



**Obtención de bacteriocinas a partir de la bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor) considerando distintas fuentes de carbono, para su aplicación como agente antimicrobiano**

Heredia Sanipatin, Kimberly Kassandra y Suárez Jiménez, Elyan Alexander

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee

27 de febrero del 2023

## Reporte de verificación



**CERTIFICADO DE ANÁLISIS**  
magister

# Trabajo de Integración Curricular.Final

**5%** Similitudes

0% Texto entre comillas  
0% similitudes entre comillas  
0% idioma no reconocido

Nombre del documento: Trabajo de Integración Curricular.Final.pdf

ID del documento: 9cfe4f144b7dc3272b479f245415409a0380df75

Tamaño del documento original: 1,27 Mo

Depositante: MILTON VINICIO LIDAY PATIÑO

Fecha de depósito: 23/2/2023

Tipo de carga: Interface

Fecha de fin de análisis: 23/2/2023

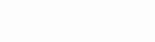
Número de palabras: 24.141

Número de caracteres: 174.436

Ubicación de las similitudes en el documento:



### Fuentes principales detectadas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 <b>TRABAJO DE TITULACION_SERPA.VITERI.pdf   TRABAJO DE TITULACION_SER...</b> El documento proviene de su biblioteca de referencias 3 fuentes similares	1%		Palabras idénticas: < 1% (270 palabras)
2	 <b>repositorio.epse.edu.ec</b> <a href="https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/2905/1/7-659-00321.pdf">https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/2905/1/7-659-00321.pdf</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (108 palabras)
3	 <b>repositorio.epse.edu.ec   Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de ...</b> <a href="https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/25911/1/7-6595D-001155.pdf.pdf">https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/25911/1/7-6595D-001155.pdf.pdf</a> 1 fuente similar	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (119 palabras)
4	 <b>repositorio.epse.edu.ec   Aislamiento e identificación de microorganismos probiótic...</b> <a href="https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/28875/1/7-6595D-001187.pdf.pdf">https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/28875/1/7-6595D-001187.pdf.pdf</a>	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (108 palabras)
5	 <b>repositorio.epse.edu.ec   Estudio de las características de las diferentes variedades ...</b> <a href="https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/28876/1/7-6595D-001185.pdf.pdf">https://repositorio.epse.edu.ec/bitstream/21000/28876/1/7-6595D-001185.pdf.pdf</a> 4 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (85 palabras)

### Fuentes con similitudes fortuitas

N°	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 <b>hdl.handle.net</b>   Caracterización de bacterias ácido-lácticas con propiedades antimic... <a href="https://hdl.handle.net/10863/13909">https://hdl.handle.net/10863/13909</a>	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (34 palabras)
2	 <b>www.dspace.uca.edu.ec</b> <a href="http://www.dspace.uca.edu.ec/bitstream/25000/25060/1/UCB-CPQ-FALCONI DOMINICA.pdf">http://www.dspace.uca.edu.ec/bitstream/25000/25060/1/UCB-CPQ-FALCONI DOMINICA.pdf</a>	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (32 palabras)
3	 <b>eprintz.uon.es</b>   Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cásmico ... <a href="https://eprintz.uon.es/bitstream/10055/1/722544.pdf">https://eprintz.uon.es/bitstream/10055/1/722544.pdf</a>	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (31 palabras)
4	 <b>dx.doi.org</b>   Changes Occurring in Spontaneous Maize Fermentation: An Overview <a href="https://dx.doi.org/10.3935/fermentador0101036">https://dx.doi.org/10.3935/fermentador0101036</a>	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (24 palabras)
5	 <b>dx.doi.org</b>   Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Ferment... <a href="https://dx.doi.org/10.3935/fermentador0101036">https://dx.doi.org/10.3935/fermentador0101036</a>	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (24 palabras)

### Fuentes mencionadas (sin similitudes detectadas)

Estas fuentes han sido citadas en el documento sin encontrar similitudes.

-  <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/7267/7/TE-UTB-FACIAG>
-  <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00010-1>
-  <https://repositorio.utb.edu.ec/handle/123456789/16629>
-  <https://doi.org/10.18601/01207555.v26.n09>
-  <https://doi.org/10.1080/10408296.2022.1791050>

Firma:



firmado electrónicamente por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD.

C.C.: 1205348673



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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de integración curricular, **“Obtención de bacteriocinas a partir de la bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor) considerando distintas fuentes de carbono, para su aplicación como agente antimicrobiano”** fue realizado por la señorita **Heredia Sanipatin, Kimberly Kassandra** y el señor **Suárez Jiménez, Elyan Alexander**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 27 de febrero del 2023**

Firma:



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

C.C.: 1205348673

**Directora del Proyecto de Investigación**



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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de Autoría**

Nosotros, Heredia Sanipatin, Kimberly Kassandra y Suárez Jiménez, Elyan Alexander, con cédulas de ciudadanía N° 2350205486 y N° 2300641079, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular "Obtención de bacteriocinas a partir de la bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor) considerando distintas fuentes de carbono, 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, 27 de febrero del 2023**

Firmas

**Heredia Sanipatin Kimberly Kassandra**

C.C.:2350205486

**Suárez Jiménez Elyan Alexander**

C.C.: 2300641079



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

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de Publicación**

Nosotras, Heredia Sanipatin, Kimberly Kassandra y Suárez Jiménez, Elyan Alexander, con cédulas de ciudadanía N° 2350205486 y N° 2300641079, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: "Obtención de bacteriocinas a partir de la bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor) considerando distintas fuentes de carbono, para su aplicación como agente antimicrobiano" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 27 de febrero del 2023**

Firmas

**Heredia Sanipatin Kimberly Kassandra**

C.C.:2350205486

**Suárez Jiménez Elyan Alexander**

C.C.: 2300641079

### **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a Dios, por darme fortaleza para seguir adelante y por guiar mi camino en todo momento.

A mis padres, Elizabeth y Leonel, por su amor incondicional, apoyo y confianza en mí, por enseñarme los valores y principios que rigen mi vida. Son mi fuente de inspiración y motivación para alcanzar mis metas.

A mis hermanas, Kateryn y Kerly, por su amor, comprensión y por ser mi apoyo constante. Su presencia es invaluable en mi vida.

A mis queridos abuelos y a toda mi familia, quienes me han brindado su amor incondicional y su apoyo en cada momento de mi vida.

A mis amigos Elyan y Susana, por su amistad, cariño y comprensión que me han brindaron a lo largo de mi formación universitaria.

Kassandra

Dedico este trabajo a Dios que me dio la fortaleza y es mi guía para seguir adelante en todo momento.

A mis padres, Yofre y Nancy, que han sido el pilar fundamental y la motivación diaria para cumplir todos mis objetivos, gracias al apoyo y paciencia que mantuvieron durante toda esta trayectoria.

A mis hermanos, Sebastián y Milena, por su apoyo, comprensión y cariño. Son esenciales en mi vida.

A mis dos abuelas, Rosario e Isolina, por todo su amor y consejos impartidos, fueron una fuente de motivación para cumplir mis metas.

A todos mis tíos, tías y primos, cada uno de ellos aportaron en gran medida para cumplir con mis objetivos propuestos.

A mis amigos Susana y Kassandra, por su amistad, comprensión y cariño brindado durante toda esta trayectoria universitaria.

Elyan

## **Agradecimiento**

A Dios, por darme fortaleza, salud y por haberme sostenido en los momentos de dificultad y me han dado la fuerza para seguir adelante.

A mis queridos padres, Leonel y Elizabeth, quienes siempre han sido mi fuente de inspiración y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Su amor, dedicación y sacrificios han sido fundamentales para mi formación académica y personal. Gracias por creer en mí, por motivarme a seguir adelante y por nunca dejarme rendirme ante los obstáculos. Este logro es también suyo y les agradezco por estar siempre a mi lado.

A mis queridos abuelos y a mi familia, quienes siempre han estado a mi lado brindándome su amor, apoyo y aliento en cada paso que he dado.

Agradezco a la Dra. Sungey Sánchez y el Dr. Juan Neira, por su guía, paciencia y valiosas sugerencias que me permitieron llevar a cabo este trabajo de la mejor manera posible. También, a aquellos profesores que, con su dedicación, experiencia y conocimientos, me permitieron expandir mi mente y disfrutar de la carrera que elegí.

A Elyan, quien ha sido una persona esencial en mi vida y a pesar de los desafíos que enfrentamos juntos me ha brindado su apoyo y compañía incondicional en todo momento. Su presencia ha sido fundamental para el desarrollo de esta investigación y para mi crecimiento personal.

A mis amigos, Susana, Hadassa, Genecys y Deivis, quienes han sido una parte fundamental de mi vida universitaria, tanto por su amistad como por su valiosa contribución a mi formación académica.

A mis amigos Anderson y Milena, gracias por acompañarme en cada etapa de mi vida, por brindarme su amistad sincera y por ser un apoyo incondicional en los momentos difíciles. Su presencia ha sido fundamental en mi formación como persona y como estudiante, y han hecho que estos años de estudio sean más agradables e inolvidables.

Kassandra

Agradezco a Dios por ser mi guía y fortaleza siempre, mostrándome el camino correcto y llenar mi corazón, a fin de hacer las cosas de la mejor forma posible.

A mis padres por todo su apoyo incondicional, por educarme de la forma correcta y enseñarme a luchar por mis sueños, yendo por el camino del bien. Gracias a ellos, estoy donde he buscado estar

A mi abuelita Rosario e Isolina, por haberme permitido tener excelentes padres y familia, además de todos los consejos recibidos y la motivación a salir adelante, para cuidar en un futuro de mi familia, como ellos lo hicieron conmigo.

A mi tutora y cotutor que, durante toda mi carrera universitaria, han sido unos excelentes profesionales y permitieron llevar a cabo una excelente investigación. Además de, aquellos docentes que impartieron correctamente sus materias, gracias a ellos logramos disfrutar de aprender.

A mis amigas y compañeras, Susana, Jazmín y Hadassa que, durante toda mi trayectoria universitaria y personal, se mantuvieron con un apoyo incondicional, apoyándome a culminar mis estudios

A mi amiga Kassandra, que me apoyo de forma especial en todo momento y a pesar de los altibajos, se mantuvo conmigo y fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

A mis tíos Álvaro, Miguel, Mery y Miriam, junto a mis primos José Luis y Santiago, que me apoyaron incondicionalmente abriéndome las puertas de su casa, motivaron y escucharon, para ser una mejor persona cada día.

A Jessenia, Escarly y Lizbeth, por su apoyo especial en momentos difíciles, motivándome y dándome razones para no decaer y esforzarme cada día más en cumplir mis metas, las llevo siempre en mi corazón.

## Índice de contenido

Carátula.....	1
Reporte de verificación.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimiento.....	8
Índice de tablas.....	18
Índice de figuras .....	21
Resumen.....	23
Abstract.....	24
Capítulo I.....	25
Introducción.....	25
Objetivos .....	27
Objetivo General .....	27
Objetivos específicos.....	27
Hipótesis .....	28
Diseño AxByC .....	28
Hipótesis Factor A (Fuentes de carbono).....	28
Hipótesis Factor B (Concentración de sustratos).....	28
Hipótesis Factor C (Tiempo de fermentación) .....	28

	11
Hipótesis Interacción AxB (Fuentes de carbono*Concentración de sustratos) .....	28
Hipótesis Interacción AxC (Fuentes de carbono*Tiempo de fermentación).....	29
Hipótesis Interacción BxC (Concentración de sustratos*Tiempo de fermentación).....	29
Hipótesis Interacción AxBxC (Fuentes de carbono*Concentración de sustratos*Tiempo de fermentación) .....	29
Diseño AxB .....	30
Hipótesis Factor A (Tipo de solución) .....	30
Hipótesis Factor B (Microorganismos patógenos) .....	30
Hipótesis Interacción AxB (Tipo de solución * Microorganismos patógenos) .....	30
Capítulo II.....	31
Revisión de literatura .....	31
Bebidas fermentadas.....	31
Chicha del Yamor.....	33
Variedades de maíz empleados en la Chicha del Yamor .....	33
Maíz morado.....	33
Maíz morocho.....	34
Maíz canguil .....	34
Maíz chulpi .....	35
Maíz blanco .....	35
Maíz amarillo .....	36
Maíz jora.....	36
Fermentación .....	36

	12
Bacterias ácido lácticas .....	37
Generalidades .....	37
Métodos de identificación .....	39
Bacteriocinas.....	39
Clasificación.....	40
Propiedades bioquímicas de las bacteriocinas .....	41
Producción y secreción de bacteriocinas .....	41
Mecanismo de acción.....	41
Aplicaciones .....	42
Métodos para evaluar la actividad de bacteriocina en ensayos in vitro .....	43
Método de difusión de discos.....	43
Método de difusión en pozo de agar .....	43
Capítulo III.....	44
Metodología.....	44
Ubicación del área de investigación .....	44
Ubicación política.....	44
Ubicación ecológica .....	44
Ubicación geográfica.....	45
Materiales .....	46
Elaboración de la bebida fermentada tradicional “Chicha del Yamor” .....	46
Caracterización fisicoquímica de la “Chicha del Yamor” .....	46
Caracterización microbiológica de la “Chicha del Yamor” .....	48

Siembra de muestra de bebida fermentada “Chicha del Yamor” .....	49
Aislamiento de bacterias ácido lácticas de la bebida Yamor (Chicha) .....	50
Identificación de bacterias ácido lácticas .....	50
Conservación de la bacteria ácido láctica identificada .....	51
Cinética de crecimiento bacteriano .....	52
Evaluación de la actividad antimicrobiana de la bacteria ácido láctica .....	54
Métodos .....	56
Elaboración de la bebida fermentada tradicional “Chicha del Yamor” .....	56
Fermentación de la Chicha del Yamor.....	57
Caracterización fisicoquímica de la Chicha del Yamor .....	57
Caracterización microbiológica de la Chicha del Yamor .....	59
Siembra de muestra de bebida fermentada “Chicha del Yamor”.....	60
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas .....	60
Identificación de Ácido Lácticas .....	61
Caracterización molecular .....	61
Conservación de la bacteria ácido láctica.....	62
Cinética de crecimiento bacteriano .....	62
Evaluación de la actividad antimicrobiana de la bacteria ácido láctica .....	63
Diseño experimental .....	65
Factores y niveles del experimento .....	65
Tratamiento a comparar .....	66
Tipo de diseño experimental .....	68

	14
Repeticiones .....	69
Análisis estadístico.....	69
Análisis funcional .....	70
VARIABLES A MEDIR .....	71
Capítulo IV.....	72
Resultados .....	72
Resultados de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida Yamor (Chicha) .....	72
Resultados del aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en la bebida tradicional Chicha del Yamor .....	73
Análisis morfológico de las cepas aisladas .....	73
Análisis microscópico de las cepas aisladas.....	74
Análisis molecular de las cepas aisladas.....	75
Resultados de la evaluación de los parámetros cinéticos en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas con adición de distintas fuentes de carbono .....	76
Resultados del análisis de varianza para las variables estudiadas durante el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas con adición de distintas fuentes de carbono.....	79
Análisis de varianza para la variable pH .....	79
Análisis de varianza para la variable acidez (ácido láctico).....	80
Análisis de varianza para la variable densidad óptica .....	81
Análisis de varianza para la variable sólidos solubles .....	82

Resultados del estudio de la adición de distintas fuentes de carbono para el enriquecimiento de chicha Yamor, en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas para la estandarización de parámetros cinéticos microbianos. (Tukey $p < 0.05$ ) .....	83
Resultados del estudio de la concentración óptima de las fuentes de sustratos en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas de la Chicha Yamor .....	85
Resultados del estudio de las condiciones para la producción de bacteriocinas evaluando los parámetros cinéticos en distintos tiempos de fermentación .....	87
Resultados del estudio de la interacción ABC (Fuente de carbono*Concentración del sustrato*Tiempo de fermentación) en la producción de bacteriocinas .....	89
Análisis de conglomerados para los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas empleando diferentes fuentes de carbono .....	94
Análisis de componentes principales .....	95
Resultados del análisis de varianza para la variable evaluada en el estudio de la actividad antagonista de las bacteriocinas producidas de la fermentación bacteriana ..	99
Análisis de varianza para el halo de inhibición.....	99
Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar la diferencia significativa entre los diferentes factores establecidos para el estudio de la actividad antagonista .....	100
Capítulo V .....	104
Discusión.....	104
Identificación de la bacteria ácido láctica .....	104
Respecto a la cinética de crecimiento de la BAL implementando diferentes fuentes de carbono.....	105

	16
Con respecto a las fuentes de carbono (Factor A) .....	105
Con respecto a la concentración de sustratos (Factor B) .....	107
Con respecto al factor C (Tiempo de fermentación) .....	109
Con respecto a la interacción ABC (Fuentes de carbono*Concentración de sustratos*Tiempo de fermentación).....	111
Respecto al análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas .....	113
Tipo de solución (Factor A).....	113
Microorganismos patógenos (Factor B).....	114
Capítulo VI.....	115
Conclusiones .....	115
Identificación de la bacteria ácido láctica .....	115
Respecto a la cinética de crecimiento de la BAL implementando diferentes fuentes de carbono.....	115
Fuentes de carbono (Factor A) .....	115
Concentración de sustratos (Factor B) .....	115
Tiempo de fermentación (Factor C).....	116
Fuentes de carbono*Concentración de sustratos*Tiempo de fermentación (Interacción ABC) .....	116
Respecto al análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas .....	116
Tipo de solución (Factor A).....	116
Microorganismos patógenos (Factor B).....	117
Recomendaciones .....	118

Referencias ..... 120

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> <i>Instrumentos utilizados en la elaboración de la bebida tradicional "Chicha del Yamor"</i> .....	46
<b>Tabla 2</b> <i>Instrumentos utilizados para la determinación del pH de la Chicha del Yamor ...</i>	46
<b>Tabla 3</b> <i>Instrumentos utilizados para la determinación de la acidez titulable de la Chicha del Yamor</i> .....	47
<b>Tabla 4</b> <i>Instrumentos utilizados para la determinación de la densidad relativa de la Chicha del Yamor</i> .....	47
<b>Tabla 5</b> <i>Instrumentos utilizados para la determinación de los grados alcohólicos de la Chicha del Yamor</i> .....	47
<b>Tabla 6</b> <i>Instrumentos utilizados para la determinación de sólidos solubles de la Chicha del Yamor</i> .....	48
<b>Tabla 7</b> <i>Instrumentos utilizados para la determinación de la densidad óptica de la Chicha del Yamor</i> .....	48
<b>Tabla 8</b> <i>Instrumentos utilizados para el conteo de mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas y aerobios mesófilos de la Chicha del Yamor</i> .....	48
<b>Tabla 9</b> <i>Instrumentos utilizados para la siembra de la muestra de la bebida Chicha del Yamor</i> .....	49
<b>Tabla 10</b> <i>Recursos utilizados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas de la bebida Yamor (Chicha)</i> .....	50
<b>Tabla 11</b> <i>Instrumentos utilizados para la tinción de bacterias ácido lácticas de la bebida Yamor (Chicha)</i> .....	50
<b>Tabla 12</b> <i>Instrumentos utilizados para la prueba de catalasas</i> .....	51
<b>Tabla 13</b> <i>Instrumentos utilizados para la conservación de la BAL identificada</i> .....	51
<b>Tabla 14</b> <i>Instrumentos utilizados para la preparación del inóculo</i> .....	52
<b>Tabla 15</b> <i>Instrumentos utilizados para el establecimiento del sistema de fermentación</i> ...	52

<b>Tabla 16</b> Instrumentos utilizados para la determinación de los parámetros cinéticos a evaluar .....	53
<b>Tabla 17</b> Instrumentos utilizados para la obtención de la solución libre de células.....	54
<b>Tabla 18</b> Instrumentos utilizados para la replicación de las bacterias patógenas .....	54
<b>Tabla 19</b> Instrumentos utilizados para la realización del antibiograma.....	55
<b>Tabla 20</b> Factores y niveles del experimento para probar la cinética de crecimiento de la BAL implementando diferentes fuentes de carbono.....	65
<b>Tabla 21</b> Factores y niveles del experimento para probar la actividad antimicrobiana de la BAL frente a diferentes microorganismos patógenos .....	65
<b>Tabla 22</b> Tratamientos a comparar en la cinética de crecimiento .....	66
<b>Tabla 23</b> Tratamientos a comparar en la actividad antimicrobiana de la BAL frente a diferentes microorganismos patógenos.....	67
<b>Tabla 24</b> Esquema del análisis de varianza para la cinética de crecimiento microbiano para la producción de bacteriocinas.....	69
<b>Tabla 25</b> Esquema del análisis de varianza para la actividad antimicrobiana de la BAL frente a diferentes microorganismos patógenos .....	70
<b>Tabla 26</b> Propiedades fisicoquímicas determinadas de la Chicha del Yamor.....	72
<b>Tabla 27</b> Propiedades microbiológicas determinadas de la Chicha del Yamor.....	72
<b>Tabla 28</b> Resultados del análisis morfológico de las colonias identificadas .....	73
<b>Tabla 29</b> Resultados del análisis morfológica de las colonias identificadas .....	74
<b>Tabla 30</b> Resultados del análisis de varianza para la variable pH.....	79
<b>Tabla 31</b> Resultados del análisis de varianza para la variable acidez.....	80
<b>Tabla 32</b> Resultados del análisis de varianza para la variable densidad óptica (absorbancia).....	81
<b>Tabla 33</b> Resultados del análisis de varianza para la variable sólidos solubles (°Brix) ....	82

<b>Tabla 34</b> Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor A en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica.....	83
<b>Tabla 35</b> Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor B en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica.....	85
<b>Tabla 36</b> Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor C en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica.....	87
<b>Tabla 37</b> Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción ABC en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica .....	89
<b>Tabla 38</b> Matriz de correlación de los componentes principales de los parámetros cinéticos.....	95
<b>Tabla 39</b> Porcentaje de varianza total explicada .....	96
<b>Tabla 40</b> Matriz de componentes.....	97
<b>Tabla 41</b> Tabla de comunalidades.....	97
<b>Tabla 42</b> Resultados del análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición .....	99
<b>Tabla 43</b> Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor A en la variable diámetro del halo de inhibición.....	100
<b>Tabla 44</b> Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor B en la variable diámetro del halo de inhibición.....	101

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> <i>Clasificación de las bebidas fermentadas</i> .....	32
<b>Figura 2</b> <i>Procesos metabólicos de las bacterias ácido lácticas</i> .....	38
<b>Figura 3</b> <i>Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación</i> .....	45
<b>Figura 4</b> <i>Árbol filogenético realizado a base de secuencias 16S ARNr de BAL</i> .....	56
<b>Figura 5</b> <i>Cinética de fermentación de la variable pH</i> .....	76
<b>Figura 6</b> <i>Cinética de fermentación de la variable acidez</i> .....	76
<b>Figura 7</b> <i>Cinética de fermentación de la variable sólidos solubles (°Brix)</i> .....	77
<b>Figura 8</b> <i>Cinética de fermentación de la variable absorbancia (densidad óptica)</i> .....	78
<b>Figura 9</b> <i>Efecto de las fuentes de carbono en las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas</i> .....	78
<b>Figura 10</b> <i>Efecto de las concentraciones de los sustratos en las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas</i> .....	84
<b>Figura 11</b> <i>Efecto del tiempo de la fermentación en las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas</i> .....	86
<b>Figura 12</b> <i>Efecto de la interacción ABC en la fermentación de las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas</i> .....	88
<b>Figura 13</b> <i>Dendograma para relacionar los parámetros cinéticos evaluados</i> .....	91
<b>Figura 14</b> <i>Gráfico de sedimentación</i> .....	94
<b>Figura 15</b> <i>Gráfica de componentes principales</i> .....	96
<b>Figura 16</b> <i>Análisis del efecto del tipo de soluciones en la formación del halo de inhibición</i> .....	98
<b>Figura 17</b> <i>Análisis del efecto de los microorganismos patógenos en la formación del halo de inhibición</i> .....	100
<b>Figura 18</b> <i>Análisis del efecto de los microorganismos patógenos en la formación del halo de inhibición</i> .....	102

**Figura 19** *Gráfico de superficie de respuesta para la variable diámetro del halo de inhibición en relación la interacción AB* ..... 103

## Resumen

Las bebidas fermentadas son cada vez más populares en dietas saludables y forman parte de las tradiciones culturales en muchos países, incluyendo la chicha, una bebida alcohólica obtenida por la fermentación de maíz. La presente investigación tuvo como objetivo obtener bacteriocinas a partir de la bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor), considerando distintas fuentes de carbono y evaluar la actividad antagonista de estos frente a microorganismos patógenos. Se realizó un aislamiento de bacterias a partir de la Chicha del Yamor al tercer día de su fermentación, se identificó cepas de bacterias ácido lácticas mediante un análisis morfológico y microscópico, luego, tras la detección del gen 16s se identificó la especie *Lactobacillus fermentum*, después, se evaluó la influencia de diferentes fuentes de carbono (fructosa, glucosa, sacarosa y lactosa), concentraciones (2%, 5%) y tiempos de fermentación (0h, 24h, 48h y 72h) en el crecimiento de la bacteria, se realizó un diseño trifactorial para determinar las diferencias significativas, en base a los parámetros cinéticos se encontró que el medio suplementado con glucosa al 5% a las 72 horas resultó óptimo para el crecimiento de *L. fermentum*. Para evaluar la actividad antagonista de las bacteriocinas producidas, se planteó un diseño experimental bifactorial en el que se compararon los diámetros de inhibición (halos) entre los tipos de soluciones preparadas y microorganismos patógenos. Los resultados indicaron que la preparación de la solución con glucosa y bacteria permitió la mejor inhibición en *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri*. En conclusión, se identificó la bacteria *L. fermentum* de la bebida Yamor y se determinó que el mejor tratamiento fue glucosa al 5% durante 72 horas. Además, se demostró que las bacteriocinas producidas por esta cepa tienen actividad antagonista contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri*.

*Palabras clave:* bebidas fermentadas, Yamor, bacteriocinas, *Lactobacillus fermentum*, glucosa.

### Abstract

Fermented beverages are becoming increasingly popular in healthy diets and are part of cultural traditions in many countries, including chicha, an alcoholic beverage obtained by fermenting corn. The aim of this study was to obtain bacteriocins from the traditional fermented beverage of the Ecuadorian Sierra (Yamor), considering different carbon sources, and to evaluate their antagonistic activity against pathogenic microorganisms. Bacteria were isolated from Yamor Chicha on the third day of fermentation, and lactic acid bacteria strains were identified through morphological and microscopic analyses. After the detection of the 16s gene, the *Lactobacillus fermentum* species was identified. Then, the influence of different carbon sources (fructose, glucose, sucrose, and lactose), concentrations (2%, 5%), and fermentation times (0h, 24h, 48h, and 72h) on bacterial growth was evaluated. A trifactorial design was used to determine significant differences, and based on kinetic parameters, it was found that the medium supplemented with 5% glucose for 72 hours was optimal for *L. fermentum* growth. To evaluate the antagonistic activity of the produced bacteriocins, a bifactorial experimental design was proposed in which inhibition diameters (halos) were compared between prepared solutions and pathogenic microorganisms. The results indicated that the preparation of the solution with glucose and bacteria allowed the best inhibition of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus warneri*. In conclusion, the *L. fermentum* bacteria from Yamor beverage was identified, and the best treatment was determined to be 5% glucose for 72 hours. Additionally, it was demonstrated that the bacteriocins produced by this strain have antagonistic activity against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus warneri*.

*Key words:* fermented beverages, Yamor, bacteriocins, *Lactobacillus fermentum*, glucose.

## Capítulo I

### Introducción

Las bebidas fermentadas son alimentos muy reconocidos a nivel mundial y forman parte fundamental de las dietas locales en muchas culturas. Además, tienen un gran valor sociocultural, ya que son consumidas durante festividades y eventos especiales (Ojeda-Linares, et al., 2021). En todo el mundo, muchas culturas mantienen tradiciones culinarias basadas en alimentos fermentados, los cuales pueden ser preparados a base de cereales, como es el caso de América Latina y África, donde se utilizan maíz y sorgo para la elaboración de bebidas y panes (Anagnostopoulos & Tsaltas, 2019).

En la actualidad, las bebidas fermentadas han adquirido una gran importancia en la alimentación saludable, ya que pueden contribuir a prevenir enfermedades, proteger órganos, evitar padecimientos cardiovasculares, entre otros (Negrete-Romero, Valencia-Olivares, Baños-Dossetti, Pérez-Armendáriz, & Cardoso-Ugarte, 2021). Un ejemplo de estos productos es la Chicha, una bebida alcohólica obtenida por la fermentación de maíz en agua azucarada, la cual es utilizada en diferentes festividades religiosas en algunas culturas de los países en América Latina (Castillas-Corzo, Burbano-Argotti, & Salazar-Duque, 2020).

El objeto de estudio en este trabajo es la Chicha del Yamor, una bebida tradicional que se prepara de forma exclusiva en Otavalo, Ecuador, durante el mes de septiembre y surgió como una ofrenda de fertilidad de la tierra. Hoy en día, muchos locales la preparan durante todo el año para compartir su cultura con los turistas y habitantes del pueblo que la incluyen en su dieta diaria, debido a que, este producto es rico en vitaminas y minerales esenciales, posee un alto nivel nutricional, tiene propiedades antioxidantes, digestivas y nutricionales que mejoran el sistema inmunológico (Insuasti-Pérez, 2018). Además, investigaciones previas han logrado identificar cepas de bacterias ácido lácticas a partir

de esta bebida, lo que sugiere que es posible obtener bacteriocinas a partir de ella (Baca-Armas, Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha del Yamor [Tesis de ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial], 2016).

En estos productos, la fermentación es un proceso importante, ya que ocurre una transformación química de compuestos los primarios en metabolitos secundarios como ácidos orgánicos, vitaminas y péptidos antimicrobianos o bacteriocinas que ofrecen beneficios para la salud (Civas-Limon, et al., 2020). Las bacteriocinas son proteínas antimicrobianas producidas por ciertas cepas de bacterias, generalmente ácido lácticas y son una forma potencialmente prometedora de combatir las infecciones bacterianas en humanos y animales (Castellanos-Rozo, et al., 2022).

En este contexto, la presente investigación se enfoca en la obtención de bacteriocinas a partir de la Chicha del Yamor utilizando distintas fuentes de carbono y en evaluar su aplicación como agente antimicrobiano, la bacteria ácido láctica fue identificada mediante la secuenciación del gen 16S, a su vez se realizó una fermentación variando las concentraciones de cuatro sustratos con el fin de favorecer la producción de bacteriocinas y se realizó un antibiograma para evaluación su actividad antimicrobiana.

## Objetivos

### Objetivo General

- Obtener bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor) considerando distintas fuentes de carbono, para su aplicación como agente antimicrobiano

### Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida Yamor (Chicha).
- Evaluar la adición de distintas fuentes de carbono para el enriquecimiento de chicha Yamor, en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas para la estandarización de parámetros cinéticos microbianos.
- Determinar la concentración óptima de las fuentes de sustratos para el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas de la Chicha Yamor.
- Establecer las condiciones para la producción de bacteriocinas evaluando los parámetros cinéticos en distintos tiempos de fermentación
- Estudiar la actividad antagonista que generan las bacteriocinas obtenidas de la bebida fermentada tradicional (Yamor), en distintos microorganismos patógenos.

## Hipótesis

### Diseño AxBxC

#### Hipótesis Factor A (Fuentes de carbono)

- H0: La adición de fuentes de carbono no influye en los parámetros cinéticos del proceso fermentativo para la producción de bacteriocinas
- Ha: La adición de fuentes de carbono influye en los parámetros cinéticos del proceso fermentativo para la producción de bacteriocinas

#### Hipótesis Factor B (Concentración de sustratos)

- H0: La concentración de sustratos no influye en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas
- Ha: La concentración de sustratos influye en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas

#### Hipótesis Factor C (Tiempo de fermentación)

- H0: El tiempo de fermentación no influye en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas
- Ha: El tiempo de fermentación influye en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas

#### Hipótesis Interacción AxB (Fuentes de carbono\*Concentración de sustratos)

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores fuentes de carbono y concentración de sustratos no influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores fuentes de carbono y concentración de sustratos influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas

**Hipótesis Interacción AxC (Fuentes de carbono\*Tiempo de fermentación)**

- H0: El efecto de las interacciones entre los factores fuentes de carbono y tiempo de fermentación no influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas
- Ha: El efecto de las interacciones entre los factores fuentes de carbono y tiempo de fermentación influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas

**Hipótesis Interacción BxC (Concentración de sustratos\*Tiempo de fermentación)**

- H0: El efecto de las interacciones entre la concentración de sustratos y el tiempo de fermentación no influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas
- Ha: El efecto de las interacciones entre la concentración de sustratos y el tiempo de fermentación influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas

**Hipótesis Interacción AxBxC (Fuentes de carbono\*Concentración de sustratos\*Tiempo de fermentación)**

- H0: El efecto de las interacciones entre las fuentes de carbono, la concentración de sustratos y el tiempo de fermentación no influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas
- Ha: El efecto de las interacciones entre las fuentes de carbono, la concentración de sustratos y el tiempo de fermentación influyen en los parámetros cinéticos de la producción de bacteriocinas

## **Diseño AxB**

### **Hipótesis Factor A (Tipo de solución)**

- H0: El tipo de solución no influye en la actividad antagonista generada por las bacteriocinas obtenidas de la bebida Yamor
- Ha: El tipo de solución influye en la actividad antagonista generada por las bacteriocinas obtenidas de la bebida Yamor

### **Hipótesis Factor B (Microorganismos patógenos)**

- H0: La inhibición de los microorganismos patógenos no se ve influenciada por la actividad antagonista de las bacteriocinas
- Ha: La inhibición de los microorganismos patógenos se ve influenciada por la actividad antagonista de las bacteriocinas

### **Hipótesis Interacción AxB (Tipo de solución \* Microorganismos patógenos)**

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

## Capítulo II

### Revisión de literatura

#### Bebidas fermentadas

Las bebidas fermentadas son aquellos productos que han sido sometidos a procesos de transformación bioquímica por la acción de microorganismos o enzimas, que descomponen los carbohidratos en una variedad de compuestos, a este fenómeno se lo denomina fermentación (Voidarou, et al., 2021). Los procesos microbianos que ocurren durante la fermentación tienden a mejorar de forma natural las propiedades de los alimentos fermentados, por ello, estos productos tienen varias ventajas como una mayor vida útil, mejoras en las propiedades organolépticas, eliminación de ingredientes no deseados o nocivos en las materias primas, mejoras en las propiedades nutricionales, reducción del tiempo de cocción y mayor capacidad antioxidante in vitro, por estas razones, las bebidas fermentadas cumplen un papel importante en la dieta humana (Sharma, Garg, Kumar, Bhatia, & Kulshrestha, 2020).

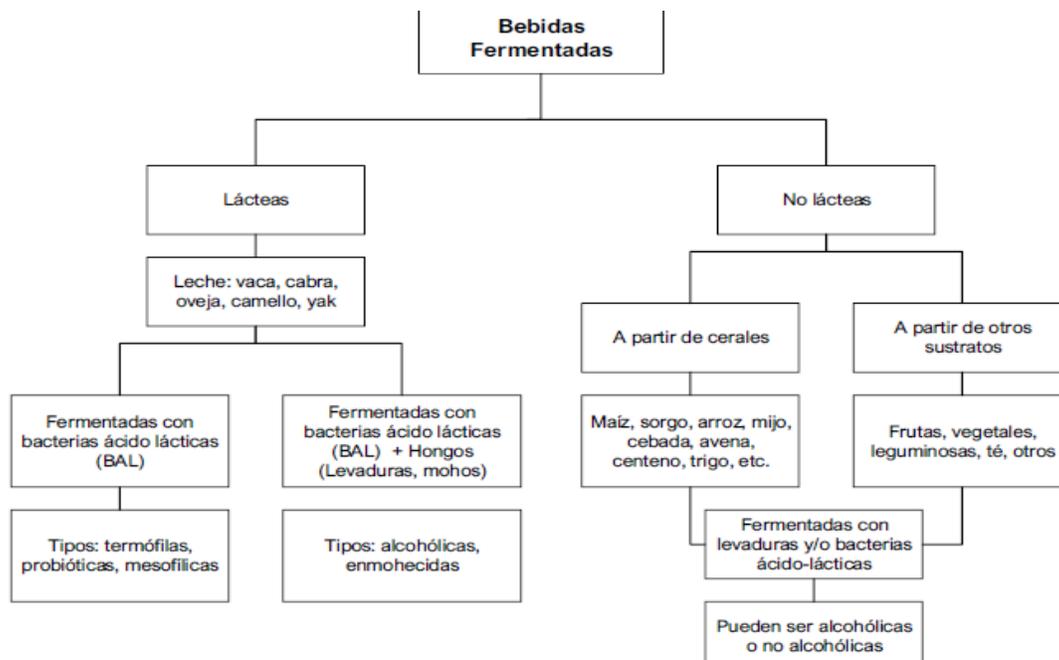
La chicha, es un ejemplo de este tipo de bebidas, la cual es un producto autóctono más importante y antiguo de Sudamérica, originaria de ciertos países de la región Andina, incluyendo Ecuador, Bolivia y Perú, así como algunas áreas de Brasil, Argentina, Venezuela, Chile y Colombia. Su producción es un aspecto clave de las festividades religiosas, sociales e incluso políticas de estas comunidades. Se trata de bebidas no destiladas que pueden o no estar fermentadas, en caso de estarlo, su contenido de alcohol rara vez supera el 5%, aunque esto puede variar hasta el 12%, dependiendo del método de producción utilizado (Chavés-López, et al., 2014).

Además, se conoce que las poblaciones indígenas de Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador utilizan comúnmente el cacao, el maíz y la yuca como sustratos para producir bebidas fermentadas (Faria-Oliveira, et al., 2015). Estos ingredientes se cultivan en las

condiciones climáticas locales y se procesan de manera artesanal, lo que puede dar lugar a variaciones en la calidad del producto final. Para su preparación, la mayoría de estos ingredientes requiere una cocción previa de los granos, seguida de un proceso de triturado y filtrado (Marsh, Hill, Ross, & Cotter, 2014).

**Figura 1**

*Clasificación de las bebidas fermentadas*



Nota. Descripción de las bebidas lácteas y no lácteas. Tomado de (Grijalva Vallejo, 2019).

Como se describe en la Figura 1, las bebidas fermentadas se clasifican en lácteas y no lácteas. Las bebidas lácteas son ampliamente conocidas y consumidas en todo el mundo debido a su popularidad en la cultura occidental y asociación con la salud, en especial aquellas que contienen bacterias ácido lácticas, se conoce que el consumo de estos productos proporciona diversos beneficios ya que se caracterizan por sus propiedades antimicrobiana y antitumorales, así como la estimulación del sistema inmunológico (Carballo-Marrero, Martínez-Rodríguez, Pérez, & Moya, 2019). Por otra parte, las bebidas no lácteas son muy populares en las regiones tropicales, son elaboradas a partir de materias primas como cereales, frutas, verduras, entre otros

sustratos, además, son productos ricos en probióticos y prebióticos (Vilela, Cosme, & Ines, 2020).

### **Chicha del Yamor**

La chicha del Yamor es una bebida ancestral que se originó entre los otavaleños, aunque también se relaciona con la cultura kichwa. Antiguamente, se utilizaba para ceremonias y curaciones. Aunque no existe una fiesta indígena específica en relación al Yamor, esta festividad nació mestiza y representa la identidad del pueblo. La chicha del Yamor es una bebida antiquísima cuya procedencia es desconocida, pero se sabe que fue elaborada por los kichwas Otavalo. Los ingredientes que la conforman incluyen siete tipos de maíz y miel de panela para obtener su característico sabor natural y dulce. La preparación es lenta y se realiza tradicionalmente en leña, cocinándose durante aproximadamente 12 horas y dejándose reposar en toneles de roble. Esta bebida es alta en nutrientes y beneficia la salud en términos antioxidantes, digestivos, nutricionales, de la flora intestinal y del sistema inmunológico. Es elaborada una vez al año por un grupo de personas que protegen y revalorizan esta bebida, y se ofrece tanto a propios como a extraños, lo que atrae a visitantes de otras etnias, como los kichwas Cayambi. La chicha del Yamor es parte de un complejo rito de agradecimiento y celebración por el ciclo agrario andino, y representa una expresión de la identidad cultural otavaleña (Insuasti-Pérez, 2018).

### **Variedades de maíz empleados en la Chicha del Yamor**

#### ***Maíz morado***

El maíz morado (*Zea mays* L.) es un cultivo y alimento común en los Andes de América del Sur, especialmente en Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina. Este maíz es único en el mundo por su color morado a negro en granos, coronta y brácteas, gracias a su alto contenido de antocianinas. Estos pigmentos son compuestos hidrosolubles pertenecientes al grupo de los flavonoides, que poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas. El

maíz morado contiene principalmente cianidina-3- $\beta$ -glucósido, pelargonidina-3-O- $\beta$ -D-glucósido, peonidina-3-O- $\beta$ -D-glucósido y sus derivados malonilglucósidos, que se encuentran en la coronta en mayor cantidad que en la cáscara del grano. Además, el maíz morado tiene un alto contenido de proteínas y minerales en comparación con otros tipos de maíz, lo que lo hace altamente valorado. El consumo de maíz morado se relaciona indirectamente con beneficios para la salud debido a su contenido de antioxidantes que pueden retrasar el daño causado por los radicales libres y reducir el riesgo de enfermedades como el cáncer, la neurodegeneración y la inflamación (Sánchez & Castro-Vargas, 2023).

### ***Maíz morocho***

El morocho es un tipo de grano que pertenece a la familia del maíz, el cual se caracteriza por ser blando y fácil de moler. Su composición es una frágil unión de proteínas, almidón y bolsas de aire, lo que permite que, al cocinarlo, absorba con facilidad líquidos del medio en el que se encuentra, especialmente si contiene lípidos como la leche de vaca. Al cocerse, su almidón se desprende de las proteínas expuestas, lo que hace que sea débil ante la energía transmitida. El morocho es una variedad de maíz de grano grande y duro, con una mazorca de color blanco. En Quichua, se le conoce como "muruchu". En Ecuador, el morocho se utiliza en varias recetas típicas, como la sopa de morocho, la bebida dulce de morocho, empanadas y coladas. Después de ser decortinado, el maíz blanco o mote se consume en granos. Esta variedad de maíz es rica en vitaminas, proteínas, fibras y sales minerales. El morocho es una variedad de maíz mejorada que se cultiva en la Sierra ecuatoriana, específicamente en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Imbabura y Chimborazo (Bolaños Vaca; Rubio Mero, 2020).

### ***Maíz canguil***

El maíz canguil es un cereal de grano, perteneciente a los siete tipos de maíz originarios del continente americano. A diferencia de los otros tipos de maíz, el canguil es

el único que tiene la particularidad de estallar. Se trata de una forma extrema del maíz, que posee endospermo duro en la mayor parte del grano, y una pequeña cantidad de almidón blando en la base del mismo. Los granos del canguil son pequeños y presentan un pericarpio grueso, variando en forma de redondos a oblongos. Al ser sometido a calor, el grano estalla y el endospermo se expande. La planta de maíz canguil es de tamaño bajo, con tallos débiles y maduración temprana. A pesar de producir más de dos mazorcas pequeñas, su rendimiento en peso es bajo en comparación a otros tipos de maíz, aunque no en número de granos (Aguilar Cortez, 2019).

### ***Maíz chulpi***

El maíz chulpi es un grano apetecido por su gran sabor, y es conocido por otros nombres como chullpi y *Zea Mays Amylosaccharata*. Este maíz se obtiene de una siembra en la región sierra y se caracteriza por su forma alargada y su color amarillo intenso debido al alto valor en betacaroteno presente en la mazorca. A medida que madura, el grano se vuelve arrugado. El maíz chulpi tiene múltiples beneficios, siendo un buen antioxidante, rico en carbohidratos y fibra, vitaminas y minerales como magnesio, hierro y fósforo, que fortalecen los tejidos musculares y ayudan en la digestión. Además, es capaz de disminuir el colesterol y metabolizar grasas a largo plazo, siendo una opción saludable para incluir en la dieta (Maza Martínez, 2021).

### ***Maíz blanco***

El maíz blanco harinoso se cultiva en la parroquia San José de Chazo, en el cantón Guano de la provincia de Chimborazo. Este tipo de maíz es de gran importancia económica ya que es muy valorado en el mercado para su consumo y comercialización (Obando Arequipa, 2019). Es un maíz suave, semidentado o corona redonda, y generalmente se utiliza como alimento humano. Algunas variedades se emplean en la elaboración de platos especiales y bebidas (Baca-Armas, Caracterización de

microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha del Yamor [Tesis de ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial], 2016).

### ***Maíz amarillo***

El maíz, originario de América, es un cereal fundamental en la alimentación mundial. Este tipo de maíz es utilizado tanto para consumo humano directo como para la alimentación de animales destinados a la producción de carne, debido a su alta conversión alimenticia. El maíz es un cereal muy versátil en cuanto a su uso industrial, siendo el más utilizado para la producción de productos básicos como almidón, dextrosa, jarabes y solubles. El grano de maíz se caracteriza por tener un endospermo córneo y duro en su parte externa, rodeado de una porción interna de almidón suave que se extiende hacia la parte superior del grano, lo que le da su apariencia dentada característica (INIA, 2020).

### ***Maíz jora***

La jora es una forma específica de maíz amarillo que ha pasado por un proceso de malteado que incluye hidratación, secado, germinación, tostado y molienda en harina. Esta harina se utiliza como ingrediente en algunos alimentos, particularmente en la elaboración de bebidas fermentadas tradicionales, como la chicha de Jora y la chicha del Yamor (Baca-Armas, Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha del Yamor [Tesis de ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial], 2016).

### **Fermentación**

La fermentación es un proceso que implica la descomposición de moléculas orgánicas grandes en moléculas más simples mediante la acción de microorganismos, como las enzimas de levadura que convierten azúcares y almidones en alcohol y las proteínas en péptidos y aminoácidos. Estas acciones microbianas o enzimáticas fermentan los alimentos y conducen a cambios bioquímicos deseables que mejoran la

calidad de los alimentos, como el mayor valor nutricional, los sabores y aromas mejorados y una apariencia atractiva (Xiang, Sun-Waterhouse, Waterhouse, Cui, & Ruan, 2019). Además, los microorganismos juegan un papel importante en la fermentación de los alimentos al mostrar cambios en las propiedades químicas y físicas de los alimentos, también son responsables del mayor valor nutricional de los alimentos fermentados, ya que los microorganismos son tanto catabólicos como anabólicos, descomponen compuestos complejos y sintetizan vitaminas complejas y otros factores de crecimiento (Melini, Melini, Luziatelli, Ficca, & Ruzzi, 2019), por ello son considerados los principales factores que influyen en los alimentos fermentados al igual que la composición de los sustratos. Además, para todos los alimentos y bebidas fermentados que se han identificado, la bacteria del ácido láctico (LAB) es la microbiota dominante y se considera la parte más crítica que contribuye a los efectos beneficiosos en productos (Sharma, Garg, Kumar, Bhatia, & Kulshrestha, 2020).

## **Bacterias ácido lácticas**

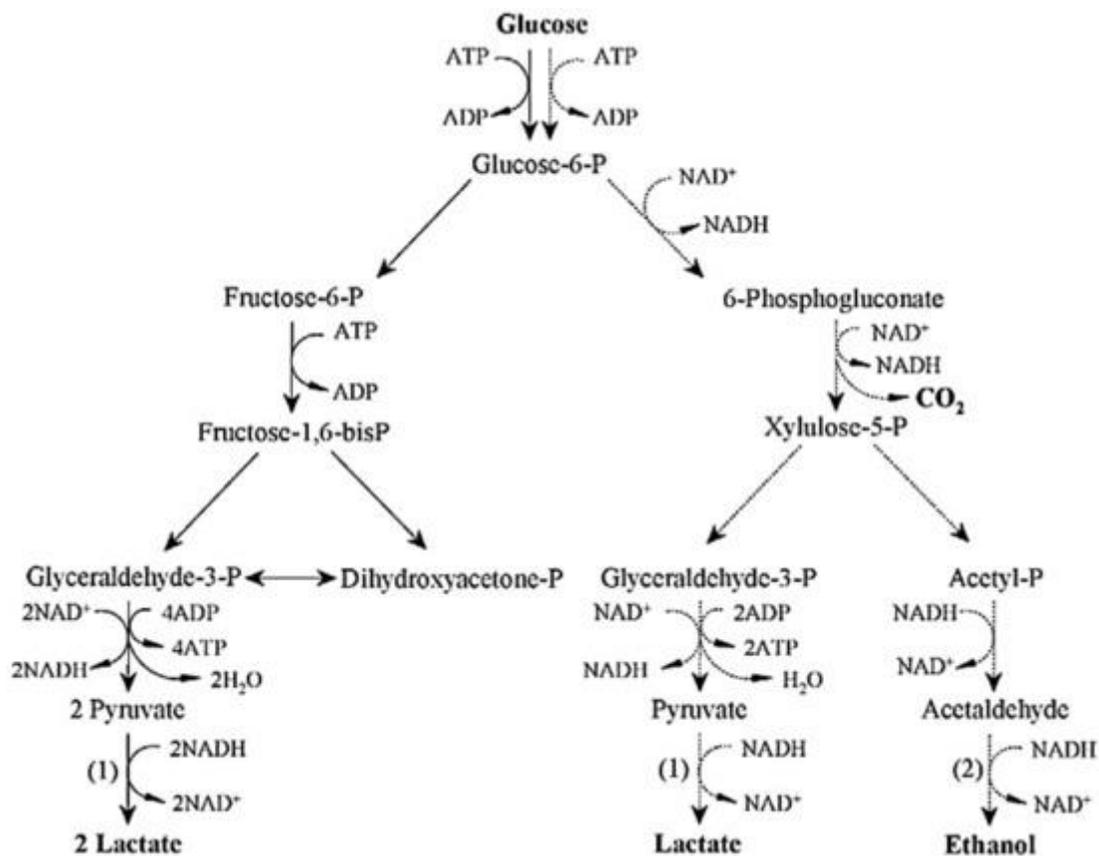
### ***Generalidades***

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un conjunto de bacterias que se caracterizan por ser grampositivas, no formadoras de esporas, no móviles, tolerantes a los ácidos, aerotolerantes, y se destacan por producir ácido láctico (LA) como su principal producto metabólico final cuando fermentan carbohidratos, especialmente la glucosa (Mora-Villalobos, et al., 2020). Existen varios géneros de bacterias del ácido láctico, entre ellos *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. De todos ellos, *Lactobacillus* es el género más grande, con más de 10 especies que se encuentran en abundancia en sustancias ricas en carbohidratos (Khalid, 2011).

Debido a la falta de un sistema respiratorio funcional, las BAL obtienen energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato y utilizan dos vías metabólicas para la fermentación de hexosas: la homofermentativa y la heterofermentativa. La primera vía se basa en la glucólisis y produce principalmente LA, mientras que la segunda, conocida como la vía de las pentosas fosfato, produce CO<sub>2</sub> y etanol o acetato, además de LA, así como se observa en la figura 2 (Mokoena, 2017).

**Figura 2**

*Procesos metabólicos de las bacterias ácido lácticas*



Nota. Vías: homofermentativas (representada por la línea continua) y heterofermentativas (representada por la línea punteada). Tomado de (Mora-Villalobos, et al., 2020)

## **Métodos de identificación**

### **Tinción Gram**

El propósito de esta técnica es la clasificación de bacterias basándose en su pared celular, distinguiendo entre Gram negativas y Gram positivas, lo que permite observar la morfología bacteriana. Los resultados de la tinción diferencial se basan en las características de la pared celular de las bacterias, como su morfología que puede ser de distintas formas, incluyendo bacilos, cocos, coco-bacilos, entre otros (Rodríguez González, 2009). En el caso de las bacterias del ácido láctico, se ha demostrado que son Gram positivas, no formadoras de esporas, no motilidad, y con forma de cocos, además de carecer de catalasa. Además, se ha observado que también pueden tener forma de bacilos con diferentes dimensiones, y son anaerobias facultativas y se pueden clasificar en heterofermentativas y homofermentativas (Parra Huertas, 2010). Para realizar la tinción se requiere la utilización de colorantes, agua, alcohol y calor, con el objetivo de teñir la muestra bacteriana, eliminar los excesos de los reactivos y fijar la muestra en cada etapa del proceso (Rodríguez González, 2009).

### **Prueba de catalasa**

Esta prueba es capaz de eliminar los productos tóxicos del oxígeno producidos por ciertas bacterias gracias a la enzima catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno. En el caso específico del género *Lactobacillus*, se sabe que es catalasa negativa, debido a que sus especies son anaerobias facultativas y carecen de esta enzima. Para realizar la prueba, se requiere tomar una muestra de la colonia sobre un portaobjetos y añadir agua oxigenada. Los resultados se diferencian por la presencia de burbujas en caso de ser positivo o la ausencia de burbujas en caso de ser negativa (Rodríguez González, 2009).

### **Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos cortos que se producen en los ribosomas y tienen la capacidad de inhibir bacterias. Estas sustancias están

estrechamente ligadas a la cepa que las produce y actúan destruyendo las células bacterianas que tienen receptores específicos en su superficie (Sugrue, O'Connor, Hill, Stanton, & Ross, 2020). Dependiendo de la capacidad de la bacteriocina para inhibir a otras bacterias, se clasifican como de espectro reducido o de amplio espectro, el primer caso ocurre cuando las bacteriocinas producidas por una bacteria solo inhiben a otras bacterias de la misma especie, mientras que, el segundo caso se da cuando pueden inhibir bacterias de otros géneros. Además, es notable que las células bacterianas productoras de bacteriocinas son inmunes a sus propias sustancias antimicrobianas, gracias a la producción de proteínas de inmunidad específicas por las células huésped (Juturu & Wu, 2018).

### **Clasificación**

Las bacteriocinas producidas por LAB suelen ser moléculas hidrofóbicas o anfífilas con carga positiva compuestas por 20 a 60 residuos de aminoácidos. Las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas se dividen generalmente en tres clases. La clase I incluye lantibióticos, pequeños péptidos que contienen aminoácidos inusuales y se subdividen en Tipo A y Tipo B según su estructura química y actividad antimicrobiana. Los lantibióticos de Tipo A son péptidos alargados con carga positiva, mientras que los lantibióticos de Tipo B son péptidos más pequeños con una carga negativa o neta nula. Las bacteriocinas de Clase II son péptidos no modificados, estables al calor y que no contienen lanthionine, y pueden dividirse en tres subgrupos, incluyendo los péptidos tipo pediocina de Clase IIa y las bacteriocinas de Clase IIb que requieren dos péptidos diferentes para su actividad. Las bacteriocinas de Clase III son proteínas grandes y lábiles al calor, y se ha sugerido una cuarta clase de bacteriocinas complejas que requieren moieties de carbohidratos o lípidos para su actividad, pero no se han caracterizado adecuadamente (Davidson, Taylor, & David, 2021).

### ***Propiedades bioquímicas de las bacteriocinas***

Las bacteriocinas producidas por BAL suelen ser estables a pH ácido o neutro, lo que sugiere que pueden estar adaptadas a su entorno natural. Sin embargo, existen excepciones como la nisina y la lactoestreptocina, cuya actividad antimicrobiana es altamente dependiente del pH, alcanzando la nisina su máxima estabilidad y solubilidad a pH 2,0 y volviéndose inactiva a pH 7,0. A diferencia de estas, otras bacteriocinas pueden mantener su actividad en un rango de pH entre 4,2 y 5,0 pero inactivarse a pH de 7,0 a 8,0. A pesar de esto, algunas bacteriocinas han demostrado ser resistentes a un rango de pH entre 3,0 y 9,0 (Martin Katusic, 2002).

### ***Producción y secreción de bacteriocinas***

La producción de bacteriocinas está estrechamente relacionada con el crecimiento y la actividad fisiológica de la cepa productora. Además, la cantidad de bacteriocina producida está correlacionada con la biomasa obtenida. Para determinar la cantidad de bacteriocina que se producirá, se debe tener en cuenta la naturaleza de la cepa productora, la composición del medio de cultivo (fuentes de nitrógeno, carbono y fósforo), las condiciones de fermentación (tiempo de crecimiento, temperatura, pH inicial y final, y agitación). En particular, el pH y la temperatura del medio son fundamentales para la producción de bacteriocinas por algunas BAL (Wu, Yin, & Jiang, 2004).

### ***Mecanismo de acción***

La acción de las bacteriocinas depende de varios factores como la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y expresión de proteínas de inmunidad y la composición química del ambiente. Un mecanismo común de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas es la formación de poros en la membrana citoplásmica de células sensibles, lo que causa la liberación de compuestos y iones como el ATP y K, lo que afecta la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos. Esta pérdida de sustancias lleva a la disminución

de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que conduce a la inhibición o muerte celular (Agudelo Londoño, 2013).

### **Aplicaciones**

Las bacteriocinas tienen aplicaciones importantes en la salud humana, especialmente en el uso de los productores de bacteriocinas como probióticos. Los probióticos son cepas no tóxicas y no patógenas que ofrecen beneficios al huésped, ya que pueden sobrevivir y mantener la actividad metabólica en el ambiente intestinal durante períodos prolongados de almacenamiento. Los probióticos tienen la capacidad de producir antimicrobianos, competir por nutrientes, destruir patógenos de forma competitiva y modular el sistema inmunológico. Las bacterias del ácido láctico, *E. coli* no patógena, bacilos y levaduras son algunos de los probióticos utilizados en la vida diaria. Además, los probióticos producen diversas sustancias antibacterianas, como bacteriocinas, ácidos grasos de cadena corta y peróxido de hidrógeno, para inhibir los patógenos gastrointestinales (Zimina, et al., 2020).

Otra de las aplicaciones es en la conservación de alimentos donde la industria alimentaria ha investigado extensamente el uso de estas sustancias en productos lácteos, huevos, vegetales y productos cárnicos. Además de su papel en la conservación de alimentos, las bacteriocinas también pueden mejorar la calidad de los mismos y sus propiedades sensoriales, como aumentar la tasa de proteólisis o prevenir el defecto de gasificación en el queso. El envasado bioactivo es otra aplicación de las bacteriocinas, donde se utiliza este proceso para proteger los alimentos de contaminaciones externas, lo que resulta en una mejora de la seguridad alimentaria y prolongación de la vida útil (Negash & Tsehai, 2020).

## **Métodos para evaluar la actividad de bacteriocina en ensayos in vitro**

### ***Método de difusión de discos***

En la actualidad, hay distintos métodos in vitro que se utilizan para investigar la actividad antimicrobiana de agentes terapéuticos. Uno de ellos es el método de difusión de discos, que fue desarrollado por Heatley en 1940. Este procedimiento consiste en sembrar el inóculo bacteriano sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton y colocar sobre ella discos de papel filtro impregnados con diferentes concentraciones del producto que se está evaluando. El producto se difunde desde el disco hacia el agar, inhibiendo el crecimiento del microorganismo y formando halos de inhibición de diferentes tamaños. La medición de estos halos permite obtener resultados semicuantitativos y clasificar a las bacterias como susceptibles, intermedias o resistentes en función del tamaño del halo de inhibición (Balouiri, Moulay, & Ibnsouda, 2016).

### ***Método de difusión en pozo de agar***

El método de difusión en pozos de agar es comúnmente utilizado para examinar la efectividad antimicrobiana de plantas o extractos microbianos. El proceso es similar al del método de difusión en disco, donde se extiende una cantidad de inóculo microbiano sobre la superficie de la placa de agar. Luego, se hace un agujero aséptico de 6 a 8 mm de diámetro con un sacacorchos estéril o una punta y se añade un volumen (20-100  $\mu\text{L}$ ) de la solución antimicrobiana. Las placas de agar se incuban en condiciones apropiadas según el microorganismo utilizado en la prueba, y el agente antimicrobiano se difunde en el medio de agar, reprimiendo el crecimiento de la cepa microbiana en examen (Balouiri, Moulay, & Ibnsouda, 2016).

## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del área de investigación

##### *Ubicación política*

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

##### *Ubicación ecológica*

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

Fuente: Estación Agro Meteorológica "Puerto Ila", Vía Quevedo km 34.

### Ubicación geográfica

El presente proyecto de Integración Curricular se realizó en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" Extensión Santo Domingo, específicamente en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de los Alimentos.

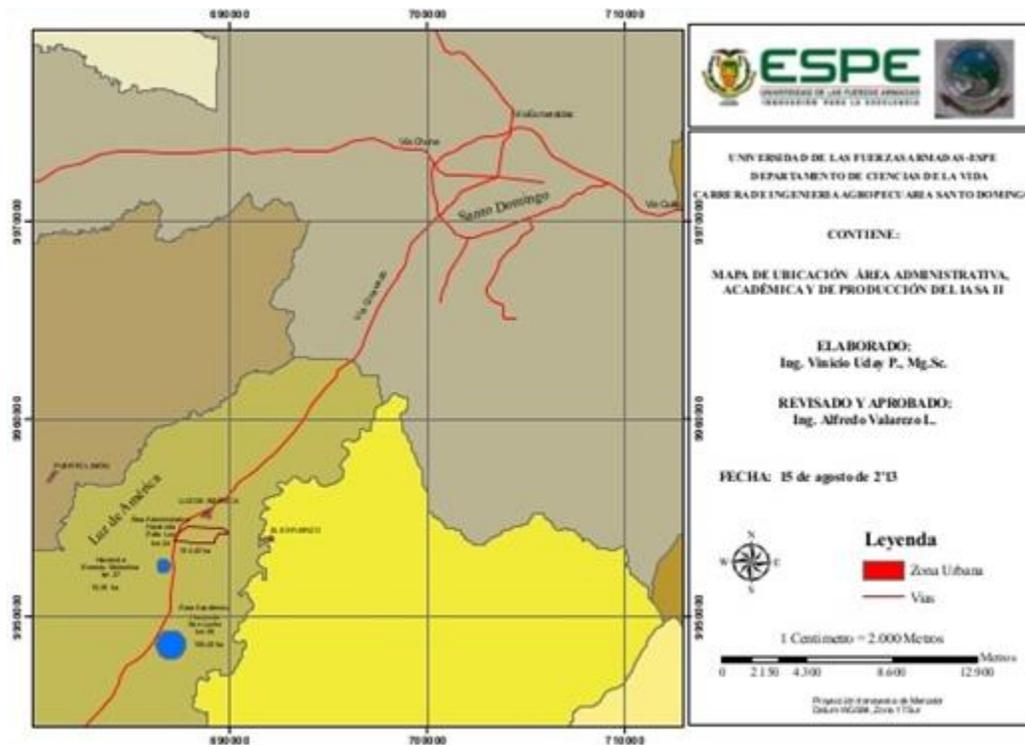
Latitud: 00° 24' 36"

Longitud: 79° 18' 43"

Altitud: 270 msnm

### Figura 3

Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación



Nota. El gráfico representa la ubicación geográfica del lugar donde se realizó la investigación

## Materiales

### *Elaboración de la bebida fermentada tradicional “Chicha del Yamor”*

**Tabla 1**

*Instrumentos utilizados en la elaboración de la bebida tradicional "Chicha del Yamor"*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Moedor	Cedazos	Agua	Canguil
Cocina de leña	Ollas		Morocho
Sistema de fermentación	Revolvedor de madera		Maíz negro
	Leña		Maíz amarillo
			Chulpi
			Jora
			Maíz blanco

### *Caracterización fisicoquímica de la “Chicha del Yamor”*

#### **Determinación de pH.**

**Tabla 2**

*Instrumentos utilizados para la determinación del pH de la Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Potenciómetro	Piseta	Agua destilada	Fermentado de la
	Vaso de precipitación 25 ml		Chicha del Yamor
	Probeta de 25 ml		

### Determinación de acidez.

**Tabla 3**

*Instrumentos utilizados para la determinación de la acidez titulable de la Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Potenciómetro	Probeta 25 ml	NaOH 0,1 N	Fermentado de la
Kit de titulación	Balón de aforo de 250 ml	Agua destilada	Chicha del Yamor
Plato agitador	Piseta		
	Vaso de precipitación 50 ml		
	Agitador magnético		

### Determinación de densidad relativa

**Tabla 4**

*Instrumentos utilizados para la determinación de la densidad relativa de la Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Balanza analítica	Picnómetro	Agua destilada	Fermentado de la Chicha
	Piseta		del Yamor

### Determinación de grados alcohólicos

**Tabla 5**

*Instrumentos utilizados para la determinación de los grados alcohólicos de la Chicha del Yamor*

<b>Insumos</b>	<b>Muestra</b>
Alcoholímetro	Fermentado de la Chicha del Yamor
Probeta 500 ml	

### Determinación de sólidos solubles

**Tabla 6**

*Instrumentos utilizados para la determinación de sólidos solubles de la Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Refractómetro	Gotero Piseta	Agua destilada	Fermentado de la Chicha del Yamor

### Determinación de densidad óptica

**Tabla 7**

*Instrumentos utilizados para la determinación de la densidad óptica de la Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Espectrofotómetro	Celdas de cuarzos Piseta	Agua destilada	Fermentado de la Chicha del Yamor

### **Caracterización microbiológica de la “Chicha del Yamor”**

#### **Recuento de mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas y aerobios mesófilos**

**Tabla 8**

*Instrumentos utilizados para el conteo de mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas y aerobios mesófilos de la Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Petriefilm	Agua de peptona	Fermentado de la Chicha del Yamor
Vortex	Tubos de ensayo		
Balanza analítica	Frasco para medio		

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Autoclave	Gradilla		
Plato agitador y calentador	Puntas		
Incubadora	Micropipeta		
Contador de colonias	Espacidor Petrifilm		
	Rotulador		
	Mechero		
	Barra magnética		

***Siembra de muestra de bebida fermentada “Chicha del Yamor”***

**Tabla 9**

*Instrumentos utilizados para la siembra de la muestra de la bebida Chicha del Yamor*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Tubos de ensayo	Agua de peptona	Fermentado de la
Vortex	Frasco para medio	MRS Agar	Chicha del Yamor
Balanza analítica	Gradilla		
Autoclave	Puntas		
Plato agitador y calentador	Micropipeta		
Incubadora	Cajas Petri		
	Parafilm		
	Fundas ziploc		
	Asa de Brigalski		
	Rotulador		
	Mechero		
	Barra magnética		

***Aislamiento de bacterias ácido lácticas de la bebida Yamor (Chicha)***

**Tabla 10**

*Recursos utilizados para el aislamiento de bacterias ácido lácticas de la bebida Yamor (Chicha)*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Frasco para medio	MRS Agar	Siembra del
Balanza analítica	Cajas Petri		fermentado de la
Autoclave	Parafilm		Chicha del Yamor
Plato agitador y calentador	Fundas ziploc		
Incubadora	Asa bacteriológica		
	Rotulador		
	Mechero		
	Barra magnética		

***Identificación de bacterias ácido lácticas***

**Tinción Gram**

**Tabla 11**

*Instrumentos utilizados para la tinción de bacterias ácido lácticas de la bebida Yamor (Chicha)*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica	Lugol	Siembra del
Autoclave	Rotulador	Alcohol cetona	fermentado de la
Microscopio	Portaobjetos	Safranina	Chicha del Yamor
	Mechero	Cristal violeta	
	Piseta	Agua destilada	

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
	Goteros		

### Prueba de catalasas

**Tabla 12**

*Instrumentos utilizados para la prueba de catalasas*

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Asa bacteriológica	Peróxido de	Siembra del
Autoclave	Rotulador	hidrógeno	fermentado de la
	Portaobjetos		Chicha del Yamor
	Mechero		
	Goteros		

### Conservación de la bacteria ácido láctica identificada

**Tabla 13**

*Instrumentos utilizados para la conservación de la BAL identificada*

Equipos	Insumos	Reactivos	Muestra
Cámara de flujo laminar	Micropipeta	Glicerol	Inoculado de la
Autoclave	Puntas		bacteria ácido láctica
	Rotulador		identificada
	Mechero		
	Goteros		
	Tubos eppendorf		

## ***Cinética de crecimiento bacteriano***

### **Preparación del inóculo**

**Tabla 14**

*Instrumentos utilizados para la preparación del inóculo*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Matraz de 200 ml	MRS caldo	Bacteria ácido
Balanza analítica	Frasco para medio	Agua destilada	láctica identificada
Autoclave	Rotulador		
Plato agitador y	Mechero		
calentador	Asa bacteriológica		
Incubadora	Barra magnética		
	Parafilm		
	Algodón		
	Cinta masking		
	Probeta		

### **Establecimiento del sistema de fermentación**

**Tabla 15**

*Instrumentos utilizados para el establecimiento del sistema de fermentación*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Matraz de 250 ml	MRS caldo	Inóculo de la
Balanza analítica	Frasco para medio	Agua destilada	bacteria ácido
Autoclave	Micropipeta	Glucosa	láctica identificada
Plato agitador y	Puntas	Fructosa	
calentador	Rotulador	Lactosa	

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Incubadora	Mechero	Sacarosa	
	Barra magnética		
	Parafilm		
	Algodón		
	Cinta masking		
	Probeta		
	Sistema de muestreo		

### Determinación de parámetros cinéticos

**Tabla 16**

*Instrumentos utilizados para la determinación de los parámetros cinéticos a evaluar*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Kit de titulación	Celdas de cuarzo	NaOH 0,1N	Fermentado de
Potenciómetro	Gotero	Agua destilada	los distintos
Plato agitador	Piseta		medios de cultivo
Espectrofotómetro	Probeta de 25 ml		
Refractómetro	Vaso de precipitación de 50 ml		
	Balón de aforo de 250 ml		
	Barra magnética		

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de la bacteria ácido láctica**

**Obtención de solución libre de células**

**Tabla 17**

*Instrumentos utilizados para la obtención de la solución libre de células*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Centrífuga	Tubos de ensayo	NaOH 0,1N	Fermentado de
Cámara de flujo laminar	Frasco de vidrio de 50	Agua destilada	los distintos
Potenciómetro	ml		medios de cultivo
Kit de titulación	Jeringa de 10 ml		
Plato agitador	Barra magnética		
Autoclave	Papel filtro		
	Embudo		
	Rotulador		

**Replicación de las bacterias patógenas**

**Tabla 18**

*Instrumentos utilizados para la replicación de las bacterias patógenas*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Cajas petri	MRS Agar	Banco de
Plato agitador y	Frasco para medio	Agua destilada	microorganismos
calentador	Barra magnética		patógenos
Autoclave	Parafilm		
Balanza analítica	Rotulador		
Vortex	Asa bacteriológica		
Incubadora			

## Antibiograma

**Tabla 19**

*Instrumentos utilizados para la realización del antibiograma*

<b>Equipos</b>	<b>Insumos</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Muestra</b>
Cámara de flujo laminar	Cajas petri	Agar Mueller -	Solución libre de
Plato agitador y	Frasco para medio	Hinton	células
calentador	Sacabocados	Agua destilada	Solución MO de
Autoclave	Barra magnética		patógenos
Balanza analítica	Parafilm		
Vortex	Rotulador		
Incubadora	Hisopos estériles		
	Micropipeta		
	Puntas		
	Vaso de precipitación		
	de 25 ml		

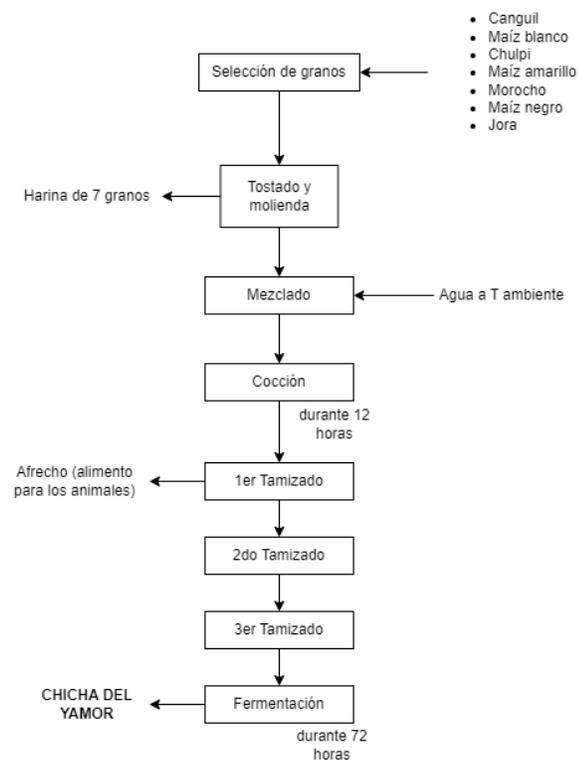
## Métodos

### ***Elaboración de la bebida fermentada tradicional “Chicha del Yamor”***

La preparación de la Chicha del Yamor fue guiada por la señora Anita Albuja, propietaria del restaurante “El auténtico Yamor” ubicado en la ciudad de Otavalo. Para este proceso, se seleccionaron los mejores granos de morocho, canguil, maíz amarillo, chulpi, maíz blanco, maíz negro y jora. Luego, estos granos fueron tostados y molidos con el fin de convertirlos en harina. Se procedió a diluir la harina en agua a temperatura ambiente y se colocó esta mezcla en ollas que contenían agua hirviendo. La cocción tarda aproximadamente 12 horas. Una vez finalizado este tiempo, se procedió a cernirlos en tres diferentes cedazos, el mosto resultante se va a utilizar en la investigación. Además, cabe mencionar que la preparación fue realizada en una cocina de leña.

## Figura 4

### *Proceso de elaboración de la Chicha del Yamor*



### ***Fermentación de la Chicha del Yamor***

Para comenzar el proceso de fermentación, se colocó el mosto obtenido en un fermentador compuesto por una botella de vidrio conectada a una trampa de agua mediante una manguera. Luego, se cubrió con papel aluminio con el fin de proteger el fermentador de la luz y se dejó fermentar durante 72 horas.

### ***Caracterización fisicoquímica de la Chicha del Yamor***

#### **Determinación de pH**

Para la determinación de los valores de pH se efectuó la metodología descrita en la Norma INEN 2325 (2002)

En un vaso de precipitación, se colocaron 25 mL del fermentado y se agitó suavemente. Luego, se introdujo el electrodo del potenciómetro, asegurándose de que no hiciera contacto con las paredes del recipiente. Finalmente, al observar la estabilidad del equipo, se anotaron los valores marcados. Cabe mencionar que este análisis se realizó por duplicado sobre la misma muestra.

#### **Determinación de acidez**

Para la determinación de la acidez se llevó a cabo considerando el procedimiento establecido en la Norma INEN 381 (1985).

Para comenzar, se preparó la muestra añadiendo 25 ml del fermentado en un balón de aforo de 250 ml, luego se agregó agua destilada hasta la marca establecida y se mezcló lentamente. Para medir la acidez, se tomó una porción de 25 ml de la disolución preparada anteriormente y fue colocada en un matraz volumétrico. A continuación, se procedió a armar el equipo de titulación que consistió en una bureta con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N. En la muestra se introdujo un agitador magnético y fue colocada debajo de la bureta. Se añadió lentamente el NaOH hasta alcanzar un pH de 7. Luego, se continuó agregando el reactivo hasta conseguir un pH máximo de 8,3. Por último, por interpolación se determinó el volumen de NaOH necesario para llegar a un pH de 8,1.

El valor de la acidez titulable se calculó mediante la siguiente ecuación:

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

Siendo

A = g de ácido en 1 litro de producto

$V_1$  =  $cm^3$  de NaOH utilizados en la titulación

$M_1$  = normalidad de la solución de NaOH

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

### **Determinación de Sólidos solubles (°Brix)**

Para la determinación de los grados brix, se empleó un refractómetro digital.

Primero, se procedió a calibrar el equipo utilizando agua destilada. Se presionó el botón de Zero durante 4 segundos. Luego, se colocaron algunas gotas del fermentado en la superficie de muestreo. Se presionó el botón de Start dos veces. Finalmente, se anotó el valor indicado en la pantalla.

### **Determinación de la densidad óptica**

Para la determinación de la absorbancia, se utilizó un espectrofotómetro. Para comenzar, se calibró el equipo colocando agua destilada en una celda de cuarzo. El valor resultante debe ser de 0,000A. Luego, se colocó la muestra del fermentado cuidadosamente en una celda de cuarzo y se la colocó dentro del equipo. Se cerró la tapa y se efectuó la lectura.

### **Determinación de grados alcohólicos**

Para la medición del contenido de alcohol se consideró la metodología establecida en la Norma INEN 340 (2016).

En una probeta limpia y seca se colocó la muestra del fermentado. Luego, se sumergió el alcoholímetro suavemente durante 10 minutos. Es importante lavar y secar el instrumental antes de utilizarlo, ya que cualquier cuerpo extraño puede alterar los valores

de lectura. Una vez que el alcoholímetro flote libremente en la probeta, se realiza la lectura.

### **Determinación de la densidad relativa**

La determinación de la densidad relativa se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la Norma INEN 349 (1978)

En la balanza analítica se pesó el picnómetro que se encontraba limpio y seco, luego se colocó cuidadosamente la muestra del fermentado hasta la marca establecida, se tapó el instrumental y se pesó. Por último, se colocó agua destilada en el picnómetro, se tapó y se pesó nuevamente. Es importante mencionar que al momento de agregar el contenido al recipiente se debe evitar la formación de burbujas de aire, además la determinación se realizó por duplicado sobre la misma muestra.

La densidad relativa se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$d = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1}$$

Donde:

$d$  = densidad relativa a 20°C/20°C

$m_1$  = masa del picnómetro vacío, en gramos

$m_2$  = masa del picnómetro con muestra, en gramos

$m_3$  = masa del picnómetro con agua destilada, en gramos

### ***Caracterización microbiológica de la Chicha del Yamor***

#### **Recuento de mohos y levaduras, ácido lácticas y aerobios mesófilos**

Después de 72 horas de fermentación, se recolectó una pequeña cantidad de la Chicha del Yamor para realizar diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  usando agua de peptona. Se prepararon 4 tubos con 9 ml de agua de peptona. En el primer tubo, se agregó 1 ml de la muestra y se mezcló, lo cual corresponde a la dilución  $10^{-1}$ . A partir de este tubo, se extrajo 1 ml y se inoculó en el tubo 2 para obtener la dilución  $10^{-2}$  y así sucesivamente

hasta obtener la dilución  $10^{-4}$ . Posteriormente, con la ayuda de una micropipeta, se tomó 1 ml de la dilución  $10^{-4}$ , se colocó en el centro de la cuadrícula del petrifilm, se presionó la placa suavemente con el esparcidor y fue colocado en la incubadora. Los petrifilm empleados correspondieron a mohos y levaduras, ácido lácticas y aerobios mesófilos. La incubación de los petrifilm se llevó a cabo en condiciones específicas. Para ácido lácticas y aeróbicos mesófilos se incubó a una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. En el caso de mohos y levaduras fue por 72 h a  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se utilizó un contador de colonias para realizar el conteo de las mismas y se calculó el valor de las unidades formadoras de colonias mediante la siguiente ecuación:

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

#### ***Siembra de muestra de bebida fermentada “Chicha del Yamor”***

De la última dilución correspondiente a  $10^{-4}$  preparada en la caracterización microbiológica, se extrajo 1 ml y se colocó en una caja petri que contenía 20 ml de agar MRS. Se realizó una siembra por extensión utilizando un asa drigalski para espaciar las células de forma uniforme por todo el medio de cultivo. Finalmente, se sellaron las cajas con parafilm y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 h.

#### ***Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas***

Después del período de incubación de 48 h, se observaron diferentes colonias en las placas sembradas, de las cuales, se realizaron nuevos aislamientos basados en observación morfológica eligiendo aquellas por color, opacidad, forma y consistencia, para ello, se prepararon cajas petri con agar MRS y se realizó una siembra por estrías usando un asa bacteriológica. Por último, se utilizó parafilm para sellar las cajas y fueron colocadas en la incubadora por 48 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cabe mencionar que este proceso fue repetido alrededor de 4 veces con el propósito de purificar las colonias.

## ***Identificación de Ácido Lácticas***

### **Tinción Gram**

Para preparar la placa, en un portaobjetos se colocó una gota de agua. Seguidamente con un asa bacteriológica se recogió una pequeña cantidad de la caja que contenía la bacteria a identificar. Luego se esparció en el portaobjetos y se procedió a fijar el contenido empleando la llama de un mechero. Una vez seco el extendido bacteriano, se efectuó la tinción. Para ello, primero se colocó cristal violeta en la placa durante 1 min. Luego se agregó lugol por 1 min. Seguidamente, se añadió alcohol cetona durante 15 segundos. Por último, se colocó safranina por 1 min. Cabe mencionar que en cada paso se realizó un lavado con agua destilada y que la placa fue secada con ayuda del mechero. Para el análisis se utilizó un microscopio donde se observó bajo el lente de 100x usando aceite de inmersión (Silva Zuta, 2021).

### **Morfología celular**

Se observaron las colonias de las placas donde previamente se efectuó la tinción Gram, durante este análisis se consideraron diferentes características como el color, opacidad, forma y consistencia (Pérez Pérez & Trinidad Díaz, 2022).

### **Prueba de catalasa**

Se añadió una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos. Luego, con un asa bacteriológica, se recolectó una pequeña porción de la muestra y se procedió a esparcirla por toda la gota. Durante 20 segundos se observó la reacción que se producía. Si la reacción es positiva, se producen burbujas, caso contrario el resultado es negativo (Rodríguez Arana, 2018).

### **Caracterización molecular**

Se enviaron las bacterias obtenidas a la empresa MacroGen Inc., en Seúl, Corea, para confirmar su identificación mediante la detección del gen 16s del ARNr, enviando las muestras por duplicado en cajas Petri. Las secuencias obtenidas fueron procesadas

mediante herramientas bioinformáticas, usando diferentes softwares como Bioedit y MEGA X, y se realizó un Blast en la plataforma del NCBI. Además, se llevó a cabo un análisis filogenético comparando con otras secuencias existentes en la base de datos del GENE BANK.

### ***Conservación de la bacteria ácido láctica***

Para la conservación de la bacteria identificada se llevó a cabo el proceso de congelamiento descrito por (Ramírez-López & Vélez-Ruiz, 2016), con ciertas modificaciones. Primero, se extrajo 10 ml del inóculo de la bacteria y se añadió glicerol al 30% (v/v). Luego, se homogeneizó la mezcla y se distribuyó en tubos eppendorf, los cuales fueron cerrados de forma hermética. Por último, se almacenaron en un congelador a - 20°C para garantizar su conservación.

### ***Cinética de crecimiento bacteriano***

#### **Preparación del inóculo**

La preparación del inóculo se realizó en matraces Erlenmeyer con caldo de cultivo (MRS). En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se preparó 200 ml de caldo MRS y con ayuda del asa bacteriológica se agregó 2 veces la muestra de cultivo. Dicho tratamiento se realizó de forma discontinua a 37°C sin agitación por 48 h.

#### **Establecimiento del sistema de fermentación**

Para la fermentación se consideró la metodología descrita por (Miao, et al., 2015) con ciertas modificaciones, los sistemas fueron establecidos en matraces Erlenmeyer con caldo de cultivo MRS. Se utilizaron matraces de 250 ml a los cuales se añadieron 200 ml de caldo MRS, junto con una fuente de nitrógeno a razón de 1 % p/v para asegurar un ambiente adecuado para el crecimiento de las bacterias. Adicionalmente, se añadieron diferentes fuentes de carbono, las cuales corresponden a glucosa, sacarosa, lactosa y fructosa a una concentración de 2 y 5 % p/v, respectivamente, esto con el objetivo de comparar los resultados obtenidos en cada tratamiento. Se agregaron 2 ml de la muestra

de cultivo a una razón del 1 % v/v para iniciar la fermentación. Finalmente, se implementó un sistema de muestreo.

### **Determinación de parámetros cinéticos**

Para recolectar los datos de los parámetros cinéticos, se tomaron muestras de los sistemas de fermentación en diferentes momentos utilizando una jeringa. Los puntos de recolección establecidos fueron a las 0 h, 24 h, 48 h, 36 h. Estas muestras se utilizaron para medir el pH, grados brix, acidez y absorbancia.

### ***Evaluación de la actividad antimicrobiana de la bacteria ácido láctica***

#### **Obtención de solución libre de células**

Transcurrido el tiempo de fermentación, se retiraron las células mediante centrifugación. Se utilizaron tubos de ensayo y se añadieron 7 ml de muestra de la mejor fermentación completando un total de 42 ml, este fue elegido en base al análisis estadístico. Los tubos fueron centrifugados a 9000 rpm durante 20 minutos, este proceso se repitió dos veces. Una vez finalizada la centrifugación, se extrajo el sobrenadante y se ajustó el pH a 6,2 para evitar la acción de los ácidos orgánicos. Finalmente, el líquido obtenido se filtró a través de una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  y se almacenó en refrigeración hasta su uso (Vásquez, Suárez, & Montoya, 2009).

#### **Replicación de bacterias patógenas**

Para evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos libres de células que contienen bacteriocinas, se utilizaron tres diferentes microorganismos patógenos: *Lysinibacillus fusiformis*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri*. Las muestras de estos fueron aisladas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Debido a que se encontraban preservadas se realizó una siembra y luego su replicación. Además, fueron incubadas a 37 °C durante 48 h.

### **Preparación de placas para inmuno sensibilidad antimicrobiana**

Se preparó el medio Agar Mueller Hinton específico para pruebas de inmuno sensibilidad antimicrobiana, mismo que se dispensó en cajas petri y en el cual se realizó un frotis del inóculo para las 3 distintas bacterias patógenas usadas, sobre la superficie del agar selectivo mencionado que es específico para este método. Cabe destacar que, el inóculo se preparó tomando con el asa bacteriológica una pequeña muestra de la bacteria patógena y se diluyó en solución salina, luego, fue ajustada a 0,5 escala de MacFarland, para después con ayuda de un hisopo esteril realizar el respectivo frotis sobre el agar mencionado (Martínez Alday, 2018).

### **Método de pozos**

Con la ayuda de un sacabocados estéril se procedieron a hacer 7 perforaciones de aproximadamente 6 mm de diámetro en cada una de las placas con medio Mueller Hinton, de los cuales, el orificio central sirvió como control negativo y en el resto de perforaciones fue donde se colocó a distintos volúmenes la solución libre de células obtenida a partir del mejor método de fermentación obtenido. Dichas placas fueron incubadas por 24 h (Martínez Alday, 2018).

### **Medición de halos de sensibilidad antimicrobiana**

Para medir cada caja petri, se la expuso de forma indirecta a la luz y se procedió a medir e interpretar sus resultados con la ayuda de una regla graduada con forma rectangular. De ello, se realizó una medida del diámetro que presentó el halo, considerando el pozo inicial hecho con el sacabocados de 6 mm. Dichas medidas fueron tomadas a las 24.

## Diseño experimental

### *Factores y niveles del experimento*

**Tabla 20**

*Factores y niveles del experimento para probar la cinética de crecimiento de la BAL implementando diferentes fuentes de carbono*

<b>Factores</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
Fuentes de carbono (A)	A0	Fructosa
	A1	Glucosa
	A2	Sacarosa
	A3	Lactosa
Concentración de sustratos (B)	B0	2%
	B1	5%
Tiempo de fermentación (C)	C0	0h
	C1	24h
	C2	48h
	C3	72h

**Tabla 21**

*Factores y niveles del experimento para probar la actividad antimicrobiana de la BAL frente a diferentes microorganismos patógenos*

<b>Factores</b>	<b>Simbología</b>	<b>Niveles</b>
Tipo de solución bacteriana (A)	A0	Solución + bacteria + glucosa (SolGluBac)
	A1	Solución + glucosa (SolGlu)
Microorganismos patógenos (B)	B0	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
	B1	<i>Bacillus cereus</i>

Factores	Simbología	Niveles
	B2	<i>Staphylococcus warneri</i>

**Tratamiento a comparar**

**Tabla 22**

*Tratamientos a comparar en la cinética de crecimiento*

Factores	Simbología	Niveles
T1	$A_0B_0C_0$	Fructosa + 2% + 0h
T2	$A_0B_0C_1$	Fructosa + 2% + 24h
T3	$A_0B_0C_2$	Fructosa + 2% + 48h
T4	$A_0B_0C_3$	Fructosa + 2% + 72h
T5	$A_0B_1C_0$	Fructosa + 5% + 0h
T6	$A_0B_1C_1$	Fructosa + 5% + 24h
T7	$A_0B_1C_2$	Fructosa + 5% + 48h
T8	$A_0B_1C_3$	Fructosa + 5% + 72h
T9	$A_1B_0C_0$	Glucosa + 2% + 0h
T10	$A_1B_0C_1$	Glucosa + 2% + 24h
T11	$A_1B_0C_2$	Glucosa + 2% + 48h
T12	$A_1B_0C_3$	Glucosa + 2% + 72h
T13	$A_1B_1C_0$	Glucosa + 5% + 0h
T14	$A_1B_1C_1$	Glucosa + 5% + 24h
T15	$A_1B_1C_2$	Glucosa + 5% + 48h
T16	$A_1B_1C_3$	Glucosa + 5% + 72h
T17	$A_2B_0C_0$	Sacarosa + 2% + 0h
T18	$A_2B_0C_1$	Sacarosa + 2% + 24h

Factores	Simbología	Niveles
T19	$A_2B_0C_2$	Sacarosa + 2% + 48h
T20	$A_2B_0C_3$	Sacarosa + 2% + 72h
T21	$A_2B_1C_0$	Sacarosa + 5% + 0h
T22	$A_2B_1C_1$	Sacarosa + 5% + 24h
T23	$A_2B_1C_2$	Sacarosa + 5% + 48h
T24	$A_2B_1C_3$	Sacarosa + 5% + 72h
T25	$A_3B_0C_0$	Lactosa + 2% + 0h
T26	$A_3B_0C_1$	Lactosa + 2% + 24h
T27	$A_3B_0C_2$	Lactosa + 2% + 48h
T28	$A_3B_0C_3$	Lactosa + 2% + 72h
T29	$A_3B_1C_0$	Lactosa + 5% + 0h
T30	$A_3B_1C_1$	Lactosa + 5% + 24h
T31	$A_3B_1C_2$	Lactosa + 5% + 48h
T32	$A_3B_1C_3$	Lactosa + 5% + 72h

**Tabla 23**

*Tratamientos a comparar en la actividad antimicrobiana de la BAL frente a diferentes microorganismos patógenos*

Factores	Simbología	Niveles
T1	$A_0B_0$	SolGluBac + <i>Lysinibacillus fusiformis</i>
T2	$A_0B_1$	SolGluBac + <i>Bacillus cereus</i>
T3	$A_0B_2$	SolGluBac + <i>Staphylococcus warneri</i>
T4	$A_1B_0$	SolGlu + <i>Lysinibacillus fusiformis</i>
T5	$A_1B_1$	SolGlu + <i>Bacillus cereus</i>

Factores	Simbología	Niveles
T6	$A_1B_2$	SolGlu + <i>Staphylococcus warneri</i>

### ***Tipo de diseño experimental***

En el presente trabajo de investigación, para evaluar la cinética de crecimiento microbiana para la producción de bacteriocinas aplicando diferentes fuentes de carbono, se utilizó un ANOVA con arreglo factorial  $A \times B \times C$  ( $4 \times 2 \times 4$ ) con un total de 32 tratamientos con 3 repeticiones para cada tratamiento.

El modelo estadístico empleado es el siguiente:

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

Donde:

$\mu$  = efecto global

$A_i$  = efecto del nivel  $i$ -ésimo del factor A

$\beta_j$  = 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 actividad antimicrobiana se aplicó un ANOVA con arreglo factorial  $A \times B$  ( $2 \times 3$ ) con un total de 6 tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento. El modelo estadístico utilizado es el siguiente:

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

Donde:  $\mu$  = media global

A = efecto del nivel i-ésimo del factor A

$\beta$  = efecto del nivel j-ésimo del factor B

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

$\varepsilon_{ij}$  = error aleatorio

k = número de replicaciones del experimento

### **Repeticiones**

En la cinética de crecimiento microbiano se realizaron 3 repeticiones para cada tratamiento, generando un total de 96 unidades experimentales.

Por otra parte, en la actividad antimicrobiana se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento, generando un total de 24 unidades experimentales.

### **Análisis estadístico**

#### **Tabla 24**

*Esquema del análisis de varianza para la cinética de crecimiento microbiano para la producción de bacteriocinas*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Grados de libertad</b>
Fuentes de carbono	a - 1	3
Concentración de sustratos	b - 1	1
Tiempo de fermentación	c - 1	3
Fuentes de carbono x Concentración de sustratos	(a - 1) (b - 1)	3
Fuentes de carbono x Tiempo de fermentación	(a - 1) (c - 1)	9
Concentración de sustratos x Tiempo de fermentación	(b - 1) (c - 1)	3

<b>Fuente de variación</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Grados de libertad</b>
Fuentes de carbono x Concentración de sustratos x Tiempo de fermentación	$(a - 1) (b - 1) (c - 1)$	9
Réplicas	$r - 1$	2
Error experimental		62
<b>Total</b>	<b><math>abcr - 1</math></b>	<b>95</b>

**Tabla 25**

*Esquema del análisis de varianza para la actividad antimicrobiana de la BAL frente a diferentes microorganismos patógenos*

<b>Fuente de variación</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Grados de libertad</b>
Tipo de solución	$(a - 1)$	1
Microorganismos patógenos	$(b - 1)$	2
Tipo de solución x Microorganismos patógenos	$(a - 1) (b - 1)$	2
Réplicas	$r - 1$	3
Error experimental		15
<b>Total</b>	<b><math>abr - 1</math></b>	<b>23</b>

### **Análisis funcional**

Se aplicó la prueba de significancia de Tukey ( $p < 0,05$ ) para las variables que indicaron diferencia significativa en el análisis de varianza, esto fue aplicado en ambos diseños empleados.

***Variables a medir***

Para la cinética de crecimiento microbiano se evaluaron las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se analizó el diámetro del halo de inhibición.

## Capítulo IV

### Resultados

#### Resultados de la caracterización de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida Yamor (Chicha)

En la tabla 26 se muestran las propiedades fisicoquímicas la bebida fermentada analizadas en función a las normas INEN correspondientes.

**Tabla 26**

*Propiedades fisicoquímicas determinadas de la Chicha del Yamor*

<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Densidad relativa</b>	<b>°Alcohólicos</b>	<b>Acidez</b>
3,49	6	1,01 g/ml	2°	0,007

En la tabla 27 se presentan las propiedades microbiológicas de la bebida tradicional estudiada, con las cuales se puede determinar a este producto como una bebida apta para el consumo humano. Además, en el petrifilm correspondiente a las bacterias ácido lácticas se evidenció un valor incontable de las colonias, lo que asegura la presencia de este tipo de bacterias en la bebida Chicha del Yamor.

**Tabla 27**

*Propiedades microbiológicas determinadas de la Chicha del Yamor*

<b>Mohos y levaduras</b>	<b>Aerobios</b>	<b>Bacterias ácido lácticas</b>
$5 \times 10^{-4}$ UFC	$5,6 \times 10^{-3}$ UFC	$3 \times 10^1$ UFC

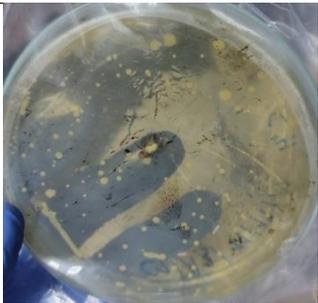
## Resultados del aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas presentes en la bebida tradicional Chicha del Yamor

### *Análisis morfológico de las cepas aisladas*

Después de la siembra del fermentado de Chicha, se identificaron cuatro cepas morfológicamente diferentes, las cuales fueron caracterizadas como se muestra en la tabla 28.

**Tabla 28**

*Resultados del análisis morfológico de las colonias identificadas*

Colonias	Ilustración	Características
Cepa 1		<p><b>Forma:</b> Irregular</p> <p><b>Color:</b> Amarillo pastel</p> <p><b>Borde:</b> Ondulado</p> <p><b>Elevación:</b> Convexa</p> <p><b>Textura:</b> Cremosa</p>
Cepa 2		<p><b>Forma:</b> Circular</p> <p><b>Color:</b> Blanco opaco</p> <p><b>Borde:</b> Entero</p> <p><b>Elevación:</b> Convexa</p> <p><b>Textura:</b> Cremosa</p>
Cepa 3		<p><b>Forma:</b> Circular</p> <p><b>Color:</b> Beige</p> <p><b>Borde:</b> Entero</p> <p><b>Elevación:</b> Convexa</p> <p><b>Textura:</b> Cremosa</p>

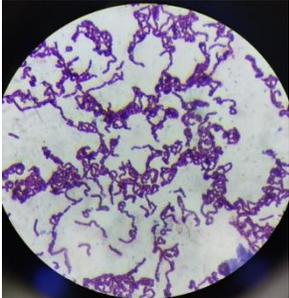
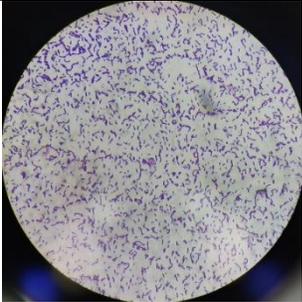
Colonias	Ilustración	Características
Cepa 4		<p><b>Forma:</b> Irregular</p> <p><b>Color:</b> Amarillo pastel</p> <p><b>Borde:</b> Lacerado</p> <p><b>Elevación:</b> Plana</p> <p><b>Textura:</b> Lisa</p>

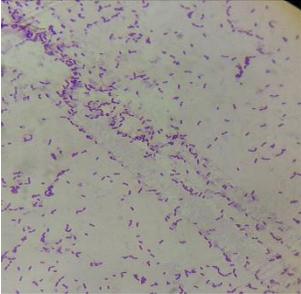
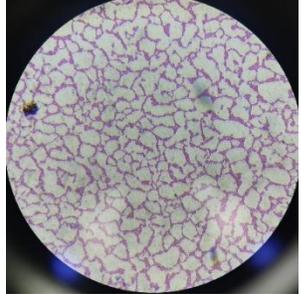
### ***Análisis microscópico de las cepas aisladas***

El resultado de la tinción Gram en las cepas obtenidas mostró que son Gram positivas. Además, el ensayo bioquímico de catalasas dio resultados negativos para todas las bacterias analizadas, así como se muestra en la tabla 29.

**Tabla 29**

*Resultados del análisis morfológica de las colonias identificadas*

Cepa	Tinción Gram (100X)	Características
Cepa 1		<p>Bacilos Gram (+), robustos, dispuestos en pares y en cadenas</p> <p>Catalasa (-)</p>
Cepa 2		<p>Bacilos Gram (+), cortos, dispuestos solos o en pares</p> <p>Catalasa (-)</p>

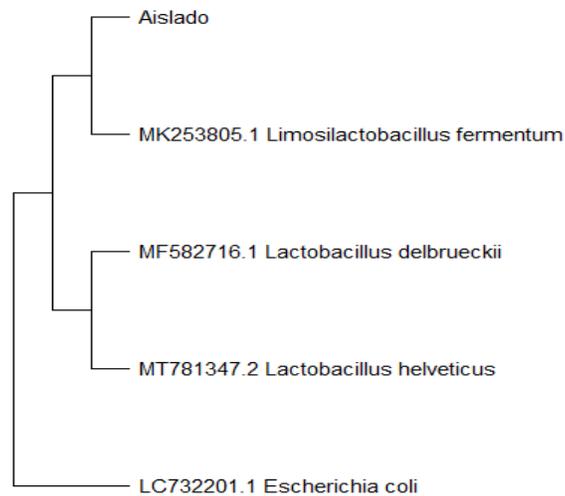
Cepa	Tinción Gram (100X)	Características
Cepa 3		Bacilos Gram (+), cortos y anchos, dispuestos solos y en pares  Catalasa (-)
Cepa 4		Bacilos Gram (+), cortos y delgados, dispuestos en cadenas  Catalasa (-)

### ***Análisis molecular de las cepas aisladas***

De las cepas resultantes del fermentado de Chicha del Yamor se seleccionó la cepa dominante, de la cual se efectuó una secuenciación y mediante un BLAST, se determinó el nombre de la cepa aislada y se comparó la secuencia de 16S ARNr con 3 cepas relacionadas y 1 grupo externo, con esto se realizó un árbol filogenético utilizando el programa Mega-X (Figura 5). Además, la formación de un clado indica una similitud alta entre *Limosilactobacillus fermentum* y la secuencia aislada, el porcentaje fue corroborado con los resultados del BLAST que fue de 99,53%.

**Figura 5**

Árbol filogenético realizado a base de secuencias 16S ARNr de BAL



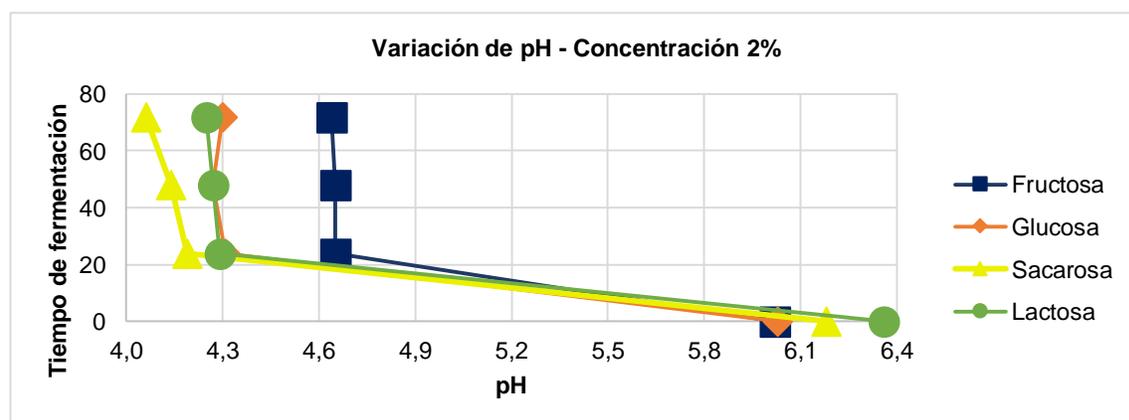
Nota. Elaboración propia

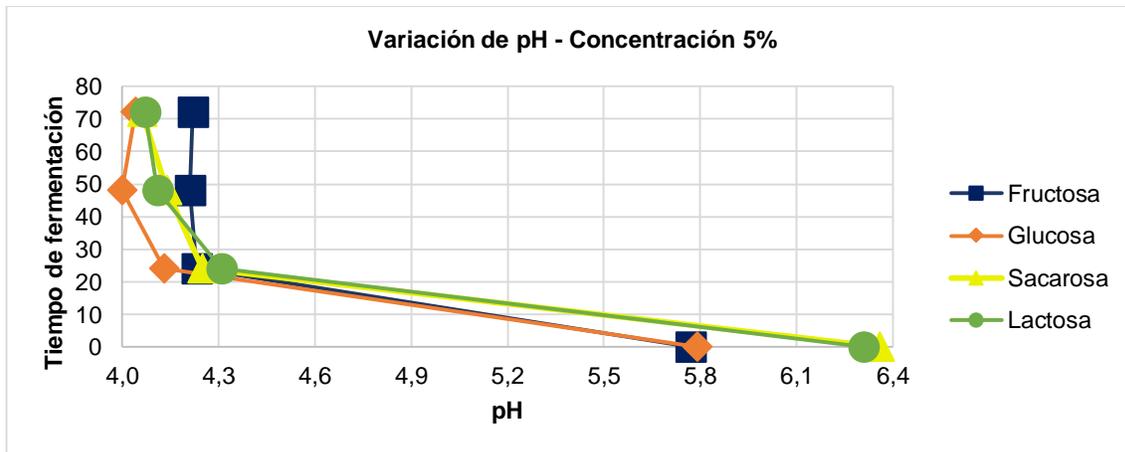
### Resultados de la evaluación de los parámetros cinéticos en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas con adición de distintas fuentes de carbono

Durante 3 días de fermentación se registraron los parámetros cinéticos de pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica en los sistemas de fermentación que variaban en la concentración de las cuatro fuentes de carbono empleadas, los cuales se presentan en las figuras 6, 7, 8 y 9, respectivamente.

**Figura 6**

Cinética de fermentación de la variable pH

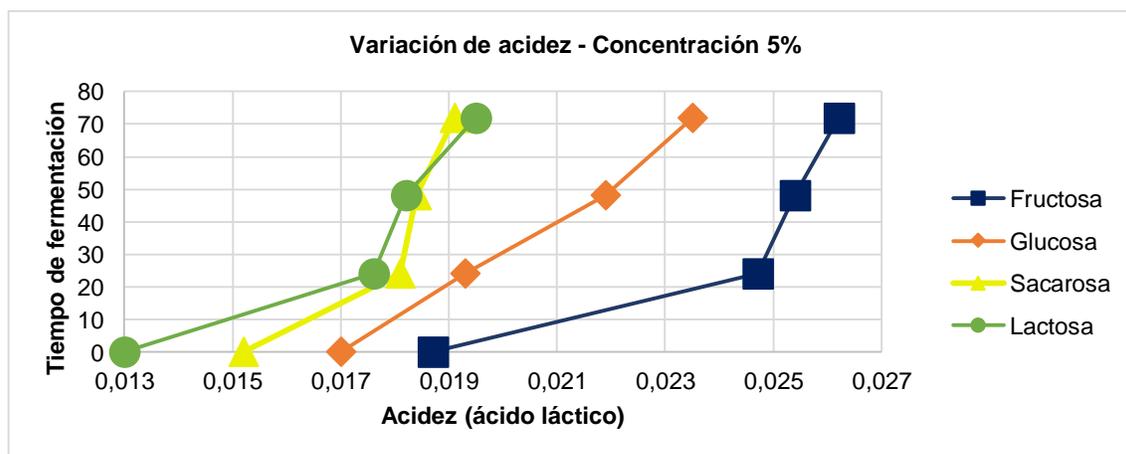
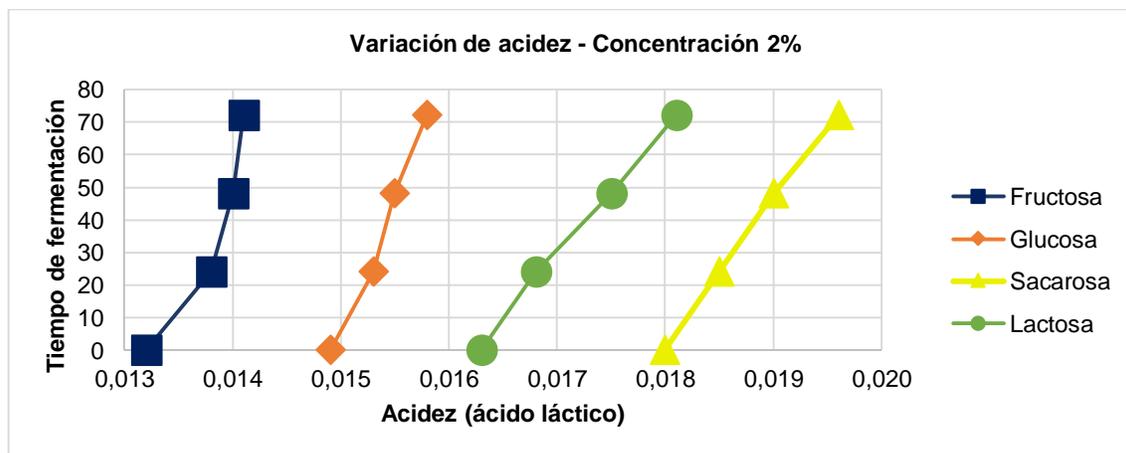




Nota. Elaboración propia

**Figura 7**

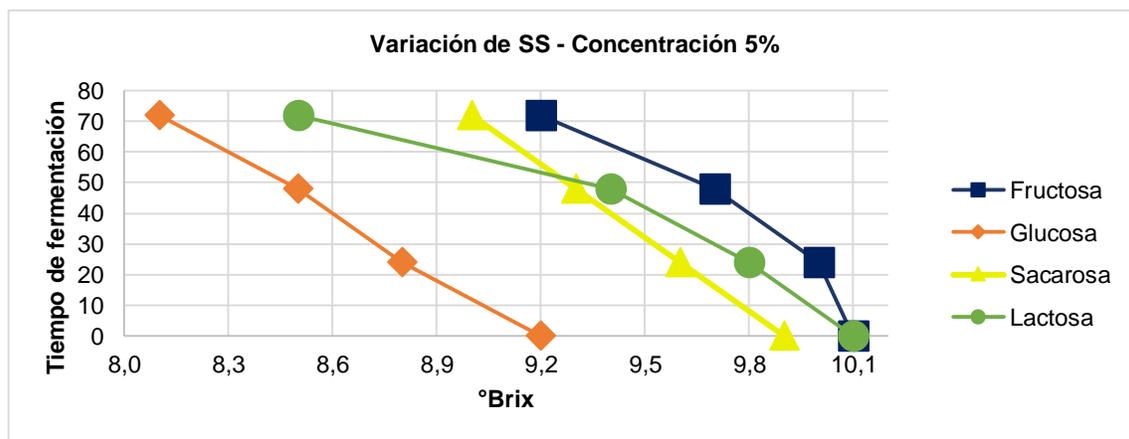
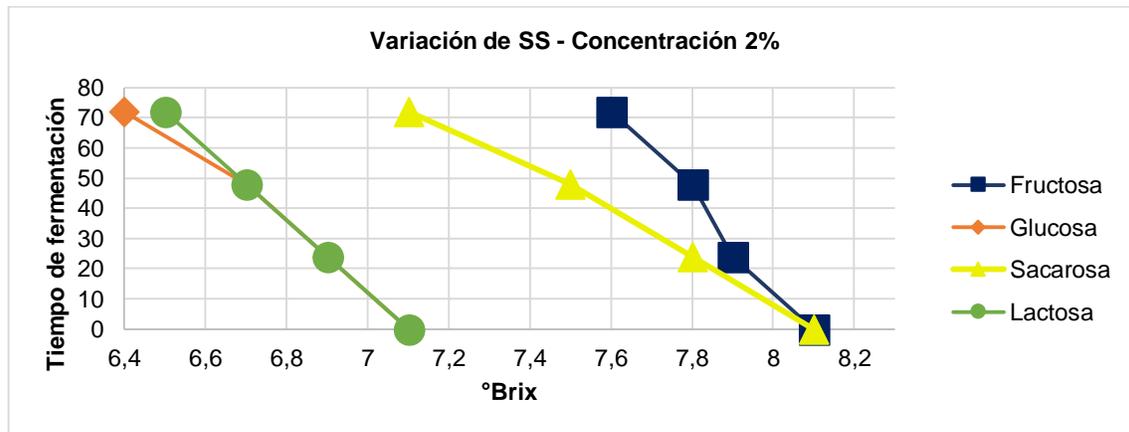
*Cinética de fermentación de la variable acidez*



Nota. Elaboración propia

Figura 8

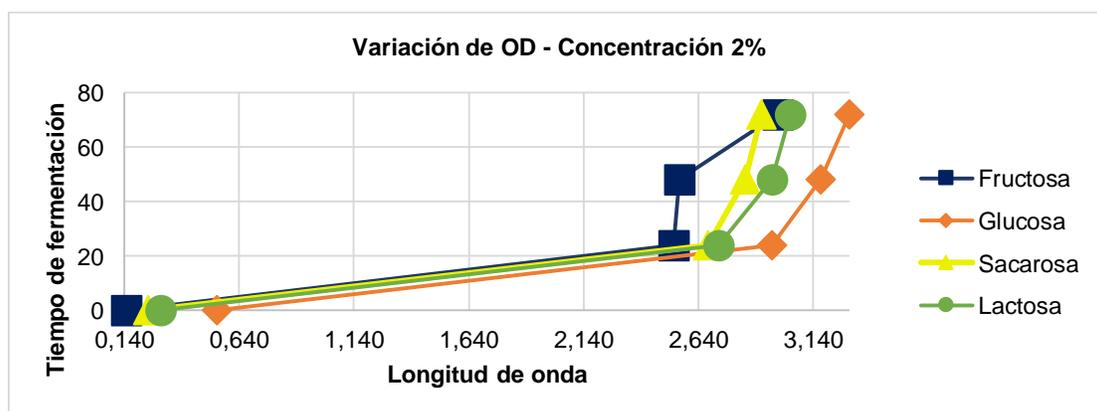
Cinética de fermentación de la variable sólidos solubles (°Brix)

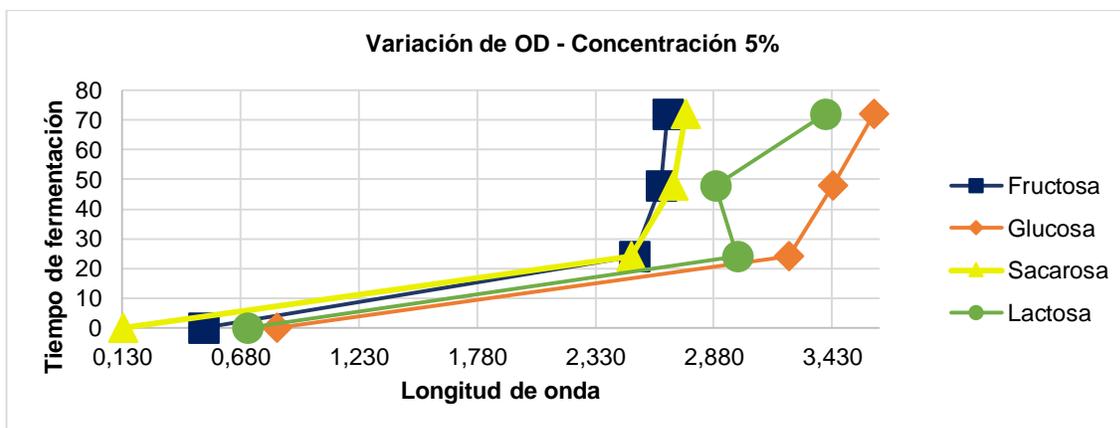


Nota. Elaboración propia

Figura 9

Cinética de fermentación de la variable absorbancia (densidad óptica)





Nota. Elaboración propia

**Resultados del análisis de varianza para las variables estudiadas durante el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas con adición de distintas fuentes de carbono**

**Análisis de varianza para la variable pH**

**Tabla 30**

*Resultados del análisis de varianza para la variable pH*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Sustrato	0,499803	3	0,166601	85,77	0,0000
B:Concentración(%)	0,632126	1	0,632126	325,44	0,0000
C:Tiempo	62,4082	3	20,8027	10709,96	0,0000
D:Replica	0,00363958	2	0,00181979	0,94	0,3973
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,656553	3	0,218851	112,67	0,0000
AC	1,46929	9	0,163255	84,05	0,0000
BC	0,0705281	3	0,0235094	12,10	0,0000

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
ABC	0,0386427	9	0,00429363	2,21	0,0330
RESIDUOS	0,120427	62	0,00194237		
TOTAL	65,8992	95			

La tabla 30 presenta el análisis de varianza para pH durante la fermentación de la producción de bacteriocinas, en este caso se encontró diferencia significativa en el Factor A (Sustrato), Factor B (Concentración %), Factor C (Tiempo), interacción AB, interacción AC, interacción BC e interacción ABC. En cuanto a las réplicas no existió diferencia significativa.

#### ***Análisis de varianza para la variable acidez (ácido láctico)***

**Tabla 31**

*Resultados del análisis de varianza para la variable acidez*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Sustrato	0,0000340921	3	0,000011364	9,71	0,0000
B:Concentración(%)	0,00028635	1	0,00028635	244,67	0,0000
C:Tiempo	0,000183048	3	0,000061016	52,14	0,0000
D:Replica	0,00000219271	2	0,00000109635	0,94	0,3974
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,000467564	3	0,000155855	133,17	0,0000
AC	0,0000105529	9	0,00000117255	1,00	0,4482
BC	0,0000820079	3	0,000027336	23,36	0,0000
ABC	0,0000143612	9	0,00000159569	1,36	0,2242

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
RESIDUOS	0,0000725606	62	0,00000117033		
TOTAL	0,00115273	95			

La tabla 31 muestra el análisis de varianza para la variable acidez, donde se observa que existe diferencia significativa en el Factor A (Tipo de Sustrato), Factor B (Concentración %), Factor C (Tiempo), interacción AB, e interacción BC. Mientras que, para las réplicas, la interacción AC e interacción ABC no se encontró diferencia significativa

#### ***Análisis de varianza para la variable densidad óptica***

**Tabla 32**

*Resultados del análisis de varianza para la variable densidad óptica (absorbancia)*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Sustrato	5,19598	3	1,73199	78,53	0,0000
B:Concentración(%)	0,237109	1	0,237109	10,75	0,0017
C:Tiempo	112,62	3	37,5399	1702,06	0,0000
D:Replica	0,0742011	2	0,0371005	1,68	0,1944
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,759024	3	0,253008	11,47	0,0000
AC	0,297899	9	0,0330999	1,50	0,1677
BC	0,170874	3	0,056958	2,58	0,0613
ABC	0,404126	9	0,0449029	2,04	0,0499
RESIDUOS	1,36745	62	0,0220556		

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
TOTAL	121,126	95			

La tabla 32 de análisis de varianza para la variable densidad óptica, presenta que existe diferencia significativa en el Factor A (Sustrato), Factor B (Concentración %), Factor C (Tiempo), interacción AB, e interacción ABC. Así mismo indicó que no existe diferencia significativa para la interacción AC, interacción BC y las réplicas.

### **Análisis de varianza para la variable sólidos solubles**

**Tabla 33**

*Resultados del análisis de varianza para la variable sólidos solubles (°Brix)*

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Sustrato	17,7771	3	5,92569	73,64	0,0000
B:Concentración(%)	99,2267	1	99,2267	1233,08	0,0000
C:Tiempo	12,8379	3	4,27931	53,18	0,0000
D:Replica	0,0508333	2	0,0254167	0,32	0,7303
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	2,5975	3	0,865833	10,76	0,0000
AC	0,347917	9	0,0386574	0,48	0,8824
BC	1,36833	3	0,456111	5,67	0,0017
ABC	0,604167	9	0,0671296	0,83	0,5875
RESIDUOS	4,98917	62	0,0804704		
TOTAL	139,8	95			

La tabla 33 presenta el análisis de varianza para la variable sólidos solubles donde se puede observar que existe diferencia significativa en el Factor A (Sustrato), Factor B (Concentración %), Factor C (Tiempo), interacción AB e interacción BC. Así mismo indicó que no existe diferencia significativa para la interacción AC, interacción ABC y las réplicas.

**Resultados del estudio de la adición de distintas fuentes de carbono para el enriquecimiento de chicha Yamor, en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas para la estandarización de parámetros cinéticos microbianos. (Tukey  $p < 0.05$ )**

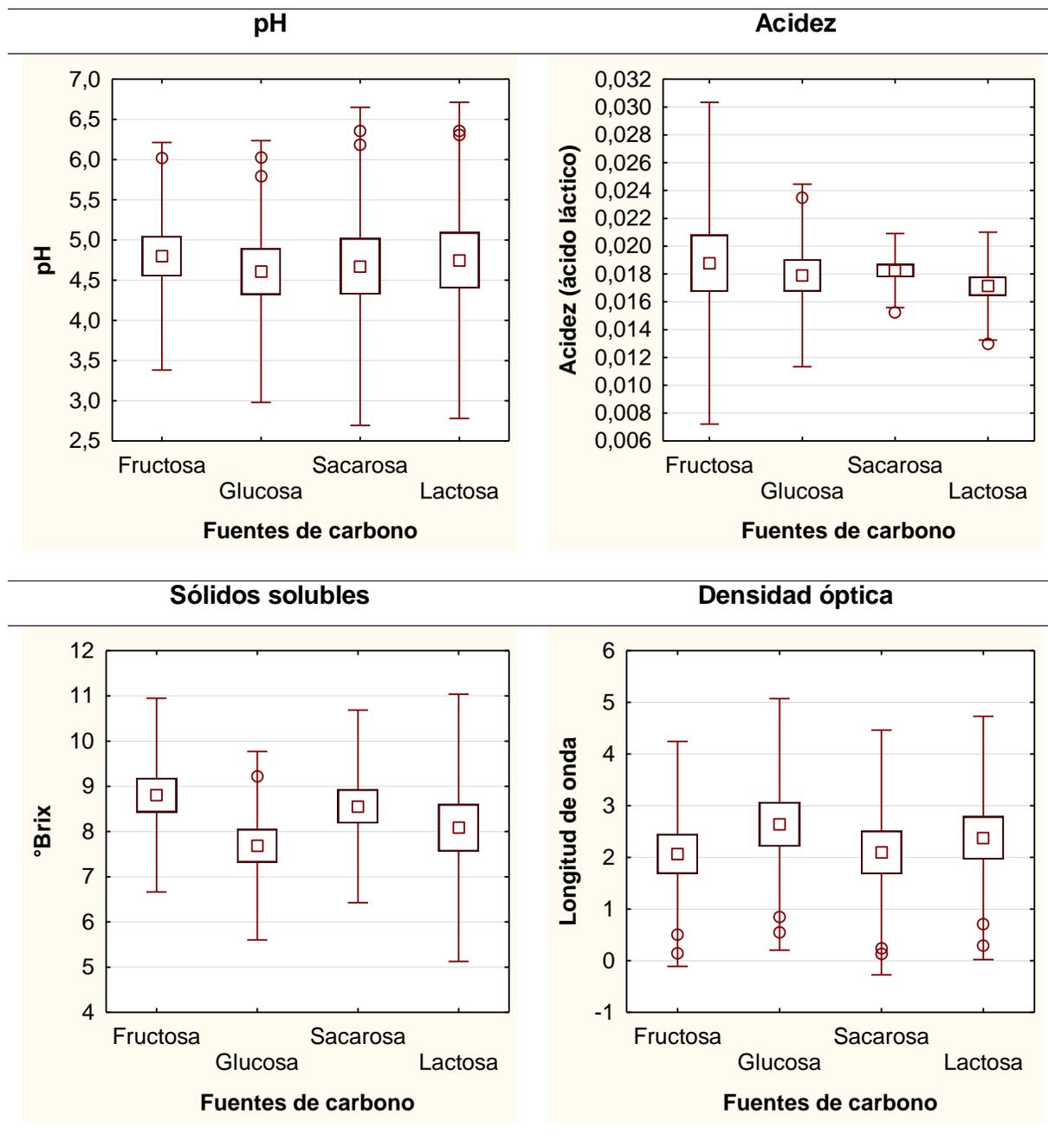
**Tabla 34**

*Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor A en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica*

<b>Fuentes de carbono</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Sólidos solubles</b>	<b>Densidad óptica</b>
A0: Fructosa	4,80 <sup>D</sup>	0,019 <sup>C</sup>	8,8 <sup>D</sup>	2,0673 <sup>A</sup>
A1: Glucosa	4,61 <sup>A</sup>	0,018 <sup>AB</sup>	7,7 <sup>A</sup>	2,6385 <sup>C</sup>
A2: Sacarosa	4,67 <sup>B</sup>	0,018 <sup>BC</sup>	8,6 <sup>C</sup>	2,0949 <sup>A</sup>
A3: Lactosa	4,75 <sup>C</sup>	0,017 <sup>A</sup>	8,1 <sup>B</sup>	2,3763 <sup>B</sup>

Figura 10

*Efecto de las fuentes de carbono en las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas*



La tabla 34 presenta las medias obtenidas para el pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica obtenidos de la fermentación para la producción de bacteriocinas

aplicando diferentes fuentes de carbono. Para el pH, se encontró la formación de cuatro grupos independientes donde el grupo A de la glucosa presentó una media de 4,61, el grupo B de la sacarosa mostró un valor de 4,67, el grupo C perteneciente a la lactosa presentó una media de 4,75 y el grupo D de la fructosa mostró un valor de 4,80.

En cuanto a la acidez se encontró tres grupos homogéneos, donde el grupo A de lactosa y glucosa presentaron valores de 0,017 y 0,018 respectivamente, el grupo B de glucosa y sacarosa presentó valores de 0,018 en los dos casos y el grupo C de fructosa mostró un valor de 0,019.

Para los sólidos solubles se formaron cuatro grupos independientes donde el grupo A de la glucosa presentó una media de 7,7, el grupo B de la lactosa mostró un valor de 8,1, el grupo C perteneciente a la sacarosa presentó una media de 8,6 y el grupo D de la fructosa mostró un valor de 8,8.

En la densidad óptica, se encontraron tres grupos homogéneos donde el grupo A correspondiente a la fructosa y sacarosa no presentaron diferencias significativas y mostraron valores de 2,0673 y 2,0949, respectivamente, el grupo B de la lactosa mostró un valor de 2,3763 y el grupo C de la glucosa presentó una media de 2,6385.

### **Resultados del estudio de la concentración óptima de las fuentes de sustratos en el proceso fermentativo de la producción de bacteriocinas de la Chicha Yamor**

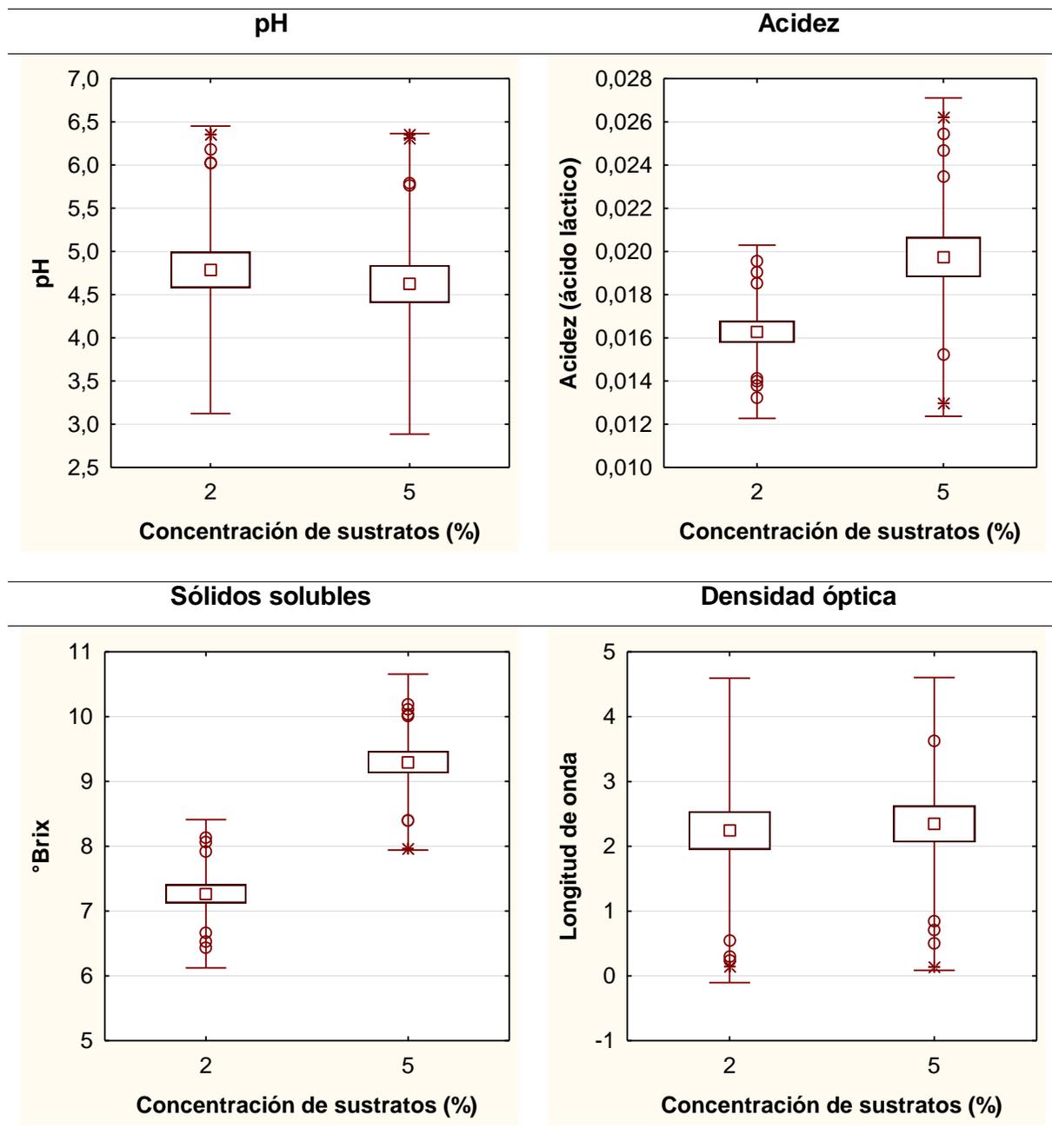
**Tabla 35**

*Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor B en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica*

<b>Concentración de los sustratos</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Sólidos solubles</b>	<b>Densidad óptica</b>
B0: 2%	4,79 <sup>B</sup>	0,016 <sup>A</sup>	7,3 <sup>A</sup>	2,2445 <sup>A</sup>
B1: 5%	4,63 <sup>A</sup>	0,020 <sup>B</sup>	9,3 <sup>B</sup>	2,3439 <sup>B</sup>

Figura 11

*Efecto de las concentraciones de los sustratos en las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas*



La tabla 35 presenta las medias obtenidas para el pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica obtenidas de la fermentación para la producción de bacteriocinas

variando las concentraciones de los sustratos empleados. Para el pH, se encontró la formación de dos grupos independientes, el grupo A corresponde a la concentración 5% con un valor de 4,63 y el grupo B perteneciente a la concentración 2% muestra una media de 4,79.

En cuanto a la acidez se mostraron dos grupos independientes donde el grupo A de la concentración 2% presentó una media de 0,016, mientras que el grupo B perteneciente a la concentración 5% mostró un valor de 0,020.

Para los sólidos solubles se formaron dos grupos independientes donde el grupo A de la concentración 2% presentó una media de 7,3, por el contrario, el grupo B de la concentración 5% mostró un valor de 9,3.

En la densidad óptica, se encontraron dos grupos independientes donde el grupo A correspondiente a la concentración 2% mostró un valor de 2,2445, en cambio, el grupo B de la concentración al 5% presentó una media de 2,3439.

### **Resultados del estudio de las condiciones para la producción de bacterianas evaluando los parámetros cinéticos en distintos tiempos de fermentación**

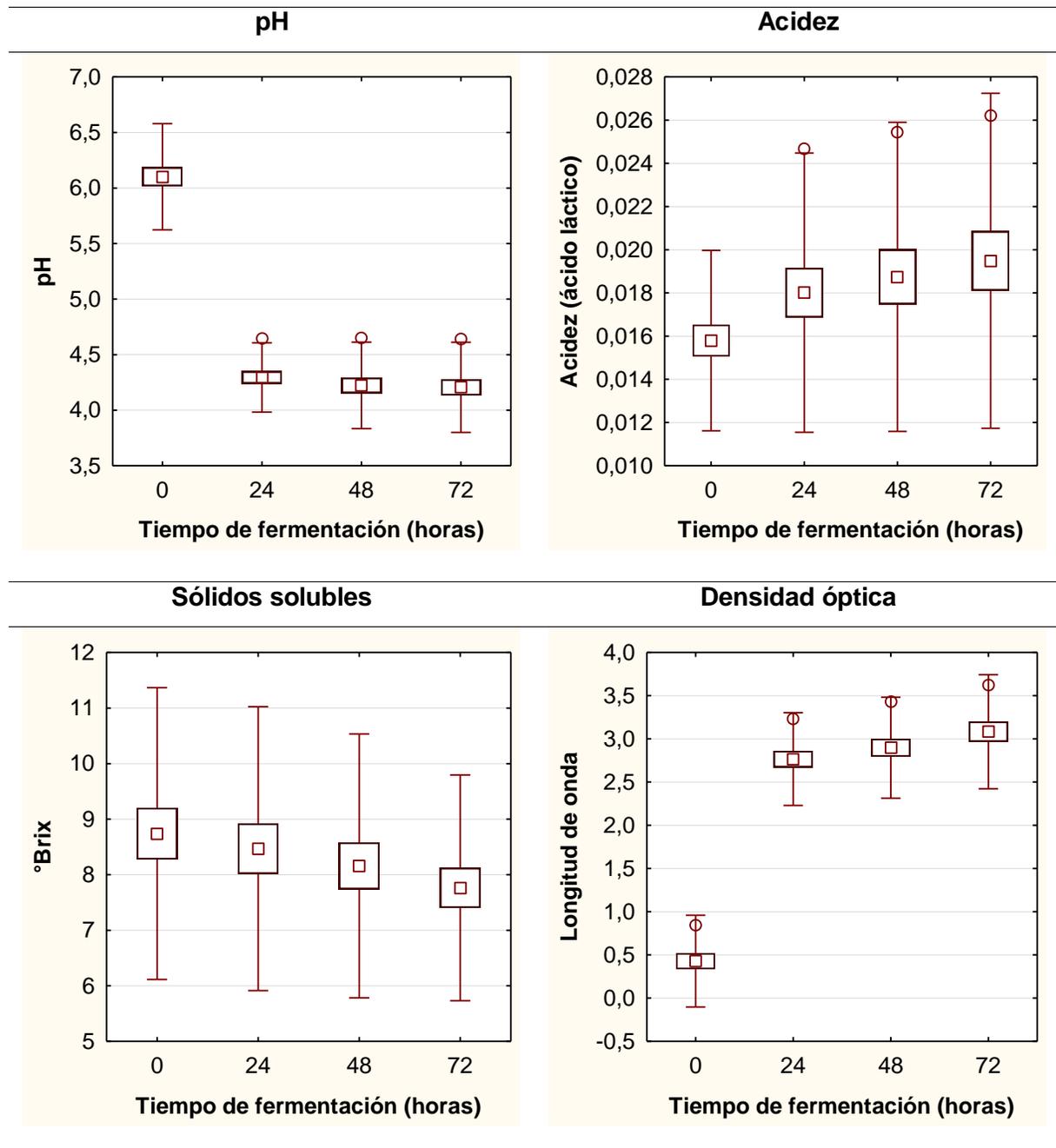
**Tabla 36**

*Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor C en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica*

<b>Tiempo de fermentación</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Sólidos solubles</b>	<b>Densidad óptica</b>
C0: 0 h	6,10 <sup>C</sup>	0,015 <sup>A</sup>	8,8 <sup>D</sup>	0,4284 <sup>A</sup>
C1: 24 h	4,30 <sup>B</sup>	0,018 <sup>B</sup>	7,7 <sup>A</sup>	2,7667 <sup>B</sup>
C2: 48 h	4,22 <sup>A</sup>	0,019 <sup>BC</sup>	8,6 <sup>C</sup>	2,8981 <sup>C</sup>
C3: 72 h	4,20 <sup>A</sup>	0,020 <sup>C</sup>	8,1 <sup>B</sup>	3,0838 <sup>D</sup>

Figura 12

*Efecto del tiempo de la fermentación en las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas*



La tabla 36 presenta las medias obtenidas del pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica obtenidos del tiempo de la fermentación para la producción de

bacteriocinas. Para el pH, se encontró la formación de tres grupos homogéneos donde el grupo A perteneciente a los tiempos de 48h y 72h indicaron valores de 4,22 y 4,20, respectivamente, el grupo B correspondiente al tiempo de 24h presentó un valor de 4,30, el grupo C del tiempo de 0h mostró una media de 6,10.

En cuanto a la acidez se mostraron tres grupos homogéneos donde el grupo A del tiempo 0h presentó una media de 0,015, el grupo B del tiempo 24h y 48h mostraron valores de 0,018 y 0,019, respectivamente, mientras que el grupo C perteneciente al tiempo 48h y 72h indicaron valores de 0,019 y 0,020.

Para los sólidos solubles se formaron cuatro grupos independientes donde el grupo A del tiempo 24h mostró un valor de 7,7, el grupo B perteneciente al tiempo 72h presentó una media de 8,1, el grupo C del tiempo 48h mostró un valor de 8,6 y el grupo D del tiempo 0h presentó una media de 8,8.

En la densidad óptica, se encontraron cuatro grupos independientes donde el grupo A correspondiente al tiempo 0h presentó un valor de 0,4284, el grupo B del tiempo 24h mostró un valor de 2,7667, el grupo C del tiempo 48h presentó una media de 2,8981 y el grupo D de 72h indicó una media de 3,0838.

### **Resultados del estudio de la interacción ABC (Fuente de carbono\*Concentración del sustrato\*Tiempo de fermentación) en la producción de bacteriocinas**

**Tabla 37**

*Resultados de la prueba de significancia de Tukey para la interacción ABC en las variables pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica*

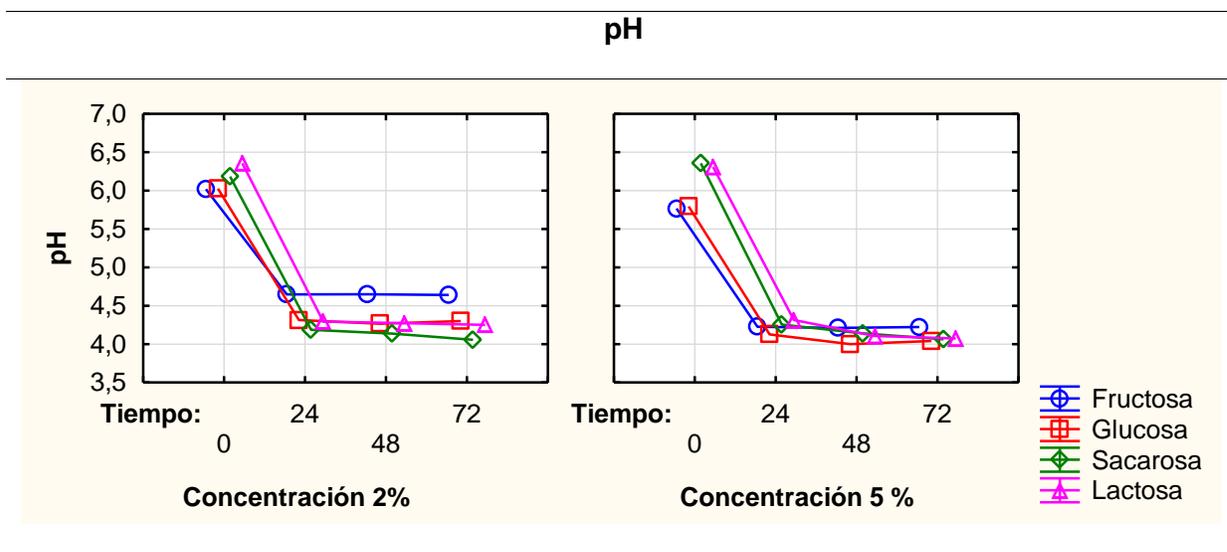
<b>Interacciones ABC</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Densidad óptica</b>	<b>Sólidos solubles</b>
<b>A0B0C0:</b> Fructosa+2%+0h	6,02 <sup>J</sup>	0,013 <sup>A</sup>	0,1473 <sup>A</sup>	8,1 <sup>FGHI</sup>
<b>A0C0C1:</b> Fructosa+2%+24h	4,65 <sup>H</sup>	0,014 <sup>AB</sup>	2,5340 <sup>DE</sup>	7,9 <sup>EFGH</sup>

<b>Interacciones ABC</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Densidad óptica</b>	<b>Sólidos solubles</b>
<b>A0B0C2:</b> Fructosa+2%+48h	4,65 <sup>H</sup>	0,014 <sup>ABC</sup>	2,5594 <sup>DE</sup>	7,8 <sup>DEFG</sup>
<b>A0B0C3:</b> Fructosa+2%+72h	4,64 <sup>H</sup>	0,014 <sup>ABCD</sup>	2,9840 <sup>DEFGHI</sup>	7,6 <sup>CDEFG</sup>
<b>A0B1C0:</b> Fructosa+5%+0h	5,77 <sup>I</sup>	0,019 <sup>FGHI</sup>	0,5063 <sup>ABC</sup>	10,2 <sup>N</sup>
<b>A0B1C1:</b> Fructosa+5%+24h	4,23 <sup>DEFG</sup>	0,025 <sup>JK</sup>	2,5100 <sup>DE</sup>	10,0 <sup>MN</sup>
<b>A0B1C2:</b> Fructosa+5%+48h	4,21 <sup>CDEFG</sup>	0,025 <sup>K</sup>	2,6323 <sup>DEF</sup>	9,7 <sup>LMN</sup>
<b>A0B1C3:</b> Fructosa+5%+72h	4,22 <sup>DEFG</sup>	0,026 <sup>K</sup>	2,6650 <sup>DEF</sup>	9,1 <sup>IJKL</sup>
<b>A1B0C0:</b> Glucosa+2%+0h	6,03 <sup>J</sup>	0,015 <sup>ABCDE</sup>	0,5440 <sup>ABC</sup>	7,1 <sup>ABCDE</sup>
<b>A1B0C1:</b> Glucosa+2%+24h	4,31 <sup>G</sup>	0,015 <sup>ABCDEF</sup>	2,9590 <sup>DEFGHI</sup>	6,9 <sup>ABCD</sup>
<b>A1B0C2:</b> Glucosa+2%+48h	4,27 <sup>EFG</sup>	0,016 <sup>ABCDEF</sup>	3,1733 <sup>GHIJ</sup>	6,7 <sup>AB</sup>
<b>A1B0C3:</b> Glucosa+2%+72h	4,30 <sup>G</sup>	0,016 <sup>ABCDEFG</sup>	3,2957 <sup>HJ</sup>	6,4 <sup>A</sup>
<b>A1B1C0:</b> Glucosa+5%+0h	5,79 <sup>I</sup>	0,017 <sup>BCDEFGH</sup>	0,8483 <sup>C</sup>	9,2 <sup>KLM</sup>
<b>A1B1C1:</b> Glucosa+5%+24h	4,13 <sup>ABCDE</sup>	0,019 <sup>HI</sup>	3,2303 <sup>HIJ</sup>	8,8 <sup>HIJK</sup>
<b>A1B1C2:</b> Glucosa+5%+48h	4,00 <sup>A</sup>	0,022 <sup>IJ</sup>	3,4340 <sup>IJ</sup>	8,4 <sup>GHIJK</sup>
<b>A1B1C3:</b> Glucosa+5%+72h	4,04 <sup>A</sup>	0,023 <sup>JK</sup>	3,6233 <sup>J</sup>	8,0 <sup>EFGH</sup>
<b>A2B0C0:</b> Sacarosa+2%+0h	6,18 <sup>K</sup>	0,018 <sup>EFGH</sup>	0,2430 <sup>AB</sup>	8,1 <sup>FGHIJ</sup>
<b>A2B0C1:</b> Sacarosa+2%+24h	4,19 <sup>BCDEFG</sup>	0,019 <sup>FGHI</sup>	2,6833 <sup>DEF</sup>	7,8 <sup>EFG</sup>
<b>A2B0C2:</b> Sacarosa+2%+48h	4,14 <sup>ABCDEF</sup>	0,019 <sup>GHI</sup>	2,8463 <sup>DEFGH</sup>	7,5 <sup>BCDEF</sup>
<b>A2B0C3:</b> Sacarosa+2%+72h	4,06 <sup>AB</sup>	0,020 <sup>HI</sup>	2,9157 <sup>DEFGH</sup>	7,1 <sup>ABCDE</sup>
<b>A2B1C0:</b> Sacarosa+5%+0h	6,36 <sup>L</sup>	0,015 <sup>ABCDEF</sup>	0,1337 <sup>A</sup>	10,0 <sup>MN</sup>
<b>A2B1C1:</b> Sacarosa+5%+24h	4,25 <sup>EFG</sup>	0,018 <sup>EFGH</sup>	2,4970 <sup>D</sup>	9,7 <sup>LMN</sup>
<b>A2B1C2:</b> Sacarosa+5%+48h	4,14 <sup>ABCDEF</sup>	0,018 <sup>EFGHI</sup>	2,6917 <sup>DEF</sup>	9,2 <sup>KLM</sup>

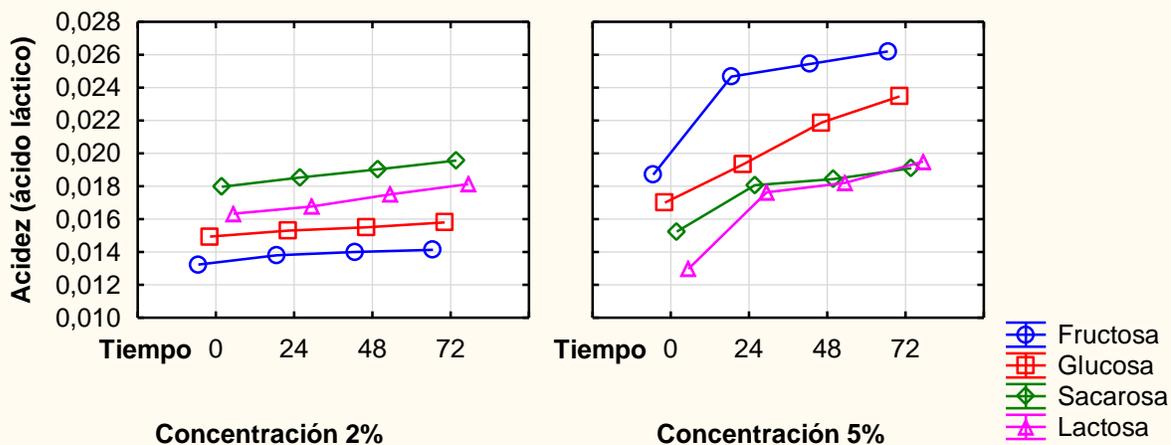
Interacciones ABC	pH	Acidez	Densidad óptica	Sólidos solubles
<b>A2B1C3:</b> Sacarosa+5%+72h	4,06 <sup>AB</sup>	0,019 <sup>GHI</sup>	2,7483 <sup>DEFG</sup>	8,9 <sup>IJKL</sup>
<b>A3B0C0:</b> Lactosa+2%+0h	6,36 <sup>L</sup>	0,016 <sup>ABCDEFGH</sup>	0,2960 <sup>AB</sup>	7,1 <sup>ABCDE</sup>
<b>A3B0C1:</b> Lactosa+2%+24h	4,29 <sup>G</sup>	0,017 <sup>BCDEFGH</sup>	2,7293 <sup>DEFG</sup>	6,9 <sup>ABC</sup>
<b>A3B0C2:</b> Lactosa+2%+48h	4,27 <sup>FG</sup>	0,018 <sup>CDEFGH</sup>	2,9613 <sup>DFGHI</sup>	6,7 <sup>AB</sup>
<b>A3B0C3:</b> Lactosa+2%+72h	4,25 <sup>EFG</sup>	0,018 <sup>EFGH</sup>	3,0410 <sup>FGHI</sup>	6,5 <sup>A</sup>
<b>A3B1C0:</b> Lactosa+5%+0h	6,31 <sup>KL</sup>	0,013 <sup>A</sup>	0,7087 <sup>BC</sup>	10,1 <sup>MN</sup>
<b>A3B1C1:</b> Lactosa+5%+24h	4,31 <sup>G</sup>	0,018 <sup>DEFGH</sup>	2,9903 <sup>EFGHI</sup>	9,7 <sup>LMN</sup>
<b>A3B1C2:</b> Lactosa+5%+48h	4,11 <sup>ABCD</sup>	0,018 <sup>EFGH</sup>	2,8867 <sup>DEFGH</sup>	9,3 <sup>KLMN</sup>
<b>A3B1C3:</b> Lactosa+5%+72h	4,07 <sup>ABC</sup>	0,020 <sup>HI</sup>	3,3970 <sup>IJ</sup>	8,4 <sup>GHIJK</sup>

**Figura 13**

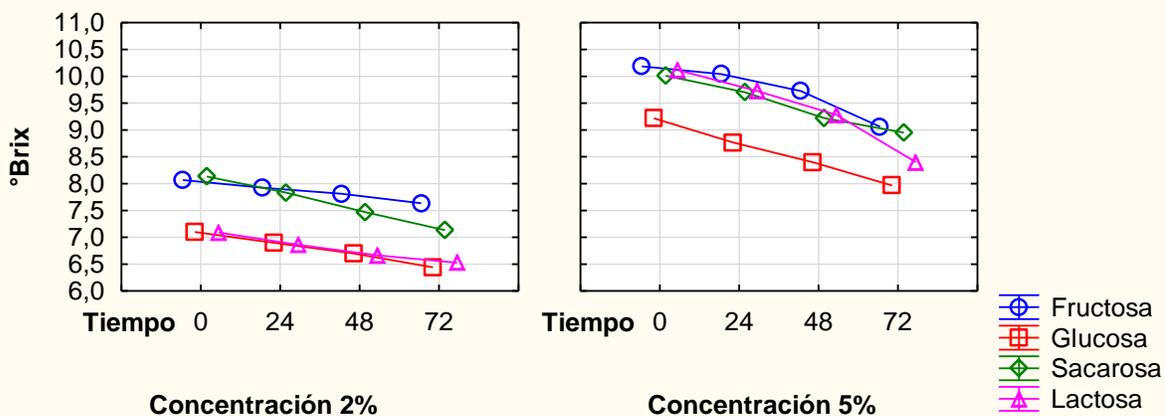
*Efecto de la interacción ABC en la fermentación de las variables analizadas en los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas*



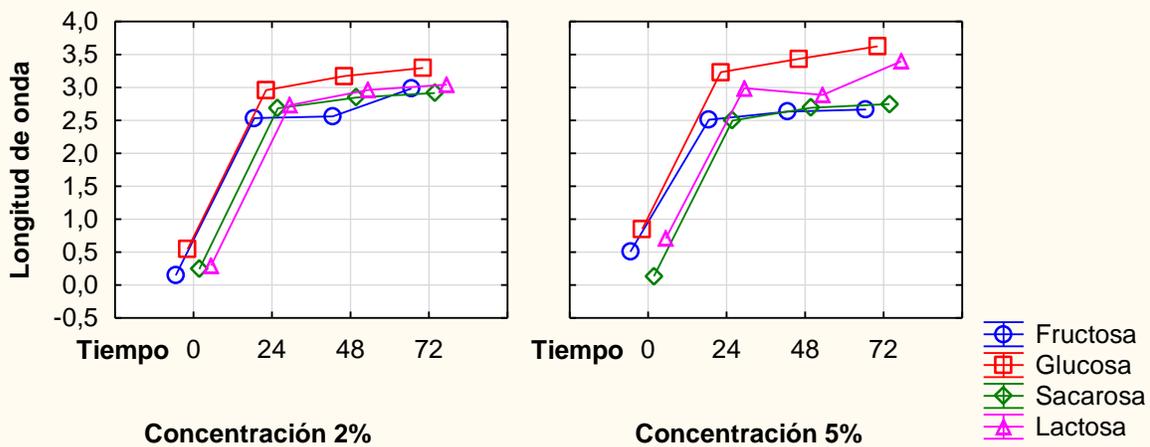
**Acidez**



**Sólidos solubles**



**Densidad óptica**



La tabla 37 presenta las medias obtenidas para el pH, acidez, sólidos solubles y densidad óptica para la interacción ABC, en el caso del pH, el grupo A conformado por las interacciones Glucosa + 5% + 24h (4,13), Glucosa + 5% + 48h (4,00), Glucosa + 5% + 72h (4,04), Sacarosa + 2% + 48h (4,14), Sacarosa + 2% + 72h (4,06), Sacarosa + 5% + 48h (4,14), Sacarosa + 5% + 72h (4,06), Lactosa + 5% + 48h (4,11) y Lactosa + 5% + 72h (4,07) indicaron valores significativamente menores en comparación al resto, por otra parte, el grupo L perteneciente a Sacarosa + 5% + 0h (6,36), Lactosa + 2% + 0h (6,36) y Lactosa + 5% + 0h (6,31) indicaron mayores valores.

En cuanto a la acidez, se obtuvo un mayor contenido en el grupo K conformado por las interacciones Fructosa + 5% + 24h (0,025) Fructosa + 5% + 48h (0,025), Fructosa + 5% + 72h (0,026) y Glucosa + 5% + 72h (0,023), por el contrario, el grupo A perteneciente a Fructosa + 2% + 0h (0,013), Fructosa + 2% + 24h (0,014), Fructosa + 2% + 48h (0,014), Fructosa + 2% + 72h (0,014), Glucosa + 2% + 0h (0,015), Glucosa + 2% + 24h (0,015), Glucosa + 2% + 48h (0,016), Glucosa + 2% + 72h (0,016), Sacarosa + 5% + 0h (0,015), Lactosa + 2% + 0h (0,016) y Lactosa + 5% + 0h (0,013) indicaron menor contenido.

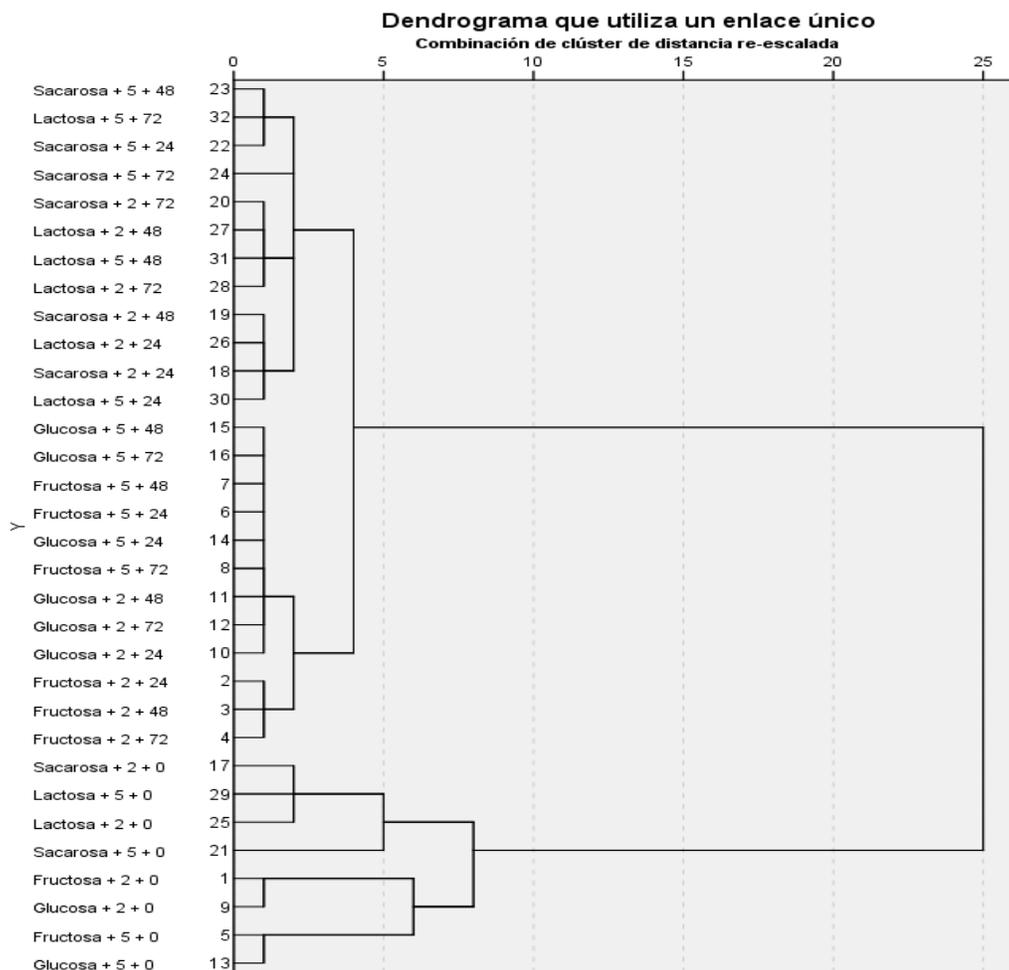
Para los sólidos solubles, se obtuvo el mayor valor en el grupo N perteneciente a las interacciones Fructosa + 5% + 0h (10,2), Fructosa + 5% + 24h (10,0), Fructosa + 5% + 48h (9,7), Sacarosa + 5% + 0h (10,0), Sacarosa + 5% + 24h (9,7), Lactosa + 5% + 0h (10,1), Lactosa + 5% + 24h (9,7), Lactosa + 5% + 48h (9,3), por otra parte, el grupo A conformado por las interacciones Glucosa + 2% + 0h (7,1), Glucosa + 2% + 24h (6,9), Glucosa + 2% + 48h (6,7) Glucosa + 2% + 72h (6,4), Sacarosa + 2% + 72h (7,1), Lactosa + 2% + 0h (7,1), Lactosa + 2% + 24h (6,9), Lactosa + 2% + 48h (6,7) y Lactosa + 2% + 72h (6,5), indicaron medias inferiores en relación a los demás.

En la densidad óptica, el grupo J conformado por Glucosa + 2% + 48h (3,1733), Glucosa + 2% + 72h (3,2957), Glucosa + 5% + 24h (3,2303), Glucosa + 5% + 48h (3,4340), Glucosa + 5% + 72h (3,6233), Lactosa + 5% + 72h (3,3970), indicaron medias superiores, mientras que la media inferior la presentó el grupo A correspondiente a las interacciones Fructosa + 2% + 0h (0,1473), Fructosa + 5% + 0h (0,5063), Glucosa + 2% + 0h (0,5440), Sacarosa + 2% + 0h (0,2430), Sacarosa + 5% + 0h (0,1337), Lactosa + 2% + 0h (0,2960).

### **Análisis de conglomerados para los parámetros cinéticos de la fermentación para la producción de bacteriocinas empleando diferentes fuentes de carbono**

**Figura 14**

*Dendrograma para relacionar los parámetros cinéticos evaluados*



La figura 14 indica el dendograma realizado mediante el método de clúster jerárquico para grupos vecinos más cercanos y muestra las similitudes entre los tratamientos de estudio. Se observó una mayor relación entre los tratamientos Glucosa + 5% + 48h (T15), Glucosa + 5% + 72h (T16), Fructosa + 5% + 48h (T7), Fructosa + 5% + 24h (T6), Glucosa + 5% + 24h (T14), Fructosa + 5% + 72h (T8), Glucosa + 2% + 48h (T11), Glucosa + 2% + 72h (T12), Glucosa + 2% + 24h (T10).

En cambio, los tratamientos que se encuentran más alejados a los demás son Fructosa + 2% + 0h (T1), Glucosa + 2% + 0h (T9), Fructosa + 5% + 0h (T5) y Glucosa + 5% + 0h (T13).

### Análisis de componentes principales

**Tabla 38**

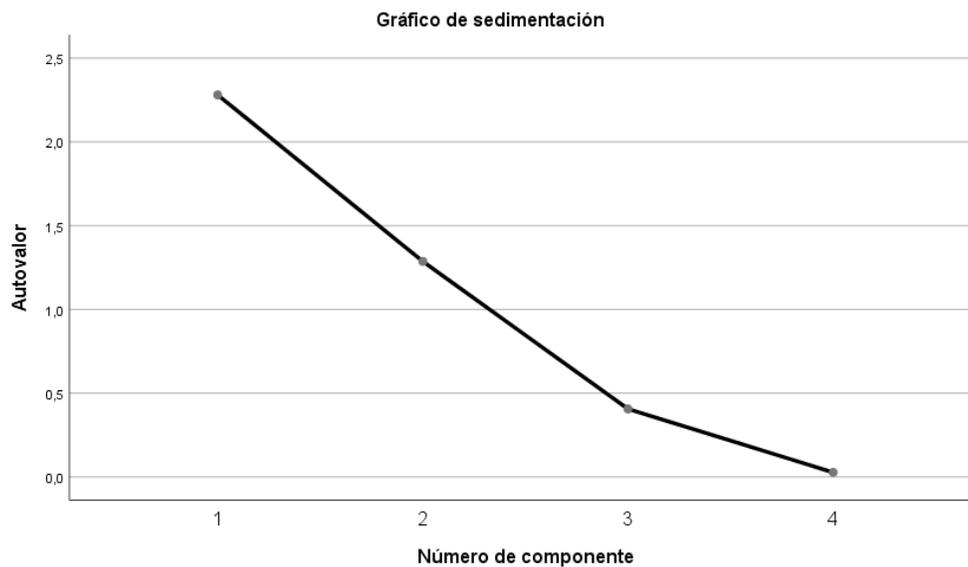
*Matriz de correlación de los componentes principales de los parámetros cinéticos*

<b>Matriz de correlaciones<sup>a</sup></b>					
		<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Brix</b>
<b>Correlación</b>	<b>pH</b>	1,000	-0,489	-0,964	0,175
	<b>Acidez</b>	-0,489	1,000	0,379	0,311
	<b>Absorbancia</b>	-0,964	0,379	1,000	-0,268
	<b>Brix</b>	0,175	0,311	-0,268	1,000

La tabla 38 muestra una correlación inversa entre la absorbancia y el pH.

**Tabla 39***Porcentaje de varianza total explicada*

Componentes						
Componente	Autovalores iniciales			Sumas de cargas al cuadrado de la extracción		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	2,281	57,018	57,018	2,281	57,018	57,018
2	1,286	32,159	89,177	1,286	32,159	89,177
3	,406	10,144	99,321			
4	,027	,679	100,000			

**Figura 15***Gráfico de sedimentación*

En la figura 15, se muestra un gráfico de sedimentación, el cual indica el análisis de los cuatro componentes analizados durante la fermentación para la producción de

bacteriocinas. Además, la tabla 40 muestra los porcentajes de varianza, con el cual se puede determinar que dos componentes son útiles en la investigación, debido a que el porcentaje de varianza entre ambos componentes indican un valor alto.

**Tabla 40**

*Matriz de componentes*

<b>Matriz de componente<sup>a</sup></b>		
	<b>Componente</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>pH</b>	-0,979	0,056
<b>Acidez</b>	0,612	0,650
<b>Absorbancia</b>	0,956	-0,182
<b>Brix</b>	-0,185	0,910

**Tabla 41**

*Tabla de comunalidades*

<b>Comunalidades</b>		
	<b>Inicial</b>	<b>Extracción</b>
<b>pH</b>	1,000	,961
<b>Acidez</b>	1,000	,797
<b>Absorbancia</b>	1,000	,947
<b>Brix</b>	1,000	,862

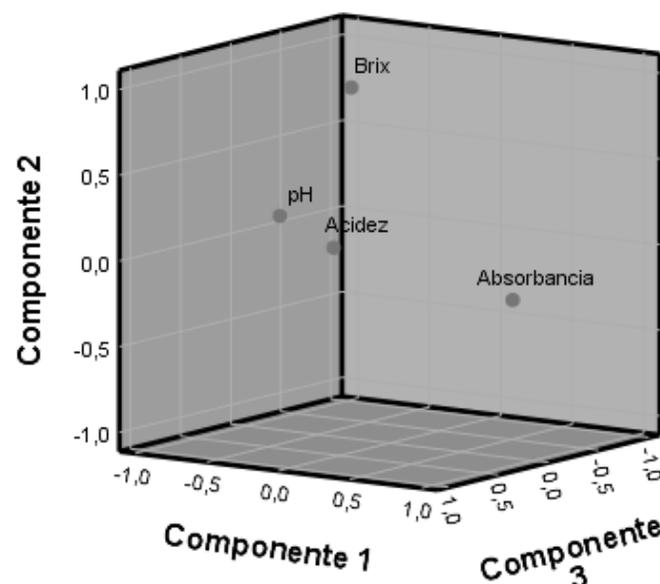
La tabla 40 es útil para identificar los principales componentes extraídos de un conjunto de variables y nos permite evaluar la relevancia que cada uno de estos tienen en relación a las variables estudiadas, donde a medida que aumenta el valor absoluto, se puede interpretar que la variable tiene mayor influencia en el componente en cuestión. Por ejemplo, la primera componente está altamente relacionada con las variables pH, Acidez

y absorbancia, mientras que la segunda componente está más relacionada con la variable Brix.

Por otra parte, la tabla 41 indica la matriz de comunalidades, donde se muestra el porcentaje de cada variable que se puede obtener en relación a los componentes considerandos, es decir que, reteniendo dos componentes, se puede extraer el 96% de la variable de pH, el 79% de la acidez, el 94% de la densidad óptica y el 86% de los sólidos solubles. También, deja en evidencia que el componente 1 corresponde al pH y absorbancia le pertenece al componente 2.

### Figura 16

*Gráfica de componentes principales*



La figura 16 demostró la información de forma agrupada de las correlaciones que comparten las variables evaluadas, se evidenció que el pH, la acidez y °Brix mantienen de alguna forma relación. Mientras que, la absorbancia tiene menor relación con el resto de variables.

**Resultados del análisis de varianza para la variable evaluada en el estudio de la actividad antagonista de las bacteriocinas producidas de la fermentación bacteriana**

***Análisis de varianza para el halo de inhibición***

**Tabla 42**

*Resultados del análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>EFFECTOS</b>					
<b>PRINCIPALES</b>					
A:Tipo de solución	0,0816667	1	2,04167	31,96	0,0000
B:Microorganismos patógenos	0,0358333	2	0,447917	7,01	0,0071
C:Replica	0,0166667	3	0,138889	2,17	0,1336
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,000833333	2	0,0104167	0,16	0,8510
RESIDUOS	0,0383333	15	0,0638889		
TOTAL	0,173333	23			

La tabla 42 presenta el análisis de varianza para el diámetro del halo de inhibición producido por las bacteriocinas frente a diferentes microorganismos patógenos. Se encontró diferencia significativa en el Factor A (Tipo de solución) y Factor B (Microorganismos patógenos). En cuanto a las réplicas y la interacción AB no existió diferencia significativa.

**Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para determinar la diferencia significativa entre los diferentes factores establecidos para el estudio de la actividad antagonista**

**Tabla 43**

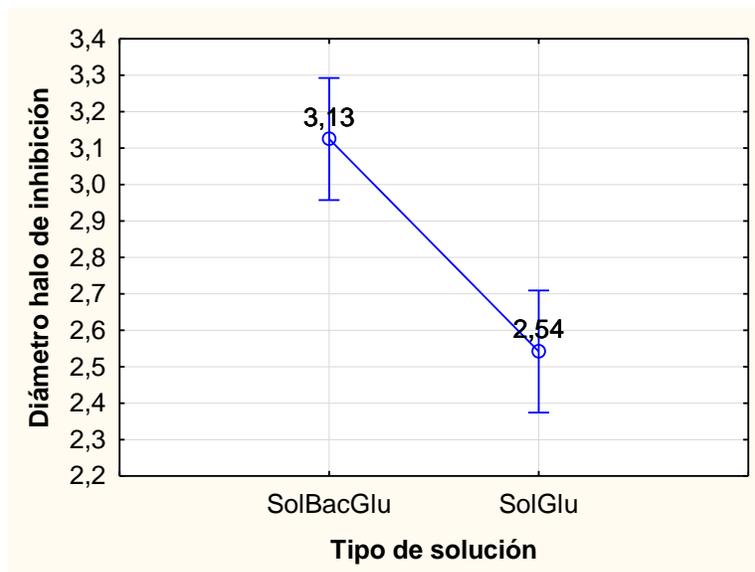
*Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor A en la variable diámetro del halo de inhibición*

Tipo de solución	Diámetro del halo del inhibición
SolGluBac	3,13 <sup>A</sup>
SolGlu	2,54 <sup>B</sup>

La tabla 43 presenta las medias obtenidas del diámetro del halo de inhibición con respecto a cada los tipos de soluciones. Se encontró la formación de dos grupos independientes donde el grupo A de la solución con glucosa más bacteria presentó una media de 3,13 mm, mientras que el grupo B de la solución con glucosa libre de bacteria mostró una media de 2,54 cm de diámetro.

**Figura 17**

*Análisis del efecto del tipo de soluciones en la formación del halo de inhibición*



La figura 17 indica la diferencia significativa entre las medias obtenidas de la actividad antagonista que presentan los tipos de solución evaluados. Se observa que la solución con glucosa más la bacteria (SolBacGlu) presenta mayor inhibición.

**Tabla 44**

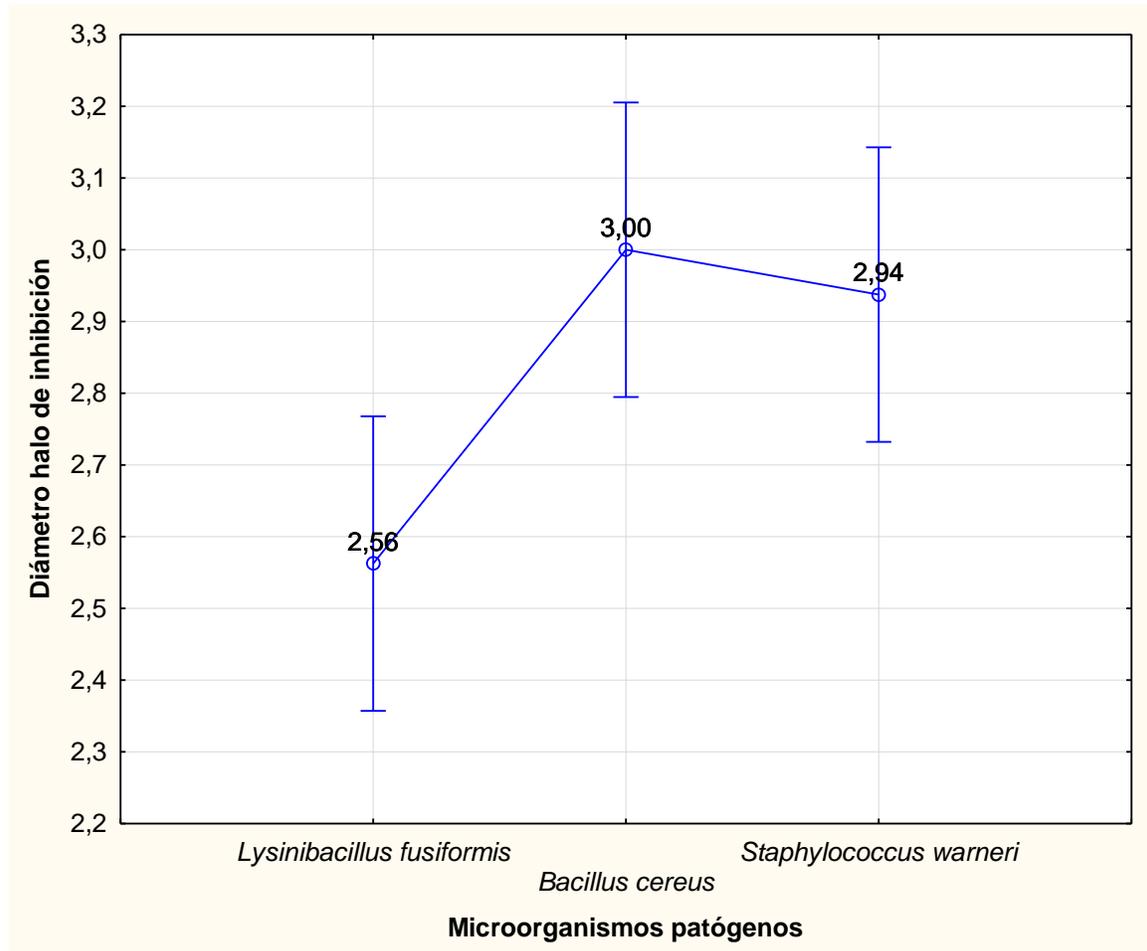
*Resultados de la prueba de significancia de Tukey para el Factor B en la variable diámetro del halo de inhibición*

<b>Microorganismos patógenos</b>	<b>Diámetro del halo del inhibición</b>
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2,56 <sup>A</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	2,94 <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus warneri</i>	3,00 <sup>B</sup>

La tabla 44 presenta las medias obtenidas del diámetro del halo de inhibición con respecto a cada los microorganismos patógenos evaluados. Se encontró la formación de dos grupos homogéneos donde el grupo A de la *Lysinibacillus fusiformis* presentó una media de 2,56 mm de diámetro, mientras que el grupo B de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri* mostraron valores de 2,94 y 3,00 mm, respectivamente.

**Figura 18**

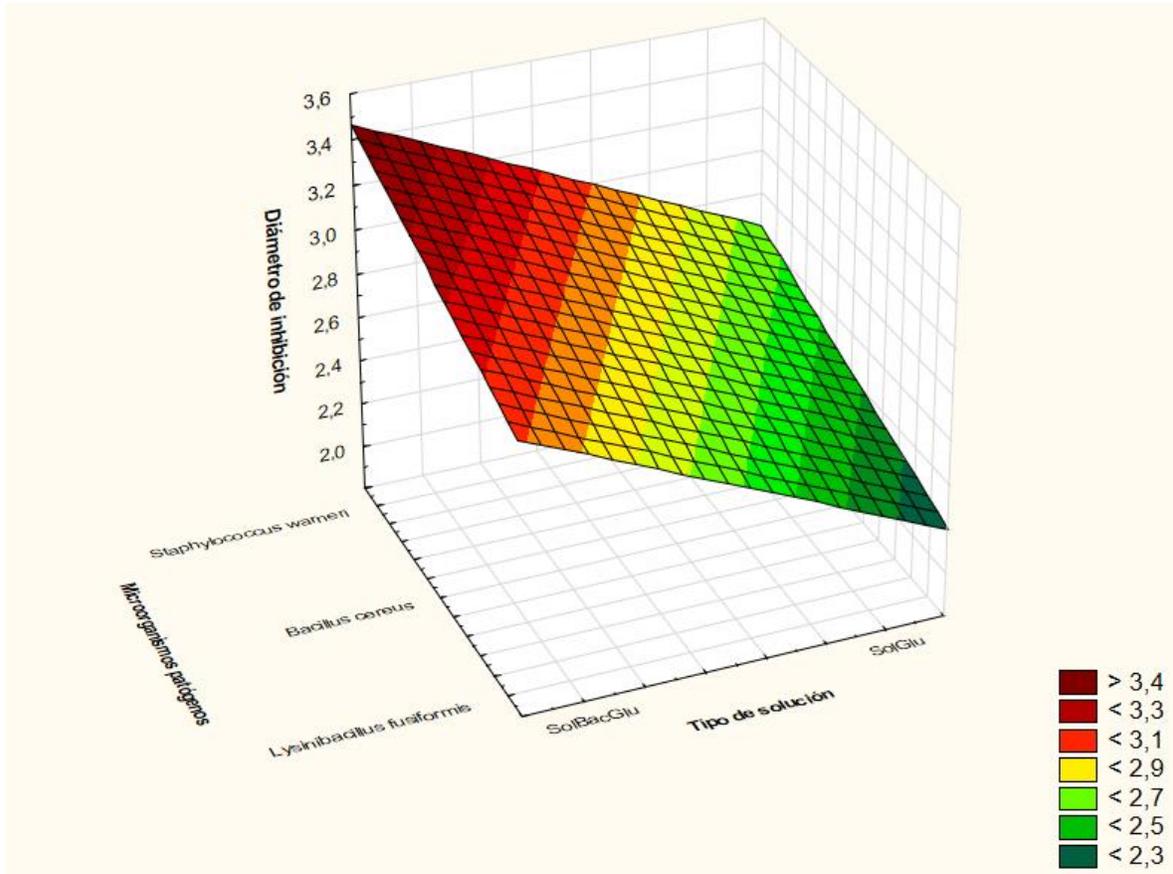
*Análisis del efecto de los microorganismos patógenos en la formación del halo de inhibición*



La figura 18 indica la diferencia significativa entre las medias obtenidas de la actividad antagonista que presentan los microorganismos patógenos evaluados. Se observa que *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri* presentan valores altos de inhibición.

**Figura 19**

Gráfico de superficie de respuesta para la variable diámetro del halo de inhibición en relación la interacción AB



La figura 19 muestra que los valores más altos se encuentran en la parte superior izquierda de la gráfica que coincide con la solución con glucosa más bacteria (SolBacGlu) con *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri*, mientras que los valores más bajos se encuentran de la parte inferior derecha de la superficie que coinciden con la solución con glucosa libre de bacteria con *Lysinibacillus fusiformis* .

## Capítulo V

### Discusión

#### Identificación de la bacteria ácido láctica

Según lo señalado por Velázquez-López, Covatzin-Jirón, Toledo-Meza, & Vela-Gutiérrez (2018), las bebidas fermentadas como el pozol que es elaborado a base maíz contienen una gran cantidad de microorganismos beneficiosos, incluyendo ciertas bacterias lácticas que se desarrollan durante el proceso de fermentación. Estas bacterias son las responsables de la acidificación de la mezcla mediante la producción de una combinación de ácidos, y además contribuyen a proporcionar un sabor fresco y agradable al producto final.

En el presente estudio, se lograron aislar cuatro cepas bacterianas presentes en la chicha de Yamor utilizando el método de estría en Agar MRS. Las cepas aisladas presentaron características similares, como la forma de bacilos en la colonia, tonalidades que oscilaban entre el blanco y el amarillento, tinción gram positiva y prueba negativa de catalasa y al aplicar la identificación del gen 16S, se pudo determinar que la bacteria *L. fermentum* fue la cepa predominante encontrada en esta bebida.

Agati, Guyot, Morlon-Guyot, Talamond, & Hounhouigan (1998), indicaron que las cepas amilolíticas de *L. fermentum* se aislaron por primera vez del ogi y el mawe' de Benin, bebidas a base de cereales. De acuerdo con Calderon, Loiseau, & Guyot (2003), la fermentación natural de las masas de cereales africanos está dominada por bacterias heterolácticas debido a que el almidón es el principal carbohidrato en los cereales. Además, Wells, Krause, Callaway, & Russell (1997), indicaron que *L. fermentum* puede prosperar bajo las condiciones ácidas impuestas por una dieta de 80% de cereales, lo que coincide con las características de la bebida tradicional chicha del yamor, ya que es un producto a base de siete variedades de maíz, es decir, con un alto porcentaje de almidón.

Además, el pH de la bebida fue de 3,49, lo que coincide con el rango ácido que estas bacterias pueden resistir.

### **Respecto a la cinética de crecimiento de la BAL implementando diferentes fuentes de carbono**

#### ***Con respecto a las fuentes de carbono (Factor A)***

Las bacterias del género *Lactobacillus* se cultivan comúnmente en medio MRS (DeMan, Rogosa y Sharpe), el cual, está diseñado para satisfacer sus necesidades nutricionales y proporcionarles un ambiente óptimo para su crecimiento. No obstante, se ha indicado que complementar la formulación de este medio mediante la adición de sales y carbohidratos derivan en un aumento de la masa celular y genera una mejor producción de compuestos bioactivos (León-de la O, et al., 2013). Esto último, de acuerdo con Mckee & Mckee (2014), se correlaciona a que, en la búsqueda de mantener las bacterias ácido lácticas, resulta indispensable contar con una reserva de energía, pues si se parte desde los alimentos, se tiene que los carbohidratos que se consideran la fuente de carbono, que realizan tal suministro.

Como menciona en su investigación, Wang, Tashiro, & Sonomoto (2015), se requiere buscar nuevas fuentes de carbono, a fin de reemplazar los carbohidratos refinados existentes, por lo que se han ido implementando fuentes con naturaleza heterogénea en azúcares, que como resultado genere una mayor producción del ácido láctico y se disminuyan los costos en estos procesos.

Forero & Sánchez (2008), mencionan que ciertas fuentes de carbono, que no se ven favorecidas, solo deben ser incluidas de forma limitada, por lo que aportan baja eficiencia hasta que esté agotada la fuente preferencial. Además, Gaspar, Carvalho, Vinga, Santos, & Neves (2013), identificaron que se pueden obtener beneficios generando subproductos finalizada la fermentación, como lo son producir ácido acético, CO<sub>2</sub>, etanol ácido fórmico, entre otros.

En cuanto al pH, se observó que la glucosa con (4,61) mostró valores bajos, comparados a los obtenidos para fructosa (4,80) el cual mostró valores altos. Así, según Bamforth (2005), se logra evidenciar que los valores de pH obtenidos, se mantienen dentro del rango óptimo que va desde 4,0 a 6,0, considerando que las bacterias ácido lácticas se denominan acidófilas. En ello, es importante considerar que, dependiendo la especie a estudiar tendrán su propio intervalo de crecimiento y a su vez un pH óptimo. También, se considera que las BAL pueden crecer a un rango de pH amplio, pero si se sobrepasa sus límites de tolerancia, pueden darse daños en el microorganismo como daños en su membrana plasmática, volviendo al microorganismo poco disponible (Willey, Sherwood, & Woolvertonn, 2009).

Los valores de pH obtenidos, hacen referencia también a su ambiente natural, por el cual se logran obtener bacterias ácido lácticas. Así, la variación de pH logra simular su comportamiento en varios ambientes, como menciona Rivera, Pertierra, Gaitán, Gutiérrez, & Oltras, (2006) las BAL pueden interactúan en nuestro intestino delgado a un rango de pH que varía entre 5 a 7. Además, Jurado & Jarrín (2015) mencionan que a un pH de 4,5 a 5,0 es cuando logran reproducirse, tal como se evidenció en los valores obtenidos en la presente investigación.

Con respecto a la acidez, en este estudio, se encontró que la glucosa con un valor de 0,018 produjo valores de acidez superiores a los de la fructosa que fueron de 0,017. Lo cual comprueba que la acidez es inversamente proporcional al pH, por lo que se evidenció que, al tener una acidez mayor en el caso de la glucosa, el valor de pH fue menor. Esto según Castellanos, García, Astudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011), mencionan que puede deberse a que las bacterias utilizadas en el estudio tienen una mayor afinidad por la glucosa, es por eso que es importante considerar el pH y sus efectos en el proceso de fermentación al elegir una fuente de carbono para las bacterias. Además, es esencial tener en cuenta que la acidez está estrechamente relacionada con el pH. Por ende, un

aumento en la acidez titulable puede indicar una mayor acidificación del medio durante la fermentación, lo que puede ser beneficioso o no dependiendo de las preferencias de la bacteria y del producto final que se está buscando obtener.

Respecto a los sólidos solubles los resultados presentaron diferencias significativas, la glucosa arrojó un valor menor siendo de 7,7, comparado al obtenido por la fructosa que fue de 8,8. Como se muestra en la investigación de Benavides (2019), se evidencia que debido al crecimiento de las bacterias inoculadas, lo esperado es un descenso en los sólidos solubles, lo cual se encuentra relacionado a los carbohidratos solubles, que dentro de este estudio, se considera a las fuentes de carbono, debido a que son el componente que más incide en esta medida.

La densidad óptica presentó valores más altos para la glucosa con 2,6385, mientras que la fructosa con un valor de 2,0673 fue más baja. Benavides (2019), menciona que es importante comprender que, al buscar la producción de bacteriocinas, se implica tener un conteo de bacterias lácticas mínimo, a fin de detener una acción funcional. Así, según Casaus (1998), el valor mínimo debe ser de  $1 \times 10^6$ /g UFC para que luego se dé la estimulación o producción futura de bacteriocinas. Cabe mencionar que, aunque se puedan presentar distintas velocidades en el crecimiento celular, cuando el medio de cultivo es acondicionado, dependiendo el tiempo de fermentación, se pueden alcanzar fases de crecimiento bacteriano similares (Benavides, 2019).

#### ***Con respecto a la concentración de sustratos (Factor B)***

Respecto al pH, se observó que a la concentración del 5%, mostró un valor de 4,63, siendo menor en comparación al obtenido para la concentración al 2%, que evidenció un pH más alto de 4,79. Mismas que, a pesar de la variación en la concentración de la fuente de carbono, no sobrepasa el punto óptimo de pH, manteniendo sus rangos entre 4,0 a 6,0 (Bamforth, 2005; Willey, Sherwood, & Woolvertonn, 2009). Bamforth (2005), indicó que, mantener un pH óptimo favorece el correcto funcionamiento

celular lo que a su vez permite mantener el pH intracelular deseado comparado a los resultados obtenidos por Torres (2017), se evidenció que el pH disminuye a medida que crece el microorganismo durante el tiempo, esto se da porque los microorganismos utilizan los carbohidratos que se agregaron al medio de cultivo, sirviendo como fuente de energía, llegando en algunos casos a formar hasta ácidos orgánicos.

Otro factor a considerar según es que, el pH puede ser controlado si se utilizan agentes neutralizantes, como lo serían el hidróxido de potasio, calcio, sodio, solución de amonio o carbonato de calcio. También Wang, Tashiro, & Sonomoto (2015), mencionan que, un pH óptimo, podría mejorar los niveles de inhibición y a su vez mejorar la eficacia de la fermentación, pero puede verse afectada la presión osmótica debido a la presencia de bastante solutos en el medio de fermentación Finalmente, la investigación de Ramirez (2009), mostró que a un pH de 3,2 a 3,8, se puede detener su actividad, pero presentan rendimientos del ácido láctico distintos, siendo dependientes de si son bacterias homofermentativas o heterofermentativas

Con respecto a la acidez, se observó que la concentración al 5% tuvo la mayor acidez con un valor de 0,020, mientras que la concentración al 2% arrojó un valor menor con 0,016. Este aumento de acidez según Torres (2017), está relacionado a la disminución del pH, dado por el crecimiento de microorganismos y además que existe una acumulación de ácidos orgánicos conforme pasa el tiempo. Evidenciado con el valor de pH que fue de 4,63 y una alta acidez con un valor máximo de 0,02. Otra referencia se presenta en la investigación de Avtonomova, Krasnopol'skaya, & Maksimov (2006), en la cual, también se demostró que si se tiene un pH menor a 4,0 resulta estresante para cultivos líquidos con bacterias ácido lácticas.

Respecto a los sólidos solubles, se observó que a la concentración del 5% arrojó un valor de 9,3, mismo que fue más alto que el obtenido en la concentración al 2% que arrojó valores más bajos de 7,3. Como menciona Benavides, (2019), cuando se

mantienen sustancias solubles incluidas en el sustrato, se tiene más disponibilidad a fin de que sean aprovechadas por los microorganismos, por tanto, un potencial favorable en la fermentación es tener un mayor aumento en los sólidos solubles. Cabe mencionar que, según la investigación de Quan, Liu, Guo, Ye, & Zhang (2022), la utilización de diferentes cepas de bacterias ácido lácticas, presenta características comunes en la utilización de azúcar, pero como es el caso de *Lactobacillus fermentum*, presenta sus características únicas para metabolizar azúcares. En este caso, el tener una concentración mayor de carbohidratos, arroja una mayor cantidad de sólidos solubles.

La densidad óptica a una concentración del 5 % fue de 2,3439 siendo un valor mayor, en comparación a la concentración al 2% que fue de 2,2445 con un valor menor. De ello, según la investigación de Castellanos, García, Astudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011) la principal influencia sobre la densidad óptica, se basa en la concentración de la fuente de carbono empleada, debido a que pueden actuar positiva o negativamente. Así, a una concentración superior, se obtuvo mayor cantidad de biomasa, en la que su velocidad de formación es más lenta, la cual resulta en fases exponenciales largas, misma que se relaciona a la investigación presentada, que hasta las 72 h se obtuvo un aumento en la densidad óptica. Cabe mencionar que, la investigación de Castellanos, García, Astudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011), también evidenció que glucosa es la mejor fuente de carbono para obtener mayor densidad óptica, al igual que esta investigación.

### **Con respecto al factor C (Tiempo de fermentación)**

Con respecto a la acidez, se observó que a las 0 horas (0,015) mostró valores inferiores mientras que a las 48 y 72 horas (0,019 y 0,020) tuvieron valores superiores. El valor de acidez se ve afectado por el grado de acidez que tiene la bebida fermentada, a medida que avanza la fermentación el pH disminuye junto con el contenido de azúcar mientras que sube la acidez (Guamán, 2013).

Según la investigación de Anrango (2013), el valor referencial de la acidez de la chicha de maíz debe estar entre 0.1 a 3, basado en la Norma INEN 341.

Con respecto al pH, se observó que, al iniciar la fermentación (0 horas), su valor fue de 6,10, mismo que se mostró mayor valor, comparado al obtenido a las 72 horas, que logro mantenerse en un valor de 4,20, el cual resulto inferior. Según la investigación de Torres (2017) se mostró que el pH se ve disminuido, conforme vaya creciendo el microorganismo al transcurrir el tiempo, lo cual se debe a que los microorganismos aprovechan los carbohidratos que suplementan el medio de cultivo, mismos que sirven como fuente de energía, llegando a formar incluso ácidos orgánicos. Además, según Anrango (2013) se menciona que la fermentación puede continuar de forma satisfactoria, si el pH del mosto se logra ajustar a un valor entre 4 y 4,5, de forma tal que se puede favorecer el desarrollo de levaduras y que, al mantener un pH bajo, se logre inhibir el desarrollo de una gran variedad de microorganismos.

Para los sólidos solubles, se observó que a las 0 horas (8,8) mostró valores altos, mientras que a las 24 horas indicó valores bajos siendo este de 7,7. Morales (2018), señala el efecto de la temperatura de pasteurización y la letalidad sobre los sólidos totales en la chicha, en donde se afirmó que la temperatura de pasteurización logra afectar en el contenido de solidos solubles de la chicha, siendo el caso que si se alcanza temperaturas de pasteurización mayores a los 80°C, se obtiene una bebida con un mayor número de solidos totales, siendo el caso contrario si se aplican temperaturas menores a los 70°C. Cabe mencionar que la humedad de la bebida, será la variación de los sólidos totales, afirmando que la hidrólisis de polisacáridos causa dichas diferencias.

Además, como lo menciona la investigación de Quan, Liu, Guo, Ye, & Zhang (2022), la disminución de los °Brix confirma aún más las características que presenta el metabolismo de los azúcares solubles al procesar las bacterias ácido lácticas.

En la densidad óptica, se observó que a las 0 horas (0,4284) mostró valores bajos, mientras que a las 72 horas (3,0838) indicó valores mayores de 3,0838 a comparación con los valores reportados por la investigación de Baca-Armas (2016) en el que el valor de densidad relativa de la chicha del Yamor puede presentar un valor de 1.02 durante el proceso fermentativo, en el cual los valores de densidad de bebidas fermentadas a base de maíz negro y de la combinación de maíz negro y blanco tienen un valor de 1.01.

Según la investigación de Castellanos, García, Astudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011) evidencia que la temperatura es un factor importante a considerar, ya que, a mayor temperatura, se tienen velocidades de crecimiento más altas y a menor temperatura, el crecimiento es más lento, pero más duradero. La misma cobra importancia al tener efecto positivo en su interacción con la concentración.

***Con respecto a la interacción ABC (Fuentes de carbono\*Concentración de sustratos\*Tiempo de fermentación)***

En el caso del pH, el grupo A conformado por las interacciones Glucosa + 5% + 72h (4,04), indicaron valores significativamente menores en comparación al resto. Mismo que según Bamforth (2005) y Willey, Sherwood, & Woolvertonn (2009) se mantiene el valor del pH dentro del rango óptimo que corresponde de 4,0 a 6,0, por lo cual aún se da el crecimiento. Además, como menciona Ramirez (2009) el pH logra una disminución hasta un nivel que las bacterias indeseables quedan inhibidas, pero es importante considerar que a un pH entre 3,2 y 3,8, su actividad puede detenerse. Otro factor importante, es el mencionado por Torres (2017), donde se evalúa que la disminución de pH se da a medida que crece el microorganismo, como se evidencio en esta investigación, después de haber transcurrido 72h de fermentación.

Por otra parte, el grupo L perteneciente a Lactosa + 2% +0h (6,36) indicó mayores valores, en el cual según Melini, Melini, Luziatelli, Ficca, & Ruzzi (2019) factores como el tipo de azúcar, junto a su disponibilidad limitada o no de nutrientes, afectan en el proceso,

además como muestra la guía técnica del medio MRS de Britania (2021), respecto al pH del medio, si no ha transcurrido tiempo de fermentación, se mantendrá un pH aproximado de 6,4, como se muestra en el presente estudio.

En cuanto a la acidez, se obtuvo un mayor contenido en el grupo K conformado por las interacciones Fructosa + 5% + 72h (0,026) y Glucosa + 5% + 72h (0,023), como menciona Torres (2017), la acidez es inversamente proporcional al pH, por lo que el aumento en la acidez, se basa en la disminución del pH, dado por el crecimiento de microorganismos.

Guamán (2013), también menciona que conforme avance la fermentación, para que se dé el aumento en la acidez, el contenido de azúcar disminuye. Por el contrario, el grupo A perteneciente a Fructosa + 2% + 0h (0,013), indicaron menor contenido, como se evidencia en la guía técnica del medio MRS de Britania (2021), al no haber transcurrido la fermentación y mantener un pH alto, los valores de la acidez serán bajos.

Para los sólidos solubles, se obtuvo el mayor valor en el grupo N perteneciente a la interacción Fructosa + 5% + 0h (10,2), que, según Benavides (2019), menciona que los sólidos solubles son una medida indirecta de aquellas sustancias que se presentan disueltas, siendo el caso, dentro del medio, considerando que la mayoría son aquellos carbohidratos, se puede entender resulten en un alto valor de °Brix, como lo evidencian los resultados obtenidos. Además, al estar en un tiempo 0h y no haber iniciado la fermentación, dicho valor no presenta variación alguna. Por otra parte, el grupo A conformado por las interacciones Glucosa+2%+72h (6,4), indicaron medias inferiores en relación a los demás. Según Benavides (2019), debido a que se tiene un crecimiento de las bacterias que se inoculó, el descenso de esta propiedad, trascurridas las 72h es esperado, de forma especial porque es una medida indirecta de las fuentes de carbono, que son aquellos componentes que más inciden y han sido consumidos durante la fermentación.

En la densidad óptica, el grupo J conformado por Glucosa + 5% + 72h (3,6233), indicaron medias superiores, lo que, según Wang, Tashiro, & Sonomoto, 2015 se encuentra relacionado al medio, ya que las bacterias ácido lácticas pueden crecer en el mismo, si se suplementa con carbohidratos, entre los cuales prefieren metabolizar aquellos más fáciles de degradar y que a su vez, logran presentar una tasa mayor de crecimiento. Esto se relaciona a los datos obtenidos por Castellano, Garcia, Astrudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011) que evidencia que glucosa, se considera como la mejor fuente de carbono para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Mientras que la media inferior la presentó el grupo A correspondiente a las interacciones Fructosa + 2% + 0h (0,1473) y Sacarosa + 5% + 0h (0,1337), en las cuales, al no presentar un tiempo de fermentación, aún no logran desarrollar mayor cantidad de biomasa, por lo que no se ha generado todavía un crecimiento microbiano, tal como lo menciona Castellanos, García, Astudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011).

### **Respecto al análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas**

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

En cuanto al tipo de solución, se observó que el tratamiento que incorporó la glucosa y bacteria ácido láctica inoculada mostró un mayor diámetro de inhibición (3,13 mm) en comparación con la solución con glucosa libre de bacteria (2,54 mm). Como mencionan Serna Cock & Enríquez Valencia (2013), esto se debe a la capacidad de inhibición contra bacterias patógenas, que dependerá del tipo de cepa de bacteria ácido láctica que se evalué, lo que se evidencia en esta investigación donde resultó el diámetro de inhibición mayor para aquella solución suplementada por glucosa con la bacteria ácido láctica inoculada. Además, según Parada, Caron, Medeiros, & Socol (2010), gracias a la fermentación de azúcares y consiguiente disminución de pH, un factor importante para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, es la producción de ácidos orgánicos en la fermentación, como el ácido láctico, además que, el mismo bajo pH hace

que los ácidos orgánicos se vuelvan liposolubles, por lo cual pueden atravesar la membrana celular y llegar al citoplasma. Además, las bacterias ácido lácticas tienen un amplio espectro de acción y pueden inhibir tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, lo que aumenta su capacidad para combatir microorganismos patógenos (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010).

### ***Microorganismos patógenos (Factor B)***

*Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri* mostraron mayor inhibición con valores de 3,00 y 2,94 mm, respectivamente y se observó menor efecto en el caso de *Lysinibacillus fusiformis* (2,56 mm). Según Serna Cock & Enríquez Valencia (2013) esto se debe a que la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas, frente a las Gram positivas se ve influenciada por la acción principal de las bacteriocinas. Esto según Favaro, Penna, & Todorov (2015) se debe a que se favorece la formación de poros para luego producir la muerte celular. Cabe mencionar que, otros estudios como el de Serna Cock & Enríquez Valencia (2013) han demostrado que las BAL, pueden también inhibir el crecimiento de patógenos Gram negativos, pero principalmente se debe a su producción de ácidos orgánicos.

## Capítulo VI

### Conclusiones

#### Identificación de la bacteria ácido láctica

La cepa bacteriana *L. fermentum* fue identificada mediante análisis morfológico y pruebas bioquímicas que revelaron su forma de bacilo, coloración blanquecina y resultado negativo en la prueba de catalasa. La confirmación de su identidad se obtuvo mediante la identificación del gen 16S.

#### Respecto a la cinética de crecimiento de la BAL implementando diferentes fuentes de carbono

##### **Fuentes de carbono (Factor A)**

En base a los resultados obtenidos, a partir de las fuentes de carbono tratadas en el medio de cultivo, se concluye que la mejor fuente fue la glucosa. La elección de este sustrato se fundamentó en varias observaciones como el alto contenido de ácido láctico registrado (0,018) y la alta densidad óptica (2,6385), que son indicadores del crecimiento celular. Además, se registró un bajo nivel de sólidos solubles (7,7) y un bajo valor de pH (4,61), lo que sugiere que la glucosa fue más efectiva para promover el crecimiento de *L. fermentum* en particular.

##### **Concentración de sustratos (Factor B)**

La concentración más efectiva para el crecimiento y producción de bacteriocinas de *L. fermentum* fue del 5%. Esta elección se basó en varios indicadores de crecimiento celular, como el alto contenido de ácido láctico registrado (0,020) y la alta densidad óptica (2,3439). Además, se observó un bajo valor de pH (4,63) y en sólidos solubles se obtuvo (9,3), lo que sugiere que la concentración influye en para la supervivencia y crecimiento de la bacteria en particular.

### ***Tiempo de fermentación (Factor C)***

El tiempo de fermentación más efectivo es el de 72h, dado que a dicho tiempo se evidencio un alto crecimiento celular. Esta elección se basó en los valores de los parámetros cinéticos donde se obtuvo alta densidad óptica (3,838), además que la concentración de ácido láctico (0,020) fue alta, misma que se correlaciona con un bajo valor de pH (4,20), esto debido al crecimiento celular, además, evidenció desde las 24h un descenso en los sólidos solubles (7,7), por lo que se concluye que hasta las 72 horas hubo suministro de nutrientes adecuado para que se mantenga una fase exponencial de crecimiento.

### ***Fuentes de carbono\*Concentración de sustratos\*Tiempo de fermentación (Interacción ABC)***

El tratamiento que demostró el mejor crecimiento celular fue el suplementado con glucosa al 5% durante 72 horas de fermentación. Esto se basó en los parámetros cinéticos obtenidos, como un pH de 4,04, una acidez de 0,023, sólidos solubles de 8,0 y una densidad óptica de 3,6233. Además, se observó que el bajo pH resultante de este tratamiento permitió inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas durante la fermentación, lo que les permite a las bacterias de interés mantenerse en ambientes más ácidos.

### **Respecto al análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas**

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

La solución más efectiva para la producción de bacteriocinas fue la que contenía células bacterianas y glucosa (SolBacGlu), ya que se observó un promedio alto en los diámetros de los halos de inhibición, con un valor de 12,25 mm de diámetro. Esto indica que la SolBacGlu tiene una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas evaluadas, como *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus warneri* y *Bacillus cereus*.

**Microorganismos patógenos (Factor B)**

Los microorganismos patógenos *Bacillus cereus* y *Staphylococcus warneri* presentaron mayor sensibilidad ante la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por *L. fermentum*, con valores de inhibición de 3,00 y 2,92, respectivamente. En contraste, *Lysinibacillus fusiformis* tuvo una menor actividad con un diámetro de halo de inhibición de 2,56 mm.

## Recomendaciones

Se recomienda elaborar la bebida fermentada con los procesos de cocción tradicionales, a fin de, por medio de elevadas temperaturas evitar la contaminación y que la fermentación, dure aproximadamente 48 horas.

Realizar una correcta desinfección de los distintos tipos de cedazos a fin de evitar la contaminación y que además logre retener los sedimentos indeseados. También, es importante realizar una perfecta selección de los granos pertenecientes a las distintas variedades de maíz, para que los mismos no interfieran en la fermentación

Identificar correctamente las distintas características morfológicas en la identificación de bacterias ácido lácticas a fin de aislar distintas cepas microbianas. Inicialmente el aislamiento de bacterias ácido lácticas se debe optar por aquellas colonias con apariencia blanquecina y cremosa, a fin de que sean solo bacterias ácido lácticas si así lo requiere la investigación

En base a las cuatro fuentes de carbono estudiadas, se recomienda utilizar Glucosa como suplemento principal en el medio de cultivo MRS específico para BAL, dado que fue el que mostró mejores valores respecto a los parámetros cinéticos

Así mismo se recomienda tener en cuenta el pH inicial de la bebida para mantener un acondicionamiento similar durante los procesos de fermentación. También, que posibles estudios evalúen cómo interfiere la adición de endulzante natural agregado al finalizar el proceso de fermentación.

Para la identificación de bacterias ácido lácticas se recomienda recurrir a la secuenciación molecular de las bacterias, a fin de determinar su especie.

Para las pruebas antimicrobianas se recomienda usar el medio Agar Muller Hinton debido a que es un medio específico para pruebas de inmunosensibilidad, por lo que los microorganismos pueden crecer en el mismo

Se recomienda realizar futuras investigaciones que presenten modificaciones en la temperatura de fermentación a fin de analizar cómo la misma interfiere en el crecimiento celular.

Se recomienda mantener el pH en un rango óptimo de 4,0 a 6,0, ya que como demostró la presente investigación, permite que las bacterias ácido lácticas se sigan reproduciendo. Cabe mencionar que, a menor pH se logra inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados en el medio.

Dado que el mejor tratamiento con fuentes de carbono fue a una concentración del 5%, se recomienda usar la misma concentración para suplementación del medio a fin de que existan suficientes nutrientes y se mantenga la etapa de crecimiento, considerando que un exceso puede causar un estrés bacteriano que inhibe su crecimiento.

Para evitar la etapa de muerte de las bacterias, se recomienda mantener como máximo 72 horas de fermentación para las cepas bacterianas utilizadas. Dado que, hasta dicho periodo, se logran mantener nutrientes si se utiliza la suplementación del medio antes recomendada.

Se recomienda la utilización de SolBacGlu para la producción de bacteriocinas con potencial antimicrobiano. Además, se sugiere la realización de futuras investigaciones para evaluar la efectividad de las bacteriocinas producidas con SolBacGlu contra otros patógenos alimentarios relevantes.

Se recomienda continuar investigando la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por *L. fermentum* sobre otros microorganismos patógenos de interés en la industria alimentaria, con el objetivo de determinar su potencial uso como conservante natural y reducir el uso de químicos sintéticos en la conservación de alimentos.

## Referencias

- Agati, V., Guyot, J. P., Morlon-Guyot, J., Talamond, P., & Hounhouigan, D. J. (1998). Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe` and ogi) from Benin. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 512-520. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.853527.x
- Agudelo Londoño, N. (2013). *Estado del arte de la obtención de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos [Tesis de ingeniería, Universidad Pontificia Bolivariana]*. Repositorio institucional.
- Aguilar Cortez, D. J. (2019). *“Efectos de los macronutrientes principales, sobre el desarrollo y rendimiento del cultivo de maíz canguil (Zea mays L.), en la zona de Babahoyo [Tesis de ingeniería, Universidad Técnica de Babahoyo]*. Repositorio institucional. Retrieved from <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/7267/TE-UTB-FACIAG-ING%20AGRON-000224.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Anagnostopoulos, D. A., & Tsaltas, D. (2019). Fermented Foods and Beverages. In C. M. Galanakis, *Innovations in Traditional Foods* (1er ed., pp. 257-291). Woodhead Publishing. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00010-1>
- Anrango, S. (2013). *Evaluación de tres tipos de Maíz (Zea mays) Suave Morado, Suave Dulce Blanco y Suave Dulce Amarillo, en la elaboración de Chicha de Jora [Tesis de ingeniería, Universidad Politécnica Estatal del Carchi]*. Repositorio institucional, Tulcán.
- Avtonomova, A. V., Krasnopol'skaya, L. M., & Maksimov, V. N. (2006). Optimization of nutrient medium for submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. *Springer: Microbiology*, 148-153.
- Baca-Armas, I. C. (2016). *Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha del Yamor [Tesis de*

- ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial*]. Repositorio universal. Retrieved from <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/16629>
- Baca-Armas, I. C. (2016). *Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha del Yamor [Tesis de ingeniería, Universidad Tecnológica Equinoccial]*. Repositorio universal. Retrieved from <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/16629>
- Balouiri, M., Moulay, S., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Bamforth, C. (2005). *Alimentos, fermentación y microorganismos*. Zaragoza, España: acribia SA.
- Benavides, M. (2019). *Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional de Colombia]*. Repositorio institucional.
- Britania. (2021). *M.R.S. Agar*. Argentina: CABA.
- Calderon, M., Loiseau, G., & Guyot, J. P. (2003). Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and  $\alpha$ -amylase production. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 161-169. doi:10.1016/s0168-1605(02)00147-2
- Carballo-Marrero, S., Martínez-Rodríguez, A., Pérez, S., & Moya, S. (2019). New trends and applications in fermented beverages. In *Fermented Beverages* (pp. 31-66). doi:10.1016/B978-0-12-815271-3.00002-6
- Casaus, M. (1998). *AI SLAM IENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE ORIGEN CÁRNICO PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE LA ENTEROCINA P DE*

*Enterococcus faecium P13 Y DE LA ENTEROCINA B DE Enterococcusfaecium*

T136. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID: FACULTAD

DEVETERINARLA, Madrid.

- Castellano, A., Garcia, L. M., Astrudillo, M., López Galán, J. E., & Florez Pardo, L. M. (2011). Parámetros fisicoquímicos para la síntesis de ácido láctico o etanol de la bacteria. *Acta biol. Colomb*, 16(2), 15-32.
- Castellanos, A., García, L. M., Astudillo, M., López Galán, J. E., & Florez Pardo, L. M. (2011). Parámetros fisicoquímicos para la síntesis de ácido láctico o etanol de la bacteria (*Corynebacterium glutamicum*). *Acta biol. Colomb*, 16(2), 15-32.
- Castellanos, A., García, L. M., Astudillo, M., López Galán, J. E., & Florez Pardo, L. M. (2011). Parámetros fisicoquímicos para la síntesis de ácido láctico o etanol de la bacteria (*Corynebacterium glutamicum*). *Acta biol. Colomb*, 16(2), 15-32.
- Castellanos-Rozo, J., Galvis-López, J. A., Pérez Pulido, R., Grande, M. J., Lucas, R., & Gálvez, A. (2022). Las bacteriocinas y su efecto sinérgico con tecnologías emergentes en alimentos. *Mutis*, 12(2). doi:10.21789/22561498.1841
- Castillas-Corzo, F., Burbano-Argotti, C. A., & Salazar-Duque, D. A. (2020). La chicha, producto gastronómico y ritual: caso Chorro de Quevedo (Colombia) y Otavalo (Ecuador). *Rev. Turismo y Sociedad*, 26, 205-224.  
doi:<https://doi.org/10.18601/01207555.n26.09>
- Chavés-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. G., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048.  
doi:10.1111/1541-4337.12098
- Cuvas-Limon, R. B., Nobre, C., Cruz, M., Rodriguez-Jasso, R. M., Ruíz, H. A., Loredotreviño, A., . . . Belmares, R. (2020). Spontaneously fermented traditional

beverages as a source of bioactive compounds: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(18), 2984-3006.

doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1791050>

Davidson, P. M., Taylor, T. M., & David, J. R. (2021). *Antimicrobials in Food* (4ta ed.). CRC Press.

Faria-Oliveira, F., Diniz, R. H., Godoy-Santos, F., Piló, F. B., Mezdari, H., Castro, I. M., & Brandão, R. L. (2015). The role of yeast and lactic acid bacteria in the production of fermented beverages in South America. In A. Eissa (Ed.), *Food Production and Industry* (pp. 107-135). London, UK: InTechOpen.

Favaro, L., Penna, A., & Todorov, S. D. (2015). BAL bacteriocinogénicas de quesos- ¿Aplicación en bioconservación? *Trends in Food Science and Technology*, 41(1), 37-48.

Forero, A., & Sánchez, S. (2008). Represión Catabólica por Carbono de Bacterias Gram-Positivas: Inteligencia Alimenticia. *BioTecnología*, 12(2), 24-48.

Gaspar, P., Carvalho, A., Vinga, S., Santos, H., & Neves, A. (2013). From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764-788.

Grijalva Vallejo, N. J. (2019). *Caracterización bioquímica y tecnológica de levaduras aisladas en bebidas fermentadas tradicionales del Ecuador [Tesis doctoral, Universitat de València]*. Repositorio institucional. Retrieved from <https://digital.csic.es/bitstream/10261/247550/1/caractecuador.pdf>

Guamán, Á. (2013). *VALIDACIÓN TÉCNICA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LAS CHICHAS (JORA Y MORADA), ELABORADAS POR LA FUNDACIÓN ANDINAMARKA, CALPI-RIOBAMBA [Tesis de bioquímico farmacéutico, Universidad Politécnica de Chimborazo]*. Repositorio institucional.

- INEN 1529-11. (1998). *Control microbiológicos de los alimentos. Mohos y lebaduras viables. Detección*. Retrieved from <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-11.pdf>
- INEN 1529-5. (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos*. Retrieved from <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>
- INIA. (2020). *Manual técnico del cultivo de maíz amarillo duro (1ra ed.)*. (E. Alviárez, Ed.)
- Insuasti-Pérez, R. J. (2018). *La Chicha del Yamor como expresión de la identidad cultural otavaleña [Tesis de ingeniería, Universidad de Otavalo]*. Repositorio institucional. Retrieved from <https://repositorio.uotavalo.edu.ec/bitstream/52000/146/1/UO-PG-GES-2018-08.pdf>
- Jurado, H., & Jarrín, V. (2015). CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus lactis* Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO EN CEPAS PATÓGENAS. *Revista Biosalud*, 49-62.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2018). Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. *Biotechnology Advances*, 36(8), 2187-2200. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.10.007
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3), 1-13.
- León-de la O, D. I., Calderón-Yépez, B., Martínez-Ballinas, A., Sánchez-Herrera, E. M., Zulatto-Lobato, A. C., Camacho-Hernández, I., . . . Salgado-Brito, R. (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*(12), 133 - 144.

- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124. doi:10.1016/j.tifs.2014.05.002
- Martin Katusic, A. D. (2002). *Capacidad Antagonista Frente a Listeria monocytogenes de dos Sustancias Tipo Bacteriocina Utilizadas en Combinación con NaCl y CO<sub>2</sub>* [Tesis de ingeniería, Universidad Austral de Chile]. Repositorio institucional. Retrieved from <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2002/fam381c/sources/fam381c.pdf>
- Martínez Alday, C. A. (2018). *Evaluación del potencia probiótico de bacterias del género lactobacillus para la producción de quesos artesanales* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California]. Repositorio institucional. Retrieved from <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/2720/1/VET008239.pdf>
- Maza Martínez, J. E. (2021). *Obtención de una biopelícula a partir de almidón de maíz chulpi (Zea Mays Amylosaccharata) para embalaje de alimentos* [Tesis de ingeniería, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. Repositorio institucional. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/16772/1/96T00688.pdf>
- Mckee, J. R., & Mckee, T. (2014). Metabolismo de los carbohidratos. In *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida* (5ta ed., pp. 264-370). México: McGraw Hill.
- Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A. G., & Ruzzi, M. (2019). Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*, 11(5), 1189. doi:10.3390/nu11051189
- Miao, J., Xu, M., Guo, H., He, L., Gao, X., DiMarco-Crook, C., . . . Cao, Y. (2015). Optimization of culture conditions for the production of antimicrobial substances by

- probiotic *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6. *Journal of Functional Foods*, 18, 244-253. doi:10.1016/j.jff.2015.07.011
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, 22(8), 1255. doi:10.3390/molecules22081255
- Morales, J. (2018). *EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO DE PASTEURIZACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE LA CHICHA AREQUIPEÑA CLARIFICADA A BASE DE MAÍZ MORADO GERMINADO VARIEDAD KCULLI (Zea mays) [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]*. Repositorio institucional, Arequipa, Perú.
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., . . . López-Gómez, J. P. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentation*, 6(1), 23. doi:10.3390/fermentation6010023
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-7. doi:10.1155/2020/4374891
- Negrete-Romero, B., Valencia-Olivares, C., Baños-Dossetti, G. A., Pérez-Armendáriz, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. (2021). Nutritional Contributions and Health Associations of Traditional Fermented Foods. *Fermentation*, 7(4), 289. doi:https://doi.org/10.3390/fermentation7040289
- Obando Arequipa, E. S. (2019). *Caracterización morfológica de maíz blanco harinoso (Zea may L.) material nativo "Chavo" de la provincia de Chimborazo [Tesis de ingeniería, Universidad Técnica de Ambato]*. Repositorio institucional. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29726/1/Tesis-234%20%20Ingenier%c3%ada%20Agron%c3%b3mica%20-CD%20636.pdf>

- Ojeda-Linares, C., Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., Islas, L. A., Lappe-Oliveras, P., Nabhan, G. P., . . . Casas, A. (2021). Traditional Fermented Beverages of Mexico: A Biocultural Unseen Foodscape. *Foods*, *10*(10), 2390. doi:<https://doi.org/10.3390/foods10102390>
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. P., & Soccol, C. R. (2010). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Recent Research in Science and Technology*, *50*(3), 42-46.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas papel funcional en los alimentos. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*(1), 93-105. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612010000100012#:~:text=Las%20bacterias%20%C3%A1cido%20l%C3%A1cticas%20son,anaerobias%20facultativas%20y%20catalasa%20negativa](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000100012#:~:text=Las%20bacterias%20%C3%A1cido%20l%C3%A1cticas%20son,anaerobias%20facultativas%20y%20catalasa%20negativa)
- Pérez Pérez, R., & Trinidad Díaz, R. E. (2022). *Manual para el aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas [Tesis de licenciatura, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas]*. Repositorio institucional. Retrieved from <https://repositorio.unicach.mx/handle/20.500.12753/4303>
- Phumkhachorn, P., & Rattanachaikunsopon, P. (2010). Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*, *1*(4), 218-228.
- Quan, Q., Liu, W., Guo, J., Ye, M., & Zhang, J. (2022). Effect of Six Lactic Acid Bacteria Strains on Physicochemical Characteristics, Antioxidant Activities and Sensory Properties of Fermented Orange Juices. *MDPI: Food Microbiology*, *11*(13). doi:<https://doi.org/10.3390/foods11131920>
- Ramirez, J. (2009). Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado [Tesis

- de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalada, Mexico].  
*Repositorio institucional*, 150-202.
- Ramírez-López, C., & Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información tecnológica*, 27(6), 115-128. doi:10.4067/S0718-07642016000600012
- Rivera, T., Pertierra, G., Gaitán, B., Gutiérrez, V., & Oltras, M. (2006). *Fundamentos de bioquímica metabólica, Segunda edición*. Madrid: Editorial TÉBAR, S.L.
- Rodriguez Arana, N. K. (2018). *Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita "Capsicum frutescens" [Tesis de licenciatura, Universidad del Perú decana de América]*. Repositorio institucional. Retrieved from [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/9777/Rodriguez\\_a n.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/9777/Rodriguez_a n.pdf?sequence=3&isAllowed=y)
- Rodríguez González, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]*. Repositorio institucional. Retrieved from <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf>
- Sánchez, E. R., & Castro-Vargas, D. J. (2023). Extracción y cuantificación de Antocianinas de maíz morado (zea maysl.) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción. *Revista Latinoamericana de Difusión Científica*, 5(8), 47-80. doi:<https://doi.org/10.38186/difcie.58.04>
- Serna Cock, L., & Enríquez Valencia, C. E. (2013). Actividad antimicrobiana de Weissella confusa y sus metabolitos frente a Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 15(2), 63-69.

- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation*, 6(4), 106. doi:<https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- Silva Zuta, M. Z. (2021). *Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) en Amazonas [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]*. Repositorio institucional. Retrieved from <https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2444/Silva%20Zuta%20Miguelina%20Zayda.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sugrue, I., O'Connor, P. M., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R. P. (2020). Actinomyces Produces Defensin-Like Bacteriocins (Actifensins) with a Highly Degenerate Structure and Broad Antimicrobial Activity. *Journal of Bacteriology*, 202(4). doi:10.1128/JB.00529-19
- Torres, A. (2017). *Producción de un exopolisacárido por la cepa de Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides BL-UV04 en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante un sistema en lote y lote alimentado [Tesis de Maestro, Universidad Veracruzana]*. Repositorio institucional.
- Vásquez, S. M., Suárez, H., & Montoya, O. I. (2009). Evaluación de bacteriocinas como medio protector para la biopreservación de la carne bajo refrigeración. *Revista chilena de nutrición*, 36(3), 228-238. doi:10.4067/S0717-75182009000300005
- Velázquez-López, A., Covatzin-Jirón, D., Toledo-Meza, M. D., & Vela-Gutiérrez, G. (2018). Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco. *CienciaUAT*, 13(1), 165-178. doi:10.29059/cienciauat.v13i1.871

- Vilela, A., Cosme, F., & Ines, A. (2020). Wine and Non-Dairy Fermented Beverages: A Novel Source of Pro- and Prebiotics. *Fermentation*, 6(4), 113.  
doi:<https://doi.org/10.3390/fermentation6040113>
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., . . . Bezirtzoglou, E. (2021). Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods*, 10(1), 69.  
doi:10.3390/foods10010069
- Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 10-18. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.06.003
- Wang, Y., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Producción fermentativa de ácido láctico a partir de materiales renovables: logros recientes, perspectivas y límites . *ScienceDirect: Revista de Biociencia y Bioingeniería*, 10-18.
- Wells, J. E., Krause, D. O., Callaway, T. R., & Russell, J. B. (1997). A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(3), 237-243. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00376.x
- Willey, J., Sherwood, L., & Woolverton, C. (2009). *Microbiología: Prescott, Harley y Klein* (7ma ed.). España: McGraw Hill.
- Wu, C. W., Yin, L. J., & Jiang, S. T. (2004). Purification and Characterization of Bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146-1151. doi:10.1021/jf035100d
- Xiang, H., Sun-Waterhouse, D., Waterhouse, G. I., Cui, C., & Ruan, Z. (2019). Fermentation-enabled wellness foods: A fresh perspective. *Food Science and Human Wellness*, 8(3), 203-243. doi:10.1016/j.fshw.2019.08.003
- Zimina, M., Babich, O., Prosekov, A., Sukhikh, S., Ivanova, S., Shevchenko, M., & Noskova, S. (2020). Overview of Global Trends in Classification, Methods of

Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics*, 553.

doi:10.3390/antibiotics9090553