Especies de penco*Microorganismos patógenos).....	28
Hipótesis Interacción AxC (Especies de penco*Tipo de solución)	29
Hipótesis Interacción BxC (Microorganismos patógenos*Tipo de solución).....	29
Hipótesis Interacción AxBxC (Especies de penco*Microorganismos patógenos*Tipo de solución).....	29
Capítulo II	30
Revisión de literatura	30
Agave	30
Generalidades	30
Zonas de producción	31
Especies de Agave	32
Aplicaciones.....	33
Bebidas Tradicionales a partir del penco	35
Chaguarmishqui	35
Composición y propiedades	35
Extracción y fermentación.....	35
Microorganismos Fermentadores	36
Probióticos.....	38

	12
Bacterias ácido lácticas.....	39
Generalidades	39
Clasificación.....	41
Propiedades antimicrobianas	41
Aplicación de las Bacterias Ácido Lácticas.....	43
Métodos de Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	44
Método de Difusión en Disco de Agar	44
Método de Difusión de Pozos	45
Método de Difusión de Tapón	45
Capítulo III	46
Metodología	46
Ubicación del Área de Investigación.....	46
Ubicación Política	46
Ubicación Ecológica.....	46
Ubicación Geográfica.....	47
Materiales.....	48
Determinación de pH	48
Determinación de Acidez	48
Determinación de sólidos solubles.....	48
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.....	49
Identificación de Bacterias Ácido Lácticas.....	50

Ensayo In Vitro de Actividad Antimicrobiana	51
Métodos	52
Obtención de Materia Prima.....	52
Fermentación de las Especies de Penco	52
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.....	52
Identificación de bacterias ácido lácticas	53
Ensayos de Actividad Microbiana	53
Diseño experimental.....	55
Factores y niveles de experimento.....	55
Tratamiento a comparar	56
Tipo de diseño experimental	57
Repeticiones	59
Análisis estadístico	59
Análisis funcional	60
Variables a medir	60
Capítulo IV	64
Resultados.....	64
Cinética de las variables fisicoquímicas evaluadas durante los 3 días de fermentación.....	64
Identificación de bacterias ácido lácticas	66
Caracterización macroscópica de las cepas aisladas	66
Caracterización microscópica de las cepas aisladas.....	68

Caracterización molecular de las cepas aisladas	70
Determinación de la actividad antimicrobiana	71
Análisis de varianza para las variables evaluadas en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.	76
Análisis de varianza para la variable pH	76
Análisis de varianza para la variable acidez (% ácido láctico)	77
Análisis de varianza para la variable sólidos solubles (°Brix)	78
Análisis de varianza para la variable recuento de aerobios mesófilos.	79
Análisis de varianza para la variable recuento de mohos y levaduras.	80
Prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa entre los factores utilizados para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.....	81
Prueba de Tukey para el factor A en las variables pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.	81
Prueba de Tukey para el factor B en las variables pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.	83
Prueba de Tukey para la interacción entre el factor A y B en las variables pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.	85
Análisis de varianza para la variable evaluada en la determinación de la actividad antimicrobiana del Chaguarmishqui.	88
Análisis de varianza para el halo de inhibición	88
Prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa entre los factores utilizados para la de la actividad antimicrobiana.....	89

Prueba de Tukey para el factor A.....	89
Prueba de Tukey para el factor B.....	90
Prueba de Tukey para el factor C	92
Prueba de Tukey para la interacción entre el factor A y B.....	93
Prueba de Tukey para la interacción entre el factor A y C.....	95
Prueba de Tukey para la interacción entre el factor B y C.....	96
Análisis de conglomerados para la caracterización fisicoquímica y microbiológica.....	98
Análisis de componentes principales	99
Capítulo V	103
Discusión	103
Identificación de bacterias ácido lácticas	103
Respecto a la caracterización fisicoquímica y microbiológica	104
Especies de penco (Factor A).....	104
Estado del Chaguarmishqui (Factor B)	105
Especies de penco * Estado del Chaguarmisqui (Interacción AxB).....	108
Respecto a la actividad antimicrobiana.....	110
Especies de penco (Factor A).....	110
Microorganismos patógenos (Factor B)	111
Tipo de solución (Factor C).....	111
Especies*Microorganismos Patógenos (Interacción A*B)	112
Especies*Tipos de soluciones (Interacción A*C).....	113

Microorganismos patógenos*Tipos de soluciones (Interacción B*C).....	114
Capítulo VI	115
Conclusiones	115
Identificación de bacterias ácido lácticas	115
Respecto a la caracterización fisicoquímica y microbiológica	115
Especies de penco (factor A)	115
Estado de fermentación (factor B).....	115
Especies de penco * Estado de fermentación (AxB)	115
Respecto a actividad antimicrobiana	116
Especies de penco (factor A)	116
Microorganismos patógenos (factor B).....	116
Tipo de solución (factor C)	116
Especies de penco * microorganismo patógeno (AxB).....	116
Especies de penco * tipo de solución (AxC).....	117
Microorganismo patógeno * tipo de solución (BxC).....	117
Especies de penco * microorganismo patógeno * tipo de solución (AxBxC).....	117
Recomendaciones	118
Capítulo VII	120
Bibliografía.....	120

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Taxonomía de las plantas de agave.</i>	30
Tabla 2 <i>Recursos implementados para la determinación del pH del Chawarmishqui.</i>	48
Tabla 3 <i>Recursos implementados para la determinación de la acidez titulable del Chaguarmishqui.</i>	48
Tabla 4 <i>Recursos implementados para la determinación de sólidos solubles del Chaguarmishqui.</i>	48
Tabla 5 <i>Recursos implementados para el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras.</i>	49
Tabla 6 <i>Recursos implementados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir del Chawarmishqui fermentado.</i>	49
Tabla 7 <i>Recursos implementados para la identificación de bacterias ácido lácticas por tinción Gram.</i>	50
Tabla 8 <i>Recursos implementados para la realización de pruebas de catalasa y oxidasa.</i>	50
Tabla 9 <i>Recursos implementados para la determinación de actividad antimicrobiana de las BAL frente a microorganismos patógenos.</i>	51
Tabla 10 <i>Factores y niveles a probar en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.</i>	55
Tabla 11 <i>Factores y niveles a probar en el efecto antimicrobiano que tienen las BAL provenientes de dos especies de penco frente a microorganismos patógenos.</i>	55
Tabla 12 <i>Tratamientos a comparar en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.</i>	56
Tabla 13 <i>Tratamientos a comparar en el efecto antimicrobiano que tienen las BAL provenientes de dos especies de penco frente a microorganismos patógenos.</i>	56
Tabla 14 <i>Esquema del análisis de varianza para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.</i>	59

Tabla 15 Esquema del análisis de varianza para la determinación de la actividad antimicrobiana de las BAL obtenidas a partir del Chaguarmishqui frente a microorganismos patógenos.....	60
Tabla 16 Resultados de la caracterización morfológica de las colonias identificadas.	66
Tabla 17 Resultados de las pruebas microbiológicas de las BAL aisladas.	68
Tabla 18 Resultados del diámetro de inhibición formado a partir del antagonismo entre microorganismos probióticos y microorganismos patógenos.....	72
Tabla 19 Resultados del análisis de varianza para la variable pH según el estado de fermentación del Chaguarmishqui.....	76
Tabla 20 Resultado del análisis de varianza para la variable acidez (% ácido láctico) según el estado de fermentación del Chaguarmishqui.	77
Tabla 21 Resultados del análisis de varianza para la variable sólidos solubles (°Brix) según el estado del Chaguarmishqui.	78
Tabla 22 Resultados del análisis de varianza para la variable aerobios mesófilos según el estado del Chaguarmishqui.	79
Tabla 23 Resultados del análisis de varianza para la variable aerobios mesófilos según el estado del Chaguarmishqui.	80
Tabla 24 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor A en las variables pH, acidez, sólidos solubles aerobios mesófilos y mohos y levaduras.....	81
Tabla 25 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor B en las variables pH, acidez, sólidos solubles aerobios mesófilos y mohos y levaduras.....	83
Tabla 26 Resultado de la prueba de significancia de Tukey para la interacción entre A y B en las variables pH, acidez, sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.....	85
Tabla 27 Resultados del análisis de varianza para la variable diámetro del halo de inhibición en la fermentación del Chawarmishqui.	88
Tabla 28 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor A en la variable diámetro del halo de inhibición.....	89

Tabla 29 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor B en la variable diámetro del halo de inhibición.....	90
Tabla 30 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor C en la variable diámetro del halo de inhibición.....	92
Tabla 31 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción AXB en la variable diámetro del halo de inhibición.	93
Tabla 32 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción AXC en la variable halo de inhibición.....	95
Tabla 33 Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción BXC en la variable determinación del halo de inhibición.....	96
Tabla 34 Matriz de correlación de los componentes principales del Chaguarmishqui.....	99
Tabla 35 Matriz de componentes.....	100
Tabla 36 Porcentaje de varianza total explicada.....	100

Índice de Figuras

Figura 1 <i>Planta de Agave americana sbsp. andina.</i>	32
Figura 2 <i>Planta de Agave americana var. marginata.</i>	33
Figura 3 <i>Metabolismo del azúcar en Lactobacillus y Saccharomyces como representantes de las BAL y levaduras, respectivamente.</i>	38
Figura 4 <i>Árbol filogenético sin raíces de las BAL y otros géneros relacionados.</i>	40
Figura 5 <i>Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación.</i>	47
Figura 6 <i>Cinética de las variables fisicoquímicas durante los 3 días de fermentación.</i>	64
Figura 7 <i>Cinética de fermentación para el factor sólidos solubles.</i>	65
Figura 8 <i>Cinética de fermentación para el factor acidez.</i>	65
Figura 9 <i>Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias 16S ARNr de las bacterias ácido-lácticas aisladas.</i>	71
Figura 10 <i>Efecto de las variedades del Chaguarmishqui en las variables fisicoquímicas y microbiológicas de estudio.</i>	82
Figura 11 <i>Efecto del estado del Chaguarmishqui en las variables fisicoquímicas y microbiológicas de estudio</i>	84
Figura 12 <i>Efecto del estado del Chaguarmishqui en las variables fisicoquímicas y microbiológicas de estudio.</i>	87
Figura 13 <i>Análisis del efecto de las especies de penca en la formación del halo de inhibición.</i>	90
Figura 14 <i>Análisis del efecto de los tipos de microorganismos patógenos en la formación del halo de inhibición.</i>	91
Figura 15 <i>Análisis del efecto de los tipos de soluciones preparadas en la formación del halo de inhibición.</i>	92
Figura 16 <i>Análisis del efecto de la interacción entre los factores A*B en la formación del halo de inhibición.</i>	94

Figura 17 <i>Análisis del efecto de la interacción entre los factores A*C en la formación del halo de inhibición.</i>	96
Figura 18 <i>Análisis del efecto de la interacción entre los factores B*C en la formación del halo de inhibición.</i>	97
Figura 19 <i>Dendograma para relacionar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos evaluados.</i>	98
Figura 20 Gráfico de sedimentación.....	101
Figura 21 Grafica de componentes principales.....	102

Resumen

El penco es una planta que crece y se desarrolla de manera silvestre en muchas regiones del Ecuador donde son utilizados para la obtención de subproductos como el chaguarmisqui. El chaguarmisqui es una bebida extraída del corazón del penco que tiene múltiples utilidades debido a las propiedades que presenta, sin embargo, su caracterización microbiológica ha sido poco estudiada. La presente investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar microorganismos probióticos a partir del chaguarmisqui y evaluar el poder antimicrobiano de estos frente a microorganismos patógenos. El aislamiento de bacterias se realizó a partir del chaguarmisqui recolectado al tercer día de fermentación; la cual se llevó a cabo en reactores discontinuos y, para establecer la variación entre los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de los extractos durante este proceso, se realizó un diseño bifactorial, que permitió determinar diferencias significativas entre los extractos de las dos especies y el estado en que se encontraban. Las especies obtenidas tras el aislamiento pertenecieron al grupo de bacterias ácido-lácticas (BAL) y estas fueron *Lactobacillus plantarum* (bacilos pequeños, gran positivos, catalasa negativa) y *Weisella confusa* (cocos, gran positivos, catalasa negativa) con respecto a la especie 1 y 2 del penco. Para evaluar la actividad antimicrobiana se planteó un diseño experimental trifactorial en el que se comparó los diámetros de inhibición (halos) obtenidos mediante las interacciones entre los microorganismos aislados del penco, microorganismos patógenos y los tipos de soluciones preparadas, los resultados evidenciaron que, de los tres microorganismos patógenos evaluados, *C. freundii* es el más susceptible ante las dos bacterias aisladas, que la preparación de la solución más bacteria permite los mejores resultados en cuanto a la inhibición y que *W. confusa* es la bacteria con mayor actividad antimicrobiana llegando a producir halos de hasta 4 mm.

Palabras claves: Bacterias ácido-lácticas, probióticos, chaguarmisqui, actividad antimicrobiana.

Abstract

The penco is a plant that grows and develops wild in many regions of Ecuador where it is used to obtain by-products such as chaguarmisqui. The chaguarmishqui is a beverage extracted from the heart of the penco that has multiple utilities due to its properties, however, its microbiological characterization has been little studied. The objective of this research was to isolate and characterize probiotic microorganisms from chaguarmishqui and to evaluate their antimicrobial power against pathogenic microorganisms. The isolation of bacteria was carried out from the chaguarmishqui collected on the third day of fermentation, which was carried out in batch reactors and, to establish the variation between the physicochemical and microbiological parameters of the extracts during this process, a bifactorial design was carried out, which allowed determining significant differences between the extracts of the two species and the state in which they were found. The species obtained after isolation belonged to the lactic acid bacteria (LAB) group and were *Lactobacillus plantarum* (small bacilli, large positive, catalase negative) and *Weisella confusa* (cocci, large positive, catalase negative) with respect to species 1 and 2 of the fungus. To evaluate the antimicrobial activity, a trifactorial experimental design was used to compare the inhibition diameters (halos) obtained through the interactions between the microorganisms isolated from the fungus, pathogenic microorganisms and the types of solutions prepared; the results showed that, of the three pathogenic microorganisms evaluated, *C. freundii* is the most susceptible to the two isolated bacteria, that the preparation of the solution plus bacteria gives the best results in terms of inhibition and that *W. confusa* is the bacterium with the greatest antimicrobial activity, producing halos of up to 4 mm.

Key Words: Lactic acid bacteria, probiotics, chaguarmisqui, antimicrobial activity.

Capítulo I

Introducción

Las plantas del género *Agave* fueron introducidas en el Ecuador desde México en la época de la colonia, estas principalmente se usaban para la conformación de cercas que dividían las distintas haciendas. Hoy en día se usan como planta ornamental, para la obtención de fibra, en la industria medicinal y en la industria alimentaria, principalmente para la obtención del tequila y el mezcal (Quishpi, 2014).

Esta planta es resistente a una amplia diversidad de ambientes y puede desarrollarse en zonas perturbadas como suelos pedregosos o erosionados. Debido a esto su cultivo se expande por todo el Ecuador, principalmente en las provincias de Guayas, Imbabura, Manabí, Loja, Cañar y Carchi (Trávez, 2014).

Del penco azul y sus variedades se puede obtener la pulpa, sabia o mucílago que en nuestro país es conocida como Chaguarmishqui, a partir de la cual se elaboran bebidas fermentadas tradicionales como el pulque o el miske que son consumidas por algunas comunidades indígenas (Quishpi, 2014). En el estudio de Villacrés (2018) que analiza las características fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida, se indica tiene un alto contenido de azúcares, aminoácidos, vitaminas y minerales y posee levaduras y de bacterias que permiten la rápida fermentación de esta.

Otros estudios que también se centran en la caracterización de la bebida, han demostrado que las bacterias presentes en esta pertenecen al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL), microorganismos altamente estudiados, por su contribución al valor nutricional de los productos y porque se consideran cómo probióticos, ya que no son patógenos y su consumo es beneficioso para los seres humanos, debido a que ayudan a regular el microbiota intestinal (Tamang et al., 2016). Además, según Shah et al. (2016) gracias a que durante su metabolismo

producen compuestos antimicrobianos son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos.

A pesar de que existe evidencia de la presencia de BAL en el Chaguarmishqui, no se ha reportado en el penco blanco y si bien se han aislado del penco azul no se encontraron muchas investigaciones sobre esto en el Ecuador. Por lo tanto, en nuestro estudio se plantea el aislamiento y caracterización de cepas de BAL de la bebida extraída del penco azul y blanco y se evalúa la actividad antimicrobiana de estas lo cual nos confirma sus capacidades probióticas.

Objetivos

Objetivo General

- Aislar y caracterizar microorganismos probióticos a partir de una bebida tradicional (Chaguarmishqui), considerando dos especies de penco (*Agave americana*), “azul” y “blanco”, para su aplicación como agente antimicrobiano.

Objetivos Específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímica y microbiológica de la bebida tradicional Chaguarmishqui.
- Aislar y caracterizar los microorganismos probióticos presentes en la bebida tradicional Chaguarmishqui, considerando dos especies de penco (*Agave americana*), “azul” y “blanco”.
- Evaluar de forma In Vitro la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos frente a microorganismos patógenos.

Hipótesis

Diseño AxB

Hipótesis Factor A (Especies de Penco)

- H0: Las especies de penco azul y blanco no influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos del chaguarmishqui.
- Ha: Las especies de penco azul y blanco influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos del chaguarmishqui.

Hipótesis Factor B (Estados de fermentación)

- H0: Los estados del chaguarmishqui no influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos de su composición.
- Ha: Los estados del chaguarmishqui influyen en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos de su composición.

Hipótesis Interacción AxB (Especies de penco*Microorganismos patógenos)

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y estado de fermentación no influye en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos.
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y estado de fermentación influye en los cambios fisicoquímicos y microbiológicos.

Diseño AxBxC

Hipótesis Factor A (Especies de Penco)

- H0: Los microorganismos probióticos presentes en las diferentes especies de penco no producen variación en la actividad antimicrobiana.
- Ha: Los microorganismos probióticos presentes en las diferentes especies de penco producen variación en la actividad antimicrobiana.

Hipótesis Factor B (Microorganismo patógenos)

- H0: La inhibición de los microorganismos patógenos no se ve influenciada por la actividad antimicrobiana de las bacterias aislada.
- Ha: La inhibición de los microorganismos patógenos se ve influenciada por la actividad antimicrobiana de las bacterias aislada.

Hipótesis Factor C (Tipo de solución)

- H0: Los tipos de solución no influyen en la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos.
- Ha: Los tipos de solución influyen en la actividad antimicrobiana de los microorganismos probióticos.

Hipótesis Interacción AxB (Especies de penco*Microorganismos patógenos)

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y microorganismos patógenos no influye en la actividad antimicrobiana.
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y microorganismos patógenos influye en la actividad antimicrobiana.

Hipótesis Interacción AxC (Especies de penco*Tipo de solución)

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y tipo de solución no influye en la actividad antimicrobiana.
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco y tipo de solución influye en la actividad antimicrobiana.

Hipótesis Interacción BxC (Microorganismos patógenos*Tipo de solución)

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores microorganismos patógenos y tipo de solución no influye en la actividad antimicrobiana.
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores microorganismos patógenos y tipo de solución influye en la actividad antimicrobiana.

Hipótesis Interacción AxBxC (Especies de penco*Microorganismos patógenos*Tipo de solución)

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco, microorganismos patógenos y tipo de solución no influye en la actividad antimicrobiana.
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores especies de penco, microorganismos patógenos y tipo de solución influye en la actividad antimicrobiana.

Capítulo II

Revisión de literatura

Agave

Generalidades

Las plantas del género *Agave L.* y especies relacionadas son un grupo de monocotiledóneas que crecen en una gran diversidad de hábitats y tipos de suelo, es tolerante a la niebla salina, a las altas temperaturas y la sequía extrema, generalmente se propaga por semillas, sin embargo, también puede crecer vegetativamente por bulbillos y rizomas, debido a esto tiene la capacidad de desarrollarse y colonizar zonas perturbadas, bordes de caminos, arena desnuda y áreas costeras, consta de 10 géneros y 340 especies (De la Torre et al., 2018). Su taxonomía se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Taxonomía de las plantas de agave.

Reino	Plantae
Subreino	<i>Traqueobionta</i>
Filo	<i>Espermatofita</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Liliidae</i>
Orden	<i>Liliales</i>
Familia	<i>Agavaceae</i>
Género	<i>Agave L.</i>
Especie	<i>Agave americana L.</i>

Nota: Tomado de (United States Department of Agriculture, 2022)

La planta es una roseta amplia de la que se desprenden hojas gruesas y resistentes, de un tamaño aproximado de 5 m de diámetro y 2 m de altura, las hojas poseen bordes dentados con espinas rectas o ligeramente curvadas y una espina apical grande y afilada. Para que la roseta llegue a su etapa reproductiva se necesitan de entre 7 y 17 años, dependiendo de los cuidados de la planta, en específico, del agua y los nutrientes que tenga a disposición. La inflorescencia es en forma de panícula y puede tener hasta 10 m de altura, el racimo es denso y contempla flores de color verde-blanco (De la Torre et al., 2018).

En Ecuador, los Agaves son polinizados principalmente por colibríes e insectos como las abejas, abejorros, mariposas y libélulas y también por aves como *Parabuteo unicinctus* y *Falco sparverius* que se posan en el tallo de las flores (De la Torre et al., 2018).

Zonas de producción

A. Americana es una especie originaria de México y del Sur de Estados Unidos e introducida en América central y del Sur, ha sido distribuida por todos los países Andinos especialmente en Colombia, Venezuela, Bolivia y Ecuador (Ayora & Quito, 2013).

Zona de Producción a Nivel Nacional. Las plantas de Agave en el Ecuador se encuentran establecidas entre una cota mínima de 1600 msnm y máxima de 3300 msnm, en sitios que cumplen con las características para que se desarrollen óptimamente, estas características son: presencia de cagabuas florecidas, suelos áridos, precipitaciones acordes a las condiciones del suelo y un clima seco. Las plantas de Agave se encuentran por lo general de forma silvestre y semi-domesticada (Ayora & Quito, 2013).

Específicamente crecen en las provincias de Chimborazo, Cañar, Loja, Cotopaxi, Azuay, Tungurahua, Guayas y Manabí y se utilizan como cerco, planta ornamental, e incluso pueden emplearse en sistemas agroforestales como método de preservación del medio ambiente. A pesar de sus bajos requerimientos nutricionales, en los últimos años ha habido una

disminución en el volumen de producción del penco, debido al poco conocimiento del manejo del cultivo, a que no se trabaja en aspectos de mejoramiento genético de la planta y a que el mercado no ofrece precios razonables por los productos extraídos de la planta (Ayora & Quito, 2013).

Especies de Agave

Agave Azul (Agave americana sbsp. andina). Se caracteriza por presentar una coloración verdosa tendiente a azul, sus hojas son anchas y largas pero muy variables, generalmente alcanza una altura de entre los 70 a 200 cm (Gonzales et al., 2009). Pueden encontrarse de forma silvestre en pendientes de cerros, cañadas y predios, lugares a los que mínimamente tiene acceso el ser humano o semi-cultivadas en tapiales o como cercas que delimitan terrenos agrícolas; se distribuyen por todo el corredor interandino, desde el Cantón Montufar del Carchi hasta Loja (Duque, 2013).

Figura 1

Planta de Agave americana sbsp. andina.



Figura tomada de (Duque, 2013)

Agave blanco (Agave americana sbsp. americana L.). También conocido como agave amarillo o *Agave americana var. marginata*, es una especie de Agave que se caracteriza por presentar una combinación de colores verde y amarillo pálido de manera longitudinal en las hojas, generalmente son usadas como plantas ornamentales y se encuentran adornando casas o jardines; están distribuidas por todo el Ecuador gracias a su gran atractivo, su fácil desarrollo y a que no requieren de mucho cuidado para su mantenimiento (Duque, 2013).

Figura 2

Planta de Agave americana var. marginata.



Figura tomada de (Duque, 2013)

Aplicaciones

Según Nava et al. (2014) a las diferentes partes de la planta de *A. americana*, piña (corazón de la planta una vez desprovista de sus hojas y raíces), tallo floral, hojas y botones florales se les da 52 usos diferentes y a su savia o mishki 72, dando como resultado un total de 124 usos en general.

Los usos de las distintas partes de la planta son los siguientes:

Como aditivo alimenticio las hojas se usan para madurar la jora y como levadura en la elaboración de pan. En cuanto a la gastronomía, los botones florales son ocupados para la preparación de las alcaparras y las hojas para la obtención de harina. Como alimento para animales, las hojas, tallo floral, corazón y raíces se usan como forraje para el ganado. En la elaboración de materiales las fibras del tallo floral y las hojas se usan para la construcción de cuerdas, vigas y artesanías y las hojas y raíces para la preparación de jabones, geles para el cabello, para teñir y curar cuero. En la parte medicinal las hojas se aprovechan para tratar el dolor de cabeza, huesos rotos, desparasitante y anastésico y la raíz para tratar la sífilis. En cuanto al aspecto medioambiental la planta se usa para la elaboración de cercas, para la prevención de la erosión en la agroforestería y el ecoturismo, el tallo floral como abono y las hojas como fertilizante, control de hongos en cultivos y repelente contra insectos. En aspectos culturales tradicionales, a partir de las hojas y raíces se obtienen brebajes que sirven como abortivo y para curar enfermedades del alma y las flores se utilizan para la elaboración de platos tradicionales en Carnaval (Nava et al., 2014).

Los usos de la sabia o mishke se detallan a continuación:

Como levadura en la elaboración de pan, como endulzante y energizante, para la preparación de jarabes, helado, vinagre, pan, tortillas, barbacoas, para alimentar cerdos, perros y aves de corral, para aliviar el dolor de huesos, músculos, garganta y corazón, para tratar osteoporosis, parálisis facial, insuficiencia renal, afectaciones gastrointestinales y hepáticas, para reducir síntomas de afecciones del sistema respiratorio, resfriado, gripe, tos y para la regeneración de la flora intestinal (Probiótico). En la preparación de bebidas alcohólicas como guarango, chicha curada, pingolito, licor, mezcal consumidas en festividades y como afrodisiacos de fertilidad y tonificantes (Nava et al., 2014).

Bebidas Tradicionales a partir del penco

A partir de las plantas de penco se elaboran bebidas tradicionales como el chaguarmishqui, miske o el guarango utilizadas en rituales o fiestas por culturas ancestrales (De la Torre, 2019).

El Chaguarmishqui es la pulpa extraída del penco y es una bebida dulce proveniente de un particular proceso de extracción que consiste en hacer un hueco en el centro de la planta para que dentro de este se deposite su sabia, esta sabia se recolecta a los 45 días después del proceso mencionado. El guarango se obtiene a partir del Chaguarmishqui y su elaboración consiste en hervir esta pulpa hasta que pierda toda su espuma, cuando esta tibio se añade guarango de días anteriores (llamado semilla) y se deja fermentar durante dos semanas. El miske es la bebida que se obtiene tras la destilación del fermentado del Chaguarmishqui, utilizando microorganismos nativos de la zona (De la Torre, 2019).

Chaguarmishqui

Composición y propiedades

Es un líquido color blanco lechoso con un alto grado de azúcares como la sacarosa, fructosa, glucosa y polifruktanos, los cuales empiezan a aumentar su concentración cuando el penco se encuentra entre los 7-8 años (Gonzales et al., 2009). En cuanto a su valor nutricional el chaguarmishqui contiene la mayoría de los aminoácidos esenciales con excepción de la metionina, vitaminas en especial biotina, ácido ascórbico y piridoxina y minerales como hierro, zinc, cobre y manganeso (Sánchez et al., 1967).

Extracción y fermentación

La sabia, agua miel o Chaguarmishqui se obtiene a partir del corazón del penco maduro, es decir, a partir de un penco de entre 8 a 12 años de desarrollo. La producción de esta sabia ocurre de la siguiente manera: una vez el penco esté empezando a desprender el tallo

floral, este se corta y se empieza a producir el aguamiel, esta planta se deja reposar durante alrededor de 6 meses para de esta manera continuar con la extracción. Una vez transcurrido el tiempo determinado, se realiza un corte profundo en el centro de penco hasta formar una especie de olla, donde se almacenará el aguamiel. Para que ocurra la expulsión de la sabia, la persona encargada de la extracción hace un raspado en la olla formada en el centro de la planta, fomentando la producción del aguamiel, que se almacenará en ese mismo lugar (Ortega, 2019).

Comúnmente, la sabia se recolecta dos veces al día, en la mañana y en la tarde, esperando al menos 5 h después de la primera recolección. El penco es capaz de producir chaguarmishqui durante 3 o máximo 4 meses, pasado este tiempo se seca y muere (Ortega, 2019).

La pulpa obtenida se puede consumir o generalmente se lleva a un proceso de fermentación que según Changoluisa (2020) ocurre de manera natural luego de pocas horas de la recolección, esto debido a la presencia de bacterias y levaduras como *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*, cabe mencionar que la bebida fermentada se conoce como pulque.

Microorganismos Fermentadores

Naturalmente, los alimentos y bebidas fermentadas poseen microorganismos funcionales y no funcionales. Los funcionales modifican los constituyentes químicos de la materia en el transcurso de la fermentación, ajustando la biodisponibilidad de nutrientes, mejorando la calidad sensorial, brindando efectos bioconservadores, produciendo compuestos antimicrobianos y estimulando los efectos probióticos que promueven la salud (Tamang et al., 2016).

Las propiedades funcionales que brindan estos microorganismos a los alimentos fermentados comprenden efectos probióticos, antimicrobianos, antioxidantes, de degradación de sustancias antinutritivas, entre otros, que pueden resultar importantes para la fabricación de alimentos. Entre estos se encuentran un sinnúmero de microorganismos que han sido identificados a lo largo del tiempo, sin embargo, las que más predominan son las bacterias ácido lácticas (BAL) conformadas por los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y *Carnobacterium*; además de ciertas levaduras y hongos como *Saccharomyces*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Sharma et al., 2020).

Además de la duración y el tratamiento de los alimentos el procesamiento y la composición de los sustratos utilizados son otro de los factores que influyen en los alimentos fermentados. Generalmente se requiere de medios ricos en azúcares para que la producción de los microorganismos sea mayor, lo que asegura que la obtención final del producto va a ser más eficiente. En la figura 3 se muestra el metabolismo que estos realizan para transformar la glucosa presente en el medio a un producto final.

Figura 3

Metabolismo del azúcar en *Lactobacillus* y *Saccharomyces* como representantes de las BAL y levaduras, respectivamente.

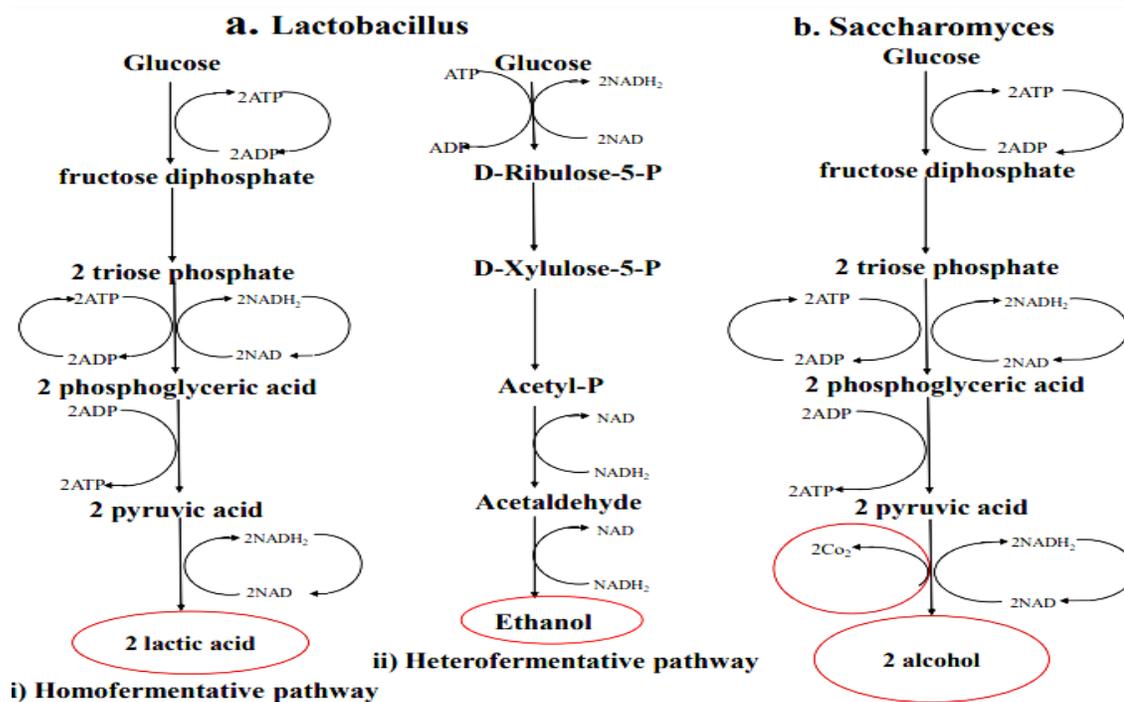


Figura tomada de (Sharma et al., 2020)

Probióticos

Los probióticos son microorganismos que confieren múltiples beneficios para la salud y la nutrición cuando son administrados en cantidades adecuadas. Se utilizan de manera popular como bioingredientes para la obtención de alimentos fermentados y como nutrientes para la mejora del microbiota intestinal humana. Los probióticos también pueden ser utilizados en medicamentos o complementos de la dieta debido a las sustancias producidas por los mismos (Tamang y otros, 2016).

La fuente más tradicional para su obtención son los productos fermentados lácticos, no obstante, se han reportado cepas probióticas aisladas de la fermentación de frutas y de

productos coreanos como el kimchi, Kanjang y Doenjang, donde se ha demostrado que al ser fermentados con microorganismos probióticos tiene muchos beneficios para la salud, como la capacidad para mejorar las funciones inmunitarias del cuerpo (Shin & Jeong, 2015).

Dentro de los microorganismos probióticos más conocidos están aquellos que pertenecen al grupo de las BAL, como los *Lactobacillus* y los *Enterococcus*, y los pertenecientes al género de los Bifidobacterium, sin embargo, cabe mencionar que durante las últimas décadas ciertas levaduras y microorganismos han evolucionado como probióticos (Tamang y otros, 2016).

Identificación de Cepas Probióticas. Para poder ser calificados como probióticos la identificación de cepas bacterianas requiere del cumplimiento de una serie de requisitos esenciales. El haber resultado de una fermentación es uno de ellos.

La correcta identificación no solo incluye la observación morfológica del microorganismo, sino también, la identificación del género, especie y cepa por medio de la caracterización molecular; esta información es única en cada microorganismo. Además de ello, otro de los requisitos que se toma en cuenta es el de ser viable en los productos que se los incorpora (Garrote & Bonet, 2017).

Bacterias ácido lácticas.

Generalidades

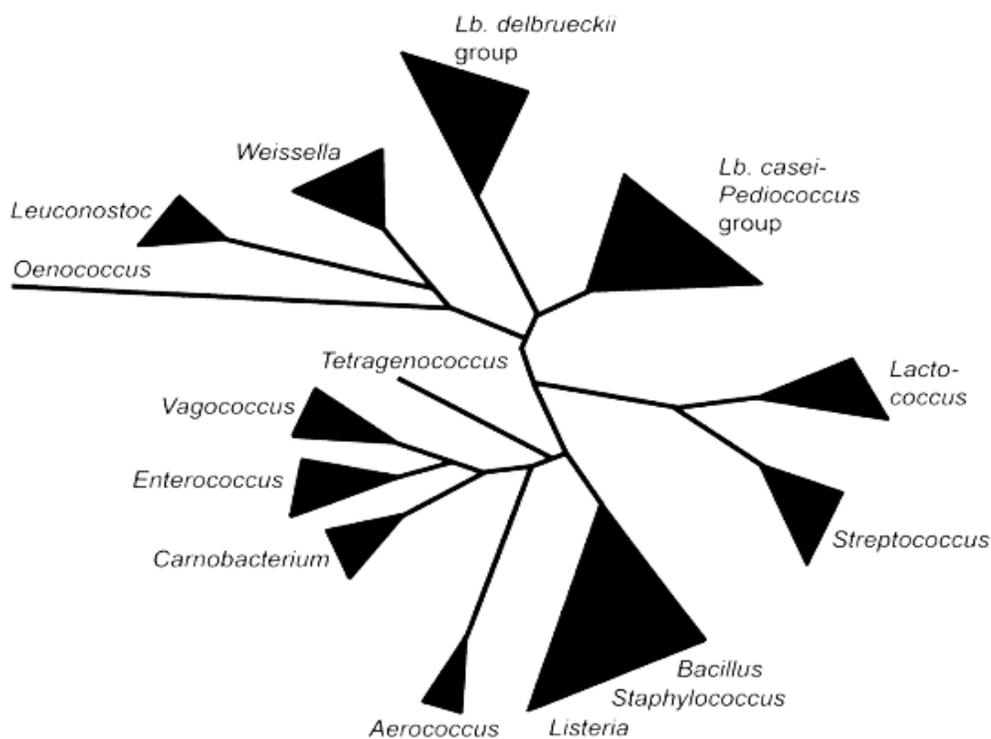
Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que se caracterizan por producir ácido láctico como producto final en una fermentación enriquecida de glucosa. Son un conjunto de bacterias relacionadas fisiológica y metabólicamente a grampositivas, catalasas negativas, aerotolerantes, organotróficas, tolerantes al ácido y un bacilo o coco estrictamente fermentativo. Estas bacterias se dividen celularmente en un solo plano, a excepción de los *Pediococos*, y tienen un requerimiento especial de factores de crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas. Se agrupan dentro de la rama del género *Clostridium*; bacterias

anaeróbicas que poseen características de grampositivas relacionadas con los bacilos, y también de las pertenecientes al género *Bifidobacterium*; bacterias gram positivas anaeróbicas distribuidas en el tracto intestinal de mamíferos (Björkroth & Koort, 2016).

Los géneros de BAL presentes en los diferentes tipos de mostos y vino se diferencian no solo por las características fenotípicas, sino también por la relación filogenética revelada por la secuenciación de rRNA, misma que se puede apreciar en la figura 4.

Figura 4

Árbol filogenético sin raíces de las BAL y otros géneros relacionados.



Nota: El gráfico representa el árbol filogenético esquemático de las BAL y otros géneros relacionados. Figura tomada de (Axelsson, 2004)

Clasificación

Según el tipo de fermentación las BAL pueden clasificarse en homofermentativas y heterofermentativas (König et al., 2017).

Homofermentativas. Las especies homofermentativas son aquellas que producen ácido láctico en un aproximado del 85%, puesto que la conversión de un mol de glucosa permite la producción de dos moles de ácido láctico. Aquí se incluyen a los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* del grupo I (König et al., 2017).

Heterofermentativas. Las heterofermentativas, por el contrario, produce un 50% de ácido láctico en vista de que la conversión de un mol de glucosa solo produce un mol de ácido láctico. En esta conversión se producen otros compuestos como etanol o acetato y CO₂. Las heterofermentativas utilizan la ruta de las pentosas fosfatos para llevar a cabo el metabolismo de azúcares e incluye a los géneros de *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella* y *Lactobacillus* del grupo II (König et al., 2017).

Según la temperatura óptima estas se clasifican en mesófilas y termófilas (Anchundia & Torres, 2022):

Mesófilas. Son bacterias que requieren de una temperatura de incubación de 20 a 25°C por un lapso de 18 a 20 horas (Anchundia & Torres, 2022).

Termófilas. Son bacterias que requieren de una temperatura de incubación de 40 a 45°C por un lapso de 2 a 4 horas (Anchundia & Torres, 2022).

Propiedades antimicrobianas

La mayoría de las especies de BAL tienen la capacidad para producir componentes que sirven potencialmente como antimicrobianos cuando se encuentran en concentraciones adecuadas. El ácido acético, el CO₂, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas son algunas de estas sustancias (König et al., 2017). Las BAL tienen un amplio espectro de acción contra

hongos, protozoos y bacterias grampositivas y gramnegativas (Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010).

Bacteriocinas. Las bacteriocinas son los metabolitos que más se destacan como sustituyentes de agentes químicos; son descritas como péptidos antimicrobianos producidos en los ribosomas de las bacterias con ayuda o no de una enzima de modificaciones postaduccionales (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Poseen un peso molecular bajo, son termoestables, estables a niveles de pH inferiores y sensibles a la acción de las proteasas (Vanegas et al., 2017). La mayoría de las bacteriocinas son de origen alimentario y, dado que son mediamente estables al calor y favorecen la inhibición del crecimiento de microorganismos dañinos en alimentos procesados, su aplicación en la microbiología alimentaria es de gran interés (Cotter et al., 2005).

Las bacteriocinas tienen una amplia gama de clasificaciones en base a sus genotipos y funcionalidad, a pesar de ello y, en función de su mecanismo de biosíntesis y actividad biológica, estas pueden clasificarse como clase I (modificadas menores a 10 kDa), clase II (no modificadas menores a 10 kDa) y clase III (no modificadas mayores a 10 kDa (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Producción de bacteriocinas. Los microorganismos productores de bacteriocinas tienen ventajas relacionadas con la mejora de las propiedades organolépticas de los alimentos, pueden contribuir a la textura, sabor, olor y calor nutricional de los mismos (Mahrous et al., 2013).

La expresión de las bacteriocinas está regulada por factores internos presentes y secretados por la misma bacteria y, por factores externos como el pH, la temperatura y la cantidad de glucosa presente en el medio. Varias investigaciones han demostrado que las condiciones de crecimiento para lograr una producción óptima de bacteriocinas requieren de un

medio específico con parámetros de temperatura 34 a 35°C, pH 5 a 6, glucosa 2% y sin aireación, todo esto durante 48 horas (Mokoena et al., 2021).

Aplicación de las Bacterias Ácido Lácticas

Las propiedades que poseen las BAL ha generado un creciente interés en la industria, su aplicación a la seguridad alimentaria, el desarrollo de alimentos nuevos, la mitigación de infecciones transmitidas por los alimentos y la inhibición de proliferación de microorganismos patógenos son el principal objetivo. Las BAL utilizan los carbohidratos como fuente de carbono y generan péptidos antimicrobianos denominados como bacteriocinas. Las bacteriocinas funcionan como agentes de control biológico asegurando la prevención del deterioro de los alimentos y la extensión de su vida útil. Así mismo, ejerce una defensa antimicrobiana que garantiza la seguridad del consumidor (Mokoena et al., 2021).

Gracias al extenso potencial, estudios realizados indican que se ha aplicado el uso de BAL para la prevención de diabetes tipo II (Peng et al., 2018). Las BAL inducen cambios que son beneficiosos para el sistema del microbiota intestinal y reducen la inflamación sistémica en sujetos con diabetes II mediante la alteración de endotoxinas. Ensayos en ratones demuestran que los niveles de glucosa y obesidad disminuyen significativamente (Alokail et al., 2013).

Otra de las aplicaciones que tienen son como agentes antifúngicos y antimicrobianos. A medida que aumenta la resistencia a antibióticos se es más complicado controlar el deterioro de alimentos por contaminación con los mismos, curiosamente las BAL tienen la capacidad de producir varios compuestos que provocan la disminución del pH, inhibiendo el crecimiento de muchos microorganismos, incluidos hongos y bacterias patógenas (Peng y otros, 2018).

Recientemente se ha visto su potencial aplicación en sistemas de tratamiento de aguas residuales, lo que se visualiza como una posible solución a este problema. Diariamente las fuentes de agua están expuestas a un sin número de contaminantes no solo microbiológicos

sino también minerales, que resultan del desarrollo de productos industrializados, donde no se lleva un correcto tratamiento de los desechos generados. La utilización de las BAL es una solución biodegradable dada sus capacidades para la remoción de metales (Balboa Luna & Vergara Gonzales, 2021).

Métodos de Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Las pruebas de susceptibilidad son métodos que se usan en ensayos para determinar o evaluar la actividad antimicrobiana de un compuesto, sustancia o extracto de manera in vitro; las plantas son la principal fuente de estas sustancias y, dado que proporcionan una extensa gama de compuestos estructuralmente diversos, tienen la capacidad para inhibir bacterias resistentes. Los métodos más empleados por ser simples y básicos son la difusión en disco, la difusión en pozos y difusión de tapón (Balouiri et al., 2016).

Método de Difusión en Disco de Agar

La difusión en disco o método de Kirby-Bauer es una técnica desarrollada desde 1940 para medir la susceptibilidad de bacterias frente a un antibiótico. Es la más utilizada en los laboratorios de microbiología clínica en vista de que puede analizarse con precisión, es una herramienta bien sencilla, su realización es de bajo costo y tienen facilidad para interpretar los resultados de más de un microorganismo. El antibiograma por difusión de discos se basa en el fenotipo de resistencia de la bacteria probada y, sus resultados, guían a la selección de un medicamento adecuado dependiendo de si la bacteria es susceptible, intermedia o resistente. En la actualidad se utiliza el agar Mueller-Hilton como medio general para realizar este tipo de pruebas, puesto que aumenta al máximo la reproducción de patógenos tanto aerobios como anaerobios facultativos (Rechenchoski et al., 2017).

Método de Difusión de Pozos

A diferencia del método de Kirby-Bauer la difusión en pozo se aplica para evaluar la capacidad antimicrobiana de extractos de plantas o extractos microbianos, con un procedimiento muy parecido al de difusión de disco. Aquí el agente antimicrobiano se esparce por el medio luego de haber sido colocado en las perforaciones realizadas previamente, y en el caso de tener resultados positivos, inhibe el crecimiento de la cepa a ensayada. Varios de los estudios realizados con este método lo recomiendan para llevar a cabo ensayos de actividad antimicrobiana por su alta sensibilidad (Montero-Recalde et al., 2018).

Método de Difusión de Tapón

La difusión en tapón es un método que tiene un procedimiento similar a la difusión en disco con el fin de resaltar un antagonismo dado entre microorganismo. El método requiere de un cultivo puro de la bacteria al que una vez incubado se corta asépticamente en formas de cilindros y se transfiere a una placa inoculada previamente con el patógeno de prueba. Las bacterias secretan moléculas y sustancias que una vez esparcidas por el medio ejercen un efecto antimicrobiano representado por la zona de inhibición (Balouiri et al., 2016).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del Área de Investigación

Ubicación Política

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

Ubicación Ecológica

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

Ubicación Geográfica

El trabajo de Integración Curricular se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y Bromatología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, extensión Santo Domingo. Ubicada en la Vía Santo Domingo Quevedo Km 24.

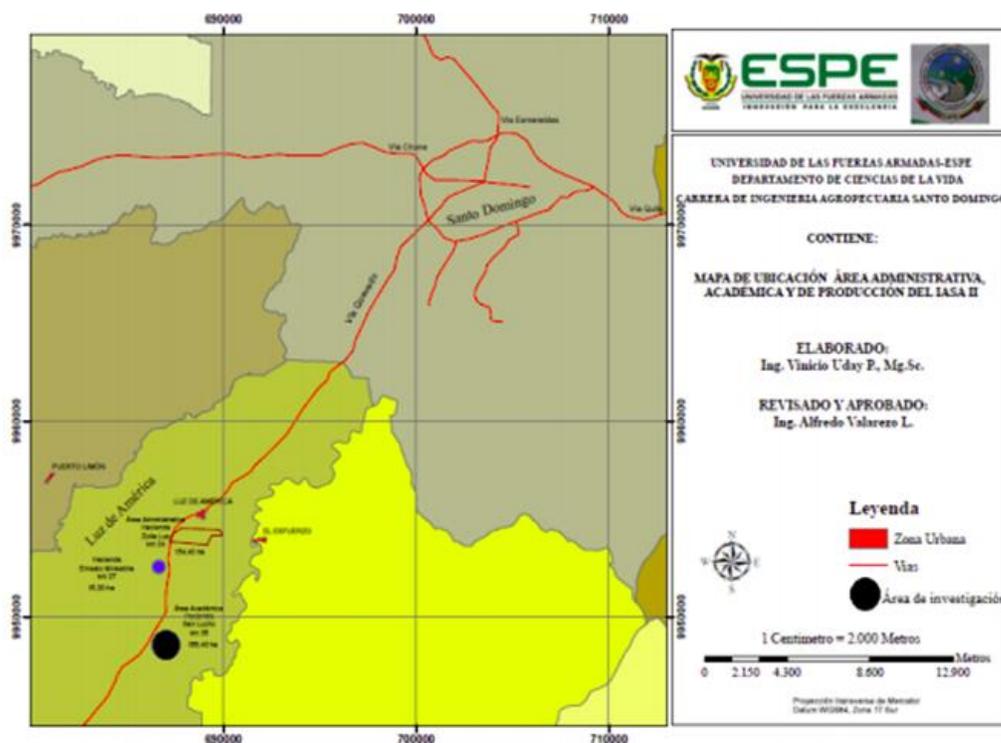
Latitud: 00° 24' 36"

Longitud: 00° 24' 36"

Altitud: 270 msnm

Figura 5

Mapa de la ubicación geográfica del área de investigación.



Materiales

Determinación de pH

Tabla 2

Recursos implementados para la determinación del pH del Chawarmishqui.

Equipos	Materiales/Insumos	Muestra
Potenciometro	Pipeta de 10 ml Probeta de 100 ml Vaso de precipitación 100 mL	Fermentado de Chawarmishqui

Determinación de Acidez

Tabla 3

Recursos implementados para la determinación de la acidez titulable del Chaguarmishqui.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestra
Potenciómetro	Probeta de 25 mL	Na(OH) 0,1N	Chaguarmishqui
Kit de titulación	Balón aforado de 250 mL		
Plato agitador	Vaso de precipitación 25 mL Pipeta plástica Electrodo		

Determinación de sólidos solubles

Tabla 4

Recursos implementados para la determinación de sólidos solubles del Chaguarmishqui.

Equipos	Materiales/Insumos	Muestra
Refractómetro	Vaso de precipitación 25 mL	Chaguarmishqui

Tabla 5

Recursos implementados para el recuento de aerobios mesófilos, mohos y levaduras.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestra
Balanza	Tubos de ensayo	Agua Peptona	Chaguarmishqui
Autoclave	Gradilla		
Cámara de flujo laminar	Pipetas		
Incubadora	Puntas		
	Petrifilm		

Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas

Tabla 6

Recursos implementados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir del Chawarmishqui fermentado.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestra
Balanza	Tubos de ensayo	MRS Agar	Chaguarmishqui
Plancha térmica	Gradilla	Agua de peptona	
Autoclave	Frasco para medio		
Incubadora	Asa de Brigalski		
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica		
	Mechero		
	Micropipeta		
	Placas petri		

Identificación de Bacterias Ácido Lácticas

Tabla 7

Recursos implementados para la identificación de bacterias ácido lácticas por tinción Gram.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestra
Microscopio	Asa bacteriológica	Cristal violeta	Chaguarmishqui
	Porta objetos	Lugol	
	Piseta	Alcohol	
	Gotero	Safranina	
	Mechero		
	Vaso de precipitación		

Tabla 8

Recursos implementados para la realización de pruebas de catalasa y oxidasa.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestra
Microscopio	Asa bacteriológica	Peróxido de hidrógeno	Chaguarmishqui
	Porta objetos		
	Piseta	Reactivo de Kovacs	
	Mechero		

Ensayo In Vitro de Actividad Antimicrobiana

Tabla 9

Recursos implementados para la determinación de actividad antimicrobiana de las BAL frente a microorganismos patógenos.

Equipos	Materiales/Insumos	Reactivo	Muestra
Incubadora	Electrodos	Mueller-Hinton	Solución libre
Cámara de flujo laminar	Frasco de medios	Agar	de células (SLC)
Autoclave	Asa bacteriológica	NaCl	Solución MO patógeno
Balanza	Micropipeta		
Espectrofotómetro	Placas Petri		
Centrífuga	Sacabocados (5 mm)		
Potenciómetro	Mechero		
Vórtex	Pipeta (10 mL)		
	Isopo estéril		
	Tubos de ensayos (10 mL)		
	Vaso de precipitación		
	Matraz de Erlenmeyer		

Métodos

Obtención de Materia Prima

El extracto recolectado del penco (Chaguarmishquis) utilizado para nuestro trabajo provino de la plantación de la microempresa “Casa del Penco” ubicada en Otavalo-Ibarra.

Fermentación de las Especies de Penco

El Chaguarmishqui se recogió tras escarbar una cavidad en la base de la raíz del penco, y este se llevó a dos biorreactores batch para cada una de las especies, se dejó fermentar durante 3 días, recogiendo datos de pH, acidez y °Brix, para desarrollar la cinética de fermentación.

Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas.

Al tercer día de fermentación, se recolectó una pequeña cantidad del Chaguarmishqui y se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-4} utilizando agua de peptona. Para esto, el agua de peptona se preparó al 1,5%, es decir, en 72 ml de agua destilada se diluyeron 1,08 g, posteriormente se repartieron 9 ml en cuatro tubos y con una micropipeta se inoculó 1 ml de la muestra del chaguarmishqui fermentado en el primer tubo para hacer la dilución 10^{-1} , de este tubo se extrajo 1 ml y se inoculó en el siguiente tubo para obtener la dilución 10^{-2} y así se continuó hasta obtener la dilución 10^{-4} , este procedimiento se realizó con el chaguarmishqui de ambas especies del penco. De cada dilución 10^{-4} , se tomó 0,1 ml y se colocó en cajas Petri con 25 ml de agar MRS, utilizando un aza drigalski para esparcir uniformemente las células por todo el medio. Terminado esto, las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.

De las colonias obtenidas en las placas luego de las 48 horas de incubación, se realizaron nuevas siembras para obtener las colonias puras, esto utilizando el método de siembra por estrías.

Identificación de bacterias ácido lácticas

Tinción Gram. Se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos, luego con un asa bacteriológica estéril se recolectó una pequeña cantidad de muestra, se esparció por el portaobjetos y se fijó utilizando la llama de un mechero. Una vez seca la muestra, esta se cubrió con cristal violeta, el cual se dejó actuar durante 1 min, luego se añadió lugol durante 1 min, posterior a esto alcohol cetona durante 15 seg y finalmente safranina durante 1 min, en cada etapa se realizó un lavado con agua destilada y se secó con el mechero. El portaobjetos se observó utilizando un microscopio a una resolución de 100x utilizando aceite de inmersión.

Prueba de Catalasa. En un portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), luego se tomó una porción de la muestra con el asa bacteriológica, se esparció por toda gota y se observó la reacción producida durante los 20 seg. Si la colonia produce burbuja la reacción es positiva y si esto no ocurre la reacción es negativa.

Caracterización Molecular. Las bacterias obtenidas se enviaron a la empresa Macrogen Inc. DNA en Corea del Sur por duplicado en cajas Petri con agar MRS, esto con el objetivo de confirmar la identificación de las bacterias tras la detección del gen 16s del ARNr. Las secuencias adquiridas por secuenciación fueron analizadas mediante un Blast y se determinaron relaciones filogenéticas con otras secuencias obtenidas de la base de datos GENE BANK.

Ensayos de Actividad Microbiana

Crecimiento de las diferentes BAL. El crecimiento de las BAL se realizó en caldo comercial MRS, que contiene los nutrientes necesarios para su desarrollo. En este caso, se colocó en un matraz 250 ml de agar MRS y se inoculó la cepa bacteriana deseada en el medio, el cual posteriormente fue sellado con algodón y parafilm e incubado a 37 °C durante 48 horas.

Obtención de soluciones para el antibiograma. Las soluciones bacterianas se realizaron según lo mencionado por Serna & Rubiano (2012), para esto se utilizaron 45 ml de caldo inoculado con la bacteria para cada solución las cuales fueron: solución de metabolitos libre de células (Sol) y solución de células bacterianas con metabolitos (SolBac).

Para obtener la solución de metabolitos libres de células se centrifugó el caldo a 3500 rpm durante 30 min y luego el sobrenadante se filtró usando membranas de 0,45 μm y la solución de células bacterianas con metabolitos se extrajo directamente del medio de cultivo líquido.

Obtención de microorganismos patógenos. Para la determinación de la actividad antimicrobiana contra las BAL aisladas se utilizaron tres cepas bacterianas patógenas Gram negativas, las cuales fueron: *Escherichia coli* obtenida en el laboratorio de la Universidad SEK, *Citrobacter freundii* y *Klebselia pneumoniae* aisladas de aguas residuales de la Universidad de las fuerzas armadas ESPE.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de las BAL. Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en pozos descrito según Palacios (2022) con ciertas modificaciones. Primero, se preparó la solución de cada una de las bacterias patógenas a evaluar ajustada a 0,5 en la escala de MacFarland y, una vez preparada, se empapó en ella un isopo estéril para sembrar por diseminación en medio Mueller Hinton. Se esperó 15 min hasta que el medio absorba la solución y con ayuda de un sacabocado se realizaron pozos de 6mm de diámetro, a los cuales se agregaron 75 μL de la solución obtenida de ácido lácticas. Finalmente, la actividad antimicrobiana se determinó tras la medición de los halos de inhibición con una regla milimétrica, cabe mencionar que se utilizó agua destilada en uno de los pocillos como control negativo para comparar los resultados. Se consideró una inhibición efectiva si las cepas evaluadas exhibían halos superiores a 2 mm.

Diseño experimental

Factores y niveles de experimento

Tabla 10

Factores y niveles a probar en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.

Factores	Simbología	Niveles
Especie de penco (A)	a ₀	Azul
	a ₁	Blanco
Estado (B)	b ₀	Fresco
	b ₁	Fermentado

Tabla 11

Factores y niveles a probar en el efecto antimicrobiano que tienen las BAL provenientes de dos especies de penco frente a microorganismos patógenos.

Factores	Simbología	Niveles
Especie de penco (A)	a ₀	Azul
	a ₁	Blanco
Microorganismo patógeno (B)	b ₀	<i>Escherichia coli</i>
	b ₁	<i>Citrobacter freundii</i>
	b ₂	<i>Klebselia pneumoniae</i>
Tipo de solución bacteriana (C)	c ₀	Solución + bacteria (SolBac)
	c ₁	Solución (Sol)

Tratamiento a comparar**Tabla 12**

Tratamientos a comparar en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.

Factores	Simbología	Niveles
T1	a ₀ b ₀	Azul+ Fresco
T2	a ₀ b ₁	Azul+ Fermentado
T3	a ₁ b ₀	Amarillo + Fresco
T4	a ₁ b ₁	Amarillo + Fermentado

Tabla 13

Tratamientos a comparar en el efecto antimicrobiano que tienen las BAL provenientes de dos especies de penco frente a microorganismos patógenos.

Factores	Simbología	Niveles
T1	a ₀ b ₀ c ₀	Azul+ <i>E. coli</i> + SolBac
T2	a ₀ b ₀ c ₁	Azul+ <i>E. coli</i> + Sol
T3	a ₀ b ₁ c ₀	Azul+ <i>C. freundii</i> + SolBac
T4	a ₀ b ₁ c ₁	Azul+ <i>C. freundii</i> + Sol
T5	a ₀ b ₂ c ₀	Azul+ <i>K. pneumoniae</i> + SolBac
T6	a ₀ b ₂ c ₁	Azul+ <i>K. pneumoniae</i> + Sol
T7	a ₁ b ₀ c ₀	Blanco+ <i>E. coli</i> + SolBac
T8	a ₁ b ₀ c ₁	Blanco + <i>E. coli</i> + Sol

T9	$a_1 b_1 c_0$	Blanco + <i>C. freundii</i> + SolBac
T10	$a_1 b_1 c_1$	Blanco + <i>C. freundii</i> + Sol
T11	$a_1 b_2 c_0$	Blanco + <i>K. pneumoniae</i> + SolBac
T12	$a_1 b_2 c_1$	Blanco + <i>K. pneumoniae</i> + Sol

Tipo de diseño experimental

Para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del chaguarmishqui se aplicó un ANOVA DBCA con arreglo factorial $A \times B$ (2×2) con un total de 4 unidades experimentales y tres repeticiones por tratamiento. El modelo estadístico es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ = media global

A = efecto del nivel i -ésimo del factor A

β = efecto del nivel j -ésimo del factor B

$(A\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

ε_{ij} = error aleatorio

k = número de replicaciones del experimento

Para el efecto antimicrobiano se aplicó un ANOVA DBCA de arreglo factorial $A \times B \times C$ ($2 \times 3 \times 2$) con un total de 12 unidades experimentales con 3 repeticiones para cada tratamiento.

El modelo estadístico aplicado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + C_k + (A\beta)_{ij} + (AC)_{ij} + (\beta C)_{ij} + (A\beta C)_{ijk} + R_1 + E_{ijk1}$$

Donde:

μ = efecto global

A_i = efecto del nivel i-ésimo del factor A

β_j = efecto del nivel j-ésimo del factor B

C_k = efecto del nivel k-ésimo del factor C

$(A\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

$(AC)_{ik}$ = efecto de la interacción doble del factor A por el factor C

$(\beta C)_{jk}$ = efecto de la interacción doble del factor B por el factor C

$(A\beta C)_{ijk}$ = efecto de la interacción triple de los factores A, B, C

R_1 = efecto de la replicación del experimento

E_{ijk1} = error aleatorio

Para la caracterización fisicoquímica se aplicó un ANOVA DBCA con arreglo factorial AxB (3x2) con un total de 6 unidades experimentales y tres repeticiones por tratamiento. El modelo estadístico es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

μ = media global

A = efecto del nivel i-ésimo del factor A

β = efecto del nivel j-ésimo del factor B

$(A\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

E_{ij} = error aleatorio

k = número de replicaciones del experimento

Repeticiones

En la caracterización fisicoquímica se realizaron 5 repeticiones para cada tratamiento, generando un total de 20 unidades experimentales.

En la actividad antimicrobiana se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento, generando un total de 36 unidades experimentales.

Análisis estadístico

Tabla 14

Esquema del análisis de varianza para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Especie de Penco	a -1	1
Estado	b -1	1
Especie de penco x Estado	(a-1) (b-1)	1
Réplicas	r-1	4
Error experimental		12
Total	abr-1	19

Tabla 15

Esquema del análisis de varianza para la determinación de la actividad antimicrobiana de las BAL obtenidas a partir del Chaguarmishqui frente a microorganismos patógenos.

Fuente de variación	Fórmula	Grados de libertad
Especie de Penco	a -1	1
Microorganismo patógeno	b -1	2
Tipo de solución	c-1	1
Especie de penco x M. patógeno	(a-1) (b-1)	2
Especie de penco x Tipo de solución	(a-1) (c-1)	1
M. patógeno x Tipo de solución	(b-1) (c-1)	2
Especie de penco x M. patógeno x Tipo de solución	(a-1) (b-1) (c-1)	2
Réplicas	r-1	2
Error experimental		22
Total	abcr-1	35

Análisis funcional

Se aplicó una prueba de significancia de Tukey ($p < 0,05$) para las variables que resultaron con diferencia significativa en el análisis de varianza de ambos diseños.

Variabes a medir

Para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación se evaluaron las variables de pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

pH. El pH se determinó siguiendo la norma INEN 389 (1985), para esto se diluyó en un vaso de precipitación 10 ml de la muestra en 100 ml de agua destilada y se agitó suavemente, luego se procedió a introducir el electrodo del potenciómetro en el vaso con la muestra, evitando que se toquen las paredes del mismo.

Acidez. El procedimiento utilizado para determinar la acidez titulable se basó de la norma INEN 381 (1985):

Primero se realizó la preparación de la muestra, para lo cual se colocó en un balón de aforo de 250 ml 25 ml de Chaguarmishqui, se aforó con agua destilada y se mezcló lentamente la disolución.

Para la medición de acidez, se apartó en un matraz volumétrico 25 ml de la disolución preparada previamente, se armó un equipo de titulación y en la bureta se colocó hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N. El vaso con la muestra se colocó debajo de la bureta y se fue añadiendo lentamente NaOH hasta llegar a un pH de 7, luego se adicionó gota a gota el reactivo hasta registrar un pH de máximo 8,3. Por interpolación se consigue el volumen de NaOH utilizado para llegar a un pH de 8,1. Una vez obtenido este valor, se procedió a calcular la acidez titulable, donde se utilizó la siguiente ecuación:

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

Siendo

A= gramos de ácido en 1 litro de producto.

V1= cm³ de NaOH usados para la titulación.

N1= normalidad de la solución de NaOH.

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

V2= volumen de muestra diluida utilizada.

Sólidos solubles. Los grados Brix se midieron con un refractómetro de 45°, para esto primero se calibró el equipo con agua destilada, posteriormente se colocó una gota de la muestra en la bandeja y se cerró, se observó el resultado y se lavó.

Recuento de Aerobios mesófilos. La presencia de aerobios mesófilos se realizó utilizando placas de petrifilm. Previo al uso de las placas se preparó diluciones seriadas del Chaguarmishqui de ambas especies utilizando como diluyente agua de peptona de la siguiente manera:

Se preparó agua de peptona, según lo indicado por el fabricante, para hacer diluciones seriadas hasta 10^{-4} de cada especie, por cada especie prepararon 4 tubos con 9 ml y se agregándose 1 ml de la muestra en el primer tubo y continuando con el procedimiento hasta tener un volumen final de 9 ml a partir de la solución madre.

Se colocó la placa en una superficie plana, se levantó el film superior, se pipeteó 1 ml de la disolución 10^{-4} y se colocó en el centro del film interior, posteriormente se dejó caer el film superior, sin hacer ninguna presión y evitando la formación de burbujas. Para finalizar la placa petrifilm se colocó cara arriba en una incubadora 37°C durante 48 horas.

Presencia de Mohos y Levadura. En el caso de mohos y levaduras se utilizó un petrifilm específico para estos microorganismos y se siguió el mismo procedimiento utilizado para el recuento de aerobios mesófilos; se levantó el film superior, se colocó 1 ml de la disolución 10^{-4} y se dejó caer sobre la muestra. La placa petrifilm en este caso se incubó a 21°C durante 72 horas.

Finalmente, las placas tanto de aerobios mesófilos como de mohos y levaduras se leyeron utilizando el contador de colonias y para determinar las unidades formadoras de colonias, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Recuento} \left(\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{número de colonias} \times \text{Inverso del factor de dilución}}{\text{Volumen inoculado}}$$

Para la determinación de la actividad antimicrobiana del Chaguarmishqui se evaluó la variable halo de inhibición.

Determinación del halo de inhibición. Para determinar las medidas del halo de inhibición se basó en la metodología de Kirby-Bauer, donde una vez obtenidos los resultados se midió el diámetro de los halos de inhibición en cada una de las placas con ayuda de una regla milimétrica.

Capítulo IV

Resultados

Cinética de las variables fisicoquímicas evaluadas durante los 3 días de fermentación.

Se realizó una cinética de fermentación con los factores pH, acidez y sólidos solubles, los cuales según las figuras 6, 7 y 8 mostraron variabilidad durante el transcurso de los días. En el caso del pH para la especie 1 los valores fueron de 5,4 (día 0), 4,08 (día 1), 3,81 (día 2) y 3,77 (día 3), mientras que para la especie 2 fueron de 5,58 (día 0), 4,05 (día 1), 3,75 (día 2) y 3,74 (día 3). Para los sólidos solubles en la especie 1 fueron de 15,2 (día 0), 13,5 (día 1), 10,2 (día 2) y 8 (día 3); y en la especie 2 de 17,2 (día 0), 13 (día 1), 12,2 (día 2) y 10 (día 3). Cabe mencionar que para ambos factores los valores disminuyeron con respecto a los días de fermentación

En cuanto a la acidez los valores aumentaron significativamente, ya que para la especie 1 se mostró valores de 0,07 (día 0), 0,94 (día 1), 0,52 (día 2) y 0,52 (día 3) y para la especie 2 de 0,09 (día 0), 0,7 (día 1), 0,72 (día 2) y 0,72 (día 3).

Figura 6

Cinética de las variables fisicoquímicas durante los 3 días de fermentación.

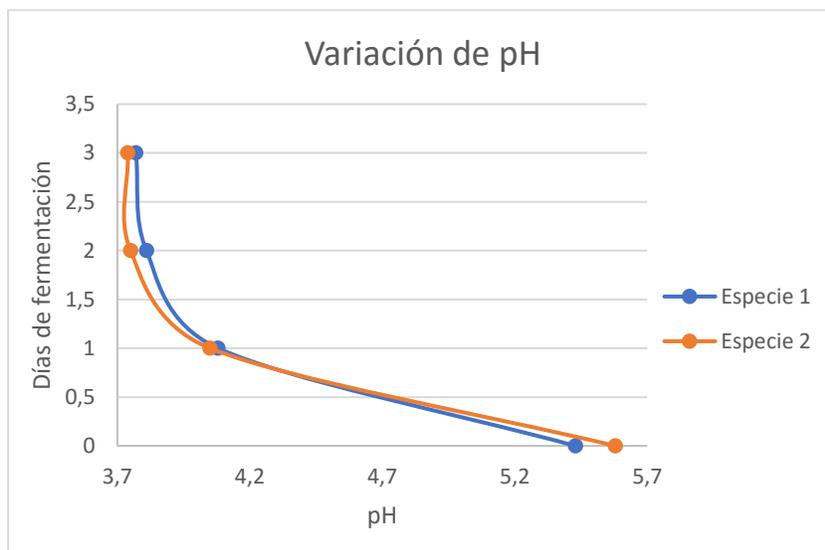
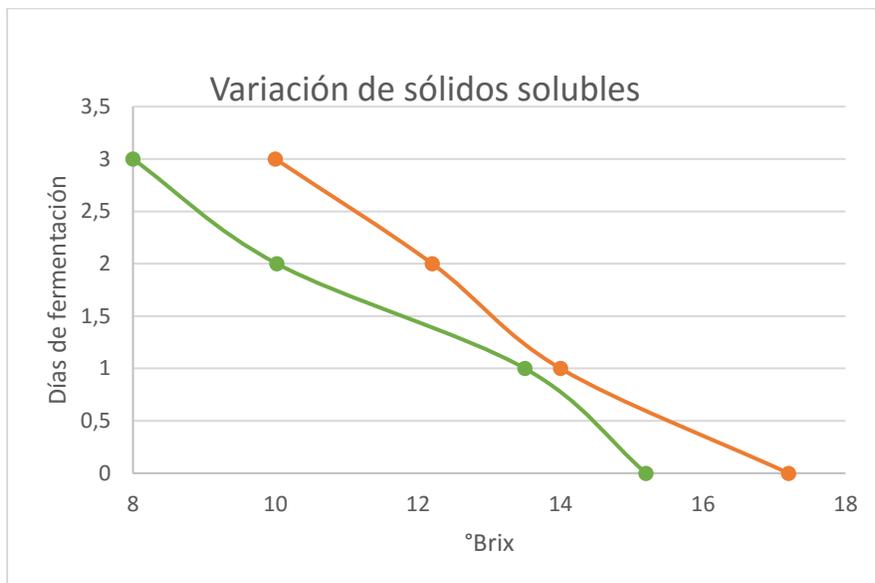
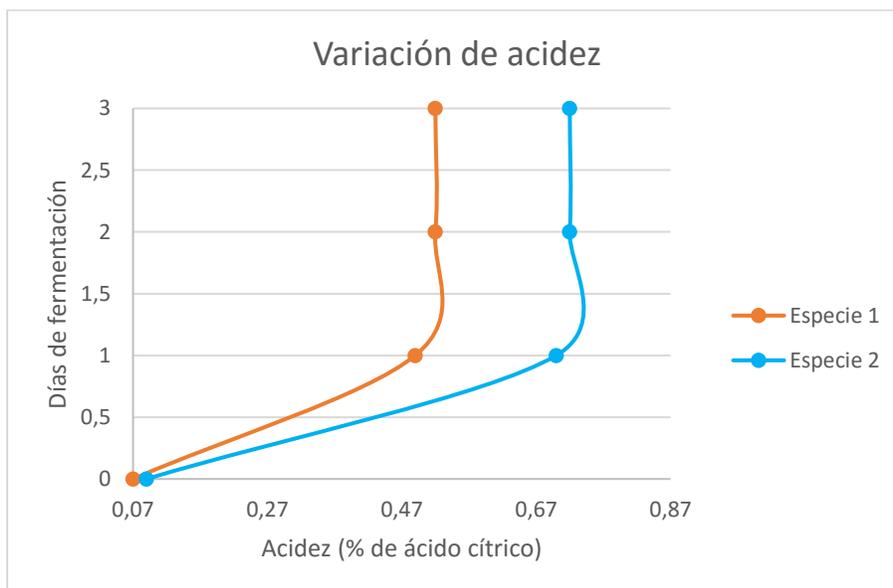


Figura 7

Cinética de fermentación para el facto sólidos solubles.

**Figura 8**

Cinética de fermentación para el facto acidez.



Identificación de bacterias ácido lácticas

Caracterización macroscópica de las cepas aisladas

De las colonias obtenidas tras la siembra del Chaguarmishqui fermentado se identificaron tres colonias predominantes en la especie 1 y dos en la especie 2, las cuales fueron aisladas y caracterizadas como se observa en la tabla 16.

Tabla 16

Resultados de la caracterización morfológica de las colonias identificadas.

Procedencia	Colonia	Características
Penco azul (cepa 1)		Forma: Redonda Tamaño: 2 mm Color: Blanco Textura: Cremosa
Penco azul (cepa 2)		Forma: Redonda Tamaño: 4 mm Color: Blanco opaco Textura: Cremosa

Penco azul (cepa 3)



Forma: Redonda
Tamaño: 2 mm
Color: Blanco opaco
Textura:

Penco blanco (cepa1)



Forma: Redonda grande
Tamaño: 4 mm
Color: Blanco opaco
Textura: Cremosa

Penco blanco (cepa 2)



Forma: Redonda
Tamaño: 2 mm
Color: Blanco
Textura: Cremosa

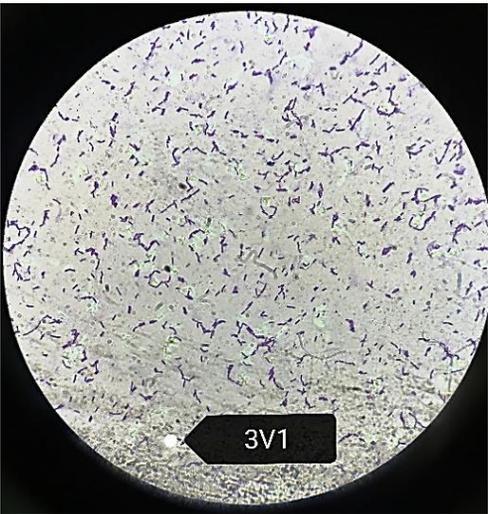
De la especie 1 correspondiente al penco azul se lograron aislar 3 cepas diferentes con las siguientes características morfológicas: cepa 1 = forma de crecimiento redondo, tamaño aproximado de 2mm y textura cremosa de color blanco; cepa 2 = forma de crecimiento redondo, tamaño de 4 mm y textura cremosa de color blanco opaco; y cepa 3 = forma de crecimiento redondo, tamaño de 2 mm y textura cremosa de color blanco muy opaco. Por otra parte, de la especie 2 correspondiente al penco blanco se aislaron 2 cepas con las siguientes características: cepa 1 = forma de crecimiento redondo, tamaño de 4 mm y textura cremosa de color blanco opaco y cepa 2 = forma de crecimiento redondo, tamaño aproximado de 2mm y textura cremosa de color blanco.

Caracterización microscópica de las cepas aisladas

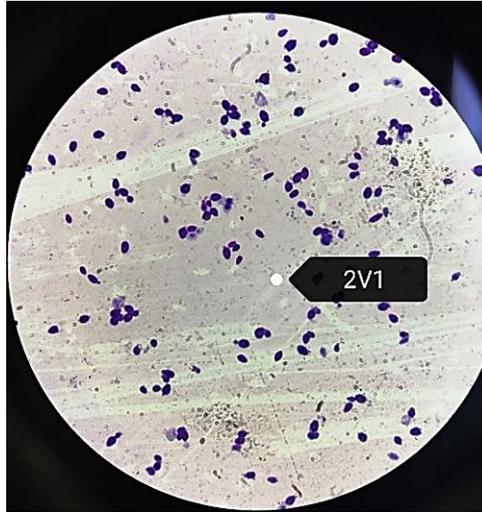
La tinción Gram realizada a las bacterias obtenidas nos indica que son Gram positivas y la prueba bioquímica de catalasa dio un resultado negativo en el caso de todas las bacterias analizadas, lo cual se detalla en la tabla 17.

Tabla 17

Resultados de las pruebas microbiológicas de las BAL aisladas.

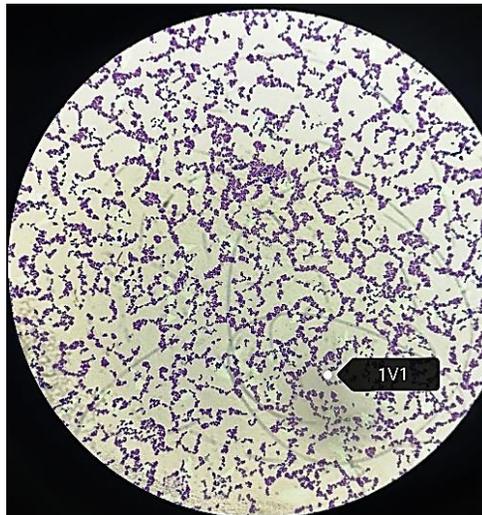
Procedencia	Cepa	Características
Penco azul (cepa 1)		Bacilo Gram + Catalasa (-)

Penco azul (cepa 2)



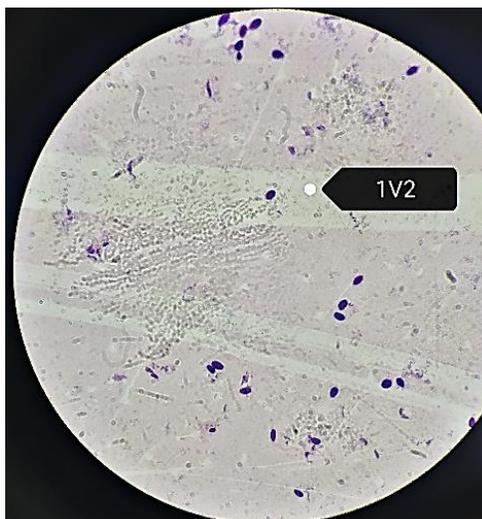
Coco Gram +
Catalasa (-)

Penco azul (cepa 3)



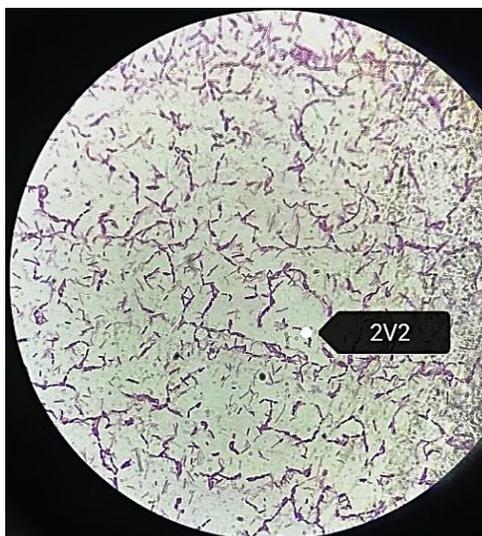
Bacilo Gram +
Catalasa (-)

Penco blanco (cepa1)



Coco Gram +
Catalasa (-)

Penco blanco (cepa 2)



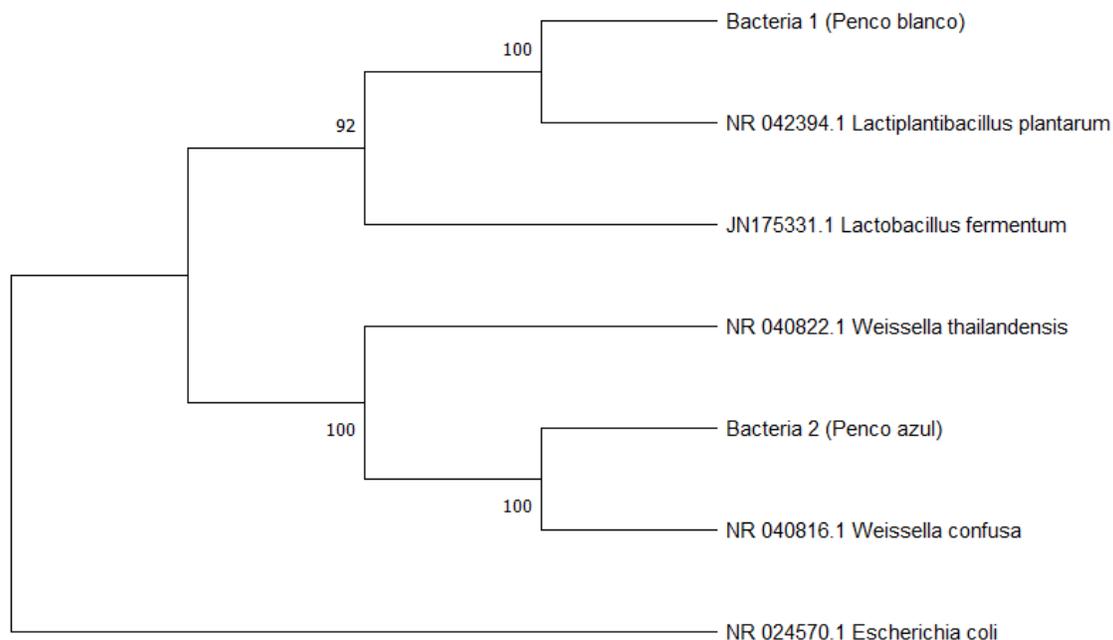
Bacilo Gram +
Catalasa (-)

Caracterización molecular de las cepas aisladas

De las cepas obtenidas a partir de la fermentación del Chaguarmishqui se escogieron las predominantes para cada especie y se realizó una secuenciación de cada una de estas obteniéndose mediante un BLAST, el nombre de las especies aisladas y una comparación entre las secuencias de 16S ARNr de estas, 4 cepas relacionadas y 1 grupo externo, esto tras realizar un árbol filogenético en el programa Mega-X (Figura 9). En este se evidenció la formación de un clado que establece una homología del 100% entre *Lactobacillus plantarum* y la secuencia aislada del penco blanco y una relación bastante cercana de esta secuencia con *Lactobacillus fermentum*. En el caso de la bacteria 2 aislada del penco azul, se observó una homología del 100% con *Weissella confusa*, la cual a su vez se encuentra estrechamente relacionada con *Weissella thailandensis*, ya que comparten el mismo género. También se puede apreciar una relación entre ambos géneros y es que ambas bacterias presentan características similares, lo cual no ocurre con *E. coli*, cómo se muestra en el árbol.

Figura 9

Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias 16S ARNr de las bacterias ácido-lácticas aisladas.



Nota: Arbol filogenético de las bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Weissella confusa* identificadas en las dos especies de penco, fundamentado en las secuencias del gen 16S ARNr con un grupo externo que es *Escherichia coli*.

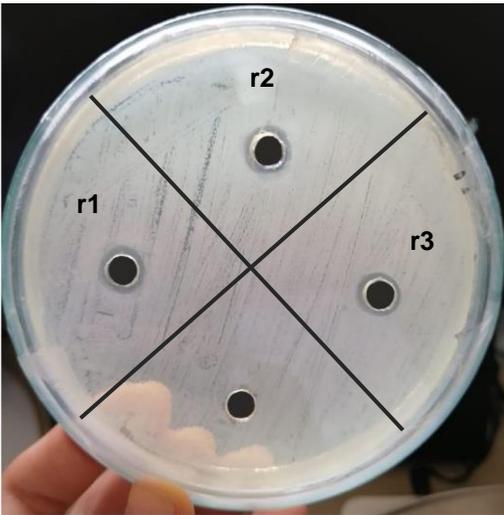
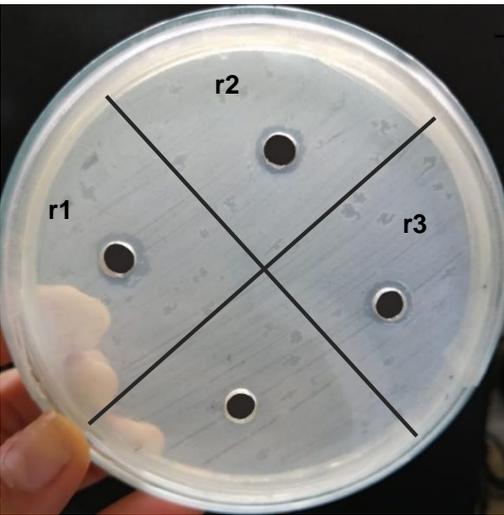
Determinación de la actividad antimicrobiana

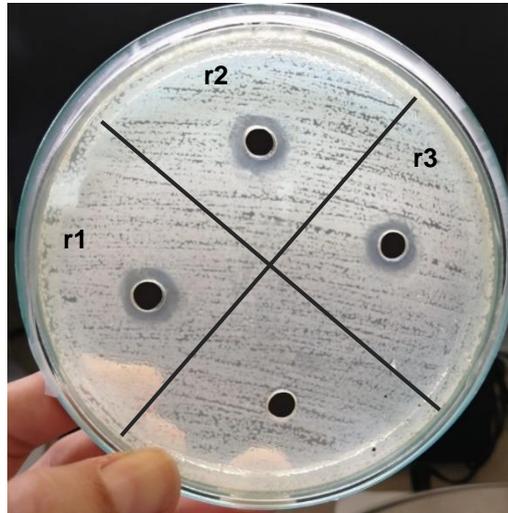
La actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de difusión en pozo, utilizando las bacterias aisladas de las diferentes especies de penco, los microorganismos patógenos obtenidos y los tipos de soluciones preparadas. En la tabla 18 se muestra el halo de inhibición en milímetros (mm) obtenido tras la aplicación del método, donde se puede apreciar que en la combinación a1b1c0 (Blanco+*C. freundii*+SolBac) fue donde más presencia de halo de observó, dando un promedio de 5,17 mm entre las tres repeticiones. En la combinación

a0b1c1 (Azul+C. *freundii*+Sol) no se mostraron buenos resultados, ya que se obtuvo un promedio de 0,66 mm entre las tres repeticiones.

Tabla 18

Resultados del diámetro de inhibición formado a partir del antagonismo entre microorganismos probióticos y microorganismos patógenos.

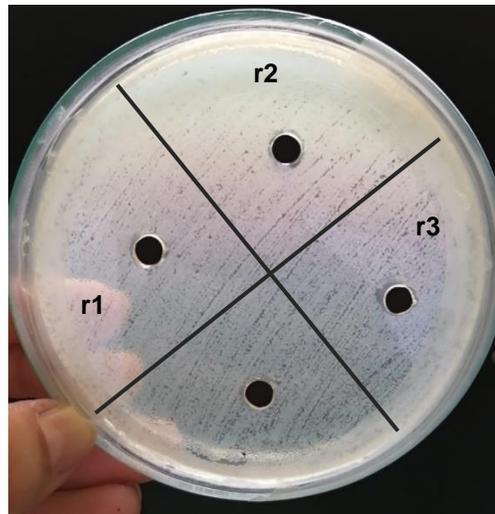
Tratamientos	Antibiograma	Halo de inhibición (mm)
a ₀ b ₀ c ₀		r1: 1,5 r2: 1,5 r3: 1
a ₀ b ₀ c ₁		r1: 1,5 r2: 1 r3: 1

$a_0 b_1 c_0$ 

r1: 3

r2: 3

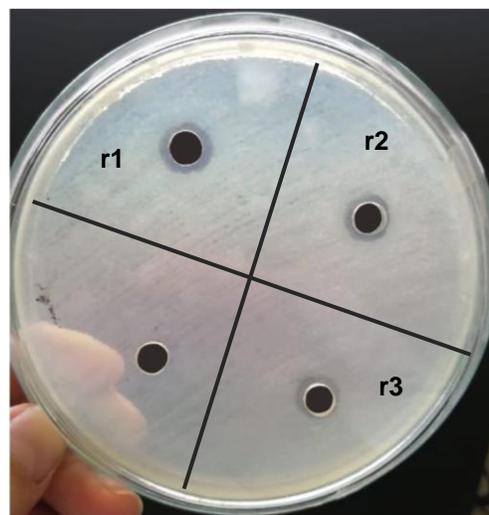
r3: 2,5

 $a_0 b_1 c_1$ 

r1: 0

r2: 0,5

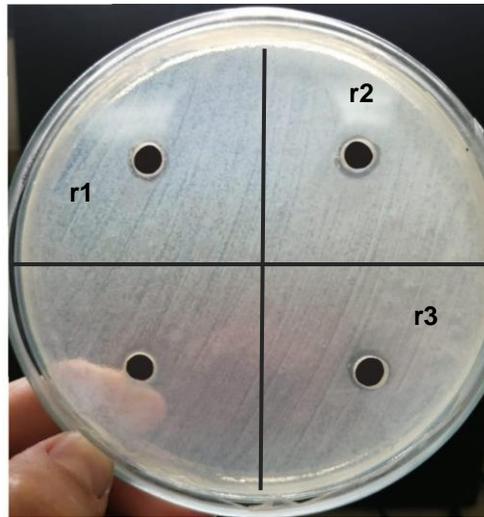
r3: 0,5

 $a_0 b_2 c_0$ 

r1: 2

r2: 1,5

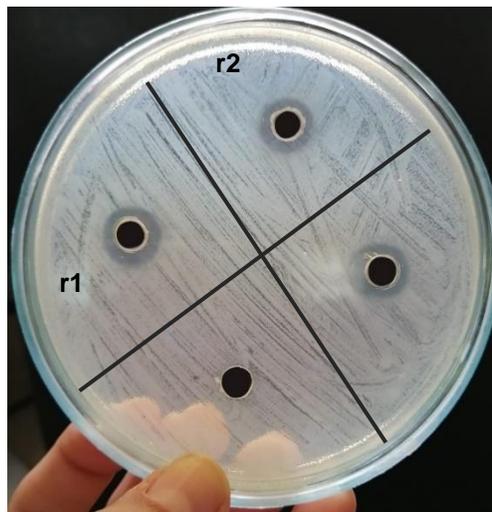
r3: 1,5

$a_0 b_2 c_1$ 

r1: 0,5

r2: 1

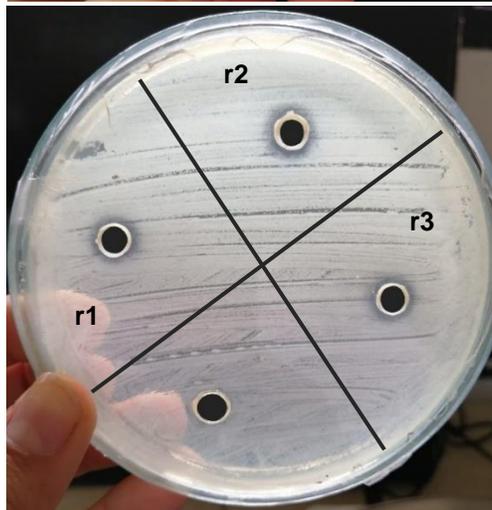
r3: 1

 $a_1 b_0 c_0$ 

r1: 3,5

r2: 3

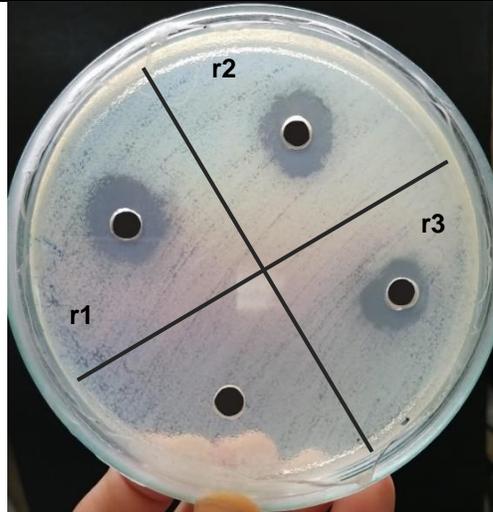
r3: 3,5

 $a_1 b_0 c_1$ 

r1: 1,5

r2: 1,5

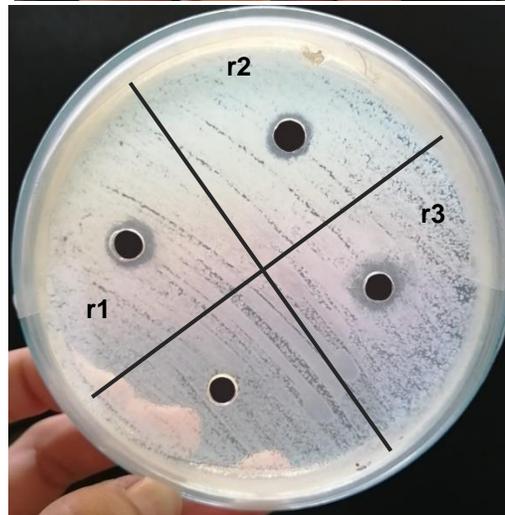
r3: 1

$a_1 b_1 c_0$ 

r1: 5,5

r2: 5,5

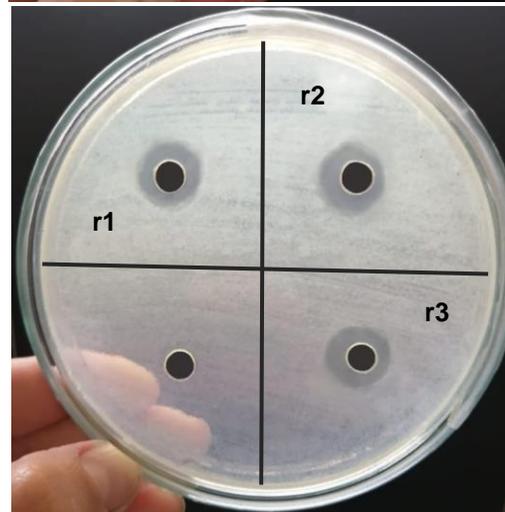
r3: 4,5

 $a_1 b_1 c_1$ 

r1: 2

r2: 1,5

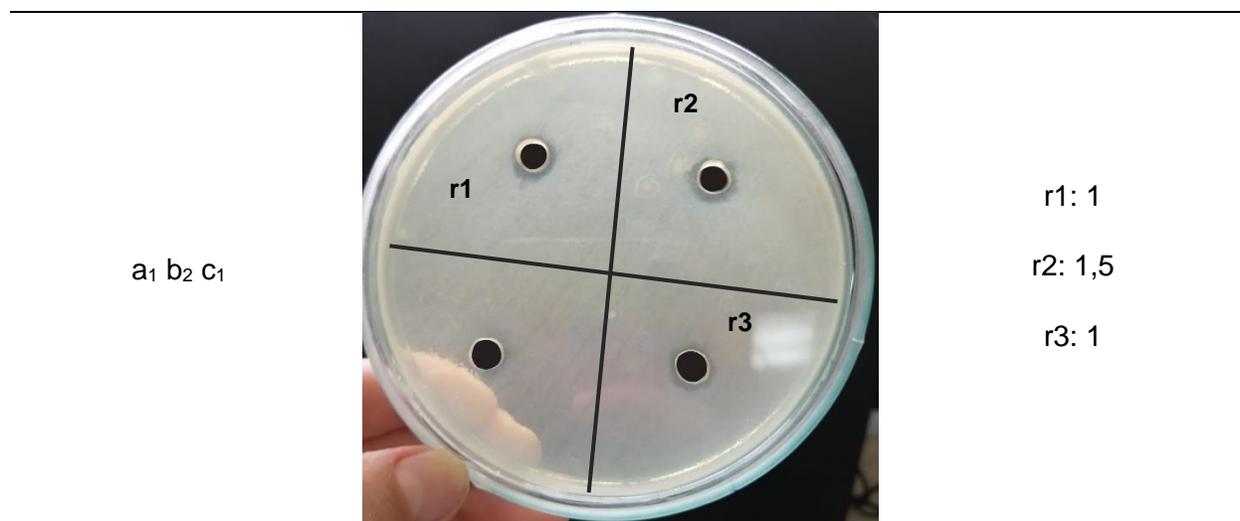
r3: 2,5

 $a_1 b_2 c_0$ 

r1: 3

r2: 4

r3: 4



Análisis de varianza para las variables evaluadas en la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.

Análisis de varianza para la variable pH

Tabla 19

Resultados del análisis de varianza para la variable pH según el estado de fermentación del Chaguarmishqui.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Especies	0,02	1	0,02	40,16	0,0007
B: Estado	9,17	1	9,17	20007,29	0,0001
C: Replicas	$1,0 \times 10^{-3}$	2	$5,2 \times 10^{-4}$	1,15	0,3790
A*B	0,02	1	0,02	33,64	0,0012
Error	$2,7 \times 10^{-3}$	6	$4,6 \times 10^{-4}$		
Total	9,21	11			

La tabla 19 muestra el análisis de varianza para la variable pH durante los estados de fermentación del Chaguarmishqui, en este caso se encontró diferencia significativa para el factor A (Especie), factor B (Estado) y la interacción AXB. En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable acidez (% ácido láctico)

Tabla 20

Resultado del análisis de varianza para la variable acidez (% ácido láctico) según el estado de fermentación del Chaguarmishqui.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Especies	0,03	1	0,03	0,19	0,0001
B: Estado	0,88	1	0,88	0,13	0,0001
C: Replicas	1,6X10 ⁻⁴	2	8,1X10 ⁻⁵	0,19	0,6874
A*B	0,02	1	0,02	0,04	0,0001
Error	1,2X10 ⁻³	6	2,0X10 ⁻⁴		
Total	0,92	11			

La tabla 20 denota el análisis de varianza para la variable acidez durante los estados de fermentación del Chaguarmishqui, en este caso se encontró diferencia significativa para el factor A (Especie), factor B (Estado) y la interacción AXB. En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable sólidos solubles (°Brix)

Tabla 21

Resultados del análisis de varianza para la variable sólidos solubles (°Brix) según el estado del Chaguarmisqui.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Especies	11,80	1	11,80	324,30	0,0001
B: Estado	149,11	1	149,11	4097,61	0,0001
C: Repetición	0,01	2	0,01	0,21	0,8193
A*B	0,14	1	0,14	3,87	0,0001
Error	0,22	6	0,04		
Total	161,06	11			

La tabla 21 muestra el análisis de varianza para la variable sólidos solubles durante los estados de fermentación del Chaguarmisqui, en este caso se encontró diferencia significativa para el factor A (Especie), factor B (Estado) y la interacción AXB. En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable recuento de aerobios mesófilos.

Tabla 22

Resultados del análisis de varianza para la variable aerobios mesófilos según el estado del Chaguarmisqui.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Especies	1,2X10 ¹⁵	1	1,2X10 ¹⁵	3811,56	0,0001
B: Estado	1,2X10 ¹⁵	1	1,2X10 ¹⁵	3860,18	0,0001
C: Repetición	6,9X10 ¹¹	2	3,4X10 ¹¹	1,06	0,4031
A*B	1,1X10 ¹⁵	1	1,1X10 ¹⁵	3591.18	0,0001
Error	1,9X10 ¹²	6	3,2X10 ¹²		
Total	3,7X10 ¹⁵	11			

La tabla 22 muestra el análisis de varianza para la variable recuento de aerobios mesófilos durante los estados de fermentación del Chaguarmishqui, en este caso se encontró diferencia significativa para el factor A (Especie), factor B (Estado) y la interacción AXB. En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa.

Análisis de varianza para la variable recuento de mohos y levaduras.

Tabla 23

Resultados del análisis de varianza para la variable aerobios mesófilos según el estado del Chaguarmisqui.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Especies	2,3X10 ¹⁰	1	1,2X10 ¹⁵	27,91	0,0019
B: Estado	3,7X10 ¹²	1	1,2X10 ¹⁵	4548,15	0,0001
C: Repetición	6,8X10 ⁸	2	3,4X10 ¹¹	0,82	0,4842
A*B	1,8X10 ¹²	1	1,1X10 ¹⁵	2232,7	0,0001
Error	8,2X10 ⁸	6	3,2X10 ¹²		
Total	1,1X10 ¹²	11			

La tabla 23 muestra el análisis de varianza para la variable recuento de mohos y levaduras durante los estados de fermentación del Chaguarmishqui, en este caso se encontró diferencia significativa para el factor A (Especie), factor B (Estado) y la interacción AXB. En cuanto a las réplicas no se encontró diferencia significativa.

Prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa entre los factores utilizados para la caracterización fisicoquímica y microbiológica del Chaguarmishqui según el estado de fermentación.

Prueba de Tukey para el factor A en las variables pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

Tabla 24

Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor A en las variables pH, acidez, sólidos solubles aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

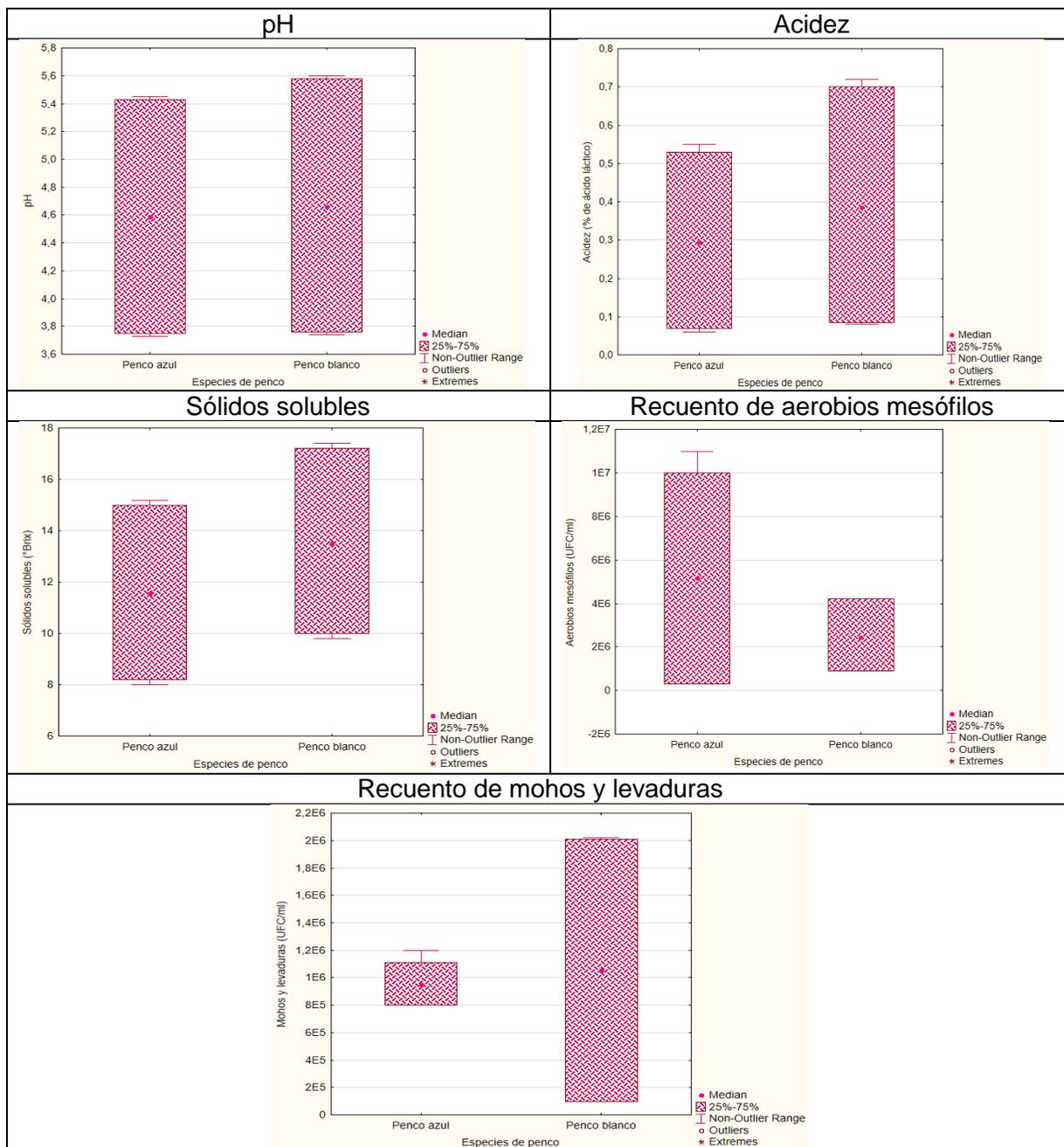
Factor A	pH	Acidez	Sólidos solubles	Aerobios	Mohos/Lev
Penco Azul	4,59 ^A	0,30 ^A	11,58 ^A	6,6X10 ⁵ ^A	9,6X10 ⁵ ^A
Penco Blanco	4,67 ^B	0,39 ^B	13,57 ^B	2,1X10 ⁷ ^B	1,5X10 ⁶ ^B

La tabla 24 presentan las medias obtenidas para el pH, acidez, solidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras del Chaguarmishqui extraído de las diferentes especies de penco. Para el pH, se encontró la formación de 2 grupos independientes; en el grupo A al que pertenece especie de penco azul se mostró un valor menor de 4,59 y en el grupo B de la especie de penco blanco se mostró una media mayor de 4,67. Con respecto a la acidez se encontraron 2 grupos independientes, siendo A el grupo que mostró valores más bajos (0,30) y B el grupo con valores superiores (0,39). Para la variable sólidos solubles también se observó que en el grupo A del penco azul los valores son relativamente bajos (11,58) en comparación del grupo B del penco blanco (13,57). En cuanto a las variables recuento de aerobios mesófilos y recuento de mohos y levaduras los grupos independientes A y B presentaron resultados similares a las demás variables, siendo B, el grupo perteneciente al

penco blanco el que presenta valores altos en cuanto al número de unidades formadoras de colonias. En la figura 10 se presentan los resultados en gráficos de cajas.

Figura 10

Efecto de las variedades del Chaguarmishqui en las variables fisicoquímicas y microbiológicas de estudio.



Prueba de Tukey para el factor B en las variables pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

Tabla 25

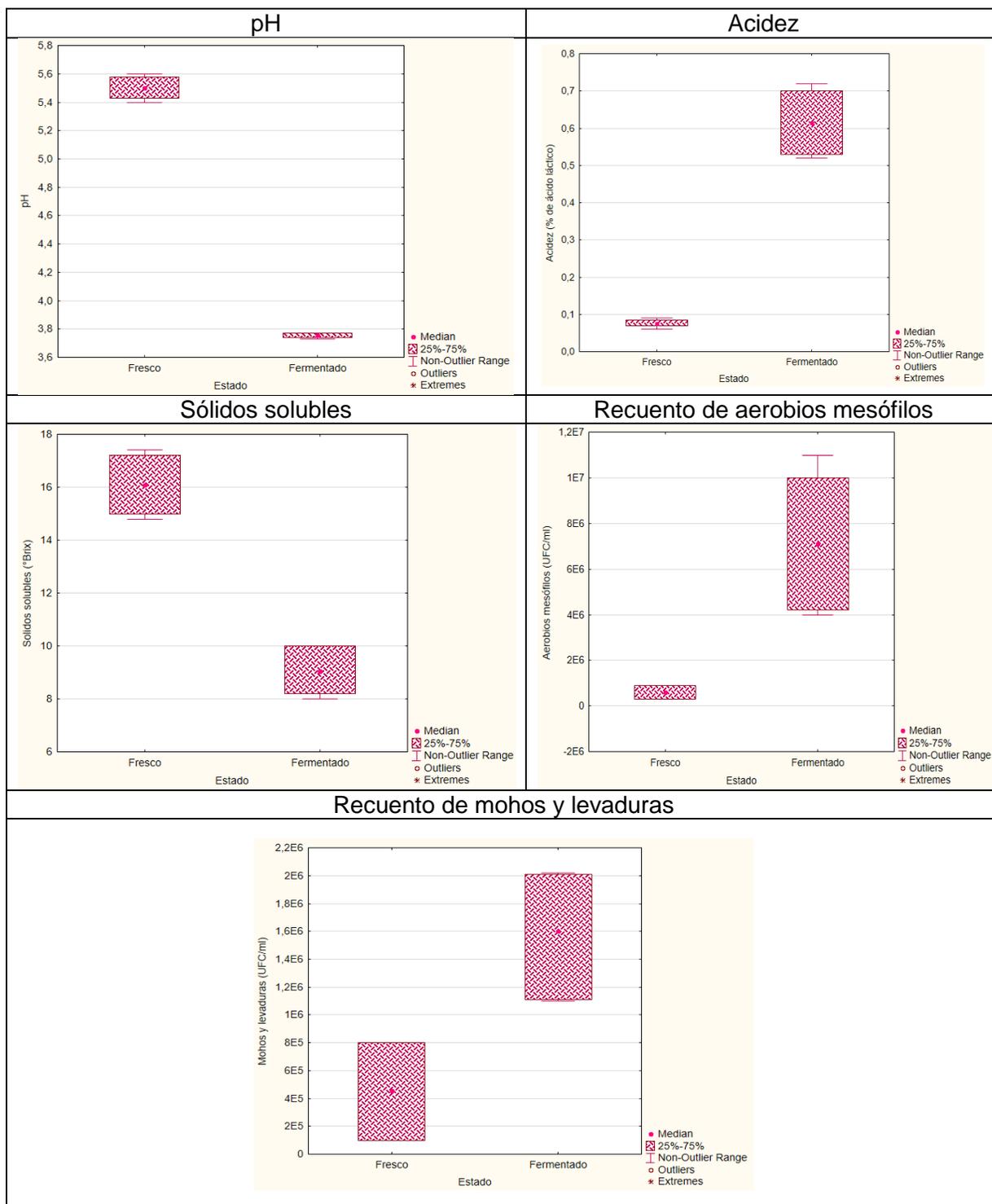
Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor B en las variables pH, acidez, sólidos solubles aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

Factor B	pH	Acidez	Sólidos solubles	Aerobios	Mohos/Lev
Fresco	5,50 ^B	0,08 ^A	16,10 ^A	6X10 ⁵ ^A	4,5X10 ⁵ ^A
Fermentado	3,75 ^A	0,62 ^B	9,05 ^A	2,1X10 ⁷ ^B	1,6X10 ⁶ ^B

La tabla 25 presentan las medias obtenidas para el pH, acidez, sólidos solubles, aerobios, mohos y levaduras y aerobios del Chaguarmishqui fresco y fermentado. En cuanto al pH se observa la formación de dos grupos independientes, el grupo A que corresponde al Chaguarmishqui fresco presenta un valor de 5,50 y el grupo B correspondiente al Chaguarmishqui fermentado un valor de 3,75. Con respecto a la acidez se encontraron 2 grupos independientes, el grupo A (Chaguarmishqui fresco) el grupo que mostró valores más bajos (0,08) y B (Chaguarmishqui fermentado) el grupo con valores superiores (0,62). Para la variable sólidos solubles, al igual que el pH, también se observó que en el grupo A los valores son relativamente altos (16,10) en comparación del grupo B (9,05). En cuanto a las variables recuento de aerobios mesófilos y recuento de mohos y levaduras los grupos independientes A y B, pertenecientes a el chaguarmishqui fresco y fermentado, respectivamente, presentaron resultados similares, siendo B el grupo que presenta valores altos para el número de unidades formadoras de colonias en ambas variables. Estos resultados también se mostraron en la figura 11 mediante un gráfico de cajas.

Figura 11

Efecto del estado del Chaguarmishqui en las variables fisicoquímicas y microbiológicas de estudio



Prueba de Tukey para la interacción entre el factor A y B en las variables pH, acidez y sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

Tabla 26

Resultado de la prueba de significancia de Tukey para la interacción entre A y B en las variables pH, acidez, sólidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

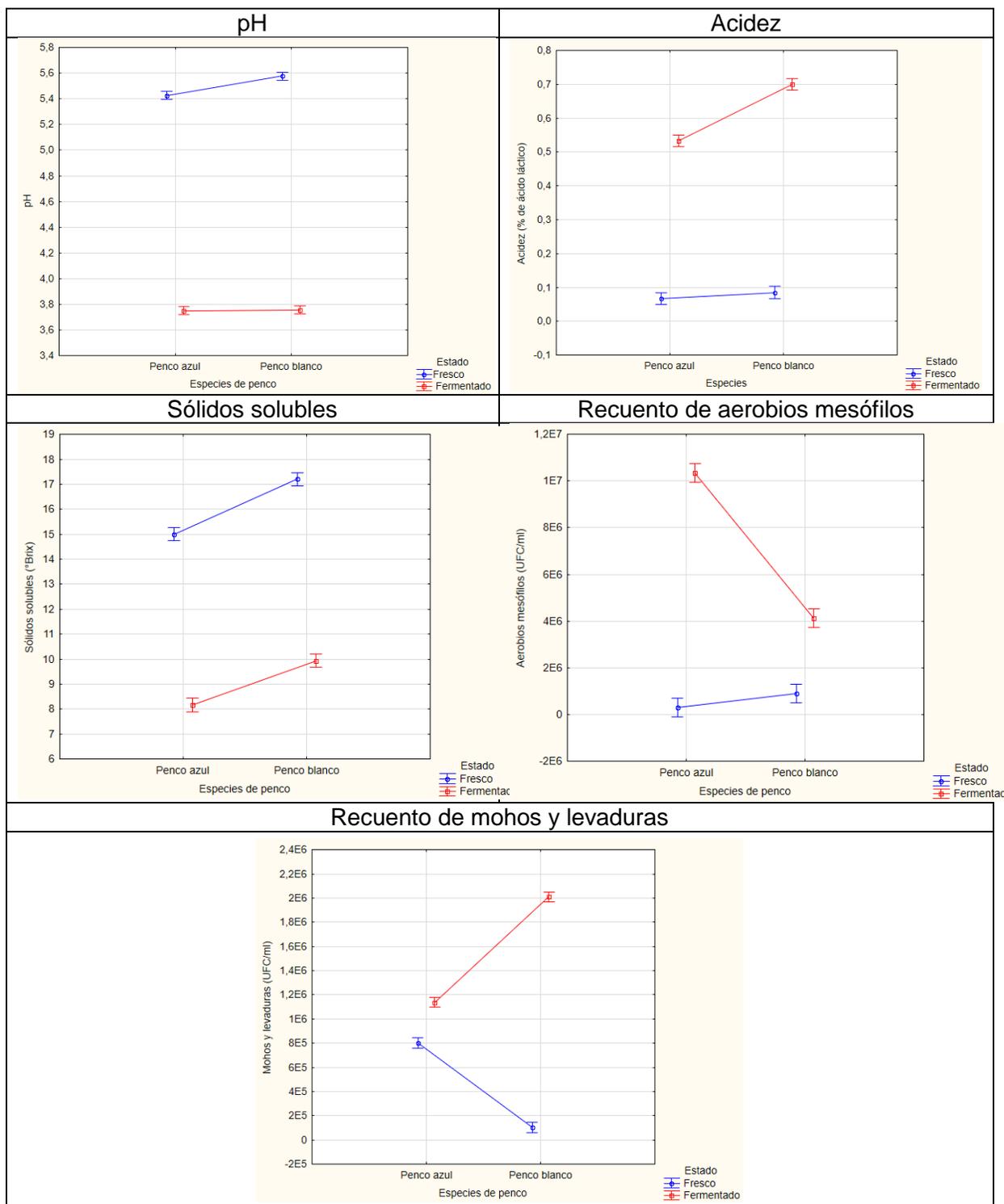
Factor A	Factor B	pH	Acidez	Sólidos solubles	Aerobios	Mohos/Lev
Penco Azul	Fresco	5,43 ^B	0,07 ^A	15,00 ^C	3X10 ⁵ ^A	8X10 ⁵ ^B
Penco Azul	Fermentado	3,75 ^A	0,53 ^B	8,17 ^A	1X10 ⁶ ^C	1,1X10 ⁶ ^C
Penco Blanco	Fresco	5,58 ^C	0,09 ^A	17,20 ^D	9X10 ⁵ ^B	1X10 ⁵ ^A
Penco Blanco	Fermentado	3,76 ^A	0,70 ^C	9,93 ^B	4X10 ⁷ ^D	2X10 ⁶ ^D

La tabla 26 presentan las medias obtenidas para el pH, acidez y solidos solubles, aerobios mesófilos y mohos y levaduras para la interacción AxB, encontrándose la formación de 3 grupos independientes A, B y C en la variable pH. En el grupo A perteneciente a penco azul + chaguarmishqui fermentado y penco blanco + chaguarmishqui fermentado se encontraron valores de 3,75 y 3,76 respectivamente. En el grupo B perteneciente a penco azul + chaguarmishqui fresco se mostró un valor de 5,43 y, finalmente, en el grupo C perteneciente al penco blanco + chaguarmishqui fresco uno de 5,58 mm; siendo este el más alto de las medias obtenidas. Al igual que el pH la acidez también presentó 3 grupos independientes A, B, C; siendo A el perteneciente a las interacciones de penco azul + chaguarmishqui fresco (0,07) y penco blanco + chaguarmishqui fresco (0,09), B el perteneciente de la interacción penco azul + chaguarmishqui fermentado (0,53) y C penco blanco + chaguarmishqui fermentado (0,70). De los 3 grupos este último es el que presentó valores superiores a los demás. Para la variable sólidos solubles se encontraron grupos independientes A, B, C y D. El grupo A perteneciente a

penco azul + chaguarmishqui fermentado se mostró un valor de 8,17; en el grupo B del penco blanco + chaguarmishqui fermentado uno de 9,93; en el grupo C del penco azul + chaguarmishqui fresco uno de 15 y en el grupo D del penco blanco + chaguarmishqui fresco uno de 17,20; siendo este el mayor de todos en cuanto a grados brix. En el caso de recuento de aerobios se mostraron grupos independientes A, B, C y D. En el grupo A perteneciente a penco azul + chaguarmishqui fresco se encontró una media de 3×10^5 UFC/ml, en el grupo B perteneciente a penco blanco+ chaguarmishqui fresco se mostró un valor de 9×10^5 UFC/ml, en el grupo C del penco azul + chaguarmishqui fermentado uno de 1×10^6 UFC/ml y, finalmente, en el grupo D perteneciente al penco blanco + chaguarmishqui fermentado uno de 4×10^7 UFC/ml; siendo este el más alto de las medias obtenidas. Al igual que en el recuento de aerobios mesófilos, el recuento de mohos y levaduras también presentó 4 grupos independientes A, B, C y D; siendo A el perteneciente a las interacciones de penco blanco + chaguarmishqui fresco (1×10^5 UFC/ml), B el perteneciente de la interacción penco azul + chaguarmishqui fresco (8×10^5 UFC/ml), C el perteneciente al penco azul + chaguarmishqui fermentado ($1,1 \times 10^6$ UFC/ml) y D el grupo con mejores resultados, el perteneciente al penco blanco + chaguarmishqui fermentado (2×10^6 UFC/ml). Los resultados antes mencionados se expresan en la figura 12.

Figura 12

Efecto del estado del Chaguarmishqui en las variables fisicoquímicas y microbiológicas de estudio.



Análisis de varianza para la variable evaluada en la determinación de la actividad antimicrobiana del Chaguarmissqui.

Análisis de varianza para el halo de inhibición

Tabla 27

Resultados del análisis de varianza para la variable diámetro del halo de inhibición en la fermentación del Chawarmishqui.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Especie	18,06	1	18,06	122,79	0,0001
B: Patógeno	4,76	2	2,38	16,19	0,0001
C: Tipo de solución	31,17	1	31,17	211,93	0,0001
INTERACCIONES					
AB	1,54	2	0,77	5,24	0,0138
AC	4,34	1	4,34	29,51	0,0001
BC	4,76	2	2,38	16,19	0,0001
ABC	0,60	2	0,30	2,03	0,1552
Réplicas	0,10	2	0,05		0,7221
Error	3,24	22	0,15		
Total	68,58				

La tabla 27 detalla el análisis de varianza para el halo de inhibición producido por las BAL aisladas de las distintas especies de penco frente a diferentes microorganismos patógenos, lo cual nos indica la capacidad antimicrobiana que poseen. Esta prueba estadística mostró diferencia significativa para el factor A (Especie), el factor B (Patógeno), factor C (Tipo

de solución), interacción AB, interacción AC, interacción BC. Y así mismo indicó que no existe diferencia significativa para la interacción ABC y réplicas.

Prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa entre los factores utilizados para la de la actividad antimicrobiana.

Prueba de Tukey para el factor A

Tabla 28

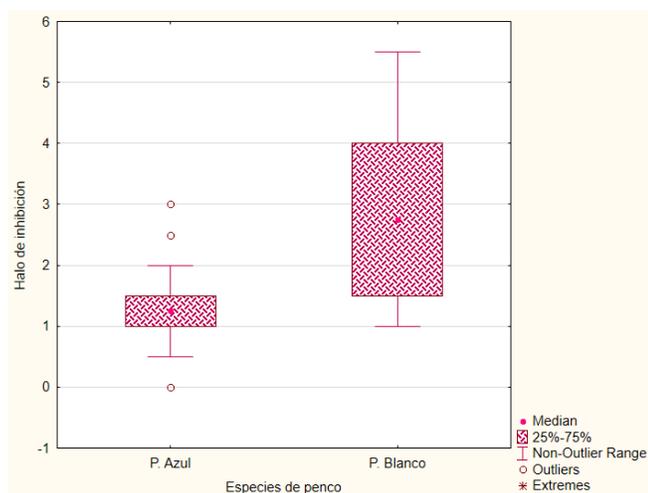
Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor A en la variable diámetro del halo de inhibición.

Especie	Inhibición
Penco Azul	1,36 ^A
Penco Blanco	2,78 ^B

La tabla 28 presentan las medias obtenidas del diámetro de inhibición con cada especie de penca, encontrándose la formación de 2 grupos independientes A y B. En el grupo A de la especie de penca azul se mostró un valor de 1,36 mm de diámetro, mientras que en el grupo B de la especie de penca blanco se mostró una media más alta de 2,78 mm de diámetro.

Figura 13

Análisis del efecto de las especies de penco en la formación del halo de inhibición.



La figura 13 muestra la diferencia significativa entre las medias obtenidas de actividad antimicrobiana que presentan los microorganismos de las especies de penco. Se observa que la variedad de penco blanco presentó resultados de inhibición mucho mayores.

Prueba de Tukey para el factor B

Tabla 29

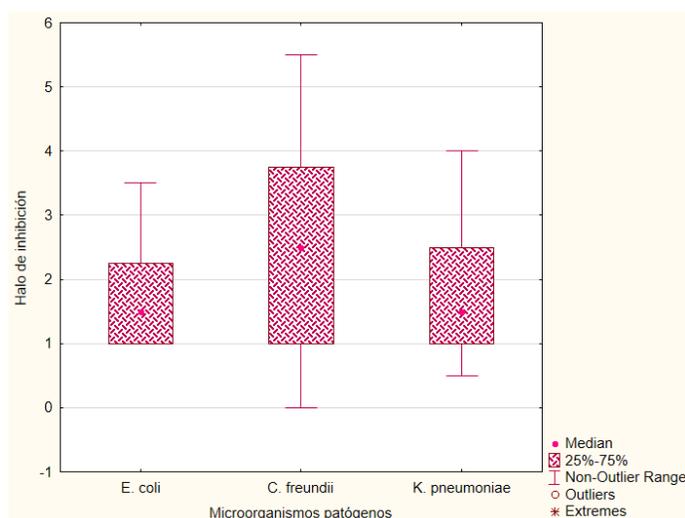
Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor B en la variable diámetro del halo de inhibición.

M. Patógeno	Inhibición
<i>E. coli</i>	1,79 ^A
<i>K. pneumoniae</i>	1,83 ^A
<i>C. freundii</i>	2,58 ^B

La tabla 29 presentan las medias obtenidas del diámetro de inhibición con respecto a cada microorganismo patógeno (Factor B), encontrándose la formación de 2 grupos independientes A y B. En el grupo A donde se encuentra *E. coli* y *K. pneumoniae* se mostraron valores de 1,79 y 1,83 mm de diámetro, respectivamente; mientras que en el grupo B donde se encontró *C. freundii* se mostró una media 2,58 mm de diámetro.

Figura 14

Análisis del efecto de los tipos de microorganismos patógenos en la formación del halo de inhibición.



La figura 14 muestra la diferencia significativa entre las medias obtenidas de actividad antimicrobiana que se presenta ante los microorganismos patógenos evaluados. Se observa que *C. freundii* es la bacteria que presentó mayor sensibilidad.

Prueba de Tukey para el factor C

Tabla 30

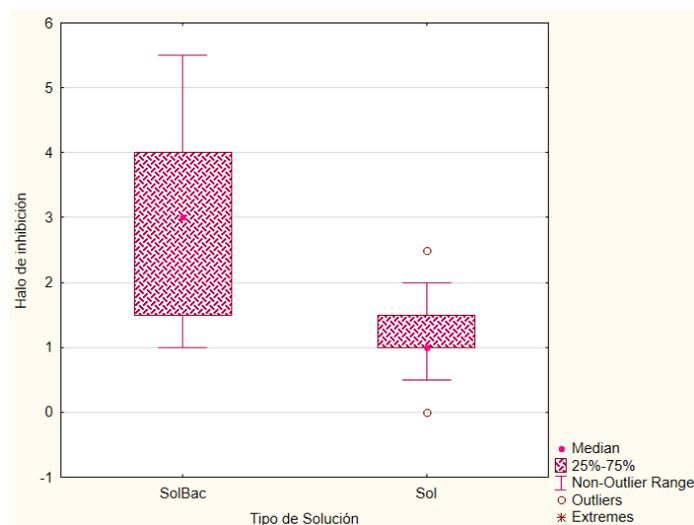
Resultados de la prueba de significancia de Tukey para factor C en la variable diámetro del halo de inhibición.

Tipo de solución	Inhibición
Sol	1,14 ^A
SolBac	3,00 ^B

La tabla 30 presentan las medias obtenidas del diámetro de inhibición con cada tipo de solución aplicada (factor C), encontrándose la formación de 2 grupos independientes A y B. En el grupo A donde se ubica la solución libre de bacteria se mostró un valor de 1,14 mm de diámetro, mientras que en el grupo B donde se ubica la solución más bacterias se mostró una media de 3 mm de diámetro.

Figura 15

Análisis del efecto de los tipos de soluciones preparadas en la formación del halo de inhibición.



La figura 15 muestra la diferencia significativa entre las medias obtenidas de actividad antimicrobiana que se presenta con las diferentes soluciones aplicadas. Se determina a la SolBac como la solución con mejores resultados de inhibición.

Prueba de Tukey para la interacción entre el factor A y B.

Tabla 31

Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción AXB en la variable diámetro del halo de inhibición.

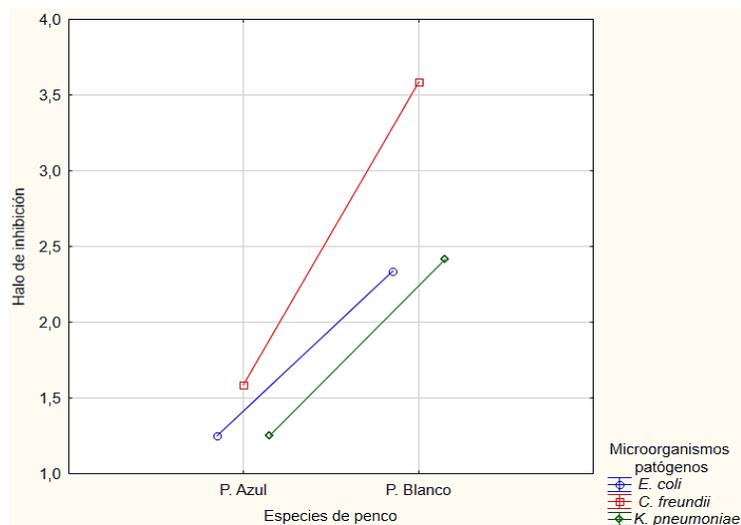
Especie	M. Patógeno	Inhibición
Penco azul	<i>K. pneumoniae</i>	1,25 ^A
Penco azul	<i>E. coli</i>	1,25 ^A
Penco azul	<i>C. freundii</i>	1,58 ^A
Penco blanco	<i>E. coli</i>	2,33 ^B
Penco blanco	<i>K. pneumoniae</i>	2,42 ^B
Penco blanco	<i>C. freundii</i>	3,58 ^C

La tabla 31 presentan las diferencias entre las medias obtenidas del diámetro de inhibición con respecto a las especies de penco (Factor A) y los microorganismos patógenos (Factor B), encontrándose la formación de 3 grupos A, B y C. En el grupo A perteneciente al enfrentamiento de penco azul contra *K. pneumoniae*, penco azul contra *E. coli* y penco azul contra *C. freundii* se mostraron medias de 1,25 mm; 1,25 mm y 1,58 mm, respectivamente. En el grupo B perteneciente al enfrentamiento de penco blanco contra *E. coli* y penco blanco contra *K. pneumoniae* se mostraron valores de 2,33 mm y 2,2 mm, respectivamente y,

finalmente, en el grupo C perteneciente al penco blanco + *C. freundii* se mostró un valor de 3,58 mm; siendo este el más alto de las medias obtenidas.

Figura 16

Análisis del efecto de la interacción entre los factores A*B en la formación del halo de inhibición.



La figura 16 muestra diferencia significativa entre las medias obtenidas de actividad antimicrobiana que presentan los microorganismos de las especies de penco ante los microorganismos patógenos evaluados. Se observa que existió mayor inhibición en el enfrentamiento de la bacteria de penco blanco con *C. freundii*.

Prueba de Tukey para la interacción entre el factor A y C.

Tabla 32

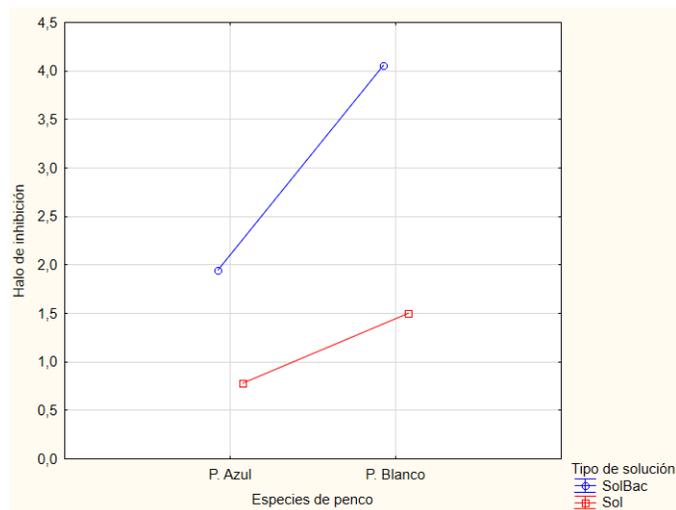
Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción AXC en la variable halo de inhibición.

Especie	Tipo de solución	Inhibición
Penco azul	Sol	0,78 ^A
Penco blanco	Sol	1,50 ^B
Penco azul	SolBac	1,94 ^B
Penco blanco	SolBac	4,06 ^C

La tabla 32 se presenta la diferencia entre las medias obtenidas del diámetro de inhibición con respecto a las interacciones de las especies de penco y los tipos de solución, encontrándose la diferenciación de tres grupos independientes. En el grupo A la preparación de la solución de metabolitos utilizando el penco azul permitió un halo de 0,78 mm, en el grupo B la preparación de la solución de metabolitos con el penco blancos y la preparación de solución + bacteria a partir del penco azul, permitieron un halo de inhición de 1,50 y 1,94 mm respectivamente y en el grupo C la solución + bacteria obtenida del penco blanco dio los mejores resultados en cuanto a la inhibición dilucidando un halo de 4,06 mm.

Figura 17

*Análisis del efecto de la interacción entre los factores A*C en la formación del halo de inhibición.*



La figura 17 muestra la diferencia significativa entre las medias obtenidas de actividad antimicrobiana que presentan los microorganismos de las especies de penic con las diferentes soluciones preparadas. Se observa que existió mayor inhibición en la combinación de penic blanco con SolBac.

Prueba de Tukey para la interacción entre el factor B y C.

Tabla 33

Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción BXC en la variable determinación del halo de inhibición.

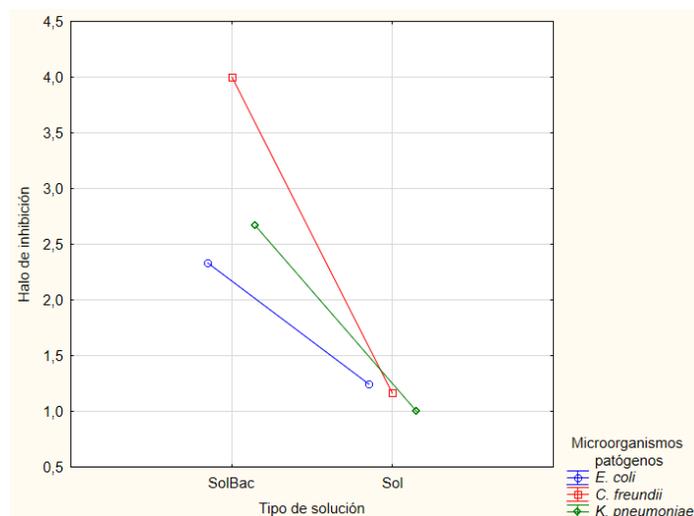
M. Patógeno	Tipo de solución	Inhibición
<i>K. pneumoniae</i>	Sol	1,00 ^A
<i>C. freundii</i>	Sol	1,17 ^A
<i>E. coli</i>	Sol	1,25 ^A

<i>E. coli</i>	SolBac	2,33 ^B
<i>K. pneumoniae</i>	SolBac	2,67 ^B
<i>C. freundii</i>	SolBac	4,00 ^C

La tabla 33 muestra la diferencia entre las medias del diámetro de inhibición obtenidas de la interacción con respecto al microorganismo patógeno y los tipos de solución y se muestra la diferenciación de tres grupos independientes. En el grupo A se encuentra el enfrentamiento entre la solución de metabolitos frente a *K. pneumoniae*, la solución de metabolitos frente a *C. freundii* y la solución de metabolitos frente a *E. coli*, interacciones que reflejaron el menor halo de inhibición con 1,00, 1, 17 y 1,25 mm, respectivamente. En el grupo B se halla el enfrentamiento de la solución + bacteria frente a *E. coli* y el enfrentamiento de la solución + bacteria frente a *K. pneumoniae*, los cuales presentaron halos de 2,33 y 2,67 mm, respectivamente. En el grupo C se ubica el enfrentamiento que permitió la mayor inhibición que es el de la solución + bacteria frente a *C. freundii* con un halo de 4,00 mm.

Figura 18

Análisis del efecto de la interacción entre los factores B*C en la formación del halo de inhibición

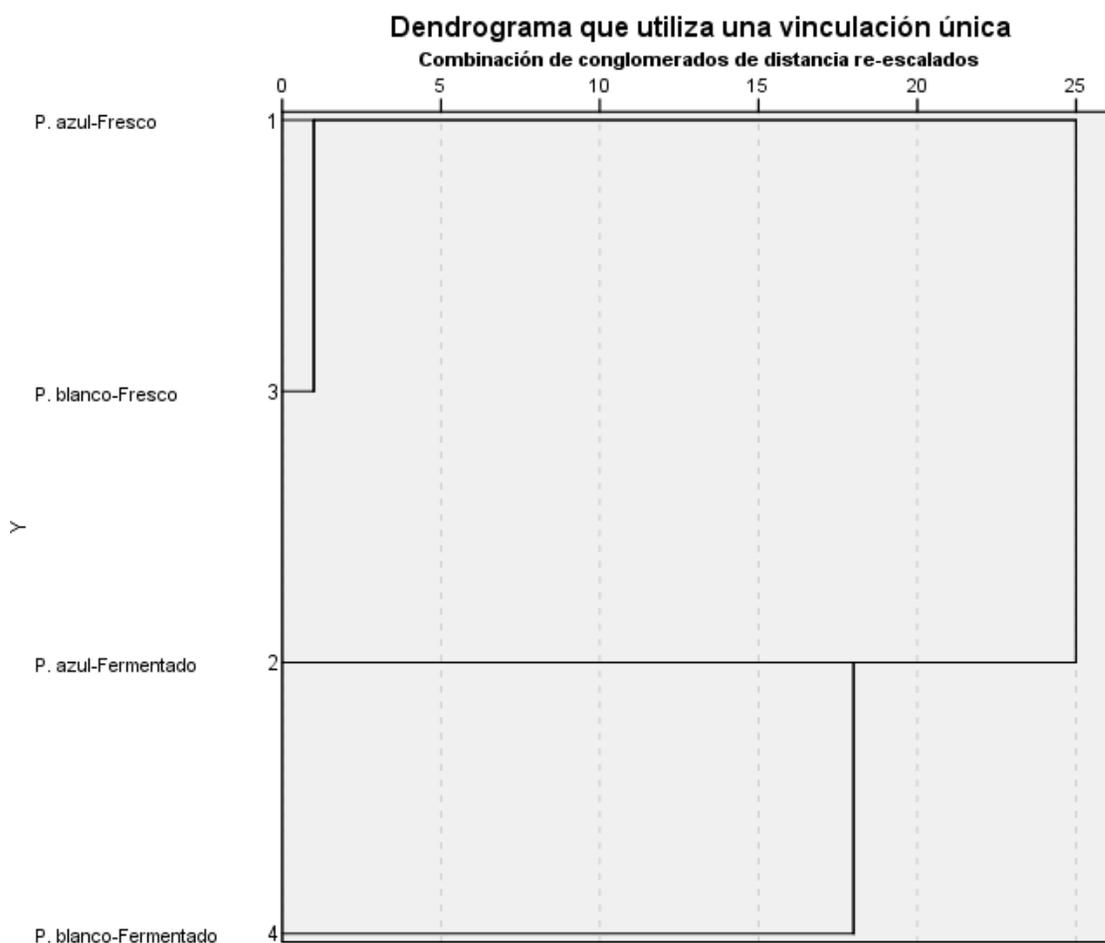


La figura 18 muestra la diferencia significativa entre las medias obtenidas de actividad antimicrobiana que se presentan con los dos tipos de soluciones ante los microorganismos patógenos evaluados. Se observa que existió mayor inhibición en el tratamiento que se realiza con SolBac y *C. freundii*.

Análisis de conglomerados para la caracterización fisicoquímica y microbiológica.

Figura 19

Dendrograma para relacionar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos evaluados.



La figura 19 representa un dendograma para grupos vecinos más cercanos en base a los tratamientos de estudios con las variables fisicoquímicas y microbiológicas (pH, acidez, sólidos solubles, recuento de aerobios y recuento de mohos y levaduras), donde se observó la formación de 2 grupos en base a las especies de penco y el estado de fermentación del chaguarmishqui. En el grupo 1 se encuentra una estrecha similitud entre el penco azul y el blanco, ambos en estado fresco. Por otra parte, en el grupo 2, se presenció que penco blanco y azul en estado fermentado son los que menos relación demostraron.

Análisis de componentes principales

Tabla 34

Matriz de correlación de los componentes principales del Chaguarmishqui

		pH	Acidez	Sólidos solubles	Aerobios	Mohos y levaduras
Correlación	pH	1,000	-,971	,974	-,580	-,825
	Acidez	-,971	1,000	-,896	,749	,880
	Sólidos solubles	,974	-,896	1,000	-,423	-,774
	Aerobios	-,580	,749	-,423	1,000	,846
	Mohos y levaduras	-,825	,880	-,774	,846	1,000

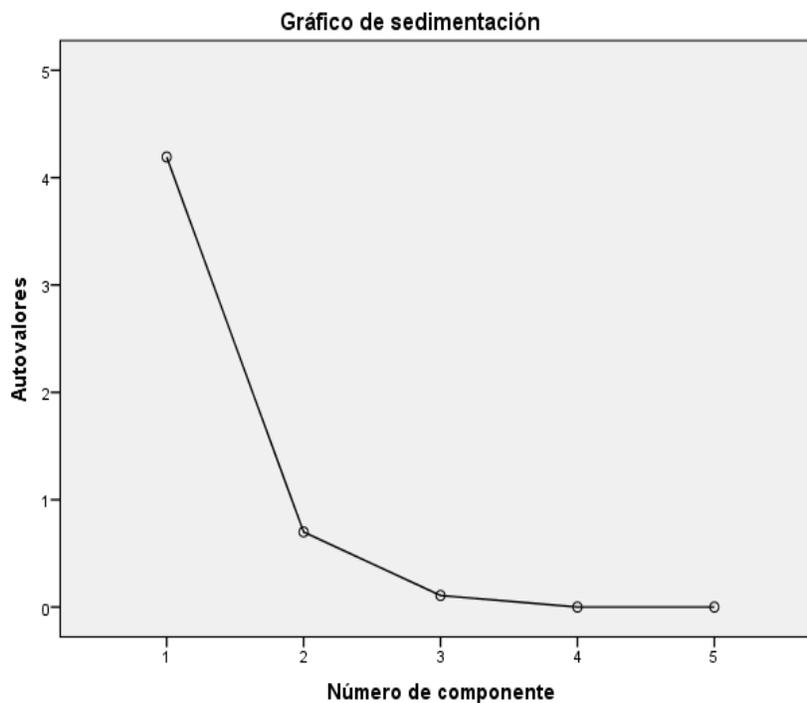
La tabla 34 muestra una alta correlación entre sólidos solubles y pH y entre la acidez y el conteo de aerobios y mohos y levaduras. Por otra parte, se puede notar una baja correlación entre pH, acidez, aerobios y mohos y levaduras y de igual manera entre acidez, pH y sólidos solubles.

Tabla 35*Matriz de componentes*

	Componentes	
	1	2
pH	-,959	,271
Acidez	,986	-,046
Sólidos solubles	-,901	,429
Aerobios	,775	,627
Mohos y levaduras	,943	,218

Tabla 36*Porcentaje de varianza total explicada*

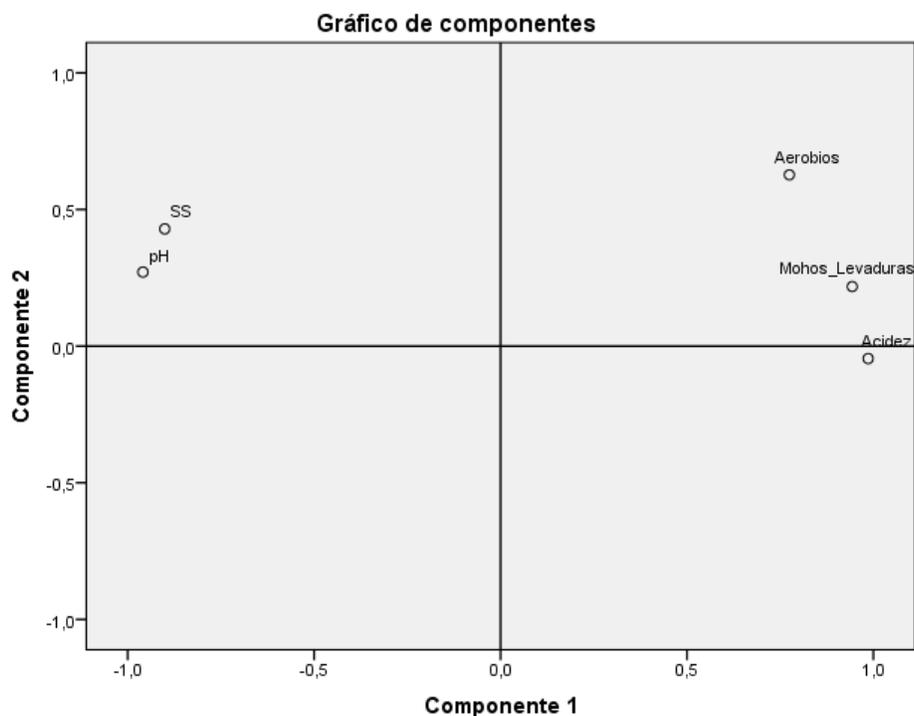
Componente	Componentes					
	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	4,192	83,850	83,850	4,192	83,850	83,850
2	,700	13,993	97,843	,700	13,993	97,843
3	,108	2,157	100,000			
4	1,002E-013	1,045E-013	100,000			
5	1,000E-013	1,003E-013	100,000			

Figura 20*Gráfico de sedimentación*

La figura 20 detalla el análisis de los 5 componentes evaluados durante la fermentación del Chaguarmishqui, de los cuales 2 presentan porcentajes de varianza elevados que son pH (83,85%) y acidez (13,99%), es decir, estos parámetros por si solos podrían explicar los fenómenos durante la fermentación, sin requerir de las demás variables.

Figura 21

Grafica de componentes principales



La figura 21 muestra gráficamente la correlación de los componentes analizados durante la fermentación de la bebida, donde se puede notar que existe una correlación bastante alta entre aerobios, mohos y levaduras y acidez y entre el pH y los sólidos solubles.

El pH y sólidos solubles están correlacionados, ya que, ambos parámetros presentan los valores más altos cuando el sustrato está fresco y estos valores se incrementan con el transcurso de los días de fermentación.

Por su parte la población microbiana se correlaciona con la acidez ya que durante el proceso fermentativo el incremento de esta provocaría una disminución de levaduras y bacterias aerobias, sin embargo, en este último caso, la correlación es un poco menor, debido a que las BAL son resistentes a esta variación.

Capítulo V

Discusión

Identificación de bacterias ácido lácticas

Durante mucho tiempo las BAL han sido aisladas a partir de alimentos; estén estos fermentados o no. En el presente estudio se aislaron 3 cepas de la especie de penco azul y 2 de la especie de penco blanco mismas que, morfológicamente se evidenciaron como cepas cremosas de color blanquecino (tabla 16), catalasa negativa, cocos y bacilos (tabla 17), características que según Mokoena et al. (2021) son específicas de bacterias lácticas. Sin embargo, solo las predominantes en cada especie fueron identificadas.

Según lo descrito por Parra (2010) las BAL son cocos o bacilos Gram-positivos, no formadores de esporas y anaerobios facultativos con carencia de catalasa, que tienen diferentes longitudes y un grosor de entre 0,5 y 0,8 μm . Para Cuvas-Limón et al. (2019) la prueba de catalasa en BAL siempre resulta ser negativa, puesto que al ser bacterias anaeróbicas y carecer de citocromo para realizar la fosforilación oxidativa no descomponen el peróxido de hidrógeno.

Como mencionan Djaduuni & Kihal (2012) las BAL están constituidas por un grupo de géneros que presentan características similares, estos son los *Lactococcus*, *Leuconotoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Weisella* y otros que se describen en estudios como el de Mokoena et al. (2021). En nuestro estudio las cepas aisladas se caracterizaron tras la secuenciación utilizando la región 16s de las mismas, encontrándose dos bacterias de los géneros *Lactobacillus* (*L. plantarum*) y *Weisella* (*W. confusa*) a partir del fermentado de las dos especies de penco, azul y blanco, estos microorganismos también fueron caracterizados por Escalante-Adelfo et al. (2016), quienes determinaron la diversidad bacteriana del chaguarmisqui fermentado por medio del análisis de

ADNr 16S. Por otra parte, debido a que no se encontró información que mostrará un análisis microbiológico del penco blanco, es factible afirmar que nuestra investigación es pionera en evidenciar la presencia *W. confusa* en esta especie.

Respecto a la caracterización fisicoquímica y microbiológica

Especies de penco (Factor A)

La diferencia en cuanto a pH, acidez, sólidos solubles, aerobios y mohos y levaduras del chaguarmishqui extraído de ambas especies de penco fue mínima pero significativa. El pH del extracto del penco azul fue de 4,59 y del penco blanco de 4,67, demostrándose que el primero presenta una mayor acidez. En cuanto a la acidez, el extracto del penco blanco presentó el mayor porcentaje con 0,39 a diferencia del penco azul que fue de 0,30. Finalmente, evaluando los grados Brix se determinó que el extracto del penco blanco presenta valores más elevados (13,57) en contraste con los del penco azul (11,58); moradores de los sitios de recolección de la pulpa, aseguran que, generalmente la producción del penco blanco es más dulce, lo que concuerda con nuestro estudio, sin embargo, no existe evidencia científica que compruebe esto.

La diferencia de los parámetros fisicoquímicos entre ambas especies puede deberse a que durante la recolección se pudo notar una mayor madurez del penco blanco, y esto concuerda con el estudio de Villacís-Tello et al (2021) quien menciona que a mayor madurez de la planta mayor pH y grados Brix. Este autor además atribuye la diferencia entre estos a la forma del raspado y la hora de recolección del mosto.

Basándonos en la Norma técnica Ecuatoriana INEN 2304 (2017) consideramos que ambas especies son capaces de producir una bebida con las características necesarias para ser consumida y comercializada como refresco, ya que, según lo establecido, es adecuado un valor

de grados brix de entre 0-15, un pH de entre 2-4,5 y una acidez (% de ácido láctico) mayor o igual a 0,1 y el chaguarmishqui de ambas especies cumple con los rangos señalados.

En general, la población microbiana de los extractos de ambas especies de penco fue elevado, esto debido a que la recolección se realiza al aire libre y a que el hueco donde se almacena se encuentra a la intemperie de abejas u otros insectos presentes en el entorno donde se produce (Jurado & Sarzosa, 2009). Por otra parte, la población de mohos y levaduras y bacterias aerobias fue mayor en el chaguarmishqui extraído del penco blanco que del azul, esto según Changoluisa (2020) se debe a que existe un mayor crecimiento microbiológico en medios que proporcionan más azúcar, lo que ocurre con el penco blanco.

Estado del Chaguarmishqui (Factor B)

Conforme a los resultados obtenidos del análisis se pudo considerar que el mucilago de ambas especies de penco presentó una disminución significativa de pH y °Brix, y un aumento de acidez al momento de ser fermentados; Herrera (2008) lo relaciona con el aumento de microorganismos. Este autor afirma que todos los cambios fisicoquímicos y que se dan en la bebida se producen por el consumo de los diversos grupos microbianos que se encuentran en ella.

De los resultados obtenidos en la tabla 25, se puede observar que la media de las especies en su estado fresco tiene un valor de pH 5,5, lo que concuerda con lo mencionado por Porras (2011) quien obtuvo un pH de 5,7 en el análisis de la bebida de chaguarmishqui para el desarrollo de derivados mixiológicos. Estos valores indican que el mucilago de chaguarmishqui se encontró en un nivel ligeramente ácido, debido a que su valor no es muy bajo y se aproxima a 6. Sin embargo, al momento de fermentar la bebida, este valor disminuyó a 3,75 con. Basándonos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2304 (2017) se considera que es un valor aceptable, puesto que la misma menciona que las bebidas refrescantes no deben exceder un nivel de pH de 4,5.

Con respecto a los sólidos solubles (sistema de medición representado por los grados brix que determinan el porcentaje en peso de la sacarosa en solución de agua a 20°C) en la tabla 25 se observa que en estado fresco el chaguarmishqui tuvo un promedio de °Brix de 16,10. Changoluisa (2020) en su estudio para la estabilización de una bebida refrescante a partir del Chaguarmishqui de penco azul también obtuvo valores similares a los nuestros, demostrando que en el primer día los grados brix de los diferentes tratamientos oscilaron entre 15,6 a 17,7.

Al evaluar los sólidos solubles de la bebida en estado fermentado se aprecia que conforme avanzaron los días estos tienden a decaer. En nuestro estudio se obtuvo un valor final (3 días de fermentación) de 9,05; valor que, según Cruz (2015) se determinan como parámetro de degradación. Robles et al. (2016) explican que la reducción de sólidos solubles se debe a la transformación de los azúcares a etanol y CO₂, haciendo que durante los primeros 5 días el consumo de glucosa por parte de los microorganismos se incremente y por tanto la velocidad de la reacción sea mayor.

De los resultados obtenidos para la acidez (% de ácido láctico) en la tabla 25 se determinaron valores relativamente bajos de 0,08, lo que concuerda con Herrera (2008) quien realizó un análisis de la composición química del Chaguarmishqui y estableció un valor de acidez de aproximadamente 0,068 en estado fresco; además, determinó que para el pulque (Chaguarmishqui fermentado) el valor mínimo debe ser de 0,40 y el máximo de 0,75, lo cual de igual manera se relaciona con nuestros resultados ya que el valor promedio de la bebida fermentada fue de 0,62, este incremento de ácido láctico durante la fermentación es producido por el metabolismo de azúcares por parte de bacterias ácido-lácticas (Herrera, 2008). Cabe mencionar que en el Ecuador el porcentaje relativamente alto que se obtiene tras el proceso fermentativo es el que ha permitido el aprovechamiento de los diferentes subproductos de la

planta, puesto que lo hace factible para los procesos de conservación, donde lo que se quiere es lograr el mantenimiento del producto como tal (Enríquez, 2021).

El análisis microbiológico se basó en el recuento de aerobios mesófilos y mohos y levaduras, utilizando petrifilm para la determinación de UFC/ml, según Soque (2019) el petrifilm es ampliamente utilizados en análisis de alimentos ya que permite una determinación rápida y confiable de los microorganismos presentes en estos. En nuestro análisis los resultados mostraron una elevada carga microbiana en el Chaguarmishqui, esto según Jurado & Sarzosa (2009) ocurre debido a que su recolección se realiza al aire libre y a que el hueco donde se almacena se encuentra a la intemperie de abejas u otros insectos presentes en el entorno donde se produce.

El conteo de microorganismos aerobios mesófilos se realiza para identificar el número total de bacterias presentes en el Chaguarmishqui incluyendo las BAL y sin diferenciar los tipos de patógenos. El conteo de estos microorganismos se realiza para tener una idea del incremento en cuanto a las BAL durante la fermentación. En nuestro trabajo se obtuvo valor 6×10^5 UFC/ml en el Chaguarmishqui fresco extraído de las diferentes especies de penco, estos valores son similares a los obtenidos por Jurado & Sarzosa, (2009) quienes en su análisis microbiológico del Chaguarmishqui encontraron una cantidad de 10×10^5 UFC/ml, y con la de Trávez (2014) quien incluso determinó valores más elevados de $4,5 \times 10^7$ ufc/ml. En la etapa fermentativa se mostró un valor de $2,1 \times 10^7$ UFC/ml, este valor incrementó debido a que las bacterias llegan a una etapa de crecimiento exponencial, la cual denota altos valores de UFC. En este punto la bebida les ofrece un medio rico en azúcares y con un pH ácido que sigue siendo óptimo para su desarrollo (Ramírez et al., 2011).

En cuanto a mohos y levaduras, en la etapa inicial de fermentación fue de $4,5 \times 10^5$. Estos valores concuerdan con los obtenidos por Changoluisa (2020) quien encontró 17×10^4 UFC/ml en el chaguarmishqui fresco y a los de Trávez (2014) quien mostró valores de $6,6 \times 10^5$

UFC/ml esto solo en cuanto a levaduras, este último autor también evaluó la cantidad de mohos que fue menor a 10 UFC/ml, por lo tanto, el valor elevado en el conteo de estos microorganismos en nuestro estudio puede atribuirse a la presencia de levaduras, lo cual es evidente para Lema (2015) quien afirma que son las principales encargadas de la fermentación de la bebida. Por su parte durante fase exponencial de fermentación que en este caso fue a los 3 días, se encontró una cantidad de $1,6 \times 10^6$ UFC/ml, un valor similar fue reportado por Trávez (2014), quien también analizó la biodiversidad microbiana del chaguarmishqui fermentado y afirma que a pesar de que la cantidad de levaduras se incrementan durante la etapa fermentativa, ya que, la bebida en estos momentos provee un medio adecuado para el desarrollo exponencial de las mismas y aún no incrementa considerablemente su concentración de alcohol y compuestos orgánicos.

Especies de penco * Estado del Chaguarmisqui (Interacción AxB)

Los resultados en cuanto a esta interacción demostraron que la variación de la características fisicoquímicas y microbiológicas depende no solo de la especie de penco, sino también del estado de fermentación que el chaguarmishqui presente. Según Escalante et al. (2016), la fermentación del chaguarmisqui es una fermentación doble, una láctica y otra alcohólica, ya que, la bebida proporciona un medio adecuado para el crecimiento tanto de bacterias ácido lácticas como de levaduras y esto debido principalmente a sus óptimas características fisicoquímicas en cuanto al pH, acidez y sólidos solubles.

Leal et al. (2014) mencionan que el pH es la característica más importante para que ocurra la fermentación, en su estudio determinaron que el pH óptimo para que se lleve a cabo es de entre 3 y 5, en nuestro estudio el pH del extracto del penco azul y blanco fue de 5, 43 y 5, 58, respectivamente, estos valores a pesar de que fueron un poco elevados, permitieron resultados adecuados en cuanto a fermentación, ya que al tercer día el pH se redujo

significativamente, dilucidando valores de 3,75 para el penco azul y 3,76 para el penco blanco, lo que indica un metabolismo satisfactorio por parte de los microorganismos presentes.

En cuanto a la cantidad de grados Brix se determinó un valor elevado para ambas especies de penco, esto debido a que se encontraban en un óptimo estado de maduración y a que la recolección se hizo un día después del raspado, lo que asegura que el Chaguarmishqui era fresco; a pesar de esto se mostró un valor más elevado de Brix en el penco blanco debido a que se notaba en este un mayor estado de maduración. Al continuar con la fermentación de la bebida hubo una notable disminución de los grados Brix llegando a ser de 8,17 para el extracto del penco azul y de 9,93 para el extracto del penco blanco, en este caso la reducción es una característica del proceso fermentativo, ya que, los microorganismos degradan los azúcares en alcohol o ácidos orgánicos (Zúñiga et al., 2020).

Con respecto a la acidez, que fue inversamente proporcional a los valores de pH y sólidos solubles, se encontró que el Chaguarmishqui fresco presentó porcentajes bajos de entre 0,07-0,09%, para ambas especies, lo cual para Herrera (2008) es lo adecuado en este extracto. Estos valores aumentaron a los 3 días de fermentación, lo cual ocurre debido a que durante la fermentación los azúcares son transformados en ácido láctico por las BAL, lo que corrobora la presencia de las mismas en la bebida (Hernández, 2009).

Debido a que la recolección del extracto del penco es al aire libre y de forma artesanal, la población de microorganismos en el chaguarmishqui fresco de ambas especies fue elevada (Jurado & Sarzosa, 2009), sin embargo, hubo un crecimiento significativo de estos tras el transcurso de los días de fermentación, llegando a exhibir valores de aproximadamente $1,1 \times 10^6$ UFC/ml de mohos y levaduras y aerobios en el extracto del penco azul y valores de 4×10^7 y 2×10^6 UFC/ml de aerobios y mohos y levaduras en el extracto del penco blanco, respectivamente. Esto se debe a que durante la etapa exponencial de la fermentación existe un incremento de los microorganismos con capacidad fermentativa (Trávez, 2014), en nuestro

caso de levaduras y bacterias ácido-lácticas, que son fermentadores naturales del chaguarmishqui (Hernández, 2009).

Respecto a la actividad antimicrobiana

Especies de penco (Factor A)

Al haberse encontrado diferencia significativa con respecto a este factor se indica que la bacteria predominante en la especie de penco azul (*Lactobacillus plantarum*) demostró una inhibición menor (1,36) a la de la bacteria predominante en la especie de penco blanco (*Weissella confusa*) (2,78), evidenciando la capacidad antimicrobiana del Chaguarmishqui frente a diferentes patógenos. Estos datos coinciden con los de Jay (2002), quien menciona que en esta bebida se pueden encontrar microorganismos homofermentativos del género *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, y heterofermentativos del género *Weissella* y *Lactobacillus*. A pesar de ello, no existe evidencia alguna de los géneros aislados de la especie de penco blanco debido a que hay poca información sobre la caracterización microbiológica y molecular de la especie.

Durante la primera etapa de la fermentación del Chaguarmishqui es donde más producción de microorganismos se evidencian, según Sánchez-Marroquín et al. (1967) en esta etapa los *Leuconostoc mesenteroides* realizan la síntesis de dextranas, que son polisacáridos generados como producto de desechos, favoreciendo a la viscosidad del chaguarmishqui, incrementando su acidez y produciendo el CO₂ que permite la anaerobiosis de *Lactobacillus plantarum*. Otros autores como Herrera (2008) han evidenciado géneros de bacterias como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sp.* y *Leuconostoc citreum*.

Microorganismos patógenos (Factor B)

C. freundii, *E. coli* y *K. pneumoniae* son bacterias patógenas Gram negativas, causantes de enfermedades cuyo contagio comúnmente ocurre por medio de los alimentos. La prueba de susceptibilidad realizada a estas bacterias patógenas indicó mayor inhibición en el caso de *C. freundii* y un menor efecto en caso de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Se ha reportado una gran cantidad de estudios que muestran la capacidad que tienen las BAL para inhibir el crecimiento de patógenos Gram negativos. Serna & Enríquez 2013 demostraron el efecto antimicrobiano contra *E. coli*, *C. perfringens* y *S. aureus*, mientras que Bartkiene et al. (2020) evaluaron la inhibición de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. fecalis* y *C. freundii* obteniendo resultados favorables.

Tipo de solución (Factor C)

En cuanto a los tipos de solución se pudo establecer que se mostraron resultados significativos en el tratamiento que contenía la SolBac, dado que al estar en conjunto estas tienen mayor capacidad para producir sus metabolitos. En un estudio realizado por Serna & Rubiano (2012) se reportaron resultados similares al enfrentar ácido láctico con bacterias patógenas como *E. coli*, obteniéndose hasta un aproximado de 3 mm de diámetros de inhibición. Por su parte Serna & Enríquez (2013) también encontró mayores diámetros de inhibición en los tratamientos correspondiente a la SolBac, siendo estos superiores a 2 mm de diámetros.

Al igual que el trabajo realizado por Allende et al. (2007) los tratamientos que contenían solo la bacteriocina (sobrenadante) ejercieron un control mínimo sobre el crecimiento del patógeno. Sin embargo, en un estudio realizado por Lange-Starke et al. (2014) para evaluar el potencial inhibitorio de sobrenadantes de BAL los tratamientos de la solución libres de células lograron una alta reducción en comparación con el control. De igual forma, al evaluar el efecto de los sobrenadantes de *L. plantarum* sobre síntomas clínicos, Kim et al. (2018) demostraron

que las bacteriocinas presentes en la solución producen un tipo de exopolisacárido que permite contrarrestar los síntomas provocados por enfermedades clínicas como el rotavirus.

Especies*Microorganismos Patógenos (Interacción A*B)

Los resultados en cuanto a esta interacción se muestran en la tabla 21 donde se puede observar que el microorganismo aislado del penco blanco permitió la mayor inhibición frente a *C. freundii* y que la inhibición de este microorganismo también fue efectiva contra *E. coli* y *K. pneumoniae*. Shah et al. (2016) evaluaron la actividad antagónica de *W. confusa* en co-cultivo con *E. coli* y *S. aureus* y encontraron una fuerte actividad inhibitoria de esta bacteria contra estas dos cepas patógenas; por su parte Goh & Philip (2015) caracterizaron las bacteriocinas producidas por *W. confusa* y en el estudio que llevaron a cabo, reportaron que la bacteriocina que purificaron fue efectiva para inhibir *E. coli*, *B. cereus* y otras bacterias Gram negativas.

Por otra parte, considerando el microorganismo aislado del penco azul, la mayor inhibición fue contra *C. freundii*, seguido de *E. coli* y *K. pneumoniae*. Sin embargo, debido a que consideramos como una inhibición efectiva cuando el halo supera los 2 mm, se puede afirmar que *L. plantarum* no posee actividad antimicrobiana frente a los patógenos utilizados. A pesar de esto, existen múltiples investigaciones que demuestran la actividad antimicrobiana de esta cepa, en la investigación realizada por Bartkiene et al. (2020) se halló una capacidad inhibitoria por parte de *L. plantarum* frente a *C. freundii* y *K. pneumoniae* que superó los 2 mm y Jurado et al. (2015) también determinó una inhibición efectiva frente a *E. coli* y *S. aureus*. Otro estudio realizado por Erdogmus et al. (2021) reflejó actividad inhibitoria contra *K. pneumoniae*, *E. coli* y *B. subtilis*, siendo más efectiva la inhibición contra *K. pneumoniae*.

Ya que los dos microorganismos evaluados son BAL, para ambos se menciona que la inhibición ocurre debido a la producción por parte de estos de diferentes tipos de compuestos antibacterianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, hidróxido de carbono, etanol y bacteriocinas (Shah et al., 2016; Bartkiene et al., 2020).

En nuestro caso, la inhibición por parte de *W. confusa* y *L. plantarum* puede deberse a que hubo una notable diferencia en el crecimiento de las cepas, en caso de la primera, el desarrollo fue significativamente mayor que el de la segunda a las 24 horas de incubación.

Especies*Tipos de soluciones (Interacción A*C)

De los resultados obtenidos en la tabla 22 se rescata que existe diferencias significativas entre las interacciones del factor A y C, demostrándose mayor inhibición en la interacción de la bacteria del penco blanco con la SolBac (4,06 mm). Como se mencionó anteriormente, el poder inhibitorio de las bacterias aisladas ocurre debido a la producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas, no obstante, aquí también es importante considerar el efecto del pH, la producción de exopolisacáridos y la buena capacidad de adherencia.

En los tratamientos se demuestra que las soluciones que combinan a las bacterias y sus bacteriocinas tienen mayor inhibición, lo que según Serna & Enríquez (2013) esto podría ocurrir dependiendo del tipo de bacteria ácido láctica utilizada para su preparación. Por el contrario, los tratamientos que solo contienen la bacteriocina demostraron menor inhibición. Esto concuerda con lo descrito en el estudio de Sabadogo et al. (2004), donde no se evidenció actividad inhibitoria de bacteriocinas contra bacterias gran negativas.

La producción de bacteriocinas es independiente de cada microorganismo. En el caso de *L. plantarum* una de las más comunes es la plantaricina, producida por las diferentes cepas de la misma. Las plantaricinas han demostrado ser efectiva para contrarrestar el crecimiento de bacterias patógenas presente en los alimentos, sin embargo, se han mostrados efectos de inhibición relativamente estrechos según los descrito por Zhang et al. (2013). En cuanto a *W. confusa*, Tenea & Lara (2018) establecen que uno de los componentes producidos por esta bacteria es el generado por la cepa Cys2-2, ya que se ha evidenciado su uso múltiple frente a bacterias gran negativas; llegando a la conclusión de que bacteriocina Cys2-2 demuestran un

amplio espectro de inhibición. Existen estudios comprobados como el de Fossi et al. (2016) donde evaluó el crecimiento de patógenos frente a la solución de bacteriocinas producidas por aislados de BAL a partir de la cerveza y el vino que, determinan su efectividad frente a patógenos transmitidos por los alimentos como *E. coli*, *S. entérica* y *S aureus*.

Microorganismos patógenos*Tipos de soluciones (Interacción B*C)

En cuanto a esta interacción, los resultados en la tabla 23, muestran una efectiva actividad inhibitoria al utilizar la SolBac contra los tres microorganismos patógenos evaluados ya que demostraron halos de inhibición mayores a 2 mm, cabe mencionar que la mayor inhibición fue contra *C. freundii* (4 mm) que según Bartkiene et al. (2020) tiene una alta sensibilidad a los compuestos exhibidos por BAL. Esto no ocurrió en el caso de la solución de solo metabolitos frente a los patógenos ya que el halo fue menor a los 2 mm.

Estos resultados se exponen y concuerdan con los de Serna & Enríquez (2013) quienes mencionan que la SolBac permite continuar con la producción de bacteriocina y compite por los nutrientes, lo que hace que se produzca una mayor inhibición a diferencia de utilizar la solución de solo metabolitos, dónde se obtiene una cierta concentración de la bacteriocina, la cual a pesar de que no fue analizada, según Monroy et al. (2015) afecta a los resultados del estudio, por lo tanto esta poca inhibición se puede atribuir a una baja concentración de metabolitos.

Serna & Enríquez (2013) en su estudio también encontraron mayor inhibición por parte de la SolBac frente a *E. coli* y *K. neumonia*. A pesar de esto, autores como Zapata et al. (2009) pudieron mostrar una actividad antimicrobiana considerable con la solución de metabolitos frente a *E. coli* y *Klebsiella sp.* y Svetoch et al. (2009) una efectiva capacidad antimicrobiana frente a *C. freundii*.

Capítulo VI

Conclusiones

Identificación de bacterias ácido lácticas

Se evidenció presencia de BAL para ambas especies de penco, dado que presentaron características morfológicas similares a las descritas para estas bacterias. Además, mediante una caracterización morfológica se determinó que *L. plantarum* es la bacteria predominante en el penco azul y *W. confusa* en el penco blanco.

Respecto a la caracterización fisicoquímica y microbiológica

Especies de penco (factor A)

El extracto del penco blanco presenta posee los valores más elevados de pH y grados Brix que del penco azul, debido a la notable diferencia en cuanto la maduración y además tiene una mayor población tanto de aerobios como de mohos y levaduras, ya que proporciona un medio con mayor concentración de azúcares.

Estado de fermentación (factor B)

Se registró una disminución de pH y sólidos solubles, y un aumento de los valores que corresponden a la acidez, recuento de aerobios y recuento de mohos y levaduras en el extracto de ambas especies de penco, lo que es característico luego de 3 días de fermentación. Además, se determinó que el chaguarmishqui obtenido posee características fisicoquímicas adecuadas para su comercialización como bebida refrescante.

Especies de penco * Estado de fermentación (AxB)

El chaguarmishqui del penco blanco, ofrece una mayor eficiencia para la fermentación, ya que, presentó un mayor contenido de azúcares inicial y una mayor población de microorganismos incluso durante la fase exponencial de crecimiento microbiano de esta.

Respecto a actividad antimicrobiana

Especies de penco (factor A)

Los microorganismos probióticos presentes en las diferentes especies de penco exhiben una efectiva actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos gram negativos, esto debido a los compuestos que producen y a la competencia por nutrientes en un medio adecuado de crecimiento. En nuestro caso, el microorganismo aislado del penco blanco, *Weissella confusa*, permitió mayor inhibición que el aislado del penco azul, *Lactobacillus plantarum*.

Microorganismos patógenos (factor B)

Los microorganismos patógenos presentan sensibilidad ante la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas aisladas, demostrándose que *C. freundii* es el patógeno con mayor sensibilidad frente a estos y, que *E. coli* el más resistente.

Tipo de solución (factor C)

Los tipos de soluciones obtenidas a partir de la solución madre de BAL influyen en la actividad antimicrobiana frente a los distintos patógenos, siendo la SolBac la que permitió los mejores resultados en comparación con la solución libre de bacterias.

Especies de penco * microorganismo patógeno (AxB)

Los mejores resultados se obtuvieron en los tratamientos conformados por el microorganismo aislado del penco blanco (*W. confusa*) frente a *C. freundii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, siendo el primero el que mayor sensibilidad mostró ante esta cepa. Por su parte, el microorganismo aislado del penco azul no permitió una efectiva actividad antimicrobiana, ya que reflejó halos de inhibición menores a 2 mm en su antagonismo con los 3 microorganismos patógenos evaluados.

Especies de penco * tipo de solución (AxC)

La actividad antimicrobiana más representativa se obtuvo utilizando la SolBac preparada a partir de la BAL aislada del penco blanco, esta exhibió el mayor halo de inhibición y por tanto es la más efectiva para contrarrestar el crecimiento de patógenos. Mientras que la SolBac obtenida del penco azul y la solución libre de bacterias obtenida a partir de las ambas especies de penco no mostró halos de inhibición efectivos que denoten actividad antimicrobiana.

Microorganismo patógeno * tipo de solución (BxC)

El enfrentamiento entre la SolBac contra *C. freundii* fue el que mayor capacidad inhibitoria mostró en relación con los demás, también se obtuvo una actividad antimicrobiana efectiva por parte del enfrentamiento entre *E. coli* y *K. pneumoniae* contra la SolBac y en cuanto a la solución libre de bacterias, esta no mostró un efecto inhibitorio significativo.

Especies de penco * microorganismo patógeno * tipo de solución (AxBxC)

El efecto de las interacciones entre las especies de penco, los microorganismos patógenos y los tipos de soluciones preparadas no influye en la actividad antimicrobiana.

Recomendaciones

Al haberse encontrado *Weissella confusa* como microorganismo predominante en el chaguarmisqui obtenido del penco blanco y *Lactobacillus plantarum* en el obtenido del penco azul, se recomienda realizar un estudio a profundidad incluyendo también a aquellas bacterias que se encuentran en la planta en menor proporción, ya que por motivos de tiempo en nuestro caso solo caracterizamos las predominantes de cada especie.

Se recomienda en un estudio de comparación entre el extracto de ambas especies, conseguir la pulpa de plantas con el mismo tiempo de maduración y con las mismas técnicas de recolección, para evitar la afectación de factores tanto intrínsecos como extrínsecos en el estudio. Además, son necesarias pruebas más específicas en cuanto a la caracterización microbiológica, para descartar con mayor efectividad la presencia de contaminantes en las muestras.

En cuanto a la fermentación del chaguarmishqui, se recomiendan realizar más estudios, en especial con la especie del penco blanco, ya que no existen investigaciones que demuestren las características fisicoquímicas, microbiológicas o la cinética de fermentación del mismo. Asimismo, considerando que existen parámetros que se cumplen y otros que no según el estado de fermentación se recomienda tomar en cuenta las normativas que establecen los máximos permisibles con respecto a la caracterización fisicoquímica y microbiológica.

Referente a las especies de penco para medir la actividad antimicrobiana se recomienda usar la bacteria aislada del penco blanco debido a que es la que mejores resultados presenta en cuanto a la inhibición de patógenos.

Se recomienda utilizar *C. freundii* en estudios de actividad antimicrobiana ya que demostró ser una bacteria bastante sensible al efecto de las BAL. Además, considerando que hubo una inhibición efectiva de los microorganismos patógenos se recomienda evaluar este

procedimiento con otras bacterias como *Salmonella* o *Streptococcus sp.* que son contaminantes bastante comunes en alimentos.

Se recomienda la preparación de SolBac para evaluar la capacidad antimicrobiana de las BAL, y en especial si se trabaja con *W. confusa* para contrarrestar el efecto de patógenos Gram negativos.

Tomando en cuenta que entre la interacción de especies de penco y microorganismos patógenos hay diferencia significativa, se recomienda el uso de la bacteria obtenida del penco blanco para tratar la contaminación por *C. freundii*, puesto que, en los ensayos antimicrobianos, fue la que mayor inhibición presentó.

En el caso de la interacción de las especies de penco con los tipos de solución se recomienda la preparación de SolBac utilizando la bacteria extraída del penco blanco, ya que es la que resulto más eficiente para la inhibición de microorganismos patógenos.

Para la interacción entre los microorganismos patógenos y el tipo de solución se recomienda el uso de SolBac para lograr resultados óptimos frente a *C. freundii* y otros microorganismos patógenos.

Capítulo VII

Bibliografía

- Allende, A. M., Selma, V., Gil, M., Suárez, J., & Rodríguez, A. (2007). Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Elsevier*, 24(7-8), 759-766.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.03.002>
- Alokail, M., Sabico, S., Al-Saleh, Y., Al-Daghri, N., Alkharfy, K., Vanhoutte, P., & McTernan, P. (2013). Effects of probiotics in patients with diabetes mellitus type 2: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trials*(14), 195.
<https://doi.org/10.1186/1745-6215-14-195>
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. (2016). acteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*(100), 2939-2951.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Anchundia, A., & Torres, V. (2022). *Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos en distintos tipos de cacao (mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano* [Trabajo de titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas].
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. *Marcel Dekker, III*, 1-67.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>

- Ayora, D., & Quito, K. (2013). *Procesos de extracción del mishqui y elaboración del Chaguarmishqui en Ñañaarín, provincia del Azuay. Propuesta de nuevos usos gastronómicos y bebidas* [Tesis de grado, Universidad de Cuenca].
- Balboa Luna, C., & Vergara Gonzales, L. (2021). Potencial aplicación de bacterias ácido lácticas en sistemas de tratamiento de agua. *Ecosistemas*, 30(2), 2224. <https://doi.org/https://doi.org/10.7818/ECOS.2224>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Elsevier*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bartkiene, E., Lele, V., Ruzauskas, M., Domig, K., Starkute, V., Zavistanaviciute, P., & Bartkevics, V. (2020). Lactic Acid Bacteria Isolation from Spontaneous Sourdough and Their Characterization Including Antimicrobial and Antifungal Properties Evaluation. *Microorganisms*, 8(1), 64. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganismos8010064>
- Björkroth, J., & Koort, J. (2016). Lactic Acid Bacteria: Taxonomy and Biodiversity. *Elsevier*, 11, 5-8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00864-7>
- Changoluisa, R. (2020). *Estabilización de una bebida redrescante a partir de aguamiel de agave americana (Agave americana L.)* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi].
- Cotter, P., Hill, C., & Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*(3), 777-778. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>

- Cruz, A. (2015). *Diseño de una Bebida Nutricional Saborizada a Base de Aguamiel (Chaguarmishqui) de Penco (Agave Americana L.) Enriquecida con Amaranto (Amaranthus caudatus L.)* [Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador].
- Cuvas-Limón, R., Cruz-Hernández, M., & Belmares-Cerda, R. (2019). Aislamiento, Caracterización y Evaluación Antimicrobiana de Bacterias a partir de Leche de Cabra. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*(4), 142-146.
<http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/2/19.pdf>
- De la Torre, L. (2019). El penco azul espinas, corazón y miel. *Ecuador tierra incognita*, 109(3).
<https://doi.org/30-40>
- De la Torre, L., Cummins, I., & Logan, E. (2018). Agave americana an Furcrea andina: Key Species to Andean Cultures in Ecuador. *Botanical Sciences*, 96(2), 246.
<https://doi.org/10.17129/botsci.1813>
- Djaduuni, F., & Kihal, M. (2012). Actividad antimicrobiana de las bacterias del ácido láctico y el espectro de sus biopéptidos contra los gérmenes de los alimentos. *Archivos Brasileños de Biología y Tecnología*, 55(3), 435–444. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000300015>
- Duque, J. (2013). *Evaluación de tres étodos de reproducción del penco azul (Agave americana), en la parroquia Tocachi, cantón Pedro Moncayo provincia Pichincha*. [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito]. Archivo en línea.
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5068/6/UPS-YT00263.pdf>
- Enríquez, M. (2021). Evaluación Fisicoquímica y Microbiológica de una Conserva de Flor de Cabuya Negra (Agave Americana) con Diferentes Niveles de Ácido Acético en el Líquido de Cobertura. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 33(1), 8.
<https://doi.org/https://doi.org/10.37815/rte.v33n1.779>

- Erdogmus, S., Erismis, U., & Uguz, C. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented meat products and evaluation of their antimicrobial effect. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(4), 289-296. <https://doi.org/https://doi.org/10.17221/222/2020-CJFS>
- Escalante Adelfo, r. M., Martínez, A., López, A., Bolivar, Francisco, & Goset, G. (2016). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *Elsevier*, 235(2), 273-279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
- Fossi, B., Anyangwe, I., Tavea, F., Lucas, K., & Akenji, T. (2016). Lactic acid bacteria from traditionally processed corn beer and palm wine against selected food-borne pathogens isolated in south west region of Cameroon. *Africa Journal of Microbiology Research*, 10(30), 1140-1147. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8143>
- Garrote, A., & Bonet, R. (2017). Probióticos. *Farmacia Profesional*, 31(2), 13-16. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-probioticos-X0213932417608720>
- Goh, H., & Philip, K. (2015). Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin. *Dairy Origin*, 10(10), e0140434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140434>
- González, F., Vázquez, P., Jáime, O., & Zúñiga, M. (2016). Potencial probiotico de Bacterias Aisladas del Pulque: Una revisión. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de alimentos*, 1(1), 924-930. <https://doi.org/http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/159.pdf>
- Gonzales, M., Galván, R., López, I., Reséndiz, L., & González, M. (2009). *Agaves-magueyes, lechuguillas y noas- del Estado de Durango y sus alrededores*. CONABIO.

https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/M-Socorro-Gonzalez-Elizondo/publication/322243902_Agaves_-magueyes_lechuguillas_y_noas-_del_Estado_de_Durango_y_sus_alrededores/links/5a4dc0290f7e9b8284c4e786/Agaves-magueyes-lechuguillas-y-noas-del-Estado-de-Durango-y

Hernández, P. (2009). *Estudio del comportamiento de la cinética de fermentación por lotes de aguamiel (Agave salmiana)* [Tesis de grado_Instituto Politécnico Nacional].

Herrera, M. (2008). *Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla* [Tesis de grado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior.
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1160/1/178541.pdf>

INEN 2304. (2017). *Refrescos o bebidas no carbonatadas. Requisitos*.
https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2304-1.pdf.

INEN 381. (1985). *Conservas vegetales. Determinación de acidez titulable metodo potenciometrico de referencia*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/381.pdf>.

INEN 389. (1985). *Conservas vegetales. Determinación de la concentración del Ion Hidrógeno (pH)*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/389.pdf>.

Jay, J. (2002). *Microbiología moderna de los alimentos*. Acribia S.A.

Jurado, H., Jarrín, V., & Parreño, J. (2015). Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 57-66. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(13\)57-66](https://doi.org/10.18684/BSAA(13)57-66)

Jurado, S., & Sarzosa, X. (2009). *Estudio de la cadena agroindustrial de la Cabuya en la producción de miel y licor de cabuya* [Tesis de grado, Escuela Politécnica Nacional].
<https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1693/1/CD-2305.pdf>

- Kim, K., Lee, G., & Yang, S. (2018). El exopolisacárido de *Lactobacillus plantarum* LRCC5310 ofrece protección contra la diarrea inducida por rotavirus y regula la respuesta inflamatoria. *Journal of Dairy Science*, *101*(7), 5702-5712.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-14151>
- König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (2017). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer International Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-60021-5>
- Lange-Starke, A., Petereit, A., Truyen, U., Braun, P., Fehlhaber, K., & Albert, T. (2014). Potencial antiviral de cultivos iniciadores seleccionados, bacteriocinas y ácido D, L-láctico. *Ambiente Alimentario*, *6*(2), 42-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12560-013-9135-z>
- Leal, I., Tarantino, G., Hernández, R., & Morán, H. (2014). Efecto de la temperatura y el pH en la fermentación del mosto de Agave cocui. *Multiciencias*, *14*(4), 375-381.
- Mahrous, H., Mohamed, A., El-Mongy, M. A., & El-Batal, A. (2013). Study Bacteriocin Production and Optimization Using New Isolates of *Lactobacillus* spp. Isolated from Some Dairy Products under Different Culture Conditions. *Scientific Research*, *4*(3), 32-356. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.43045>
- Mokoena, M., Omatola, C. A., & Olanirán, A. (2021). Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Moléculas*, *XXVI*(22), 7055. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Mokoena, M., Omatola, C., & Olaniran, A. (2021). Applications of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins against Food Spoilage Microorganisms and Foodborne Pathogens. *Molecules*, *26*(22), 7055. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26227055>

- Monroy, M., Castro, J., Castro, G., De Lara, R., Ocampo, J., & Cruz, I. (2015). El uso de cinco cepas probióticas para la determinación de la sensibilidad (positiva o negativa) del crecimiento de bacterias patógenas (in vitro), aisladas de peces enfermos. *Revista Digital del Departamento El Hombre y su Ambiente*, 1(7), 25-31.
<https://doi.org/file:///C:/Users/Luis%20Mora/Downloads/03CINCOCEPASPROBIOTICAS.pdf>
- Montero-Recalde, M., Vayas, L., Avilés-Esquivel, D., Pazmiño, Pilar, & Erazo-Gutierrez, V. (2018). Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. *Scielo*, 29(4). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>
- Nava, N., Medina, M., Martinez, J., Rodriguez, R., & Aguilar, C. (2014). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546-559.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>
- Ortega, M. (2019). *Chaguarmishqui y sus diversas aplicaciones en la gastronomía*. Universidad de las Américas, Quito.
- Palacios, A. (2022). *Determinación de la actividad antagonista de microorganismos ambientales frente a Escherichia coli ATCC 25922* [Tesis de grado, Universidad Nacional Mayir de San Marcos].
- Parra, R. (2010). Revisión. Bacterias ácido lácticas: Papel Funcional en los alimentos. *Scielo*, 8(1), 93-105. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012
- Peng, T.-R., Wu, T.-W., & Chao, Y.-C. (2018). Effect of Probiotics on the Glucose Levels of Pregnant Women: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicina*, 54(5), 77. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/medicina54050077>

- Porras, L. (2011). *Desarrollo de derivados mixiológicos a partir del chaguarmishqui (dulce de la cabuya)* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9432/1/84T00099.pdf>.
- Quishpi, E. (2014). *Elaboración de mermeladas baja en calorías utilizando los componentes edulcorantes que posee el chaguarmishqui (agave), con frutas de la zona, en la escuela de gastronomía de salud pública-ESPOCH* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo].
- Ramirez, J., Rosas, P., Velásquez, M., Ulloa, J., & Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente*, 1(7), 1-13.
<https://doi.org/http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses. *Annals of Biological Research*, 1(4), 218-228.
<https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>
- Rechenchoski, D., López, A., AC, P., Schuroff, P., Burgos, T., Pelisson, M., . . . Vespero, E. (2017). Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacter* spp. isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 8(3), 509-514.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.008>
- Robles, R., Muñoz, O., & Chirre, J. (2016). Estudio del consumo de azúcares reductores durante la fermentación alcohólica del mosto de uva italia para la obtención de vino blanco. *Industrial Data*, 19(2), 104-110.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/idata.v19i2.12842>

- Sabadogo, A., Ouattara, A., Bassole, H., & Traore, A. (2004). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3), 174-179. <https://doi.org/10.3923/pjn.2004.174.179>
- Sánchez, A., Larios, C., & Vierna, L. (1967). Estudios sobre la microbiología del pulque XIX. Elaboración de la bebida mediante cultivos puros. *Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología*, 1(9), 83-85.
- Serna, L., & Enríquez, E. (2013). Actividad antimicrobiana de *Weissella confusa* y sus metabolitos frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XV(2), 63-69. <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v15n2/v15n2a08.pdf>
- Serna, L., & Rubiano, L. (2012). Actividad Antimicrobiana de *Weissella confusa* contra *Escherichia coli*. *Red de Revistas Científicas de América Latina*, 19(1), 102-104. <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914026.pdf>
- Shah, N., Patel, A., Ambalam, P., Holst, O., Ljungh, A., & Prajapati, J. (2016). Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in co-culture. *Ann Microbio*, 66(3), 1137-1143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13213-016-1201-y>
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, B. S., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial Fermentation and Its Role in Quality. Improvement of Fermented Foods. *Fermentation*, 6(4), 16-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentacion6040106>
- Shin, D., & Jeong, D. (2015). Korean traditional fermented soybean products: Jang. *Journal of Ethnic Food*, 2(1), 2-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jef.2015.02.002>

- Soque, A. (2019). *Evaluación bacteriológica de leche cruda, sometida a tres concentraciones de ozono, mediante su comprobación en placas petrifilm* [Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador].
- Svetoch, E., Eruslanov, B., Kovalev, Y., Mitsevich, E., Mitsevich, I., Levchuk, V., . . . Stern, N. (2009). Antimicrobial activities of Bacteriocins E 50-52 and B 602 Against Antibiotic-Resistant Strains Involved in Nosocomial Infections. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1(2), 136-142. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9027-6>
- Tamang, J., Shin, D.-H., Jung, S.-J., & Chae, S.-W. (2016). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Frontiers in Microbiology*, 7(1), 275-289. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>
- Tamang, J., Watanabe, K., & Holzapfel, W. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7(1), 196-210. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tenea, G., & Lara, M. (2018). Antimicrobial compounds produced by *Weissella confusa* Cys2-2 strain inhibit Gram-negative bacteria growth. *CyTA-Journal of food*, 17(1), 105-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1561520>
- Trávez, J. (2014). *Biodiversidad microbiana asociada a los procesos fermentativos de la bebida Chaguarmishqui* [Tesis de grado, Universidad Tecnológica Equinoccial].
- United States Department of Agriculture. (11 de 08 de 2022). *Agave americana L.* <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=AGAM>
- Vanegas, M. F., Londoño Zapata, A., Durango Zuleta, M., Gutiérrez Buriticá, M., Ochoa Agudelo, S., & Sepúlveda Valencia, J. (2017). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, XV(1), 5-55.

[https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)45-55](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)45-55)

Villacís-Tello, A., Santiana-Espín, C., Flores-Fiallos, L., & Guamán-Lozada, D. (2021). Diseño de un proceso industrial para la elaboración de una bebida alcohólica a partir del dulce de cabuya (agave americano). *Polo del Conocimiento*, 6(12), 1446-1501. <https://doi.org/10.23857/pc.v6i12.3452>

Villacrés, P. (2018). *Cuantificación de la biomasa residual y caracterización del chaguarmishqui* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato].

Villacrés, P. (2018). *Cuantificación de la biomasa residual y caracterización del Chaguarmishqui*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato.

Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoña, O., & Gutierrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 16(1), 75-82. <https://doi.org/http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n1/v16n1a09.pdf>

Zhang, H., Liu, L., Hao, Y., Zhon, S., Liu, H., Han, T., & Xie, Y. (2013). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiología e Inmunología*, 57(11), 746-755. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1348-0421.12091>

Zúñiga, D., Montaleza, M., Andrade, D., León, J., Ramirez, P., Criollo, A., . . . Andrade, S. (2020). Cinética de fermentación láctica natural de col blanca (*Brassica oleracea* L. capitata). *MASKANA*, 11(1), 48-56. <https://doi.org/10.18537/mskn.11.01.05>