

Optimización de medios para producción de bacteriocinas antimicrobianas obtenidas de BAL de Chicha de chontaduro

(Optimization of media for the production of antimicrobial bacteriocins obtained from BAL from Chicha de chontaduro)

Serpa Gaviláñez Evelyn Marlein , Viteri Uribe Brandon Fernando ,
Sungey Naynee Sánchez Llaguno , Juan Alejandro Neira Mosquera

Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí, Ecuador
emserpa@espe.edu.ec, bfviteri@espe.edu.ec, snsanchez@espe.edu.ec, jneiral@espe.edu.ec

Resumen: Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos anaeróbicos presentes en bebidas fermentadas como la chicha de chontaduro. Son conocidas por su potencial de sintetizar bacteriocinas que se utilizan como aditivo para la bioconservación de alimentos por su capacidad antimicrobiana. La presente investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias productoras de bacteriocinas en la chicha de chontaduro, bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana, considerando distintos tipos de sustratos (Glucosa-peptona y Fructosa-peptona), para su aplicación como agente antimicrobiano. La caracterización fisicoquímica y microbiológica de la bebida fermentada se realizó al tercer día y se aislaron las bacterias. La colonia BAL se identificó con pruebas bioquímicas y morfológicas, se realizaron sistemas de fermentación suplementados con Glucosa-peptona y Fructosa-peptona a distintas concentraciones: 0,5 %, 2 %, 5 % y 7 %, se llevaron a cabo mediciones de los parámetros cinéticos, incluyendo pH, acidez, absorbancia y grados Brix, a intervalos de 0, 24, 48 y 72 horas, con el fin de identificar las condiciones óptimas para maximizar la producción de bacteriocinas mediante el análisis del crecimiento bacteriano y la eficiencia del proceso de fermentación. Se evaluaron los parámetros cinéticos para determinar el efecto del tipo y concentración de sustrato, así como el tiempo de fermentación en la producción de bacteriocinas y se determinó el mejor tratamiento con un diseño trifactorial A*B*C, obteniendo en total 32 tratamientos con tres repeticiones. La actividad antimicrobiana se evaluó con el método de difusión de pozos para las tres bacterias patógenas (*Lysinibacillus macroides*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*). El tratamiento más eficaz fue el 32, que consistió en fructosa peptona al 7 % +72 horas. Este tratamiento mostró una mayor producción de bacteriocinas y una mejora en la eficiencia fermentativa con los siguientes parámetros cinéticos: pH 3,53, acidez 0,30, absorbancia 3,49 y grados Brix 7,53. Se observó una correlación inversa entre el pH y la absorbancia, reflejando un crecimiento bacteriano robusto, y una correlación directa entre acidez y absorbancia, indicando una mayor producción de ácidos orgánicos. La fructosa favoreció la producción de bacteriocinas, lo que resalta la importancia de ajustar adecuadamente los sustratos. Además, factores como la temperatura y la presencia de inhibidores deben ser evaluados en investigaciones futuras.

Palabras clave: bacteriocinas, BAL, fermentación, parámetros cinéticos.

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are anaerobic microorganisms present in fermented beverages such as chicha de chontaduro. They are known for their potential to synthesize bacteriocins that are used as additives for food biopreservation due to their antimicrobial capacity. The objective of this research was to isolate and characterize bacteriocin-producing bacteria in chicha de chontaduro, a traditional fermented beverage from the Ecuadorian Amazon region, considering different types of substrates (Glucose-peptone and Fructose-peptone), for its application as an antimicrobial agent. The physicochemical and

microbiological characterization of the fermented beverage was carried out on the third day and the bacteria were isolated. The BAL colony was identified with biochemical and morphological tests, fermentation systems supplemented with Glucose-peptone and Fructose-peptone at different concentrations were performed: 0.5 %, 2 %, 5 % and 7 %, measurements of kinetic parameters, including pH, acidity, absorbance and Brix degrees, were carried out at intervals of 0, 24, 48 and 72 hours, in order to identify the optimal conditions to maximize bacteriocin production by analyzing bacterial growth and the efficiency of the fermentation process. Kinetic parameters were evaluated to determine the effect of substrate type and concentration, as well as fermentation time on bacteriocin production and the best treatment was determined with a trifactorial design A*B*C, obtaining a total of 32 treatments with three replicates. The antimicrobial activity was evaluated with the well diffusion method for the three pathogenic bacteria (*Lysinibacillus macroides*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*). The most effective treatment was treatment 32, which consisted of 7 % fructose peptone + 72 hours. This treatment showed higher bacteriocin production and improved fermentation efficiency with the following kinetic parameters: pH 3.53, acidity 0.30, absorbance 3.49 and Brix 7.53. An inverse correlation was observed between pH and absorbance, reflecting robust bacterial growth, and a direct correlation between acidity and absorbance, indicating increased production of organic acids. Fructose favored the production of bacteriocins, highlighting the importance of properly adjusting substrates. In addition, factors such as temperature and the presence of inhibitors should be evaluated in future research.

Keywords: bacteriocins, LAB, fermentation, kinetic parameters.

1. INTRODUCCIÓN

Los conservantes son aditivos alimentarios utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos como bacterias, mohos, hongos y levaduras, los cuales pueden comprometer la seguridad del alimento y causar riesgos para la salud [1]. Al frenar el deterioro microbiológico, los conservantes permiten prolongar la vida útil de los productos alimenticios. Estos compuestos se clasifican en conservantes de origen natural y sintético, siendo los conservantes artificiales los más usados en la industria alimentaria debido a su eficacia y estabilidad [2].

El marco regulatorio sobre el uso de conservantes químicos en alimentos está definido por diversas normativas internacionales y locales, que establecen los límites máximos permisibles para estos compuestos. A nivel global, el Codex Alimentarius, desarrollado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), proporciona estándares que garantizan la seguridad alimentaria [3]. En América Latina, cada país adopta normativas específicas; en Ecuador, por ejemplo, la regulación es gestionada por la Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA).

Entre los conservantes aprobados tanto por el Codex como por ARCSA se incluyen los benzoatos, sorbatos, sulfitos y nitratos, compuestos ampliamente utilizados por su efectividad para prevenir el crecimiento microbiano [3], [4]. No obstante, algunos de estos conservantes han sido objeto de preocupación debido a estudios que sugieren posibles efectos adversos en la salud cuando se consumen en exceso, lo que resalta la necesidad de regulaciones estrictas y un monitoreo continuo de su uso.

Un estudio realizado por Afshar et al. [5] evidenció que el consumo prolongado de benzoato de potasio (E212) puede inducir efectos teratogénicos en el desarrollo ocular de fetos de ratones BALB/c. De manera similar, Zengin et al. [6] evaluó el benzoato de sodio y el benzoato de potasio, encontraron que ambos compuestos tienen efectos clastogénicos, mutagénicos y citotóxicos en linfocitos humanos in vitro. Por otro lado, Tsay et al. [7] trataron larvas de pez cebra con benzoato de sodio (E211) y encontraron que dosis elevadas (1400-1500 ppm) causaron la muerte de los peces, además de provocar desalineaciones en las fibras musculares, alteraciones en la innervación de axones motores y daños en los tubos pronéfricos. Además, Khan et al. [8]

observó que la administración de benzoato de sodio en dosis de 200, 400 y 700 mg/kg de peso corporal en ratas Wistar macho provocó un aumento significativo en los niveles de citocinas inflamatorias, como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6.

En el estudio realizado por Hrnčiarová et al. [9] se evaluaron los efectos del benzoato de sodio (E211), nitrito de sodio (E250) y sorbato de sodio (E201) en cepas bacterianas aisladas de muestras fecales frescas, reportando valores de IC50 de 0.7, 1.0, 1.2 y 1.4 mg/mL, respectivamente. Los resultados mostraron que la exposición a estos aditivos alimentarios indujo disbiosis en la microbiota intestinal humana, provocando una disminución en la diversidad microbiana. Otro estudio con sorbato de sodio demuestra que es genotóxico para los linfocitos de sangre periférica humana in vitro en concentraciones altas [10].

El sulfito de sodio (E221), otro aditivo químico de uso común ha demostrado tener efectos adversos cuando la exposición es inadecuada o prolongada, desencadenando procesos como apoptosis hepática, necroptosis y piroptosis en ratones y en células AML-12 [11].

El nitrito de sodio (E250), un conservante ampliamente utilizado en productos cárnicos, ha generado controversia debido a su potencial toxicidad en dosis elevadas. Aunque es eficaz en la preservación de alimentos, su accesibilidad y la rapidez con la que puede ser letal han contribuido a su creciente uso en casos de suicidio, lo que ha suscitado preocupación en el ámbito de la salud pública. La ingestión accidental de nitrito de sodio, aunque poco frecuente, suele estar asociada a la preparación no controlada de alimentos caseros. Los síntomas clínicos como náuseas, vómitos y taquicardia suelen ser leves debido a la baja cantidad ingerida. Sin embargo, en casos graves o fatales, se observa cianosis y alteración de la conciencia, con un alto riesgo de mortalidad antes de llegar al hospital, especialmente cuando se consumen dosis elevadas o existen enfermedades crónicas subyacentes [12].

El uso extendido de conservantes sintéticos en la industria alimentaria ha generado preocupación debido a sus posibles efectos adversos para la salud, como se ha observado en estudios que vinculan compuestos como los benzoatos y sorbatos con efectos mutagénicos, citotóxicos y teratogénicos. A pesar de la eficacia de estos conservantes en la preservación de alimentos, el riesgo para la salud humana, especialmente cuando se consumen en exceso, plantea la necesidad urgente de buscar alternativas más seguras. Esta problemática se agrava por el creciente consumo de alimentos ultraprocesados que contienen estos conservantes, lo que aumenta la exposición de la población a los riesgos mencionados. En respuesta a estas preocupaciones y al creciente interés en alternativas más seguras, ha aumentado el desarrollo y la adopción de conservantes naturales, como las bacteriocinas [13].

En los últimos 30 años, las bacteriocinas han generado un gran interés, tanto en la comunidad científica como en el sector industrial, gracias a su capacidad para inhibir microorganismos patógenos. Se han desarrollado diversas investigaciones en torno a su detección, producción, purificación, mecanismo de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación segura en la bioconservación de alimentos [14].

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos tóxicos sintetizados por el ribosoma y se liberan extracelularmente en la fase de crecimiento tardío y estacionario temprano [15], [16]. Entre los principales géneros de bacterias grampositivas que sintetizan bacteriocinas se encuentran *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Microbacterium*, *Aerococcus*, *Leptosphaeria*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* y *Vagococcus* [17],[18]. [19].

Las bacteriocinas suelen ser péptidos catiónicos pequeños (<10 kDa), estables al calor, anfifílicos y capaces de permeabilizar membranas celulares. Además de su actividad

antimicrobiana, los microorganismos productores de bacteriocinas pueden aportar valor agregado a los alimentos, mejorando su textura, valor nutricional y sabor [20]. Estas moléculas han demostrado eficacia contra patógenos significativos, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Clostridium botulinum* [21].

El mecanismo de acción de las bacteriocinas se basa en su capacidad para unirse a receptores específicos en la membrana celular de microorganismos patógenos. Esta interacción provoca la formación de poros que aumentan la permeabilidad de la célula, lo que resulta en su muerte [22]. La producción de bacteriocinas está mediada por un sistema de control que comprende tres componentes fundamentales: un péptido inductivo (o factor activador de feromonas), una histidina quinasa transmembrana que actúa como receptor de feromonas, y un regulador de respuesta. Por lo general, las bacteriocinas son sintetizadas por bacterias ácido-lácticas (BAL) en forma de péptidos inactivos, que son transportados a la superficie celular durante la fase de crecimiento exponencial. En este contexto, las bacteriocinas son activadas a través de un proceso enzimático, donde los transportadores poseen un dominio N-terminal que facilita la escisión del péptido guía, y un dominio C-terminal que participa en la hidrólisis del trifosfato de adenosina, proporcionando así la energía necesaria para su activación [23], [24].

El presente trabajo se justifica en la búsqueda de alternativas más seguras y naturales, centrándose en el potencial de las bacteriocinas producidas por BAL aisladas de la chicha de chontaduro como agentes de bioconservación. La chicha de chontaduro, una bebida tradicional de la región amazónica del Ecuador, no ha sido investigada a gran profundidad como fuente de estos bioconservantes. Aunque la bebida también puede encontrarse en otros países de la región andina, como Perú y Bolivia, y en zonas bajas de Brasil, Colombia, Venezuela, Chile y Argentina [25], [26], su potencial en la industria alimentaria ha sido poco explorado. En este estudio se analizaron los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la chicha de chontaduro para obtener información sobre las bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas (BAL) aisladas de esta bebida. El objetivo fue determinar el sustrato más óptimo para el crecimiento y la producción de bacteriocinas. Para ello, se implementaron sistemas de fermentación con diferentes combinaciones de sustratos (Carbono-Nitrógeno). Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas.

Esta investigación no solo responde a la necesidad de garantizar la seguridad alimentaria sin comprometer la salud de los consumidores, sino que también se alinea con el creciente interés social por alimentos más naturales y saludables. Además, la promoción de conservantes naturales como las bacteriocinas fomentan prácticas de consumo más sostenibles y saludables, respondiendo a la demanda actual de los consumidores por productos libres de aditivos artificiales. Desde una perspectiva política y regulatoria, esta investigación también busca contribuir a la adopción de normativas que promuevan el uso de conservantes naturales en lugar de los sintéticos, alineándose con estándares internacionales como el Codex Alimentarius y las regulaciones locales, como las emitidas por la ARCSA en Ecuador [3].

2. METODOLOGÍA

2.1. Obtención de la chicha de chontaduro

La bebida fermentada chicha de chontaduro utilizada en el presente proyecto de investigación se adquirió de la Comuna Kichwa Juan Montalvo, ubicada en el cantón La Joya de los Sachas, ubicada en la provincia de Orellana, Ecuador. Se evaluó una cantidad aproximada de 1100 mL de la bebida. La chicha fue almacenada en un frasco de vidrio de 2000 mL cubierto con papel aluminio para evitar la exposición a la luz directa, utilizando un sistema de fermentación con trampa de agua que consistía en un tubo de plástico conectado a una botella adicional para permitir la salida de los gases generados durante el proceso de fermentación. El almacenamiento se realizó

a temperatura ambiente y en condiciones sin exposición directa a la luz, lo que garantizó un entorno estable para la fermentación y minimizó posibles alteraciones externas.

2.2. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la chicha de chontaduro

Durante las primeras horas, la bebida inicia su fermentación y las bacterias acidolácticas (BAL) se adaptan al medio (chicha de chontaduro), alcanzando un pico de actividad en su crecimiento exponencial al tercer día. Por lo tanto, en este momento se midieron los parámetros fisicoquímicos: pH por método directo utilizando un pH-metro de la marca BOECO Modelo BT-700, acidez por el método de titulación para medir la acidez titulable, grados alcohólicos mediante el uso de un alcoholímetro BOECO con un rango de 100 % Vol, densidad con el uso de un picnómetro de 10 mL y grados Brix utilizando un refractómetro de mano BOECO de 45 °. Los parámetros se midieron y se compararon de acuerdo con la Norma INEN 2262:2013 para bebidas alcohólicas, a excepción de la densidad y grados Brix.

Se caracterizó microbiológicamente la bebida fermentada mediante la técnica de recuento en placa, utilizando Petrifilm marca 3M para bacterias ácido lácticas (BAL), aerobios mesófilos, mohos y levaduras. Como primer paso, se prepararon diluciones seriadas de la chicha de chontaduro, utilizando como diluyente agua de peptona hasta la dilución 10^{-4} , y se agregó 1 mL de la disolución en el centro del film. Las placas de Petrifilm se colocaron en la incubadora digital marca Memmert, modelo Incubadora I. Los Petrifilm de bacterias ácido-lácticas y aerobios se incubaron durante 48 horas a 37 °C, mientras que los de mohos y levaduras se mantuvieron durante 72 horas a 25 °C. Posteriormente, se contabilizaron utilizando un contador de colonias Isolab (603.11.001). Las metodologías empleadas para la caracterización microbiológica se rigieron y compararon con el manual del usuario de Petrifilm, marca 3M.

2.3. Aislamiento de las bacterias productoras de bacteriocinas

En el tercer día de fermentación, al fermentado se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} utilizando agua de peptona al 1,5 %. De la dilución 10^{-4} , se tomó 1 mL mediante una micropipeta automática BrandTech de 100 µL para cada caja Petri que contenía 25 mL de agar MRS. Las cajas se sellaron con parafilm y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Transcurrido este período, se realizaron nuevas siembras empleando el método de estrías para purificar las colonias.

2.4. Identificación de las colonias aisladas

Se llevó a cabo una identificación morfológica mediante tinción de Gram considerando que las formas bacterias ácido-lácticas (BAL) corresponden principalmente a cocos y bacilos. La reacción a la tinción, que se manifiesta en un color azul/morado, proporciona información sobre la estructura de la pared celular, indicando que las BAL son grampositivas.

Para la tinción Gram, se esterilizaron en una autoclave Tuttnaver automática 2540- PG15E todos los materiales a utilizar para no contaminar las placas con las colonias. Primero, se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos. Luego, con un asa bacteriológica de metal, se tomó una pequeña cantidad de la muestra bacteriana y se esparció por el portaobjetos. Para fijar la muestra al portaobjeto se utilizó un mechero. Cuando la muestra secó, se cubrió con cristal violeta por 60 segundos. Luego, se añadió lugol de igual manera por 60 segundos. Posterior a esto, alcohol cetona durante 15 segundos. Finalmente, se colocó safranina y se dejó por 60 segundos. En cada etapa se realizó un lavado con agua destilada y se secó con el mechero. Para visualizar las placas, se utilizó un microscopio óptico Better Scientific BS750 a una resolución de 100x colocando aceite de inmersión en la muestra del portaobjetos.

Además, se realizaron pruebas bioquímicas: en la prueba de catalasa se utilizó una gota de peróxido de hidrógeno en el portaobjeto con la muestra bacteriana, donde la presencia de burbujas confirmó la presencia de la enzima catalasa y en la prueba oxidasa se agregaron 3 gotas del

reactivo Kovac en un papel filtro con la muestra siendo la coloración rosada, púrpura o negra un resultado positivo para la enzima oxidasa, ayudando a diferenciar el grupo bacteriano.

2.5. Establecimiento de sistemas de fermentación bacteriana con distintos tipos de sustratos y producción de bacteriocinas

La bacteria identificada se replicó una sola vez en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y tras 48 horas, se establecieron los sistemas de fermentación. Inicialmente, se elaboraron los medios en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 200 mL de medio de cultivo MRS y 2 mL de la muestra bacteriana. En cada tratamiento, se añadió un sustrato (glucosa-peptona y fructosa-peptona) en concentraciones de 0,5 %, 2 %, 5 % y 7 % p/v. Para la medición de los parámetros cinéticos, como el % de acidez, pH, densidad óptica a 550 nm se utilizó el Espectrofotómetro Shimadzu UV-1280 y grados Brix, se utilizó un equipo de muestreo (equipo de venoclisis), y las mediciones se realizaron en diferentes intervalos de tiempo (0, 24, 48 y 72 horas). Finalmente, la fermentación discontinua se incubó a 37 °C, sin agitación, durante 72 horas.

El estudio cinético realizado tiene como objetivo central identificar las mejores condiciones para maximizar la producción de bacteriocinas a partir del crecimiento bacteriano y la eficiencia del proceso de fermentación. Las variables medidas (pH, acidez, absorbancia y grados Brix) permiten evaluar cómo los cambios en el tipo y concentración de sustrato, junto con el tiempo de fermentación, afectan este proceso y ayudan a determinar las condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas.

2.6. Análisis estadístico

Para esta investigación se aplicó un diseño estadístico de bloques completamente aleatorizados con un arreglo factorial ABC, donde se evaluaron tres factores: Factor A (Tipo de Sustrato: Glucosa-peptona y Fructosa-peptona), Factor B (Concentración del Sustrato: 0,5 %, 2 %, 5 %, 7 %) y Factor C (Tiempo: 0, 24, 48, 72 horas) como se observa en la Tabla 1, con tres repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico se realizó exclusivamente con los parámetros cinéticos, utilizando ANOVA para determinar diferencias significativas entre los tratamientos, seguido de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) para la separación de medias. Los datos fueron procesados utilizando el software STHATGRAPICS. Las variables evaluadas incluyeron pH, acidez, densidad y grados Brix.

Se realizó un análisis de conglomerados jerárquico con el objetivo de agrupar los tratamientos en función de sus similitudes, permitiendo identificar patrones y posibles relaciones entre los diferentes niveles de glucosa, fructosa y peptona, así como los tiempos de incubación. Esto se realizó para explorar si los tratamientos podían agruparse de forma coherente según su proximidad, lo cual ayudaría a identificar patrones de comportamiento de las bacterias en función de las condiciones experimentales.

Adicionalmente, se empleó un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos y visualizar de forma clara la variabilidad entre los tratamientos, resaltando las variables más influyentes en la diferenciación de los tratamientos. Esto nos permite interpretar mejor las tendencias y patrones complejos en los resultados.

2.7. Obtención de las bacteriocinas

Los mejores tratamientos seleccionados según los parámetros cinéticos, fueron sometidos a centrifugación a 10000 rpm durante 20 minutos en la Centrífuga modelo DM0412P. El sobrenadante resultante se recolectó en un frasco de vidrio ámbar de 100 mL y se ajustó su pH entre 6,0 y 6,5 utilizando NaOH a 1N, con el fin de neutralizar los ácidos orgánicos presentes. Finalmente, el sobrenadante fue filtrado manualmente utilizando papel filtro de 0,22 μm para obtener las bacteriocinas.

Tabla 1. Interacciones respectivas con sus respectivos tratamientos (Tipo de sustratos, concentración del sustrato y tiempo).

Tratamiento	Interacción	Combinación
T1	A0B0C0	Glucosa-Peptona + 0,5 % + 0 h
T2	A0B0C1	Glucosa-Peptona + 0,5 % + 24 h
T3	A0B0C2	Glucosa-Peptona + 0,5 % + 48 h
T4	A0B0C3	Glucosa-Peptona + 0,5 % + 72 h
T5	A0B1C0	Glucosa-Peptona + 2 % + 0 h
T6	A0B1C1	Glucosa-Peptona + 2 % + 24 h
T7	A0B1C2	Glucosa-Peptona + 2 % + 48 h
T8	A0B1C3	Glucosa-Peptona + 2 % + 72 h
T9	A0B2C0	Glucosa-Peptona + 5 % + 0 h
T10	A0B2C1	Glucosa-Peptona + 5 % + 24 h
T11	A0B2C2	Glucosa-Peptona + 5 % + 48 h
T12	A0B2C3	Glucosa-Peptona + 5 % + 72 h
T13	A0B3C0	Glucosa-Peptona + 7 % + 0 h
T14	A0B3C1	Glucosa-Peptona + 7 % + 24 h
T15	A0B3C2	Glucosa-Peptona + 7 % + 48 h
T16	A0B3C3	Glucosa-Peptona + 7 % + 72 h
T17	A1B0C0	Fructosa-Peptona + 0,5 % + 0 h
T18	A1B0C1	Fructosa-Peptona + 0,5 % + 24 h
T19	A1B0C2	Fructosa-Peptona + 0,5 % + 48 h
T20	A1B0C3	Fructosa-Peptona + 0,5 % + 72 h
T21	A1B1C0	Fructosa-Peptona + 2 % + 0 h
T22	A1B1C1	Fructosa-Peptona + 2 % + 24 h
T23	A1B1C2	Fructosa-Peptona + 2 % + 48 h
T24	A1B1C3	Fructosa-Peptona + 2 % + 72 h
T25	A1B2C0	Fructosa-Peptona + 5 % + 0 h
T26	A1B2C1	Fructosa-Peptona + 5 % + 24 h
T27	A1B2C2	Fructosa-Peptona + 5 % + 48 h
T28	A1B2C3	Fructosa-Peptona + 5 % + 72 h
T29	A1B3C0	Fructosa-Peptona + 7 % + 0 h
T30	A1B3C1	Fructosa-Peptona + 7 % + 24 h
T31	A1B3C2	Fructosa-Peptona + 7 % + 48 h
T32	A1B3C3	Fructosa-Peptona + 7 % + 72 h

2.8. Ensayos de actividad antimicrobiana de las bacteriocinas

Para evaluar la actividad antimicrobiana, se utilizó el método de difusión en pozos. Se preparó previamente una solución salina que contenía tres microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Lysinibacillus macroides* y *Bacillus cereus*), los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Santo Domingo. Estos microorganismos fueron aislados en dicho laboratorio y posteriormente enviados para su procesamiento molecular, sin certificación por colecciones oficiales como ATCC o DSMZ.

El inóculo de cada patógeno se aplicó en cajas Petri que contenían el medio de cultivo Muller Hinton Agar mediante el método de estría. A continuación, se aplicó el método de difusión en pozos de agar, donde se realizaron perforaciones en el agar utilizando un sacabocados y se depositaron 15 µL de bacteriocina en cada pozo. Finalmente, las placas se incubaron a 37 °C siendo la temperatura óptima para cada microorganismo patógeno, y se midieron los halos de inhibición (en milímetros).

3. RESULTADOS

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

La caracterización de las propiedades fisicoquímicas (Tabla 2) y microbiológicas (Tabla 3) obtenida de la bebida fermentada estudiada. Obteniendo un numero incontable en la identificación de BAL de manera general.

3.2. Aislamiento e identificación de las bacterias productoras de bacteriocinas

Los resultados de las pruebas bioquímicas (Tabla 4) confirmaron que la colonia 1 pertenece a un género de bacterias ácido-lácticas (BAL), ya que la tinción Gram resultó positiva, y las pruebas de catalasa y oxidasa fueron negativas. La morfología observada bajo el microscopio óptico a 100x reveló la presencia de bacilos. Aunque no se identificó la especie exacta, estas características coinciden con géneros comunes de BAL como *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Leuconostoc*, los cuales son típicos en procesos de fermentación. Sería necesario un análisis molecular adicional, como secuenciación de ADN, para confirmar el género específico.

3.3. Crecimiento bacteriano en los sistemas de fermentación

Se evaluó el crecimiento de la colonia 1 en sistemas de fermentación a lo largo del tiempo, utilizando la absorbancia como un indicador de la densidad celular. En la Figura 1, se presenta la variación de la absorbancia a diferentes intervalos de tiempo (0, 24, 48 y 72 horas). La absorbancia se determinó mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-1280, midiendo la densidad óptica a 550 nm. Este parámetro está directamente relacionado con la concentración de células en suspensión, ya que a medida que las bacterias se multiplican, la turbidez de la solución aumenta, reflejando un incremento en la absorbancia.

El análisis mostró una correlación significativa entre el tiempo y la absorbancia, con un coeficiente de 0,97028, lo que indica un crecimiento exponencial durante las primeras fases de la fermentación. Esta medición es clave para monitorear el desarrollo del cultivo bacteriano y evaluar su actividad metabólica, ya que un aumento en la absorbancia sugiere un incremento en la biomasa bacteriana, lo que es esencial para comprender la eficacia del sistema de fermentación.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la chicha de chontaduro.

Acidez % (p/v)	pH	Densidad	°Alcohólicos	°Brix
0,23 g/L	4,5	1,00 g/mL	<5°	3

Tabla 3. Propiedades microbiológicas de la chicha de chontaduro.

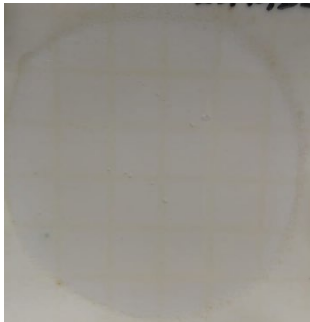
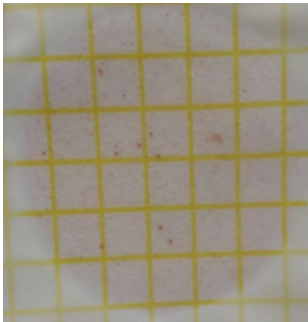
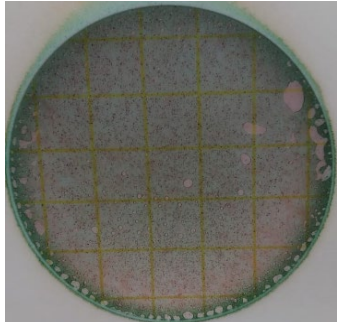
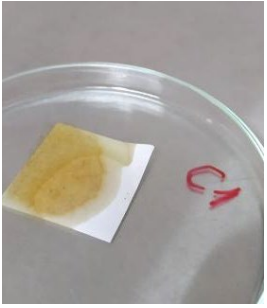
Mohos y levaduras	Aerobios	Bacterias ácido lácticas
		
1E+4 UFC/mL	2,17E+6 UFC/mL	3E+6 UFC/mL

Tabla 4. Colonia 1 pruebas bioquímicas.

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

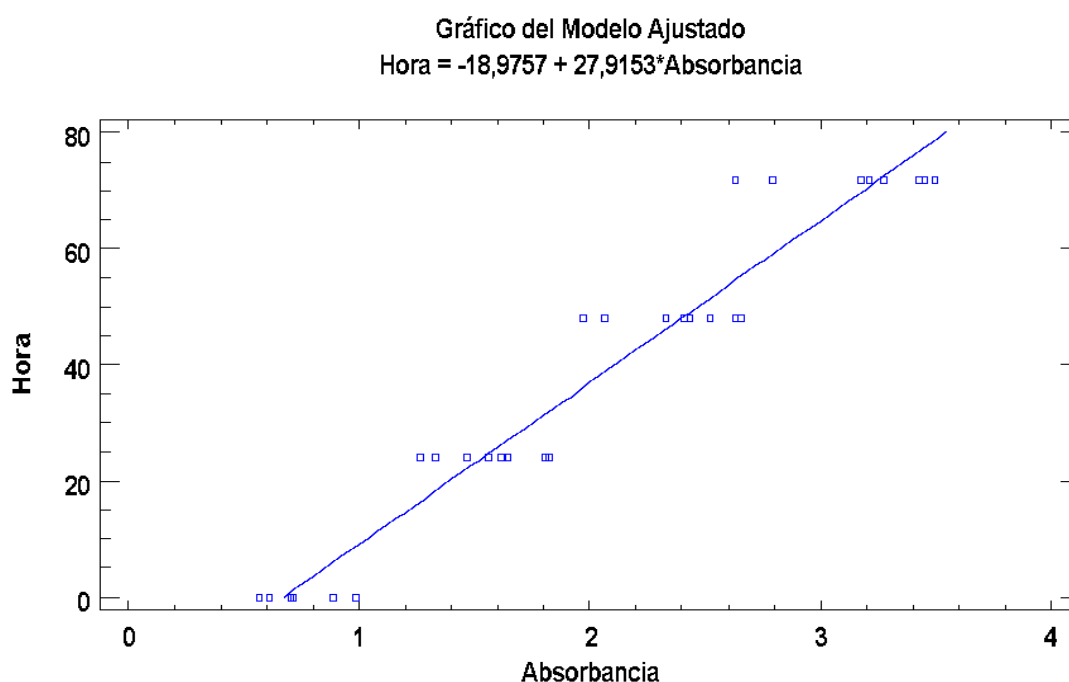


Figura 1. Regresión Simple: Hora vs. Absorbancia.

3.4. Prueba de significación de Tukey ($p < 0,05$) para la variable pH para mayor producción de bacteriocinas

Se observó una variación significativa en los valores de pH a lo largo de los diferentes tiempos de fermentación y concentraciones de sustrato como se evidencia en la Figura 2. El mayor valor de pH se registró en el tratamiento con Fructosa-Peptona al 0,5 % y 0 horas, alcanzando un valor de 6,21, lo que indica que este sistema mantuvo una baja acidez en las primeras etapas del proceso. En contraste, el valor más bajo de pH se obtuvo en el tratamiento con Fructosa-Peptona al 7 % y 72 horas, con un valor de 3,53, lo que sugiere que a concentraciones más altas de fructosa y tras tiempos prolongados de fermentación, se genera una mayor producción de ácidos, lo que provoca una disminución del pH. Esta tendencia podría estar asociada al aumento en la producción de compuestos ácidos como parte del metabolismo bacteriano en el sistema de fermentación.

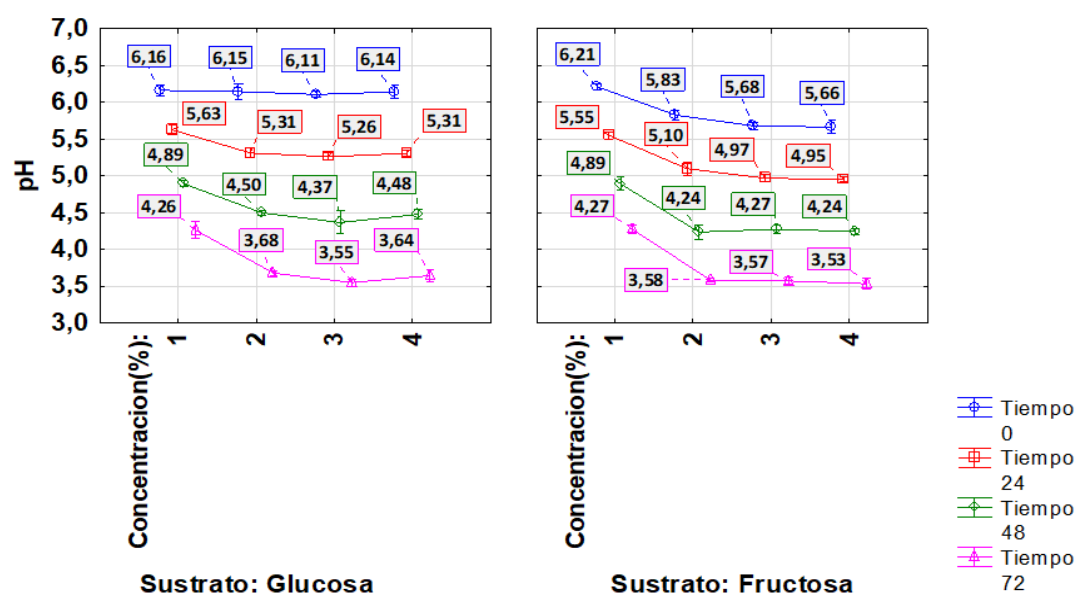


Figura 2. Prueba de significación de Tukey para pH (Interacción ABC: Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo).

3.5. Prueba de significación de Tukey ($p < 0,05$) para la variable acidez para mayor producción de bacteriocinas

En la variable de acidez (g/L), se observó un comportamiento acorde con los cambios de pH, donde los tratamientos con mayor concentración de sustrato y tiempos de fermentación prolongados resultaron en mayores valores de acidez como se observa en la Figura 3. El mayor valor de acidez fue registrado para el tratamiento con Fructosa-Peptona al 7 % y 72 horas, alcanzando 0,30 unidades de acidez. Este resultado sugiere una correlación directa entre el tiempo de incubación y la producción de ácidos en este sistema. Por otro lado, el valor más bajo de acidez se obtuvo para el tratamiento con Glucosa-Peptona al 5 % y 0 horas, con un valor de 0,02 unidades, lo que es coherente con un proceso de fermentación recién iniciado donde aún no se ha producido una cantidad significativa de ácidos.

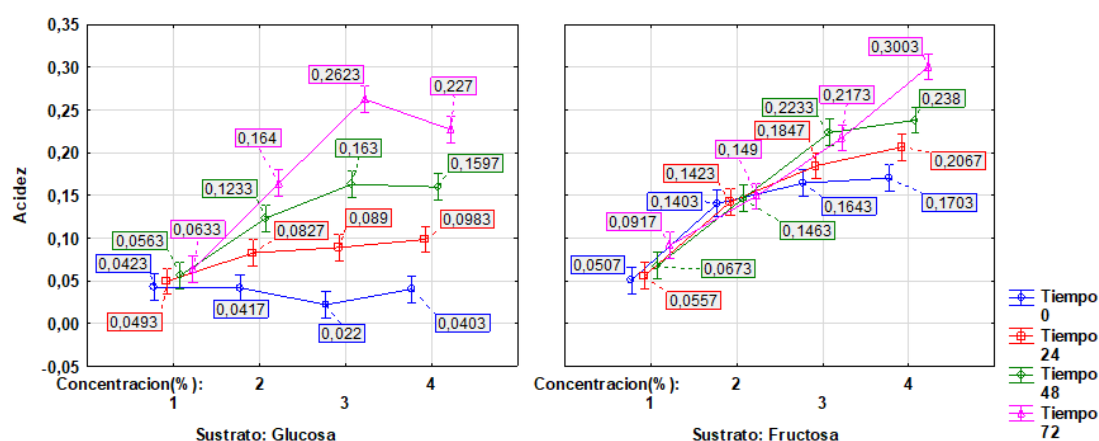


Figura 3. Prueba de significación de Tukey para acidez (Interacción ABC: Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo).

3.6. Prueba de significación de Tukey ($p<0,05$) para la variable absorbancia para mayor producción de bacteriocinas

La absorbancia, medida como un indicador de crecimiento celular y turbidez del medio, mostró valores más altos conforme aumentaban la concentración del sustrato y el tiempo de fermentación como se presenta en la Figura 4. En los tratamientos con fructosa, se observó que el valor máximo de absorbancia fue 3,49, registrado para Fructosa-Peptona al 7 % y 72 horas, lo que indica un mayor crecimiento bacteriano en este sistema. En contraste, el valor más bajo de absorbancia fue de 0,565 para el tratamiento con Glucosa-Peptona al 0,5 % y 0 horas, lo que refleja un crecimiento bacteriano limitado al inicio de la fermentación. La fructosa parece favorecer una mayor proliferación bacteriana en comparación con la glucosa, lo que podría estar relacionado con la capacidad de la bacteria para metabolizar este sustrato de manera más eficiente bajo las condiciones experimentales.

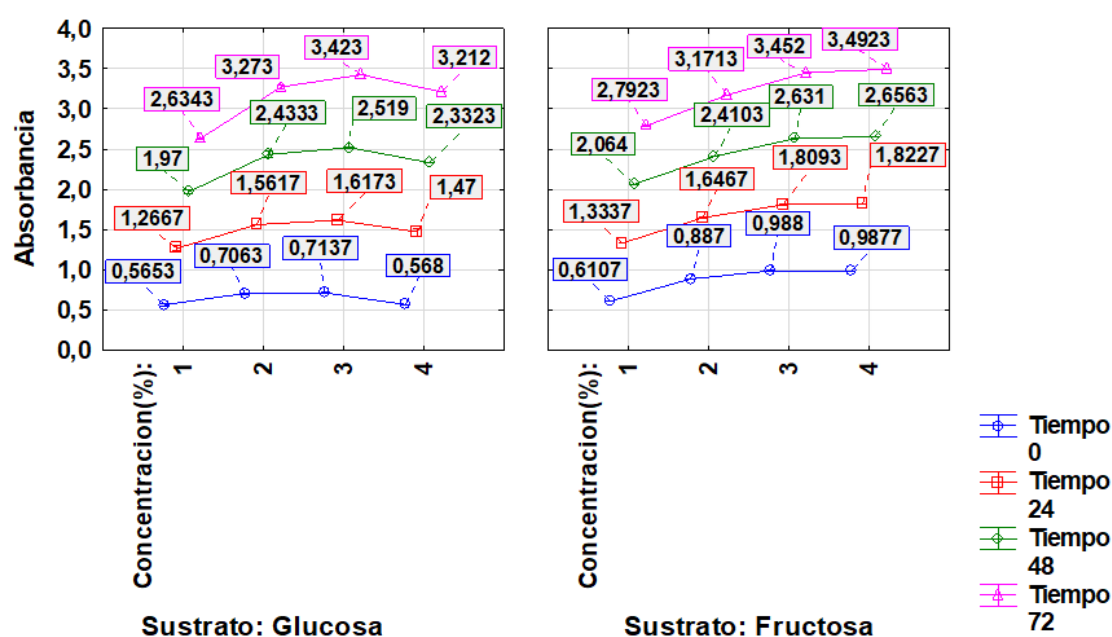


Figura 4. Prueba de significación de Tukey para absorbancia (Interacción ABC: Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo).

3.7. Prueba de significación de Tukey ($p<0,05$) para la variable grados brix

Los grados Brix, una medida de la cantidad de sólidos disueltos (principalmente azúcares), presentaron una tendencia creciente con el tiempo y la concentración de sustrato, lo cual se detalla en la Figura 5. El valor más alto de Brix, 10,30, se obtuvo en los tratamientos de Fructosa-Peptona al 7 % y Glucosa-Peptona al 7 % a 0 horas. Esto indica que, al inicio de la fermentación, ambos sustratos presentaban una alta concentración de azúcares disponibles. A medida que avanzaba el tiempo de fermentación, los grados Brix disminuyeron debido al consumo de azúcares por parte de las bacterias. El valor más bajo fue 2,53, observado en Fructosa-Peptona al 0,5 % y 72 horas, lo que sugiere que una mayor duración de la fermentación y concentraciones bajas de sustrato llevan a una mayor utilización de los azúcares por las bacterias.

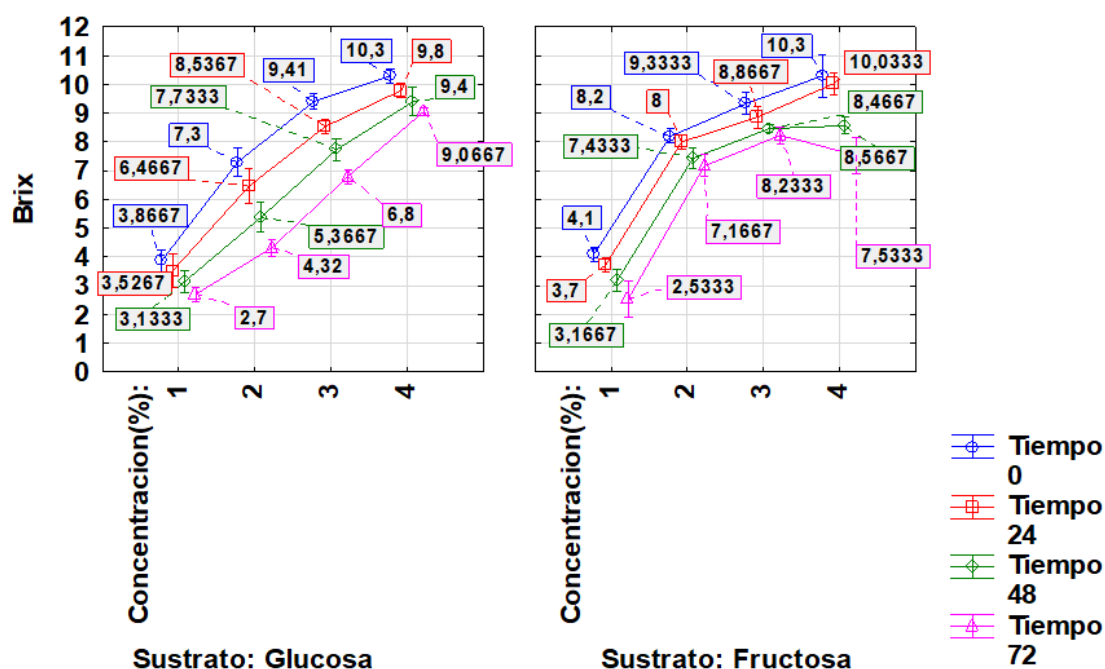


Figura 5. Prueba de significación de Tukey para grados brix (Interacción ABC: Tipo de sustrato*concentración del sustrato*tiempo).

3.8. Análisis de conglomerados

En la Figura 6 se observa el dendograma mediante un clúster jerárquico que muestra similitudes entre los tratamientos de estudio. Se obtuvo mayor relación entre los tratamientos Fructosa-peptona + 0,5 % + 72 horas, Fructosa-peptona + 5 % + 48 horas, Glucosa-peptona + 0,5 % + 72 horas, Fructosa-peptona + 2 % + 48 horas, Fructosa-peptona + 7 % + 48 horas, Glucosa-peptona + 5 % + 48 horas, Glucosa-peptona + 2 % + 48 horas y Glucosa-peptona + 7 % + 48 horas. Por otra parte, los tratamientos que tienen menor proximidad de los demás tratamientos son Fructosa-peptona + 2 % + 72 horas, Fructosa-peptona + 5 % + 72 horas, Fructosa-peptona + 7 % + 72 horas, Glucosa-peptona + 5 % + 72 horas, Glucosa-peptona + 2 % + 72 horas y Glucosa-peptona + 7 % + 72 horas.

El análisis de conglomerados jerárquicos mostró que los tratamientos con tiempos de incubación más largos (72 horas) tienden a agruparse de manera independiente de los tratamientos con tiempos más cortos, lo cual sugiere que la duración de la incubación tiene un efecto significativo en las características que diferencian a los grupos. Específicamente, los tratamientos con 72 horas de incubación con fructosa y glucosa-peptona a diferentes concentraciones presentaron menor proximidad con los tratamientos de 48 horas, lo que indica posibles variaciones en la actividad bacteriana o la producción de bacteriocinas en esos periodos.

Por otro lado, los tratamientos con tiempos de incubación de 48 horas presentan mayor similitud entre ellos, agrupándose independientemente de las variaciones en la concentración de glucosa o fructosa. Esto sugiere que el tiempo de incubación es un factor determinante en la diferenciación de los tratamientos, más allá de la concentración de los sustratos.

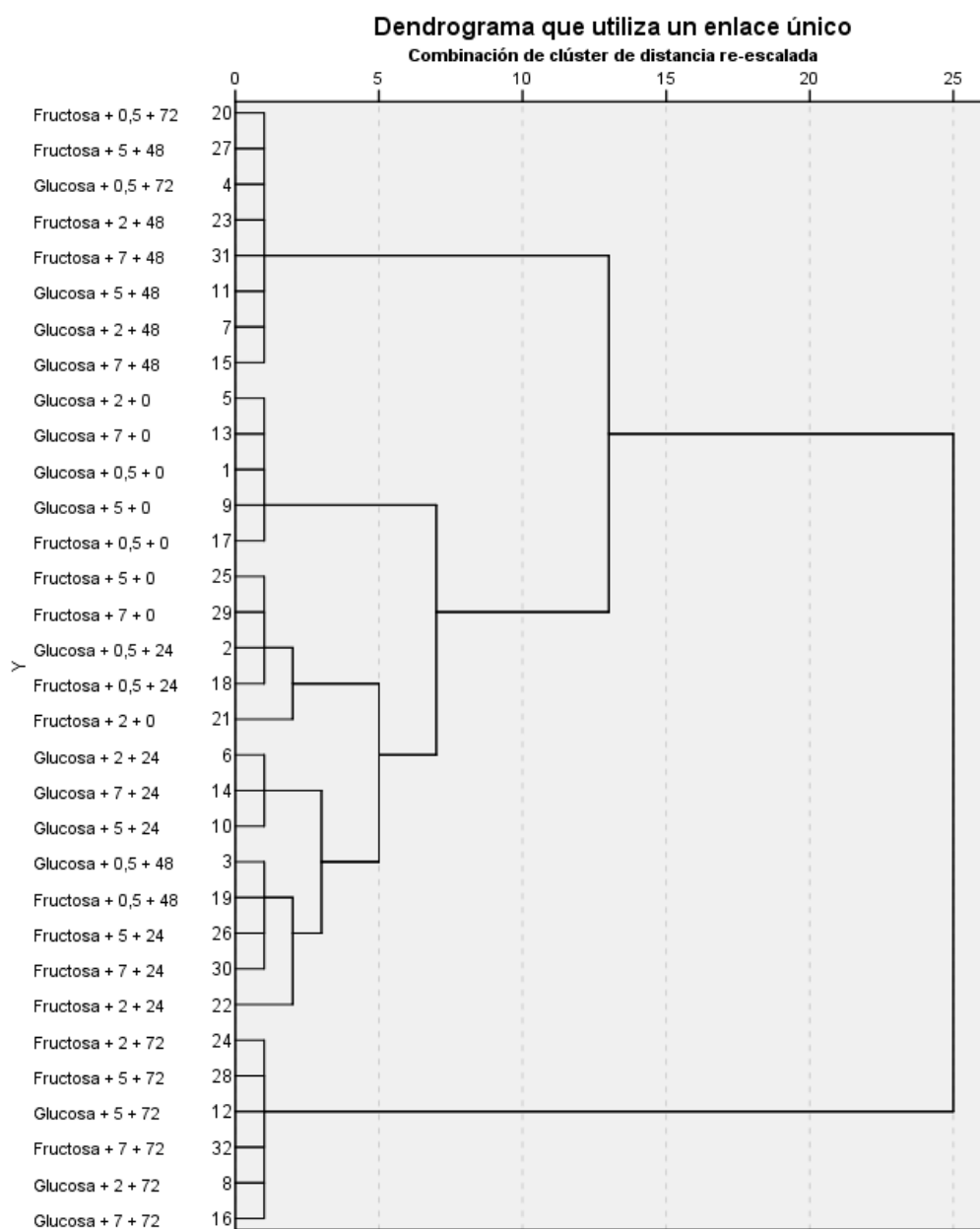


Figura 6. Dendrograma de los tratamientos en estudio.

3.9. Análisis de componentes principales

La Figura 7 presenta los resultados del análisis de los cuatro componentes evaluados durante el sistema de fermentación. De acuerdo con el gráfico de sedimentación, se seleccionaron dos componentes principales, ya que son los que explican la mayor parte de la varianza en los datos, y tienen valores de varianza mayores a 1, según el criterio de Kaiser.

La Figura 8 muestra las correlaciones entre las variables brix, pH, acidez y absorbancia en un espacio tridimensional utilizando el análisis de componentes principales (PCA). Se observa una relación inversa entre el pH y la absorbancia, así como entre el pH y la acidez, mientras que la acidez y la absorbancia muestran una leve relación directa. El primer componente (Componente 1) está fuertemente relacionado con el pH, que explica la mayor parte de la varianza en los datos, mientras que el segundo componente (Componente 2) está más asociado con las variables Brix y

acidez. Estos dos componentes principales fueron seleccionados porque capturan la mayoría de las relaciones relevantes entre las variables. La absorbancia, aunque tiene una relación inversa con el pH, se asocia en menor medida con el componente 3, que captura una fracción menor de la varianza.

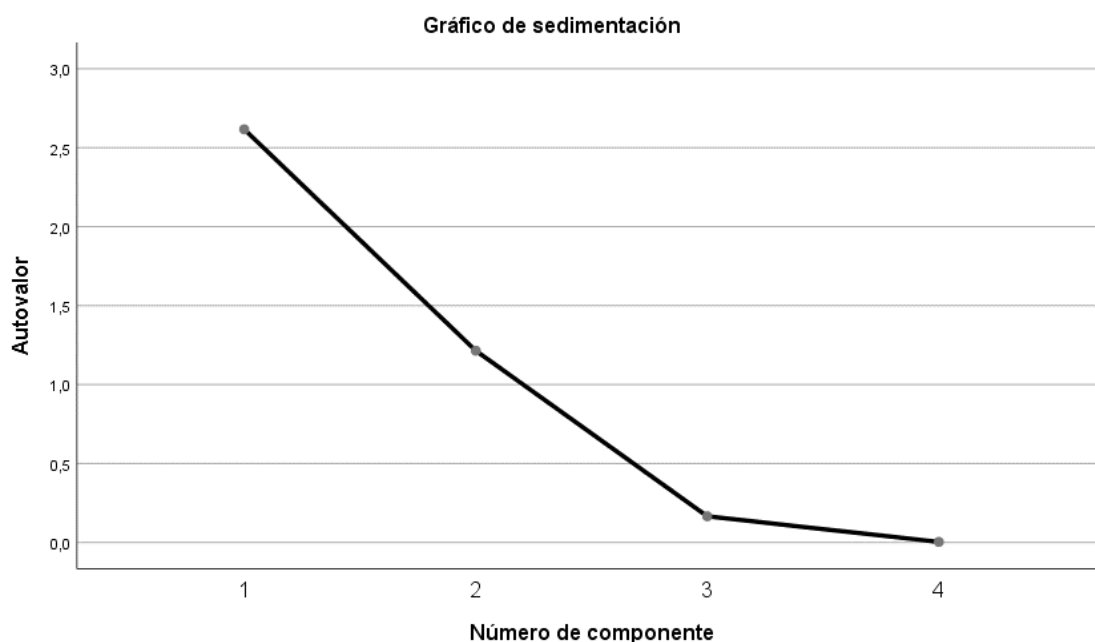


Figura 7. Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales.

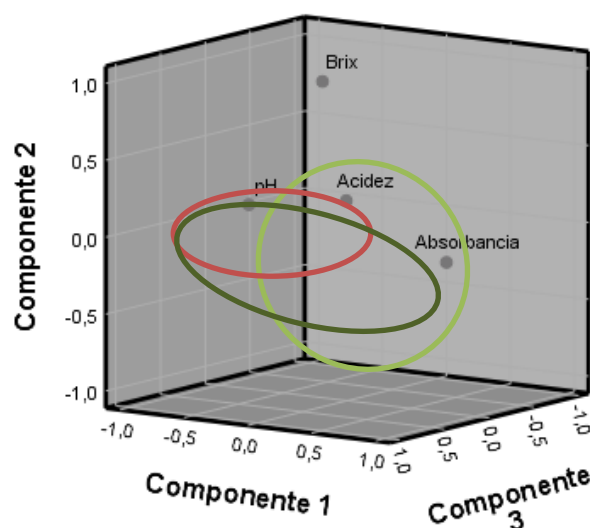


Figura 8. Gráfico de componentes principales.

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

En la Tabla 5 se evidenció la actividad antimicrobiana mediante los halos de inhibición, alrededor de los pozos sobre cada bacteria patógena. La bacteriocina que se empleó fue de la mejor fermentación de cada sustrato en función de sus parámetros cinéticos microbianos.

Tabla 5. Unidades arbitrarias del mejor tratamiento de cada tipo de sustrato.

Tratamiento	<i>Lysinibacillus macroides</i> (AU/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (AU/mL)	<i>Bacillus cereus</i> (AU/mL)
Glucosa-peptona + 5 % + 72 horas	263,9	214,3	229,7
Fructosa-peptona + 7 % + 72 horas	324,9	263	246,2

4. DISCUSIÓN

De acuerdo con la Norma Técnica NTE INEN 2262:2013 [27] para bebidas alcohólicas, el pH debe estar entre 3,8 y 4,8, y la acidez no debe superar 0,3. La bebida estudiada cumple con estos parámetros. Respecto a los grados Brix, el valor obtenido es 3, lo que indica un bajo contenido alcohólico a las 72 horas de fermentación. Para lograr un mayor grado alcohólico, los grados Brix deberían estar entre 5 y 22, ya que una mayor concentración de azúcar facilita la fermentación alcohólica y, por ende, aumenta el porcentaje de alcohol en la bebida tradicional [28]. Estudios recientes sugieren que la concentración de azúcares en el sustrato está estrechamente relacionada con la eficiencia de la fermentación y la producción de alcohol. Estos estudios sugieren que, al controlar el tipo y la cantidad de azúcares disponibles, es posible manipular las características finales del producto fermentado, tal como el contenido de alcohol y las propiedades sensoriales [29].

En cuanto a la caracterización microbiológica de la bebida fermentada, se obtuvo un nivel muy inferior de Mohos y levaduras: $1\text{E}+4$ UFC/mL demostrando que el consumo de la bebida fermentada es seguro. Además, se registró un valor incontable de colonias en el petrifilm de ácido láctico: $3\text{E}+6$ UFC/mL asegurando la presencia de bacterias lácticas en la bebida tradicional. Estos resultados subrayan la importancia de las bacterias ácido-lácticas (BAL), no sólo por su papel en la producción de metabolitos como el ácido láctico, sino también por su capacidad para inhibir microorganismos patógenos, lo que contribuye tanto a la seguridad alimentaria como a la estabilidad de los productos fermentados [30].

La bacteria seleccionada (colonia 1) fue identificada como una bacteria ácido-láctica mediante pruebas bioquímicas y análisis microscópico, cumpliendo con las características descritas por Khalid [31]. Los ensayos revelaron resultados negativos para catalasa y oxidasa, y se observó su capacidad de crecer en un ambiente ácido, con un rango de pH entre 4 y 4,5. Las BAL presentaron una morfología consistente, observándose cocos, cocobacilos y bacilos Gram positivos no esporulados [32]. En un estudio de productos fermentados tradicionales ecuatorianos, incluida la chicha, se aislaron 114 cepas bacterianas, predominando el género *Lactobacillus* ($n=68$), seguido de *Enterococcus* ($n=15$), *Pediococcus* ($n=13$), *Lactobacillus* ($n=10$), *Leuconostoc* ($n=7$) y *Weissella* ($n=6$). Es importante destacar que el género *Leuconostoc* fue aislado principalmente de bebidas fermentadas a base de maíz, yuca y chonta [33]. Con base en estos resultados, se concluye que la bacteria aislada pertenece al grupo de BAL.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son comúnmente empleadas para la producción de bacteriocinas debido a su capacidad antimicrobiana, que permite inhibir o eliminar bacterias patógenas de especies similares [34]. Esta propiedad es crucial en la industria alimentaria para prevenir la degradación de alimentos por microorganismos patógenos, según lo indicado por [35], [36]. Estudios recientes corroboran que las BAL no solo son productoras eficientes de bacteriocinas, sino que también han demostrado su capacidad probiótica, lo que amplía su aplicación en la industria alimentaria, al mejorar la salud del consumidor y la preservación de los alimentos [29], [30].

La actividad antimicrobiana (halos de inhibición) de la cepa bacteriana fue mayor en el tratamiento Fructosa-peptona + 5 % + 72 horas para las tres bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Lysinibacillus macroides*), correlacionando con el crecimiento bacteriano, que fue el más significativo. Investigaciones señalan que la producción de bacteriocinas puede ser optimizada mediante la selección adecuada del sustrato y las condiciones de fermentación, lo que permite un mayor control sobre la actividad antimicrobiana en la industria alimentaria [29], [30].

Para las interacciones del factor A (Tipo de sustrato), B (Concentración del sustrato) y C (Tiempo), en [37] la composición del medio de cultivo, como el tipo de sustrato y las concentraciones de las fuentes de nitrógeno (Peptona) y carbono (Glucosa y Fructosa) tienen un efecto clave en la producción de bacteriocinas. Investigaciones como la de Riley & Wertz [38] también apoyan que la variación en la fuente de carbono puede influir drásticamente en la capacidad de las BAL para sintetizar bacteriocinas, y esto coincide con la observación de que las diferencias significativas en el pH corresponden a tratamientos con glucosa y fructosa. Recientemente, se ha comprobado que las diferencias en la concentración de sustratos influyen de manera directa no solo en la producción de bacteriocinas, sino también en la viabilidad de las BAL durante la fermentación prolongada, lo que refuerza la necesidad de optimizar estas condiciones para maximizar los beneficios industriales [30].

Existieron diferencias significativas en el pH, con menor pH se tiene a los tratamientos Glucosa-peptona + 5 % + 72 horas (3,55) y Fructosa-peptona + 7 % + 72 horas (3,53), esto se debe a que la cepa bacteriana prefiere fructosa en su mayor concentración, al término de 72 horas aún sigue creciendo lo cual produce que su pH disminuye. Esto está en línea con investigaciones recientes que demuestran que el crecimiento prolongado de LAB bajo condiciones ácidas promueve la acidificación del medio debido a la acumulación de ácidos orgánicos [29]. Teniendo una relación inversa entre la absorbancia y el pH. Esta relación inversa entre la absorbancia y el pH es consistente con estudios como el de Papagianni [39], que exploran la relación entre la disminución del pH y el crecimiento bacteriano en fermentaciones con bacterias ácido lácticas. En cambio, se obtuvo un mayor valor de pH en el grupo Fructosa-Peptona + 0,5 % + 0 horas (6,21) evidenciando que la bacteria prefiere un medio más suplementado, además este valor se dio debido a que la bacteria aún estaba en un proceso de adaptación.

Para la acidez, se observa diferencia significativa en los resultados, teniendo como mayor producción al grupo Fructosa-peptona + 7 % + 72 horas (0,30), indicando que la bacteria produce mayor acidez a través del tiempo, y que a mayor concentración del sustrato fructosa, se tendrá mayor producción de acidez, hasta llegar a una etapa de muerte provocada por el estrés osmótico autoacidificándose, reportado en estudios previos por [35], [40], [41], [42].

En cuanto a la absorbancia, se muestra diferencia significativa, teniendo en cuenta que la cepa bacteriana creció más en el tratamiento Fructosa-peptona + 7 % + 72 horas (3,49), lo cual demostró que el crecimiento bacteriano está correlacionado con la acidez. Sin embargo, el pH con la absorbancia contiene una relación muy estrecha e inversamente proporcional. Este patrón ha sido confirmado en investigaciones más recientes, que muestran cómo la disminución del pH coincide con un aumento en la densidad celular, lo que refleja una mayor actividad metabólica de las LAB en medios de fructosa [38], [39]. Los grados Brix concuerdan teniendo al tratamiento de menor valor: Fructosa-peptona + 0,5 % + 72 horas (2,53 grados Brix), debido a que contiene la menor concentración y que la bacteria consume los nutrientes en el mayor rango de tiempo estudiado.

5. CONCLUSIONES

El tratamiento de fermentación con Fructosa-Peptona al 7 % durante 72 horas demostró ser el más eficaz en términos de producción de bacteriocinas y eficiencia general del proceso

fermentativo. Los parámetros cinéticos obtenidos bajo estas condiciones fueron pH de 3,53, acidez de 0,30, absorbancia de 3,49 y grados Brix de 7,53, evidenciando una fermentación eficiente con alta producción de bacteriocinas.

El crecimiento bacteriano, especialmente de las bacterias ácido lácticas (BAL), está íntimamente relacionado con la composición del medio de cultivo, la concentración de sustrato, el pH, y la producción de acidez. En nuestro estudio, se observó una correlación inversa entre el pH y la absorbancia, indicando que la disminución del pH a medida que avanza la fermentación está asociada con un aumento en la turbidez del medio, lo que refleja un crecimiento bacteriano robusto. Asimismo, la correlación directa entre acidez y absorbancia sugiere que un mayor crecimiento bacteriano está vinculado con una mayor producción de ácidos orgánicos.

La concentración de nitrógeno y carbono en el medio de cultivo juega un papel crucial en la optimización del crecimiento bacteriano y la producción de bacteriocinas. En particular, la mayor concentración de fructosa favorece una mayor producción de bacteriocinas y una mayor acidez, destacando la importancia de ajustar las concentraciones de sustrato para maximizar los beneficios del proceso fermentativo.

Sin embargo, es importante señalar que en este estudio no se evaluaron factores adicionales como la temperatura y la presencia de inhibidores, los cuales podrían haber influido en la fermentación y en la producción de bacteriocinas. La temperatura puede afectar significativamente la actividad metabólica de las BAL, y la presencia de inhibidores puede alterar la eficiencia del proceso fermentativo y la producción de bacteriocinas. En investigaciones futuras, se recomienda incluir estos factores para obtener una comprensión más completa del proceso de fermentación y de las condiciones óptimas para la producción de bacteriocinas.

REFERENCIAS

- [1] G. Velázquez-Sámano, R. Collado-Chagoya, R. A. Cruz-Pantoja, A. A. Velasco-Medina y J. Rosales-Guevara, “Reacciones de hipersensibilidad a aditivos alimentarios”, *Revista Alergia México*, vol. 66, no. 3, pp. 329-339, jun. 2019. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.29262/ram.v66i3.613>
- [2] J.A. Carbajal-Sánchez y P.A. Moreno-Pérez, “Aditivos alimentarios adicionados en alimentos envasados o enlatados en México ¿información confiable?”, *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, vol. 27, no. 1, pp. 51-62, feb. 2023. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.14306/renhyd.27.1.1768%20>
- [3] *Norma general del codex para los aditivos alimentarios. revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2021, 2023*, Codex STAN 192-1995, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS), Roma (Italia), 1995. [En línea]. Disponible en: <https://n9.cl/8uwz2>
- [4] *Instructivo Externo. Criterios técnicos para la categorización del riesgo sanitario de alimentos procesados. Versión [6.0]*, Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA), Ecuador, 2023. [En línea]. Disponible: <https://lc.cx/sfFoRF>
- [5] M. Afshar, S.A. Moallem, J. Khayatzaheh, and M.Shahsavan, “Teratogenic effects of long term consumption of potassium benzoate on eye development in BALB/c fetal mice”, *Iranian journal of basic medical sciences*, vol. 16, no. 4, pp. 584-589, apr. 2013. [Online]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24250932/>
- [6] N. Zengin, D. Yüzbaşıoğlu, F. Ünal, S. Yılmaz, and H. Aksoy, “The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate”, *Food*

- Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 4, pp. 763–769, apr. 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.040>
- [7] H. J. Tsay, Y. H. Wang, W. L. Chen, M. Y. Huang, and Y. H. Chen, “Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae”, *Neurotoxicology and Teratology*, vol. 29, no. 5, pp. 562–569, 2007. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2007.05.001>
 - [8] I. S. Khan, K. B. Dar, S. A. Ganie, and M. N. Ali, “Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats”, *Drug and chemical toxicology*, vol. 45, no. 3, pp. 1345–1354, oct. 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1825472>
 - [9] L. Hrnčirova, et al. “Human gut microbes are susceptible to antimicrobial food additives in vitro”, *Folia Microbiol*, vol. 64, no. 4, pp. 497–508, jan. 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s12223-018-00674-z>
 - [10] S. Mamur, D. Yüzbaşıoğlu, F. Ünal, and H. Aksoy, “Genotoxicity of food preservative sodium sorbate in human lymphocytes in vitro”, *Cytotechnology*, vol. 64, no. 5, pp. 553–562, feb. 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9434-5>
 - [11] M. Liu, J. Lu, J. Hu, Y. Chen, X. Deng, J. Wang, S. Zhang, J. Guo, W. Li, and S. Guan, “Sodium sulfite triggered hepatic apoptosis, necroptosis, and pyroptosis by inducing mitochondrial damage in mice and AML-12 cells”, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 467, pp. 133719, apr. 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133719>
 - [12] M. Padovano, M. Aromatario, S. D’Errico, M. Concato, F. Manetti, M. Chiara David, M. Scopetti, P. Frati, and V. Fineschi, “Sodium Nitrite Intoxication and Death: Summarizing Evidence to Facilitate Diagnosis”, *International journal of environmental research and public health*, vol. 19, no. 21, pp. 13996, oct. 2022. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/ijerph192113996>
 - [13] N. S. Terefe, “*Food fermentation*”. Elsevier eBooks, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03420-x>
 - [14] S.M. Vásquez, H. Suárez y S. Zapata, “Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne”, *Revista chilena de nutrición*, vol. 36, no. 1, pp. 64-71, mar. 2009. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/s0717-75182009000100007>
 - [15] J. Zheng, M. G. Gänzle, X. B. Lin, L. Ruan, and M. Sun, “Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome”, *Environmental Microbiol*, vol. 17, no. 6, pp. 2133–2143, oct. 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12662>
 - [16] T. K. Sahoo, P. K. Jena, A. K. Patel, and S. Seshadri, “Purification and Molecular Characterization of the Novel Highly Potent Bacteriocin TSU4 Produced by *Lactobacillus animalis* TSU4”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 177, no. 1, pp. 90–104, aug. 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1730-z>
 - [17] S. Kaur y S. Kaur, “Bacteriocins as Potential Anticancer Agents”, *Frontiers Pharmacol*, vol. 6, nov. 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00272>
 - [18] G. Preciado, M. Michel, S.L. Villarreal-Morales, A.C. Flores-Gallegos, J. Aguirre-Joya, J. Morlett-Chavez, C.N. Aguilar, and R. Rodríguez-Herrera “Bacteriocins and Its Use for Multidrug-Resistant Bacteria Control”, *Antibiotic Resistancet*, pp. 329–349, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00016-2>

- [19] P. Mak, “Chapter 13 - Staphylococcal Bacteriocins”, en *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, Academic Press, 2018, pp. 161–171. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00013-3>
- [20] F. Gaggia, D. Di Gioia, L. Baffoni, and B. Biavati, “The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety”, *Trends in Food Science & Technology*, vol. 22, pp. S58–S66, nov. 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.003>
- [21] A. Darbandi, A. Asadi, M. Mahdizade Ari, E. Ohadi, M. Talebi, M. Halaj Zadeh, A. Darb Emamie, R. Ghanavati y M. Kakanj, “Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials”, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 36, no. 1, 2021. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>
- [22] M. Hassan, M. Kjos, I. F. Nes, D. B. Diep y F. Lotfipour, “Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance”, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 113, no. 4, pp. 723–736, oct. 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
- [23] P. D. Cotter, C. Hill, and R. P. Ross, “Bacteriocins: developing innate immunity for food”, *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 10, pp. 777–788, oct, 2005. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- [24] R. Kumariya, A. K. Garsa, Y. S. Rajput, S. K. Sood, N. Akhtar, and S. Patel, “Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria”, *Microbial Pathogenesis*, vol. 128, pp. 171–177, mar. 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- [25] C. Chaves-López, A. Serio, C. D. Grande-Tovar, R. A. C. Mulet, J. Delgado-Ospina, and A. Paparella, “Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: the Colombian Heritage”, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 13, no. 5, pp. 1031-1048, aug. 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>
- [26] F. Faria-Oliveira, et al. “The role of yeast and lactic acid bacteria in the production of fermented beverages in south america”, en *Food Production and Industry. InTech*, oct. 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.5772/60877>
- [27] *Bebidas alcohólicas. Cerveza. Requisitos.*, NTE INEN 2 262:2003, Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria (NTE), 2003. [En línea]. Disponible en: <https://n9.cl/1ap1z>
- [28] V. Martín, B. Gallego y C. Pulido Lería, *Elaboración de vinos, otras bebidas alcohólicas, aguas, cafés e infusiones, HOTR0209 - sumillería*. IC Ed., 2021. [En línea]. Disponible en: <https://n9.cl/dkx5w>
- [29] C. Miramontes-Corona, A. Cetina-Corona, M. E. Macías-Rodríguez, A. Escalante, R. I. Corona-González, and G. Toriz, “Lactic acid bacterial fermentation of esterified agave fructans in simulated physicochemical colon conditions for local delivery of encapsulated drugs”, *Fermentation*, vol. 10, no. 478, sep. 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/fermentation10090478>
- [30] Y. L. Aguirre-Garcia, et al. “Lactic acid fermentation in the food industry and bio-preservation of food”, *Fermentation*, vol. 10, no. 168, mar, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/fermentation10030168>.
- [31] K. Khalid, “An overview of lactic acid bacteria”, *International Journal of Biosciences*, 2021. [Online]. Available: <https://n9.cl/22zzop>

- [32] B. L. D. Monroy, A. E. Iglesias y E. Valiño, “Consortios microbianos con actividad ácido-láctica promisorios aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes”, *Revista Ciencia y Agricultura*, vol. 11, no. 1, pp. 17–25, en. 2014. [En línea]. Disponible en: <https://n9.cl/ik55z>
- [33] L. Guamán, S. Zapata, M. Serrano, and G. A. Trueba P., “Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional Ecuadorian fermented foods”, *ACI Avances en ciencia e ingeniería*, vol. 6, no. 1, jun. 2014. [Online]. Available: <https://doi.org/10.18272/aci.v6i1.155>
- [34] A. B. Snyder, and R. W. Worobo, “Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 94, no. 1, pp. 28–44, aug. 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6293>
- [35] M. G. Gänzle, “Revisitando el metabolismo láctico: metabolismo de las bacterias del ácido láctico en las fermentaciones alimentarias y el deterioro de los alimentos”, *Current Opinion in Food Science*, vol. 2, pp. 106–117, apr. 2015. [En línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- [36] J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes, and M. L. Chikindas, “Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71, no. 1, pp. 1–20, dec. 2001. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)
- [37] L. Alquicira, “Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133”, Tesis de posgrado, Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México, 2006. [En línea]. Disponible en: <https://bindani.izt.uam.mx/concern/tesiuams/q237hs18x?locale=es>
- [38] M. A. Riley, and J. E. Wertz, “Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives”, *Biochimie*, vol. 84, no. 5–6, pp. 357–364, 2002. [Online]. Available: [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01421-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01421-9)
- [39] M. Papagianni, “Food fermentation and production of biopreservatives”, in *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology*, 2nd ed, pp. 109–124, 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1201/b12084-8>
- [40] D. I. Serrazanetti, D. Gottardi, C. Montanari, and A. Gianotti, “Dynamic stresses of lactic acid bacteria associated to fermentation processes”, in *InTech eBooks*, 2013. [Online]. Available: <https://doi.org/10.5772/51049>
- [41] K. Papadimitriou, A. Alegría, P. A. Bron, M. de Angelis, M. Gobbetti, M. Kleerebezem, J. A. Lemos, D. M. Linares, P. Ross, C. Stanton, F. Turroni, D. van Sinderen, P. Varmanen, M. Ventura, M. Zúñiga, E. Tsakalidou, and J. Kok, “Stress physiology of lactic acid bacteria”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 80, no. 3, pp. 837–890, july. 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00076-15>
- [42] V. Biscola, Y. Choiset, H. Rabesona, J. Chobert, T. Haertlé, and B. Franco, “Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy”, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 125, pp. 564–574, aug. 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/jam.13779>

