



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE
LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE ALIMENTOS
FERMENTADOS SOBRE *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* DE
GRANOS DE QUINUA**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORES: LISETH VERONICA ANDINO GUALPA

FAUSTO RENÉ GUASGUA MIPAZ

DIRECTORA: Dra. JANNETH MARÍA GALLEGOS NUÑEZ PhD.

Riobamba – Ecuador


2021

© 2021, Liseth Verónica Andino Gualpa & Fausto René Guasgua Mipaz

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotros, Liseth Verónica Andino Gualpa y Fausto René Guasgua Mipaz, declaro que el presente trabajo de titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados. Como autores asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 01 de septiembre de 2021



Liseth Verónica Andino Gualpa

060423300-7


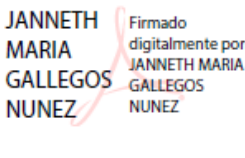



Fausto René Guasgua Mipaz

172228281-9

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE ALIMENTOS FERMENTADOS SOBRE *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* DE GRANOS DE QUINUA**, realizado por la señorita **LISETH VERONICA ANDINO GUALPA** y el señor **FAUSTO RENÉ GUASGUA MIPAZ**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr. Carlos Pilamunga Capus PhD PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: CARLOS PILAMUNGA	2021-09-01
Dra. Janneth María Gallegos Núñez PhD DIRECTOR(A) DE TRABAJO DE TITULACIÓN	 Firmado digitalmente por JANNETH MARIA GALLEGOS NUNEZ	2021-09-01
Ing. Violeta Maricela Dalgo Flores Msc. MIEMBRO DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: VIOLETA MARICELA DALGO FLORES	2021-09-01

DEDICATORIA

A Dios por ser el motor de mi vida y por permitir que esto se haga posible.

A mis Padres y a toda mi familia por estar conmigo en los momentos más difíciles, siendo ese apoyo incondicional y dándome ánimos para terminar todos los objetivos planteados durante este trayecto.

A mi hermana Dayra por ser la persona que estuvo ahí conmigo en mis momentos más difíciles por apoyarme y complementar mis ideas que sin ella esto tampoco sería posible.

A mis Docentes que durante mi vida como estudiante confiaron en mí y supieron darme ese valor que necesitaba para poder sobresalir de las situaciones más difíciles.

Fausto

A la vida que me ha permitido iniciar y finalizar esta etapa.

A mi madre Nancy Gualpa que ha sido incondicional conmigo, el apoyo brindado me ha conducido a ser mejor cada día y a cumplir cada meta planteada, la fortaleza de mi madre me ha enseñado aferrarme a mis ideales y luchar por mis sueños.

A mi familia que ha sido el motor de mi vida, me han brindado ánimos en los momentos más complicados.

A mis Docentes que me han brindado sus conocimientos y apoyo durante mi instancia en la institución.

Liseth

AGRADECIMIENTO

Estoy muy agradecido con Dios por permitirme que cada día me levante y aprenda de mis errores, lo cual me ha llevado a adquirir la sabiduría que siempre he necesitado para desenvolverme en cualquier actividad. Quiero agradecer a mis padres José, Gloria, Nelson, María y Segundo, porque me apoyaron desde un inicio al tomar esta decisión, por la confianza que depositaron en mí y enseñarme valores como responsabilidad, educación, amabilidad, honestidad, tolerancia, respeto y empatía por los demás. Sin embargo, debo destacar a mi madre Gloria que sin su apoyo y sus sabios consejos nada de esto fuese posible hoy. A mi hermana Dayra por acompañarme en cada momento de mi vida por ser ese apoyo que necesitaba. A mis grandes amigos: Evelyn, Zulay, Daysi, Vanesa, Johana, Alexander, Mauricio, Nathaly, Flor, Fabian les estoy muy agradecido por su amistad y lealtad que me han demostrado en mi vida universitaria, pero sobre todo gracias a mi gran amiga y hermana Liseth Andino que sin su apoyo nada de esto sería posible te estaré eternamente agradecido desde que iniciamos como estudiantes hasta que llegue el punto final de nuestras vidas y a todos quienes conformaron parte de mi vida les estaré eternamente agradecido. También estamos agradecidos con la Dra. Janeth Gallegos por impartirnos sus conocimientos y valores tanto en la vida como estudiantes y durante el trabajo de titulación al ser una persona sabia y acompañarnos durante este trayecto llegando a culminar el último paso dentro de la universidad, deseándole éxitos en su vida profesional.

Fausto

Agradezco a mi madre Nancy Gualpa, porque ha estado presente durante mi etapa universitaria mediante sus consejos y amor, siendo el pilar fundamental de mi existencia. A mi enamorado Byron porque sin su amor, paciencia y respeto mi proceso universitario no hubiera sido el mismo. A mis amigos: Nataly, Alejandra, Alexander, Roberto, Damián, Zulay, Daysi, Andrea, Paola, Christian, Katherine por ser parte de mi vida y hacer de ella una mejor experiencia. Finalmente, un especial agradecimiento a Fausto por su incondicional soporte durante nuestra trayectoria académica, porque más que un amigo le considero mi hermano, deseándole siempre éxitos en su nueva etapa profesional.

Liseth

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	5

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. Antecedentes.....	6
1.2. Bases Teóricas.....	7
1.2.1. <i>Cereales y Pseudocereales</i>	7
1.2.1.1. <i>Composición nutricional de cereales y pseudocereales</i>	8
1.2.2. La Quinoa	8
1.2.2.1. <i>Composición nutricional de la quinoa</i>	9
1.2.2.2. <i>Zonas de producción en Ecuador</i>	9
1.2.2.3. <i>Procesos de Cosecha en Ecuador</i>	10
1.2.2.4. <i>Factores biológicos de alteración en la cosecha y post cosecha de la quinoa</i>	10
1.2.3. Hongos deterioradores de los granos de quinoa	11
1.2.3.1. Características morfológicas de los hongos y condiciones ecológicas para su desarrollo.....	11
1.2.3.2. <i>Los hongos contaminantes de la quinoa</i>	12
1.2.3.3. <i>Penicillium y Aspergillus</i>	12
1.2.4. <i>Alimentos Fermentados</i>	15
1.2.4.1. <i>Microorganismos de los alimentos fermentados</i>	15
1.2.4.2. <i>Bacterias en alimentos fermentados</i>	16
1.2.5. Bacterias Ácido Lácticas	16
1.2.5.1. <i>Características microbiológicas de las Bacterias ácido lácticas</i>	16
1.2.5.2. <i>Ecología</i>	17
1.2.5.3. <i>Bacterias Homofermentativas</i>	17
1.2.5.4. <i>Bacterias Heterofermentativas</i>	18

1.2.5.5. <i>Morfología macroscópica de colonias de bacterias ácido lácticas</i>	19
1.2.5.6. <i>Pruebas de Identificación a nivel de género</i>	19
1.2.5.7. <i>Efecto antagonista de las BAL</i>	20
1.2.5.8. <i>Propiedades y Usos de las BAL</i>	21

CAPÍTULO II

2. Metodología	24
2.1. Localización del estudio	24
2.2. Factores de estudio	24
2.2.1. <i>Población de estudio</i>	24
2.3. Materiales, equipos y reactivos	24
2.3.1. <i>Origen de los aislamientos de BAL</i>	24
2.3.2. <i>Análisis microbiológico</i>	25
2.4. Técnicas y métodos	27
2.4.1. <i>Muestreo de Alimentos</i>	27
2.4.2. <i>Aislamiento de Bacterias ácido lácticas</i>	28
2.4.3. <i>Aislamiento de hongos</i>	29
2.4.4. <i>Cinética de crecimiento de hongos</i>	29
2.4.5. <i>Conteo de esporas</i>	29
2.4.6. <i>Ensayo de antagonismo in vitro de las BAL</i>	29
2.4.7. <i>Crio preservación de BAL</i>	30

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	31
3.1. Resultados del aislamiento de hongos a partir de granos de quinua	31
3.2. Caracterización de bacterias ácido lácticas provenientes de alimentos fermentados y cultivos comerciales	36
3.3. Resultados del ensayo in vitro del antagonismo de bacterias ácido lácticas aisladas sobre los hongos de la quinua	43
CONCLUSIONES	57
RECOMENDACIONES	58
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Composición del valor nutritivo de la quinua.....	25
Tabla 2-1: Valores nutricionales de la quinua en comparación con otros cereales.....	9
Tabla 1-2: Materiales, reactivos y equipos utilizados para el análisis microbiológico de las muestras de alimentos fermentados artesanales y productos comerciales.	25
Tabla 2-3: Codificación de los lugares de muestreo de los granos de quinua para el aislamiento de hongos	27
Tabla 3-2: Codificación de muestras de alimentos fermentados y estándares para aislamientos de BAL	27
Tabla 1-3: Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de la quinua.	31
Tabla 2-3: Cinética de crecimiento de <i>Penicillium</i> sp y <i>Aspergillus</i> sp aislado de los granos de quinua.	34
Tabla 3-3: Conteo de UFC de diluciones decimales en Agua de peptona al 0,1% de alimentos fermentados comerciales y artesanales.....	36
Tabla 4-3: Comparación de la morfológica macroscópica de BAL aisladas de alimentos fermentados artesanales con respecto a los de cultivos comerciales.....	40
Tabla 5-3: Características morfológicas microscópicas y pruebas de identificación de BAL aislados de alimentos fermentados	40
Tabla 6-3: Porcentaje de inhibición de BAL de muestras artesanales sobre <i>Penicillium</i> sp y <i>Aspergillus</i> sp.....	43
Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición de BAL (estándares prácticos) sobre <i>Penicillium</i> sp y <i>Aspergillus</i> sp.....	45
Tabla 8-3: Análisis univariante de los Porcentajes de Inhibición de <i>Penicillium</i> sp y <i>Aspergillus</i> sp.....	46
Tabla 9-3: Prueba de normalidad en Kolmogorov-Smirnov	50
Tabla 10-3: Estudio estadístico ANOVA en análisis multivariable.....	52
Tabla 11-3: Análisis estadístico Tukey de los alimentos fermentados artesanales y cultivos comerciales.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>Penicillium</i> sp y modelos de ramificación del conidioforo	13
Figura 2-1: Estructuras típicas observadas en especies del género <i>Aspergillus</i> , cabeza conidial con vesícula globosa que soporta fiálides que originan los conidios	14
Figura 3-1: Vía Homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	18
Figura 1-3: A) Morfología macroscópica de <i>Aspergillus</i> sp en Agar PDA B) Morfología macroscópica de <i>Aspergillus</i> sp en Agar PDA	33
Figura 2-3: A) Morfología macroscópica de <i>Penicillium</i> sp en Agar PDA B) Morfología macroscópica de <i>Penicillium</i> sp en Agar PDA	33
Figura 3-3: Actividad antagonica de BAL aisladas de Suero Lácteo (SL) sobre A) <i>Penicillium</i> sp y B) <i>Aspergillus</i> sp Entrada al área de farmacia	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Cinética de crecimiento en Agar PDA de <i>Penicillium</i> sp	51
Gráfico 2-3: Cinética de crecimiento en Agar PDA de <i>Aspergillus</i> sp	51
Gráfico 3-3: Análisis de correspondencia de las muestras de alimentos fermentados y cultivos comerciales con respecto a las UFC por mL o g de producto	55
Gráfico 4-3: Porcentajes de inhibición de Bal y Control positivo de Tebuconazol en <i>Penicillium</i> sp y <i>Aspergillus</i> sp	64
Gráfico 5-3: Porcentaje de inhibición de <i>Penicillium</i> spp y <i>Aspergillus</i> spp por la bioactividad antagonica de aislados de bacterias acido lácticas procedentes de distintas fuentes	65
Gráfico 6-3: Evaluación de Normalidad en las variables “Porcentajes de inhibición de <i>Penicillium</i> sp y <i>Aspergillus</i> sp”	67
Gráfico 7-3: Estadístico de prueba para análisis bivariable.....	68
Gráfico 8-3: Gráfico de medias del porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de los diferentes alimentos fermentados y cultivos comerciales contra <i>Penicillium</i> sp y <i>Asperigllus</i> sp.....	70
Gráfico 9-3: Porcentaje de inhibición de las cepas de BAL, Tebuconazol sobre <i>Penicillium</i> y <i>Aspergillus</i>	72

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE ALIMENTOS FERMENTADOS
- ANEXO B:** PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
- ANEXO C:** AISLAMIENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS DE ALIMENTOS FERMENTADOS
- ANEXO D:** PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS
- ANEXO E:** CONTEO DE ESPORAS DE LOS HONGOS AISLADOS Y PURIFICADOS EN CÁMARA DE NEUBAUER
- ANEXO F:** ENSAYO DE ANTAGONISMO DE LAS BAL SOBRE *PENICILLIUM* SP Y *ASPERGILLUS* SP
- ANEXO G:** ANTAGONISMO DE CONTROL POSITIVO TEBUCONAZOL, BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS Y BLANCO EN *PENICILLIUM* SP Y *ASPERGILLUS* SP
- ANEXO H:** CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS* SP EN AGAR PDA MEDIANTE MEDICIÓN DE MICELIO
- ANEXO I:** CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *PENICILLIUM* SP EN AGAR PDA MEDIANTE MEDICIÓN DE MICELIO
- ANEXO J:** BANCO DE CEPAS DE BAL CRIO PRESERVADAS EN GLICEROL AL 30%
- ANEXO H:** AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

RESUMEN

Los hongos filamentosos son los organismos más comunes deterioradores de los alimentos que pueden provocar problemas económicos incluso problemas de salud, debido a la producción de micotoxinas. El presente estudio de tamizaje se enfocó en evaluar la actividad antagonista de las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de alimentos fermentados sobre *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp aislados de granos de quinua *Chenopodium quinua Willdenow* almacenados en una organización de comercio, de ciudad de Riobamba. Se examinaron BAL aisladas en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a partir de: pickles, chicha; queso con cultivo lácteo y suero lácteo y de otros productos con marcas registradas: Kumis Alpina, multiflora Megalabs, Choozit TM81 Danisco. Las bacterias se caracterizaron a nivel de género mediante su morfología macro y microscópica, pruebas de catalasa, oxidasa y tinción Gram, se purificaron para someterlas al ensayo de antagonismo y se elaboró un banco de las cepas bioactivas. Como indicadores de antagonismo se aislaron e identificaron a *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp de granos de quinua provenientes de diferentes zonas de la provincia de Chimborazo: Colta, Guamote y Calpi, Obteniendo once aislados de *Penicillium* y cuatro de *Aspergillus*. Los hongos *Penicillium* Cp 1.3 y *Aspergillus* Gm 1.6. participaron en el ensayo de superposición de placas de agar Malta frente a cuarenta cepas de BAL con potencial bioactividad antifúngica. La frecuencia de aislados de BAL con supresión media de *Penicillium* sp fue del 22,5%, de modo similar con *Aspergillus* sp se obtuvo que el 15% representa una supresión media; siendo las cepas aisladas de pickles y suero lácteo las que mostraron actividad antifúngica superior. Se recomienda realizar un estudio genotípico de los aislados de hongos y BAL, con el fin de conocer la especie participante y promover el uso cepas bioactivas durante la cosecha, postcosecha y almacenamiento de la quinua.

Palabras clave: <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS>, <ANTAGONISMO >, <*Aspergillus* sp>, <*Penicillium* sp >, < *Chenopodium quinua Willdenow* >, < ALIMENTOS FERMENTADOS>.



1854-DBRA-UTP-2021

SUMMARY

Filamentous fungi are the most common food spoilage organisms that can cause financial problems, including health problems, due to the production of mycotoxins. The present screening study focused on evaluating the antagonist activity of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented foods on *Penicillium* sp and *Aspergillus* sp isolated from grains of quinoa, *Chenopodium quinoa Willdenow*, stored in a trade organization in the city of Riobamba. Isolated LABs were examined on Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar from: pickles, chicha; cheese with milk culture and whey and other products with registered trademarks: Kumis Alpina, Megalabs Multiflora, Choozit TM81 Danisco. The bacteria were characterized at the genus level by means of their macro and microscopic morphology, catalase, oxidase and Gram stain tests, they were purified to be subjected to the antagonism test and a bank of the bioactive strains was prepared. As antagonism indicators, *Penicillium* sp and *Aspergillus* sp were isolated and identified, these were taken from quinoa grains from different areas of the Chimborazo province: Colta, Guamote and Calpi, obtaining eleven *Penicillium* and four *Aspergillus* isolates. The fungi *Penicillium* Cp 1.3 and *Aspergillus* Gm 1.6. participated in the Malta agar plate overlay test against forty strains of BAL with potential antifungal bioactivity. The frequency of BAL isolates with mean *Penicillium* sp suppression was 22.5%, similarly with *Aspergillus* sp it was obtained that 15% represents a mean suppression; being the isolated strains of pickles and milk serum those that showed superior antifungal activity. It is recommended to carry out a genotypic study of the fungal isolates and LAB, in order to know the participating specie and promote the use of bioactive strains during harvest, postharvest and storage of quinoa.

Keywords: <LACTIC ACID BACTERIA>, <ANTAGONISM>, <*Aspergillus* sp>, <*Penicillium* sp>, <*Chenopodium quinoa Willdenow*>, <FERMENTED FOODS>.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos por su riqueza en nutrientes pueden ser contaminados por hongos que adaptan su fisiología a las características de a_w , pH, potencial rédox, temperatura, que ofrecen estos nichos ecológicos, también la colonización por hongos puede atribuirse a la asimilación de nutrientes. En general, los hongos contaminantes pueden crecer en una gran variedad de alimentos, así los géneros más comunes *Aspergillus* y *Penicillium* se han aislado de cereales, vegetales, frutas y productos de panificación (Crowley et al 2013, p.95).

Frente a la contaminación por hongos, la industria agroalimentaria ha aplicado métodos de prevención combinados con tratamientos diferentes (tecnologías de barrera: tratamiento térmico, empaque al vacío), con el fin de prevenir las pérdidas económicas del producto y la vez asegurar su calidad e inocuidad para los consumidores. A parte de lo descrito se ha recomendado el uso de preservantes químicos tales como ácidos orgánicos (acético, láctico, propiónico, sórbico, benzoico y sus sales), sin embargo, estos microorganismos se están volviendo resistentes a tales compuestos (Schnürer & Magnusson, 2005, p.75).

En este contexto, desde 1995, la tendencia en preservación de alimentos es eliminar el uso de compuestos químicos y promover la búsqueda de métodos naturales para la conservación (EU,1995) debido también a que los consumidores demandan alimentos libres de conservantes químicos con menos procesamiento y más seguros para la salud humana (Miranda Jorge et al 2011, p.60).

Así, entre los microorganismos más usados en la preservación natural de alimentos figuran las bacterias ácido lácticas (BAL), de amplia distribución en el ambiente, en productos lácteos, alimentos fermentados, vegetales y cereales. En este sentido se han usado cepas seleccionadas, particularmente especies de *Lactobacillus* con fines de bioconservación. El empleo de las BAL se explica porque son quimioheterotrofas, tienen capacidad para acidificar el medio, (volviéndolo inhóspito para bacterias alterantes o patógenicas) y algunas exhiben potencial para producir compuestos antifúngicos (Crowley, Mahony, & van Sinderen, 2013, p.97).

Al principio se creyó que los ácidos orgánicos, por su pH bajo eran los principales agentes responsables de la actividad antifúngica de las BAL pero junto a los ácidos se encontraron también otros metabolitos tales como: el dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos, acetoína, diacetilo, propionato, dipéptidos cíclicos, compuestos proteináceos, compuestos misceláneos como las lactonas, presencia de bacteriocinas por ejemplo, nisina, reuterina, reuteriicina, pediocina, lacticina, y sustancias inhibitoras similares a bacteriocina (BLIS), del inglés “bacteriocina like inhibitory substances” (Reis et al., 2012, Peyer et al., 2016, p.125).

Se ha evidenciado que la reducción del crecimiento de hongos por la acción de BAL puede atribuirse a la competencia por los nutrientes del sustrato y a las interacciones entre hongos y metabolitos bacterianos. Es preciso anotar que el retraso o aumento de la actividad antifúngica de

las BAL depende de la especie y es afectada por las condiciones de incubación (temperatura, tiempo), medio de cultivo, pH (Ahlberg, S.H et al., 2015, Laref, Guessas, & Kihal, 2013).

Cabe señalar que, los hongos patogénicos que atacan a los cultivos, pueden también llegar a deteriorar el producto con los efectos antes mencionados. Sin embargo, el mayor riesgo de la contaminación de alimentos por hongos es la producción de micotoxinas, cuyo consumo genera potencial toxicidad crónica de difícil diagnóstico y con efectos acumulativos para humanos y animales de abasto. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos del suelo cuando una temperatura elevada y alta humedad ambiental promueven un exuberante crecimiento fungal en los alimentos. Las distintas micotoxinas suelen ocurrir simultáneamente en la naturaleza (Pizzolitto et al., 2012, p.90). Los géneros más comunes asociados a este problema son *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Claviceps*.

Los productos agrícolas como la quinua son susceptibles del ataque por hongos micotoxicógenos, antes de la cosecha, durante la cosecha, en el transporte, almacenamiento y procesamiento, este crecimiento puede comprometer la calidad y el rendimiento de los cultivos (Streit, 2013, p.78) con las consecuentes implicaciones económicas.

Sin duda, la contaminación con hongos en nuestro medio debe representar una preocupación principal para los fabricantes de alimentos, y para los organismos gubernamentales de control sanitario. Frente a este aspecto, el uso de BAL aisladas de microbiota indígena de alimentos fermentados) y de otras fuentes surge como una oportunidad promisoría para identificar cepas capaces de controlar este problema, siendo necesario establecer una estrategia metodológica que evidencie la potencialidad de aislamientos de BAL como antagonistas de hongos alterantes y micotoxigénicos, debido a que estas bacterias son seguras para el consumo.

Se prevé que las BAL o sus metabolitos, debidamente vehiculizados se puedan emplear en productos alimenticios, garantizando una mejor calidad, mayor duración y el control de hongos lo cual podría mejorar el nivel competitivo de los productores artesanales y/o microempresarios, dando por finalizado como primera fase del proyecto de investigación en que se enmarca este estudio y contribuyendo con los resultados para futuras investigaciones pertinentes.

Por lo anterior, el presente estudio se enfoca en buscar y aislar bacterias ácido lácticas a partir de alimentos como pickles, chicha, queso con cultivo lácteo, suero lácteo y otros a fin de probar su capacidad antagonica frente a *Penicillium* y *Aspergillus*, hongos deterioradores de los granos de quinua, en la fase de almacenamiento teniendo en cuenta que las bacterias y sus productos pueden emplearse como biopreservativos.

JUSTIFICACIÓN

Los hongos como microorganismos ubicuos se encuentran en todos los ambientes y debido a su capacidad fisiológica altamente versátil pueden contaminar una gama amplia de alimentos, tales como derivados lácteos, cereales, pseudocereales y frutas. La contaminación puede ocurrir a través de la cadena alimentaria, en cualquier tiempo y localidad y los factores que promueven la contaminación son las deficiencias higiénicas en la cosecha, procesamiento o almacenamiento.

Los hongos como contaminantes pueden ejercer una acción dañina sobre el sustrato alimenticio, conduciendo a su deterioro progresivo que se manifiesta por cambios indeseables en sus características sensoriales como olor, color, flavor y textura, además provocan cambios en su composición química. Todos los efectos de la alteración fúngica de los alimentos se traducen en pérdidas económicas debido al rechazo del consumidor por el producto y por ende a problemas para su comercialización local o para su exportación (Delavenne *et al.*, 2012,p.188).

A parte del deterioro, la contaminación por hongos afecta a la inocuidad alimentaria debido a la presencia de micotoxinas y a sus efectos nocivos para la salud humana y animal, efectos que además son acumulativos. Se sabe que la aflatoxicosis causa hepatotoxicidad severa con una tasa de mortalidad del 25%, mientras que estudios en animales han encontrado que la exposición crónica a micotoxinas se asocia con carcinoma hepatocelular, especialmente en la presencia de hepatitis B. Por otra parte, a las micotoxinas se atribuye depresión inmunológica, reducción del crecimiento e interferencias nutricionales por daño en el intestino, y se asume que efectos similares podrían ocurrir en humanos.

Si bien, es posible prevenir el crecimiento fungal y las micotoxinas pueden eliminarse o inactivarse por métodos físicos, químicos y biológicos; en la práctica, la mayoría de estas aplicaciones no se pueden adoptar en países pobres por los costos elevados, por la pérdida del valor nutricional, la alteración de las características sensoriales y los efectos desconocidos en la salud humana. Por esta razón una alternativa simple para prevenir la presencia de micotoxinas es controlar con BAL la contaminación por hongos micotoxigénicos en el campo y durante el almacenamiento de los productos.

Las BAL son de especial interés para emplear en biopreservación debido al hecho que se consideran como organismos GRAS “*Generally regarded as safe*”, o sea generalmente considerados como seguros, destacándose su largo historial de uso en alimentación humana y animal. La mayoría de estudios sobre bioactividad de BAL se han centrado en efectos antibacterianos, mientras los reportes sobre efectos antifúngicos no son tan frecuentes. Aunque los granos andinos son sensibles al crecimiento fungal poco se sabe de la contaminación de quinua con hongos, aunque Pappier y colaboradores reportaron que *Penicillium* y *Aspergillus* fueron los contaminantes más frecuentes en quinua cosechada en Argentina (Pappier *et al.*, 2008 citado en Ramos-Díaz *et al.*, 2021).

En este contexto, el presente estudio se justifica porque se centra en el tamizaje de cepas de BAL con potenciales efectos de control de hongos como *Penicillium* y *Aspergillus* que pueden comprometer la integridad de los granos de quinua si las condiciones ecológicas o deficiencias higiénicas favorecen su ingreso y crecimiento en esta matriz.

La reducción de hongos en la producción y almacenamiento de alimentos resulta clave para promover el desarrollo de estrategias destinadas a este fin, relacionado con el mejoramiento del nivel competitivo de los productores artesanales y/o microempresarios y la calidad y seguridad alimentaria. Los resultados de este estudio ofrecen una aportación en este tema.

Cabe mencionar que el proyecto de investigación es cofinanciado por el grupo de investigación en Seguridad Alimentaria y Desarrollo (SAGID), y se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

OBJETIVOS

General

- Evaluar la actividad antagonista *in vitro* de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados elaborados artesanalmente sobre *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp contaminantes de granos de quinua.

Específicos

- Buscar, aislar e identificar a nivel de género *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp en granos de quinua almacenados en una planta de producción.
- Buscar, aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas capnófilas en pickles, chicha, queso con cultivo lácteo, suero lácteo, y cultivos comerciales.
- Ejecutar ensayos de *screening in vitro* de la actividad antagónica de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados junto con las bacterias de cultivos comerciales, frente a *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp, para seleccionar las de mayor actividad.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

Las bacterias lácticas consideradas como un grupo microbiano surgieron a mediados del siglo XIX con la contribución de Louis Pasteur en 1857 sobre procesos fermentativos (fermentación láctica, alcohólica o butírica) quien demostró que eran causados por distintos tipos de microorganismos. Posteriormente en 1873, se aisló el primer cultivo puro de un microorganismo y lo denominó *Bacterium lactis*. A finales del siglo XIX se propuso el término “Bacterium ácido láctico” y se emplearon cultivos iniciadores en la elaboración industrial de quesos y leche agria en Kiel y Storch (Copenhague), comenzando así la era industrial de las fermentaciones (Bibel, 1988, pp.661-665).

La fermentación microbiana es uno de los métodos ecológicos y económicos más antiguos para la conservación de los alimentos (Pawlowska et al., 2012, p.218), así pues, el uso de BAL remonta hace más de 10.000 años, principalmente fue aplicado en la alimentación para obtener productos fermentados con una mayor durabilidad en relación a los demás alimentos (Pradeep, Kuttappa and Prasana, 2014, pp.14-18).

Caplice, E y Fitzgerald G, consideran que las BAL cumplen con un rol durante la producción y conservación de alimentos, puesto que la fermentación depende de la oxidación de los carbohidratos para generar productos finales tales como: ácidos orgánicos, alcohol y dióxido de carbono siendo estas moléculas las que a los agentes de deterioro de los alimentos. Las BAL realizan una oxidación parcial y el alimento retiene el potencial energético suficiente para el beneficio nutricional del consumidor (Caplice and Fitzgerald, 1999, p.133). Por otro lado, Delavenne, E; Mouniera, J; Déniel, F; evaluaron la actividad antifúngica de las BAL aisladas de leche cruda de oveja, vaca y cabra contra hongos de la descomposición de los alimentos como: *Penicillium expansum* y *Mucor plumbeus*, donde producen gas, alcohol y compuestos aromáticos indeseables que conducen a defectos de sabor y textura. El efecto de dicha inhibición se atribuyó a la presencia de ácidos orgánico, ácido caproico, peróxido de hidrógeno y/o etanoles producidos por las especies de *Lb. buchneri* y *Lb. plantarum* que fueron identificadas en dichas muestras (Delavenne et al., 2012, p.188).

Actualmente, varios estudios de las BAL como biopreservantes muestran un gran potencial para el control de enfermedades de las plantas, aumentando el proceso de fotosíntesis, y la resistencia contra patógenos (Asam y Rychlik, 2013, p.491). En general, las BAL empleadas en la cosecha, transporte y almacenamiento de los alimentos, controlan hongos toxigénicos destacando los géneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp y *Fusarium* sp (Willey y Prescott, 2009, p.1088) (Bennett y Klich, 2003, p.498), capaces de alterar nutrimentalmente y organolépticamente los sustratos

alimenticios, principalmente alimentos de origen vegetal, como frutas, verduras y cereales. (Richard, 2009, p.5).

La capacidad de las BAL como antimicrobianos presentan tres tipos de acción sobre el crecimiento fungal: *i*) inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o pared celular, *ii*) daño a la integridad de las membranas y *iii*) interferencia a nivel metabólico. (Heredia-Castro *et al.* 2017,p.123). Contribuyendo a reducir la presencia de hongos productores de micotoxinas, dicha actividad se basa en la producción de metabolitos ácidos y péptidos antifúngicos tal como lo demuestra Valerio; Favilla M; De Bellis, P y Sisto, A, al evidenciar la actividad antifúngica de BAL aisladas de semolina contra *Penicillium roqueforti* y *Aspergillus niger*, en el que metabolitos como el ácido láctico, acético, cítrico y fórmico analizados por HPLC, demuestran como la actividad de varios metabolitos puede llegar a detener el crecimiento de hongos deterioradores y la producción de sus micotoxinas (Valerio *et al.*, 2009,p.440).

En el Ecuador existen alimentos fermentados que se elaboran artesanalmente tales como la chicha de maíz, chaguarmisqui, vinagre, en el que se ven involucradas las BAL para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Guamán *et al.*, identificaron estas bacterias a partir, chicha de maíz, fruto de la palma(chonta), vinagre, ponche de huevo, quesos y embutidos. Encontraron como especie dominante *Lb. plantarum* que se desarrolla en las últimas fases de fermentación de vegetales y lácteos, mientras que *Pediococcus*, usado como cultivo iniciador se aisló de embutidos; el género *Leuconostoc* fue el más abundante en fermentados de maíz (chicha) y en la chonta, este estudio demostró una gran diversidad de bacterias ácido lácticas en productos fermentados ecuatorianos (Guamán *et al.*, 2014). En nuestro país se evaluaron *in vitro* propiedades bioactivas de BAL aislados de bosques subtropical lluvioso ecuatoriano describiendo contra *Escherichia coli* y *Salmonella* spp (Benavides *et al.*, 2016,p.237).

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Cereales y Pseudocereales

Los cereales tales como avena, arroz, mijo, maíz pertenecen a la familia de las gramíneas puesto que son plantas monocotiledóneas y la estructura del grano está formado por endospermo, germen y salvado por lo tanto son ricos en almidón. Este polisacárido está conformado por amilosa entre el 25 y 28% y amilopectina del 72 a 75% (Colonna Nantes, Buleon, 1992; Cappelle *et al.*, 2013; citados en ILSI, 2018). Por otro lado, algunas especies de plantas como el alforfón, amaranto y quinua son consideradas pseudocereales debido a que son plantas dicotiledóneas productoras de semillas, razón por la cual el Departamento de Agricultura de Estados Unidos los define como “Frutas o semillas de plantas no gramíneas o no cereales que se consumen del mismo modo que los granos de cereales. Normalmente no contienen gluten y son ricos en proteínas y nutrientes” (USDA, 2020).

1.2.1.1. Composición nutricional de cereales y pseudocereales

Los cereales contienen un porcentaje de humedad en peso seco entre el 12 y 14%, son ricos en vitaminas del grupo B, sin embargo, difieren su composición entre los diferentes cereales. Cabe destacar que poseen abundantes enzimas entre las más representativas son las amilasas, proteinasas y lipasas, mientras que el almidón es el polisacárido más abundante y representativo, aunque existen otros en menor cantidad como la hemicelulosa, celulosa y glucanos. Los lípidos se encuentran en menor cantidad a diferencia de las proteínas y carbohidratos, no obstante, sirven como fuente de producción de aceite como es el caso del maíz y trigo (Martínez 2000, pp.141-144).

La composición de los pseudocereales es variable, comenzando con las proteínas, son una gran fuente de aminoácidos tales como *lisina, triptófano, niacina y arginina*; (Matuz *et al.*, 2000; Gorinstein *et al.*, 2002; Vega-Galvez *et al.*, 2010, p.3666) siendo más abundantes en la quinua, amaranto y trigo sarraceno o alforfón. Los lípidos que se encuentran abundantes son: *ácido linoleico, palmítico y esteárico* (Caí, Sun y Corke, 2003; Vega-Galvez *et al.*, 2010; Paredes-Lopez y Robert, 2018, p.366). El *almidón* se encuentra en cantidades semejantes en comparación con los cereales, con la única diferencia que su contenido de amilosa es muy bajo, lo que permite aprovecharlos también en productos como: pan, galletas, postres etc. (W.A. *et al.*, 1983; Qian y Kuhn, 1999; Lindeboom *et al.*, 2005, p.366).

1.2.2. La Quinua

La quinua es un pseudocereal debido a la forma del grano y su composición química; posee un alto valor nutritivo por su contenido en proteínas, carbohidratos, vitaminas y fibra. Por esta razón los cultivos de quinua son importantes para mejorar la calidad de vida a nivel mundial (ILSI, 2018, p.91).

En Ecuador la quinua es cultivada en la región andina, y se adapta a fuertes condiciones ambientales, se cree que antes de la conquista española los Chibchas y tribus de la meseta Cundiboyacense cultivaban intensamente la quinua. En el país existen 2 variedades representativas de quinua, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP) las ha denominado: INIAP-Ingapirca, obtenida del Banco de Germoplasma de la Universidad Técnica del Altiplano en 1980, y entregada a los agricultores como una variedad mejorada, es una variedad que presenta hojas pequeñas de forma romboide y borde entero.

La otra variedad es INIAP-TUNKAHUAN, la cual fue obtenida de una población de germoplasma en la provincia de Carchi-Ecuador en 1985, fue mejorada y entregada a los agricultores entre 1987 y 1991, a diferencia de INIAP-INGACARPI, esta presenta hojas triangulares grandes y de borde dentado y ondulado (Nieto, C; Vimos, C; 1994, p.5).

1.2.2.1. Composición nutricional de la quinua

El grano de quinua se considera un alimento completo debido a su elevado valor nutritivo en especial por un gran contenido de aminoácidos esenciales que puede sustituir aquellos que son aportados por la proteína animal. Según la FAO (FAO, 2011), la quinua es también una gran fuente de ácidos grasos como la omega 3 y 6 que ayudan a reducir los niveles de colesterol LDL y elevan el colesterol HDL, además aporta con minerales entre los que se resalta su alto contenido en calcio, magnesio y zinc. Las saponinas (glucósidos esteroideos) son otros de los componentes que abundan en la quinua, se encuentran en todas las partes de la planta por lo que según (Bhargava, Shukla y Ohri, 2006, pp.79-80) su contenido menor o mayor al 0,11%, determina que la quinua se considere como dulce o amarga. En la Tabla 1.1 se aprecia el valor nutritivo de este pseudocereal y de otros alimentos proteicos. La Tabla 1.2 muestra el valor nutritivo de la quinua en contraste con el de otros cereales.

Tabla 1-1: Composición del valor nutritivo de la quinua.

Componentes %	Quinua	Carne	Huevo	Queso	Leche vacuna	Leche Humana
Proteínas	13,00	30,00	14,00	18,00	3,50	1,80
Grasas	6,10	50,00	3,20		3,50	3,50
Carbohidratos	71,00	-	-	-	-	-
Azúcar					4,70	7,50
Hierro	5,20	2,20	3,20		2,50	
Calorías 100 g	3,50	431,00	200,00	24,00	60,00	80,00

Fuente:(MDRT-BOLIVIA, 2009; citado en FAO, 2011, p.7)

Tabla 2-1: Valores nutricionales de la quinua en comparación con otros cereales.

	QUINUA	TRIGO	MAIZ	ARROZ	
Proteínas		14,00%	11,60%	9,80%	7,70%
Carbohidratos		60,00%	69,70%	70%	74,90%
Grasa		5,00%	3,50%	7%	2,80%
Lisina		0,89%	0,36%	0,22%	
Metionina		0,32%	0,17%	0,27%	0,27%
Triptófano		0,15%	0,14%	0,07%	0,10%
Calorías 100 g		341,00	309,00	338,00	353,00

Fuente: (MDRT-BOLIVIA, 2009, p.9)

1.2.2.2. Zonas de producción en Ecuador

La región andina del Ecuador se caracteriza por la cosecha de alimentos de consumo nacional. Entre las provincias donde se encuentra la producción de quinua son: Chimborazo, Imbabura, Cotopaxi y Carchi, siendo las tres primeras provincias los mayores productores de esta planta de alto valor nutricional (FAO, 2011).

1.2.2.3. *Procesos de Cosecha en Ecuador*

El tratamiento postcosecha de los granos de quinua comprende las siguientes etapas: el presecado, consiste en recolectar la planta y dejar de 7 a 15 días almacenadas sobre una tela o nylon (Bhargava, A; Srivastava, 2013; citados en ILSI, 2018). La siguiente fase es el trillado, la misma que consiste en, someter a la planta a métodos mecánicos y/o manuales que tienen como finalidad, el desprendimiento de los perigonios de las semillas y la paja (Meyhuay, 2013, p.18). Después del trillado de los granos, se trata de separar las impurezas existentes en las semillas, mediante métodos manuales como es el aprovechamiento del viento, o a su vez empleando máquinas que generan corrientes de aire a través de aspas giratorias para lograr una separación más rápida y con gran cantidad.

Posteriormente, se procede a secar las semillas al sol durante 3 días a fin de eliminar el exceso de humedad, por lo que es importante asegurar un adecuado almacenamiento, ya que al exceder los rangos de humedad de entre 12 y 15% es probable que empiece el deterioro de la semilla e inicie el crecimiento de microorganismos alterantes de la quinua. Por último, se procede a la remoción de saponinas para lo cual se utilizan los métodos húmedo, seco o combinado que tiene como finalidad la eliminación del pericarpio (Bhargava, Shukla y Ohri, 2006; citados en ILSI, 2018).

1.2.2.4. *Factores biológicos de alteración en la cosecha y post cosecha de la quinua*

Durante el proceso de cosecha, la quinua es sensible a diversos ataques por parte de microorganismos o plagas que pueden alterar la obtención de nutrientes o a su vez provocar la pérdida total de la planta. Una de las enfermedades que ataca a la planta en pleno crecimiento es el mildiu, cuyo agente es *Peronospora farinosa*, un oomiceto que causa un ligero cambio de color en la cara superior de la hoja, y se extiende a lo largo de las hojas formando zonas de color pajizo de tejido necrosado (Mujica, Izquierdo y Marathee, 2014, p.5).

Los cereales y pseudocereales que provienen de países en desarrollo normalmente experimentan pérdidas postcosecha debido a una manipulación inadecuada, plagas y deterioro por microorganismos. Entre las causas principales de deterioro del grano de quinua se puede mencionar: aves, insectos y hongos (Bolívar Blancas, 2007, p.180).

Las aves y roedores contaminan los granos de quinua logrando introducir microorganismos dañinos; mediante el excremento u orina, por tal motivo el lugar de almacenamiento debe estar alejado de zonas de vegetación y fuentes de agua. Por otra parte, los insectos contaminan el grano con partes de su cuerpo o excremento, por ejemplo, los gorgojos producen calor y agua metabólica propiciando el aumento de hongos durante el almacenamiento y el deterioro del grano (Bolívar Blancas, 2007, p.180).

1.2.3. Hongos deterioradores de los granos de quinua

Los hongos filamentosos o mohos se desarrollan en la superficie de los alimentos con una característica física que generalmente los distingue, ya sean estos aterciopelados o algodonosos. Es así, que todo alimento que presenta un aspecto enmohecido se considera no apto para el consumo. Determinados hongos son capaces de generar metabolitos secundarios de carácter tóxico denominados micotoxinas y son producidos cuando se alteran las condiciones normales de su hábitat. La exposición del ser humano a estos compuestos puede causar micotoxicosis, y se efectúa por vía alimentaria, siendo este el principal riesgo de los alimentos con contaminación fúngica, sea esta evidente o no (Antón, A; Lizaso, 2001, p.1).

Durante los procesos de recolección de los granos de quinua se considera crucial mantener la integridad de su estructura y la calidad de sus nutrientes, para lo cual es indispensable cuidar las condiciones de almacenamiento. Si los granos poseen una alta humedad se facilita el desarrollo de hongos y si se encuentran daños, no resistirán el ataque de hongos. Entre los hongos que se aislaron en este estudio sobre granos almacenados de quinua constan: *Aspergillus* sp, productor de micotoxinas como aflatoxina y ocratoxina y *Penicillium* sp, el cual puede liberar de los granos ácido penicílico y citrinina (Bolívar Blancas, 2007, p.181). Hay pocos estudios que se enfocan principalmente en determinar la micobiota de granos Andinos, entre estos Pappier et al que reportan a *Penicillium* y *Aspergillus* como los contaminantes más frecuentes en quinua (Pappier et al., 2008 citados en Ramos-Díaz et al., 2021).

1.2.3.1. Características morfológicas de los hongos y condiciones ecológicas para su desarrollo

La morfología fúngica se observa de manera macroscópica y microscópica, y estas características conducen a su identificación fenotípica que contribuye a su clasificación. Las hifas de los hongos son filamentos ramificados y entrelazados que pueden crecer dentro del alimento o fuera de este, algunas de estas son completas y lisas mientras que otras son delgadas y desordenadas; el conjunto de hifas se denomina micelio. Determinadas estructuras del micelio ayudan a identificar algunos géneros, por ejemplo, los rizoides de *Rhizopus* y *Absidia*, la célula basal de *Aspergillus*, y la ramificación en forma de Y del género *Geotrichum* (Frazier y Westhoff, 1993, p.24).

Los hongos se reproducen mediante esporas asexuales o sexuales. Las esporas asexuales son de tamaño pequeño, ligeras y resistentes a la desecación por lo que diseminan fácilmente en la atmósfera y originan un talo nuevo de moho, además existen esporas sexuales implicadas en la reproducción de hongos denominados “perfectos” (Frazier y Westhoff, 1993, p.28).

El desarrollo de los hongos y la generación de micotoxinas requiere de ciertas condiciones ecológicas del ambiente (Frazier y Westhoff, 1993, p.29), como son:

Actividad de agua, a_w y humedad. El agua disponible para el desarrollo de hongos contaminantes de cereales y pseudocereales requiere de valores superiores a 0.7. En cuanto al porcentaje de humedad, los hongos requieren un valor mayor al 14% para su crecimiento. Mientras que la temperatura optima es alrededor de 25-30°C (Solís, 2015, p.20).

Los hongos por su naturaleza aerobia, requieren de oxígeno para su crecimiento, y crecerán bien en medios con $Eh +$, en cuanto al pH, pueden crecer en un rango que se ajusta entre 2 y 8,5. Los hongos poseen enzimas hidrolíticas tales como: amilasas, pectinasas, proteinasas y lipasas capaces de desdoblar moléculas complejas y sencillas, (Solís, 2015, p.20), por lo que varios sustratos ofrecen un ambiente adecuado para el crecimiento de estos microorganismos. En efecto, el suelo, las plantas y los granos, son las matrices más comunes que los albergan. Es así, que las esporas de los géneros, *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, desempeñan un papel importante en el deterioro de alimentos (Solís, 2015, p.20).

1.2.3.2. Los hongos contaminantes de la quinua

Los hongos al encontrar condiciones ambientales favorables, pueden colonizar los granos de la quinua (FAO, 1985), entre estos se distinguen:

- Hongos de Campo: colonizan los granos antes de la cosecha, requieren niveles de humedad entre el 20 al 22%. Como ejemplos se mencionan a: *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. nivale*), *Alternaria* spp, *Helminthosporium* spp, *Cladosporium* spp, *Penicillium* (*P. oxalicum*, *P. funiculosum*, *P. oylopium*, *P. oydrinum*) (Perusia y Funiculosum, 2001, p.87).
- Hongos de almacenaje: requieren de sustratos que sean fácilmente metabolizables (carbohidratos), una humedad relativa ambiente mayor o igual al 70%. La temperatura varía de acuerdo al tipo de hongo, por ejemplo, *Aspergillus flavus* requiere una temperatura de 12 a 47°C para la producción de toxinas. La cantidad de oxígeno y dióxido de carbono deben ser idóneas, y entre mayor tiempo de almacenamiento mejor serán las condiciones de desarrollo. Entre los géneros más comunes que se han encontrado en el almacenamiento son: *Aspergillus* (*A. Flavus*, *A. parasiticus*), y *Penicillium* (Perusia y Funiculosum, 2001, p.88).

1.2.3.3. *Penicillium* y *Aspergillus*

Penicillium sp

Los hongos de este género se clasifican en la división Ascomycota, clase Euromycetes, orden Eurotyales, familia Trichocomoaceae. Este hongo crece rápidamente formando un micelio de color blanco inicialmente, a medida que se forman las esporas se va coloreando según la especie, al final el micelio es de aspecto pulverulento y está cubierto de esporas, el conidióforo puede ser monoverticilado asimétrico, biverticilado simétrico o poli verticilado. *Penicillium* sp presenta

hifas con ramificaciones como se aprecia en la figura 1-1 al final de los conidióforos, la métula, fiálides y conidios se unen a modo de eslabones de cadenas (Visagie *et al.*, 2014,p.343).

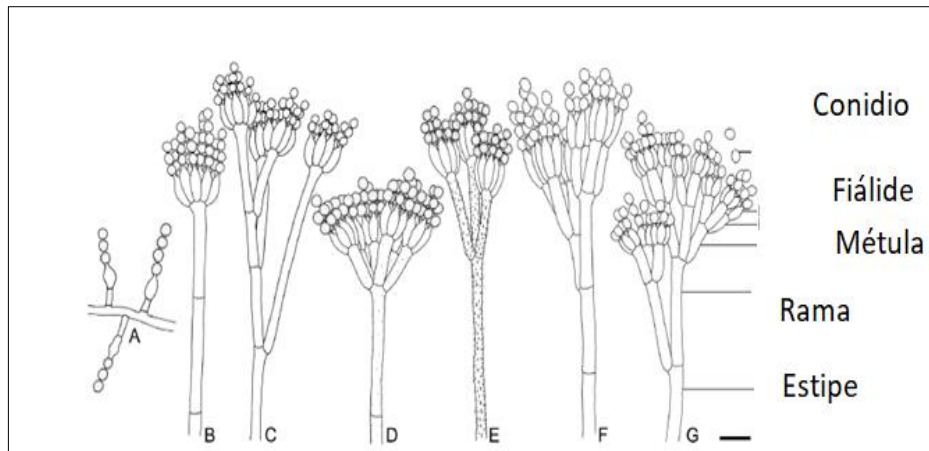


Figura 1-1: *Penicillium* sp y modelos de ramificación del conidióforo
Realizado por: Visagie *et al.*, 2014

Penicillium se conoce bien como uno de los hongos más comunes presentes en diversos hábitats, en el suelo, la vegetación, aire, ambientes interiores y varios productos alimenticios (Lorenzo *et al.*, 2018, pp. 53-107). Su distribución es amplia a nivel global y tiene un gran impacto económico en la vida humana, su principal función en la naturaleza es la descomposición de materiales orgánicos, algunas especies pueden actuar como patógenos en la pre y post cosecha de cultivos alimentarios, adicionalmente producen varias micotoxinas (Samson *et al.*, 2014, pp. 141-173).

Desde el punto de vista ecológico, se ha encontrado una fuerte asociación entre especies de *Penicillium* y sus hábitats naturales, lo cual se atribuye probablemente a comunicación química vía metabolitos secundarios y enzimas extracelulares, pero se conoce que hay mucho por investigar. Según Andersen y Frisvad, los factores abióticos influyen, incluyendo la combinación de temperatura, potencial rédox, pH, presión, a_w y atmósfera, pero ninguno de estos factores puede explicar la asociación de especies de *Penicillium* a un sustrato particular, como por ej. *P. aurantiogriseum* a cereales, se menciona también que el tratamiento con químicos puede cambiar la asociación entre la microbiota y la matriz alimentaria (Visagie *et al.*, 2014,p.343).

Aspergillus sp

El género se caracteriza por tener micelio vegetativo con hifas hialinas, ramificadas, estructura conidial desarrollada como cabezas conidiales, con presencia o ausencia de métula entre vesícula y fiálides, los cuales pueden ser uniseriados o biseriados. Las vesículas se forman en la parte distal del conidióforo que se origina en células hifales especializadas de paredes gruesas (células del pie). Según la especie existen variaciones en el aspecto de estas estructuras. *Aspergillus* se reproduce de forma asexual y sexual y para la descripción se aplica también las características

tamaño y morfología de estructuras tales como cleistotecio, ascosporas y desarrollo de ascomata (Samson *et al.*, 2014).

Aspergillus es un género diverso con alto impacto social y económico, las especies son comunes en varios hábitats, en el aire de interiores, polvo de casas y oficinas, cereales y productos alimenticios con actividad de agua reducida (Visagie *et al.*, 2017). Se sabe que estos hongos descomponen los alimentos, pueden causar pudrición postcosecha en cultivos de maíz y o trigo secados inadecuadamente. Producen micotoxinas y frecuentemente se reportan como patógenos humanos y animales. Aunque también tienen usos biotecnológicos (Samson *et al.*, 2014).

A diferencia de los *Aspergillus* micotoxigénicos, hay otros *Aspergillus* en los que no se han identificado micotoxinas, pero pueden producir pérdidas del alimento y tienen potencial para crear condiciones más favorables para las especies menos xerofíticas de modo que pueden producir micotoxinas, esto se daría mediante la producción de agua metabólica que incrementa la actividad de agua del sustrato (Deschuyffeleer *et al.*, 2015).

Las especies de *Aspergillus* se diferencian mediante tasa de crecimiento, textura, producción de esclerocio o cleistotecio, colores del micelio, esporulación, pigmentos solubles, exudados, reverso de la colonia. Las estructuras reproductivas, asexuales o sexuales son importantes para su identificación, como, por ejemplo: forma de las cabezas conidiales, presencia o ausencia de mótula entre vesícula y fiálides, fiálides uniseriados o biseriados, color de los estipes, tamaño, forma y textura de los estipes, células de Hülle (cuando están presentes), Ascosporas, tamaños y morfología (Samson *et al.*, 2014).



Figura 2-1: Estructuras típicas observadas en especies del género *Aspergillus*, cabeza conidial con vesícula globosa que soporta fiálides que originan a los conidios. Realizado por: Chen *et al.*, 2017, pp. 37-135

1.2.4. Alimentos Fermentados

La fermentación de los alimentos se ha practicado desde la prehistoria de la humanidad y desarrollado a lo largo del tiempo modificando sustratos, procesos y tecnologías. La fermentación tiene lugar mediante cultivos microbianos de bacterias, levaduras y hongos, con técnicas como el repique y el enriquecimiento. Uno de los grupos microbianos principales empleados en la fermentación tradicional e industrial conforman las bacterias ácido lácticas (Shankar y Ushar 2021,p.1).

En la fermentación anaeróbica por bacterias ácido lácticas ocurre un proceso metabólico sin oxígeno, en el que se genera energía a partir de compuestos orgánicos sin la participación de un agente oxidante exógeno, formando metabolitos como el ácido láctico, ácido acético, fórmico y propiónico, etanol, dióxido de carbono, bacteriocinas, entre otros; mejorando en estos alimentos la vida de almacenamiento, la disponibilidad de nutrientes, las propiedades organolépticas y en muchos casos aportan microorganismo benéficos para la dieta del consumidor o microorganismos con propiedades inhibitorias para otros de carácter perjudicial que pueden estar presentes en las matrices originales (Ray, Studies y Joshi, 2014, p.181).

1.2.4.1. Microorganismos de los alimentos fermentados

Existen una gran variedad de alimentos que resultan de un proceso de fermentación, por ejemplo: kombucha, kimchi, yogurt, queso, kéfir, kumis, chucrut, encurtidos o pickles. Los microorganismos de la fermentación generan ciertas sustancias a partir del sustrato, generalmente los carbohidratos son la fuente original para la formación de metabolitos como el ácido láctico, el cual ayuda a conservar el alimento y le da el sabor ácido tan agradable para el paladar. Sin embargo, el proceso no solo preserva el alimento, sino que crea las enzimas necesarias para la digestión (Tamang, 2010; Bourdichon *et al.*, 2012; FAO, 2013; citados en Tamang *et al.*, 2015).

Es necesario tener en cuenta que tanto alimentos como bebidas fermentadas a nivel mundial son elaborados por diferentes microorganismos (Tamang, 2010; Bourdichon *et al.*, 2012; FAO, 2013; citados en Tamang *et al.*, 2015) que se detallan a continuación:

- Bacterias: *Acetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Carnobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Gluconacetobacter*, *Hafnia*, *Halomonas*, *Klebsiella*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Macrococcus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Tetragenococcus*, *Weisella*, *Zymomonas*.
- Hongos: *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Lecanicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Sperendonema*.

- Levaduras: *Candida*, *Cyberlindnera*, *Cystofilobasidium*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Guehomuces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Starmerella*, *Torulaspora*, *Trigonopsis*, *Wickerhamomyces*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, *Zygotoruspora*.

1.2.4.2. Bacterias en alimentos fermentados

Las BAL en los productos lácteos fermentados incluyen principalmente los géneros de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Enterococcus*, *Oenococcus* seguidos por especies de *Acetobacter* que oxidan el alcohol a ácido acético. En general, el género *Lactobacillus* es el predominante (Joshi y Sharma, 2009, p.199).

1.2.5. Bacterias Ácido Lácticas

Se describe como bacterias ácido lácticas (BAL) a un grupo de microorganismos con gran diversidad morfológica y fisiológica, siendo el principal carácter bioquímico la producción de ácido láctico como metabolito mayoritario, durante la fermentación de glucosa y otros azúcares como la arabinosa galactosa o xilosa (Sun et al., 2008, p.2)

Durante la fermentación estas bacterias sintetizan vitaminas y minerales, producen péptidos biológicamente activos, con enzimas tales como proteinasas y peptidasas y remueven algunos compuestos anti nutricionales. Entre los péptidos, algunos tienen efectos antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, antagonistas de los opioides, anti alergénicos, anti carcinogénicos, efectos a los que se atribuyen beneficios para la salud (Magnusson., B y Schnurer. 2003,p.129).

1.2.5.1. Características microbiológicas de las Bacterias ácido lácticas

Las BAL son bacterias Gram-positivas, catalasa y oxidasa negativas, de morfología bacilar o cocobacilar, su longitud es variable y se acompaña de un grosor aproximadamente de 0,5-0,8 μm , son inmóviles, no esporuladas y anaerobias facultativas o microaerófilicas (Savadojo, 2006; citado en Parra Huertas, 2010). Sus colonias se caracterizan por ser color blanco lechoso, consistencia suave y forma circular convexa, esta morfología es visible en medios de cultivos específicos (Ismail, Yulvizar and Mazhitov, 2018, pp.4-5). Se destaca su aroma inconfundible, típicamente a lácteo.

Las BAL no realizan fosforilaciones oxidativas en presencia de oxígeno, debido a su incapacidad de sintetizar citocromos y enzimas correspondientes al grupo hemo, citando como ejemplo la citocromo catalasa (Ekinci.F, 2008, pp.3-7), sin embargo en ciertas condiciones son capaces de tomar grupos hemo externos de moléculas y enzimas como flavoproteínas, oxidasas y

peroxidasas, para formar la enzima denominada pseudocatalasa, que permite realizar limitadas oxidaciones no fosforilantes (Gorbeña and Sáenz, 2017, pp.56-57).

1.2.5.2. *Ecología*

Por lo que se refiere a ecología las bacterias ácido lácticas se localizan en ambientes en donde existen vitaminas, proteínas y carbohidratos, así pues, el rango de crecimiento es relativamente amplio, se ha evidenciado que son capaces de desarrollarse en temperaturas por debajo de 15 °C o por encima de los 45°C, de igual manera el pH de un entorno adecuado varía desde pH 3 a 11. Esta adaptación hacia diversos ambientes explica su amplia distribución en la naturaleza, como en los materiales vegetales y frutas, diversos tipos de alimentos fermentados, cavidades (bucal, genital, intestinal y tracto respiratorio) de humanos y animales, y otros ambientes naturales (Chen and Linlin, 2018, pp.4-5).

1.2.5.3. *Bacterias Homofermentativas*

Las BAL homofermentativas utilizan la ruta Embden-Meyerhof Parnas (EMP) para convertir un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico y 2 moles de ATP, se produce más del 85% de ácido láctico por acción de las enzimas aldosas, hexosa e isomerasa. Cabe mencionar que se caracteriza por degradar fructosa 1,6 difosfato aldosa en dos triosas fosfatos, los cuales se convertirán en piruvato y posteriormente se efectúa una reacción de reducción mediante NADH, con el fin de obtener ácido láctico figura 3-1. Mientras que las BAL hetero fermentativas carecen de la enzima aldosa la cual impide la degradación de la fructosa 1,6-difosfato (Gorbeña y Sáenz, 2017, p. 59). Dentro de esta clasificación se destacan los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* (Parra Huertas, 2010, p.97).

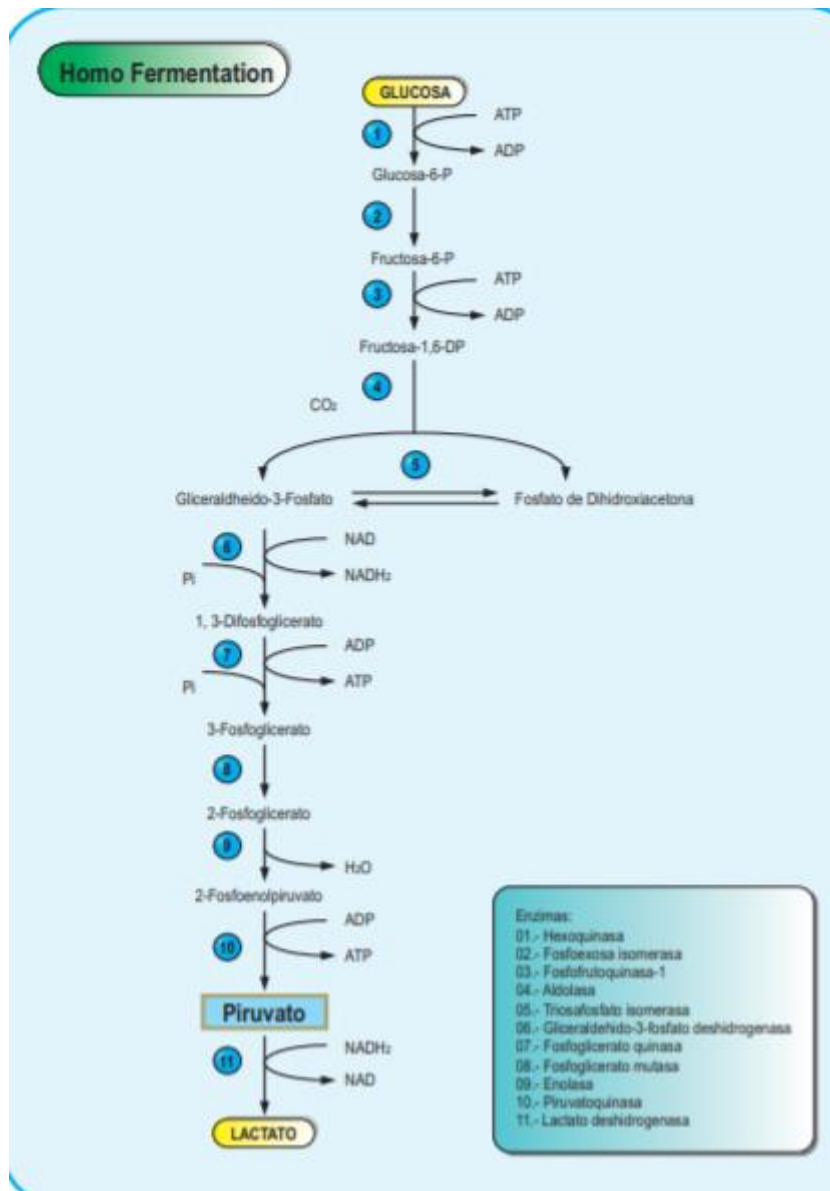


Figura 3-1: Vía homofermentativas de la glucosa por bacterias ácido lácticas.

Realizado por: Axelsson y Von Wright, 2004.

1.2.5.4. Bacterias Heterofermentativas

Las BAL heterofermentativas producen además de lactosa, ácido láctico en un 50% y también forman en pequeñas cantidades ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Este tipo de bacterias carecen de las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero contienen la enzima fosfoacetolasa la cual le permite usar la vía de las hexosas monofosfato o de las pentosas (Devlieghere, Vermeiren y Debevere, 2004; Ly *et al.*, 2008, p.275).

Las Bacterias heterofermentativas generan ácido láctico en menor concentración, pues fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y de CO₂ (Devlieghere, Vermeiren y Debevere, 2004; Ly *et al.*, 2008, p.275), por lo que no pueden ser usadas como cultivos iniciadores, a excepción de ciertos alimentos como el kimchi que requiere que el ácido láctico no

se encuentre en gran cantidad; por lo que este tipo de bacterias dan las características deseadas del alimento. Existen ciertos alimentos en que las bacterias hetero fermentativas actúan como cultivos iniciadores, sin embargo, deben ser precedidos de bacterias homofermentativas para la continuidad del proceso de la fermentación, de esta manera se logra tener las características reológicas y de palatabilidad deseadas (Choi *et al.*, 2003, p.247).

1.2.5.5. Morfología macroscópica de colonias de bacterias ácido lácticas

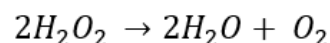
La morfología macroscópica describe las características de una colonia individual que ha desarrollado en un medio de cultivo sólido, este parámetro se usa como criterio de selección e identificación bacteriana (Society, 2021). Ismail en su artículo titulado “Caracterización de las bacterias del ácido láctico del kéfir de leche de vaca local”, señala que las observaciones morfológicas de colonias de BAL se efectuaron de forma visual, apreciándose colonias esféricas, color blanco cremoso con bordes lisos regulares y continuos y elevación convexa (Ismail, Yulvizar and Mazhitov, 2018, p.4).

1.2.5.6. Pruebas de Identificación a nivel de género

Las pruebas de identificación se basan en las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas que permiten determinar las características metabólicas de las bacterias (Carr, Chill y Maida, 2002, pp. 2-3).

Prueba de catalasa

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos, esta prueba permite la detección de bacterias capaces de sintetizar catalasa que neutraliza las formas tóxicas del oxígeno, la presencia de la enzima se detecta por la hidrólisis del peróxido de hidrógeno al 3%, en agua y oxígeno molecular, considerándose una prueba positiva al observar la liberación burbujas de oxígeno tal como se muestra la siguiente reacción (Bou *et al.*, 2010, p.6).



Prueba de oxidasa

Los citocromos son proteínas que forman parte de la cadena transportadora de electrones, propias del metabolismo aerobio y fotosintético. La prueba de la oxidasa detecta la presencia de citocromo C en la bacteria. La reacción se basa en la capacidad del tetrametil-p-fenilendiamina (incolore en estado reducido) de oxidarse rápidamente en presencia de citocromo C, produciendo formas coloreadas (azul) (Bou *et al.*, 2010, p.6).

Tinción Gram

La tinción Gram clasifica a las bacterias en 2 grupos en base a la respuesta que presenten al colorear la pared bacteriana. La diferencia entre bacterias Gram positivas y Gram negativas está dada por el espesor de la capa de peptidoglicano que presenta la pared bacteriana. Las Gram negativas están compuestas principalmente por lipopolisacáridos, fosfolípidos, proteínas y menos del 10% de peptidoglicanos a diferencia de las Gram positivas que contienen mayor porcentaje de peptidoglicanos (Latorre and Navarro, 2011, p.26). Las bacterias Gram positivas, al contener una gran cantidad de peptidoglicano, se tiñen de color azul- violeta, mientras que las bacterias Gram negativas se tiñen de rosa (Esaú López-Jácome et al., 2014, p.12).

1.2.5.7. Efecto antagonista de las BAL

Las principales BAL reconocidas por su capacidad para prevenir o limitar el crecimiento de hongos productores de micotoxinas pertenecen a los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Se han descrito metabolitos activos tales como ácidos orgánicos y péptidos antifúngicos (AFP), destacándose los dipéptidos cíclicos antifúngicos: ciclo (L-PheL-Pro) y ciclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) (Ström et al., 2002, p.4322).

La actividad antimicrobiana de las BAL, se atribuye a los siguientes metabolitos:

Ácidos orgánicos: Se informa que el efecto antimicrobiano es generado por los productos finales ácidos, el pH bajo y la constante de disociación, los mismos que se desarrollan tras las 48 horas de incubación, así pues, el ácido láctico, propiónico y acético, que en su forma no disociada puede penetrar a la célula microbiana y actuar colapsando el gradiente de protones electroquímico a su vez, altera la membrana celular e interrumpe el sistema de transporte. (Snijders, Van Logtestijn and Mossel, D. A. A. Smulders, 1985; citado en Ammor et al. 2006). Conjuntamente las Sales de ácido propiónico, como propionato de sodio y propionato de amonio muestran un efecto similar contra hongos y levaduras a pH bajo (Schnürer and Magnusson, 2005; citado en Reis et al., 2012).

Peróxido de hidrógeno: Se origina en presencia de oxígeno como resultado de la acción de la flavoproteína y su efecto antimicrobiano se debe a la capacidad de oxidar los grupos sulfhidrilo, provocando la desnaturalización de una serie de enzimas patógenas, de igual manera es encargado de peroxidar los lípidos de la membrana, aumentando su permeabilidad (Kong and Davison, 1980; citado en Ammor et al., 2006).

Dióxido de carbono: es producido principalmente por BAL heterofermentativo, éste se involucra en la creación de un entorno anaeróbico que inhibe descarboxilaciones enzimáticas, de tal manera que la acumulación de CO₂ en la bicapa lipídica de la membrana puede causar una disfunción en la permeabilidad (Eklund, 1984; citado en Ammor et al., 2006, p.180).

No solo los compuestos ácidos y el pH son los encargados del efecto antagonista, sino también ciertas sustancias proteicas, conocidas como bacteriocinas, éstas tienen ciertos mecanismos de acción sobre los microorganismos patógenos de los alimentos y son producidas durante o en el final de la fase de crecimiento exponencial (Cotter, Hill and Ross, 2005, pp777-778).

Existen dos posibles mecanismos de acción de las bacteriocinas. La clase I indica que las bacteriocinas atraviesan la pared celular, inhibiendo el lípido II en la membrana del patógeno, razón por la cual evita la síntesis de peptidoglicano, encargado formación de la pared celular de los microorganismos, siendo la Nisina A sintetizada por *Lactococcus lactis*, pertenece a este grupo (Da Costa et al., 2019, p.3).

Al contrario, la Clase II es responsable de la formación de poros de la membrana celular, al unirse con el receptor formador de poros pertenecientes al sistema manosa-fosfotransferasa (Da Costa et al., 2019, p.3), lo que conlleva a un desequilibrio osmótico, debido a fuga de iones y fosfato inorgánico de la célula. La lacticina P, producida por *L. lactis* QU 5, presenta este mecanismo de acción (Fimland et al., 2005, pp.669-672).

1.2.5.8. Propiedades y Usos de las BAL

El uso de BAL remota hace más de 10.000 años, principalmente fue aplicado en la alimentación con el fin de obtener productos fermentados con una mayor durabilidad con relación a los demás alimentos; entre ellos el yogurt era considerado un alimento probiótico capaz de prevenir enfermedades y garantizar la salud (Pradeep, Kuttappa and Prasana, 2014, pp.14-18).

Las BAL pueden jugar un papel muy importante como conservantes ya que tienen una larga historia en la producción de alimentos y generalmente son reconocidos como seguros (estado GRAS). Además, debido a ciertas propiedades metabólicas, las BAL son de especial interés en la industria alimentaria porque pueden mejorar el sabor, la textura y el valor nutricional del alimento final (Arendt and Ryan, 2007, pp.19-21).

Hoy en día se obtienen una serie de productos fermentados con propiedad probiótica, definiéndose probiótico como un conjunto de microorganismos vivos y activos que ejercen una acción equilibradora sobre el intestino, aliviando los síntomas en enfermedades inflamatorias, colitis, enfermedad hepática alcohólica, estreñimiento, reducción del riesgo de cáncer de colon, hígado y seno; esto se debe a la presencia de anti mutagénicos, anticancerígenos, hipocolesterolémicos y antihipertensivos (S.S. and Pan, 2014, pp. 79-81).

A nivel medicinal las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas, se han convertido en un foco de investigación, por la capacidad de actuar como antibióticos naturales, de acuerdo al artículo titulado “Bacteriocinas de bacterias del ácido láctico como alternativa a los antibióticos”, indica que, gran parte de las bacteriocinas sintetizadas son péptidos anfifílicos, que producen daño o inhibición de la biosíntesis de la pared celular es uno de los mecanismos más

efectivos efectos sobre microorganismos patógenos siendo la Nisina A, lacticina P sintetizada por *Lactococcus lactis*, perteneciente a este grupo (Nayar et al., 2015, p.1127) (Fimland et al., 2005, pp. 1726-1734). Por lo que se evidencia en la investigación *in vivo* realizada con el uso de ratones como modelo, no mostró la influencia de la pediocina PA-1 en la composición de la microflora intestinal, a diferencia de los antibióticos clásicos, es decir, penicilinas y tetraciclinas son potentes inhibidores del crecimiento microflora positiva del organismo (Ołdak and Zielińska, 2017, pp. 335-336). Se puede señalar que las BAL han sido empleadas a nivel industrial, agrícola y ganadero tal como se detalla en el artículo científico titulado “El efecto de los inóculos de bacterias del ácido láctico en el rumen *in vitro* fermentación, producción de metano, bacterias celulolíticas ruminales poblaciones y actividades de celulasa del ensilaje de la rastra”, el mismo que argumenta que el uso de mazorca sirve como alimento para los rumiantes, teniendo en cuenta que la calidad del forraje y la digestibilidad es una estrategia de mitigación más efectivas para reducir intensidad de emisión de CH₄ por rumiantes, recibiendo gran atención por la comunidad científica por ser un gas de efecto invernadero. Las BAL se han utilizado para mejorar la calidad de fermentación y digestibilidad del ensilaje de paja, en resumen *L. plantarum* podría mejorar de manera eficiente la calidad de la fermentación y la digestibilidad de la fibra del ensilaje de la mazorca de maíz y reducir la emisión de metano, lo que resulta favorable para el medio ambiente (GUO et al. 2020, pp. 838-847).

La actividad antimicótica de las BAL ha sido estudiada y evidenciada en artículo científico titulado “Uso de bacterias del ácido láctico para la inhibición de *Aspergillus flavus* y crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y producción de micotoxinas”, donde se demuestra que la producción de sustancias activas tales como ácido, ácido benzoico y propiónico, ácido butírico, ácido fórmico, caproico y ácidos hexanoicos, ácido monohidroxiocadecenoico, ácido feniláctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, reuterino, fungicinas, etanol, diacetilo, dióxido de carbono, dipéptidos cíclicos, compuestos fenólicos e hidroxilo ácidos grasos, están asociados a sus efectos antimicóticos; La cepa *L. kefir* FR7 fue la cepa más eficaz en la eliminación de micotoxinas con porcentaje de reducción del 97,22%, 95,27% y 75,26% para AFB1, AFB2 y OTA, respectivamente, debido a una mayor producción de ácido orgánico, por tal razón permite reducir el pH intracelular y detener las actividades metabólicas del patógeno (Ben Taheur et al., 2019, pp. 15-23).

Otro gran aporte por parte de las BAL a nivel de la industria alimenticia es la capacidad de reducción de contaminantes químicos y naturales, tal y como se denota en el artículo científico titulado “Uso de levaduras y bacterias del ácido láctico para reducir la exposición a alimentos químicos contaminantes y toxicidad”, a nivel mundial la contaminación química o natural de los alimentos representa un problema de salud, las BAL han resultado ser una alternativa para reducir la exposición a contaminantes; gran parte de interacciones de BAL con metales involucran procesos de adsorción a los componentes de la superficie, se ha demostrado que transportadores

específicos como Zrt1, Pho84 o Fps1 están implicados en la captación de Cd, As (III, V,) respectivamente, de igual manera los componentes del peptidoglicano presentes en la pared celular de las BAL se ven implicados en la unión a micotoxinas producidas por hongos patógenos, cabe destacar que gran parte BAL contienen enzimas bacterianas tales como fosfotriesterasas, metil paratión hidrolasas y anhidrolasas de ácido organofosforado, capaces de degradar organofosforados o pesticidas mediante la hidrólisis del enlace fosfodiéster (Chiocchetti et al., 2019, pp. 1534-1545).

CAPÍTULO II

2. Metodología

2.1. Localización del estudio

El trabajo de investigación sobre la Evaluación de la actividad antagonista *in vitro* de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados: pickles, chicha, queso con cultivo lácteo, suero lácteo, y cultivos comerciales sobre cepas de hongos *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. contaminantes de los granos de quinua, se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Factores de estudio

2.2.1. Población de estudio

Las bacterias ácido lácticas aisladas a partir de pickles, chicha, queso con cultivo lácteo y suero lácteo comercializados en la ciudad de Riobamba fueron sometidas a ensayos para determinar su capacidad inhibitoria sobre aislados de *Penicillium* y *Aspergillus*. Los hongos se aislaron a partir de granos de quinua originarios de cultivos de Calpi, Colta y Guamote.

La cantidad seleccionada fue de 5 unidades de muestra por tipo de alimento, teniendo como ventajas el costo y facilidad de selección, asegurándose que se cuente con al menos 500 mL o 500 gramos de cada producto.

Las Bacterias BAL aisladas de cultivos comerciales tales como: Kumis Alpina®, probiótico Multiflora Megalabs®, cultivos iniciadores Choozit TM 81 Danisco®, se emplearon a modo de estándares prácticos, o controles positivos.

2.3. Materiales, equipos y reactivos

2.3.1. Origen de los aislamientos de BAL

- Granos de quinua dulce
- Bebidas fermentadas comerciales: kumis y yogurt
- Cultivos starters
- Probiótico: multiflora
- Alimentos fermentables autóctonos: chicha, suero de leche, queso con cultivo iniciador, pickles.

2.3.2. Análisis microbiológico

Tabla 1-2: Materiales, reactivos y equipos utilizados para el análisis microbiológico de las muestras de alimentos fermentados artesanales y cultivos comerciales.

DETERMINACIÓN ANALÍTICA	MATERIALES	REACTIVOS	EQUIPOS
Aislamiento de hongos a partir de granos de quinua almacenados	Tubos de ensayo, matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL, cajas Petri de vidrio, probeta de 100 y 250 mL, vasos de precipitación 100 mL, varilla de agitación Pipetas de vidrio graduadas 1, 5 y 10 mL, lámpara de alcohol, micropipeta de 100 y 1000 uL, micropipeta de 20 uL, gradilla metálica, asa bacteriológica, espátula, papel aluminio, pera de succión, Puntas azules y amarillas para micropipetas y bolsas plásticas Ziploc.	Tetraciclina Genfar® Agar Papa Dextrosa Agua de Peptona. Agua estéril.	Baño de Agua memmert® Autoclave Tuttnauer® Cámara de flujo laminar Bioair® Balanza analítica Boeco® Incubadora microbiológica memmert® Placa de calentamiento.
Caracterización morfológica de hongos	Cubre y porta objetos, lampara de alcohol, asa microbiológica, cinta scotch.	Azul algodón de lactofenol. Agua estéril	Microscopio Zeiss®
Cinética de crecimiento de hongos	Regla Staedtler® Marcador permanente	Ninguno	Ninguno
Conteo de esporas de hongos	Cámara de Neubauer con cubre cámara, tubos de ensayo, varilla de agitación, micropipeta de 100 y 1000 uL, micropipeta de 20 uL, Puntas azules y amarillas para micropipetas.	Solución de Tween 80 0,1 % Agua estéril	Microscopio Zeiss®
Aislamiento de BAL de cultivos comerciales: Kumis Alpina®, Multiflora Megalabs®, Choozit TM 81 Danisco®	Tubos de ensayo, balón de aforo 100 mL, matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL, cajas Petri de vidrio, probetas de 100 y 250 mL, vasos de precipitación,	Ácido acético 5M Agua de Peptona Etanol al 99%, Agar MRS (OXOID CM0361),	Baño de Agua memmert® Autoclave Tuttnauer® Cámara de flujo laminar Bioair® Balanza analítica Boeco®

	varilla de agitación, pipetas de vidrio graduadas 1, 5 y 10 mL, lámpara de alcohol, termómetro micropipetas de 100 y 1000 uL, gradilla metálica, asa bacteriológica, espátula, papel aluminio, Jarra Gas Pak, pera de succión, Puntas azules y amarillas para pipetas volumétricas.	Cicloheximida 50mg/mL, Leche UHT Rey Leche®	Incubadora microbiológica memmert® Placa de calentamiento
Aislamiento de BAL de alimentos fermentados: pickles, chicha; queso con cultivo lácteo, suero lácteo	Tubos de ensayo, tubos con tapa rosca, balón de aforo 100 mL, matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL, cajas Petri de vidrio, probeta de 100 y 250 mL, vasos de precipitación, varilla de agitación, pipetas de vidrio graduadas 1, 5 y 10 mL, lámpara de alcohol, Embudo de vidrio termómetro, micropipetas de 100 y 1000 uL, gradilla metálica, asa bacteriológica, espátula, papel aluminio, cuchillo, pera de succión, eppendorf, Jarra Gas Pak, puntas azules y amarillas para micropipetas.	Ácido acético 5M Agua de Peptona Etanol al 99% Agar MRS OXOID (CM0361), Caldo MRS (OXOID CM0359), Cicloheximida 50 mg/mL.	Baño de agua memmert® Cámara de flujo laminar Bioair® Balanza analítica Boeco® Incubadora microbiológica memmert® Placa de calentamiento
Caracterización de BAL de productos fermentados: pickles, chicha; queso con cultivo láctico, suero lácteo y cultivos comerciales: Kumis Alpina®, Multiflora Megalabs®, Choozit TM 81 Danisco®	Cubre objetos, lampara de alcohol, asa microbiológica	Peróxido de hidrogeno 3% Tira reactiva oxidasa OxiStrips™ Cristal violeta Lugol Alcohol-cetona Safranina Agua Estéril Aceite de inmersión	Microscopio Zeiss®
Ensayo de antagonismo de las BAL aisladas de	Tubos de ensayo, matraz Erlenmeyer de 250 y 500	Agar MRS (OXOID CM0361), Caldo MRS (OXOID CM0359)	Vortex Cámara de flujo laminar Bioair®

alimentos fermentados y cultivos comerciales sobre <i>Penicillium sp</i> y <i>Aspergillus sp</i>	mL, Cajas Petri de vidrio, probetas de 100 y 250 mL Vasos de precipitación, Lámpara de alcohol, micropipeta de 20 a 100 uL, asa microbiológica, Jarra Gas Pak gradilla metálica, espátula, papel aluminio, untas amarilla para pipetas volumétricas, Regla Staedtler® Marcador permanente.	Agar Bacto, Extracto de Malta Tebuconazol 1mg/mL	Autoclave Tuttnauer® Balanza analítica Boeco® Incubadora microbiológica memmert®
Crio preservación de BAL de los alimentos fermentados y cultivos comerciales	Frascos de Vidro Schoot, Pipeta graduada de 5 mL, Micropipeta de 1000 uL.	Glicerol 99,9%, Mallincrodt AR®, Caldo MRS (OXOID CM0359), etanol 60%.	Autoclave Tuttnauer®, Cámara de Flujo laminar Bioair®, Congelador GE Profile®,

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto. 2021

Tabla 2-3: Codificación de los lugares de muestreo de los granos de quinua para el aislamiento de hongos.

MUESTRA	LUGAR MUESTREO	LOTE	CÓDIGO
QUINUA	CALPI	CALPI 9H14	Cp
AMARGA	COLTA	COLTA 101	Cl
	GUAMOTE	GUAMOTE 286	Gm

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto. 2021.

Tabla 3-2: Codificación de muestras de alimentos fermentados y estándares para aislamientos de BAL.

TIPO	MUESTRAS	CODIGO
ARTESANAL	Pickles	PK
	Chicha	CH
	Queso con Cultivo láctico	QF
	Suero Lácteo	SL
COMERCIAL	Kumis Alpina ®	KU
	Multiflora Megalabs ®	MF
	Choozit TM 81 Danisco ®	TM81

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

2.4. Técnicas y métodos

2.4.1. Muestreo de Alimentos

Quinua

Las muestras de granos de quinua, se tomaron en el almacén de la “Fundación Maquita” ubicada en la parroquia Calpi de la ciudad de Riobamba. Las muestras de quinua provenían de tres lugares

diferentes, a cada una se asignó un código específico, siendo estos: Calpi (Calpi9H14), Colta (Colta 101) y Guamote (Guamote 286) tal como se muestra en la tabla 2-3.

Los granos de quinua fueron vertidos en fundas Ziploc, con un peso aproximado de 500 g cada una, se rotuló y se trasladaron al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo para su posterior análisis microbiológico.

Alimentos fermentados

Los pickles se obtuvieron en el Local “Fuente de soda Hugo’s”, ubicada en la ciudad de Riobamba en las calles Guayaquil y Colón 22-53 pasaje la Merced. La cantidad muestreada fue de 500 g y se envasaron en un recipiente de vidrio estéril.

La chicha artesanal, se tomó en el local “Fritadería Guijarro” ubicada en el cantón Guano en las calles León Dalgo y Ricaurte, provincia de Chimborazo, se colocaron 100 mL, en un frasco estéril, en total se tomaron 5 muestras.

Las muestras de queso artesanal con cultivo láctico se tomaron en una tienda de abastecimientos “El Salinerito”, ubicada en la ciudad de Riobamba en las calles Guayaquil y Esmeraldas. Se tomaron al azar cinco muestras de 500 g, Cada muestra fue colocada en funda Ziploc, rotulada y mantenida a 4°C en un cooler.

El suero lácteo se tomó de la quesería “Saguazo”, ubicada en la comunidad de Ilapo, cantón Guano, provincia de Chimborazo, se colocaron 100 mL en 5 frascos estériles respectivamente.

Finalmente, las muestras que se observan en la tabla 3-2, se trasladaron al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, para su posterior análisis microbiológico.

2.4.2. Aislamiento de Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas fueron aisladas de las distintas muestras, mediante la preparación de diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% (10^{-1} - 10^{-6}), se tomaron 10 mL o 10 g de la muestra, posteriormente se lleva a cabo la siembra en superficie en Agar MRS con ácido acético 5 M y Cicloheximida de 50 mg/5mL de etanol al 60%, se incubaron por 48 horas a 37°C en condiciones de capnofilia. A partir de cada aislamiento se seleccionaron colonias con características macroscópicas típicas de BAL, a cada colonia se identificó a nivel de género mediante pruebas de tinción Gram, oxidasa y catalasa. Las colonias con características típicas se inocularon en Caldo MRS (OXOID CM 0359) e incubaron durante 8 horas a 37 °C., y se purificaron empleando la técnica de siembra en estría o por agotamiento, mediante 3 resiembras consecutivas en Agar MRS (OXOID CM0361) incubando a 37°C durante 48 h en capnofilia(Carolina and Jorge, 2016,p.116).

2.4.3. Aislamiento de hongos

Para la obtención de aislados de *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp de la quinua se procedió a realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} - 10^{-5} en agua de peptona al 0,1 % y se inoculó 100 uL de 3 diluciones en Agar Patata Dextrosa (PDA) suplementado con tetraciclina 40 ppm/vol de medio de cultivo, el cultivo se incubó a 25°C por 7 días. A cada aislamiento obtenido se realizó tinción de lactofenol para su caracterización mediante observación microscópica del arreglo que presentan sus estructuras celulares, conidios, métula esterigma, conidióforo, vesícula, según el caso. Posteriormente, se purificaron las colonias inoculando el hongo mediante punción en el agar selectivo. El método consiste en tomar con una aguja microbiológica la colonia seleccionada, para transferir a un nuevo medio de cultivo sólido y evidenciar su crecimiento (Landeró Valenzuela et al.2017, pp. 1020-1021).

2.4.4. Cinética de crecimiento de hongos

A partir de las colonias de hongo aisladas y purificadas, se cortó con sacabocado un cilindro de medio, con 6 mm de diámetro, el cilindro se transfirió a un pozo realizado previamente en la parte central de una placa de PDA. Se monitoreó el crecimiento de los hongos incubados a 25°C midiendo con una regla el diámetro de las colonias durante 7 días consecutivos cada 24 horas. Se elaboró una gráfica de evolución del diámetro en mm vs tiempo en horas.

2.4.5. Conteo de esporas

Se tomaron cultivos frescos de hongos hacia el final de la fase logarítmica, se inoculó talo en el inclinado de tubos con Agar PDA, los cultivos se incubaron a 25°C durante 5 días. Al término de la incubación sobre cada cultivo se depositó 5 mL de solución salina con Tween 80 al 0,1%, con el fin de formar una suspensión de esporas, de dicha suspensión se tomó 1 mL y se transfirió a 9 mL de Solución salina con Tween 80 al 0,1%, se llegó hasta la dilución 1:100 (Carillo, M;Ramírez, M;Martínez,J 2006.p.143), de esta dilución se depositaron 20 uL en la cámara de Neubauer, dejando reposar por 3 minutos previo conteo de esporas hasta obtener una concentración de alrededor de 10^5 cel/1mL.

2.4.6. Ensayo de antagonismo in vitro de las BAL

El ensayo de antagonismo permitió determinar el porcentaje de inhibición de BAL sobre *Penicillium* y *Aspergillus*. Para conseguir tal objetivo se realizó una siembra masiva, a partir de una colonia purificada procedente del tercer repique, se suspendió una asada de este material en 20 mL de caldo MRS (OXOID 0359), se incubó a 37°C por 48 horas, luego se transfirió 1mL en 100 mL de caldo estéril, una vez evidenciado el crecimiento bacteriano, se tomó una asada y se

trazaron 2 líneas paralelas con asa de 10 µL en la superficie del medio MRS agar (OXOID CM 0361). Cada línea midió 3 cm de largo y se dejó 2,5 cm de espacio entre líneas. Transcurrido el tiempo de incubación de las BAL se depositó 10 mL de agar semisólido, compuesto por Bacto agar y extracto de Malta, conteniendo una concentración de 10⁴ esporas de hongos/10 mL, se dejó solidificar e incubar en aerobiosis por 48 horas a 25 °C. Como control positivo se utilizó tebuconazol 430 g/L y se diluyó hasta llegar a una concentración de 1mg/mL (Iglesias *et al.*, 2017, p.10), para colocar sobre las líneas(Magnusson *et al.*, 2003,p.130).

El Porcentaje de inhibición dado por las BAL, se calculó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de Inhibicion} = \frac{\text{Área del rectangulo} * 100 \%}{\text{Area del circulo (caja Petri)}}$$

2.4.7. Crio preservación de BAL

Se elaboró un banco de BAL con 40 cepas aisladas y purificadas en Agar MRS (OXOID CM 0361), para lo cual se tomó una asada de la colonia y se transfirió a 5 mL de caldo MRS (OXOID CM 0359) esterilizado, se dejó incubar por 18 horas a 37°C. Una vez que ha transcurrido el tiempo de crecimiento de las bacterias, se vertió la suspensión del caldo en frascos de vidrio Schoot con 5 mL de glicerol al 30%, ya que este actuará como un crio protector de células bacterianas. Se colocó 1000 uL de la suspensión de glicerol al 30% con caldo MRS (OXOID CM 0359), en tubos eppendorf, hasta obtener 10 copias de la misma cepa aislada, se codificó y se procedió a congelar a -20°C(Carolina and Jorge, 2016,p.116).

La fórmula que se aplicó para la obtención del glicerol al 30% es la siguiente: $V1 = \frac{C2 * V2}{C1}$

Donde:

V1= volumen requerido del Glicerol al 99,9%

C1= Pureza del Glicerol 99,9%

V2= Volumen total de agua estéril

C2= Glicerol al 30%

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Resultados del aislamiento de hongos a partir de granos de quinua

Tabla 1-3: Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de hongos aislados de la quinua.

CEPA	Características MACROSCOPICAS	Características MICROSCOPICAS	CEPA AISLADA
Cp 1.3	Colonia de color verde en el centro con borde blanco, apariencia aterciopelada y polvorienta, presencia de exudación. Reverso blanco amarillo.	Hifas hialinas ramificadas en los extremos del conidióforo, fiálides agrupadas en forma de pincel. producción de conidios esféricas	<i>Penicillium</i> sp
Cp 1.4	Colonias de apariencia algodonosa, de color verde en el centro y borde blanco, no presenta exudación. Reverso blanco con café centro.	Hifas hialinas ramas y fiálides en forma de pincel, presenta producción de conidios esféricas.	<i>Penicillium</i> sp
Cp 1.5	Colonia de color blanco a su alrededor y verde en el centro, apariencia pulverulenta, si presenta exudación. Reverso blanco.	Hifas hialinas ramificadas y fiálides en forma de pincel, presenta producción de conidios redondas.	<i>Penicillium</i> sp
Cp 1.6	Colonias de color verde en el centro y blanco en los bordes, apariencia algodonosa y no presenta exudación. Reverso blanco	Hifas hialinas biverticilado presenta conidios esféricos en forma de pincel.	<i>Penicillium</i> sp
Cp 1.7	Colonia de color verde en el centro y amarillo en su borde, apariencia pulverulenta y no presenta exudación. Reverso amarillo	Hifas hialinas conidióforos cortos, vesículas esféricas, fiálides uniseriado y esporas esféricas.	<i>Aspergillus</i> sp
CI 1.2	Colonia de color verde en el centro y borde blanco, apariencia algodonosa y si presenta exudación. Reverso amarillo	Hifas hialinas, biverticilado y fiálides en forma de pincel, presenta producción de conidios redondas.	<i>Penicillium</i> sp
CI 1.3	Colonia de color blanco en el centro y borde, apariencia algodonosa y si presenta exudación. Reverso amarillo.	Hifas hialinas conidióforo poli verticilado, producción de conidios redondas.	<i>Penicillium</i> sp
CI 1.4	Colonia de color blanco en el centro y borde, apariencia algodonosa y si presenta exudación. Reverso amarillo.	Hifas hialinas presenta conidios esféricos en forma de pincel.	<i>Penicillium</i> sp
CI 1.5	Colonia de color verde y amarillo en el centro y blanco en su borde, de apariencia algodonosa y si presenta exudación. Reverso amarillo oscuro	Hifas hialinas ramificada en los extremos del conidióforo, producción de conidios redondas u ovoide.	<i>Penicillium</i> sp
Gm 1.1	Colonia de color amarillo en el centro y blanco en su borde, de apariencia algodonosa y no presenta exudación. Reverso verde	Hifas hialinas con vesículas redondas, fiálides radiales, conidios esféricos u ovoides en forma radial.	<i>Aspergillus</i> sp
Gm 1.2	Colonia con centro blanco seguido de un halo verde y un margen blanco, apariencia algodonosa y no presenta exudación. Reverso amarillo oscuro.	Hifas hialinas ramificadas y fiálides en forma de pincel, presenta producción de conidios redondas.	<i>Penicillium</i> sp
Gm 1.3	Colonia de color verde seguido de una franja amarilla y borde blanco, apariencia algodonosa y si presenta exudación. Reverso amarillo oscuro.	Hifas hialinas presenta conidios esféricos organizados en forma de pincel.	<i>Penicillium</i> sp

Gm 1.4	Colonia de color blanco en el centro y borde, apariencia algodonosa y no presenta exudación. Reverso blanco	Hifas hialinas, con vesículas redondas y esporas redondas en forma de corona.	<i>Aspergillus</i> sp
Gm 1.5	Colonia de color blanco centro, franja verde y borde blanco, de apariencia algodonosa y si presenta exudación. Reverso amarillo.	Hifas hialinas, producción de conidios redondas u ovoide.	<i>Penicillium</i> sp
Gm 1.6	Colonia de color blanco en el centro y borde, apariencia algodonosa y no presenta exudación. Reverso blanco.	Hifas hialinas presenta vesículas redondas ausencia de métula, con cabeza de conidios.	<i>Aspergillus</i> sp

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

Los contaminantes fúngicos predominantes en los granos de quinua tabla 1-3, fueron los géneros *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp, de un total de diecinueve aislamientos cuatro cepas se consideraron del género *Aspergillus*, once del género *Penicillium*, y las restantes no presentaron las características macroscópicas y microscópicas de interés. La cepa seleccionada para el ensayo de antagonismo fue *Aspergillus* Gm 1.1, figura 1-3, cuyas características concuerdan a lo descrito por Mirabile G, sobre *Aspergillus* de alimento para ganado, como colonias que presentan en el anverso del cultivo conidios maduros color amarillo verdoso y en el reverso colonias de color amarillo claro; microscópicamente, presentan conidióforos portadores de vesículas esféricas con fiálides radiales y productoras de conidios globulares o subglobulares (Samson *et al.*, 2014, pp. 141-173) (Mirabile *et al.*, 2019, p. 7), coincidiendo con la descripción microscópica de nuestro estudio, figura 1-3. Por otro lado, Visagie, C, describe al género *Penicillium* como micelio de aspecto pulverulento, cubierto de esporas; microscópicamente presenta conidióforos monoverticilado asimétrico, biverticilado simétrico o poliverticilado, métula, fiálides y conidios se unen a modo de eslabones de cadenas. (Visagie *et al.*, 2014, pp. 343-371), además Peberdy, J concuerda con las estructuras microscópicas de *Penicillium* en el que los conidióforos son lisos, globosos con un grupo de tres a cinco ramas (Peberdy, 1987, p.32).

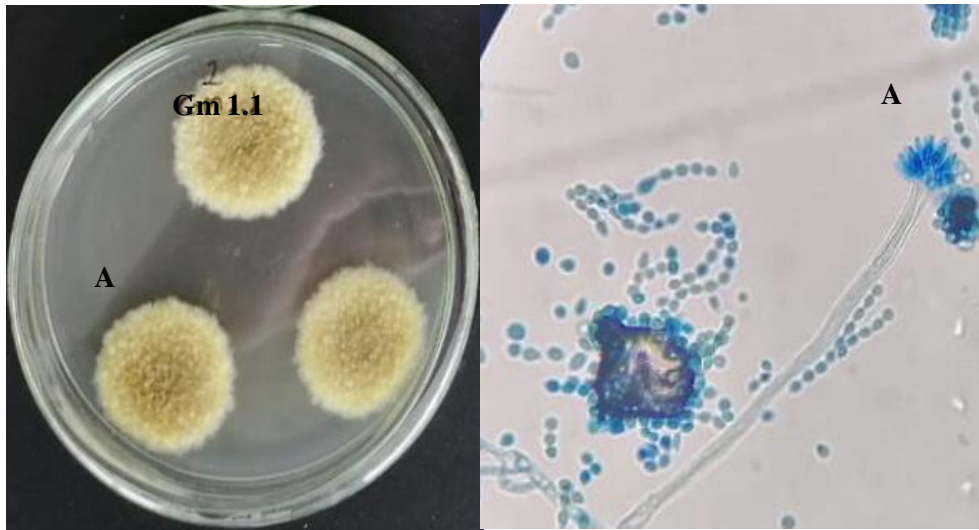


Figura 1-3: A) Morfología macroscópica de *Aspergillus* sp en Agar PDA B) Morfología microscópica *Aspergillus* sp en azul algodón de lactofenol.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

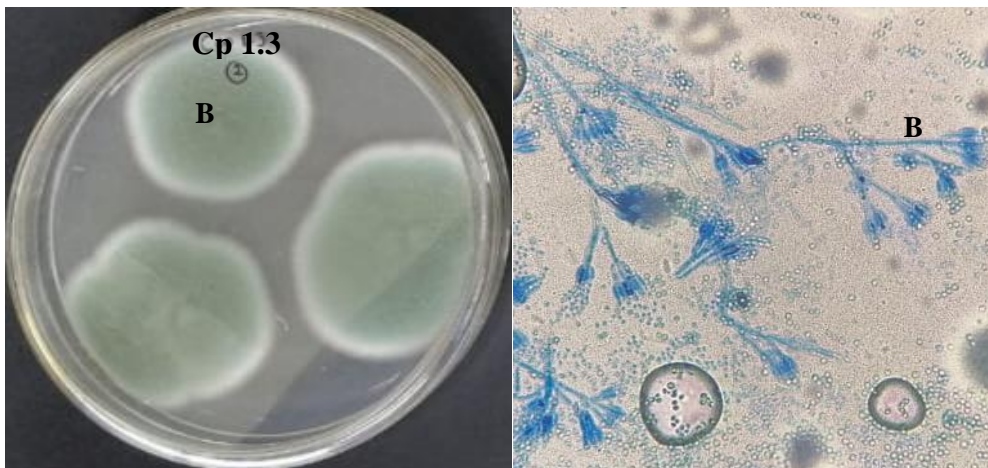


Figura 2-3: A) Morfología macroscópica de *Penicillium* sp en Agar PDA B) Morfología microscópica *Penicillium* sp en azul algodón de lactofenol.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Tabla 2-3: Cinética de crecimiento de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp aislado de los granos de quinua.

Hongo	Cepa	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
<i>Penicillium</i> sp	Cp 1.3	0,9 cm	1,2 cm	1,5 cm	2,5 cm	3,2 cm	3,7 cm	4,3 cm
<i>Aspergillus</i> sp	Gm 1.1	0,95 cm	1,05 cm	1,30 cm	1,70 cm	2,05 cm	2,30 cm	2,65 cm

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

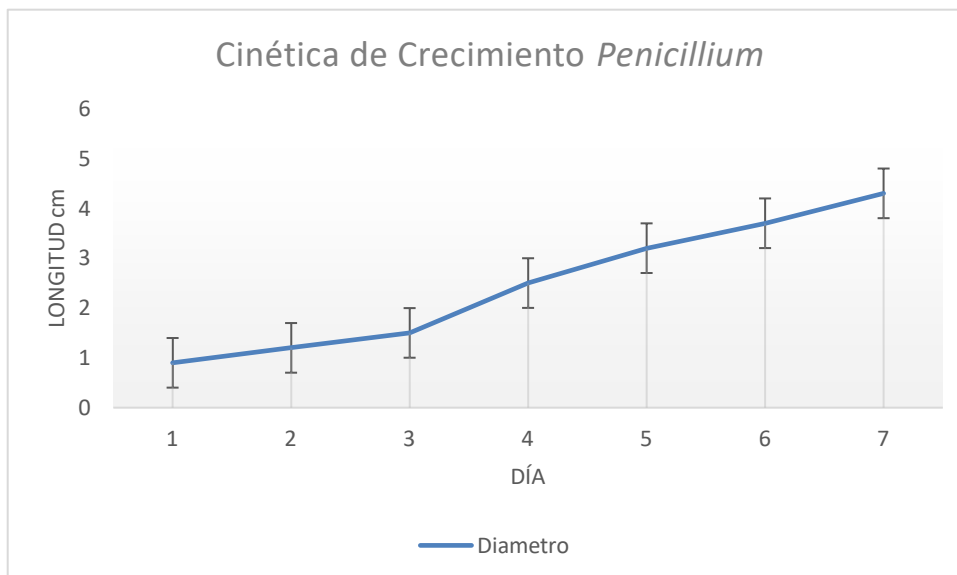


Gráfico 1-3: Cinética de crecimiento en Agar PDA de *Penicillium* sp.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

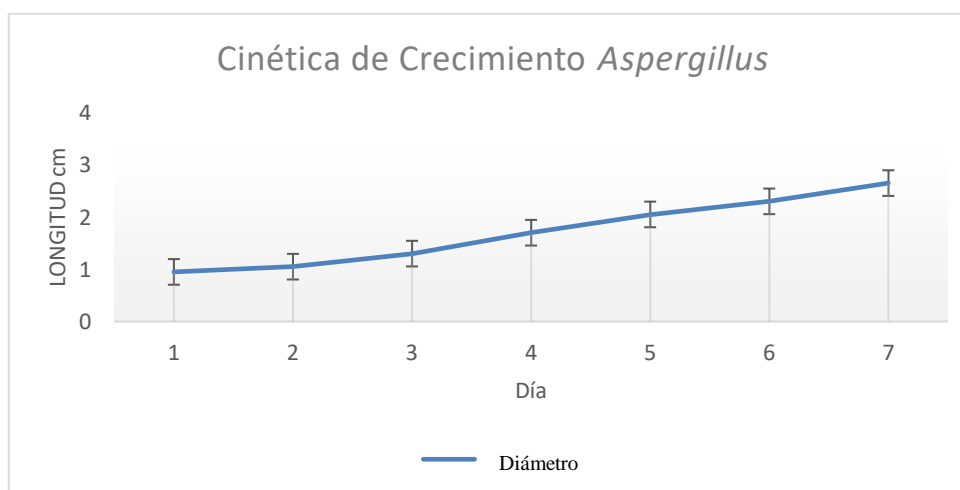


Gráfico 2-3: Cinética de crecimiento en Agar PDA de *Aspergillus* sp

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

La medición consecutiva del diámetro de la colonia a lo largo del tiempo de incubación permitió establecer la cinética de crecimiento de cada hongo empleado en este estudio tal como se aprecia en los gráficos 1-3 para *Penicillium* sp y 2-3 para *Aspergillus* sp, donde fue evidente el inicio del crecimiento exponencial al tercer día y la mayor esporulación al día séptimo, los datos fueron

útiles para aplicar al posterior recuento de esporas en la cámara de Neubauer. Los resultados de este ensayo coinciden con las apreciaciones de Prosser, que consideró que la forma de crecimiento de los hongos filamentosos, se relaciona con un aumento ordenado de los componentes celulares en condiciones óptimas de crecimiento, es decir tiene lugar la extensión del micelio, dando como resultado un crecimiento exponencial de la biomasa fungal. (Prosser y Tough 1991, p. 98).

3.2. Caracterización de bacterias ácido lácticas provenientes de alimentos fermentados y cultivos comerciales

Tabla 3-3: Conteo de UFC de diluciones decimales en Agua de peptona al 0,1% de alimentos fermentados y cultivos comerciales.

MUESTRA	CEPA	DILUCIONES						
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	
KUMIS ALPINA®	KU	N° COLONIAS (UFC)	3	1	0	0	0	0
		UFC/ ml	300	$1,00 \times 10^3$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
MULTIFLORA MEGALABS®	MF	N° COLONIAS (UFC)	5	1	0	0	0	0
		UFC/ ml	500	$1,00 \times 10^3$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
CHOOZIT TM81 DANISCO®	TM 81	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	47	8	0	0
		UFC/ g	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$4,70 \times 10^5$	$8,00 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
PICKLES	PK1	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	56	5	0	0
		UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$5,60 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
	PK 2	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	93	12	0	0
		UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$9,30 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$
	PK 3	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	89	8	1	0
UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$8,90 \times 10^5$	$8,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$	$<1,00 \times 10^1$		
PK 4	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	63	6	0	0	
UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$6,30 \times 10^5$	$6,0,0 \times 10^5$	$<1,00 \times 10^1$	$<1,00 \times 10^1$		
CHICHA	CH1	N° COLONIAS (UFC)	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento
		UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$7,50 \times 10^5$	$7,00 \times 10^5$	$4,00 \times 10^6$	$<1,00 \times 10^1$
	CH2	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	63	5	1	0
		UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$6,30 \times 10^5$	$5,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$	$<1,00 \times 10^1$
	CH3	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	69	8	1	0
UFC/ mL	$>3,00 \times 10^4$	$>3,00 \times 10^5$	$6,90 \times 10^5$	$8,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$	$<1,00 \times 10^1$		

QUESO CON CULTIVO LÁCTEO	CH4	N° COLONIAS (UFC)	No contable	126	16	2	1	0
		UFC/ mL	>3,00x10 ⁴	1,26x10 ⁵	1,60x10 ⁵	2,00x10 ⁵	1,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹
	CH5	N° COLONIAS (UFC)	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento
		UFC/ mL						
	QF1	N° COLONIAS (UFC)	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento	No existe crecimiento
		UFC/ g						
	QF2	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	268	64	17	0
		UFC/ g	>3,00x10 ⁴	>3,00x10 ⁵	2,68x10 ⁶	6,40x10 ⁶	1,70x10 ⁷	<1,00x10 ¹
	QF3	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	196	92	9	1
		UFC/ g	>3,00x10 ⁴	>3,00x10 ⁵	1,96x10 ⁶	9,20x10 ⁶	9,00x10 ⁶	1,00x10 ⁷
	QF4	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	288	101	53	1
		UFC/ g	>3,00x10 ⁴	>3,00x10 ⁵	2,88x10 ⁶	1,01x10 ⁷	5,30x10 ⁷	1,00x10 ⁷
	QF5	N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	167	34	5	0
		UFC/ g	>3,00x10 ⁴	>3,00x10 ⁵	1,67x10 ⁶	3,40x10 ⁶	5,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹
	SUERO LÁCTEO	SL1	N° COLONIAS (UFC)	No contable	143	33	4	1
		UFC/ mL	>3,00x10 ⁴	1,43x10 ⁵	3,30x10 ⁵	4,00x10 ⁵	1,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹
SL2		N° COLONIAS (UFC)	No contable	190	72	4	2	0
		UFC/ mL	>3,00x10 ⁴	1,90x10 ⁵	7,20x10 ⁵	4,00x10 ⁵	2,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹
SL3		N° COLONIAS (UFC)	No contable	215	30	4	1	0
		UFC/ mL	>3,00x10 ⁴	2,15x10 ⁵	3,00x10 ⁵	4,00x10 ⁵	1,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹
SL4		N° COLONIAS (UFC)	No contable	No contable	129	17	6	0
		UFC/ mL	>3,00x10 ⁴	>3,00x10 ⁵	1,29x10 ⁶	1,70x10 ⁶	6,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹
SL5		N° COLONIAS (UFC)	No contable	222	47	9	3	0
		UFC/ mL	>3,00x10 ⁴	2,22x10 ⁵	4,70x10 ⁵	9,00x10 ⁵	3,00x10 ⁶	<1,00x10 ¹

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

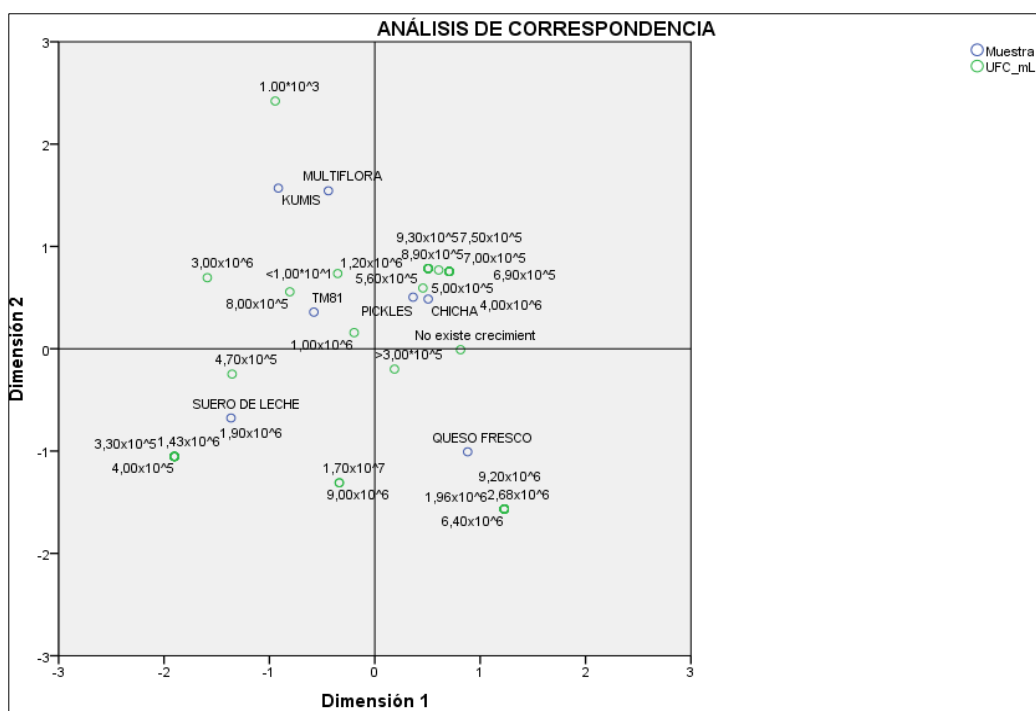


Gráfico 3-3: Análisis de correspondencia de las muestras de alimentos fermentados y cultivos comerciales con respecto a las UFC por mL o g de producto.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

El cuadrante I del Gráfico 3-3 de correspondencias evidenció que las mayores concentraciones de bacterias estuvieron presentes en la chicha y los pickles, al ser cultivadas en agar MRS por 48 horas. La concentración elevada de estos microorganismos se relaciona con el uso de recetas tradicionales para elaboración de bebidas fermentadas a base de maíz y verduras respectivamente. En estudios referentes a recuento de BAL presentes en los granos de cerveza muestran concentraciones altas alrededor de 10^8 UFC/g (Asurmendi et al. 2014,p.35). Hay que destacar que las BAL nativas, se desarrollan en una serie de sustratos de subproductos de cereales, (cebada, el trigo, maíz) y pseudocereales, como también en verduras y frutas, dicho crecimiento intervine en producción de compuestos activos antifúngicos que dependen de la actividad metabólica de cada cepa al fermentar metabolitos presentes en el sustrato como: proteínas, carbohidratos, fibra dietética, fosfolípidos, esenciales ácidos grasos, vitaminas, minerales y antioxidantes (Pelikanova, J., Liptakova, D., Valík, L., & Stančeková, 2011; citado en Jukonyte *et al.*, 2018). Las BAL se aíslan comúnmente de los alimentos fermentados, debido a que constituyen parte de la microbiota autóctona de productos lácteos y derivados; con respecto al III y IV cuadrante del gráfico 3-3, registra una concentración de $1,29 \times 10^6$ UFC/mL y $9,2 \times 10^6$ UFC/mL de las BAL aisladas de Suero lácteo y queso con cultivo lácteo respectivamente, relacionando en paralelismo con estudios literarios similares sobre BAL nativas, aisladas de leche de vaca, oveja y cabra, se mostraron concentraciones medias totales entre $4,7 \pm 0,4$ y $5,9 \pm 0,5$ Log₁₀ UFC / mL, en

consecuencia el promedio de BAL en las muestras de leche de vaca y cabra, fueron más altas en comparación con la leche de oveja (Delavenne *et al.*, 2012, p.187). Demostrando que, existe una alta concentración de BAL en leches, gracias a la fermentación de D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-maltosa, D- sacarosa, N-acetil glucosamina, L-arabinosa (Manini et al. 2016,p.277).

Por otro lado, las muestras de kumis Alpina®, Multiflora Megalabs® y Choozit TM81 Danisco® presentaron en el aislamiento *in vitro* una concentración disminuida de BAL, respecto a lo esperado, lo que se explicaría debido a: defectos de condiciones de almacenamiento en los locales donde se comercializan. De otro lado, en estos productos, los microorganismos presentes han sido adicionados en forma liofilizada o microencapsulada que causa una rápida deshidratación y estrés térmico (Ray, S., 2016; citado en Sneyder, Giraldo and Montes, 2016). O en el caso de los liofilizados, reducen la velocidad de las reacciones químicas para conservar al microorganismo generando un daño celular, reducción de la viabilidad y actividad microbiana (Strasser, S., Neureiter M., M. Gepl, 2009; citado en Sneyder, Giraldo and Montes, 2016), Este segundo argumento sería aplicable para explicar la población final de microorganismos viables en un probiótico, la cual se estima en 10^7 a 10^9 en lugar de niveles algo más elevados que podrían alcanzar productos de fermentaciones naturales. Cabe recalcar que el aislamiento de BAL en Kumis Alpina® y Multiflora Megalabs® tuvo como fin disponer de BAL como estándares prácticos de referencia para el aislamiento de BAL a partir de pickles, chicha, queso con cultivo lácteo y suero lácteo, así como para el ensayo de antagonismo frente a hongos.

Tabla 4-3: Comparación de la morfológica macroscópica de BAL aisladas de alimentos fermentados con respecto a los de cultivos comerciales.

CULTIVOS ESTANDARES							
FORMA	COLOR	BORDE	OLOR	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	ASPECTO	HALO
Elevada convexa	Blanco	Regular: Continuo	Láctico	Lisa	Suave	Cremoso Brillante	Lenticular
MUESTRAS ARTESANALES							
Elevada convexa	Blanco	Regular: Continuo	Láctico	Lisa/Semilobulada	Suave	Cremoso Brillante	Lenticular

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasua, Fausto.2021.

Los resultados de la evaluación macroscópica de las colonias de BAL Tabla 4-3 de cultivos de muestras comerciales y muestras artesanales aisladas y purificadas, en este trabajo, presentaron mínimas diferencias de tamaño, color, borde y superficie Anexo IV. Resultados que coinciden con los estudios de Morami Devi1 que describe colonias BAL de color amarillo pálido / blanquecino, elevadas, esféricas con márgenes enteros (Devi, Jeyanthi Rebecca and Sumathy, 2013, p. 117), de igual manera Ismail, Yulvizar , describe las colonias de BAL aisladas de leche de vaca de color blanco lechoso consistencia suave y forma circular convexo (Ismail, Yulvizar and Mazhitov, 2018, pp.4-5). Lo que indica que las BAL aisladas en estos alimentos corresponden morfológicamente a las características típicas esperadas y que también se observaron en las BAL procedentes de cultivos comerciales (Kumis Alpina®, multiflora Megalabs®) con identificación declarada.

Tabla 5-3: Características morfológicas microscópicas y pruebas de identificación de BAL aislados de alimentos fermentados y cultivos comerciales.

CEPA	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA	TINCION GRAM	CATALASA	OXIDASA
BAL empleadas como ESTANDARES				
KU 1.1	Cocos en cadena	+	-	-
KU 1.2	Cocos	+	-	-
MF 1.2	Bacilos cortos	+	-	-
MF 1.3	Bacilos cortos	+	-	-
MF 2.1	Bacilos largos	+	-	-
MF 2.2	Bacilos largos	+	-	-
MF 2.3	Bacilos largos	+	-	-
TM81 2.1	Bacilos cortos	+	-	-
TM81 2.2	Cocos en cadena	+	-	-
TM81 2.3	Cocos en cadena	+	-	-
PICKLES				
PK 1.1	Bacilo corto	+	-	-
PK 1.2	Bacilo corto	+	-	-
PK 2.1	Bacilo corto	+	-	-
PK 2.2	Bacilo corto	+	-	-
PK 4.1	Bacilo corto	+	-	-

CHICHA				
CH 2.1	Bacilo corto	+	-	-
CH 2.2	Cocos en cadena	+	-	-
CH 3.1	Bacilos cortos	+	-	-
CH 3.3	Cocos	+	-	-
CH 4.1	Bacilos cortos	+	-	-
CH 4.3	Cocos	+	-	-
CH 4.4	Cocos	+	-	-
QUESO CON CULTIVO LÁCTEO				
QF 2.1	Bacilos largos	+	-	-
QF 2.2	Cocos	+	-	-
QF 2.4	Cocos en cadena	+	-	-
QF 3.1	Cocos	+	-	-
QF 3.2	Cocos	+	-	-
QF 3.3	Cocos	+	-	-
QF 4.3	Bacilos cortos	+	-	-
QF 4.4	Bacilos cortos	+	-	-
QF 4.5	Bacilos cortos	+	-	-
QF 5.3	Bacilos cortos	+	-	-
QF 5.4	Bacilos cortos	+	-	-
QF 5.5	Bacilos cortos	+	-	-
SUERO LÁCTEO				
SL 1.1	Bacilos cortos	+	-	-
SL 2.1	Bacilos cortos	+	-	-
SL 2.2	Bacilos cortos	+	-	-
SL 4.1	Bacilos cortos	+	-	-
SL 4.2	Bacilos cortos	+	-	-
SL 5.1	Cocos en cadena	+	-	-

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

La Tabla 5-3, indica las características microbiológicas de colonias típicas de BAL, nótese que, de un total de 40 cepas purificadas, la morfología microscópica predominante de las muestras artesanales y cultivos comerciales, son bacilos cortos (22), mientras que los bacilos largos se ubican en última posición. La coloración Gram sirve como ensayo cualitativo para verificar la pureza del cultivo, tal pureza se consiguió mediante 3 resiembras sucesivas, la pureza del cultivo es indispensable antes de llevar a cabo pruebas de identificación fenotípicas y genotípicas.

Los ensayos de catalasa y oxidasa ayudan a diferenciar y seleccionar o descartar rápidamente las cepas analizadas. El resultado oxidasa negativo de las BAL indica la incapacidad de sintetizar una cadena de transporte de electrones, enzimas y citocromos dependientes del grupo HEMO. Sin embargo, son capaces de degradar poca cantidad de oxígeno, mediante oxidasas, tal como NADH oxidasa, piruvato oxidasa, lactato deshidrogenasa, como también por la presencia de una enzima

especial denominada pseudocatalasa dependiente de magnesio (Mills *et al.*, 2011; citado en Feng and Wang, 2020) . Es importante mencionar que las especies reactivas del oxígeno (superóxido anión (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot), limitan la viabilidad de las BAL (Hansen, 1993; Higuchi; citado en Yamamoto y Kamio, 2000) en atmósfera aerobia.

3.3. Resultados del ensayo *in vitro* del antagonismo de bacterias ácido lácticas aisladas sobre los hongos de la quinua

Tabla 6-3: Porcentaje de inhibición de BAL de muestras artesanales sobre *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp.

CEPA DE BAL	CEPA DE HONGO	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS <i>Penicillium</i> sp (Cel/ mL)	MEDIA % DE INHIBICIÓN DE BAL	CEPA DE HONGO	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS <i>Aspergillus</i> sp (Cel/ mL)	MEDIA % DE INHIBICIÓN DE BAL
PK 1.1	Cp 1.3	195000	49.70	Gm 1.1	137500	52.40
PK 1.2			62.92			58.88
PK 2.1			50.56			61.89
PK 2.2			55.95			62.20
PK 4.1			57.20			39.47
CH 2.1			25.35			25.65
CH 2.2		11.13	16.91			
CH 3.1		197500	23.69		100000	23.85
CH 3.3			16.34			23.83
CH 4.1			13.81			25.53
CH 4.3			24.45			19.74
CH 4.4			10.13			26.28
QF 2.1		112500	145000		5.52	21.26
QF 2.2					6.09	2.23
QF 2.4					2.24	5.29
QF 3.1					7.95	3.92
QF 3.2	23.84			24.30		
QF 3.3	6.29			7.54		
QF 4.3	54.64			18.86		
QF 4.4	45.72			41.13		
QF 4.5	49.73			32.49		
QF 5.3	39.01			39.01		

QF 5.4		43.06		41.04
QF 5.5		37.18		38.64
SL 1.1		47.50		37.72
SL 2.1		42.60		44.41
SL 2.2	197500	54.21	100000	54.21
SL 4.1		52.40		50.24
SL 4.2		61.08		37.10
SL 5.1		58.71		39.50
PLACA CONTROL	TEBUCONAZOL		TEBUCONAZOL	
%	8,89		10,20	
INHIBICIÓN PICKLES				
%	7,88		13,90	
INHIBICIÓN CHICHA				
%	13,67		9,67	
INHIBICIÓN QUESO CON CULTIVO LÁCTEO				
%	7,79		14,02	
INHIBICIÓN SUERO LÁCTEO				

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Tabla 7-3: Porcentaje de inhibición de BAL (estándares prácticos) sobre *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp.

CÓDIGO DE BAL	CÓDIGO DE HONGO	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS <i>Penicillium</i> sp (Cel/mL)	MEDIA % DE INHIBICIÓN DE BAL	CEPA DE HONGO	CONCENTRACIÓN DE ESPORAS <i>Aspergillus</i> sp (Cel/mL)	MEDIA % DE INHIBICIÓN DE BAL
KU 1.1	Cp 1.3	125000	20,16	Gm 1.1	102500	28.45
KU 1.2			6,36			36.42
MF 1.2			21.32			30.42
MF 1.3			19.50			25.09
MF 2.1			27.51			32.45
MF 2.2			17.65			30.73
MF 2.3			6.75			31.26
TM81 (2.1)			0			0
TM81 (2.2)			0			0
TM81 (2.3)			0			0
PLACA CONTROL	TEBUCONAZOL			TEBUCONAZOL		
% DE INHIBICIÓN	13,68			12,30		

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Tabla 8-3: Análisis univariante de los Porcentajes de Inhibición de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp.

MEDIDA	%INHIBICIÓN <i>PENICILLIUM</i>	%INHIBICIÓN <i>ASPERGILLUS</i>	CONTROL P. TEBUCONAZOL <i>PENICILLUM</i>	CONTROL P. TEBUCONAZOL <i>ASPERGILLUS</i>
MÍNIMO	0	0	8	10
1ER CUARTIL	9,5	20,75	8	10
MEDIANA	24	30,5	14	12
MEDIA	29	29,75	11,43	11,8
3ER CUARTIL	50	39,25	14	14
MÁXIMO	63	62	14	14

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Con el objetivo de detener el crecimiento de hongos como *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp se utilizó Tebuconazol para el tratamiento control. Mediante un análisis exploratorio de datos se estudió la localización central y dispersión de los porcentajes inhibidos evidenciándose en la Tabla 8-3 donde, el promedio de inhibición de hongos dados por las BAL fue de 29,37 %; en el caso de *Aspergillus* existió un mayor porcentaje de inhibición siendo del 29,75%, tanto en cultivos comerciales como artesanales. Con Tebuconazol se logró inhibir al 11,8% y 11,43% de *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp respectivamente. Hay que destacar que el porcentaje máximo de inhibición de hongos se consiguió con el uso de bacterias ácido lácticas antes que con Tebuconazol debido a que sus resultados se sobrepusieron en 48 unidades al detenimiento de *Aspergillus* y 49 unidades al crecimiento *Penicillium*.

A sabiendas que *Aspergillus* sp causa el deterioro de muchos productos alimenticios y los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales según menciona Carrillo (Carrillo, 2000. p.5) , se considera como alternativa para el control de estos hongos, el uso de sustancias producidas por BAL tales como el ácido láctico, que reduce el pH de los alimentos y otros compuestos como peróxido de hidrógeno, ácido acético, reuterina que inhiben también a *Penicillium* como mencionan Brul y Coote (Brul and Coote, 1999.p.2) De esta manera, en el presente estudio se demostró que las BAL aisladas de alimentos fermentados y cultivos comerciales en su mayoría logran tener un antagonismo sobre el crecimiento micelial de dichos hongos.

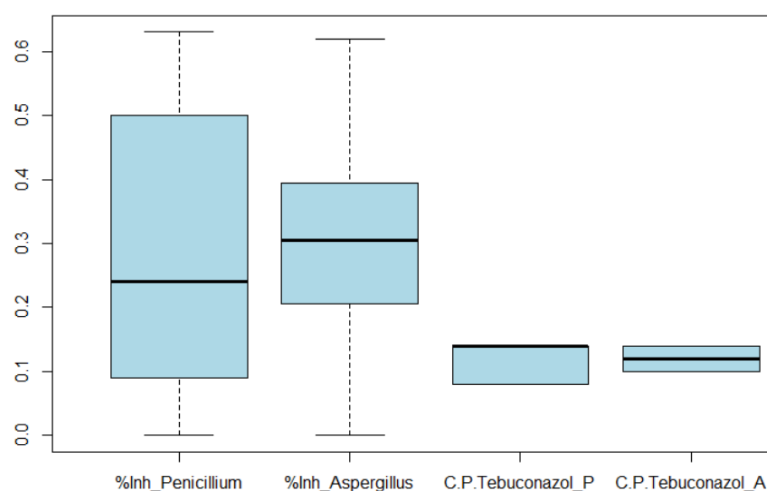


Gráfico 4-3: Porcentajes de inhibición de BAL y Control positivo de Tebuconazol en *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

El Gráfico 4-3 muestra que los porcentajes de inhibición de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp con tebuconazol a la concentración inhibitoria mínima de 1mg/mL son inferiores a los obtenidos por la actividad antagonica de las BAL. Se conoce que este agroquímico presenta una actividad fungicida sistémica de carácter preventivo, curativo y erradicativa logrando un buen control sobre microorganismos superficiales e internos de plantas. Sin embargo, se debe tomar en cuenta su ligera toxicidad para aves, peces y abejas y su acción irritante para la piel y mucosas (Portal Tecno Agricola,2021).

Las BAL poseen un mayor porcentaje de inhibición debido a que no solamente actúa un solo componente para detener el crecimiento de hongos, tal como menciona Batish, el efecto sinérgico del ácido láctico y acético pueden detener el crecimiento fúngico, este último al poseer un mayor valor de pKa puede generar dentro de la célula fúngica una mayor disociación también se considera que a mayor longitud de la cadena de ácidos grasos mejor es la efectividad contra este tipo de microorganismos (Batish *et al.*, 1997.p.212), según Sjögren el *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 se logró identificar mediante resonancia magnética y espectrofotometría de masas la presencia de ácidos como 3-hidroxi-5-cis-dodecanoico, 3-R-hidroxidecanoico, 3-R-hidroxitetradecanoico (Sjögren *et al.*, 2003, p.7555), llegando a detener especies de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp, otro de los metabolitos con mayor efecto antifúngico es el ácido feniláctico producido por bacterias del género *Lactobacillus* en especial *Lactobacillus plantarum*, tal como demuestra Lavermicocca este componente ha logrado retrasar el crecimiento de cepas como *Aspergillus niger* y *Penicillium verrucosum*, de esta manera se verifica que las BAL aisladas de alimentos fermentados artesanales y cultivos comerciales pueden generar una bioactividad antifúngica (Lavermicocca, Valerio and Visconti, 2003, p.636).

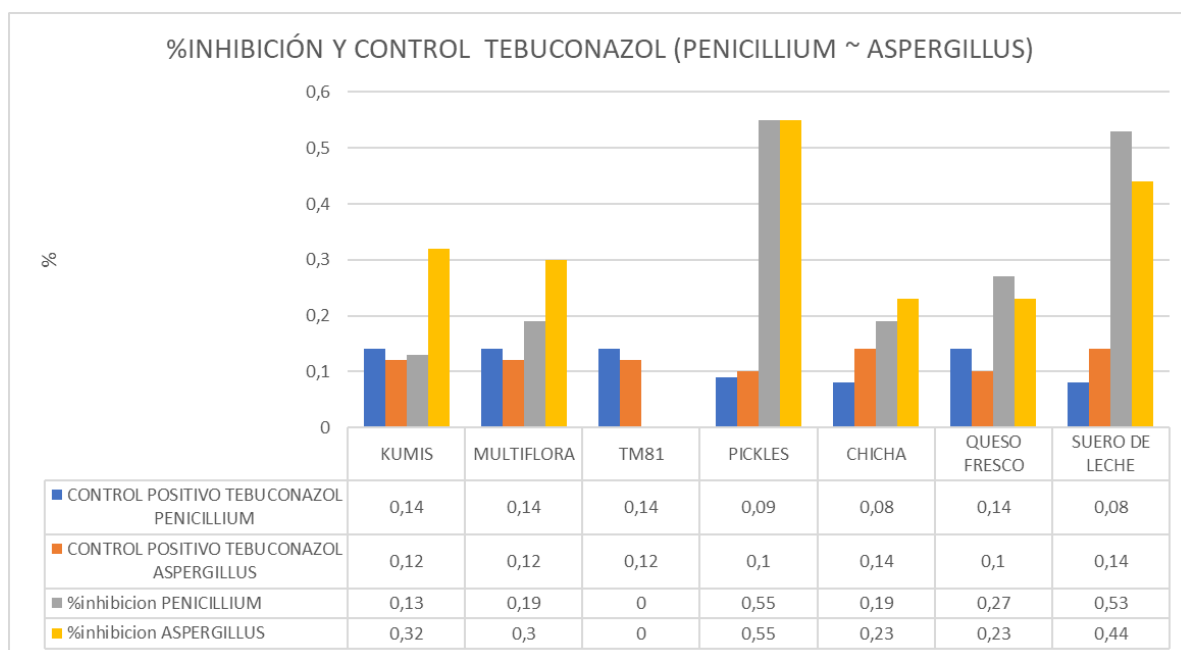


Gráfico 5-3: Porcentaje de inhibición de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp por la bioactividad antagonística de aislados de bacterias ácido lácticas procedentes de distintas fuentes.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

De acuerdo al gráfico 5-3 los aislados de BAL procedentes de pickles y suero lácteo generaron el mayor porcentaje de inhibición de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp; sugiriendo además diferencias significativas con la acción antagonística de los aislados procedentes de las otras muestras por lo que se corroboró con el análisis de varianza correspondiente.

Los hongos filamentosos son capaces de contaminar muchos alimentos incluyendo los cereales y derivados en todas las etapas del procesamiento. El uso de cepas de BAL aisladas de frutas y verduras, presentaron una actividad antifúngica contra hongos contaminantes de quesos, que incluyen los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor* y *Trichoderma*, dicha actividad se debe a la producción de una mezcla de compuestos ácidos, entre ellos, el ácido láctico, Ácido feniláctico, 4-hidroxi-feniláctico, ácido benzoico, ácido propiónico y ácido acético, producidos principalmente por la especie *L. plantarum* aislada de las muestras antes mencionadas. En resumen, la combinación de los diferentes ácidos y peróxido de hidrógeno, fue suficiente para evidenciar la actividad antagonística, que se atribuye a la desestabilización de la membrana fúngica (Cheong *et al.*, 2014, p.96). Además, investigaciones desarrolladas para la caracterización de metabolitos antifúngicos, producidos por BAL aisladas de germen de trigo fermentado, y productos lácteos, mostraron la presencia de péptidos antifúngicos (AFP), cuyo mecanismo, se atribuye, a la interacción directa con la superficie fúngica y alteración de la membrana (Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kawase K and M, 1993; citado en Siedler, Balti and Neves, 2019), siendo el péptido Lf (1-11) útil contra *Aspergillus fumigatus* (Siedler,

Balti and Neves, 2019, p.143). Con el mencionado antecedente es evidente que las cepas de BAL aisladas de pickles y suero lácteo, sean capaces de sintetizar cualquiera, o más de uno de dichos compuestos, que contrarrestan *in vitro* el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium*, dicho resultado se observa en la Figura 3-3.



Figura 1-3: Actividad antagónica de BAL aisladas de Suero Lácteo (SL) sobre A) *Penicillium sp* y B) *Aspergillus sp*.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

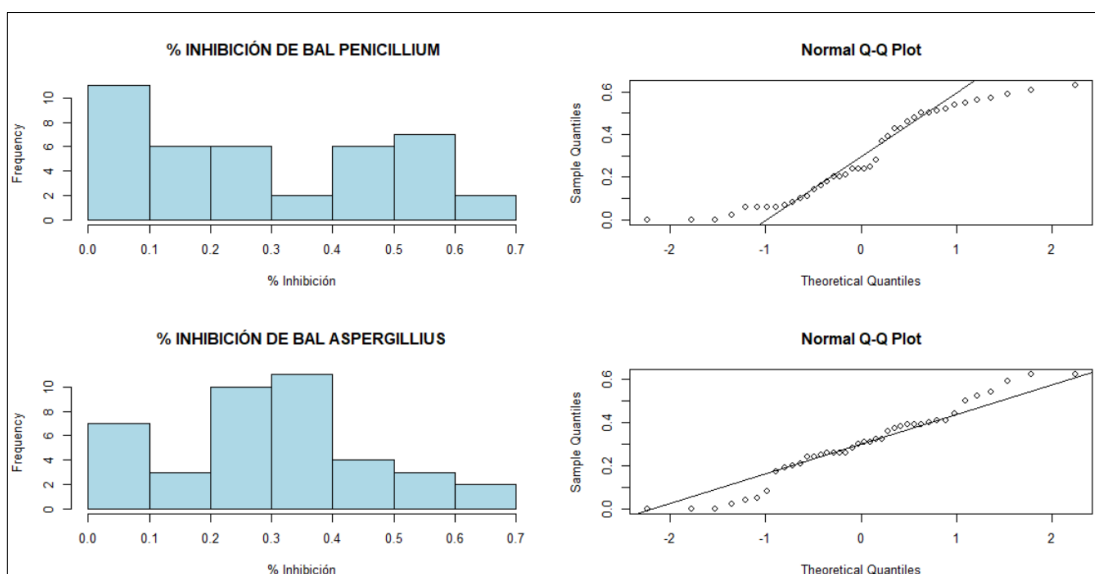


Gráfico 6-3: Evaluación de Normalidad en las variables “Porcentajes de inhibición de *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*”

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Se utilizaron pruebas gráficas e inferenciales de los resultados del gráfico 6-3 para evaluar el ajuste de las variables a una distribución normal, los gráficos Q-Q Plot indicaron que los porcentajes de inhibición carecían de ajuste normal, por tanto, con el objetivo de confirmar lo observado se usó la prueba de Kolmogorov Smirnov con la corrección de Lilliefors robusta aplicada cuando se trata del análisis de muestras superiores a 30 datos. El contraste de hipótesis se planteó como sigue.

H_0 : La variable porcentaje de inhibición sigue una ley normal

H_1 : La variable porcentaje de inhibición no sigue una ley normal

Tabla 9-3: Prueba de normalidad en Kolmogorov-Smirnov.

PRUEBA DE NORMALIDAD			
Kolmogorov-Smirnov			
	Estadístico	gl	Sig.
Inhibición sobre <i>Penicillium</i>	,123	39	,143
Inhibición sobre <i>Aspergillus</i>	,086	39	,200*

*. Esto es un límite inferior de la significancia verdadera

a. Corrección de significación de Lilliefors

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021

Existió suficiente evidencia para no rechazar H_0 , por tanto, las variables, porcentaje de inhibición de *Penicillium* y porcentaje de inhibición de *Aspergillus* se ajustan a una ley normal debido a que el valor de $p > 0,005$ el cual tiene un nivel de confianza del 95%.

```
Two Sample t-test
data: x and y
t = -0.17704, df = 78, p-value = 0.8599
alternative hypothesis: true difference in means is not equal to 0
95 percent confidence interval:
 -0.09184032  0.07684032
sample estimates:
mean of x mean of y
 0.2900    0.2975
```

Gráfico 7-3: Estadístico de prueba para análisis bivariable.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Al comprobar normalidad en las variables se planteó una prueba de comparación de medias para identificar cuál de los tratamientos inhibe en mayor concentración a los hongos *Penicillium* y *Aspergillus*, su contraste se definió por:

$$H_0: \mu_{\% \text{ de inhibición de } Penicillium} = \mu_{\% \text{ de inhibición de } Aspergillus}$$

$$H_1: \mu_{\% \text{ de inhibición de } Penicillium} \neq \mu_{\% \text{ de inhibición de } Aspergillus}$$

Como el p valor (0.8599) es mayor que el nivel de significancia (0,05) se acepta la H_0 , es decir que el porcentaje de inhibición con el uso de las bacterias ácido lácticas aisladas de los alimentos fermentados son estadísticamente iguales, sin embargo, hay que tener en cuenta que a pesar de una bioactividad igualitaria esta se puede mejorar, si en alguno de los tratamientos, se logra poner en contra de uno de los hongos el mayor número factores ecológicos que controlan su crecimiento tales como humedad relativa del ambiente, temperatura, pH, suministro de oxígeno e índice de acidez. Por otra parte, el tiempo de almacenamiento es importante ya que a mayor tiempo, aumenta la posibilidad de condiciones adversas o favorables para el desarrollo fungal (Perusia and Funiculosum, 2001,p.88)

Tabla 10-3: Estudio estadístico ANOVA en análisis multivariable.

		ANOVA				
		Suma de Cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig
Inhibición sobre <i>Penicillium</i>	Entre grupos	1,133	6	,189	11,572	,000
	Dentro de grupos	,538	33	,016		
	Total	1,671	39			
Inhibición sobre <i>Aspergillus</i>	Entre grupos	,788	6	,131	12,862	,000
	Dentro de grupos	,337	33	,010		
	Total	1,125	39			

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Con el objetivo de comparar el porcentaje de inhibición de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp entre los aislados procedentes de alimentos fermentados artesanales y cultivos comerciales se empleó un análisis de varianza tal como se muestra en la tabla 10-3 cuyo contraste se define con el siguiente planteamiento:

BAL de Alimentos fermentados artesanales

$$H_0: \mu_{\% I.P. Chicha} = \mu_{\% I.P. Quesocon cultivo lácteo} = \mu_{\% I.P. Suero lácteo} = \mu_{\% I.P. Pickles}$$

$$H_1: \text{Al menos una de las medias es diferente}$$

$$H_0: \mu_{\% I.A. Chicha} = \mu_{\% I.A. Quesocon cultivo lácteo} = \mu_{\% I.A. Suero lácteo} = \mu_{\% I.A. Pickles}$$

$$H_1: \text{Al menos una de las medias es diferente}$$

BAL de cultivos comerciales

$$H_0: \mu_{\% I.P. Kumis} = \mu_{\% I.P. Multiflora} = \mu_{\% I.P. TM81}$$

$$H_1: \text{Al menos una de las medias es diferente}$$

$$H_0: \mu_{\% I.A. Kumis} = \mu_{\% I.A. Multiflora} = \mu_{\% I.A. TM81}$$

$$H_1: \text{Al menos una de las medias es diferente}$$

Donde $\mu_{\% I.P.}$ representa el promedio de inhibición de *Penicillium* y $\mu_{\% I.A.}$ representa el promedio de inhibición de *Aspergillus*.

Como el p valor de *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp fue 0,00 se rechaza la H_0 , es decir que al menos uno de los porcentajes de inhibición es diferente tanto en alimentos fermentados como cultivos comerciales.

Para detectar el porcentaje de inhibición diferente en cada grupo de alimentos se utilizó la prueba de TUKEY y las gráficas de medias.

Tabla 11-3: Análisis estadístico Tukey de los alimentos fermentados artesanales y cultivos comerciales.

Inhibición sobre <i>Penicillium</i>					Inhibición sobre <i>Aspergillus</i>				
		Subconjunto para alfa=0,05					Subconjunto para alfa=0,05		
Muestra	N	1	2	3	Muestra	N	1	2	3
CHOOZIT TM81 DANISCO®	3	.0000			CHOOZIT TM81 DANISCO®	3	.0000		
KUMIS ALPINA®	2	.1326			KUMIS ALPINA®	2		.2298	
CHICHA	7	.1784			CHICHA	7		.2336	
MULTIFLORA MEGALABS®	5	.1855			MULTIFLORA MEGALABS®	5		.2999	
QUESO CON CULTIVO LACTEO	12	.2677	.2677		QUESO CON CULTIVO LACTEO	12		.3244	
SUERO LACTEO	6		.5275	.5275	SUERO LACTEO	6		.4386	.4386
PICKLES	5			.5527	PICKLES	5			.5497
Sig		.058	.071	1.000	Sig		1.000	.064	.676

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos

- Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica=4,305
- Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

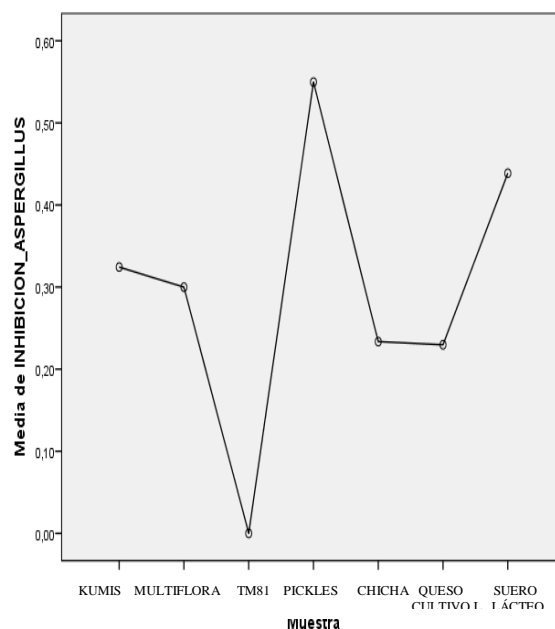
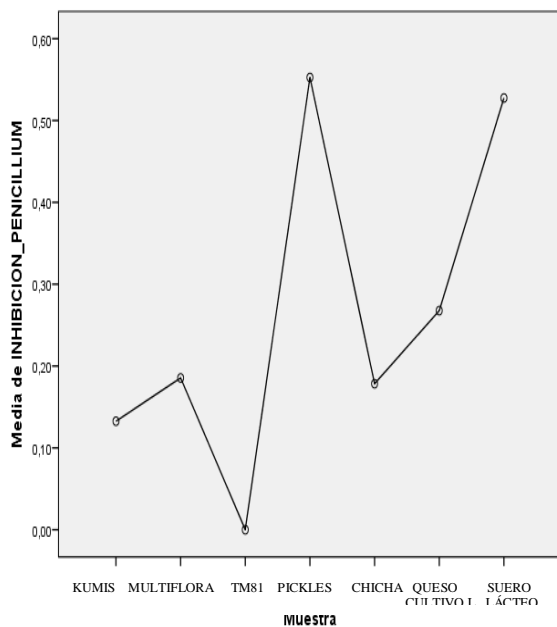


Gráfico 8-3: Gráfico de medias del porcentaje de inhibición de las BAL aisladas de los diferentes alimentos fermentados y productos comerciales contra *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

Con relación a *Penicillium* sp, los porcentajes de inhibición generados por los aislados de BAL fueron altos en las muestras de Suero lácteo y Pickles mientras que los aislados de Kumis Alpina®, Chicha, Multiflora Megalabs® y Choozit TM81 Danisco® mostraron una menor actividad antagónica lo que se explicaría en parte por el tipo de compuestos químicos responsables de dicha actividad adicionalmente por las características genéticas de las BAL y la naturaleza de la matriz en la que se desarrolla, como expresan Crowley, Mahony and Van Sinderen, los compuestos obtenidos de las BAL presentan un mayor rendimiento en la matriz nativa mientras que en los modelos experimentales llevados a cabo en el laboratorio se evidencia lo contrario.(Crowley, Mahony and Van Sinderen, 2013, p.101), demostrándose que existió mayor viabilidad y actividad antifúngica en las bacterias aisladas en sustratos nativos que no sufrieron un proceso de estrés celular. En la inhibición de *Penicillium* sp los aislados de queso con cultivo lácteo y suero lácteo presentaron diferencias significativas en su actividad antagónica lo cual se relacionaría con diferente identidad de BAL, la revisión literaria permitió comparar la producción de compuestos antifúngicos con las especies de *Lactobacillus amylovorus* DSM20552 y *Lactobacillus reuteri* R29 demostrando que existe diferencia significativa en cantidad y variedad de metabolitos producidos para contrarrestar el crecimiento de hongos (Oliveira et al. 2015).

Con relación a *Aspergillus*, los porcentajes de inhibición del hongo fueron altos en las muestras de Pickles y suero lácteo, coincidiendo con lo mencionado en estudios de presencia de ocratoxina A en alimentos de consumo humano, donde se indica que los alimentos como cereales y derivados, bebidas alcohólicas y productos de molienda (café, cacao) almacenan una cantidad alta de los hongos *Aspergillus carbonarius* y *P. purpurogenum* y que su proceso de inhibición depende mucho de las condiciones de producción y conservación (Ravelo Abreu et al., 2011,p.1216)

Por otro lado, las BAL aisladas de Kumis Alpina®, Chicha, Multiflora Megalabs® fueron más activas contra *Aspergillus* sp antes que frente a *Penicillium* sp con una reducción no tan significativa del micelio del hongo, relacionándose con estudios de capacidad antifúngica de las BAL, de los productos fermentados y los metabolitos ácidos producidos, pues se ha determinado que los ácidos con mayor actividad contra *Aspergillus fumigatus* y *nidulans*, son el ácido láctico, propiónico y el acético (Siedler, Balti and Neves, 2019, p.143).

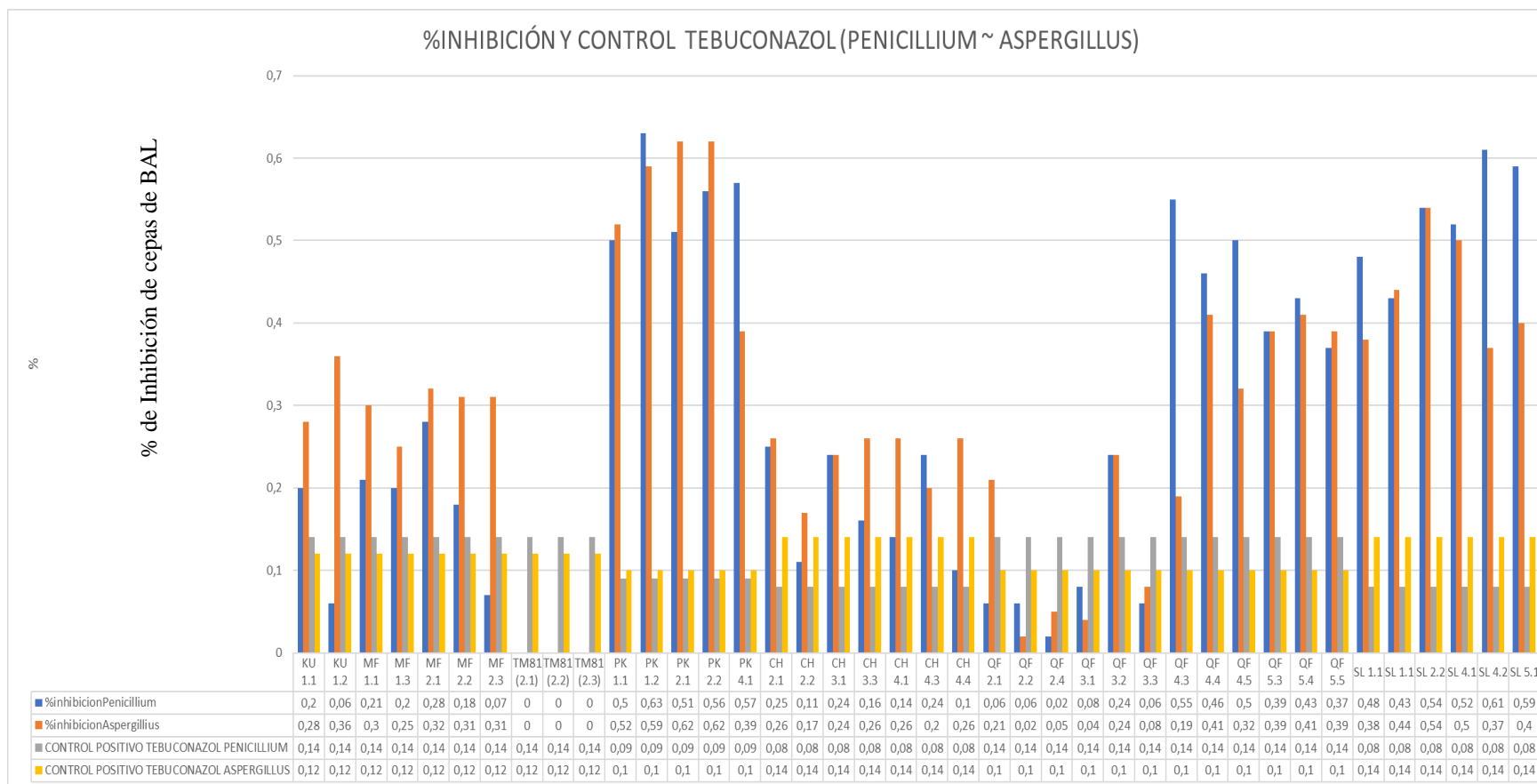


Gráfico 9-3: Porcentaje de inhibición de las cepas de BAL, Tebuconazol sobre *Penicillium* y *Aspergillus*.

Elaborado por: Andino, Liseth; Guasgua, Fausto.2021.

El gráfico 9-3, muestra la actividad antagónica de distintos aislados de BAL frente a *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp a través de las medidas del porcentaje de inhibición de su crecimiento. Arbitrariamente se estableció que una inhibición superior al 75% corresponde a (+++) supresión fuerte, del 74- 50% (++) Supresión media, menor al 50% (+) supresión débil. La frecuencia de los aislados con supresión media de *Penicillium* sp fue de 22,5% (9/40); supresión débil 77,5% (31/40). En contraste *Aspergillus* sp fue inhibido medianamente por el 15% (6/40) de los aislados de BAL; supresión débil fue de 85% (34/40).

Cabe recalcar que el tebuconazol se testó en su CMI (1mg/mL) mientras que en las BAL el efecto inhibitorio se atribuye a la difusión en el agar de compuestos metabólicos no determinados en identidad ni concentración y que pueden o no actuar sinérgicamente. Este estudio es una aproximación o tamizaje de la actividad antifúngica de BAL.

CONCLUSIONES

Las BAL aisladas de alimentos fermentados, mediante el ensayo de superposición en placa, mostraron actividad antagonica contra *Penicillium* y *Aspergillus*, destacándose con mayor capacidad inhibitorio las BAL aisladas de pickles y suero lácteo, dicha actividad se atribuye a la producción de metabolitos activos según la especie de BAL y la matriz donde se desarrolla, evidenciado el potencial antifúngico y la oportunidad promisorio para ser usados como biopreservantes durante el almacenamiento de los granos de quinua.

A partir de los granos de quinua almacenados en la planta de producción Maquita y procedentes de Guamote, Calpi y Colta, se aislaron hongos filamentosos mediante la técnica de dilución en placa, obteniéndose una variedad de colonias, que en base a su macro y micro morfología se caracterizaron como *Penicillium* y *Aspergillus*.

Se aislaron un total de 11 cepas de *Penicillium* sp y 4 cepas de *Aspergillus* sp, siendo estos potenciales alterantes de la quinua durante el almacenamiento comprometiendo la calidad e inocuidad del alimento.

En respuesta a las pruebas macroscópicas y microscópicas de identificación de BAL, las cepas aisladas de cultivos comerciales presentaron una morfología bacilar y cocoide, obteniendo un total de 10 cepas puras evaluadas mediante Gram, y ensayos típicos de caracterización resultando ser bacterias Gram positivas, catalasa y oxidasa negativa. De igual manera las 30 cepas de BAL aisladas de alimentos fermentados cumplen las características típicas de las bacterias reconocidas en los cultivos comerciales, llegando a demostrar que todas las cepas son consideradas aptas para llevar a cabo el ensayo de antagonismo.

En este estudio de tamizaje se aislaron 40 cepas BAL de alimentos fermentados y cultivos comerciales, de modo que fueron usados para evaluar la actividad antagonista contra *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp en agar MRS (OXOID CM0361) usando el método de superposición en placa. Nueve aislados de BAL poseen una actividad antifúngica media contra *Penicillium* sp, mientras que, 6 aislados de BAL mostraron una actividad media contra *Aspergillus* sp, destacando que la cepa PK 1.2 presentó mayor actividad contra *Penicillium* spp, atribuible a la producción de metabolitos activos que pueden diferir en tipo o cantidad y actuar sinérgicamente. En cuanto al género *Aspergillus* las cepas PK2.1 y PK 2.2 contrarrestan con mayor rendimiento el crecimiento fungal. Todas las cepas fueron criopreservadas en glicerol al 30%, debido a que son consideradas como potenciales antagonistas con la capacidad de extender el tiempo de vida útil de los granos quinua.

RECOMENDACIONES

Complementar la identificación de las cepas de hongos aislados de muestras de quinua mediante técnicas moleculares para la determinación de las especies de los hongos.

Complementar la identificación de las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados comerciales y artesanales con el fin de determinar la especie que presenta mayor actividad antagonista.

Considerar estudios posteriores con bacterias ácido lácticas para elaboración de biofungicidas naturales para el control microbiológico durante la cosecha, post cosecha y almacenamiento de la quinua con el fin de promover la biopreservación.

Se recomienda el uso de incubadoras de anaerobiosis para todas las muestras ya que un suministro de 30% de CO₂ provee de condiciones óptimas para el crecimiento y consiguiente bioactividad de BAL.

BIBLIOGRAFÍA

AGUDELO, N., TORRES, M., ALVAREZ, C. y VÉLEZ, L., 2015. Bacteriocinas Producidas por Bacterias Ácido Lácticas Y Su Aplicación En La Industria De Alimentos. *Alimentos hoy* [en línea], vol. 23, no. 36, pp. 63-72. Disponible en: <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/356>.

AMMOR, S., TAVERON, G., DUFOUR, E. y CHEVALLIER, I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, vol. 17, no. 6, pp. 454-461. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2005.02.006.

ARENDET, E. y RYAN, L.A., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food microbiol*, vol. 24, pp. 165-174.

ASAM, S. y RYCHLIK, M., 2013. Potential health hazards due to the occurrence of the mycotoxin tenuazonic acid in infant food. *European Food Research and Technology*, vol. 236, no. 3, pp. 491-497. ISSN 14382385. DOI 10.1007/s00217-012-1901-x.

ANTON, A.;LIZASO, J., 2001. Hongos y Micotoxina. Madrid:

ASURMENDI, P., PASCUAL, L., DALCERO, A. y BARBERIS, L., 2014. Incidence of lactic acid bacteria and *Aspergillus flavus* in brewer's grains and evaluation of potential antifungal activity of these bacteria. *Journal of Stored Products Research* [en línea], vol. 56, pp. 33-37. ISSN 0022474X. DOI 10.1016/j.jspr.2013.11.002. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2013.11.002>.

AXELSSON, L. y VON WRIGHT, A., 2004. *Bacteria ácido láctica: Clasificación y fisiología*. tercera. USA: s.n.

BEN TAHEUR, F., MANSOUR, C., KOUIDHI, B. y CHAIEB, K., 2019. Use of lactic acid bacteria for the inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* growth and mycotoxin production. *Toxicon* [en línea], vol. 166, no. March, pp. 15-23. ISSN 18793150. DOI 10.1016/j.toxicon.2019.05.004. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.05.004>.

BATISH, V.K., ROY, U., LAL, R. y GROWER, S., 1997. Antifungal Attributes of Lactic Acid Bacteria—A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 17, no. 3, pp. 209-225. DOI

10.3109/07388559709146614.

BELLAMY W, WAKABAYASHI H, TAKASE M, KAWASE K, S.S. y M, T., 1993. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol.*

BENNETT, J.W., KLICH, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 497-516.

BENAVIDES, A.B., ULCUANGO, M., YÉPEZ, L. y TENEA, G.N., 2016. Assessment of the in vitro bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], vol. 48, no. 3, pp. 236-244. ISSN 03257541. DOI 10.1016/j.ram.2016.05.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.003>.

BHARGAVA, A; SRIVASTAVA, S., 2013. Crop Production and Management. En: S. BHARGAVA, A; SRIVASTAVA (ed.), Quinoa: botany, production and uses. S.l.: CABI, pp. 90-102.

BHARGAVA, A., SHUKLA, S. y OHRI, D., 2006. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. *Industrial Crops and Products*, vol. 23, no. 1, pp. 73-87. ISSN 09266690. DOI 10.1016/j.indcrop.2005.04.002.

BIBEL, D. (1988). Elie Metchnikoffs bacillus of long life. *American Society for Microbiology* 54: 661-665

BOU, G., FERNÁNDEZ-OLMOS, A., GARCÍA, C., SÁEZ-NIETO, J.A. y VALDEZATE, S., 2010. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. S.l.: s.n. ISBN 9788461479320.

BOLÍVAR BLANCAS, M., 2007. Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* [en línea], vol. 15, no. 181, pp. 180-184. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/pdf?la07050>.

BRUL, S. y COOTE, P., 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, no. 1-2, pp. 1-17. ISSN 01681605. DOI 10.1016/S0168-1605(99)00072-0.

BOURDICHON, F., CASAREGOLA, S., FARROKH, C., FRISVAD, J.C., GERDS, M.L., HAMMES, W.P., HARNETT, J., HUYS, G., LAULUND, S., OUWEHAND, A., POWELL, I.B., PRAJAPATI, J.B., SETO, Y., TER SCHURE, E., VAN BOVEN, A., VANKERCKHOVEN, V., ZGODA, A., TUIJTELAARS, S. y HANSEN, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* [en línea], vol. 154, no. 3, pp. 87-97. [Consulta: 16 noviembre 2020]. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22257932/>.

CARR, F.J., CHILL, D. y MAIDA, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*, vol. 4, pp. 281-370.

CARILLO, M;RAMÍREZ, M;MARTÍNEZ, J., 2006. EFECTO DE SOLUTOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE HONGOS DETERIORATIVOS DE ALIMENTOS. *Sociedad Mexicana de Nutricion y Tecnologia de los Alimentos*, vol. 5, no. 2, pp. 142-146.

CANCER.NET, 2019. Cáncer de hígado: Estadísticas | Cancer.Net. [en línea]. [Consulta: 5 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/cáncer-de-hígado/estadísticas>.

CAROLINA, R.L. y JORGE, F.V.R., 2016. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Informacion Tecnologica*, vol. 27, no. 6, pp. 115-128. ISSN 07180764. DOI 10.4067/S0718-07642016000600012.

CAPLICE, E. y FITZGERALD, G.F., 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, no. 1-2, pp. 131-149. ISSN 01681605. DOI 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.

CHEN, W. y LINLIN, W., 2018. *Lactic acid bacteria in foodborne hazards reduction: Physiology to practice*. S.l.: s.n. ISBN 9789811315596.

CHEN, A., HUBKA, V., FRISVAD, J., VISAGIE, C., HOUBRAKEN, J., MEIJER, M., VARGA, J., DEMIREL, R., JURJEVI, Z., KUBATOV, F., SKLENAR, A., ZHOU, Y.G. y SAMSON, A., 2017. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food. *STUDIES IN MYCOLOGY* [en línea], vol. 88, pp. 37-135. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.07.001>.

CHEONG, E.Y.L., SANDHU, A., JAYABALAN, J., KIEU LE, T.T., NHIEP, N.T., MY HO, H.T., ZWIELEHNER, J., BANSAL, N. y TURNER, M.S., 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* [en línea], vol. 46, pp. 91-97. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.05.011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>.

CHIOCCHETTI, G.M., JADÁN-PIEDRA, C., MONEDERO, V., ZÚÑIGA, M., VÉLEZ, D. y DEVESA, V., 2019. Use of lactic acid bacteria and yeasts to reduce exposure to chemical food contaminants and toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [en línea], vol. 59, no. 10, pp. 1534-1545. ISSN 15497852. DOI 10.1080/10408398.2017.1421521. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1421521>.

CHOI, I.K., JUNG, S.H., KIM, B.J., PARK, S.Y., KIM, J. y HAN, H.U., 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, vol. 84, no. 4, pp. 247-253. ISSN 00036072. DOI 10.1023/A:1026050410724.

COLONNA NANTES, BULEON, A., 1992. New insights on starch structure and properties. *Cereal chemistry and technology: a long past and bright future*. París: INRA., pp. 25-42.

CREPPY, E.E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, vol. 127, no. 1-3, pp. 19-28. ISSN 0378-4274 (Print). DOI 10.1016/s0378-4274(01)00479-9.

CROWLEY, S., MAHONY, J. y VAN SINDEREN, D., 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology* [en línea], vol. 33, no. 2, pp. 93-109. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2013.07.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>.

DA COSTA, R.J., VOLOSKI, F.L.S., MONDADORI, R.G., DUVAL, E.H. y FIORENTINI, Â.M., 2019. Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*, vol. 2019. ISSN 17454557. DOI 10.1155/2019/4726510.

DELAVENNE, E. ET AL. (2012) 'Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period', *International Journal of Food*

Microbiology, 155(3), pp. 185–190. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003.

DESCHUYFFELEER, N., VERMEULEN, A. y DAELMAN, J., 2015. Modelling of the growth/no growth interface of *Wallemia sebi* and *Eurotium herbariorum* as a function of pH, aw and ethanol concentration. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 192, pp. 77-85.

DELAVENNE, E., MOUNIER, J., DÉNIEL, F., BARBIER, G. y LE BLAY, G., 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology* [en línea], vol. 155, no. 3, pp. 185-190. ISSN 01681605. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003>.

DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L. y DEBEVERE, J., 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, vol. 14, no. 4, pp. 273-285. ISSN 09586946. DOI 10.1016/j.idairyj.2003.07.002.

DEVI, M., JEYANTHI REBECCA, L. y SUMATHY, S., 2013. Bactericidal activity of the lactic acid bacteria *Lactobacillus delbreukii*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 5, no. 2, pp. 176-180. ISSN 09757384.

EKINCI, F. G., 2008. Effect of using propionic Acid Bacteria as an Adjunct Culture in Yogurt Production. *Dairy Science*, vol. 91, pp. 3-11.

EKLUND, T., 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 1, pp. 179-185.

ESAÚ LÓPEZ-JÁCOME, L., HERNÁNDEZ-DURÁN, M., COLÍN-CASTRO, C.A., ORTEGA-PEÑA, S., CERÓN-GONZÁLEZ, G. y FRANCO-CENDEJAS, R., 2014. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. [en línea], vol. 3. Disponible en: www.medigraphic.org.mx www.medigraphic.org.mx.09586946. DOI 10.1016/j.dairyj.2003.07.002.

FAO, 1985. Prevención de pérdidas de alimentos postcosecha. *FAO* [en línea]. [Consulta: 28 noviembre 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/x5037s/x5037S02.htm>.

FAO - ONU, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones. *Estudio FAO. Alimentación y Nutrición*, pp. 45.

FAO, 2011. La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. *Oficina Regional para América Latina y el Caribe, FAO*. S.l.:

FAO, 2013. Commission on Genetic Resources for food and agriculture, Status and trends of the conservatory and sustainable use of microorganisms in food processes. *Fao*, no. December, pp. 82-84. ISSN 1543-5938.

FENG, T. y WANG, J., 2020. Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: a systematic review. *Gut Microbes* [en línea], vol. 12, no. 1. ISSN 19490984. DOI 10.1080/19490976.2020.1801944. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>.

FIMLAND, G., JOHNSEN, L., DALHUS, B. y NISSEN MEYER, J., 2005. Péptidos antimicrobianos (bacteriocinas de clase IIa) y su inmunidad proteínas: biosíntesis, estructura y modo de acción. *J. Pept. Sci.*, vol. 11, pp. 688-696.

FRAZIER, W. y WESTHOFF, D., 1993. Microbiología de los alimentos. Microbiología de los Alimentos. Cuarta. Zaragoza: ACRIBIA, S.A. ZARAGOZA, pp. 23-50. ISBN 842004734X.

GASPAR, P., CARVALHO, A., VINGA, S. y SANTOS, H., 2013. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnol.*, vol. 6, pp. 764-768.

GAVRILOVA, M.A., SLEPCHENKO, G.B., MIKHEEVA, E. V y DERYBINA, V.I., 2014. Voltammetric Determination of Aflatoxin B1. En: XV International Scientific Conference “Chemistry and Chemical Engineering in XXI century” dedicated to Professor L.P. Kulyov, *Procedia Chemistry* [en línea], vol. 10, pp. 114-119. ISSN 1876-6196. DOI <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.10.021>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876619614000667>.

GOBBETTI, M., DE ANGELIS, M., CORSETTI, A. y DI CAGNO, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, vol. 16, no. 1-3, pp. 57-69. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2004.02.013.

GORBEÑA, J.C.R. y SÁENZ, T.A., 2017. Bacterias ácido lácticas. *Biotempo* [en línea], vol. 8, no. 0, pp. 54-64. ISSN 2519-5697. Disponible en:

<http://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo/article/view/865>.

GORINSTEIN, S., PAWELZIK, E., DELGADO-LICON, E., HARUENKIT, R., WEISZ, M. y TRAKHTENBERG, S., 2002. Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [en línea], vol. 82, no. 8, pp. 886-891. [Consulta: 21 junio 2020]. ISSN 00225142. DOI 10.1002/jsfa.1120. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.1120>.

GUO, G., SHEN, C., LIU, Q., ZHANG, S. LIN, SHAO, T., WANG, C., WANG, Y. XIN, XU, Q. FANG Y HUO, W. JIE, 2020. The effect of lactic acid bacteria inoculums on in vitro rumen fermentation, methane production, ruminal cellulolytic bacteria populations and cellulase activities of corn stover silage. *Journal of Integrative Agriculture* [en línea], vol. 19, no. 3, pp. 838-847. ISSN 20953119. DOI 10.1016/S2095-3119(19)62707-3. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62707-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62707-3).

GUAMÁN, L., ZAPATA, S., SERRANO, M. y TRUEBA P., G.A., 2014. Caracterización de las bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados tradicionales del Ecuador. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, vol. 6, no. 1. ISSN 1390-5384. DOI 10.18272/aci.v6i1.155.

HANSEN, J.N., 1993. Antibiotics synthesized by post-translatonal modification. *Microbiol*, vol. 47, pp. 535-564.

HIGUCHI, M., YAMAMOTO, Y. y KAMIO, Y., 2000. Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 90, no. 5, pp. 484-493. ISSN 13891723. DOI 10.1016/S1389-1723(01)80028-1.

HOLK, A.L., AXELSSON, L., BIRKELAND, S., AUKRUST, T. y BLOM, H., 1992. Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Microbiol.*, vol. 138, pp. 2715- 2720.

IGLESIAS, D., OJITO-RAMOS, K., LINARES RIVERO, C. y PORTAL, O., 2017. Actividad antifúngica in vitro de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Stemphyllium solani* Weber In vitro antifungal activity of *Citrus* spp. leaves extracts against *Stemphyllium solani* Weber Revista Centro Agrícola. [en línea], vol. 44, no. 3, pp. 5-12. ISSN 2072-2001. Disponible en: <http://cagricola.uclv.edu.cu>.

ILSI, 2018. *Papel de los Cereales y los Pseudocereales en la Seguridad Alimentaria*. S.l.: s.n.

ISMAL, Y.S., YULVIZAR, C. y MAZHITOV, B., 2018. Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol. 130, no. 1, pp. 0-8. ISSN 17551315. DOI 10.1088/1755-1315/130/1/012019.

JOSE M. LORENZO, PAULO E. MUNEKATA, RUBEN DOMINGUEZ, MIRIAN PATEIRO, JORGE A. SARAIVA AND DANIEL FRANCO (2018). Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall Description in: *Innovative Technologies for Food Preservation, Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms*. Pp 53-107, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>

JOSHI V. y SHARMA, S., 2009. Cider Vinegar: Microbiology, Technology and Quality. *Vinegars of the World*. S.l.: s.n., pp. 197-207.

JUKONYTE, R., ZADEIKE, D., BARTKIENE, E., LELE, V., CERNAUSKAS, D., SUPRONIENE, S. y JUODEIKIENE, G., 2018. A potential of brown rice polish as a substrate for the lactic acid and bioactive compounds production by the lactic acid bacteria newly isolated from cereal-based fermented products. *Lwt* [en línea], vol. 97, no. October 2017, pp. 323-331. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2018.07.012. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.012>.

KHALL, R., MAHROUS, H., EL-HALAFAWY, K., KAMALY, K., FRANK, J. y EL SODA, M., 2007. Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from faeces of breast-fed infants in Egypt. *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no. 7, pp. 935-945. ISSN 16845315. DOI 10.5897/AJB2007.000-2114.

KONG, S. y DAVISON, A.J., 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 204, pp. 18-29.

LATORRE, I. y NAVARRO, C.E.R., 2011. Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel. *Departamento de Química Analítica, Área de Química Analítica*, vol. Especializ, no. TAZ-PFC-2011-285, pp. 56.

LAVERMICOCCA, P., VALERIO, F. y VISCONTI, A., 2003. Antifungal Activity of

Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, vol. 69, no. 1, pp. 634-640. DOI 10.1128/AEM.69.1.634-640.2003.

LINDEBOOM, N., CHANG, P.R., FALK, K.C. y TYLER, R.T., 2005. Characteristics of Starch from Eight Quinoa Lines. *Cereal Chemistry Journal* [en línea], vol. 82, no. 2, pp. 216-222. [Consulta: 21 junio 2020]. ISSN 0009-0352. DOI 10.1094/CC-82-0216. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1094/CC-82-0216>.

LORENZO, J.M., E, PAULO, MUNEKATA RUBEN, D., MIRIAN, P. y JORGE A, SARAIVA DANIEL, F., 2018. Main Groups of Microorganisms of Relevance for Food Safety and Stability: General Aspects and Overall. *Innovative Technologies for Food Preservation, Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms*. S.l.: s.n., pp. 53-107.

LY, M.H., COVARRUBIAS-CERVANTES, M., DURY-BRUN, C., BORDET, S., VOILLEY, A., LE, T.M., BELIN, J.M. y WACHÉ, Y., 2008. Retention of aroma compounds by lactic acid bacteria in model food media. *Food Hydrocolloids*, vol. 22, no. 2, pp. 211-217. ISSN 0268005X. DOI 10.1016/j.foodhyd.2006.11.001.

MA, J., HONG, Y., DENG, L., YI, L. y ZENG, K., 2019. Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum* on citrus. *Biological Control* [en línea], vol. 138, no. July, pp. 104044. ISSN 1049-9644. DOI 10.1016/j.biocontrol.2019.104044. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104044>.

MARCELINO, J., 2013. Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, no. January 2013, pp. 2-22. DOI 10.5772/55937.

MADIGAN, M., MARTINKO, J., BENDER, K. y BUCKLEY, D., 2015. *Biología de los microorganismos*. catorceava. España: pearson educación, S.A.

MAGUSSON., J., B, K.S.S.R.J.S. y SCHNURER., J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, vol. 129135, pp. 129.

M.A.GVRILOVA, G.B.SLEPCHENKO, E.V.MIKHEEVA y V.I.DERYBINA, 2014.

Voltammetric Determination of Aflatoxin B1. *Procedia Chemistry*, vol. 10, pp. 114 – 119.

MANI, F., CASIRAGHI, M.C., POUTANEN, K., BRASCA, M., ERBA, D. y PLUMED-FERRER, C., 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], vol. 66, pp. 275-283. ISSN 00236438. DOI 10.1016/j.lwt.2015.10.045. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>

MARNEZ, J.A., 2000. Cereales y Derivados. *Alimentos: Composición y Propiedades*. Primera. Madrid: McGraw Hill-Interamericana de España, pp. 136-141. ISBN 8448603052.

MATZ, J., BARTOK, T., MOROCZ-SALAMON, K. y BONA, L., 2000. Structure and potential allergenic character of cereal proteins I. Protein content and amino acid composition. *Cereal Research Communications* [en línea], vol. 28, no. 3, pp. 263-270. [Consulta: 21 junio 2020]. ISSN 01333720. DOI 10.1007/bf03543603. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03543603>.

MDRT-BOLIVIA, 2009. Informe Agroalimentario. S.l.:

MEYHUAY, M., 1997. QUINUA Operaciones de Postcosecha-Compendio de Postcosecha. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)* [en línea]. S.l.: [Consulta: 10 noviembre 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ar364s.pdf>.

MILLS, S., STANTON, C., FITZGERALD, G.F. y ROSS, R.P., 2011. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microbial Cell Factories*, vol. 10, no. SUPPL. 1, pp. 1-15. ISSN 14752859. DOI 10.1186/1475-2859-10-S1-S19.

MIRABILE, G., BELLA, P., CONIGLIARO, G., GIAMBRA, S., ALBERTO VAZQUEZ, M., DAVINO, S. y TORTA, L., 2019. Fungal contaminants in Sicilian livestock feeds and first studies on the enzymatic activity of *Aspergillus* isolates. *Cuban Journal of Agricultural Science*, vol. 53, no. 4, pp. 373-386. ISSN 2079-3480.

MUJICA, A., IZQUIERDO, J. y MARATHE, J., 2014. *Cultivos Andinos FAO - INTRODUCCIÓN* [en línea]. 2014. S.l.: s.n. [Consulta: 15 noviembre 2020]. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdro m/contenido/libro14/cap2.4.htm.

NAYAR, A.S., DOUGHERTY, T.J., FERGUSON, K.E., GRANGER, B.A.,

MCWILLIAMS, L., STACEY, C., LEACH, L.J., NARITA, S. ICHIRO, TOKUDA, H., MILLER, A.A., BROWN, D.G. Y MCLEOD, S.M., 2015. Novel antibacterial targets and compounds revealed by a high-throughput cell wall reporter assay. *Journal of Bacteriology*, vol. 197, no. 10, pp. 1726-1734. ISSN 10985530. DOI 10.1128/JB.02552-14.

NIETO, C; VIMOS, C., 1994. Producción y Procesamiento de Quinoa en Ecuador. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP; Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, CIID* [en línea]. Quito: [Consulta: 15 noviembre 2020]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2882/1/iniapsc16172o.pdf>.

OJURI, O.T., EZEKIEL, C.N., ESKOLA, M.K., ŠARKANJ, B., BABALOLA, A.D., SULYOK, M., HAJŠLOVÁ, J., ELLIOTT, C.T. y KRŠKA, R., 2019. Mycotoxin co-exposures in infants and young children consuming household- and industrially processed complementary foods in Nigeria and risk management advice. *Food Control* [en línea], vol. 98, no. November 2018, pp. 312-322. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2018.11.049. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.049>.

OLDAK, A. y ZIELIŃSKA, D., 2017. Bacteriocins from lactic acid bacteria as an alternative to antibiotics. *Postepy higieny i medicine doswiadczalnej (Online)*, vol. 71, pp. 328-338. ISSN 17322693. DOI 10.5604/01.3001.0010.3817.

OLIVEIRA, P.M., BROSAN, B., FUREY, A., COFFEY, A., ZANNINI, E. y ARENDT, E.K., 2015. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: Strain characterization and identification of antifungal compounds. *Food Control* [en línea], vol. 51, pp. 433-443. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2014.07.004. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.004>.

OMS | Datos y cifras sobre las enfermedades de transmisión alimentaria. *WHO* [en línea], 2016. [Consulta: 5 noviembre 2019]. Disponible en: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/es/.

PAPPIER, U., FERNÁNDEZ PINTO, V., LARUMBE, G. y VAAMONDE, G., 2008. Effect of processing for saponin removal on fungal contamination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125, pp. 153–157.

PAREDES-LOPEZ, O. y ROBERT, B., 2018. Amaranth Oil: Composition, Processing, and Nutritional Qualities. *Amaranth Biology, Chemistry, and Technology* [en línea]. S.l.: CRC Press, pp. 133-141. [Consulta: 21 junio 2020]. Disponible en: <https://www.taylorfrancis.com/>.

PAWLOWSKA, A.M., ZANNINI, E., COFFEY, A. y ARENDT, E.K., 2012. «Green Preservatives»: Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria [en línea]. 1. S.l.: Elsevier Inc. ISBN 9780123945976. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>.

PARK, M.S., LEE, S., OH, S.Y., CHO, G.Y. y LIM, Y.W., 2016. Diversity and enzyme activity of *Penicillium* species associated with macroalgae in Jeju Island. *Journal of Microbiology*, vol. 54, no. 10, pp. 646-654. ISSN 19763794. DOI 10.1007/s12275-016-6324-0.

PARRA HUERTAS, R., 2010. Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, vol. 8, no. 1, pp. 93-105. ISSN 1909-9959.

PEBERDY, J., 1987. *Penicillium and Acremonium* [en línea]. 1. Boston, MA: Springer US. ISBN 978-1-4899-1988-5. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4899-1986-1>.

PERUSIA, O.R. y FUNICULOSUM, P., 2001. Micotoxicosis 1. *Rev Inv Vet Perú*, vol. 12, no. 2, pp. 87-116.

PELIAOVA, J., LIPTAKOVA, D., VALÍK, L., & STANČEKOVÁ, K., 2011. Evaluation of the growth of selected lactobacilli in pseudocereal substrate. *Potravinarstvo*, pp. 4, 53– 57.

PESCUMA, M., HÉBERT, E.M., MOZZI, F. y FONT DE VALDEZ, G., 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food microbiology*, vol. 25, no. 3, pp. 442-451. ISSN 1095-9998 (Electronic). DOI 10.1016/j.fm.2008.01.007.

PORTA TECNO AGRICOLA, [sin fecha]. Vademecum: Tebuconazol. 2020.

PRADEEP, K., KUTTAPPA, M. y PRASANA, K., 2014. Probiotics and oral health. *Clinical Review*, vol. 69, pp. 14-20.

PROSSER, J.I. y TOUGH, A.J., 1991. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical reviews in biotechnology*, vol. 10, no. 4, pp. 253-274. ISSN 0738-8551 (Print). DOI 10.3109/07388559109038211.

QIAN, J. y KUHN, M., 1999. Characterization of *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium*

quinoa Starch. *Starch - Stärke* [en línea], vol. 51, no. 4, pp. 116-120. [Consulta: 21 junio 2020]. ISSN 1521-379X. DOI 10.1002/(SICI)1521-379X(199904)51:4116::AID-STAR116>3.0.CO;2-R. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/%28SICI%291521-.379X%28199904%2951%3A4%3C116%3A%3AAID-STAR116%3E3.0.CO%3B2-R>.

QUIRUGA, C; ESCALERA, R; ARONI, G; BONIFACIO, A; GONZALES, J; VILLCA, M; SARAVIA, R; RUIZ, A., 2014. Procesos tradicionales e innovaciones tecnológicas en la cosecha, beneficiado e industrialización de la quinoa. En: D. BAZILE (ed.), *Estado del arte de la quinua en el mundo 2013*. Santiago de Chile, Montpellier: FAO; CIRAD, pp. 258-296. ISBN 9789253085583.

RAMOS-DIAZ, J.M., SULYOK, M., JACOBSEN, S.E., JOUPPILA, K. y NATHANAIL, A. V., 2021. Comparative study of mycotoxin occurrence in Andean and cereal grains cultivated in South America and North Europe. *Food Control* [en línea], vol. 130, no. May, pp. 108260. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2021.108260. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108260>.

RAY, R.C., STUDIES, E. y JOSHI, V., 2014. Fermented Foods: Past, Present and Future, no. November. DOI 10.13140/2.1.1849.8241.

RAY, S., U.R. y R.C., 2016. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology, . *Food Biosci*, pp. 13, 76-83.

RAVELO ABREU, A. ET AL. (2011) ‘La ocratoxina a en alimentos de consumo humano: Revisión’, *Nutricion Hospitalaria*, 26(6), pp. 1215–1226. doi: 10.3305/nh.2011.26.6.5381.

REIS, J.A., PAULA, A.T., CASAROTTI, S.N. y PENNA, A.L.B., 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, vol. 4, no. 2, pp. 124-140. ISSN 18667910. DOI 10.1007/s12393-012-9051-2.

RICHARD, J.L., 2009. Some major mycotoxins and their mycotoxicosis - an overview. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 1-2, pp. 3-10.

RUALES, J. y NAIR, B.M., 1992. Nutritional quality of the protein in quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* [en línea], vol. 42, no. 1, pp. 1-11. [Consulta: 21 junio 2020]. ISSN 09219668. DOI 10.1007/BF02196067. Disponible en:

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02196067>.

SAMSON, R.A., VISAGIE, C.M., HOUBRAKEN, J., HONG, S.-B., HUBKA, V., KLAASSEN, C.H.W., PERRONE, G., SEIFERT, K.A., SUSCA, A., TANNEY, J.B., VARGA, J., KOCSUBÉ, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T. y FRISVAD., J.C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studios in Mycology*, vol. 78, pp. 141-173. DOI 10.1016/j.simyco.2014.07.004.

SAVADOGO, A., 2006. Bacteriocinas y bacterias ácido lácticas. *Biotechnology*, vol. 5, pp. 668-673.

SCHNÜRER, J. y MAGNUSSON, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Food Sci Technol*, vol. 16, pp. 70–78.

SHANKAR, I. y USHAR, A., 2021. Probiotic microorganisms from non-dairy traditional fermented foods. *Trends in food science and Technology*. Trends in food science and Technology.

SIEDLER, S., BALTI, R. y NEVES, A.R., 2019. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology* [en línea], vol. 56, pp. 138-146. ISSN 18790429. DOI 10.1016/j.copbio.2018.11.015. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>.

SIEDLER, S., BALTI, R. y NEVES, A.R., 2019. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology* [en línea], vol. 56, pp. 138-146. ISSN 18790429. DOI 10.1016/j.copbio.2018.11.015. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>.

SJÖGREN, J., MAGNUSSON, J., BROBERG, A., SCHNÜRER, J. y KENNE, L., 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, no. 12, pp. 7554-7557. ISSN 0099-2240 (Print). DOI 10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003.

SKLENAR, F., JURJEVIC, Z., ZALAR, P., FRISVAD, J., VISAGIE, C., KOLARÍK, J., HOUBRAKEN, J., CHEN, A., YILMAZ, N., SEIFERT, A., COTON, M., DENIEL, F., GUNDE-CIMERMAN, N., SAMSON, R., PETERSON, S. y HUBKA, V., 2017. Phylogeny of xerophilic aspergilli (subgenus *Aspergillus*) and taxonomic revision of section *Restricti*.

SNEYDER, R.B., GIRALDO, G.I. y MONTES, L.M., 2016. Encapsulación De Alimentos Probióticos Mediante Liofilización En Presencia De Prebióticos. *Informacion Tecnologica*, vol. 27, no. 6, pp. 135-144. ISSN 07180764. DOI 10.4067/S0718-07642016000600014.

SNIJDERS, J.M., VAN LOGTESTIJN, J.G. y MOSSEL, D. A. A. SMULDERS, F., 1985. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly*, vol. 7, pp. 277-282.
SOLÍS, C.A., 2015. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Revista de Ciencias Veterinarias*, vol. 33, no. 1, pp. 7-31.

SOCIETY, M. (2021) *Observing Bacteria in a Petri Dish* . Available at: <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/bacteria/observing-bacteria-in-a-petri-dish.html>

SOLÍS, C.A., 2015. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Revista de Ciencias Veterinarias*, vol. 33, no. 1, pp. 7-31.

STRASSER, S., NEUREITER M., M. GEPPL, R.B. y H.D., 2009. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *Microbiol*, pp. 107, 167- 177,.

STRÖM, K., SJÖGREN, J., BROBERG, A. y SCHNÜRER, J., 2002. Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 9, pp. 3-6. ISSN 00992240. DOI 10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002.

SUN, Z., YU, J., DAN, T., ZHANG, W. y ZHANG, H., 2008. Lactic Acid Bacteria. S.l.: s.n. ISBN 9783527620821.

TAMANG, J.P., 2010. *Himalayan Fermented Foods: Microbiology, Nutrition, and Ethnic values*. 1. S.l.: CRC Press. ISBN ISBN 9780367385316.

TAMANG, J.P., THAPA, N., TAMANG, B., RAI, A. y CHETTRI, R., 2015. Microorganisms in fermented foods and beverages. *Health Benefits of Fermented Foods and Beverages*, pp. 1-110. DOI 10.1201/b18279.

ÜNÜSAN, N., 2019. Systematic review of mycotoxins in food and feeds in Turkey. *Food Control*

[en línea], vol. 97, no. October 2018, pp. 1-14. ISSN 09567135. DOI 10.1016/j.foodcont.2018.10.015. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.015>.

USDA, 2020. Resultados de Búsqueda de Glosario | NAL Agricultural Thesaurus and Glossary. [en línea]. [Consulta: 3 noviembre 2020]. Disponible en: <https://agclass.nal.usda.gov/mtwdk.exe?k=glosses&l=91&w=11936&s=5&t=2>.

VACA, D.M.G., 2013. *Aislamiento y Evaluacion de Bacterias Acido LActicas con capacidad antagonica a aprtir de productos carnicos madurados artesanalmente*. S.l.: s.n.

VALERIO, F., FAVILLA, M., DE BELLIS, P., SISTO, A., DE CANDIA, S. y LAVERMICOCCA, P., 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 32, no. 6, pp. 438-448. ISSN 07232020. DOI 10.1016/j.syapm.2009.01.004.

VÁSQUEZ M., S.M., SUÁREZ M., H. y ZAPATA B., S., 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutricion*, vol. 36, no. 1, pp. 64-71. ISSN 07177518.

VEGA-GALVEZ, A., MIRANDA, M., VERGARA, J., URIBE, E., DÍAZ, L. y MARTÍNEZ, E., 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: A review. *Journal of the science of food and agriculture*, vol. 90, pp. 2541-2547. DOI 10.1002/jsfa.4158.

WANG, C., CUI, Y. y QU, X., 2018. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology* [en línea], vol. 200, no. 2, pp. 195-201. ISSN 1432072X. DOI 10.1007/s00203-017-1446-2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>.

W.A., A., B.M., P., L.A., J. y R.W., G., 1983. *Characterization of quinoa starch [Chenopodium quinoa, cereal crop, nutritive value, protein]*. 1983. S.l.: s.n.




VISAGIE, C.M., HOUBRAKEN, J., FRISVAD, J.C., HONG, S.B., KLAASSEN, C.H.W., PERRONE, G., SEIFERT, K.A., VARGA, J., YAGUCHI, T. y SAMSON, R.A., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* [en línea], vol. 78, no. 1, pp. 343-371. ISSN 01660616. DOI 10.1016/j.simyco.2014.09.001. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>.

VISAGIE, C., YILMAZ, N. y RENAUD, J., 2017. A survey of xerophilic *Aspergillus* from indoor environment, including descriptions of two new section *Aspergillus* species producing eurotium-like sexual states. *Mycology Keys*, vol. 19, pp. 1-30.


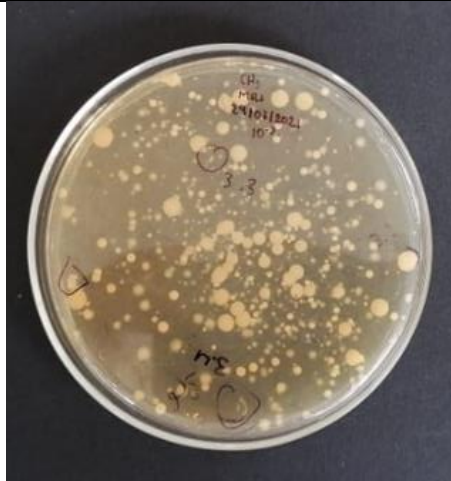

WILLEY, J.M., PRESCOTT. L.M., 2009. Microbiología. McGraw-Hill Interamericana de España, pp: 1088.

ANEXOS




ANEXO A: AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE ALIMENTOS FERMENTADOS

Diluciones Duodecimales	Selección de la colonia	Técnica de siembra por agotamiento
		

ANEXO B: PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

Diluciones Duodecimales	Selección de la colonia	Técnica de siembra por agotamiento
		

ANEXO C: AISLAMIENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS DE ALIMENTOS FERMENTADOS

Diluciones Duodecimales	Selección de la colonia	Técnica de siembra por agotamiento
		

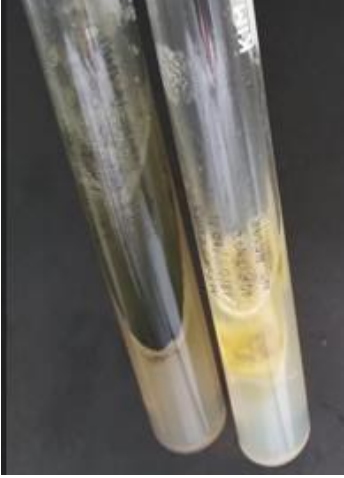
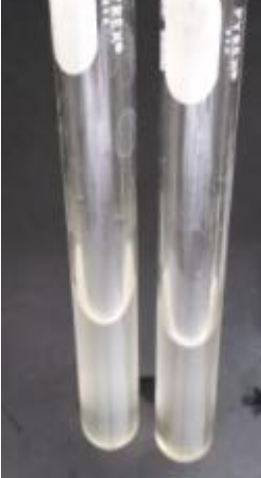
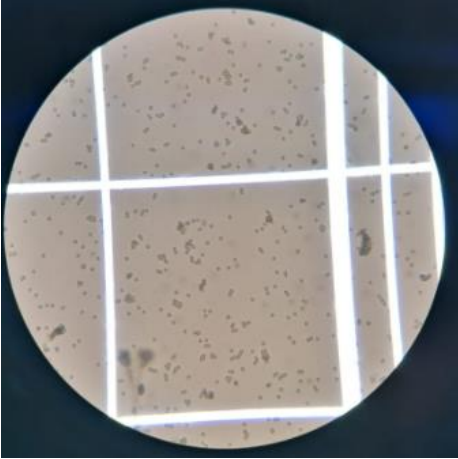
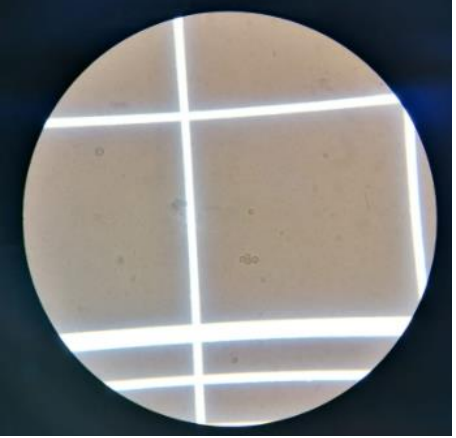
ANEXO D: PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

MUESTRA	CODIGO	CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS PURIFICADAS DE ALIMENTOS FERMENTADOS								
		TAMAÑO (cm)	FORMA	COLOR	BORDE	OLOR	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	ASPECTO	HALO
PICKLES	PK1,1	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR: CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO	si
	PK 1,2	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR: CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO	si
	PK 2,1	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR: CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO	si
	PK 2,2	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR: CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO	si
	PK 4,1	0,2	ELEVADA PLANA	BLANCO	REGULAR: CONTINUO	LÁCTICO	LISA	COMPACTO	CREMOSO	si
CHICHA	CH 2,1	0,1	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	IRREGULAR LOBULADO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLOSO	SI
	CH 2,2	0,1	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	BRILLANTE	SI
	CH 2,5	0,1	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLOSO	SI
	CH 3,1	0,2	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	BRILLANTE	NO
	CH 3,3	0,1	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	BRILLANTE	SI
	CH 4,1	0,1	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	IRREGULAR LOBULADO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	BRILLANTE	SI
	CH 4,3	0,1	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLOSO	SI
	CH 4,4	0,2	ELEVADO CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLOSO	SI
QUE	QF 2.1	<0,1	ELVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLOSO	SI

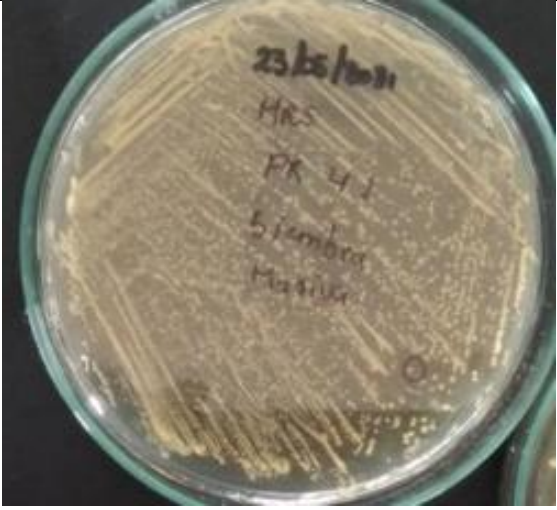
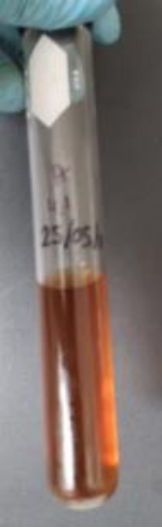
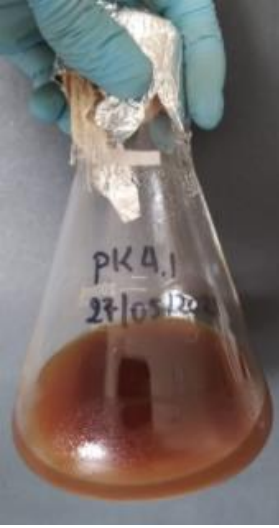

	QF 2.2	0,1	ELVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 2.4	<0,1	ELVADA CONVEXA	CREMA	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 2.5	<0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 3.1	<0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	SEMILOBULADA	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 3.2	<0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 4.3	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 4.4	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 4.5	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 5.1	0,2	PLANA CONVEXA	BLAQUECINO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	SEMIRUGOSA	SEMIBLANDA	CREMOSO	NO
	QF 5.2	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	CONVEXA	BLANDA	CREMOSO	NO
	QF 5.3	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	CONVEXA	BLANDA	CREMOSO	NO
	QF 5.4	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	QF 5.5	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
SUERO LÁCTEO	SL 1.1	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	SL 2.1	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	SL 2.2	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	SL 4.1	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	SL 4.2	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
	SL 5.1	<0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
M U E	KU 1.1	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI

KU 1.2	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
MF 1.2	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
MF 1.3	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
MF 2.1	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
MF 2.2	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
MF 2.3	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
TM81 (2.1)	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
TM81 (2.2)	0,2	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI
TM81 (2.3)	0,1	ELEVADA CONVEXA	BLANCO	REGULAR CONTINUO	LÁCTICO	LISA	BLANDA	CREMOSO BRILLANTE	SI

ANEXO E: CONTEO DE ESPORAS DE LOS HONGOS AISLADOS Y PURIFICADOS EN CÁMARA DE NEUBAUER.

Suspensión de esporas con Tween 0,1 %	Dilución de la suspensión de esporas	Conteo en cámara de Neubauer <i>Penicillium</i>	Conteo en cámara de Neubauer <i>Aspergillus</i>
			

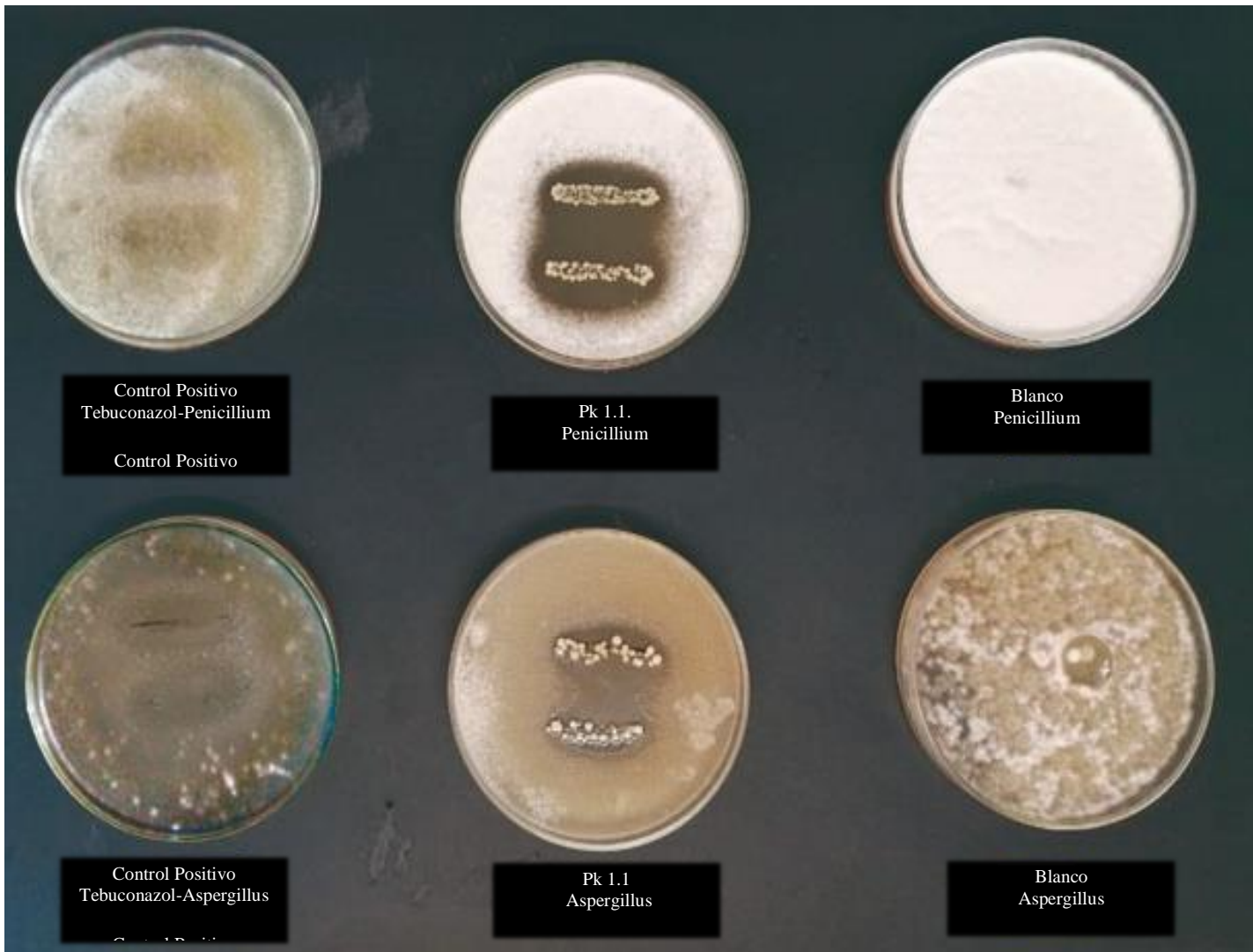
ANEXO F: ENSAYO DE ANTAGONISMO DE LAS BAL SOBRE *PENICILLIUM* SP Y *ASPERGILLUS* SP

Siembra Masiva de BAL	Inoculación en 20 ml de caldo MRS	Inoculación en 100 ml de caldo MRS	Ensayo de antagonismo
			

ANEXO G: ANTAGONISMO DE CONTROL POSITIVO TEBUCONAZOL, BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS Y BLANCO EN *ASPERGILLUS* SP Y *PENICILLIUM* SP.



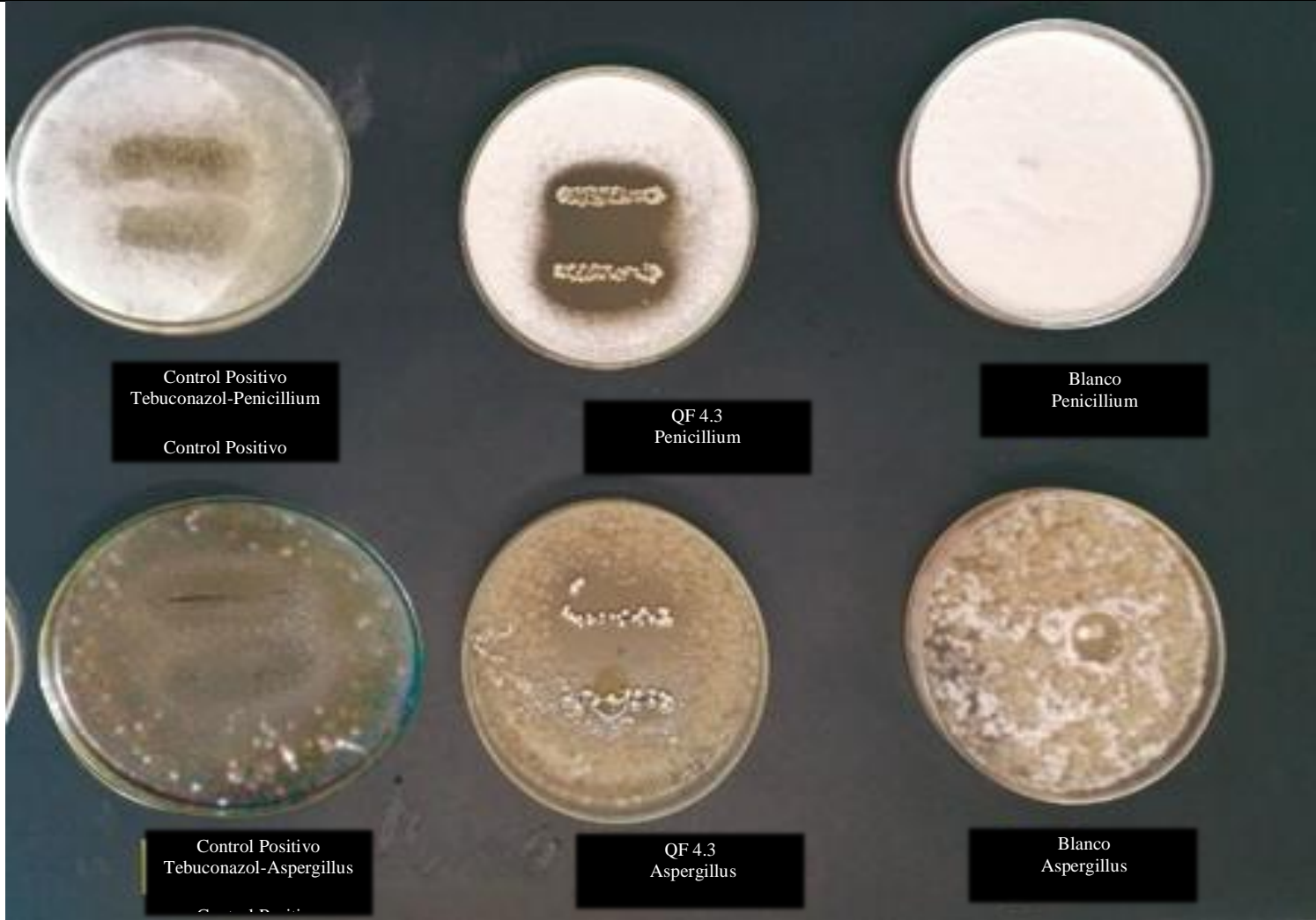
PICKLES



CHICHA



QUESO CON CULTIVO LÁCTEO



SUERO LÁCTEO



Control Positivo
Tebuconazol-Penicillium



SL 1.1
Penicillium



Blanco
Penicillium



Control Positivo
Tebuconazol-Aspergillus

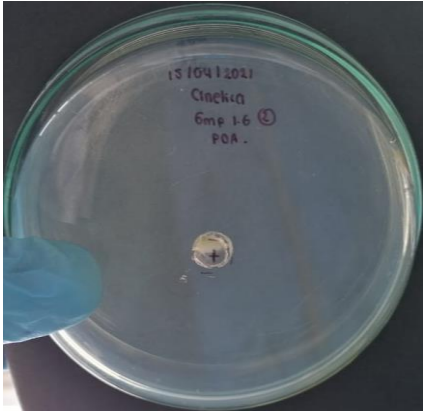
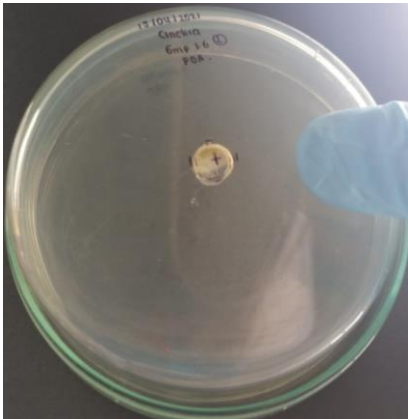
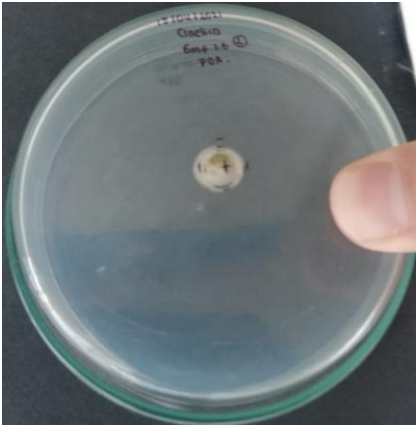
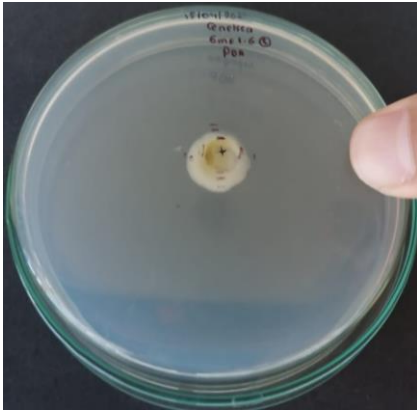
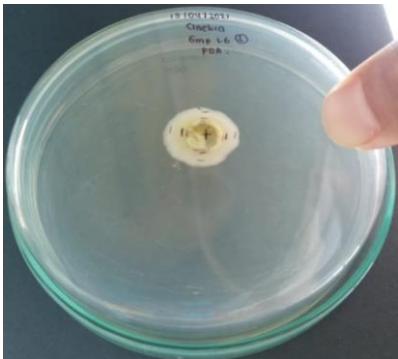
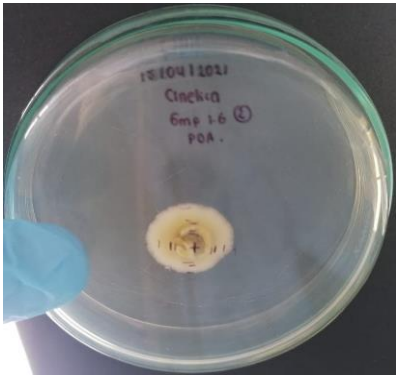



SL 1.1
Aspergillus

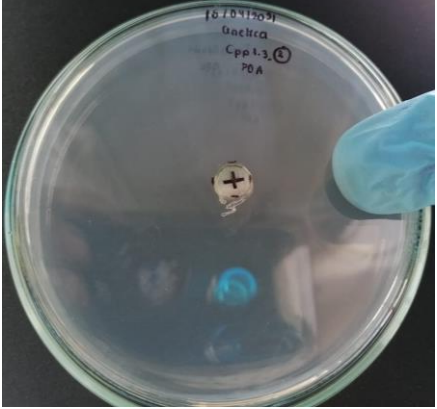
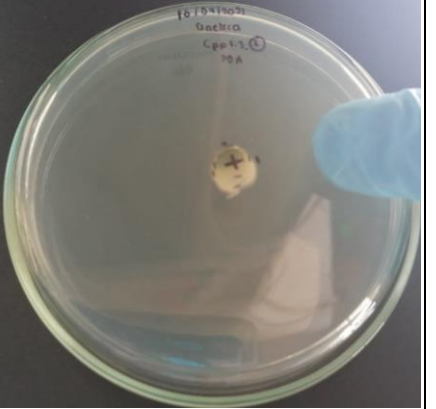







Blanco
Aspergillus

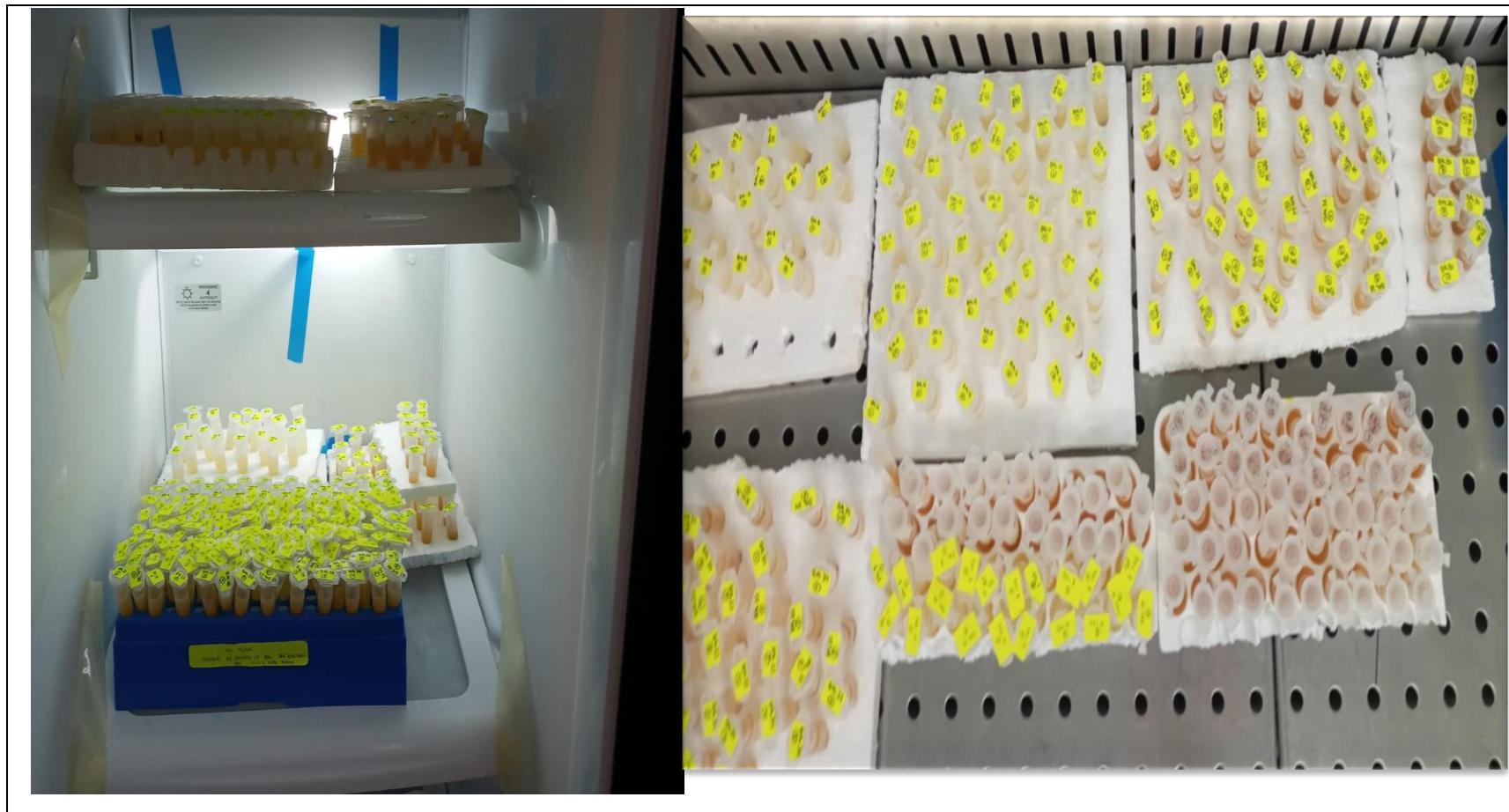
ANEXO H: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS SP* EN AGAR PDA MEDIANTE MEDICIÓN DE MICELIO.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE <i>Aspergillus sp</i>			
DIA 1: 15/04/2021	DIA 2: 16/04/2021	DIA 3: 17/04/2021	DIA 4: 18/04/2021
			
DIA 5: 19/04/2021	DIA 6: 20/04/2021	DIA 7: 21/04/2021	
			

ANEXO I: CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *PENICILLIUM* SP EN AGAR PDA MEDIANTE MEDICIÓN DE MICELIO

CINETICA DE CRECIMIENTO <i>Penicillium</i> sp			
DIA 1: 15/04/2021	DIA 2: 16/04/2021	DIA 3: 17/04/2021	DIA 4: 18/04/2021
			
DIA 5: 19/04/2021	DIA 6: 20/04/2021	DIA 7: 21/04/2021	
			

ANEXO J: BANCO DE CEPAS DE BAL CRIO PRESERVADAS EN GLICEROL AL 30%



ANEXO H: AUTORIZACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

**DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 07 / 09 / 2021

INFORMACION DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Liseth Verónica Andino Gualpa Fausto Rene Guasgua Mipaz</i>
INFORMACION INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Bioquímica y Farmacia</i>
Título a optar: <i>Bioquímico Farmacéutico</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>



1854-DBRA-UTP-2021