



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
EXTENSIÓN SANTO DOMINGO**

“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”

Autores: Heredia Sanipatin Kimberly Kassandra
Suarez Jimenez Elyan Alexander

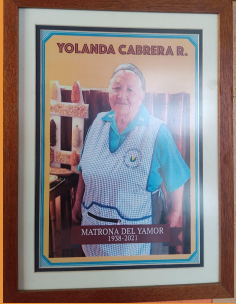
Directora: PhD. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee
Santo Domingo – Ecuador

2023





INTRODUCCIÓN



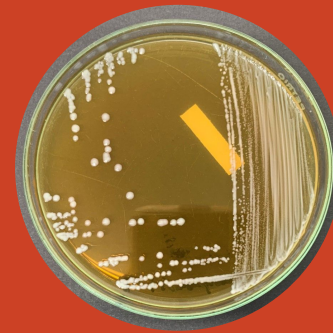
Bebidas fermentadas
Pueden ser preparados
a base de cereales y
forman parte
fundamental de las
dietas locales en
muchas culturas.



- Pueden contribuir a prevenir enfermedades, proteger órganos, evitar padecimientos cardiovasculares, entre otros.
- Tiene propiedades antioxidantes, digestivas y nutricionales que mejoran el sistema inmunológico



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





OBJETIVOS



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

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



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 la bacteriocinas

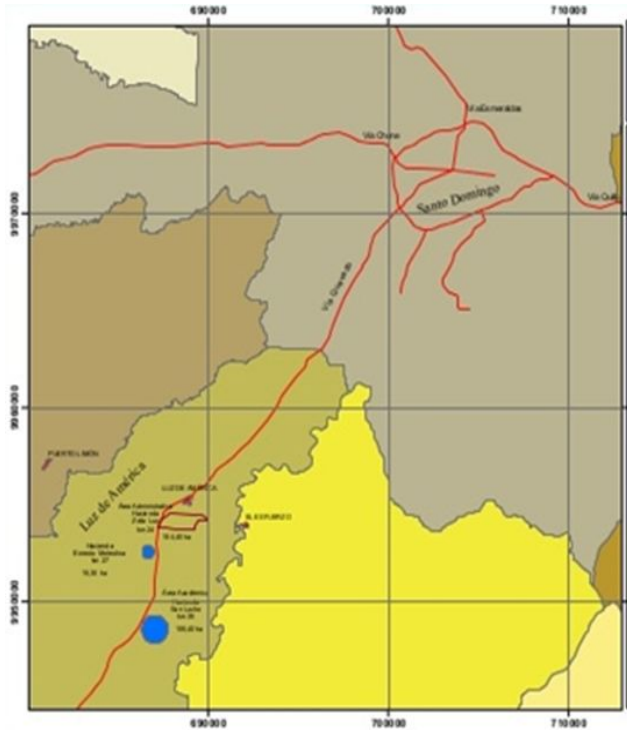
Hipótesis Factor AxB

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.





UBICACIÓN



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

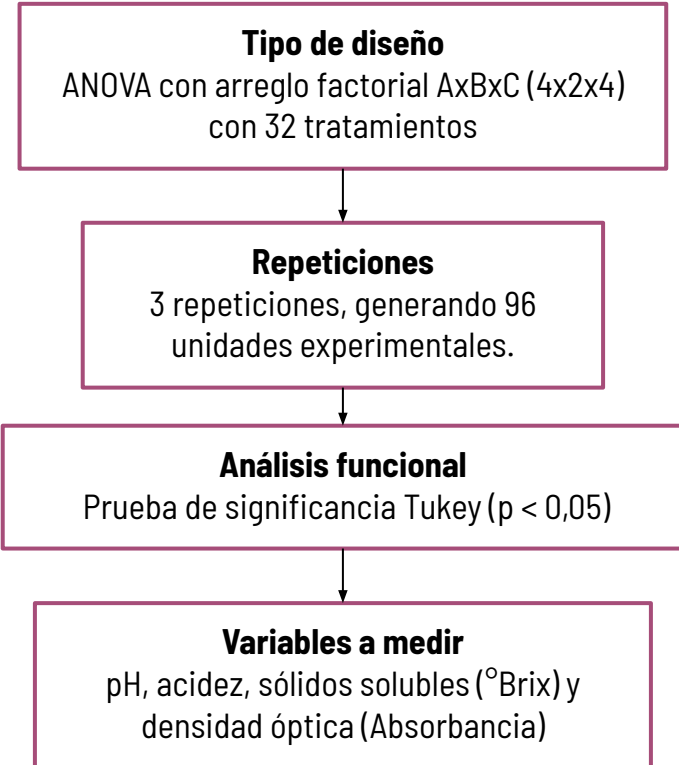
Ubicación geográfica

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



AxBxC

Factores	Simbología	Niveles
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





DISEÑO EXPERIMENTAL



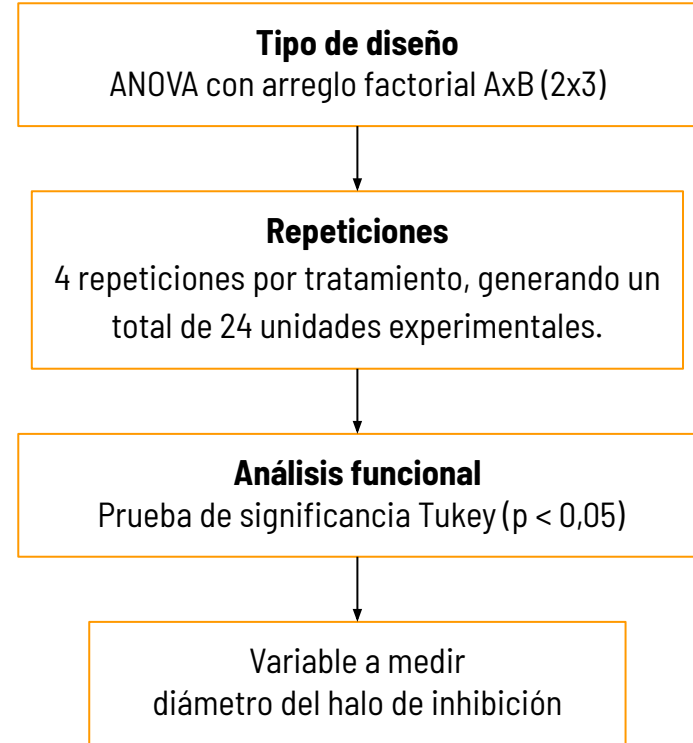
AxB

Factores	Simbología	Niveles
Tipo de solución bacteriana (A)	A0 A1	Solución + bacteria + glucosa (SolGluBac) Solución + glucosa (SolGlu)
Microorganismos patógenos (B)	B0 B1 B2	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Staphylococcus warneri</i>



AxB

Factores	Simbología	Niveles
T1	A0B0	SolGluBac + <i>Lysinibacillus fusiformis</i>
T2	A0B1	SolGluBac + <i>Bacillus cereus</i>
T3	A0B2	SolGluBac + <i>Staphylococcus warneri</i>
T4	A1B0	SolGlu + <i>Lysinibacillus fusiformis</i>
T5	A1B1	SolGlu + <i>Bacillus cereus</i>
T6	A1B2	SolGlu + <i>Staphylococcus warneri</i>





Selección de granos



Tostado y molienda



Mezclado



Cocción (12h)

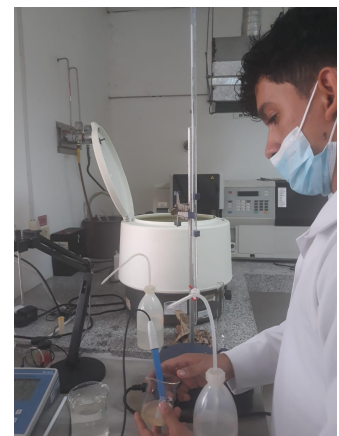


Tamizado



Fermentación (72h)





Acidez



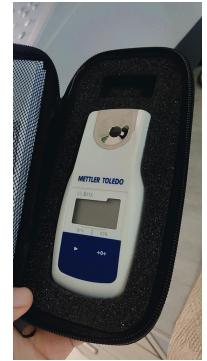
Densidad relativa



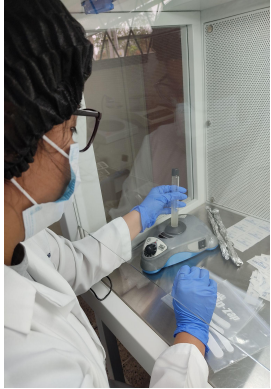
Grados alcohólicos



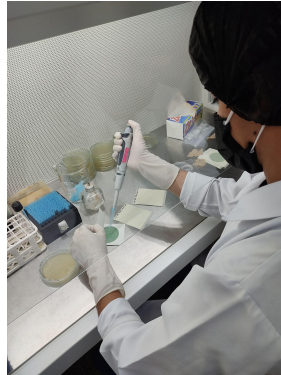
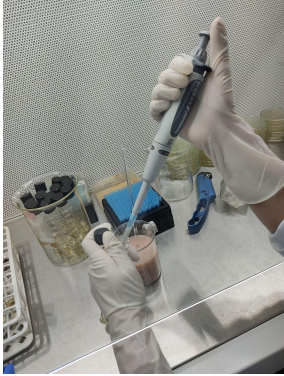
pH



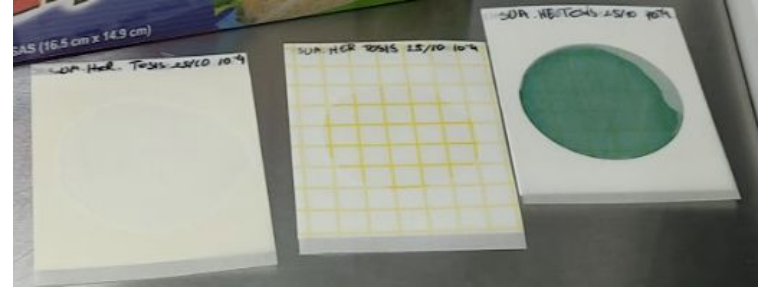
Grados brix



Diluciones seriadas

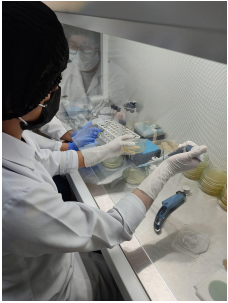


Siembra (1 ml)

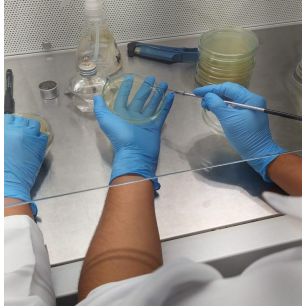


Mohos y levaduras, aerobios, BAL

SIEMBRA Y AISLAMIENTO



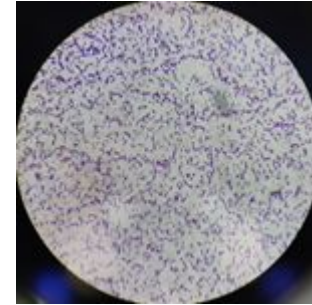
Siembra



Aislamiento



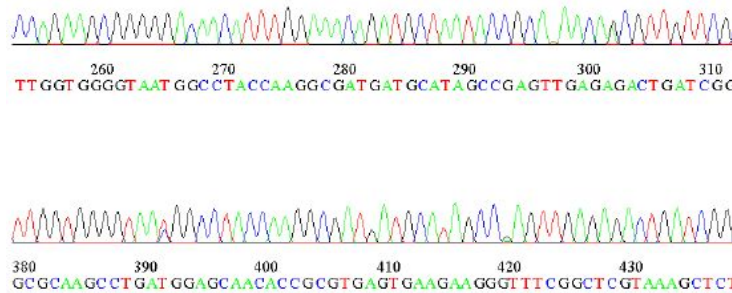
Aislamiento puro



Tinción Gram

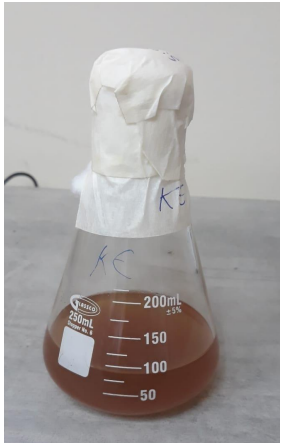


Prueba de catalasas



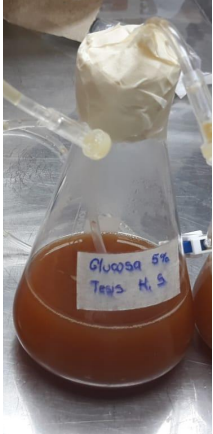
Secuenciación





Parámetro evaluados

- pH
- Acidez
- Absorbancia
- °Brix



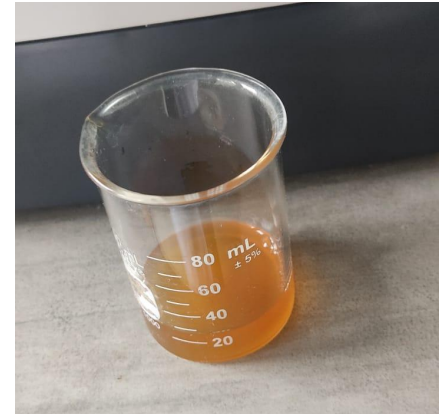
Medio: Glucosa +
5%+ 72h (SolGluBac)



Centrifugación



Filtrado



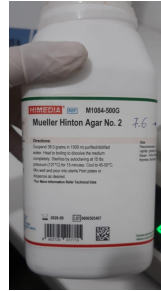
Solución libre de células con
glucosa (SolGlu)



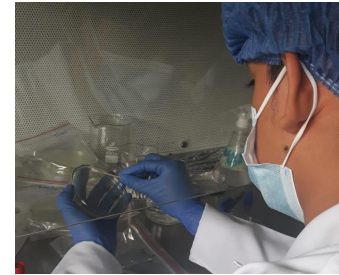
Microorganismos patógenos



Inoculación en suero fisiológico



Preparación de placas con Agar Mueller Hinton



Diseminación de solución de patógenos



Pozos de 6mm



Adición 35 μ l



CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE LA BEBIDA



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

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



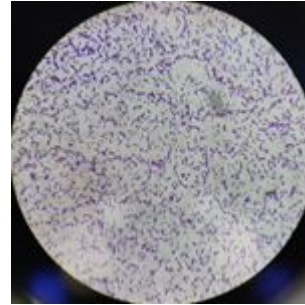


Forma: Circular

Color: Blanco opaco

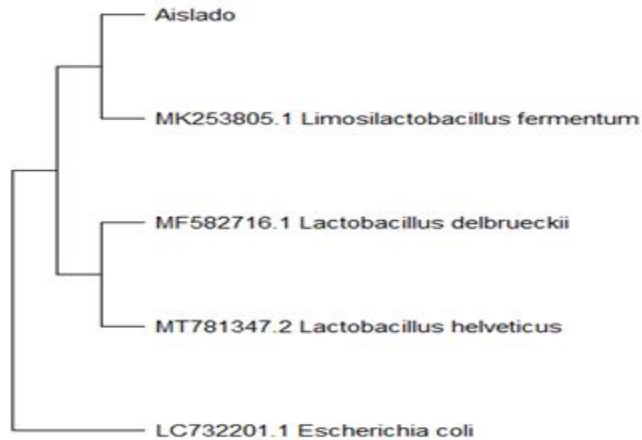
Borde: Entero

Textura: Cremosa

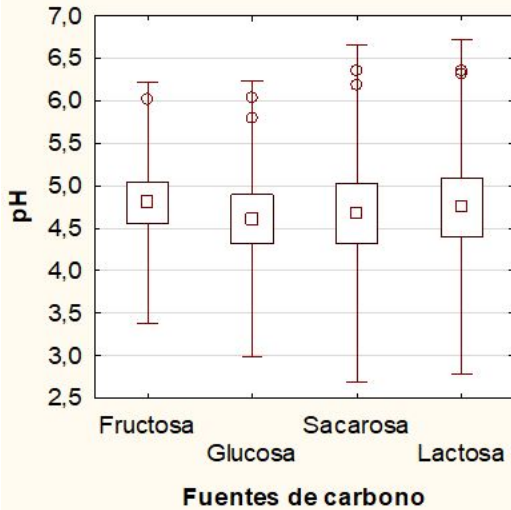


Bacilos Gram (+), cortos, dispuestos solos o en pares

Catalasa (-)

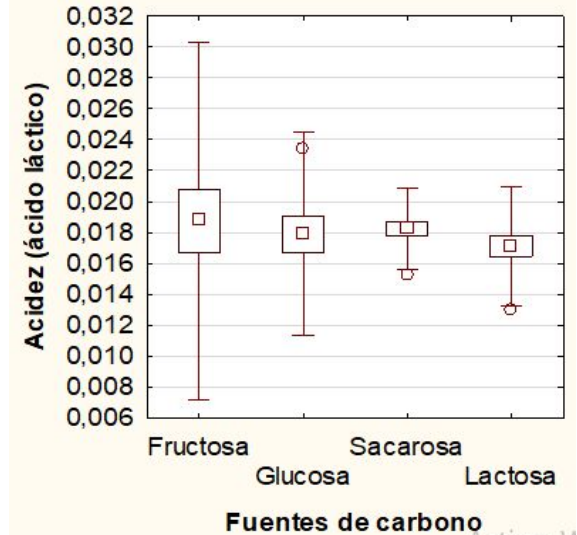


Código	Bacteria	Homología
C2	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	99,53%



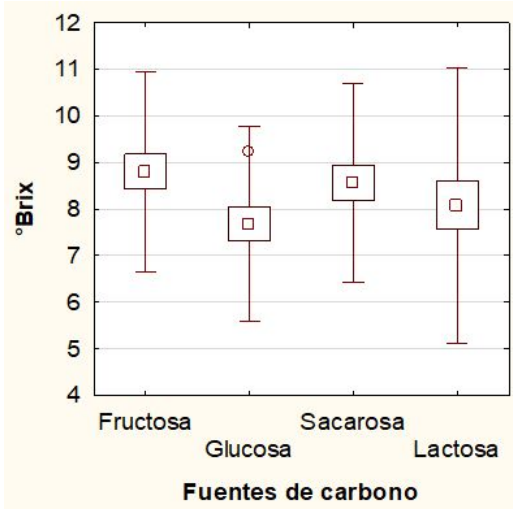
Factor A

Dependiendo la especie a estudiar tendrán su propio intervalo de crecimiento y a su vez un pH óptimo



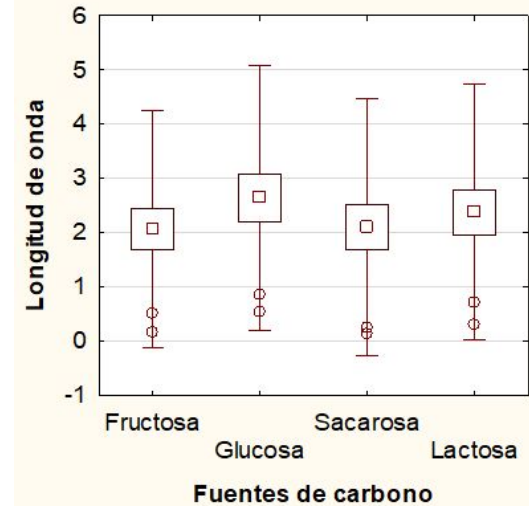
Así, según (Bamforth, 2005) (Willey, Sherwood, & Woolvertonn, 2009), se logra evidenciar que los valores de pH obtenidos, se mantienen dentro del rango óptimo que va desde 4,0 a 6,0, considerando que las bacterias ácido lácticas se denominan acidófilas

Un aumento en la acidez titulable puede indicar una mayor acidificación del medio durante la fermentación, según (Castellanos et al., 2011) las BAL pueden tener más afinidad por la glucosa



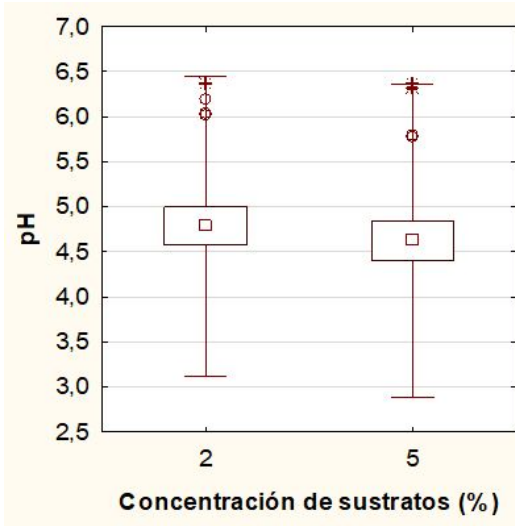
Factor A

Se pueden presentar distintas velocidades en el crecimiento celular, cuando el medio de cultivo es acondicionado dependiendo el tiempo de fermentación (Benavides, 2019).



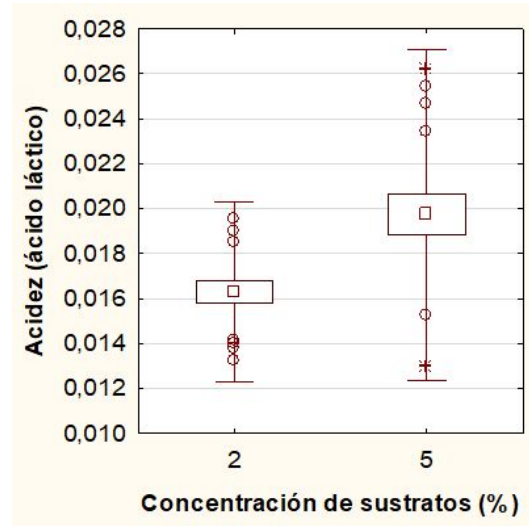
(Benavides, 2019) evidencia que debido al crecimiento de las bacterias inoculadas, lo esperado es un descenso en los sólidos solubles, relacionado a los carbohidratos.

Según (Casaus, 1998), el valor mínimo debe ser de 1×10^6 /g UFC para que luego se dé la estimulación o producción futura de bacteriocinas



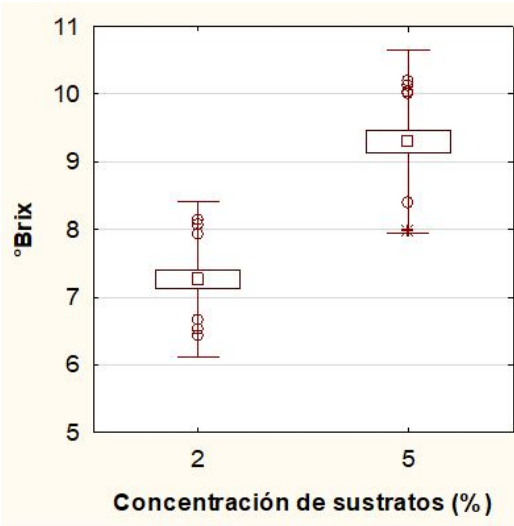
Factor B

(Ramirez, 2009) mostraron que a un pH de 3,2 a 3,8, se puede detener su actividad, pero presentan rendimientos del ácido láctico distintos



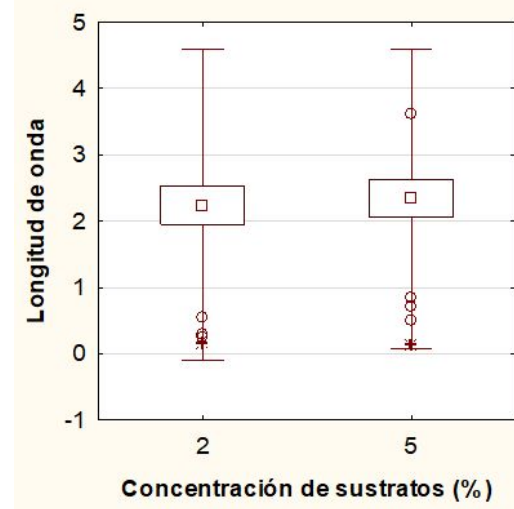
(Wang, Tashiro, & Sonomoto, 2015) menciona que, un pH óptimo, podría mejorar los niveles de inhibición y a su vez mejorar la eficacia de la fermentación.

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.



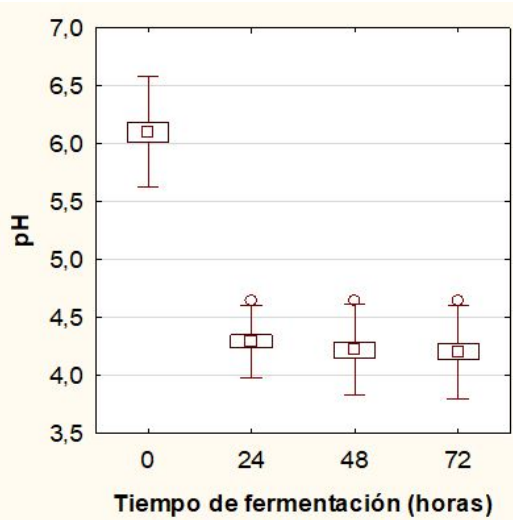
Factor B

Así, a una concentración superior, en la que su velocidad de formación es más lenta, la cual resulta en fases exponenciales largas



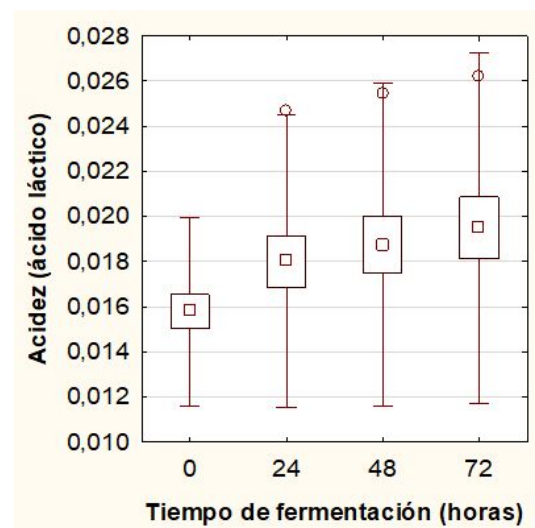
(Benavides, 2019) cuando se mantienen sustancias solubles incluidas en el sustrato, se tiene más disponibilidad, por tanto, un potencial favorable en la fermentación es tener un mayor aumento.

Según la investigación de (Castellanos et al., 2011) la principal influencia sobre la densidad óptica, se basa en la concentración de la fuente de carbono empleada. También evidenció que la glucosa es la mejor fuente de carbono para obtener mayor densidad óptica.



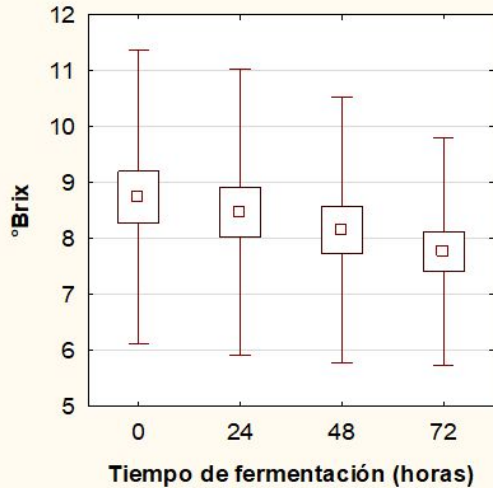
Factor C

A medida que avanza la fermentación el pH disminuye junto con el contenido de azúcar mientras que sube la acidez (Guamán, 2013).



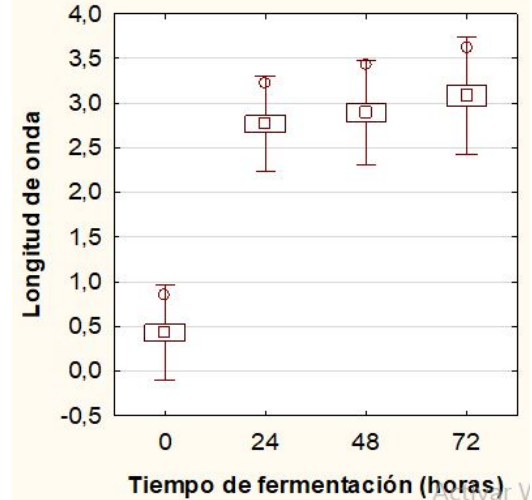
(Torres, 2017) mostró que el pH disminuye debido a que los microorganismos utilizan los carbohidratos que fueron agregados al medio de cultivo, ya que sirven como fuente de energía, pudiendo formar ácidos orgánicos.

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.



Factor C

(Morales, 2018) señala el efecto de la temperatura de pasteurización, la cual afecta el contenido de sólidos solubles totales, misma que es consecuencia de la variación de la humedad.

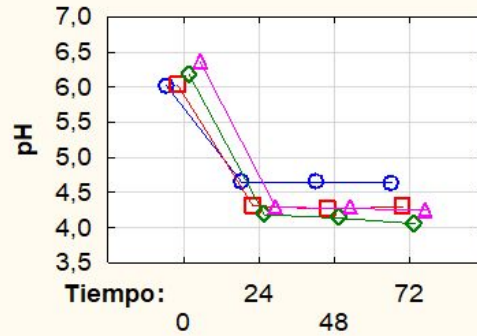


(Quan, Liu, Guo, Ye, & Zhang, 2022) la disminución de los °Brix confirma aún más las características que presenta el metabolismo de los azúcares solubles al procesar las bacterias ácido lácticas.

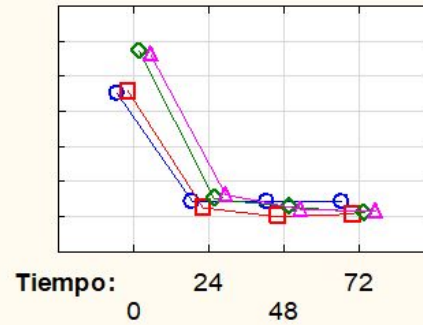
(Castellanos et al., 2011) evidencia que la temperatura es un factor importante a considerar, ya que, a mayor temperatura, se tienen velocidades de crecimiento más altas y a menos temperatura, el crecimiento es más lento.

Interacción ABC

El grupo L perteneciente a Lactosa + 2% +0h (6,36) indicó mayores valores.



Concentración 2%



Concentración 5 %

Fructosa
Glucosa
Sacarosa
Lactosa

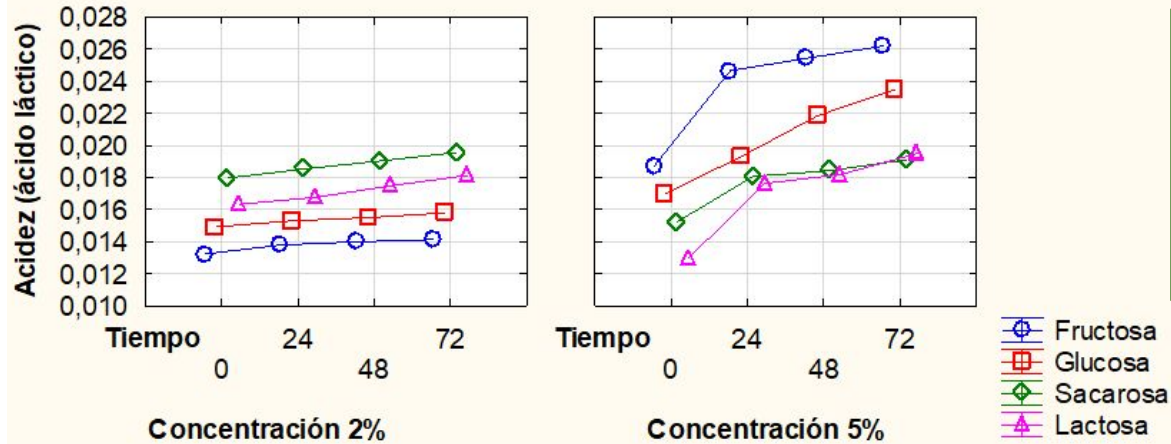
El grupo A conformado por la interacción Glucosa + 5% + 72h (4,04), indicó valores significativamente menores en comparación al resto

(Ramirez, 2009) menciona que 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.

Según Melini et al., (2019) factores como el tipo de azúcar, junto a su disponibilidad limitada o no de nutrientes, afectan en el proceso.

Interacción ABC

El grupo A perteneciente a Fructosa + 2% + 0h (0,013), indicaron menor contenido

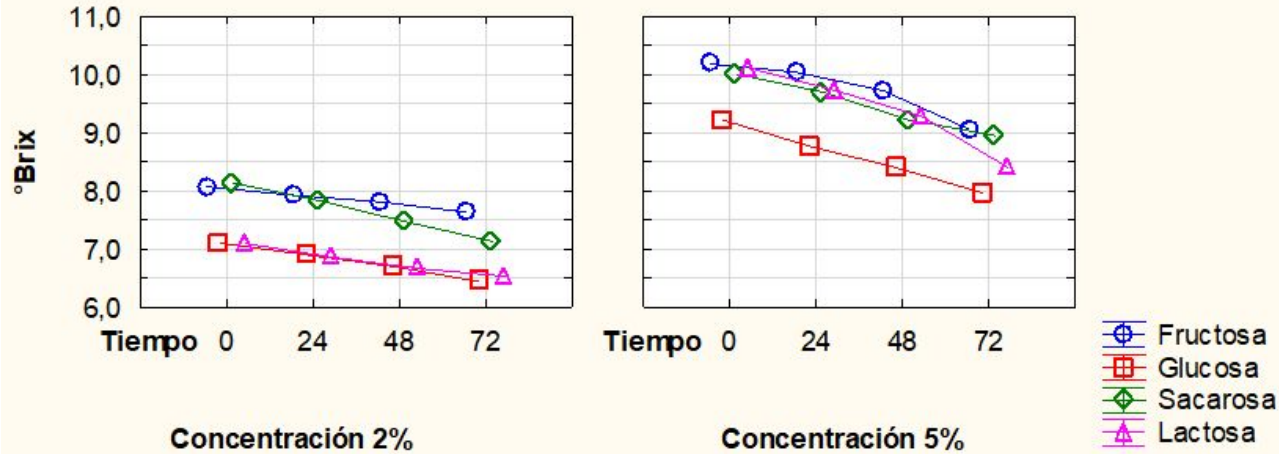


Mayor contenido en el grupo K conformado por las interacciones Fructosa + 5% + 72 h (0,026) y Glucosa + 5% + 72h (0,023),

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.

Guamán (2013), también menciona que conforme avanza la fermentación, para que se dé el aumento en la acidez, el contenido de azúcar disminuye.

Interacción ABC



El grupo A conformado por las interacciones Glucosa+2%+72 h (6,4), indicaron medias inferiores.

El mayor valor en el grupo N perteneciente a la interacción Fructosa + 5% + 0h (10,2).

Según Benavides (2019), debido a que se tiene un crecimiento de las bacterias que se inoculó, el descenso de esta propiedad es esperado.

Según Benavides (2019), menciona que los sólidos solubles son una medida indirecta de aquellas sustancias que se presentan disueltas como fuentes de carbono que han sido consumidas.

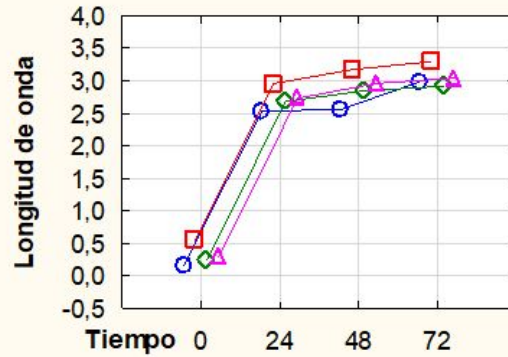


CINÉTICA DE CRECIMIENTO

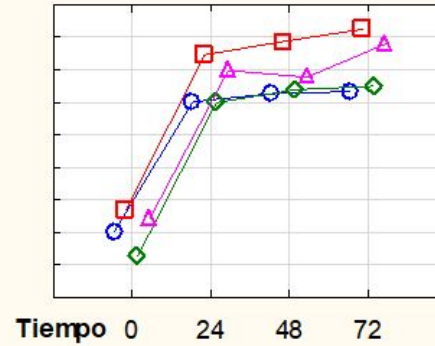


Interacción ABC

El grupo A correspondiente a las interacciones Fructosa + 2% + 0h (0,1473) y Sacarosa + 5% + 0h (0,1337) presentó una media inferior.



Concentración 2%



Concentración 5%

- Fructosa
- Glucosa
- Sacarosa
- Lactosa

El grupo J conformado por Glucosa + 5% + 72h (3,6233), indicaron medias superiores

Tal como lo menciona Castellanos et al., 2011, , 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.

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.

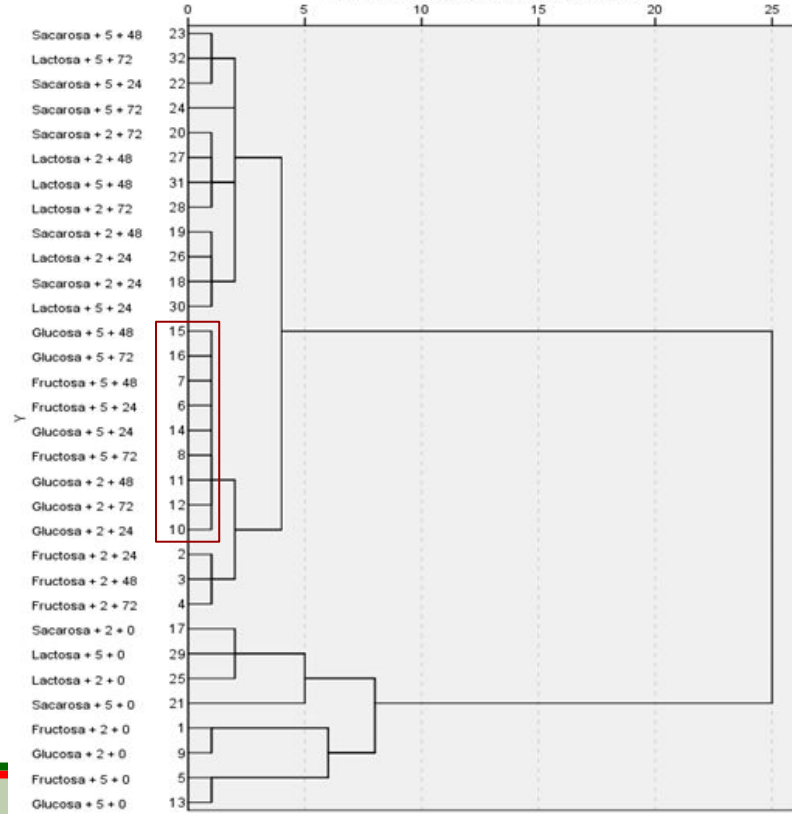




ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS



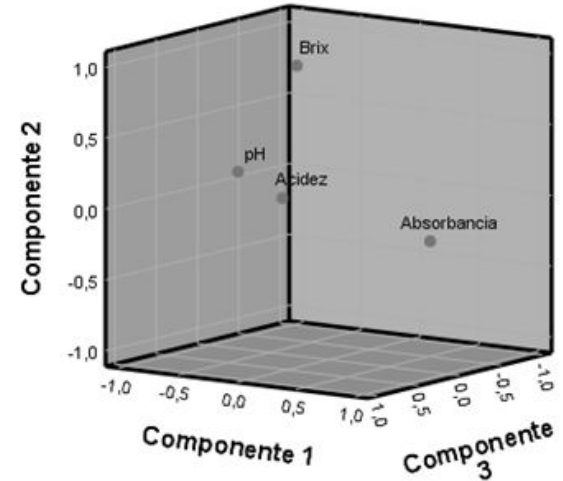
Dendrograma que utiliza un enlace único
Combinación de clúster de distancia re-escalada

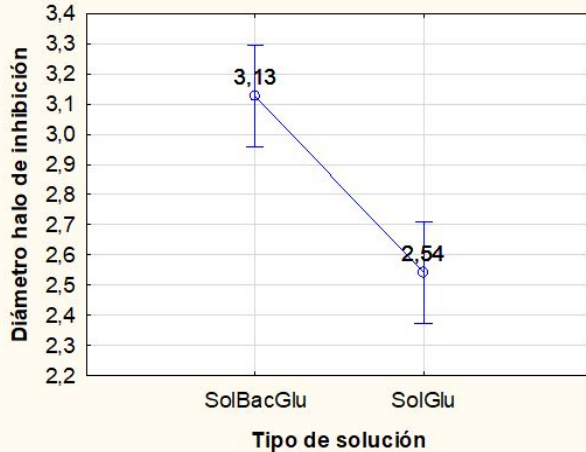


Matriz de correlaciones

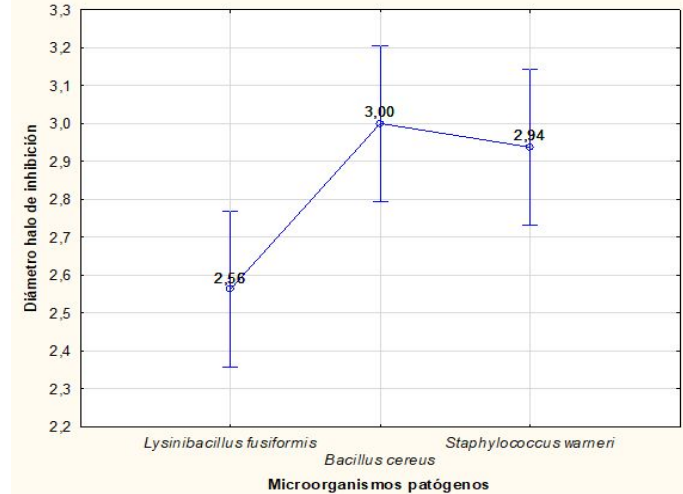
		pH	Acidez	Absorbancia	Brix
Correlación	pH	1,000	-0,489	-0,964	0,175
	Acidez	-0,489	1,000	0,379	0,311
	Absorbancia	-0,964	0,379	1,000	-0,268
	Brix	0,175	0,311	-0,268	1,000

Gráfico de componentes principales



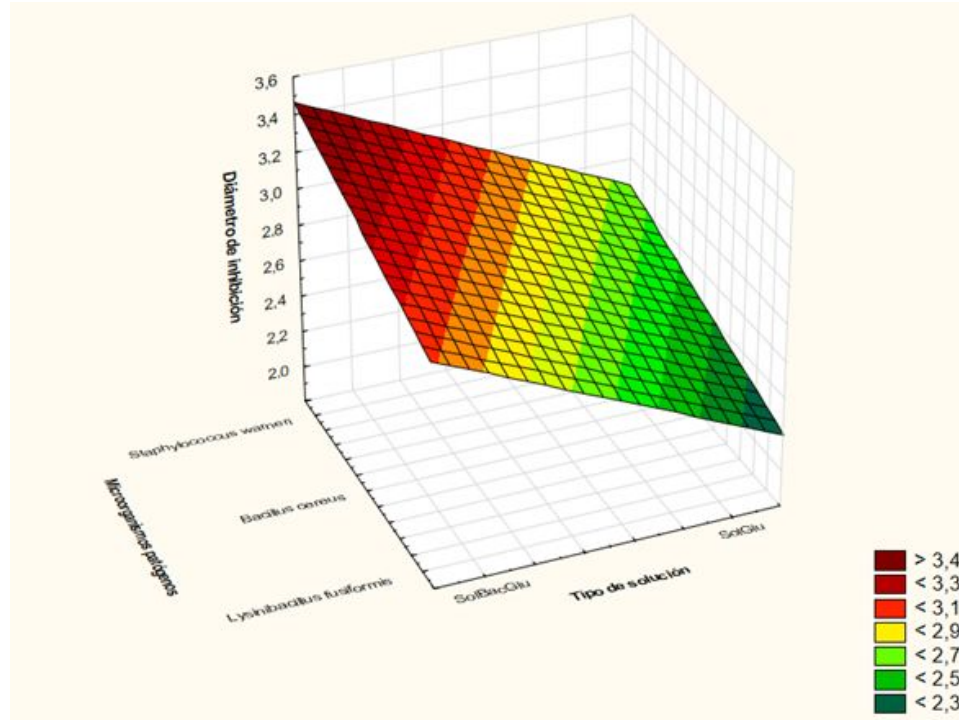


Además, las bacterias ácido lácticas tienen un amplio espectro de acción e inhibición (Phumkhachorn & Rattanachaikunsopon, 2010)



Parada et al., (2010) menciona que, 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

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.





CONCLUSIONES



Respecto al aislamiento

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.





CONCLUSIONES



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

Fuentes de carbono (Factor A)

Se concluye que se acepta la hipótesis alternativa
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 y densidad óptica, además del pH y sólidos solubles.

Fuentes de carbono (Factor B)

Se concluye que se acepta la hipótesis alternativa
Se concluye que 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 densidad óptica y ácido láctico, además de factores como pH y sólidos solubles.





CONCLUSIONES



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

Fuentes de carbono (Factor C)

Se concluye que se acepta la hipótesis alternativa
Se concluye que 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 el alto valor de densidad óptica y ácido láctico, además del pH y sólidos solubles bajos.

Fuentes de carbono (Factor AxBxC)

Se concluye que se acepta la hipótesis alternativa
Se concluye que el tratamiento que demostró el mejor crecimiento celular fue el suplementado con glucosa al 5% durante 72 horas. La elección de este sustrato se fundamentó en varias observaciones como el alto contenido de ácido láctico y densidad óptica, además del pH y sólidos solubles.





CONCLUSIONES



Respecto al análisis de la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas

Tipo de solución (Factor A)

Se concluye que se acepta la hipótesis alternativa

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. Tiene una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas evaluadas

Microorganismos patógenos (Factor B)

Se concluye que se acepta la hipótesis alternativa

Se concluye que el tratamiento que demostró el mejor crecimiento celular fue el suplementado con glucosa al 5% durante 72 horas. La elección de este sustrato se fundamentó en varias observaciones como el alto contenido de ácido láctico y densidad óptica, además del pH y sólidos solubles.





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.
- 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.
- 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
- 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.
- Para las pruebas antimicrobianas se recomienda usar el medio Agar Muller Hinton debido a que es un medio específico para pruebas de inmuno sensibilidad, por lo que los microorganismos pueden crecer en el mismo.
- Se recomienda la utilización de SolBacGlu para la producción de bacteriocinas con potencial antimicrobiano.





¡Gracias!



ESPE
ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
CAMINO A LA EXCELENCIA