



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO  
LÁCTICAS EN UN FERMENTADO LÁCTICO DE GRANOS  
GERMINADOS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) PARA  
POTENCIALES APLICACIONES**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** LOURDES LILIANA CHISAG TOALA

**DIRECTORA:** Dra. JANNETH MARÍA GALLEGOS NUÑEZ PhD.

Riobamba – Ecuador

2022

**©2022, Lourdes Liliana Chisag Toala**

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.

Yo, LOURDES LILIANA CHISAG TOALA, declaro que el presente trabajo de integración curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de integración curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 03 de mayo del 2022.


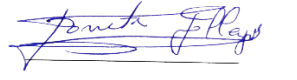



**Lourdes Liliana Chisag Toala**

**C.I. 180415577-6**

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

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Trabajo Experimental, **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN UN FERMENTADO LÁCTICO DE GRANOS GERMINADOS DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) PARA POTENCIALES APLICACIONES**, realizado por la señorita: **LOURDES LILIANA CHISAG TOALA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Bqf. Adriana Isabel Rodríguez Basantes Mgs. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>	 _____	2022-05-03
Dra. Janneth María Gallegos Núñez PhD. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>	 _____	2022-05-03
Dr. Galo Alberto Insuasti Castelo MSc. <b>MIEMBRO DEL TRIBUNAL</b>	 _____	2022-05-03

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo de titulación va dedicado a mi mami Cenaida Toala que está en el cielo, que gracias a ella empecé este largo viaje que ha sido la vida estudiantil, no necesariamente porque fue una mujer preparada sino porque me mostró que a pesar de nuestros recursos éramos capaces de lograr lo que nos proponíamos en la vida, a mi papi Daniel Chisag que a pesar de su ardua lucha con la enfermedad de Parkinson a estado velando por mí y además de constituirse en el motor fundamental para lograr uno de mis sueños que es ser profesional.

La vida puso en mi camino a una persona que se ha convertido en mi familia, amigo, hermano y apoyo incondicional mi esposo Fredy, le dedico este que para muchos será un pequeño esfuerzo, pero para mí significó lágrimas y ahí estuvo para salvarme cuando sentí que ya no lo iba a lograr. A mis hermanos, Blanky, Chayán, Jamel, Gladys, Silvia que a pesar de que no los vea seguido los amo y los atesoro siempre, mi hermana Marcia que siempre ha sido mi guía y mi apoyo, y a mi ñaño Rolando que es el que he compartido más tiempo, y más vivencias, los amo a todos.

A Sandrita, Pauly, Sandy mis hermanas de corazón, mi sobrina Sheccid gracias por compartir parte de esta etapa, mis amigas, Less, Joha, Meli y Jacque. A mis roomies y bffas Michelle, Yesy, Daya y Sandy Lu.

*Liliana*

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer en primer lugar a Dios por hacerme fuerte cuando lo necesité, por darme sabiduría y entendimiento para sacar adelante la carrera, estoy inmensamente agradecida porque estoy consciente que cada en paso que di él estuvo sosteniendo mi mano, ahora que está por terminar una de las etapas con mayores cambios en mi vida se me vienen los recuerdos de los días más tristes y oscuros que pasé, se me llenan los ojos de lágrimas porque para mí si es un gran logro estar en este lugar, aquí y ahora.

*Liliana*

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
SUMMARY.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3

## CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Quinoa.....	5
1.2.1. <i>Proteínas</i> .....	7
1.2.2. <i>Grasas</i> .....	8
1.2.3. <i>Carbohidratos</i> .....	9
1.2.4. <i>Minerales</i> .....	9
1.2.5. <i>Vitaminas</i> .....	10
1.2.6. <i>Compuestos bioactivos y antioxidantes</i> .....	10
1.2.7. <i>Proceso de germinación</i> .....	11
1.2.8. <i>Conservación de la semilla de quinoa</i> .....	12
1.3. <i>Ácido láctico</i> .....	12
1.3.1. <i>Métodos de identificación</i> .....	13
1.3.1.1. <i>Métodos de tipos gravimétrico y colorimétrico</i> .....	13
1.3.1.2. <i>Métodos enzimáticos</i> .....	13
1.3.1.3. <i>Otros métodos de identificación</i> .....	14
1.3.2. <i>Fermentación láctica</i> .....	14
1.4. <i>Bacterias ácido lácticas</i> .....	15
1.4.1. <i>Bacterias ácido lácticas homofermentativas</i> .....	15
1.4.2. <i>Bacterias ácido lácticas heterofermentativas</i> .....	16
1.4.3. <i>Caracterización bioquímica</i> .....	18
1.4.3.1. <i>Tinción GRAM</i> .....	18

1.4.3.2.	<i>Prueba de catalasa y oxidasa</i> .....	18
1.4.4.	<i>Métodos de conservación de cepas</i> .....	19
1.4.4.1.	<i>Refrigeración</i> .....	19
1.4.4.2.	<i>Congelación</i> .....	19
1.4.4.3.	<i>Deshidratación</i> .....	20

## CAPÍTULO II

2.	<b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	21
2.1.	<b>Localización del estudio</b> .....	21
2.2.	<b>Población estudio</b> .....	21
2.3.	<b>Materiales, equipos y reactivos</b> .....	21
2.3.1.	<i>Muestra experimental</i> .....	21
2.3.2.	<i>Materiales, equipos y reactivos</i> .....	22
2.4.	<b>Métodos y técnicas</b> .....	24
2.4.1.	<i>Proceso para germinación de granos de quinua nativa</i> .....	24
2.4.1.1.	<i>Procedimiento de humectación de granos de quinua para germinación</i> .....	25
2.4.1.2.	<i>Procedimiento de humectación de gasa</i> .....	26
2.4.1.3.	<i>Procedimiento para preparación del papel filtro</i> .....	27
2.4.2.	<i>Proceso de fermentación de granos de quinua germinada según el mejor tratamiento</i> .....	29
2.4.3.	<i>Proceso de cultivo de bacterias ácido lácticas de los cinco ensayos de fermentación</i> .....	30
2.4.3.1.	<i>Procedimiento para el recuento de bacterias ácido lácticas</i> .....	31
2.4.3.2.	<i>Procedimiento para aislamiento, identificación y caracterización de BAL</i> .....	32
2.4.3.3.	<i>Procedimiento para conservación de BAL</i> .....	33
2.5.	<b>Análisis estadístico</b> .....	34

## CAPÍTULO III

3.	<b>MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	35
3.1.	<b>Definición del proceso de germinación del grano de quinua nativa</b> .....	35
3.1.1.	<i>Porcentaje de germinados totales y germinados con radícula mayor a 0,5 cm</i> .....	35
3.1.2.	<i>Análisis estadístico</i> .....	36
3.1.2.1.	<i>Análisis de varianza de porcentajes de germinados totales y germinados con radícula mayor a 0,5 cm.</i> .....	36



3.1.2.2.	<i>Prueba de Tukey para germinados totales</i> .....	37
3.1.2.3.	<i>Prueba de Tukey para germinados con radícula mayor a 0,5 cm</i> .....	37
3.2.	<b>Proceso de fermentación establecido.</b> .....	38
3.1.3.	<b>Resultados de acidez titulable</b> .....	39
3.1.4.	<b>Análisis estadístico</b> .....	41
3.1.4.1.	<i>Análisis de varianza</i> .....	41
3.1.4.2.	<i>Prueba de tukey</i> .....	41
3.1.5.	<b>Resultados de pH</b> .....	43
3.1.6.	<b>Análisis estadístico</b> .....	45
3.1.6.1.	<i>Análisis de varianza</i> .....	45
3.1.6.2.	<i>Prueba de tukey</i> .....	45
3.2.1.	<b>Resultados de azúcares totales</b> .....	47
3.1.7.	<b>Análisis estadístico</b> .....	48
3.1.7.1.	<i>Análisis de varianza</i> .....	48
3.1.7.2.	<i>Prueba de tukey</i> .....	49
3.2.	<b>Resultados del recuento de BAL (log UFC/mL)</b> .....	50
3.2.1.	<b>Análisis estadístico</b> .....	51
3.2.1.1.	<i>Análisis de varianza</i> .....	51
3.2.1.2.	<i>Prueba de tukey</i> .....	51
3.3.	<b>Resultados del proceso cultivo de BAL en el fermentado optimizado</b> .....	53
3.3.1.	<i>Aislamiento e identificación de BAL obtenidas</i> .....	53
3.3.2.	<i>Elaboración de un banco de cepas de BAL</i> .....	55
<b>CONCLUSIONES</b> .....		56
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		57
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Mayores productores de quinua a nivel mundial. ....	6
<b>Tabla 2-1:</b> Características fisicoquímicas de la quinua. ....	7
<b>Tabla 3-1:</b> Aminoácidos y proteínas de quinua para adultos. ....	8
<b>Tabla 4-1:</b> Ácidos grasos esenciales de cereales comparados. ....	8
<b>Tabla 5-1:</b> Minerales de la quinua. ....	9
<b>Tabla 6-1:</b> Vitaminas de la quinua. ....	10
<b>Tabla 7-1:</b> Uso de BAL por tipo de alimentos. ....	17
<b>Tabla 8-1:</b> Estrés de las BAL. ....	17
<b>Tabla 1-2:</b> Materiales, equipos y reactivos. ....	22
<b>Tabla 2-2:</b> Factores – germinación. ....	27
<b>Tabla 3-2:</b> Tratamientos – germinación. ....	28
<b>Tabla 4-2:</b> Factores – fermentación. ....	30
<b>Tabla 5-2:</b> Tratamientos – fermentación. ....	30
<b>Tabla 1-3:</b> Resultados porcentuales de germinación, a tres temperaturas (10 °C, 20 °C y 35 °C) por 72 horas. ....	35
<b>Tabla 2-3:</b> Análisis de varianza para porcentajes de germinación total de granos de quinua y germinación de radícula con longitud mayor a 0.5 cm por 72 horas a 3 temperaturas. ....	36
<b>Tabla 3-3:</b> Prueba de Tukey (al 5%) para comparar la germinación promedio a tres temperaturas del porcentaje de granos germinados totales. ....	37
<b>Tabla 4-3:</b> Prueba de Tukey (al 5 %) de la germinación promedio del porcentaje de granos germinados con longitud de radícula mayor a 0.5 cm en 72 horas a 3 temperaturas. ....	37
<b>Tabla 5-3:</b> Porcentajes de acidez titulable en fermentados de granos germinados de quinua, a 37 °C sin glucosa y con glucosa en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h). ....	39
<b>Tabla 6-3:</b> Promedios porcentuales de acidez titulable a cinco tiempos. ....	39
<b>Tabla 7-3:</b> Análisis de varianza de la concentración de acidez en fermentados de granos germinados de quinua, sin y con glucosa a 37 °C. ....	41
<b>Tabla 8-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de acidez en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C. ....	41
<b>Tabla 9-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de acidez en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C. ....	42

<b>Tabla 10-3:</b> Resultados de pH, de fermentados sin glucosa y con glucosa a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.....	43
<b>Tabla 11-3:</b> Promedios de pH en cinco tiempos a 37 °C. ....	43
<b>Tabla 12-3:</b> Análisis de varianza del pH en fermentados de granos germinados de quinua, sin y con glucosa a 37 °C. ....	45
<b>Tabla 13-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para pH en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C. ....	45
<b>Tabla 14-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para pH en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C. ....	46
<b>Tabla 15-3:</b> Resultados porcentuales de azúcares totales para fermentados sin glucosa y con glucosa en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C. ....	47
<b>Tabla 16-3:</b> Promedios porcentuales de azúcares totales en cinco tiempos a 37 °C. ....	47
<b>Tabla 17-3:</b> Análisis de varianza de porcentajes de azúcares <i>totales</i> en fermentados de granos germinados de quinua, sin y con glucosa a 37 °C. ....	48
<b>Tabla 18-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de azúcares totales en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C. ....	49
<b>Tabla 19-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de azúcares totales en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C. ....	49
<b>Tabla 20-3:</b> Resultados del recuento de BAL (log UFC/mL) para fermentados sin glucosa y con glucosa en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C. ....	50
<b>Tabla 21-3:</b> Promedio del recuento de BAL (log UFC/mL) en cinco tiempos a 37 °C. ....	50
<b>Tabla 22-3:</b> Análisis de varianza para las BAL cuantificadas (log UFC/mL) en fermentados de granos germinados de quinua (sin glucosa y con glucosa). ....	51
<b>Tabla 23-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para cantidad de BAL en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37 °C. ....	51
<b>Tabla 24-3:</b> Prueba de tukey (al 5%), para cantidad de BAL en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37 °C. ....	52
<b>Tabla 25-3:</b> Pruebas metabólicas, de identificación y seguridad de BAL. ....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1:</b> Estructura de los isómeros ópticos del ácido láctico.....	12
<b>Figura 2-1:</b> Bacterias ácido lácticas. ....	15
<b>Figura 1-2:</b> Localización del estudio. ....	21

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-2:</b> Germinación de granos de quinua. ....	24
<b>Gráfico 2-2:</b> Humectación de los granos de quinua a germinar. ....	25
<b>Gráfico 3-2:</b> Proceso para humedecer las gasas. ....	26
<b>Gráfico 4-2:</b> Procedimiento para preparación del papel filtro. ....	27
<b>Gráfico 5-2:</b> Proceso de fermentación. ....	29
<b>Gráfico 6-2:</b> Recuento de BAL. ....	31
<b>Gráfico 7-2:</b> Aislamiento y caracterización de BAL.....	32
<b>Gráfico 1-3:</b> Porcentajes de germinación en 72 horas, germinados totales y germinados con radícula mayor 0,5 cm de los tratamientos (10 °C, 20 °C y 35 °C).....	36
<b>Gráfico 2-3:</b> Promedios porcentuales de acidez titulable en fermentados, a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.....	40
<b>Gráfico 3-3:</b> Promedios de pH en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.....	44
<b>Gráfico 4-3:</b> Promedios porcentuales de azúcares totales a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.....	47
<b>Gráfico 5-3:</b> BAL (log UFC/mL) a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C. ....	50

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** ENSAYO DE GERMINACIÓN

**ANEXO B:** PREPARACIÓN DEL FERMENTADO

**ANEXO C:** ENSAYO DE ACIDEZ TITULABLE

**ANEXO D:** ENSAYO DE PH

**ANEXO E:** ENSAYO DE AZÚCARES TOTALES

**ANEXO F:** RECUENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (UFC)

**ANEXO G:** AISLAMIENTO DE BAL

**ANEXO H:** CARACTERIZACIÓN DE BAL

**ANEXO I:** CONSERVACIÓN DE BAL

**ANEXO J:** PROCESO DE GERMINACIÓN DE GRANOS DE QUINUA

**ANEXO K:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO DE GERMINACIÓN

**ANEXO L:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO DE ACIDEZ

**ANEXO M:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOG (UFC/ML)

**ANEXO N:** ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE AZUCARES TOTALES.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>CRL</b>	Lactobacillus plantarum
<b>HR</b>	Humedad Relativa
<b>D (-)</b>	Ácido láctico es dextrógiro
<b>L (+)</b>	Ácido láctico es levógiro
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido

## RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan una pequeña parte del microbioma de las plantas con capacidad de provocar cambios en las propiedades nutricionales de un alimento. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar y caracterizar BAL presentes en granos de quinua (*Chenopodium quinoa*) nativa germinada. Se definió un proceso óptimo de germinación de granos de quinua (en 72 horas a 3 temperaturas 10, 20 y 35 grados Celsius) que fueron empleados en la fermentación, la identificación del mejor proceso de fermentación fue determinado por ensayos de acidez titulable, pH, azúcares totales y cuantificación de BAL en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h), con y sin glucosa. Se definió 20 grados Celsius como la mejor temperatura al finalizar las 72 horas de germinación con 75,67% de germinación total y 40% germinación con radícula mayor a 0,5 cm. Se obtuvo granos de quinua germinada para la fermentación, el mejor tratamiento establecido fue a 37 grados Celsius por 96 horas de fermentación, caracterizada por incremento de la concentración de ácido láctico (0.561%), reducción del pH (4.30), y disminución de la concentración de azúcares totales (0.497%), el crecimiento máximo fue de 7,27 logaritmo de UFC/mL en fermentados sin glucosa. La fermentación de los germinados con glucosa mostró un comportamiento proporcional. Se obtuvo un fermentado según el método óptimo, a partir del que se aislaron BAL a las que se realizaron pruebas de oxidasa, catalasa, tinción GRAM, ensayo de motilidad, actividad hemolítica, proteolítica y lipolítica. Los ensayos permitieron confirmar características metabólicas de este tipo de bacterias, finalmente se elaboró un banco de aislados puros almacenados bajo crio preservación. Resultaría oportuno continuar con este estudio, someter los aislados a identificación genotípica para emplearse en distintos estudios como en la aplicación biotecnológica.

**Palabras clave:** <QUINUA (*Chenopodium quinoa*)>, <BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS>, <QUINUA GERMINADA>, <FERMENTACIÓN>, <ÁCIDO LACTICO>, <AZÚCARES FERMENTABLES>.



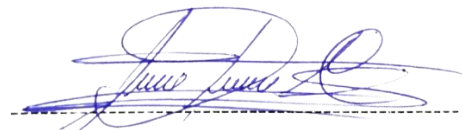
1027-DBRA-UTP-2022



## SUMMARY

Lactic acid bacteria (LAB) represent a small part of the plant microbiome with the ability to cause changes in the nutritional properties of food. The aim of this work was to isolate and characterize LAB present in germinated native quinoa (*Chenopodium quinoa*) grains. An optimal germination process for quinoa grains was defined (in 72 hours at 3 temperatures 10, 20 and 35 degrees Celsius), These were used in fermentation. The identification of the best fermentation process was determined by titratable acidity tests, pH, total sugars and LAB quantification at five times (0h, 24h, 48h, 72h and 96h), with and without glucose. Twenty degrees Celsius was defined as the best temperature at the end of 72 hours of germination with 75.67% total germination and 40% germination with a radicle bigger than 0.5 cm. Germinated quinoa grains were obtained for fermentation, the best established treatment was at 37 degrees Celsius for 96 hours of fermentation, characterized by an increase in the concentration of lactic acid (0.561%), a reduction in pH (4.30), and a decrease in the total sugar concentration (0.497%), the maximum growth was 7.27 logarithm of CFU/mL in fermented without glucose. The fermentation of the sprouts with glucose showed a proportional behavior. A fermented product was obtained in accordance with the optimal method, since LAB were isolated and oxidase, catalase, GRAM staining, motility assay, hemolytic, proteolytic and lipolytic activity tests were performed. The tests allowed to confirm metabolic characteristics of this type of bacteria, finally a bank of pure isolates stored under cryopreservation was elaborated. It would be opportune to continue with this study, subjecting the isolates to genotypic identification to be used in different studies such as biotechnological application.

**Keywords:** <QUINOA (*Chenopodium quinoa*)>, <LACTIC ACID BACTERIA>, <GERMINATED QUINOA>, <FERMENTATION>, <LACTIC ACID>, <FERMENTABLE SUGARS>.



-----  
Lcdo. Edison Hernán Salazar Calderón  
C.I: 060318469-8

## INTRODUCCIÓN

La quinua es un cultivo importante en América Latina, ya que es considerado uno de los cultivos que aportan a la seguridad alimentaria de la población, gracias a su versatilidad dentro de la agronomía y capacidad expansiva hacia otras regiones a nivel mundial (Bojanic, 2011, pp.82-84). Adquiere mayor importancia en aquellas naciones en las cuales la población no cuenta con los medios para acceder a las diferentes fuentes proteicas, siendo esta una opción que contribuye a la solución de estos problemas.

Es considerado el único alimento vegetal que posee todos los aminoácidos, oligoelementos y vitaminas esenciales para el ser humano, además de que no contiene gluten. Debido a las características de la planta se adapta a distintos tipos de pisos agroecológicos y cuenta con propiedades que le dan un alto grado de eficacia en el uso del agua, dándole resistencia en ambientes poco húmedos. Se han detectado alrededor de 30000 variedades (Bojanic, 2011, p.101).

A pesar de los beneficios y propiedades que posee, la quinua es considerado como un cultivo nativo marginado, tanto de los sistemas agronómicos y de los socioculturales. La razón es que sus propiedades nutricionales no son muy valoradas, como consecuencia de que no ha sido un ámbito de investigación de manera integral abordado, a nivel de la industria alimentaria y microbiológica, restando la posibilidad de que se convierta en un producto consumido por gran parte de la población a nivel mundial.

La quinua es un producto originario de la región andina, ha formado parte de la alimentación de este lado del continente desde la etapa prehispánica. A pesar de que los estudios realizados en los últimos tiempos han demostrado todas sus propiedades nutricionales, continúa siendo un elemento poco integrado en la alimentación de las personas, hecho que genera cierta inquietud ya que a nivel mundial se pueden evidenciar niveles importantes de desnutrición (Olarde, et al., 2016: pp.89-90).

Lo mismo sucede en lo referente a la investigación microbiológica relacionada con la quinua. Los estudios acerca de la fermentación de pseudocereales aún son un campo por explorar. A pesar del creciente interés social por el consumo de granos y harinas libres de gluten, los estudios alrededor de la microbiología de la fermentación de granos andinos son relativamente escasos lo que genera como consecuencia un limitado conocimiento de este campo.

A pesar de que existe evidencia científica en relación a las bacterias ácido lácticas (BAL), que parten de una masa madre, a nivel mundial, los pocos estudios que existen impiden sacar conclusiones claras sobre la diversidad microbiana presente en la quinua (Carrizo, 2018, pp.18-19). Razón por la cual se considera importante el abordaje del tema planteado como una contribución al campo científico, académico y social.

Teniendo en cuenta que la quinua va adquiriendo cada vez más importancia, resulta imprescindible conocer la implicación o el impacto que correlaciona a la quinua con las BAL. Por

lo tanto, esta temática es muy importante, por la falta de estudio del microbiota BAL durante su fermentación espontánea llevada a cabo en los granos de quinua, lo que impide el adecuado aprovechamiento de sus propiedades (Parra, 2017, pp.76-77). Estos microorganismos en la industria se pueden emplear con fines biotecnológicos, como probióticos además producen varios componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos esporádicos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Caracterizar las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en un fermentado láctico de granos germinados de quinua (*Chenopodium quinoa*) para potenciales aplicaciones.

### **Objetivos específicos**

- Definir un proceso de germinación del grano de quinua nativo.
- Establecer un proceso de fermentación en un licuado de granos germinados de quinua.
- Cultivar BAL a partir de una muestra fermentada de granos de quinua.
- Aislar e identificar las BAL manifestadas originarias de la quinua.
- Elaborar un banco de cepas de BAL para potenciales aplicaciones.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

El tema acerca del aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas en un fermentado láctico de granos germinados de quinua (*Chenopodium quinoa*) para potenciales aplicaciones, no es una temática ampliamente analizada a nivel nacional. Sin embargo, tras revisar los repositorios digitales de las diferentes universidades se encontraron dos estudios en los que se habla acerca de las BAL en la quinua, siendo utilizadas para la creación de bebidas fermentadas. A continuación, se detalla una breve caracterización de las mismas.

La investigación “Desarrollo de Una Bebida Fermentada a Base de Quinoa (*Chenopodium quinoa*)” presentada en la Universidad San Francisco de Quito, desde la perspectiva de los autores señalan que las bacterias ácido lácticas de la quinua son empleadas para la elaboración de productos lácteos y vegetales, siendo de amplio uso en el mercado alimenticio. Se debe tomar en cuenta que el desarrollo de BAL depende en gran medida del tipo de cepa. La finalidad que cumplen es estabilizar los alimentos, contrarrestando incluso los efectos que pueden producir bacterias de tipo patógeno, demostrando su utilidad y aplicabilidad en la industria alimenticia (Maldonado, et al., 2014: pp.57-58).

En esta misma línea, la investigación titulada “Estudio de cultivos iniciadores durante el almacenamiento de una leche fermentada incorporando harina de quinua (*Chenopodium quinoa*) germinada”, presentada en la Universidad Tecnológica Equinoccial, señala, desde la perspectiva del autor, que los cultivos iniciadores están compuestos de microorganismos vivos, principalmente conformados por bacterias ácido láctica que dan paso a la formación de ácidos orgánicos. Esto da la posibilidad de que puedan ser empleados para elaborar productos como la leche fermentada con harina de quinua germinada con altos valores nutritivos (Cargua, 2016, p.23).

A nivel internacional, se encontró evidencia científica relacionada con la temática de estudio, así el artículo científico publicado en la revista MDPI, titulado “Aislamiento de levaduras productoras de exopolisacáridos y bacterias del ácido láctico de la fermentación de masa madre de quinua (*Chenopodium quinoa*)” donde se emplea harina de quinua, se detectó una población biodiversa de BAL en la fermentación de esta junto con la levadura. Entre las BAL autóctonas productoras de exopolisacáridos, mostro potencial como candidatos para el cultivo iniciador para la fermentación de masa madre de harina de quinua (Franco, et al., 2020: pp.32-33).

Además, en la *Journal of Applied Microbiology* se publicó un artículo científico de Biodiversidad y potencial tecnológico-funcional de las bacterias del ácido láctico aisladas de masas madre de quinua fermentadas espontáneamente donde durante la fermentación de la masa madre de quinua,

BAL demostró ser la población microbiana dominante. En el proceso de análisis se pudo determinar que las cepas *Lactobacillus plantarum* CRL1905 y *Leuconostoc mesenteroides* CRL1907 fueron las seleccionadas para la producción de productos fermentados a base de quinua sin gluten (Ruiz, et al., 2016: pp.97-98).

Por otro lado, en un artículo publicado en *The Journal of the Science of Food and Agriculture* en el que se realizó un estudio de la fermentación de quinua, canihua y amaranto como pseudocereales para mejorar la accesibilidad de los minerales a través de la degradación del fitato, se obtuvo como resultados que la adición de *Lactobacillus plantarum* en la fermentación produjo un nivel más alto de ácido láctico y una reducción relativamente más rápida del pH a 4 que en la fermentación espontánea (Castro, et al., 2019: p.54-55).

En los estudios mencionados se conoció que los usos más frecuentes de las BAL ocurren en la industria láctea, para la elaboración de diversos tipos de productos entre los que se encuentran: leches fermentadas, mantequilla y queso debido a que poseen propiedades importantes que aportan al sabor, textura, aroma, además los productos fermentados se constituyen en fuentes de vitaminas y proteínas, es decir, son útiles para la nutrición humana. Los conocimientos descritos y su análisis aportan significativamente al desarrollo de la presente investigación.

## 1.2. Quinua

La quinua se encuentra dentro del grupo de los pseudo cereales, posee altos niveles de nutrientes y micronutrientes. En su composición es posible identificar un alto contenido proteico, el cual va desde los 13,81% hasta el 21,9%, posee, además, ácidos grasos como Omega 3, 6 y 9. De igual manera cuenta con minerales como el hierro, fósforo, calcio y magnesio. Dentro del grupo alimenticio de los vegetales es el único que alberga todos los aminoácidos esenciales, y es libre de gluten, una propiedad muy aceptada y reconocida en los últimos tiempos (Bojanic, 2011, pp. 56-57).

La quinua, cuyo nombre científico es *Chenopodium quinoa* también cuenta con una amplia variedad genética que se evidencia en los diferentes colores tanto en su planta, flores, semillas, formas, valor nutritivo, aplicación productiva y proceso de cultivo. Se configura como una de las fuentes naturales de proteína vegetal y valor nutritivo. Debido a la importante proporción de aminoácidos esenciales que posee, su valor biológico supera al de otros productos como el trigo, el maíz o el arroz, siendo comparable con los que se encuentran en alimentos como la leche, huevos o carne (Rojas, et al., 2016: pp.34-35).

Actualmente, en Ecuador ha dejado de ser un producto de consumo exclusivo de las comunidades nativas para adquirir mayor importancia en el mercado, por su elevado valor nutritivo y proteico, siendo Bolivia y Perú los mejores productores a nivel global (Tabla 1-1). Sumada a la importancia nutricional, a la quinua se considera como uno de los cultivos que permitirá hacer frente a los

efectos del cambio climático, si se logra que su consumo se extienda hacia los diferentes lugares del mundo debido a que es resistente a condiciones adversas que se presentan en el clima o el suelo (Casas, et al., 2016: pp. 68-88).

**Tabla 1-1:** Mayores productores de quinua a nivel mundial.

País	Toneladas
Bolivia	61.182 t
Perú	52.130 t
Ecuador	800 t

**Fuente:** (Casas, et al., 2016).

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

La producción de quinua en los países de la región Andina en total suma 114.112 t. Al incrementar la producción, también se ha dado un crecimiento importante en la exportación, siendo los principales lugares de destino Australia, Alemania, Francia, Holanda, Canadá y Estados Unidos. Es una base importante en la alimentación de las personas, ya que se la puede emplear tanto el grano de manera entera o también la harina, en general hace parte de diferentes tipos de preparaciones. Además de la industria alimenticia, también es un elemento que puede ser empleado en la cosmética y la farmacéutica (Casas, et al., 2016: pp.49-50).

Desde el punto de vista de (Bojanic, 2011, p.18) la *Chenopodium quinoa* posee características intrínsecas esenciales entre las que se encuentran:

- Variedad genética, cuenta con un pool genético que facilita el desarrollo de nuevas variantes con características superiores.
- Se adapta a condiciones adversas tanto en lo relacionado al clima como a las características del suelo. Incluso es posible que se pueda cultivar a 4000 metros sobre el nivel del mar.
- La calidad nutritiva que presenta es de las más completas y complejas, lo que lo convierte en una fuente alimenticia ideal para suplir las necesidades del organismo humano.
- Presenta una gran versatilidad en cuanto a su uso, si bien es óptima a nivel alimenticio, lo es también para el campo industrial.
- Se trata de un cultivo de bajo costo, debido a que no requiere de gran cantidad de insumos para poder crecer, ni de demasiado cuidado especiales, lo que permite a la población invertir en la producción de quinua.

Si bien la quinua es un alimento propio de los países sudamericanos, debido a sus características de adaptabilidad su cultivo se ha expandido hacia diferentes espacios geográficos. Naciones de

los continentes europeo, asiático, américa del norte, australiano y otras zonas de la región han mostrado interés en iniciar procesos de cultivo obteniendo resultados positivos (Bojanic, 2011, p.23). En su composición fisicoquímica, la quinua presenta las siguientes características tanto en la porción de cereal como de almidón:

**Tabla 2-1:** Características fisicoquímicas de la quinua.

Parámetro	Grano	Almidón
Humedad (% bs)	6,776	9,529
Actividad de agua (aw bh)	0,652	0,706
pH (bh)	6,323	8,403
Acidez Titulable (% bh)	0,327	0,054
Cenizas (% bs)	3,470	0,794
Proteínas (% bs)	13,270	N.A.

**Fuente:** (Oliva, et al., 2018)

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

En distintos estudios se presentan variaciones relativas con respecto a este análisis dadas las distintas variedades de quinua analizadas. No obstante, se presentan coincidencias en términos generales con respecto a la valoración global del aporte nutricional de la quinua (Padrón, et al., 2015: pp.67-68). En los siguientes apartados se explica con detalle cada uno de los componentes nutricionales que se presentan en el grano de quinua:

### **1.2.1. Proteínas**

La quinua presenta un valor proteico de 13,81 g/100, la información muestra que este es superior al que presentan otros elementos entre los que se encuentran el trigo, maíz o el arroz. Los aminoácidos que se han identificado en este alimento son, la lisina, el triptófano, la treonina y la metionina, todos estos se encuentran en un promedio de 5,6 gramos. Del peso total de la semilla, entre el 16% al el 20% pertenece a proteínas caracterizadas por su alto valor biológico, incluidos los aminoácidos que el cuerpo humano no produce y debe obtenerlo a través de la medicación (Bojanic, 2011, pp.45-46).

Los dos tipos de proteínas principales de la quinua son albúmina y globulina, que representan entre el 44 y el 77 % de las proteínas totales del grano (Padrón, et al., 2015: pp.45-46). En las semillas abunda mayor nivel de lisina ayuda a forma anticuerpos, metaboliza los ácidos grasos. La leucina y valina permiten la generación de energía muscular, mientras que la fenilalanina sirve como estimulación del cerebro. La treonina facilita la desintoxicación del hígado y triptófano para aplicar en casos de ansiedad e insomnio (Vargas, et al., 2019: pp.56-57). La Tabla 3-1 muestra el promedio de la proteína de la quinua en base a los requerimientos de aminoácidos y proteínas.



**Tabla 3-1:** Aminoácidos y proteínas de quinua para adultos.

Aminoácido	Aminoácido en 0,75g de proteína ideal (mg)	Composición de aminoácidos de la proteína de la quinua (mg/1.00g)
Isoleucina	13	53
Leucina	19	63
Lisina	16	64
Total, AAS	17	28
Total, AAA	19	72
Treonina	9	44
Triptófano	5	9
Valina	13	48
Histidina	16	31

**Fuente:** (Reyes, 2006)

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

### 1.2.2. Grasas

En este caso se conoce que la quinua es insaturada con un contenido del 5,5% de grasa, de este total un 50,24% de las grasas se componen de ácido linoleico (Omega 6), seguido de Omega 9 (26,04%), Omega 3 (4,77%) (Nutrición y cocina, 2015, p.87), incluyendo ácido palmítico (9,59%), en menor proporción ácido eicosapentaenoico y esteárico (Bojanic, 2011, p.26). En la tabla 4-1, se observa una comparativa entre los ácidos grasos esenciales que presenta la quinua en comparación con algunos cereales:

**Tabla 4-1:** Ácidos grasos esenciales de cereales comparados.

Ácido graso (mg/g de grasa)	Quinua	Trigo	Arroz	Maíz	Cebada	Avena
Ácido linoleico	490,4	376,5	221,2	442,4	435,3	351,3
Ácido ( $\alpha$ -linolénico)	42,8	19,4	47,0	13,7	47,4	16,1

**Fuente:** (Padrón, et al., 2015).

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Es así que las grasas insaturadas presentes en la quinua se han vuelto relevante debido a los beneficios que otorga al organismo, pues, es tiene fluidez de los lípidos. Cuando se obtienen aceites vegetales los valores de los lípidos de la quinua son altos, esto es utilizado a nivel cosmético y culinario. Además, de diversos beneficios porque reduce el nivel de riesgo

cardiovascular y se puede tener mayor control del incremento del colesterol en la sangre (Bojanic, 2011, pp. 32-33).

### **1.2.3. Carbohidratos**

La principal fracción del grano de quinua lo constituye los carbohidratos (59,4% a 70,8%), donde se encuentran los azúcares libres como: Glucosa (4,55%), Fructosa (2,41%) y Sacarosa (2,39%) y fibra (8,8% a 14,1%). El 78 % que corresponde a la fracción insoluble está compuesta principalmente de ácido galacturónico, xilosa, galactosa y subunidades de glucosa, el 22% correspondiente a la fracción soluble está compuesta principalmente de glucosa, ácido galacturónico y unidades de arabinosa (Graf, et al., 2015: pp.43-44).

### **1.2.4. Minerales**

El contenido en minerales de la quinua (Tabla 5-1) varía considerablemente según datos de varios artículos de revisión, de acuerdo con Vega- Gálvez, 2010 esto se explicaría por el tipo de suelo, composición y aplicación de fertilizantes a los cultivos como ocurre en otros alimentos de origen vegetal. La quinua presenta valores más elevados de calcio, hierro, potasio y sodio en comparación al trigo, arroz y maíz (Verena, N et al., 2016; Gálvez, et al., 2010).

**Tabla 5-1:** Minerales de la quinua.

<b>Minerales</b>	<b>Quinua entera (mg)</b>
Potasio (K)	697
Sodio (Na)	11,5
Fósforo (P)	387
Magnesio (Mg)	270
Hierro (Fe)	12
Calcio (Ca)	127
Manganeso (Mn)	37,5

**Fuente:** (Romero, 2019).

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Por lo tanto, el calcio es fácil de absorber por el organismo, pues, posee funciones en tejidos duros y blandos, incluso regula la transmisión neuromuscular, siendo un mineral importante en la alimentación. El nivel de hierro es más elevado en la quinua comparado con el trigo y maíz; lo mismo ocurre con el potasio, fósforo y magnesio, pues, es superior al arroz y maíz. El magnesio ayuda a activar enzimas, donde los fosfatos se convierten en energía. Mientras que el magnesio muestra niveles inferiores al trigo.

### 1.2.5. Vitaminas

Las vitaminas son micronutrientes, muy útiles para el metabolismo. La quinua también es rica en vitaminas (USDA 2015). Se conoce que las semillas de quinua contienen piridoxina (Vit B6) y ácido fólico en altas concentraciones. Este alimento es fuente importante de niacina para la dieta (Tabla 6-1). El nivel de tiamina es inferior al de la avena y cebada, aunque los niveles de piridoxina, riboflavina y ácido fólico son más altos que los encontrados en el trigo, avena, cebada, arroz y maíz. La riboflavina de la quinua suple el 80% de las necesidades de los niños y el 40% de los adultos. Adicionalmente, la quinua es una fuente excelente de vitamina E, con un contenido superior al del trigo. Los niveles de ácido ascórbico varían de 0 a 0.63 mg/100 g. Los procesos tecnológicos como el lavado de la quinua dulce o amarga y el perlado en ésta última suelen afectar al contenido de vitaminas (Navruz y Sanlier, 2016, p.98).

**Tabla 6-1:** Vitaminas de la quinua.

Vitaminas	Rango (mg/100) materia seca
Ácido ascórbico	0,00 – 8,50
Niacina	0,16 – 1,60
Riboflavina	0,20 – 0,46
Tiamina	0,05 – 0,60
Vitamina A (carotenos)	0,12 – 0,53
Vitamina E	4,60 – 5,90

**Fuente:** (Romero, 2019).

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

### 1.2.6. Compuestos bioactivos y antioxidantes

La quinua es un cultivo nativo ricos en nutrientes y metabolitos bioactivos tales como compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides y otros, los cuales al parecer son capaces de modular procesos metabólicos con un efecto positivo en la salud humana que incluye efectos antiinflamatorios, anticáncer, antidiabético, antiobesidad, cardioprotector; aunque su mecanismo de acción no se comprenda completamente. Entre estos compuestos, el grano de quinua contiene altas cantidades de ácidos fenólicos (30.3-59.7 mg/100g) los cuales se encuentran al estado libre o en forma conjugada, entre ellos: los ácidos vanílico y ferúlico y sus derivados. Los principales flavonoides son la quercetina y el Kamferol y sus glicósidos. La quinua también contiene carotenoides, mayormente transluteína y zeaxantina, betacianinas (betanina, isobetanina y amarantina) en las variedades rojo violeta y betaxantinas en las variedades amarillo-naranja. La quinua es rica en fitosteroles y fitoecdisteroides (Quiroga, 2020, pp. 22-23).

### 1.2.7. *Proceso de germinación*

Las semillas de quinua presentan capacidades para germinar en temperaturas muy bajas, incluso cercanas a cero, además de presentar gran tolerancia a heladas fuertes durante periodos breves (Bazile, 2014, pp.77-79). En las zonas de tipo salinas o áridas, la quinua presenta igualmente tolerancia al estrés tanto hídrico como a la salinidad, a las que se adapta. Esta adaptación, sin embargo, tiene relación con los efectos iónicos y osmóticos de la salinidad, de modo que la adaptación depende de estos. Condiciones de germinación:

- Temperatura: entre 18 y 23 ° C para el 100% de germinación. Una baja en la temperatura drástica puede producir muerte de embrión.
- Estrés hídrico: es necesaria la presencia de agua en la germinación, pero un estrés hídrico puede afectarla gravemente; este puede ser producido por falta de agua, por bajas temperaturas o bien por altos grados de salinidad. El estrés salino que produce bajos potenciales osmóticos retrasa la fase II de la germinación.
- Salinidad: este aspecto afecta a la germinación tanto por el estrés hídrico y su impacto en el potencial osmótico como por la toxicidad de iones Cl y Na. Estudios demuestran que sin sal germina el 100 % de las semillas, mientras que aplicar NaCl en concentraciones de 0,4 M produce una reducción de un 53 %.

El estudio se utilizó como condiciones de germinación el sometimiento de las semillas -durante un periodo de 48 horas- a una humedad de 86°C, esto en placas Petri con humedecimiento de papel filtro cada 6 horas, proceso realizado en total durante 48 horas (Valenzuela, et al., 2015: pp.64-65).

También se consideró varios tipos de ensayos para realizar la germinación, los cuales consistieron en una germinación controlada sin subproductos, en las que se respetaron las condiciones usuales de germinación (remojo de semillas a temperaturas de 26° constantes y en oscuridad); mientras que el otro tipo fue la germinación controlada con ácidos fúlvicos al 5 % y *trichoderma harzianum*, lo que se presentó en una concentración de 10g/100L para evitar presencia de hongos; un tercer ensayo fue realizado en macetas con distintos sustratos; un cuarto ensayo se realizó en la siembra al voleo directa sobre terreno y siembra puntual; y otro ensayo se realizó en semilleros para transplantar. Los resultados del estudio demostraron que la germinación controlada con protección contra hongos el método de germinación más efectivo, debido a que los otros métodos son propensos a la formación de hongos o bien dependen de las condiciones de calidad del terreno y de los sustratos utilizados (Donaire, 2019, p.43).

### 1.2.8. Conservación de la semilla de quinua

La longevidad de las semillas debe ser controladas en cuanto al agua, a la temperatura y al oxígeno al que están expuestas. A este respecto, las semillas de quinua presentan diferencias sutiles según el tipo de variedad, evidenciándose que algunos de estos tipos se mantienen germinables almacenadas a 43 % HR, y solo un tipo (*Chadmo*) conserva su viabilidad por más de 14 semanas almacenada de esta manera (Cuadra, 2014, p.19).

Respecto a la humedad, cabe mencionar que la semilla de quinua puede ser considerada ortodoxa, y, como tal, la isoterma que presenta en cuanto a sorción de agua presenta una forma sigmoidea que varía dependiendo de la variedad concreta de la semilla. En la quinua, la susceptibilidad al deterioro presenta variaciones, no puede aseverarse que, para todas, la presencia de humedad afecte su viabilidad; esto se observa de similar manera en su envejecimiento, variando según el tipo de semilla (Cuadra, 2014, p.27).

### 1.3. Ácido láctico

El ácido láctico es un compuesto ampliamente utilizado a nivel industrial, por ejemplo, en la industria alimenticia como conservante; de igual forma, se utiliza en farmacia, textilera, medicina, entre otras (Waldir, et al., 2007: pp.63-64). Esta biomolécula se encuentra presente de manera natural en los seres vivos (músculos, sangre, etc.) y puede sintetizarse bajo diversos procesos (Munilla y Carracedo, 2005: pp.34-35).

También llamado ácido 2-hidroxiopropanoico, corresponde a un compuesto formado por dos grupos funcionales: el alcohol y el carboxilo. De esta manera, se tiene un carbono de tipo asimétrico, que es lo que le da su actividad óptica. Dentro de esta, se encuentran dos isómeros de tipo óptico, que son el D (-) láctico y el L (+) láctico, tal como se aprecian en la figura 1-1 (García, et al., 2010: pp.73-76).



**Figura 1-1:** Estructura de los isómeros ópticos del ácido láctico.

**Fuente:** (García, et al., 2010).

El ácido láctico se presenta una consistencia siruposa, líquida soluble en agua e incolora, aunque en estado puro se presentan sólidos e higroscópicos. Sus isómeros, tal como plantean, pueden ser

producidos mediante fermentación microbiana desde fuentes renovables. La forma no óptica del ácido láctico (racémica) es la forma comercial, obtenida a partir de residuos, y es convertida a una serie de compuestos químicos diferentes como plastificantes, resinas, entre otros (García, et al., 2010: pp.76-77).

### ***1.3.1. Métodos de identificación***

La determinación o identificación del ácido láctico tiene bastante data, y se identifican varios métodos tanto cuantitativos como cualitativos. Cuando se está ante procesos de identificación que se realizan sobre matrices complejas, puede encontrarse junto a otras sustancias que requieren ser separadas en primera instancia de este (Gómez y Torrez , 2019: pp. 27-29).

#### ***1.3.1.1. Métodos de tipos gravimétrico y colorimétrico***

La titulación es uno de los métodos más utilizados y rutinarios para la identificación del ácido láctico. Este análisis volumétrico utiliza disoluciones patrón normalizadas de una base, por ejemplo, el hidróxido de sodio concentrado en 0.1 N, al tiempo que utiliza *fenoftaleína* para funcionar de indicador de la valoración (Chacón, 2006, p.14). La acidez mencionada convencionalmente como contenido de ácido láctico, se determina mediante procedimientos normalizados (NTE INEN 13:1984, 2012).

El método colorimétrico corresponde a la oxidación del analito con  $H_2SO_4$  hacia acetaldehído, lo que permite la reacción con *phidroxifenilo* en tanto haya iones de Cu. La absorción es medida a 560nm, para lo cual se espera una reacción de tipo lineal entre el incremento de la absorbancia en la longitud de onda y su concentración en la muestra del analito (Gómez y Torrez , 2019: pp.87-88).

#### ***1.3.1.2. Métodos enzimáticos***

En concentraciones con analito en cantidad superior a 0.3g/L, el método espectrofotométrico resulta adecuado en términos de costos y accesibilidad (Gómez y Torrez , 2019: pp.88-89). Este implica el análisis de la luz y su interacción con la materia, identificando los isómeros L y D del ácido láctico a partir de la reacción de iones lactatos con cloruro de hierro.

A partir del uso de LDH y  $NAD^+$  como enzima y coenzima respectivamente, puede producirse la oxidación hacia piruvato y la reducción a NADH, con absorbancia de 340nm. Con esto puede notarse la proporcionalidad que existe entre la absorbancia y la concentración del lactato dentro de un margen de 5.72 a 6.10nm, asumida la equimolaridad. La enzima debe ser purificada para analizar adecuadamente el analito (Gómez y Torrez , 2019: pp.91-92).

La fluorescencia, por su parte, permite determinar en fermentación y otros medios de cultivo a partir de la LDH para cuantificar mediante excitación a 535nm y emisión a 587nm, detectando entre 1 y 2 mmol/L (Gómez y Torrez , 2019; 92-93).

#### *1.3.1.3. Otros métodos de identificación*

Existe otra serie de métodos de determinación del ácido láctico que, por su complejidad o requerimiento de equipos y materiales se hacen menos accesibles. La resonancia magnética nuclear de protones permite la determinación de moléculas específicas mediante el spin de átomos presentes en la molécula, para lo cual se utiliza el programa de pulsos de doble quantum para los spin fuertemente acoplados. Este suele tener usos médicos. Otro método es la cromatografía de gases acopladas a masas, que consiste en derivatizar con sililantes el ácido láctico (Gómez y Torrez , 2019: pp.93-94).

#### *1.3.2. Fermentación láctica*

La fermentación se relaciona con el proceso para obtener energía sin necesidad de oxígeno, por lo que se emplea la glucosa que ayuda a obtener el ácido láctico. En otras palabras, es un proceso utilizado para que los microorganismos generen biomasa, empleando sustancias orgánicas (Campos y Ponce, 2017: pp.52-53). Este proceso se aplica para obtener productos alimenticios, así como la conservación de los mismos. La fermentación se divide en tres tipos como la láctica (uso de géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*), propiónica (*Propionibacterium*) y alcohólica (vegetales y frutas).

Se conoce que la mayoría de los productos lácteos se derivan a través de la fermentación bacteriana láctica, donde el piruvato se reduce hasta forma el lácteo debido a la deshidrogenasa. Es así que en la fermentación láctica se disminuye el pH, lo cual evita el crecimiento de las bacterias que ocasionan la putrefacción (Romero, 2019, p.34).

En la fermentación láctica se emplean BAL, bacterias Gram positivas, que fermentan los hidratos de carbono para transformarlos en ácido láctico. Generalmente, los géneros más característicos en la fermentación se basan en *Bifidobacterium Spp.*, *Lactobacillus Spp.*, y *Pediococcus Spp.*, especialmente los termoresistentes (Romero, 2019, pp. 34-35).

Cabe mencionar que la fermentación láctica se utiliza para conservar los alimentos, la efectividad de este proceso se enfoca en la generación de metabolitos, etanol, bacteriocinas, entre otros. Los metabolitos evitan el crecimiento de microorganismos contaminantes. De igual modo, mejorar la seguridad alimentaria mediante la inhibición de agentes patógenos, así como la transformación

de las características del sabor, textura y aroma, favoreciendo a la calidad nutricional y organoléptica (Benavides, 2019, p.78).

De igual forma, los alimentos funcionales pueden integrarse con prebióticos, estos ayudan al crecimiento de las bacterias, pues, algunas bacterias lácticas tienen las características prebióticas.

#### 1.4. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, inmóviles con temperatura de crecimiento de 20 a 60°C, pH de 4 a 6,5; incluso crecen en pH bajo como 3,2; sobreviviendo de forma natural, son microaerófilicos o aerotolerantes. Metabolizan la glucosa y otros azúcares anaeróbicamente, para el crecimiento son exigentes necesitan de fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales y aminoácidos. No obstante, existen casos en que estas bacterias crecen, mantienen y conservan el alimento bajo características probióticas (Fuentes, et al., 2017: pp. 27-29).



**Figura 2-1:** Bacterias ácido lácticas.

**Fuente:** (Latam News Media LLC, 2015).

La capacidad adquirida por las BAL para metabolizar varios carbohidratos les proporcionó ventajas competitivas para colonizar numerosos ecosistemas. Esta variedad de sustratos utilizados aprovecha algunas vías metabólicas, lo que hace que las BAL sean tan únicas y distintivas en términos de su potencial de fermentación (Buron, 2019, p.65).

##### 1.4.1. Bacterias ácido lácticas homofermentativas

Las BAL homolácticas utilizan la glicólisis o ruta de Embden-Meyerhof para catabolizar la glucosa y producir ácido láctico casi exclusivamente como producto final bajo condiciones estándar. Los géneros de BAL homolácticas son: *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* *Vagococcus* y algunas especies de los géneros *Lactobacillus* (*L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L.*



*bulgaricus*) (Gopal, 2022, p.87). Los compuestos obtenidos que ayudan al perfil sensorial se encuentran el amoníaco, ácidos (grasos libres – orgánicos), citrato, acetaldehído y dióxido de carbono (Benavides, 2019, p.92).

#### **1.4.2. Bacterias ácido lácticas heterofermentativas**

En contraste, el grupo heteroláctico, emplea la ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa para utilizar carbohidratos y esto resulta en generación de una cantidad significativa de otros productos finales adicionales al ácido láctico, que incluyen etanol, acetato y dióxido de carbono. Los géneros *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus* y *Weisella* son generalmente heterofermentativos (Gopal, 2022, p.88). Los géneros de *Lactobacillus* como (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*) emplean la ruta pentosa más glucólisis (Benavides, 2019, p.93).

#### *Otros metabolitos de las BAL*

Respecto a lo componentes antimicrobianos que generan las BAL se identifica que la acción conservadora se presenta por la inhibición de microorganismos contaminantes o patógenos derivados de los productos finales empleados en el proceso de fermentación. Las sustancias se relacionan con el ácido láctico, diacetilo, bacteriocinas y peróxido de carbono. El ácido láctico derivado de las BAL disminuye el pH, generando inhibición de bacterias con gram positivos y negativos. Cuando las BAL contienen oxígeno produce peróxido de hidrógeno causando susceptibilidad de la célula microbiana (Ramírez, et al., 2011: pp.45-47).

#### *Bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados*

Las BAL que se utilizan en alimentos fermentados ingresan por las siguientes vías:

- Mediante la materia prima (vegetales – embutidos) con el fin de crecer más que los demás microorganismos.
- Se encuentran en el equipo empleado para la preparación y fermentación del alimento como en las grietas de barriles de manera para almacenar aceitunas, pescado, entre otros.
- Materiales usados en una fermentación anterior, la cual se emplea en la inoculación de un nuevo lote.
- Aditivos conocidos de manera empírica.
- Cultivos mixtos con mezcla de iniciadoras.
- Cultivos puros con una o más cepas.

Las BAL se utilizan como cultivos iniciadores, que ayudan a generar productos fermentados mientras que los metabolitos se usan a manera de bioconservantes naturales debido a que controlan el crecimiento de bacterias patógenas. Asimismo, las bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) sustituyen de forma parcial a los agentes químicos, pues, tienen propiedades como estabilidad a bajo pH, al igual que el peso molecular (Heredia, 2017, p.75).

Las BAL se pueden utilizar en los siguientes alimentos:

**Tabla 7-1:** Uso de BAL por tipo de alimentos.

Tipos de alimentos	Características
Carnes rojas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se fermenta azúcar o flora natural cárnica.</li> <li>• Cultivos iniciadores: <i>Lactobacillus</i> y <i>Pediococcus</i>.</li> <li>• A partir de los cultivos iniciadores se genera el aroma, textura, color y sabor.</li> <li>• Producto final: embutidos (secos – semisecos).</li> </ul>
Productos lácteos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A partir de la lactosa, las BAL generan ácido láctico.</li> <li>• A partir del ácido cítrico generan diacetilo.</li> <li>• El aroma y sabor de los productos lácteos que se fermentan se deriva de <i>metilcelonas</i>, <i>dimetil sulfóxidos</i>, <i>lactonas</i>, entre otros.</li> <li>• Microorganismos: <i>Lactococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>.</li> <li>• Producto final: yogurt, mantequilla, queso (suizo, cheddar, cottage, entre otros.), crema ácida, etc.</li> </ul>
Productos vegetales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entorno salino y anaerobio en la producción ocasionan un dominante crecimiento de BAL.</li> <li>• Cultivos: <i>Lactobacillus (brevis, plantarum)</i>, <i>Pediococcus cerevisiae</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides</i>.</li> <li>• Producto final: aceitunas, pepinillos y col ácida.</li> </ul>

Fuente: (Peredo, 2013).

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

Las BAL presenta cinco factores que provocan estrés (Tabla 8-1), donde las cepas utilizadas deben tener resistencia al entorno derivado de los diferentes procesos industriales como la manipulación y almacenamiento de cultivos para mantenerse viables (Peredo, 2013, p.63).

**Tabla 8-1:** Estrés de las BAL.

Tipos de estrés	Características
Por acidez	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los ácidos orgánicos ocasionar un ambiente inadecuado.</li> <li>• Los ácidos se esparcen por la membrana hasta el citoplasma, descomponiéndose en protones.</li> <li>• La acumulación de protones disminuye el pH, lo cual afecta al pH transmembrana.</li> </ul>

Oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Generados por metabolismo celular y la exposición de células a agentes tanto físicos y químicos.</li> </ul>
Por frío	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En el proceso industrial (almacenamiento – congelado).</li> <li>• En temperaturas por debajo del nivel óptimo se presenta cambios en la reducción de fluidez de la membrana y estabilización de estructuras de ARN-ADN.</li> </ul>
Por calor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En temperaturas altas puede generar desnaturalización de proteínas.</li> <li>• Ocasiona alteraciones de fluidez en la membrana.</li> </ul>
Osmótico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los cambios osmóticos afectan a las funciones de la célula y bacterias.</li> <li>• Están expuestas a este estrés debido a una gran cantidad de azúcar o sal.</li> <li>• No pueden sintetizar los aminoácidos, péptidos, polioles y azúcares.</li> </ul>

**Fuente:** (Peredo, 2013).

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

### **1.4.3. Caracterización bioquímica**

#### **1.4.3.1. Tinción GRAM**

Las BAL pueden identificarse con la ayuda de la tinción Gram (identificación fenotípica), que consiste en un proceso de coloración de la capa de peptidoglicano en la pared bacteriana, lo que permite diferenciarlas. El cristal violeta da la tonalidad azul o morada a estas bacterias se les denomina Gram positivas debido a que su capa peptidoglicano es más gruesa que las de Gram negativas, y permite retener en su interior el colorante. Las Gram negativas no retienen el colorante principal, pero se hacen visibles mediante el colorante rojo de contraste (López, et al., 2014: pp. 34-36).

#### **1.4.3.2. Prueba de catalasa y oxidasa**

Otra prueba para distinguir a las bacterias de manera rápida (aunque preliminar) son las pruebas catalasa y/o oxidasa. La catalasa corresponde a una enzima que se encuentra presente en organismos con citocromos y que neutraliza el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> una forma toxica derivada del metabolismo oxigenado. En efecto, esta enzima convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que es liberado posteriormente en forma de burbujas. Como se plantea en Olmos, 2010 esta prueba es utilizada para identificar y distinguir a *Micrococacceae* de *Streotococcus* spp.y *Enterococcus* spp (Olmos, et al., 2010: pp.67-69).

El ensayo de oxidasa detecta la presencia de citocromo C en la bacteria, enzima que activa la oxidación molecular del reactivo tetra metil parafenilendiamina al ceder electrones al citocromo C, esto da como resultado peróxido de hidrógeno o agua -dependiendo del tipo de bacteria-. El oxígeno actúa en este caso como el aceptor de electrones de la cadena al final. El reactivo reducido

es incoloro, al oxidarse se torna color azul. Este sistema citocromooxidasa se presenta usualmente en bacterias de tipo aerobias, y las anaerobias en sentido estricto no presentan oxidasa (Olmos, et al., 2010: pp.76-77).

#### ***1.4.4. Métodos de conservación de cepas***

Para conservar distintos tipos de cultivos microbianos existen diversos tipos dependiendo del tipo de microorganismos que se quiere conservar. En su mayoría implican la siembra en medios de tipo estéril con una actividad metabólica reducida mediante refrigeración. Este método es para conservar durante cortos periodos de tiempo, y requiere de tubos con Agar nutritivo. Por otra parte, para cortar por completo el metabolismo de los microorganismos es posible congelar o deshidratar, de modo que se permite con ello un mayor tiempo de conservación (Zamora, 2005, p.38).

##### ***1.4.4.1. Refrigeración***

Este método permite aumentar la vida de las bacterias, pero es laborioso y requiere de resiembra, pues debe transferirse a intervalos que dependen de la temperatura y la humedad. Aquellos tubos que requieren transferencias de 6 a 8 meses en temperaturas de 5 a 8°C son los que no permiten pérdida de humedad, aunque sí admiten intercambio de gases (Zamora, 2005, p.39).

##### ***1.4.4.2. Congelación***

Este método es efectivo y permite conservar las bacterias durante mayores lapsos de tiempo. Cuando se procede a congelar, hay un alto número de pérdidas de bacterias, pero este número tiende a estabilizarse con el tiempo; así, para reducir al mínimo la destrucción de las bacterias, es preciso conseguir una cristalización extracelular. Mientras más baja la temperatura, mejor es la conservación de las bacterias; además, los medios incluyen agentes de tipo crioprotector para asegurar la viabilidad posterior del cultivo, como el glicerol, la clara de huevo, entre otros (Zamora, 2005, p.40).

Es claro que la pérdida de bacterias viables en el cultivo al congelar y al descongelar es una de las dificultades que presenta este método, de modo que debe constar el que las bacterias puedan sobrevivir a temperaturas bajo los -20°C y, a su vez, resistir a un recalentamiento acelerado. Además, los equipos requeridos para este método presentan elevados costos y requieren de un mantenimiento constante (Zamora, 2005, pp.40-41).

Conservación en nitrógeno líquido: reducidos a temperaturas muy bajas, las bacterias pueden conservar su actividad metabólica aun cuando se encuentre muy reducida, es decir, pueden

continuar siendo viables. Para realizar esta técnica, es preciso obtener cultivos de máxima densidad celular para suspender en agentes crioprotectores y congelarlos a  $-35^{\circ}\text{C}$  previo a su conservación en nitrógeno líquido. Los agentes crioprotectores pueden ser el glicerol estéril al 10 % o bien dimetil sulfóxido DMSO igualmente al 10 % (Zamora, 2005, pp.40-41).

#### *1.4.4.3. Deshidratación*

Este método consiste en retirar la mayor cantidad de agua de los productos, para lo cual es a veces necesario realizar procesos de concentración, que retiran parte del agua, para luego deshidratar (Zamora, 2005, p.42).

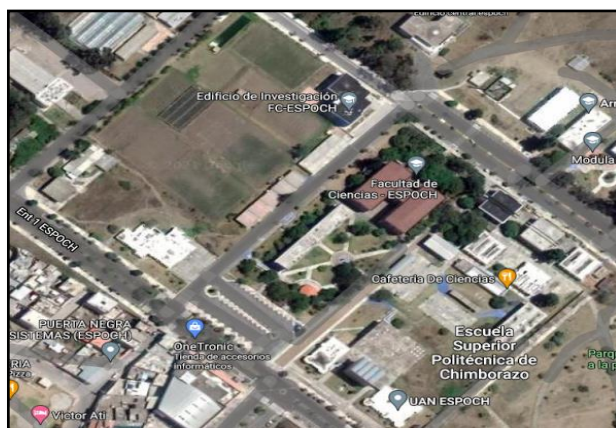
Liofilización o criodesecación: secado que sublima el hielo de cultivos congelados. Para esto primero se debe congelar y luego sublimar directamente el hielo (Zamora, 2005, p.42).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Localización del estudio

El presente estudio se realizó en los Laboratorios de: Microbiología, Investigación y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). La localización del estudio fue en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo en Ecuador.



**Figura 1-2:** Localización del estudio.

Fuente: (Google Maps, 2021)

#### 2.2. Población estudio

La población de estudio representa las bacterias ácido lácticas presentes en la quinua.

- **Criterios de inclusión:** Cepas bacterianas puras, viables, estables tanto microscópica y bioquímicamente.
- **Criterios de exclusión:** Bacterias no viables, cepas contaminadas.

#### 2.3. Materiales, equipos y reactivos

##### 2.3.1. Muestra experimental

**Quinua:** Se seleccionó quinua nativa de la parroquia Quisapincha perteneciente al cantón Ambato, la misma que fue cultivada el 15 de noviembre del 2020, se contempló la quinua seca, libre de impurezas y además sin ningún tratamiento previo al experimental.

### 2.3.2. *Materiales, equipos y reactivos*

**Tabla 1-2:** Materiales, equipos y reactivos.

<b>Actividad</b>	<b>Equipo</b>	<b>Materiales</b>	<b>Reactivos o Medios de cultivo</b>
Germinación de granos de quinua	-Estufa -Balanza analítica -Autoclave -Cámara de flujo	-Gasas no tejidas IDELIFE (medida 10 x 10 cm, 4 capas) -Cajas Petri de vidrio -Pinzas de metal -Vaso de precipitación 500 mL -Colador de metal -Tijeras -Hojas de papel filtro formato A4	-Agua destilada
Preparación del fermentado	-Estufa -Balanza analítica -Autoclave -Cámara de flujo -Licuadora Oster mod 4655	-Tela velo de novia 40 x 40 cm -Pipetas de 10 mL -Probeta de 250 mL -Varilla de agitación -Vaso de precipitación de 500 mL - Frascos de vidrio con tapa -Vaso de precipitación de 1000 mL	-Solución de glucosa 50% -Agua destilada
Determinación de acidez titulable	-Balanza analítica -Estufa	-Matraz Erlenmeyer de 250 mL -Bureta de 25 mL -Soporte universal -Pinza para bureta	-Solución NaOH 0,1 N -Solución indicadora de fenolftaleína -Agua destilada
Determinación de pH	-pH metro	-Embudo de filtración -Vasos de precipitación de 50 mL -Pipetas de 10 mL -Tubos Falcon 50mL	-Agua destilada -Solución tampón
Determinación de azúcares totales	-Centrífuga -pH metro	-Bureta de 25 mL -Soporte universal -Pinza para bureta -Matraz Erlenmeyer de 250 mL	-NaOH 50% -HCl conc -Solución Fehling A -Solución Fehling B -Agua destilada

		-Balón de aforo de 20 mL con tapa -Reverbero -Piseta	
Cuantificación de BAL	-Estufa -Balanza analítica -Autoclave -Cámara de flujo	-Matraz Erlenmeyer de 500 mL -Cajas Petri de vidrio -Probeta de 500 mL -Jarras de anaerobiosis -Vela -Puntas amarillas -Puntas azules -Micropipetas -Tubos de ensayo con tapa	-Agar MRS OXOID CM 0361 -Cicloheximida -Ácido acético 5 M -Agua
Aislamiento de BAL	-Balanza analítica -Autoclave -Cámara de flujo -Estufa	-Matraz Erlenmeyer de 500 mL -Cajas Petri de vidrio -Probeta de 500 mL -Jarras de anaerobiosis -Vela -Tubos de ensayo con tapa -Asa bacteriológica -Mechero de alcohol	-Agar MRS OXOID CM 0361 -Caldo MRS OXOID -Cicloheximida -Ácido acético 5 M -Agua -Agua de Peptona
Caracterización de BAL: Catalasa, Oxidasa y Tinción GRAM	-Cámara de flujo -Autoclave -Estufa -Microscopio	-Portaobjetos -Asa bacteriológica -Tubos de ensayo -Asa bacteriológica -Tijeras -Piseta -Mechero de alcohol	-Agua destilada -Peróxido de hidrogeno 3% -Tiras con reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TPD). -Cristal violeta -Solución de Lugol -Alcohol acetona -Safranina -Aceite de inmersión
Caracterización de BAL: Hemólisis, Proteólisis, Lipólisis y Ensayo de movilidad.	-Estufa -Balanza analítica -Autoclave -Cámara de flujo	-Asa bacteriológica -Cajas Petri de vidrio -Mechero de alcohol -Jarras de anaerobiosis	-Agar sangre -Agar caseína (Agar MRS + leche 5%) -Agar aceite (MRS + aceite de oliva 5%) -Agua de Peptona
Crio-preservación	-Autoclave	-Pipeta graduada de 5 mL	-Caldo MRS (OXOID)



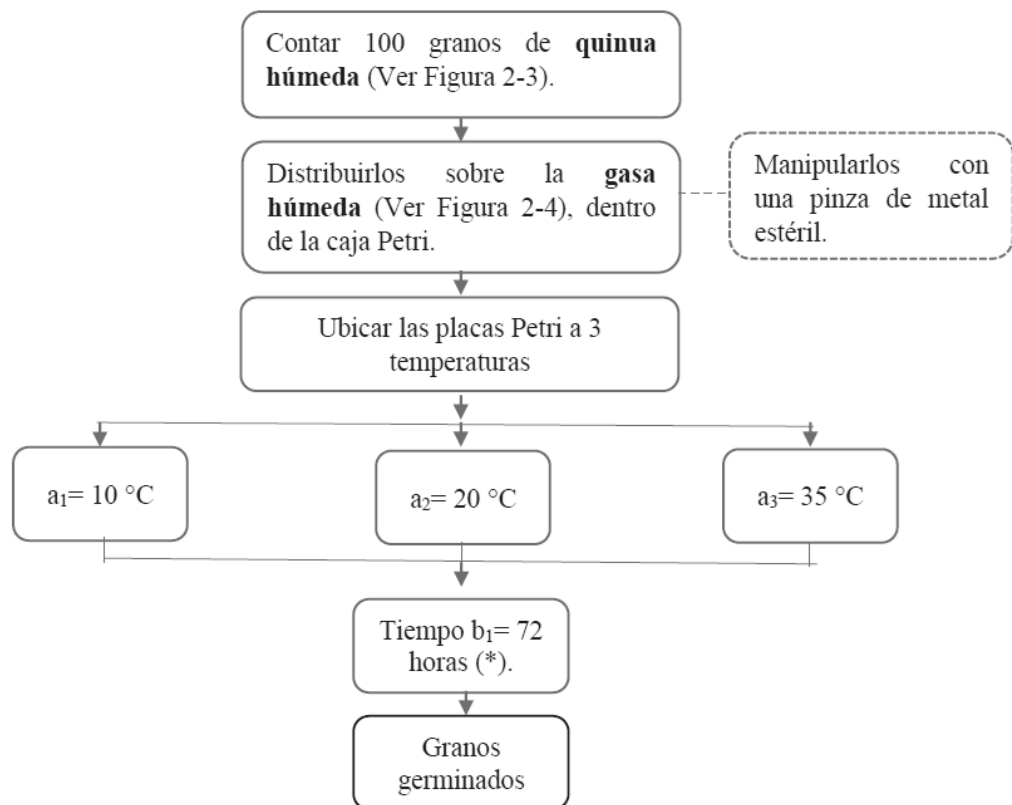
	-Cámara de flujo -Congelador GE Profile®	-Frascos de Vidro Schoot -Micropipeta de 1000 uL	-Glicerol al 99%
--	---	---	------------------

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

## 2.4. Métodos y técnicas

En este apartado, se describe el proceso de la germinación y fermentación de los granos de quinua, así como el cultivo de bacterias ácido lácticas de los cinco ensayos de fermentación. Además, se explica los factores y diseño.

### 2.4.1. Proceso para germinación de granos de quinua nativa

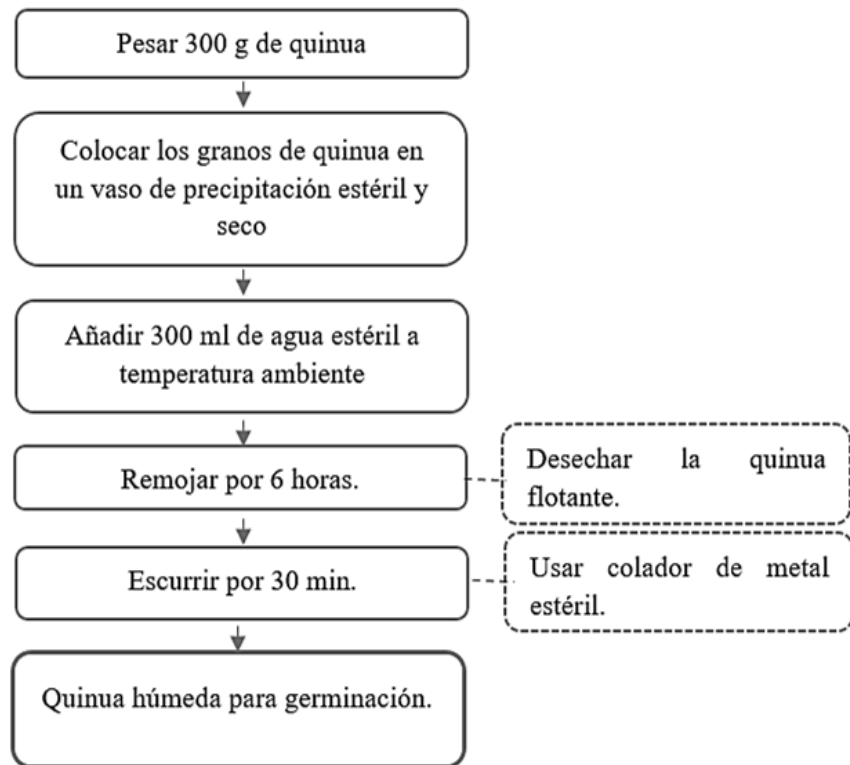


**Gráfico 1-2:** Germinación de granos de quinua.

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

(\*) Monitorizar la germinación en 3 momentos (24h, 48h y 72h) de la germinación en cada temperatura. Ver Anexo J.

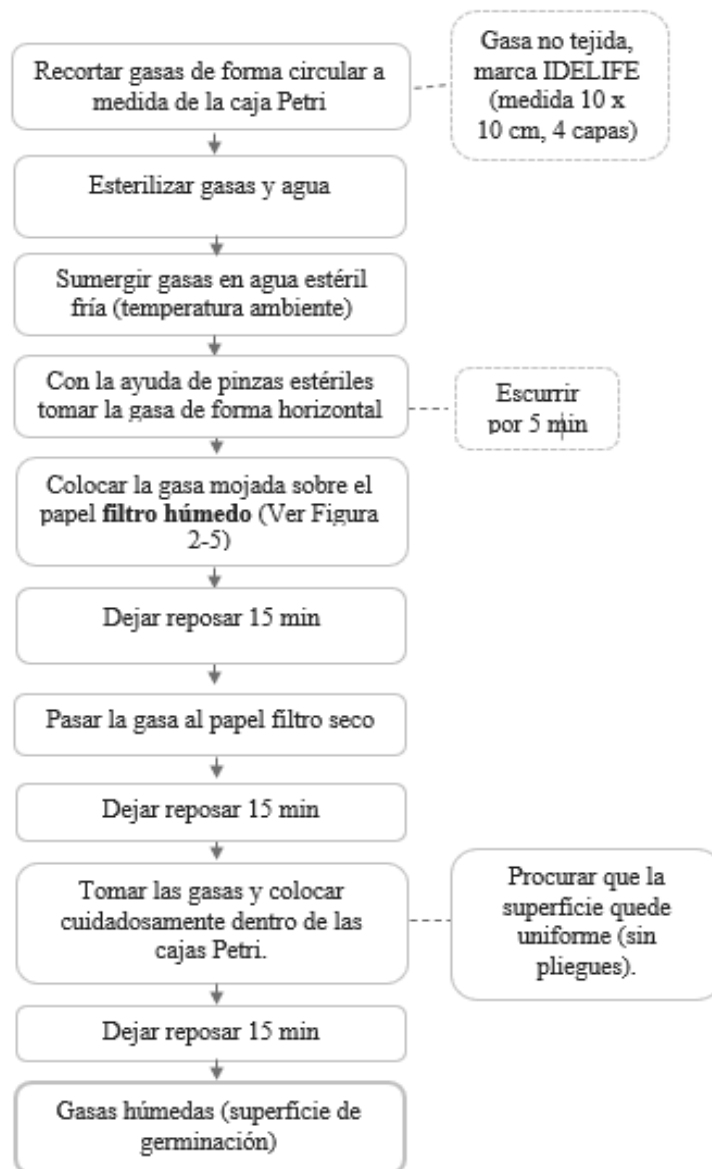
2.4.1.1. Procedimiento de humectación de granos de quinua para germinación



**Gráfico 2-2:** Humectación de los granos de quinua a germinar.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

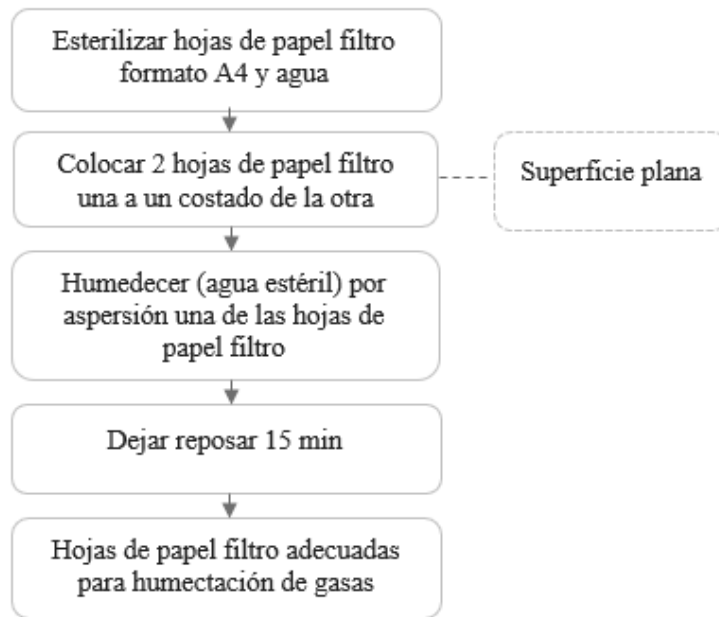
### 2.4.1.2. Procedimiento de humectación de gasa



**Gráfico 3-2:** Proceso para humedecer las gasas.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

2.4.1.3. Procedimiento para preparación del papel filtro



**Gráfico 4-2:** Procedimiento para preparación del papel filtro.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

El diseño es monofactorial con tres repeticiones análisis de medias mediante la prueba de Tukey al 5% siempre que exista significancia estadística (análisis de varianza). Los factores son a (temperatura) y b (tiempo) con tres tratamientos y combinación de niveles diferentes, esto se presenta de la siguiente manera:

**Tabla 2-2:** Factores – germinación.

<b>Factor</b>	<b>Descripción del factor</b>	<b>Nivel</b>	<b>Descripción del nivel</b>
<b>A</b>	Temperatura	a <sub>1</sub>	10 °C
		a <sub>2</sub>	20 °C
		a <sub>3</sub>	35 °C
<b>B</b>	Tiempo	b <sub>1</sub>	72 horas

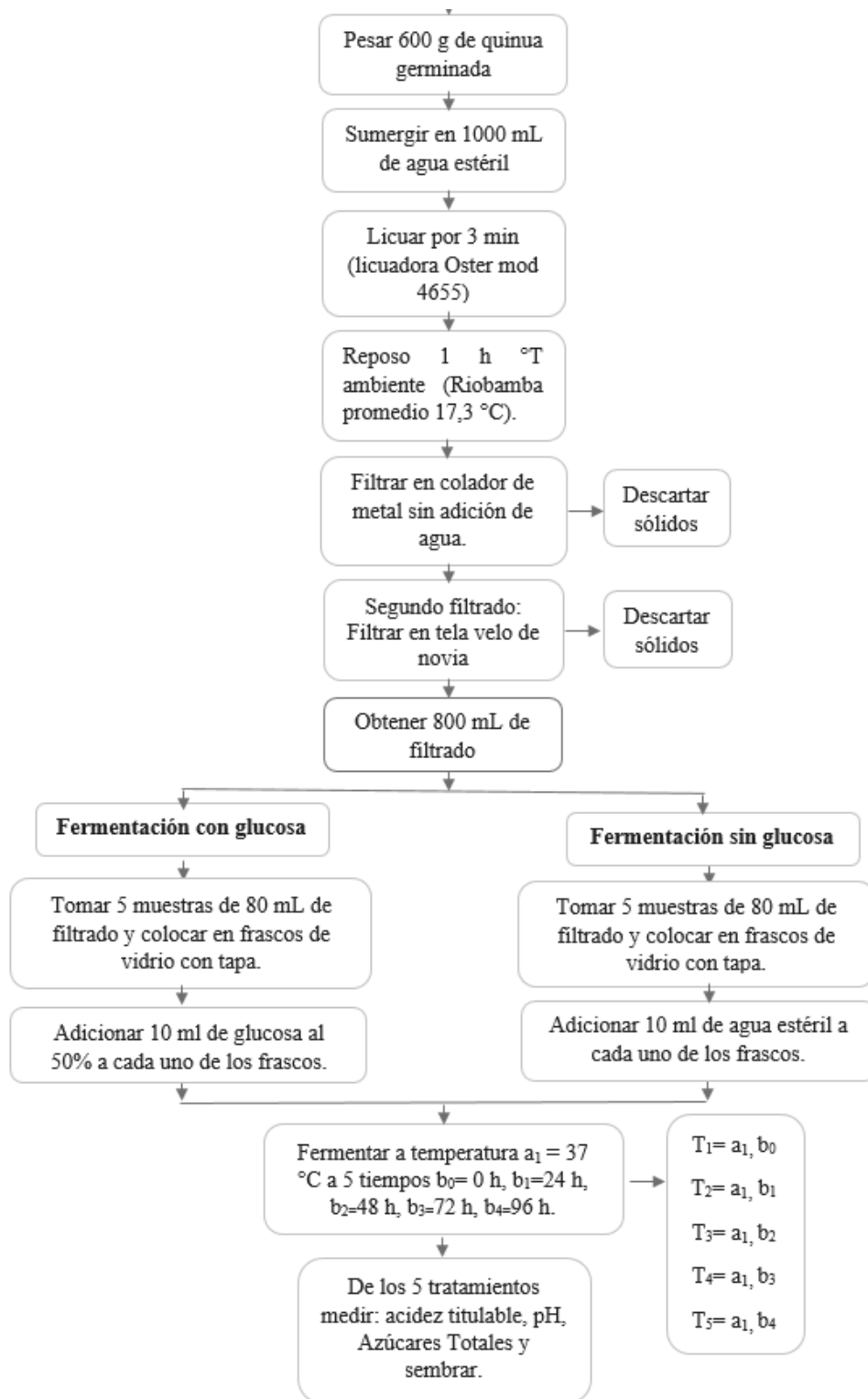
**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

**Tabla 3-2:** Tratamientos – germinación.

<b>Tratamientos</b>	<b>Combinación de niveles</b>
T <sub>1</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>1</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>
T <sub>2</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>2</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>
T <sub>3</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>3</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>3</sub> b <sub>1</sub>

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

2.4.2. *Proceso de fermentación de granos de quinua germinada según el mejor tratamiento*



**Gráfico 5-2:** Proceso de fermentación.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

- **Lectura de resultados**

Medir la acidez titulable a las 24, 48, 72 y 96 horas, esto según la norma (NTE INEN 13:1984, 2012) sobre acidez titulable de leche.

El diseño es monofactorial con tres repeticiones análisis de medias mediante la prueba de Tukey al 5% siempre que exista significancia estadística (análisis de varianza). Los factores de la fermentación son a (temperatura) y b (tiempo) con cinco tratamientos y combinación de niveles diferentes, esto se presenta de la siguiente manera:

**Tabla 4-2:** Factores – fermentación.

<b>Factor</b>	<b>Descripción del factor</b>	<b>Nivel</b>	<b>Descripción del nivel</b>
<b>A</b>	Temperatura	a <sub>1</sub>	37 °C
<b>B</b>	Tiempo	b <sub>0</sub>	0 h
		b <sub>1</sub>	24 h
		b <sub>2</sub>	48 h
		b <sub>3</sub>	72 h
		b <sub>4</sub>	96 h

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

**Tabla 5-2:** Tratamientos – fermentación.

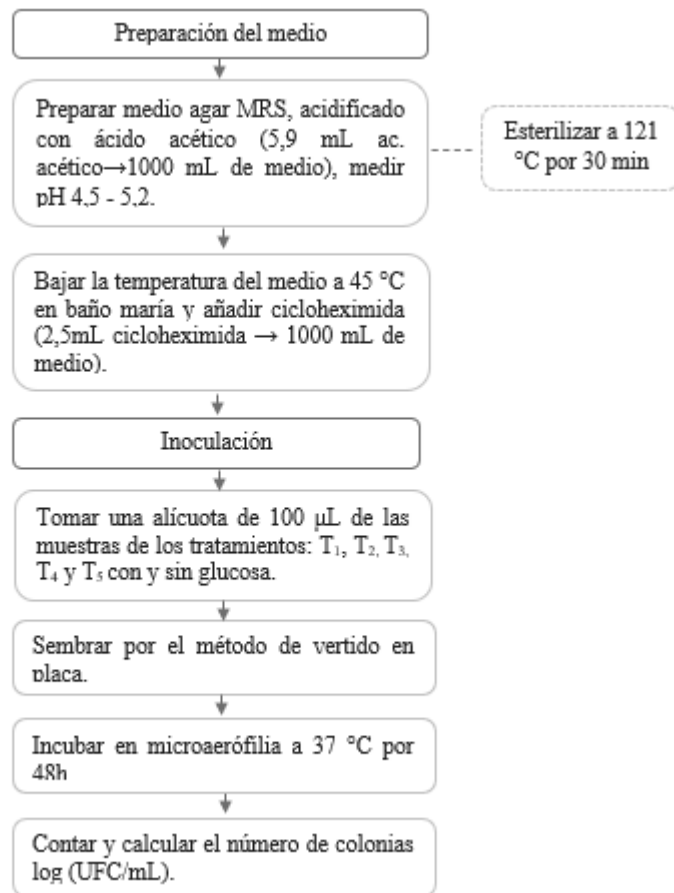
<b>Tratamientos</b>	<b>Combinación de niveles</b>
T <sub>1</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>1</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>1</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>0</sub>
T <sub>2</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>2</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>2</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>
T <sub>3</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>3</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>
T <sub>4</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>4</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>4</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>3</sub>
T <sub>5</sub> R <sub>1</sub> ; T <sub>5</sub> R <sub>2</sub> ; T <sub>5</sub> R <sub>3</sub>	a <sub>1</sub> b <sub>4</sub>

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

### **2.4.3. Proceso de cultivo de bacterias ácido lácticas de los cinco ensayos de fermentación**

Las BAL presentes en los productos de los cinco ensayos de fermentación se cultivaron siguiendo la metodología ISO 15214: 1998 actualizada al 2021 y según (Alvarado, et al., 2007; Madigan, et al., 2018; Vallejo, et al., 2018; Wong, et al., 2021; Zamora, et al., 2005; Zhu y Yang, 2020).

### 2.4.3.1. Procedimiento para el recuento de bacterias ácido lácticas



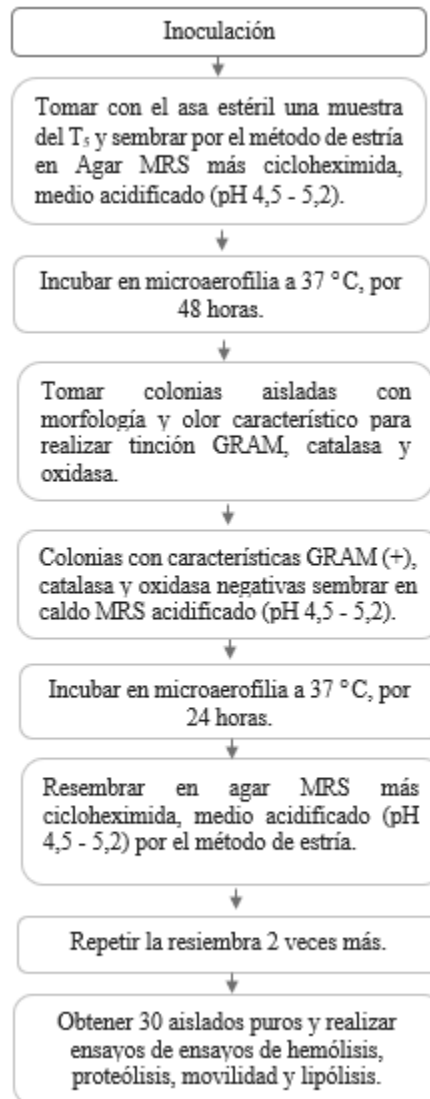
**Gráfico 6-2:** Recuento de BAL.

**Fuente:** (Zhu, et al., 2020).

**Adaptado por:** Chisag, Lourdes, 2021.



#### 2.4.3.2. Procedimiento para aislamiento, identificación y caracterización de BAL



**Gráfico 7-2:** Aislamiento y caracterización de BAL.

**Fuente:** (Zhu, et al., 2020).

**Adaptado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Se ejecutó la observación por microscopía óptica de las colonias aisladas y la tinción de Gram.

**Tinción Gram.** Se preparó un frotis bacteriano y se adicionó en secuencia los colorantes: cristal violeta 1 minuto, solución de lugol por 1 minuto, solución decolorante: alcohol- acetona se vierte sobre la placa hasta que el solvente se elimine sin color del frotis, y safranina 1 minuto. Después de cada adición de reactivo se enjuagó con agua.

Las colonias que presentaron morfología de bacilos Gram positivos se seleccionaron para posteriores ensayos.

**Oxidasa.** El material microbiano se impregnó en una tira reactiva para oxidasa, Bactident® Oxidase (OXOID), que tienen 1-naftol y dimetilparafenileno amina, la cual, en presencia de citocromo oxidasa, reacciona para formar azul de indofenol (Nachlas, et al., 1958: pp.47-48). La coloración violeta es positiva, si no hay coloración la reacción es negativa.

**Catalasa.** En un portaobjetos limpio, con un palillo estéril o aguja de inoculación de plástico desechable se colocó material procedente de una colonia con morfología típica de BAL, se adicionó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. El peróxido de hidrógeno en presencia de catalasa se descompone formando agua y O<sub>2</sub> que se evidencia como burbujeo si no hay burbujeo, la reacción es negativa, característica de *Lactobacillus* spp.

**Ensayo de hemólisis.** En placas de agar sangre se inoculó por estría o agotamiento material de una colonia típica, se incubó a 37°C durante 24 horas, después de lo cual se leyeron las placas, se reporta hemólisis alfa, si se forma una zona y aclaramiento total alrededor de la colonia, hemólisis beta si se aprecia una zona color verdoso y hemólisis gamma cuando no se produce hemólisis.

**Proteólisis.** Para este ensayo se empleó agar caseína, preparado a partir de agar MRS con leche descremada al 5%, las placas se inocularon mediante la técnica siembra por estría, se incubó a 30°C durante 72 h. La presencia de halos de aclaramiento alrededor de las colonias, indican su actividad proteolítica.

**Lipólisis.** El ensayo empleó placas de agar para lipolíticos adicionadas de aceite de oliva, se inocularon mediante estriado de las placas. El ensayo es positivo cuando se observan halos de aclaramiento alrededor de las UFC.

#### 2.4.3.3. Procedimiento para conservación de BAL

Se construyó un banco de BAL con 30 aislamientos, previamente purificados en Agar MRS (OXOID CM 0361) y caracterizadas fenotípicamente. Se procedió tomando material de una colonia y transfiriendo a 5 mL de caldo MRS (OXOID CM 0359). Se incubó a 37°C, durante 18 horas. Después del crecimiento del cultivo, la suspensión microbiana se vertió en frascos de vidrio con 5 mL de glicerol al 30%, la mezcla se homogeneizó y se repartió 1000 µL en crioviales hasta obtener 10 copias de la misma cepa aislada, se codificó y se procedió a congelar a -20°C (Gutiérrez y Jimenes, 2015: pp.28-29).

## **2.5. Análisis estadístico**

El análisis estadístico del estudio se efectuó mediante la prueba de normalidad. Debido a que los datos siguen una distribución normal estandarizada, se utiliza el análisis de la varianza (ANOVA) mientras que para medir las diferencias significativas se consideró la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ) (Cajigas y Aguirre , 2019: pp.24-26). Además, de un análisis descriptivo mediante medidas de dispersión como la desviación típica más el margen de error.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1. Definición del proceso de germinación del grano de quinua nativa

El procedimiento específico para germinación de los granos de quinua está sustentado y adaptado bajo el método para germinación (Campos y Ponce, 2017; Chaparro, et al., 2011; Mina, 2014; Moreno, 2016). El procedimiento definido y utilizado en el presente trabajo se encuentra en metodología, (Gráfico 1-2).

Finalmente, el proceso de germinación establecido permitió ensayar tratamientos a tres temperaturas por 72 horas, con los cuales se definió 20 °C como la temperatura óptima de germinación, en función a los resultados detallados a continuación.

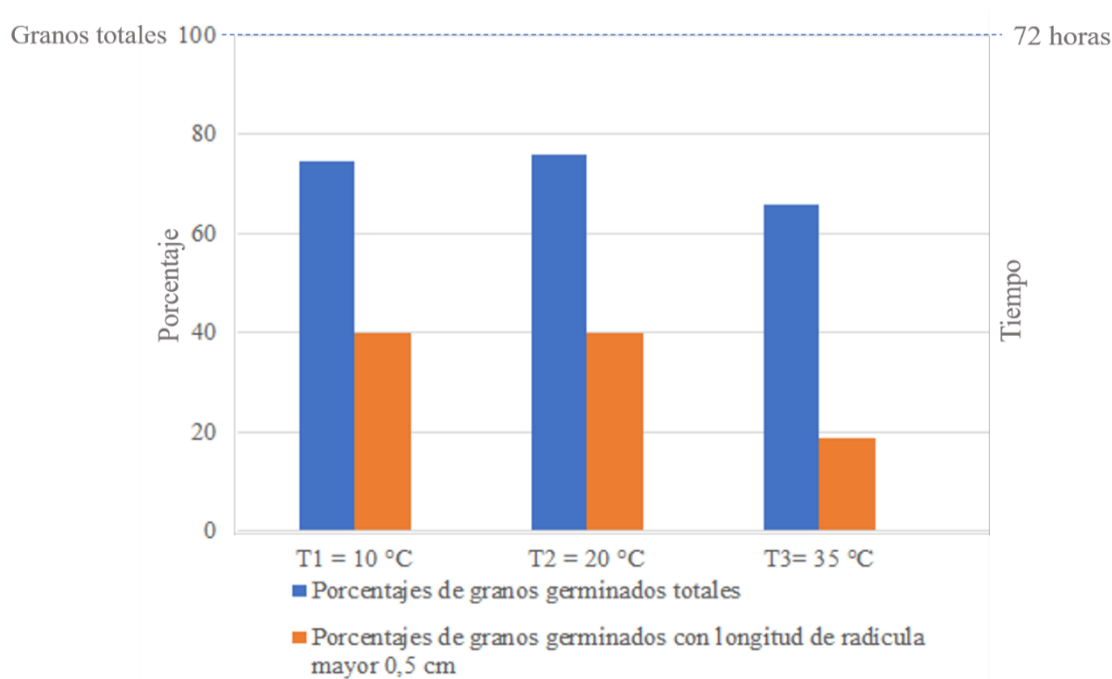
##### 3.1.1. Porcentaje de germinados totales y germinados con radícula mayor a 0,5 cm

**Tabla 1-3:** Resultados porcentuales de germinación, a tres temperaturas (10 °C, 20 °C y 35 °C) por 72 horas.

Temperatura	Repeticiones	Porcentajes de granos germinados totales	Porcentajes de granos germinados con longitud de radícula mayor 0.5 cm	Promedios	
				Porcentajes de granos germinados totales	Porcentajes de granos germinados radícula mayor 0,5 cm
10 °C	r <sub>1</sub>	70	40	74,33	40,00
	r <sub>2</sub>	76	38		
	r <sub>3</sub>	77	42		
20 °C	r <sub>1</sub>	72	41	75,67	40,00
	r <sub>2</sub>	76	39		
	r <sub>3</sub>	79	40		
35 °C *	r <sub>1</sub>	69	18	65,67	18,67
	r <sub>2</sub>	65	20		
	r <sub>3</sub>	63	18		

\*Condición experimental establecida.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.



**Gráfico 1-3:** Porcentajes de germinación en 72 horas, germinados totales y germinados con radícula mayor 0,5 cm de los tratamientos (10 °C, 20 °C y 35 °C).

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Los resultados que muestra la figura expresa que el mejor tratamiento de germinación ocurre a los 20 °C debido a que presenta el mayor porcentaje de granos germinados totales (no se consideró la longitud de la radícula), dentro de los cuales se encuentran aquellos que superan los 0,5 cm de longitud dónde no se halla diferencia aparente entre 10 y 20 °C al haberse cumplido las 72 horas.

### 3.1.2. Análisis estadístico

#### 3.1.2.1. Análisis de varianza de porcentajes de germinados totales y germinados con radícula mayor a 0,5 cm

**Tabla 2-3:** Análisis de varianza para porcentajes de germinación total de granos de quinua y germinación de radícula con longitud mayor a 0.5 cm por 72 horas a 3 temperaturas.

Fuente de variación	GL	Porcentaje de granos germinados totales	Porcentaje de granos germinados con longitud de la radícula mayor 0.5 cm
Tratamientos	2	88.44*	455.11**
Error	6	12.00	2.11
Media		72.00	33.00
CV		0.08	0.33

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Según el análisis de varianza se puede observar que el porcentaje de granos germinados entre los tres tratamientos tiene una variación significativa, mientras que el porcentaje de germinados con longitud de radícula mayor a 0,5 cm muestran una variación altamente significativa. Esto explica que en granos germinados totales hay un valor promedio similar entre los tratamientos planteados 10 y 20 °C, y que estos tienen una diferencia considerable con respecto al tratamiento de 35 °C, mientras que en granos germinados con radícula mayor a 0,5 cm hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos ensayados 10, 20 y 35°C. El promedio de los tres tratamientos expresados en porcentaje de granos germinados totales (72) supera al porcentaje de granos germinados con longitud de radícula mayor a 0,5 (33) porque al final de las 72 horas se contabilizan todos los granos que tengan cualquier forma de evidencia de germinación. Esto se ratifica con el análisis de tukey y que al final indica como mejor tratamiento de germinación correspondiente a 20 ° C.

### 3.1.2.2. Prueba de Tukey para germinados totales

**Tabla 3-3:** Prueba de Tukey (al 5%) para comparar la germinación promedio a tres temperaturas del porcentaje de granos germinados totales.

Temperatura (°C)	Media (%)	Agrupación	
20	75.67	A	
10	74.33	A	B
35	65.67		B

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

En la tabla 3-3, se puede observar que el mayor porcentaje de germinados totales se dio a 20 y 10 °C y no tienen mayor diferencia. Mientras que en relación con la generada a 35 °C si existe cierta diferencia porque la de 35 °C si difiere significativamente respecto a la de 20 °C. Según este análisis el mejor tratamiento correspondería a 20 °C.

### 3.1.2.3. Prueba de Tukey para germinados con radícula mayor a 0,5 cm

**Tabla 4-3:** Prueba de Tukey (al 5 %) de la germinación promedio del porcentaje de granos germinados con longitud de radícula mayor a 0.5 cm en 72 horas a 3 temperaturas.

Temperatura (°C)	Media (%)	Agrupación	
10	40.00	A	
20	40.00	A	
35	18.67		B

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

En la Tabla 4-3 se muestra que los tratamientos de 10 y 20 °C no difieren en sus promedios, pero si difieren considerablemente con los germinados a 35 °C. Según esto el mejor tratamiento de germinación respondería a 10 o 20 ° C.

Al comparar los promedios de 10 °C y 20 °C según Tukey al 5% no existe diferencia estadística mientras que en la temperatura de 35°C se puede observar un valor mucho menor de granos que no superan una longitud mínima de 0,5 cm.

Según el análisis de varianza y pruebas de tukey se puede concluir que el tratamiento de granos de quinua a 20 °C según la metodología aplicada es el tratamiento adecuado para ser utilizado en el proceso de fermentación y cultivo de BAL propuestos.

Mientras en el presente estudio las mejores temperaturas para la germinación de la quinua fueron 10 y 20 °C, en otro estudio, a 15 y 35°C la germinación ha sido mayor (Mamedi, et al., 2017), evidenciando que la temperatura juega un papel fundamental en la regulación de los procesos vitales de las plantas, como la germinación de semillas (Mamedi, et al., 2017: pp.53-54). En contraste, a 35°C la germinación de los granos de quinua no resultó ser mejor que a 20°C.

Por lo que en el presente trabajo se pudo citar los resultados a 35° C como una excepción ya que debido a la metodología aplicada pudo existir estas variaciones que influyen en el crecimiento de los granos de quinua.

En condiciones de campo la germinación de la quinua tarda entre siete a diez días, es decir hasta la emergencia de la plántula (Arenas y Heredia, 2017: pp.43-44). De acuerdo con Rivera, el 80 % de las semillas germinaron a los seis días (Arenas y Heredia, 2017: pp.53-54). En este estudio el proceso de germinación fue llevado a cabo a nivel de laboratorio y es importante que la germinación ocurra en un tiempo menor. Sin embargo, en la evaluación realizada sobre genotipos de quinua, encontró que algunas semillas alcanzaron el 100% de germinación en diez horas a una temperatura de 20°C y la misma muestra alcanzó el mismo resultado a 2°C en 65 horas (Arenas y Heredia, 2017: pp.43-44). Dicho reporte coincide con el resultado de este ensayo y, por tanto, es posible establecer que la quinua utilizada ha sido sometida a las temperaturas idóneas para la germinación.

### **3.2. Proceso de fermentación establecido**

El procedimiento específico para fermentación de los granos germinados de quinua está sustentado y adaptado bajo el método para fermentación (Bernabé, et al., 2017; Bernal y Padilla, et al., 2014; Ferrari, et al., 2020; Maldonado, et al., 2018; Suárez, 2018; Vásquez y Chávez, 2016). El procedimiento establecido y utilizado en el presente trabajo se encuentra en metodología, (Gráfico 5-2).

El proceso de fermentación establecido permitió ensayar tratamientos de fermentación a cinco tiempos (37 °C) utilizando como base para la fase fermentativa granos germinados según el mejor tratamiento de germinación, y definir el mejor tiempo de fermentación realizando un monitoreo

de parámetros como: acidez, pH, concentración de azúcares. Los resultados se observan a continuación.

### Resultados obtenidos del proceso de fermentación establecido

La fermentación se realizó a partir de una muestra óptima germinada, sin glucosa y con glucosa. Se adicionó glucosa para asegurar las condiciones del proceso, ante la posibilidad de insuficiencia del sustrato en el grano original.

#### 3.1.3. Resultados de acidez titulable

**Tabla 5-3:** Porcentajes de acidez titulable en fermentados de granos germinados de quinua, a 37 °C sin glucosa y con glucosa en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h).

Fermentados sin glucosa (% ácido láctico)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	0,151	0,187	0,443	0,532	0,552
r2	0,153	0,178	0,448	0,544	0,570
r3	0,151	0,185	0,441	0,533	0,561
Fermentados con glucosa (% ácido láctico)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	0,155	0,191	0,452	0,529	0,560
r2	0,160	0,187	0,459	0,527	0,560
r3	0,158	0,196	0,453	0,534	0,570

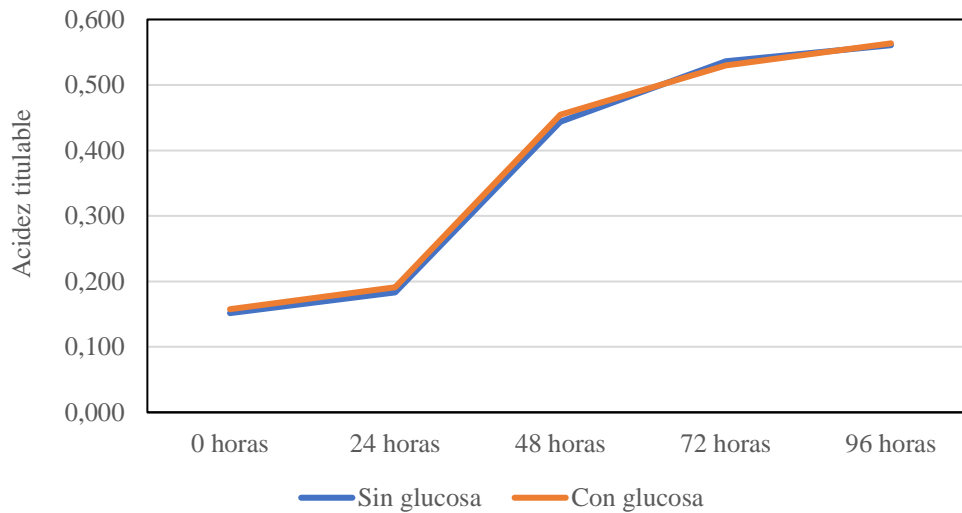
Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

**Tabla 6-3:** Promedios porcentuales de acidez titulable a cinco tiempos.

Fermentados sin glucosa (% ácido láctico)				
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
0,152	0,183	0,444	0,536	0,561
Fermentados con glucosa (% ácido láctico)				
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
0,158	0,191	0,455	0,530	0,563

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.





**Gráfico 2-3:** Promedios porcentuales de acidez titulable en fermentados, a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Según los resultados observados en el Gráfico 2-3 se puede evidenciar el comportamiento en términos de acidez conforme transcurre el tiempo de fermentación, de modo que es posible detectar un incremento a medida que se alarga el tiempo de fermentación, pero es preciso mencionar que el mayor incremento ocurre entre las 24 y 48 horas, tanto en los fermentados sin glucosa y con glucosa es decir que en este ensayo no influyó la adición o no de glucosa ya que se puede observar un mismo o similar comportamiento en ambos casos.

El mejor tiempo de fermentación se considera a las 96 horas debido a que es donde se presenta mayor acidez, el incremento de la acidez es indicativo de la actividad de las BAL quienes como producto de su metabolismo generan ácido láctico, si bien en el intervalo de tiempo entre 72 y 96 horas el porcentaje de acidez no se incrementa significativamente, es decir que tiende a ser constante, 96 horas sigue siendo el tratamiento con mayor porcentaje de acidez en comparación a los resultados obtenidos en los otros tiempos.

### 3.1.4. Análisis estadístico

#### 3.1.4.1. Análisis de varianza

**Tabla 7-3:** Análisis de varianza de la concentración de acidez en fermentados de granos germinados de quinua, sin y con glucosa a 37 °C.

Fuente de variación	GL	Acidez titulable (fermentados sin glucosa)	Acidez titulable (fermentados con glucosa)
Tratamientos	4	0.113981**	0.110144**
Error	10	0.000032	0.000017
Media		0.375	0.379
CV		0.48	0.47

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Según el análisis de varianza, el porcentaje de acidez entre los cinco tratamientos tiene una variación altamente significativa, debido a que el incremento del valor de acidez no es similar en los tiempos establecidos, ya que se observa una gran diferencia entre el lapso de 24 a 72 horas aparentemente, tanto en los fermentados sin y con glucosa.

El promedio de acidez de los cinco tratamientos es similar en los fermentados con glucosa y sin glucosa. La acidez en los fermentados sin glucosa fue detectada sin ningún contratiempo y los fermentados con glucosa mantienen la misma tendencia en concentración de acidez cumpliendo la función de respaldar la eventual posibilidad de insuficiencia de sustrato en los fermentados sin glucosa.

#### 3.1.4.2. Prueba de tukey

**Tabla 8-3:** Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de acidez en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C.

Horas	Media (%)	Agrupación				
96	0.561	A				
72	0.536		B			
48	0.444			C		
24	0.183				D	
0	0.152					E

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

La prueba de Tukey confirma que existe diferencia entre todos los tratamientos, no solamente entre el lapso de 24 a 72 horas como se observó aparentemente en el Gráfico 2-3, según Tukey el

mejor tiempo de fermentación para los fermentados sin glucosa es de 96 horas, ya que es el que tiene mayor porcentaje de acidez.

**Tabla 9-3:** Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de acidez en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C.

Horas	Media (%)	Agrupación				
96	0.564	A				
72	0.530		B			
48	0.455			C		
24	0.191				D	
0	0.158					E

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Los resultados según la prueba de tukey para fermentados con glucosa, muestran que existe diferencia entre todos los tratamientos, dónde el mejor tratamiento correspondió a fermentación por 96 horas debido a la concentración de acidez.

Los resultados de la acidez de las muestras con glucosa y sin glucosa, no muestran ninguna diferencia en el comportamiento en las diferentes horas a las que fueron tratadas, lo cual, permite deducir que la aplicación o no de glucosa es irrelevante en el comportamiento de esta variable, durante este proceso de fermentación.

La acidez aumenta gradualmente, conforme pasa el tiempo, lo cual según (Llacsá y Cucho, 2019), es adecuado en una fermentación. El aumento de la acidez de acuerdo con el tiempo sugiere la transformación del almidón y la fibra de los granos de quinua en azúcares fermentables (Llombart, 2021, p.101) y a diferentes compuestos ácidos que se forman en este proceso (ácido láctico, ácido succínico, ácido acético, etc) (García y Mamani, 2008: pp.66-67). Temperaturas superiores a 30 °C contribuyen al crecimiento de bacterias ácido lácticas, por ello es recomendable que, una vez alcanzado el nivel deseado se disminuya la temperatura a 10 °C (Romero, 2019), por tanto, se puede considerar como idóneo el procedimiento realizado en esta investigación, ya que el objetivo es cuantificar las bacterias ácido lácticas presentes en los fermentados.

### 3.1.5. Resultados de pH

**Tabla 10-3:** Resultados de pH, de fermentados sin glucosa y con glucosa a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

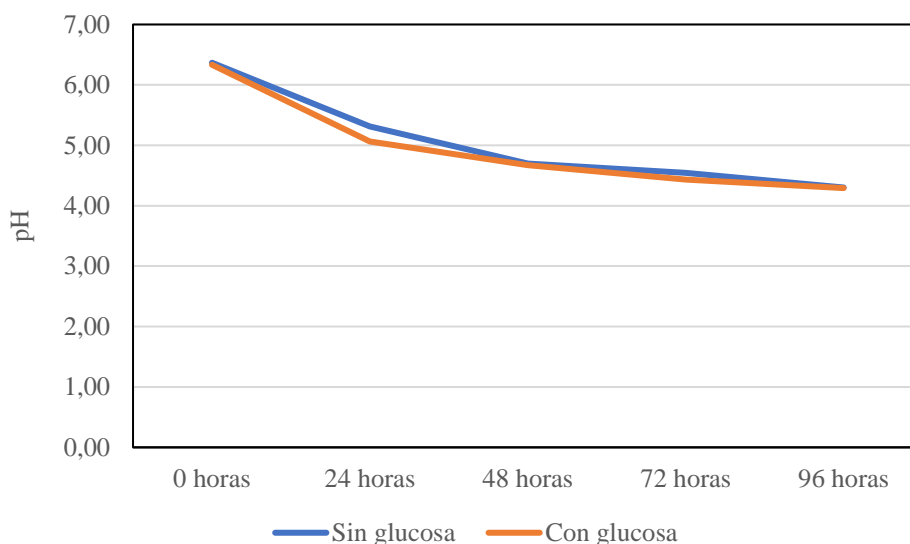
Fermentados sin glucosa (pH)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	6,39	5,49	4,74	4,51	4,30
r2	6,36	5,47	4,66	4,52	4,33
r3	6,36	4,98	4,71	4,60	4,28
Fermentados con glucosa (pH)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	6,37	5,11	4,67	4,41	4,29
r2	6,34	4,99	4,64	4,40	4,29
r3	6,30	5,09	4,71	4,50	4,30

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

**Tabla 11-3:** Promedios de pH en cinco tiempos a 37 °C.

Fermentados sin glucosa (pH)					
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
6,37	5,31	4,70	4,54	4,30	
Fermentados con glucosa (pH)					
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
6,33	5,06	4,67	4,43	4,29	

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.



**Gráfico 3-3:** Promedios de pH en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

El Gráfico 3-3 expresa los valores promedio de pH en el que se puede observar su comportamiento, a medida que transcurre el tiempo de fermentación el pH disminuye, es decir que la relación entre el tiempo de fermentación y pH es inversamente proporcional, además se observa que entre 0 y 48 horas ocurre el descenso más importante, tanto en los fermentados sin glucosa como en los fermentados con glucosa de modo que en este ensayo no influyó la adición de glucosa ya que existe un comportamiento similar en ambos casos.

El mejor tiempo de fermentación se considera a las 96 horas debido a que es donde se presenta menor pH lo que se consideró favorable, debido a la capacidad de las bacterias lácticas, de producir grandes cantidades de ácido láctico y acético, tiene como efecto la disminución del pH (Wong, et al., 2021: pp.57-58), si bien en el intervalo de tiempo entre 72 y 96 horas el pH no se incrementa significativamente, es decir que tiende a ser constante, éste sigue siendo mayor en comparación a los resultados obtenidos en los otros tiempos.

### 3.1.6. Análisis estadístico

#### 3.1.6.1. Análisis de varianza

**Tabla 12-3:** Análisis de varianza del pH en fermentados de granos germinados de quinua, sin y con glucosa a 37 °C.

Fuente de variación	GL	pH (fermentados sin glucosa)	pH (fermentados con glucosa)
Tratamientos	4	205.645**	202.766**
Error	10	0.01781	0.00201
Media		5.044	4.958
CV		0.15	0.15

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Según el análisis de varianza, los valores de pH entre los cinco tratamientos presentan una variación significativa independiente en los fermentados con glucosa y sin glucosa, ya que se observa mayor diferencia entre el lapso de 0 a 48 horas aparentemente, quedando en precisar si en los tiempos de 72 y 96 horas existe o no una diferencia significativa (particularidad que se aclara con la prueba de Tukey), tanto en los fermentados sin y con glucosa. El promedio de pH de los cinco tratamientos es similar en ambos casos observándose un tanto mayor en los fermentados sin glucosa. El pH en los fermentados sin glucosa fue detectado sin ningún contratiempo y los fermentados con glucosa mantienen la misma tendencia en términos de pH cumpliendo la función de respaldar la eventual posibilidad de insuficiencia de sustrato en los fermentados sin glucosa.

#### 3.1.6.2. Prueba de tukey

**Tabla 13-3:** Prueba de tukey (al 5%), para pH en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C.

Horas	Media (pH)	Agrupación			
0	6.37	A			
24	5.31		B		
48	4.70			C	
72	4.54			C	D
96	4.30				D

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

La prueba de Tukey confirmó que existe diferencia entre los tratamientos de 0 a 48 horas, además entre 48 y 72 horas no existe diferencia estadística, y tampoco entre 72 y 96 horas, por tanto, el mejor tiempo para los fermentados sin glucosa fue de 72 y 96 horas, ya que son los que tienen menor pH, las bacterias del ácido láctico pueden tolerar un pH bajo, altas concentraciones de sal y tratamientos térmicos (Dillon, 2014, p.87). El metabolismo de los carbohidratos por las BAL en las fermentaciones de alimentos a menudo está limitado por la acidificación y el bajo pH (Gaenzle, 2015, p.115).

**Tabla 14-3:** Prueba de tukey (al 5%), para pH en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C.

Horas	Media (pH)	Agrupación				
0	6.33	A				
24	5.06		B			
48	4.67			C		
72	4.43				D	
96	4.29					E

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

La prueba de Tukey para fermentados sin glucosa indica que, a medida que la acidez en el fermentado aumente, el pH disminuya, así fue evidenciado en esta investigación. El comportamiento del pH en las muestras de fermentación sin glucosa no muestra una alta diferencia en relación con aquellas con glucosa, hasta las 72 horas, sin embargo, en el primer caso (fermentación sin glucosa), a las 72 y 96 horas no existe diferencia en los resultados, lo cual es contrario al segundo caso (fermentación con glucosa), donde, es diferente el resultado a las 72 y 96 horas. El valor de pH es decreciente durante el proceso de fermentación, debido a la formación de ácidos (Onefre, 2018, p.43).

Según el análisis estadístico el mejor tiempo de fermentación ocurrió a las 96 horas debido a que tiene el menor pH, además es preciso mencionar que si bien hubo diferencia estadística entre las 72 y 96 horas en fermentados con y sin glucosa en ambos casos se tomó el tratamiento de 96 horas como el mejor (según tukey) es decir que en este ensayo tampoco influyó la adición de glucosa.

### 3.2.1. Resultados de azúcares totales

**Tabla 15-3:** Resultados porcentuales de azúcares totales para fermentados sin glucosa y con glucosa en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

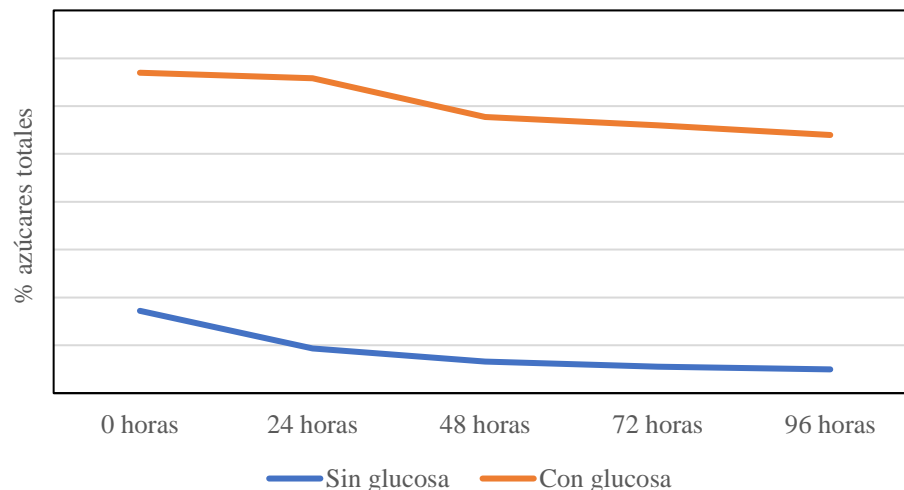
Fermentados sin glucosa (%)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	1,736	0,926	0,658	0,521	0,481
r2	1,761	0,977	0,668	0,568	0,500
r3	1,667	0,893	0,654	0,568	0,510
Fermentados con glucosa (%)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	6,579	6,410	5,682	5,556	5,319
r2	6,757	6,579	5,814	5,682	5,435
r3	6,757	6,757	5,814	5,556	5,435

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

**Tabla 16-3:** Promedios porcentuales de azúcares totales en cinco tiempos a 37 °C.

Fermentados sin glucosa (%)					
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
1,721	0,932	0,660	0,552	0,497	
Fermentados con glucosa (%)					
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
6,698	6,582	5,770	5,598	5,396	

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.



**Gráfico 4-3:** Promedios porcentuales de azúcares totales a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.



De acuerdo a los resultados que muestra la gráfica es posible observar el consumo de sustrato presente en los fermentados con y sin glucosa donde se evidencia que a medida que el tiempo de fermentación avanza la curva que indica la concentración de azúcares totales disminuye, es decir que en este ensayo existió una relación inversamente proporcional, donde el mayor valor se presentó a las 0 horas tomando en cuenta que aún no empieza el proceso de fermentación por tanto aún no se consume el azúcar presente en la muestra.

El mejor tiempo aparente de acuerdo a la figura se consideraría 96 horas debido a que es donde se ha consumido mayor cantidad de sustrato por lo que supone actividad de BAL presentes en el fermentado, afirmación que será respaldada o rechazada con la prueba de tukey.

### 3.1.7. Análisis estadístico

#### 3.1.7.1. Análisis de varianza

**Tabla 17-3:** Análisis de varianza de porcentajes de azúcares *totales* en fermentados de granos germinados de quinua, sin y con glucosa a 37 °C.

Fuente de variación	GL	Azúcares totales (fermentados sin glucosa)	Azúcares totales (fermentados con glucosa)
Tratamientos	4	0.7591**	105.31**
Error	10	0.0010	0.0112
Media		0.873	6.009
CV		0.53	0.09

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Los resultados presentes en la tabla muestran que en los fermentados sin glucosa presentaron una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados, debido a que entre el lapso de 0 a 48 se observa la mayor variación, quedando por precisar mediante el análisis de Tukey. El promedio de azúcares totales de los cinco tratamientos es diferente en ambos casos observándose mayor porcentaje en los fermentados con glucosa lo que es completamente lógico. El porcentaje de azúcares totales en los fermentados sin glucosa fue detectado sin ningún contratiempo y los fermentados con glucosa mantienen la misma tendencia en términos de consumo de sustrato, respaldando la eventual posibilidad de insuficiencia de sustrato, que según lo observado fue innecesaria la adición de glucosa.

### 3.1.7.2. Prueba de tukey

**Tabla 18-3:** Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de azúcares totales en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C.

Horas	Media (%)	Agrupación			
0	1.721	A			
24	0.932		B		
48	0.660			C	
72	0.552				D
96	0.497				D

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

La prueba de Tukey mostró diferencia estadística entre los tratamientos de 0, 24, 48 y 72 horas, y según este análisis entre 72 y 96 horas no existe diferencia significativa, por tanto, se tomó el fermentado con menor contenido de sustrato debido a que su disminución se consideró por la actividad de BAL presentes en el fermentado ya que, en el proceso de fermentación del ácido láctico puro, las bacterias del ácido láctico utilizan glucosa como fuente de carbono para producir piruvato a través de la glucólisis y luego producen ácido láctico bajo la acción del lactato deshidrogenasa (Wang, 2021, p.76).

**Tabla 19-3:** Prueba de tukey (al 5%), para porcentajes de azúcares totales en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37°C.

Horas	Media (%)	Agrupación			
0	6.698	A			
24	6.582	A			
48	5.770		B		
72	5.598		B	C	
96	5.396				C

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

La prueba de Tukey para azúcares totales de los fermentados con glucosa tuvo un comportamiento similar al anterior (fermentados sin glucosa) observándose una continua disminución de sustrato, además no se observó diferencias significativas entre 0 y 24 horas, 48 y 72 horas, y tampoco entre 72 y 96 horas siendo estos tratamientos los que poseen el menor valor de porcentaje de azúcares, en este ensayo se tomó el tratamiento de 96 horas, aquellas muestras sometidas a tratamientos con glucosa tienen mayor contenido de azúcares al llegar a las 96 horas, lo cual permite deducir que pueden aumentar las UFC en este estudio, si se extendiese el tiempo a más de 96 horas.

### 3.2. Resultados del recuento de BAL (log UFC/mL)

**Tabla 20-3:** Resultados del recuento de BAL (log UFC/mL) para fermentados sin glucosa y con glucosa en cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

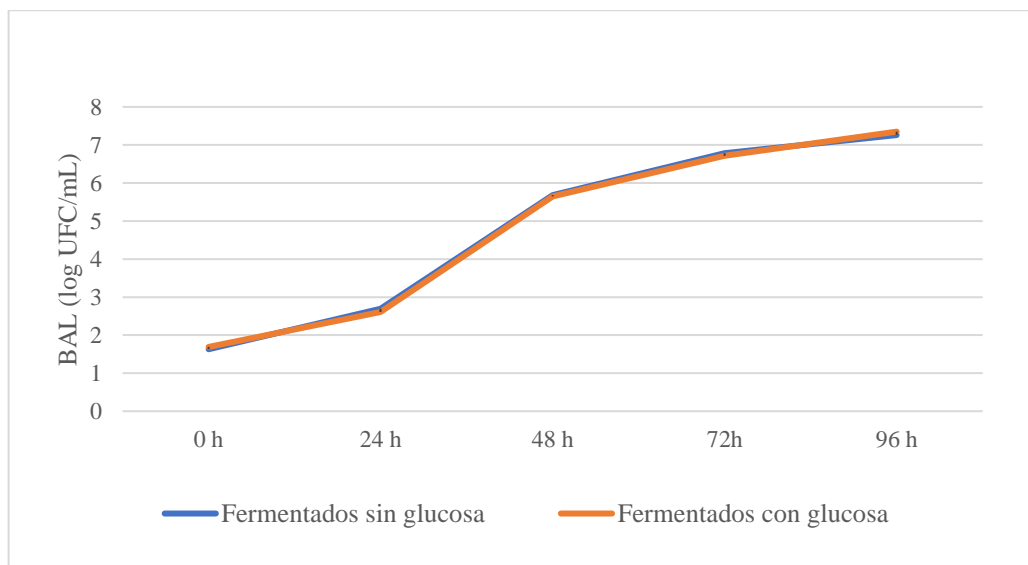
Fermentados sin glucosa (log UFC/mL)					
T/ r	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	1,57	2,82	5,68	6,73	7,20
r2	1,66	2,61	5,63	6,76	7,08
r3	1,66	2,63	5,72	6,86	7,52
Fermentados con glucosa (log UFC/mL)					
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
r1	1,74	2,63	5,82	6,90	7,25
r2	1,68	2,57	5,46	6,62	7,56
r3	1,64	2,64	5,68	6,63	7,22

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

**Tabla 21-3:** Promedio del recuento de BAL (log UFC/mL) en cinco tiempos a 37 °C.

Fermentados sin glucosa (log UFC/mL)					
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
1,63	2,69	5,68	6,78	7,26	
Fermentados con glucosa (log UFC/mL)					
0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	
1,69	2,61	5,65	6,72	7,35	

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.



**Gráfico 5-3:** BAL (log UFC/mL) a cinco tiempos (0h, 24h, 48h, 72h y 96h) a 37 °C.

Realizado por: Chisag, Lourdes, 2021.

De acuerdo con los resultados que muestra la gráfica, el crecimiento de colonias BAL es exponencial a medida que transcurre el tiempo, es decir que en este ensayo se muestra una relación directamente proporcional entre el tiempo de fermentación y cantidad de UFC, además es posible observar que el incremento más notable de la población bacteriana ocurre en el intervalo de 24 a 48 horas.

### 3.2.1. Análisis estadístico

#### 3.2.1.1. Análisis de varianza

**Tabla 22-3:** Análisis de varianza para las BAL cuantificadas (log UFC/mL) en fermentados de granos germinados de quinua (sin glucosa y con glucosa).

Fuente de variación	GL	log UFC/mL (fermentados sin glucosa)	log UFC/mL (fermentados con glucosa)
Tratamientos	4	18,9726**	19,0275**
Error	10	0,0149	0,0195
Media		4,808	4,804
CV		0,48	0,49

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Mediante el análisis de varianza es posible observar que los valores de los recuentos de BAL presentan una variación altamente significativa entre los cinco tratamientos de igual forma en el caso de los fermentados con glucosa, en este ensayo se observa mayor variación en lapso de 24 a 48 horas aparentemente, lo cual requirió ser precisado mediante la prueba de Tukey para verificar si en los otros tratamientos existe o no diferencia estadística, tanto en los fermentados sin y con glucosa. El promedio del recuento de BAL de los cinco tratamientos es similar en ambos casos sin notarse diferencia entre adición o no de glucosa.

#### 3.2.1.2. Prueba de tukey

**Tabla 23-3:** Prueba de tukey (al 5%), para cantidad de BAL en fermentados sin glucosa de granos germinados de quinua, a 37 °C.

Horas	Media (log UFC/mL)	Agrupación				
96	7,27	A				
72	6,78		B			
48	5,68			C		
24	2,69				D	
0	1,63					E

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Según Tukey al 5 % las muestras sometidas a fermentación sin adición de glucosa fueron estadísticamente diferentes entre todos los tratamientos siendo 96 horas el que presenta mayor crecimiento de BAL en comparación a los otros tratamientos a las temperaturas establecidas.

**Tabla 24-3:** Prueba de tukey (al 5%), para cantidad de BAL en fermentados con glucosa de granos germinados de quinua, a 37 °C.

Horas	Media (log UFC/mL)	Agrupación				
96	7,35	A				
72	6,72		B			
48	5,66			C		
24	2,61				D	
0	1,69					E

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

El comportamiento de las UFC fue similar en la fermentación con glucosa, donde se observó diferencia estadística entre todos los tratamientos y obteniendo el mayor crecimiento a las 96 horas, lo cual encaja con los resultados de los ensayos anteriores al afirmar que esta respuesta favorece el aumento de la acidez y la disminución de la cantidad de sustrato y pH.

Los recuentos de BAL aumentaron de 1,63 y 1,69 log (UFC/mL) a un valor final de 7,27 y 7,35 log (UFC/mL) al finalizar las 96 horas, para fermentados sin glucosa y con glucosa respectivamente, estos resultados son un tanto inferiores a los obtenidos por otros autores. Por un lado, (Ruiz, et al., 2016) obtuvieron poblaciones BAL de 1,65 y 2,60 log CFU g<sup>-1</sup> a un valor final de 8,43 y 8,15 log CFU g<sup>-1</sup> en el décimo día para las masas madre de harina de quinua, ocurriendo los principales cambios dentro de los primeros 3 días de propagación lo que concordó con los resultados del presente trabajo donde los cambios más notables se dieron de 24 a 72 horas.

Según los resultados reportados por (Franco, et al., 2020: pp.33-34) obtuvieron poblaciones finales de 8,40 log (UFC/g), 8,37 log (UFC/g), y 8,35 log (UFC/g) de la fermentación espontánea de harina de quinua después de 8 días de incubación a 30 °C, siendo valores superiores a los encontrados en este trabajo, pero hay que tomar en cuenta que la fermentación se dio a partir de granos germinados de quinua, donde los granos tuvieron un tratamiento previo por lo que podrían diferir los resultados.

En un estudio realizado, para la elaboración de yogurt adicionando quinua, se observó mayor crecimiento de bacterias ácido lácticas ( $5.3 \times 10^5$  UFC/g), en presencia de quinua, lo cual mejoró significativamente el producto final (Arriaga, 2020, p.78), por tanto, se puede deducir que un compuesto de quinua como suplemento en la formación de productos lácticos, puede favorecer la calidad de mismo.

Mediante los ensayos realizados en el presente estudio se pudo observar el comportamiento de fermentados de granos germinados de quinua según el método óptimo (Temperatura 20 °C, Tiempo 72 horas) en los tratamientos aplicados, fue posible establecer una relación entre los ensayos de acidez titulable, pH, azúcares totales y UFC. La alta acidez fue inversamente proporcional a pH bajos y éste a su vez fue inversamente proporcional al número de colonias, en cuanto al análisis de azúcares totales no se muestra diferencias en relación con la aplicación de glucosa en la muestra.

### 3.3. Resultados del proceso cultivo de BAL en el fermentado optimizado

Se estableció 96 horas como el tiempo óptimo de fermentación con 3 repeticiones que fueron sembradas en caldo MRS 10 tubos por cada repetición, para posteriormente sembrar en agar MRS (marca OXOID) acidificado, formaron colonias cuyo tamaño fue de 1 mm aproximadamente, con forma redonda y bordes definidos, presentaron color blanco cremoso, y superficie convexa. Obteniendo 30 cajas con cepas puras para verificar se realizó Tinción GRAM y las pruebas de catalasa y oxidasa (negativa) debido a que no hubo producción de gas al adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y no hubo coloración azul al agregar a las tiras con reactivo diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TPD).

#### 3.3.1. Aislamiento e identificación de BAL obtenidas

**Tabla 25-3:** Pruebas metabólicas, de identificación y seguridad de BAL.

Cod. Cepa	Tinción GRAM	Movilidad	Actividad hemolítica	Actividad proteolítica	Actividad lipolítica
BAL 1	Cocobacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 2	Cocobacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 3	Bacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 4	Bacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 5	Cocos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 6	Bacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 7	Cocos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 8	Bacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 9	Cocos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 10	Bacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-
BAL 11	Bacilos (+)	-	γ-hemólisis	+	-

BAL 12	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 13	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 14	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 15	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 16	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 17	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 18	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 19	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 20	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 21	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 22	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 23	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 24	Cocobacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 25	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 26	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 27	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 28	Cocos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 29	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-
BAL 30	Bacilos (+)	-	$\gamma$ -hemólisis	+	-

**Realizado por:** Chisag, Lourdes, 2021.

Con respecto a la morfología microscópica, se identificaron 17 cepas como bacilos, 10 cocos y 3 cocobacilos Gram positivos. De esta manera se identificaron a las BAL como cocos, bacilos y cocobacilos Gram positivos, catalasa y oxidasa negativos.

Por otro lado, según el ensayo de movilidad se pudo determinar que las BAL analizadas no poseen movilidad propia debido a que no se visualizó crecimiento fuera del área de inoculación lo que es una característica propia de este tipo de bacterias como lo menciona (Parra, 2017). Las bacterias del ácido láctico son células en forma de bastón o coco, catalasa negativa e inmóviles como lo menciona (Ismail, et al., 2019: pp.115-116).

Según el ensayo de actividad hemolítica en todos los casos corresponde a  $\gamma$ -hemólisis (sin hemólisis) que según (Savitri, et al., 2017: pp.27-28) la ausencia de actividad hemolítica se considera un requisito previo de seguridad para la selección de una cepa probiótica.

La actividad proteolítica es positiva en todos los casos lo que es importante y de utilidad en la industria alimentaria debido a la degradación de las proteínas de la leche constituye uno de los principales procesos durante la maduración de los quesos ya que interviene en la textura final del producto como consecuencia de la degradación del coágulo; también contribuye al desarrollo de

aromas y sabores debidos a la liberación de péptidos y aminoácidos de la caseína, que actúan como precursores del aroma en quesos como lo menciona (Ramírez y Vélez, 2016: pp.87-88).

La importancia de que exista actividad proteolítica en BAL, es la potencial capacidad de liberar péptidos antioxidantes (de 8 a 57 residuos de aminoácidos) durante la fermentación, por ello, es importante considerar que el alto valor nutricional de las semillas de quinua se debe principalmente a las altas concentraciones de proteínas, minerales y vitaminas. Las proteínas de la quinua son ricas en aminoácidos como lisina, treonina y metionina, que son deficientes en cereales (Rizzello et al., 2017: pp.45-46).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son capaces de convertir sustratos de carbohidratos en ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico) y producir una amplia gama de metabolitos. Debido a sus interesantes propiedades beneficiosas, las BAL se utilizan ampliamente como cultivos iniciadores, como probióticos y como fábricas de células microbianas (Ruiz, et al., 2016: pp.93-94). Las bacterias ácido lácticas, tienen la característica de ser de tipo Gram positivas, sin capacidad patogénica y de actividad fermentativa.

Las bacterias ácido láctico (BAL) constituyen un grupo bacteriano ubicuo que está muy extendido en la naturaleza en nichos de origen lácteo (fermentado), cárnico y vegetal, los tractos gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, y el suelo y el agua. Estos microorganismos son bien conocidos por su capacidad para producir ácido láctico como principal producto final de su metabolismo anaeróbico y para sintetizar una amplia gama de metabolitos que afectan beneficiosamente las propiedades nutricionales, sensoriales y tecnológicas de los productos alimenticios fermentados. Por estas razones, las BAL se han utilizado ampliamente (i) como cultivos iniciadores; (ii) como probióticos; y (iii) en la producción de compuestos interesantes (es decir, nutraceuticos), debido a su metabolismo versátil (Ruiz, et al., 2016: pp.94-95).

### ***3.3.2. Elaboración de un banco de cepas de BAL***

A partir de los aislados caracterizados mediante su morfología macro y microscópica y ensayos preliminares, tinción Gram, catalasa y oxidasa, se elaboró un banco de cepas en caldo MRS empleando glicerol al 30% como crioprotector, obteniéndose un total de 30 cepas puras de BAL caracterizadas, almacenadas en congelación a -20°C. Estas cepas podrán ser usadas para estudios o aplicaciones posteriores.

El propósito de elaborar una colección de microorganismos es asegurar su viabilidad manteniendo sus características genéticas y sus rasgos bioquímicos, inmunológicos, como también poner a disponibilidad de usuarios de estos recursos biológicos, los aislados del presente estudio se han preservado previa identificación genotípica y evaluación de su bioactividad como antagonista de hongos.



## CONCLUSIONES

- La germinación óptima de los granos de quinua fue a 20 °C durante un tiempo de 72 horas, con un 75,67% de germinación total y 40% de germinación con radícula mayor a 0,5 cm según metodología definida, (monitoreo en cajas Petri adaptadas con gasa homogéneamente humedecida, de la germinación de granos de quinua humectados uniformemente al inicio del proceso).
- La mejor fermentación sin glucosa de los granos germinados totales óptimos de quinua, ocurre a 37 °C durante 96 horas. Fermentación caracterizada por un incremento de concentración de ácido láctico (0.561%), una disminución del pH (4.30), y una reducción de la concentración de azúcares totales (0.497%). La fermentación de los germinados con glucosa mostró un comportamiento proporcional al de los fermentados sin glucosa.
- El mayor crecimiento se dio a 37 °C, durante 96 horas cuantificando un máximo de 7,27 log (UFC/mL) en fermentados sin glucosa, de este modo se ratificó el mejor tratamiento de donde se obtuvieron y aislaron BAL (en fermentados con glucosa el comportamiento fue similar).
- Se aislaron 30 cepas de BAL originarias y autóctonas de la quinua germinada por el método óptimo (Temperatura 20 °C, Tiempo 72 horas), seleccionando aquellas que dieron negativo para catalasa y oxidasa, y GRAM (+), a las que se realizaron pruebas de identificación que permitieron confirmar características metabólicas estas bacterias.
- Se conservaron y analizaron 30 aislados puros, para someterse a identificación genotípica y aplicarse en la investigación científica o como material didáctico para estudios posteriores en agroalimentación, en procesos biotecnológicos y otros.

## RECOMENDACIONES

- Profundizar la investigación en base a los resultados de este estudio a cerca de la germinación, y que diferencia podría hallarse si solo se emplea los granos de quinua el tratamiento empleado en el presente trabajo.
- En el ensayo de fermentación se trabajó hasta un tiempo máximo de 96 horas y se obtuvo resultados satisfactorios pero este tiempo aún no se determinó como el tiempo final de la actividad de BAL por lo que sería interesante aumentar el tiempo de fermentación y observar cual es el alcance que podría tener.
- Resultaría interesante continuar con el estudio de los granos de quinua como nicho bacteriano, debido a que se encontró escasa bibliografía en cuanto a esta temática y como se ha observado se obtuvo un recuento significativo de BAL, que podrían emplearse en distintos estudios.
- Las cepas puras fueron almacenadas mediante un método conocido, adicionando glicerol, pero se recomienda el estudio de nuevos métodos de conservación y tan factibles resultarían en comparación al método aplicado en este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

**ARENAS, E., & HEREDIA, G.** Calidad y germinación de semillas de quinua *Chenopodium quinoa* willd. almacenadas artesanalmente por productores. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Colombia. 2017. pp.34-35 [Consulta: 4 diciembre 2021]. Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/766>.

**ARRIAGA, C.** Uso de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en la elaboración de yogur vegano. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Agraria, Peru. 2020. pp.76-78 [Consulta: 23 octubre 2021]. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/Arreaga%20Carlos.pdf>.

**BAZILE, S., & DIDIER, T.** *Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013* [En línea]. Santiago de Chile: CIRAD, 2014. pp. 76-78 [Consulta: 11 noviembre 2021]. Disponible: [https://agritrop.cirad.fr/574154/1/document\\_574154.pdf](https://agritrop.cirad.fr/574154/1/document_574154.pdf).

**BENAVIDES, M.** Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Politécnica de Cataluña, España. 2019. pp.65-67 [Consulta: 1 octubre 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=266161>.

**BOJANIC, A.** *La Quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial* [En línea]. La Paz: FAO, 2011. [Consulta: 27 de julio 2021]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/aq287s/aq287s.pdf>

**BURON, G., CHAILYAN, A., DOLEJS, I., FORSTER, J. y MIKŠ, H.** "Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes". *Applied Microbiology and Biotechnology* [En línea], 2019, 103(7), pp. 3135-3152. [Consulta: 14 diciembre 2021]. ISSN 1432-0614. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09701-6>.

**CAJIGAS, J., & AGUIRRE, L.** Efectos del uso de estrategias participativas en la comprensión lectora de los estudiantes de 5° de básica primaria. [En línea] (Tesis de Maestría) Universidad de la Costa CUC, Colombia. 2020. pp.46-48 [Consulta: 29 junio 2021]. Disponible en: <https://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/5488/EFFECTOS%20DEL%20USO%20DE%20ESTRATEGIAS%20PARTICIPATIVAS%20EN%20LA%20COMPRESI%3%93N%20LECTORA%20DE%20LOS%20ESTUDIANTES%20DE%205%C2%B0%20DE%20B%C3%81SICA%20PRIMARIA%20.pdf?sequence=1>.

**CAMPOS, N., & PONCE, Y.** Obtención de una Bebida Fermentada (fermentación ácido-láctica) a base de Semilla de *Chenopodium Quinoa Germinada*. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Politécnica del Litoral, Ecuador. 2017. pp.34-35 [Consulta: 4 julio 2021]. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/xmlui/handle/123456789/43874>.

**CARGUA, P.** Estudio de cultivos iniciadores durante el almacenamiento de una leche fermentada incorporando harina de quinua (*Chenopodium quinoa*) germinada. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Politécnica del Litoral, Ecuador. 2016. pp.24-25 [Consulta: 17 agosto de 2021]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3387>.

**CARRIZO, S.** Aplicación de bacterias lácticas en el desarrollo de alimentos novedosos a base de granos andinos. [En línea] (Tesis Doctoral) Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. 2018. pp.24-25 [Consulta: 7 septiembre 2021]. Disponible en: [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/84670/CONICET\\_Digital\\_Nro.d8171ef0-e6ad-44df-bde4-9dafa5e35850\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/84670/CONICET_Digital_Nro.d8171ef0-e6ad-44df-bde4-9dafa5e35850_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y).

**CASAS, N., COTE, S., MONCANYO, D. y GONZÁLEZ, G.** "Usos potenciales de la quinua (*Chenopodium quinoa* en la industria alimentaria". *Research Gate* [En línea], 2016, 101(6), pp. 132-152. [Consulta: 27 mayo 2021]. ISSN 1145-0523. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/324672750>.

**CASTRO, A.** Fermentación de quinua, canihua y amaranto pseudocereales para mejorar la accesibilidad de los minerales a través de la degradación del fitato. [En línea] (Tesis Doctoral) Lund University, Suecia. 2019. pp.84-86 [Consulta: 17 mayo 2021]. Disponible en: [https://lucris.lub.lu.se/ws/portalfiles/portal/69041734/Thesis\\_Vanesa\\_Castro.pdf](https://lucris.lub.lu.se/ws/portalfiles/portal/69041734/Thesis_Vanesa_Castro.pdf).

**CHACÓN, A.** "Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada". *Agronomía Mesoamericana* [En línea], 2006, 17(1), pp. 55-61. [Consulta: 12 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43717109>

**CUADRA, C.** *Germinacion, latencia y dormicion de las semillas* [blog]. [Consulta: 4 junio 2021]. Disponible en: <https://blog.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd-2/>.

**DILLON, V.** *Encyclopedia of Food Microbiology* [En línea]. En: C.A. BATT y M.L. TORTORELLO (eds.), 2014. [Consulta: 13 diciembre 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012384730000238X>.

**DONAIRE, R.** Estudio de germinación del cultivo agroecológico quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd) en el hondo de Elche (Alicante).[En línea] (Tesis de Maestría) Universidad de Miguel Hernández, España. 2019. pp.55-58 [Consulta: 29 septiembre 2021]. Disponible en: <http://193.147.134.18/bitstream/11000/5407/1/TFM%20Donaire%20Egu%C3%ADvar%2C%20Rosmery.pdf>.

**FRANCO, W., PÉREZ, M., CONNELLY, L. y DIAZ, T.** "Aislamiento de levaduras productoras de exopolisacáridos y bacterias del ácido láctico de la fermentación de masa madre de quinua (*Chenopodium quinoa*)". *Foods* [En línea], 2020, 9(3), pp. 337. [Consulta: 10 junio 2021]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/337/htm#B47-foods-09-00337>.

**FUENTES, M., LONDOÑO, A., DURANGO, M., GUTIÉRREZ, M., OCHOA, S. y VALENCIA, J.** "Capacidad antimicrobiana de bacterias de ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano". *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [En línea], 2017, 15(1), pp. 45-55. [Consulta: 15 noviembre 2021]. ISSN 1692 3561. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15n1/v15n1a06.pdf>.

**GAENZLE, M.** "Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage". *Current Opinion in Food Science* [En línea], 2015, 2(3), pp. 106-117. [Consulta: 30 noviembre 2021]. ISSN 2214 7993. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214799315000508>.

**GARCÍA, D., & MAMANI, G.** Selección de levaduras nativas *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de chicha de jora del Valle del Mantaro.[En línea] (Tesis de Maestría) Universidad Nacional del Centro del Perú, Lima. 2008. pp.45-48 [Consulta: 9 noviembre 2021]. Disponible en: <https://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/2636>.

**GOMÉZ, S., & TORREZ, M.** "Ácido láctico: una revisión sobre los métodos de Determinación y purificación". *Biociencias* [En línea], 2019, 14(2), pp. 111-141. [Consulta: 23 julio de 2021]. ISSN 2390 0512. Disponible en: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/6027>.

**GOOGLE MAPS.** Ubicación Centro de Investigación - Laboratorio. [En línea], 2021. [Consulta: 15 Junio de 2021]. Disponible en: <https://www.google.com/maps/place/Escuela+Superior+Polit%C3%A9cnica+de+Chimborazo/4!1s0x91d307c252930ed9:0x6ad1a526f47e5b0c!8m2!3d-1.656735!4d-78.6782735?hl=es>.

**GOPAL, E.** Bacteria, Beneficial: Probiotic Lactic Acid Bacteria: An Overview. En: P.L.H. MCSWEENEY y J.P. MCNAMARA (eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* [en línea]. Oxford: Academic Press, 2022. pp. 32-33 [Consulta: 16 noviembre 2021]. ISBN 978-0-12-818767-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128187661000180>.

**GRAF, B., ROJAS, P., ROJO, L., DELATORRE, J., BALDEÓN, M. y RASKIN, I.** "Innovations in Health Value and Functional Food Development of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [En línea], 2015, 14(4), pp. 431-445. [Consulta: 23 septiembre de 2021]. ISSN 15414337. DOI 10.1111/1541-4337.12135. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12135>.

**GUTIÉRREZ, J., LUNA, L.M., MENDOZA-OROZCO, M.I., DÍAZ-MARINA, G. de J., BURGUETE-GUTIÉRREZ, C. y FELICIANO, J.** "Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* [en línea], 2015, 35(2), pp. 95-102. [Consulta: 16 agosto 2021]. ISSN 1315-2556. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&nrm=iso&tlng=es).

**HEREDIA, P., HÉRNÁNDEZ, A., GONZÁLEZ, A. y VALLEJO, B.** "Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos". *Interciencia* [en línea], 2017, 42(6), pp. 340-346. [Consulta: 19 de diciembre 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/339/33951621002/html/>.

**ISMAIL, Y., YULVIZAR, C. y MAZHITOV, B.** "Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir". *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* [en línea], 2018, 130(5), pp. 012019. [Consulta: 4 septiembre 2021]. ISSN 1755-1307. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/130/1/012019>.

**LLACSA, J., & CUCHO, A.** Cinética de fermentación de la chicha de quinua evaluado en tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Nacional del Altiplano, Perú. 2017. pp. 54-56 [Consulta: 27 agosto 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/13456>.

**LLOMBART, P.** Evaluación del impacto del proceso de fermentación en estado sólido con *Pleurotus ostreatus* en las propiedades de la quinua. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad

Politécnica de Valencia, España. 2021. pp. 74-75 [Consulta: 4 diciembre 2021]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/173636>.

**LÓPEZ, L., HERNÁNDEZ, M., COLÍN, C.A., ORTEGA, S., CERÓN, G. y FRANCO, R.** "Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología". *Investigación en discapacidad* [En línea], 2014, 3(1), pp. 9-10. [Consulta: 5 septiembre 2021]. Disponible en: [https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir2014/ir141b.pdf?fbclid=IwAR3z9\\_ljzoGBF2taww\\_xeAuX2t1CkNP71GcChg-iew\\_43tDohre\\_o7mAlnM](https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir2014/ir141b.pdf?fbclid=IwAR3z9_ljzoGBF2taww_xeAuX2t1CkNP71GcChg-iew_43tDohre_o7mAlnM).

**MALDONADO, R.** Desarrollo de Una Bebida Fermentada a Base de Quinoa (Chenopodium quinoa). [En línea] (Tesis de Grado) Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. 2014. pp. 47-49 [Consulta: 13 julio 2021]. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3387>.

**MAMEDI, A., TAVAKKOL, R. y OVEISI, M.** "Cardinal temperatures for seed germination of three Quinoa (Chenopodium quinoa Willd) cultivars". *Iranian Journal of Field Crop Science* [En línea], 2017, 48(2), pp. 89-100. [Consulta: 25 septiembre 2021]. ISSN 2008-4811. Disponible en: DOI 10.22059/ijfcs.2017.206204.654106.

**MUNILLA, M., y CARRACEDO, B.** "Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA*". *Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* [en línea], 2015, 39(1), pp. 49-59. [Consulta: 2 noviembre 2021]. ISSN 0138-6204, 1025-3076. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120659007>.

**NAVRUZ, S., & SANLIER, N.** "Nutritional and health benefits of quinoa (Chenopodium quinoa Willd)". *Journal of Cereal Science* [en línea], 69(4), pp. 371-376. [Consulta: 16 diciembre 2021]. ISSN 0733-5210. DOI 10.1016/j.jcs.2016.05.004. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521016300662>.

**NTE INEN 13:1984.** *Leche. Determinación de acidez titulable*. Primera parte: Análisis de acidez.

**NUTRICIÓN Y COCINA.** *Propiedades nutricionales de la quinoa* [Blog]. [Consulta: 16 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.propiedadesdequinua.com>

**OLARTE, S., DAZA, C. y SCHULTZ, G.** "La quinua en el contexto de la estandarización". *Agroalimentaria* [en línea], 22(43), pp. 89-102. [Consulta: 23 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/1992/199251019006/html/>.

**OLIVA, M., DUQUE, L. y GARCÍA, L.** "Caracterización fisicoquímica del cereal y almidón de Quinoa *Chenopodium quinoa*". *Revista ION* [En línea], 2018, 31(1), pp. 25-29. [Consulta: 23 julio 2021]. ISSN 0120100X, 21458480. DOI 10.18273/revion.v31n1-2018004. Disponible en: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/8754/9125>.

**OLMOS, E.,** *Procedimientos en microbiología clínica* [En línea]. SEIMC: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades, 2010. [Consulta: 23 agosto 2021]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>

**ONEFRE, C.** Efecto del Proceso de Fermentación Alcohólica de la Chicha de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) sobre su contenido de Antioxidante, Vitaminas y Minerales. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Perú. 2018. pp. 92-96 [Consulta: 12 septiembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/8537>.

**PADRÓN, C., ROPEZA, R. y MONTES, A.** "Semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow): composición química y procesamiento". *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* [En línea], 2015, 5(2), pp. 166-218. [Consulta: 29 junio 2021]. ISSN: 2218-4384. Disponible en: <http://bdigital.ula.ve/storage/pdf/rvcta/v5n2/art05.pdf>.

**PARRA, R.** "Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos". *Bacterias ácido lácticas* [En línea], 2017, 8(1), pp. 93-101. [Consulta: 4 mayo de 2021]. Disponible en: <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/724/352>.

**PEREDO, Z.** Efecto de bacterias ácido lácticas probióticas sobre la estabilidad y las propiedades sensoriales de un dulce de leche de cabra. [En línea] (Tesis de Maestría) Universidad de Veracruz, México. 2018. pp.85-88 [Consulta: 9 agosto 2021]. Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/handle/123456789/46946?locale-attribute=fr>.

**QUIROGA, C.** *Sostenibilidad del Sistema Alimentario*. 2020. págs. 3-23.

**RAMÍREZ, C., & VÉLEZ, F.** "Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra". *Información tecnológica* [en línea], 27(6), pp. 115-128. [Consulta: 23 mayo 2021]. ISSN 0718-0764. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S071807642016000600012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S071807642016000600012&lng=es&nrm=iso&tlng=es).



**RAMÍREZ, J., ULLOA, R., VELÁZQUEZ, P. y ARCE, F.** "Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud". *Revista Fuente* [En línea], 2019, 23(7), pp. 214-216 [Consulta: 27 diciembre 2021]. ISSN 2007-0713. Disponible en: <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/436>.

**REYES, E.** "Componente nutricional de diferentes variedades de quinua de la región Andina". *Avances Investigación en Ingeniería* [En línea], 2016, 34(5), pp. 86-92. [Consulta: 2 julio 2021]. Disponible en: [http://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/Quinua\\_ComposicionNutricionalVariedadesAndina\\_2006\\_r5\\_art10.pdf](http://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/Quinua_ComposicionNutricionalVariedadesAndina_2006_r5_art10.pdf).

**ROJAS, E., VARGAS, M., & PINTO, P.** "La diversidad genética de la quinua: potenciales usos en el mejoramiento y agroindustria". *RIARn* [En línea], 2016, 3(2), pp. 114-124. [Consulta: 22 agosto 2021]. ISSN 2518-6868. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/pdf/riarn/v3n2/v3n2\\_a01.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/riarn/v3n2/v3n2_a01.pdf).

**ROMERO, E.** Evaluación nutricional de una bebida fermentada utilizando suero de queso y harina de quinua germinada. [En línea] (Tesis de Grado) Universidad Nacional "Santiago Antúnez de Mayolo, Perú. 2019. pp. 65-68 [Consulta: 4 septiembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.unasam.edu.pe/handle/UNASAM/4298>.

**RUIZ, G., ALLER, K., BRU, E., VUYST, L., HÉBERT, E. y MOZZI, F.** "Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034". *Applied Microbiology and Biotechnology* [En línea], 2017, 101(15), pp. 6165-6177. [Consulta: 22 agosto 2021]. ISSN 1432-0614. Disponible en: DOI 10.1007/s00253-017-8395-1.

**RUIZ, L., MOHAMED, F., BLECKWEDEL, J., MEDINA, R., VUYST, L., HEBERT, E. y MOZZI, F.** "Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina". *Frontiers in Microbiology* [En línea], 2019, 10(6), pp. 1091. [Consulta: 22 agosto 2021]. ISSN 1664-302X. Disponible en: DOI 10.3389/fmicb.2019.01091.

**SAVITRI, M., KUMAR, V., KUMARI, A., ANGMO, K. y BHALLA, T.** "Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India". *Journal of Food Science and Technology* [En línea], 2017, 54(7), pp. 1945-1952. [Consulta: 23 julio 2021]. ISSN 0022-1155. DOI 10.1007/s13197-017-2629-1. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5495720/>.

**VALENZUELA, R., TICONA, G., YUCRA, Z., CAYLLAHUA, D., ALEJO, M. y CHURQUI, U.** "Efecto de la germinación y cocción en las propiedades nutricionales de tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)". *Revista Investigaciones Altoandinas* [en línea], 2015, 17(2), pp. 169-172. [Consulta: 23 agosto 2021]. ISSN 2306-8582, 2313-2957. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5169791>.

**VARGAS, P., ARTEAGA, R., CRUZ, L., VARGA, P., ARTEAGA, R. y CRUZ, L.** "Análisis bibliográfico sobre el potencial nutricional de la quinua (*Chenopodium quinoa*) como alimento funcional". *Centro Azúcar* [en línea], 2019, 46(4), pp. 89-100. [Consulta: 23 mayo 2021]. ISSN 2223-4861. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S2223-48612019000400089&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2223-48612019000400089&lng=es&nrm=iso&tlng=es).


**WALDIR, E., RYCHTERA, M., MELZUCH, C., QUILLAMA, E. y EGOAVIL, F.** "Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo". *Revi.peru.biol* [En línea], 2017, 14(2), pp. 271-275. [Consulta: 2 julio 2021]. ISSN 1727-9933. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v14n2/a14v14n02.pdf>.


**WANG, J., SHAO, Z., HUNGWE, M., WANG, J., BAI, X., XIE, J., WANG, Y. y GENG, W.** "Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [en línea], 2021, 9(3), pp. 612285. [Consulta: 23 noviembre 2021]. ISSN 2296-4185. DOI 10.3389/fbioe.2021.612285. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8149962/>.

**WONG, A., CORZO, H., HERNÁNDEZ, E., GONZÁLES, A. y GIACOMÁN, G.** "Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México". *Biotecnología y Ciencias Agropecuarias* [En línea], 2021, 15(2), pp.134-167. [Consulta: 30 noviembre 2021.] Disponible en: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1368>.

**ZAMORA, L.** Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. [En línea] (Tesis Doctoral) Universitat de Girona, España. 2019. pp. 165-168 [Consulta: 14 diciembre 2021]. Disponible en: <https://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/4892/Tl1zr.pdf?sequence=5&isAllowed=y>.

**ZHU, Y. y YANG, Q.** "Isolation of Antibacterial, Nitrosylmyoglobin Forming Lactic Acid Bacteria and Their Potential Use in Meat Processing". *Frontiers in Microbiology* [en línea], 11(2), pp. 105-167. [Consulta: 20 diciembre 2021]. ISSN 1664-302X. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01315>.



DIRECCION DE BIBLIOTECAS  
Y RECURSOS PARA EL APRENDIZAJE  
Y LA INVESTIGACION  
 Ing. Jhanatan Parreño Uquillas MBA  
ANALISTA DE BIBLIOTECA 1

**ANEXOS:**

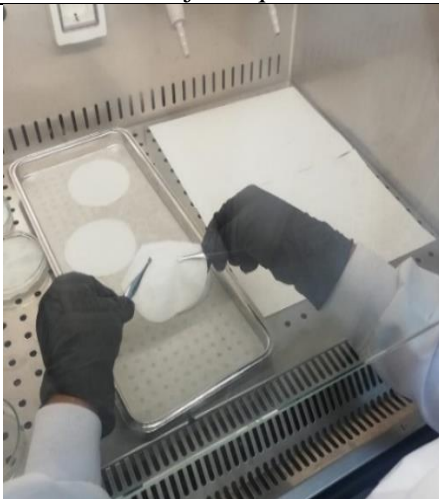
**ANEXO A: ENSAYO DE GERMINACIÓN**



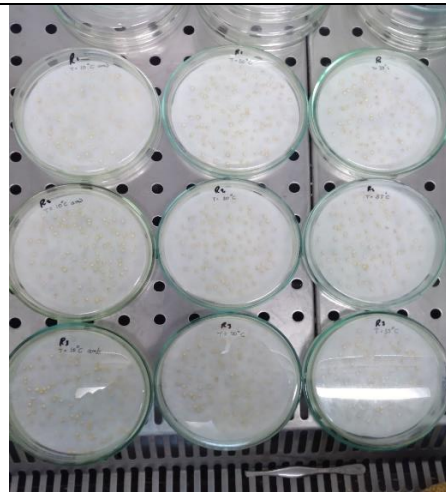
Remojo de quinua



Cernido



Preparación de la superficie



Quinua para germinar



Granos de quinua germinada

## ANEXO B: PREPARACIÓN DEL FERMENTADO



**ANEXO C: ENSAYO DE ACIDEZ TITULABLE**



Pesado



Titulación

## ANEXO D: ENSAYO DE PH

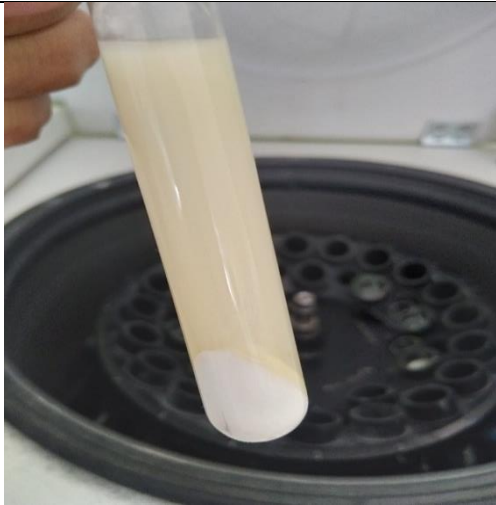


Filtrado del fermentado

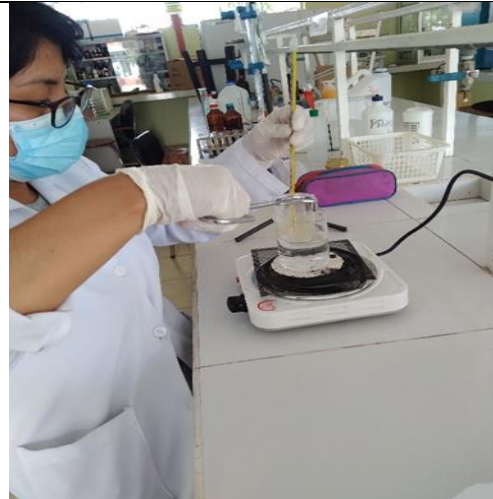


Medición de pH

## ANEXO E: ENSAYO DE AZÚCARES TOTALES



Centrifugación del fermentado



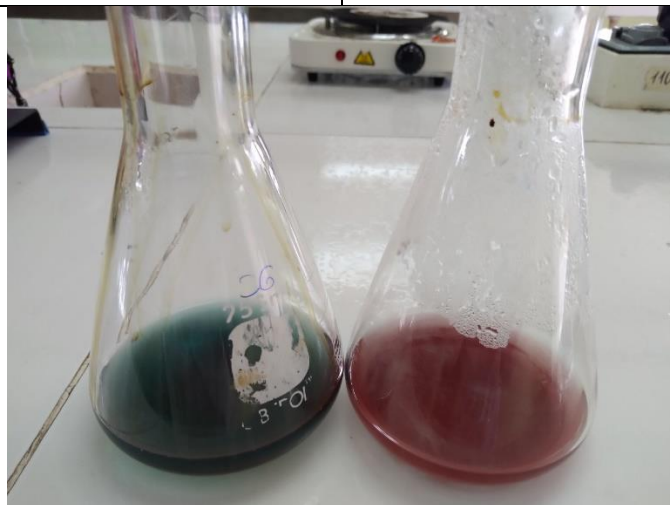
Hidrólisis de sacarosa



Aforo de la muestra



Titulación con Rx Fehling



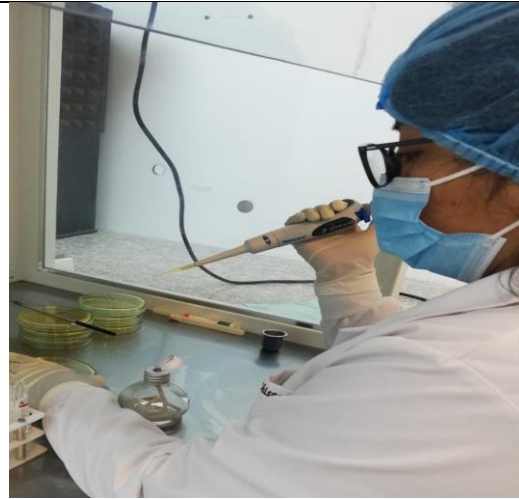
Punto final



**ANEXO F: RECUENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (UFC)**



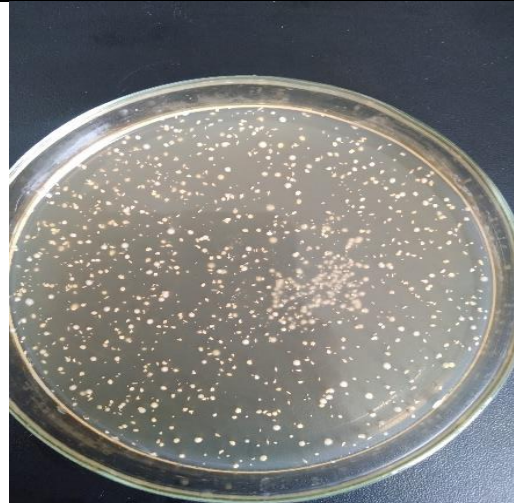
Preparación del medio de cultivo



Sembrado por vertido en placa

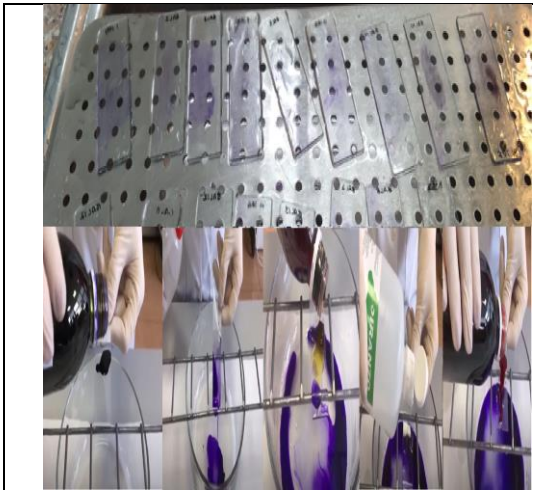


Incubación en microaerofilia



BAL

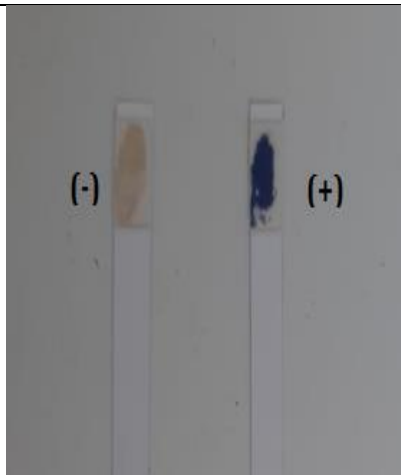
**ANEXO G: AISLAMIENTO DE BAL**



Tinción GRAM



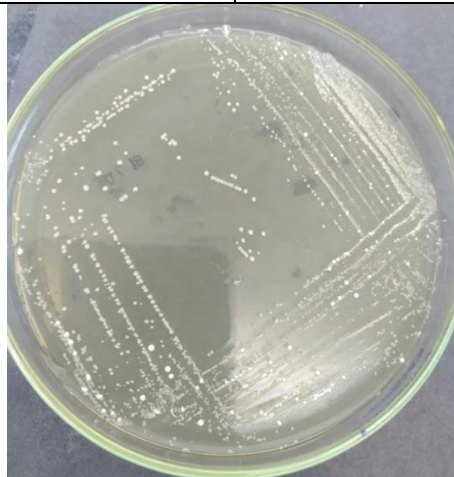
Prueba de Catalasa



Prueba de Oxidasa

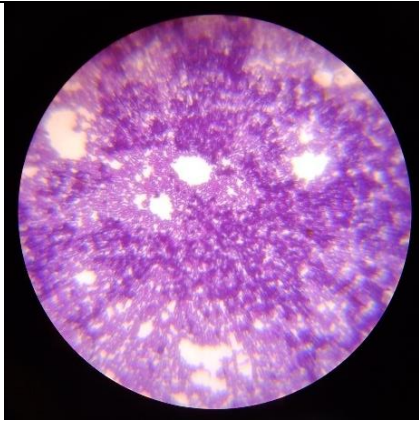


BAL en caldo MRS



BAL aisladas

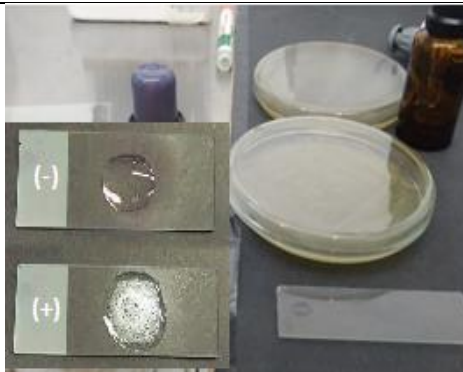
**ANEXO H: CARACTERIZACIÓN DE BAL**



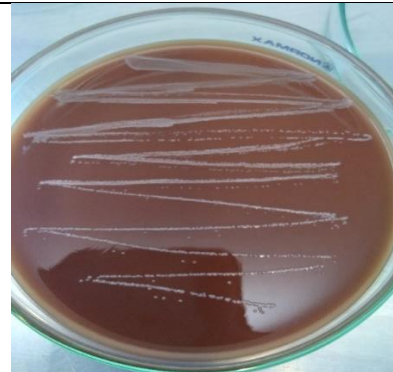
Tinción GRAM (+)



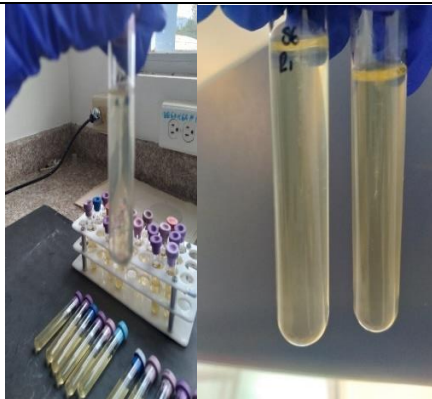
Prueba de Oxidasa



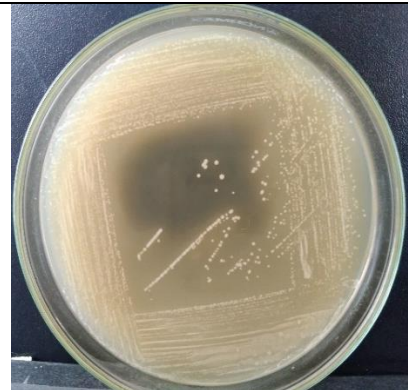
Prueba de Catalasa



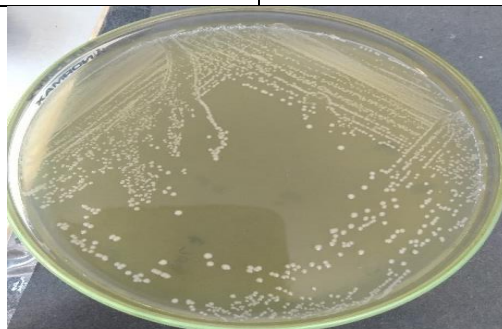
Actividad hemolítica



Prueba de movilidad

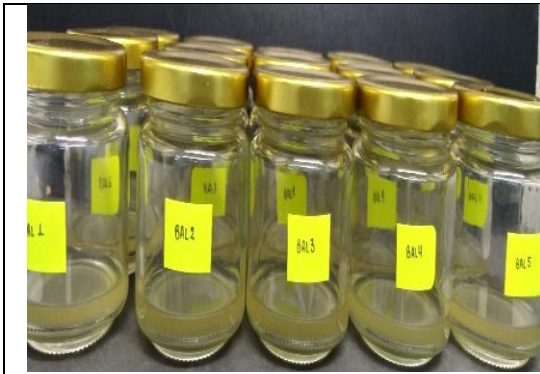


Actividad proteolítica



Actividad lipolítica

## ANEXO I: CONSERVACIÓN DE BAL

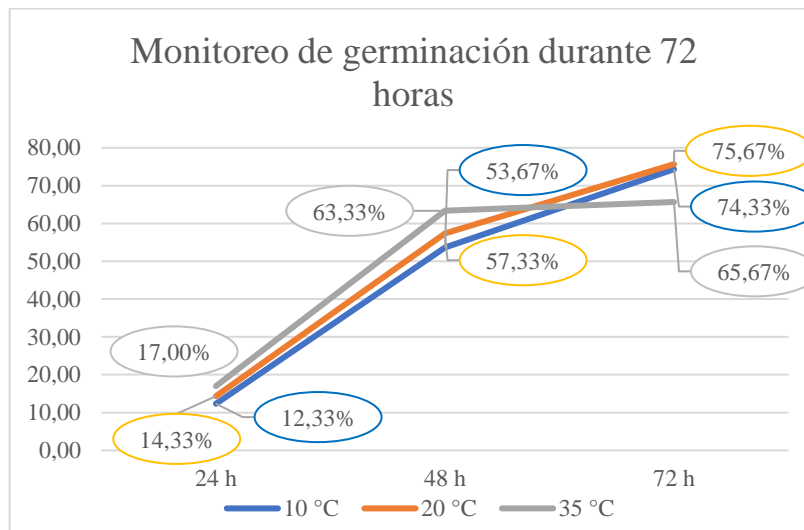


BAL + Glicerol 30%



Aislados puros

## ANEXO J: PROCESO DE GERMINACIÓN DE GRANOS DE QUINUA



## ANEXO K: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO DE GERMINACIÓN

### Germinados Totales

#### Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

#### Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
temperatura	Fijo	3	10, 20, 35

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
temperatura	2	176.89	88.44	7.37	0.024
Error	6	72.00	12.00		
Total	8	248.89			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3.46410	71.07%	61.43%	34.91%

#### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	71.89	1.15	62.26	0.000	
temperatura					
10	2.44	1.63	1.50	0.185	1.33
20	3.78	1.63	2.31	0.060	1.33

#### Ecuación de regresión

$$\text{Número de granos germinados} = 71.89 + 2.44 \text{ temperatura}_{10} + 3.78 \text{ temperatura}_{20} - 6.22 \text{ temperatura}_{35}$$

Porcentaje de germinados Totales (ANOVA)

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

temperatura	N	Media	Agrupación
20	3	75.6667	A
10	3	74.3333	A B
35	3	65.6667	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Prueba de Tukey

## Germinados con radícula mayor a 0,5 cm

### Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

### Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
temperatura	Fijo	3	10, 20, 35

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
temperatura	2	910.22	455.111	215.58	0.000
Error	6	12.67	2.111		
Total	8	922.89			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.45297	98.63%	98.17%	96.91%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	32.889	0.484	67.91	0.000	
temperatura					
10	7.111	0.685	10.38	0.000	1.33
20	7.111	0.685	10.38	0.000	1.33

### Ecuación de regresión

$$\text{Longitud de la radícula mayor 0} = 32.889 + 7.111 \text{ temperatura}_{10} + 7.111 \text{ temperatura}_{20} - 14.222 \text{ temperatura}_{35}$$

Porcentaje de germinados con radícula mayor a 0,5 cm (ANOVA)

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

temperatura	N	Media	Agrupación
10	3	40.0000	A
20	3	40.0000	A
35	3	18.6667	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Prueba de Tukey

## ANEXO L: ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENSAYO DE ACIDEZ

### Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

### Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tiempo	Fijo	5	0, 24, 48, 72, 96

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	4	0.455926	0.113981	3609.28	0.000
Error	10	0.000316	0.000032		
Total	14	0.456242			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0056196	99.93%	99.90%	99.84%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0.37510	0.00145	258.51	0.000	
tiempo					
0	-0.22354	0.00290	-77.03	0.000	1.60
24	-0.19197	0.00290	-66.15	0.000	1.60
48	0.06873	0.00290	23.68	0.000	1.60
72	0.16116	0.00290	55.54	0.000	1.60

### Ecuación de regresión

$$\text{Acidez titulable} = 0.37510 - 0.22354 \text{ tiempo}_0 - 0.19197 \text{ tiempo}_{24} + 0.06873 \text{ tiempo}_{48} + 0.16116 \text{ tiempo}_{72} + 0.18562 \text{ tiempo}_{96}$$

Fermentados sin glucosa

### Comparaciones por parejas de Tukey: tiempo

#### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
96	3	0.560718	A
72	3	0.536260	B
48	3	0.443825	C
24	3	0.183129	D
0	3	0.151554	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey



## Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

## Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tiempo	Fijo	5	0, 24, 48, 72, 96

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	4	0.440575	0.110144	6542.35	0.000
Error	10	0.000168	0.000017		
Total	14	0.440743			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0041031	99.96%	99.95%	99.91%

## Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0.37937	0.00106	358.09	0.000	
tiempo					
0	-0.22180	0.00212	-104.68	0.000	1.60
24	-0.18819	0.00212	-88.82	0.000	1.60
48	0.07531	0.00212	35.54	0.000	1.60
72	0.15054	0.00212	71.05	0.000	1.60

## Ecuación de regresión

Acidez titulable con glucosa = 0.37937 - 0.22180 tiempo\_0 - 0.18819 tiempo\_24 + 0.07531 tiempo\_48 + 0.15054 tiempo\_72 + 0.18415 tiempo\_96

Fermentados con glucosa

## Comparaciones por parejas de Tukey: tiempo

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
96	3	0.563518	A
72	3	0.529905	B
48	3	0.454672	C
24	3	0.191173	D
0	3	0.157562	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey

## ANEXO M: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOG (UFC/ML)

### Método

Codificación de factores (-1; 0; +1)

### Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tiempo	Fijo	5	0; 24; 48; 72; 96

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	4	75,8903	18,9726	1276,96	0,000
Error	10	0,1486	0,0149		
Total	14	76,0389			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,121892	99,80%	99,73%	99,56%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	4,8082	0,0315	152,78	0,000	
tiempo					
0	-3,1788	0,0629	-50,50	0,000	1,60
24	-2,1217	0,0629	-33,71	0,000	1,60
48	0,8691	0,0629	13,81	0,000	1,60
72	1,9749	0,0629	31,38	0,000	1,60

### Ecuación de regresión

$$\text{Log UFC/mL f. sin glucosa} = 4,8082 - 3,1788 \text{ tiempo}_0 - 2,1217 \text{ tiempo}_{24} + 0,8691 \text{ tiempo}_{48} + 1,9749 \text{ tiempo}_{72} + 2,4565 \text{ tiempo}_{96}$$

### Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Log UFC/mL f. sin glucosa	Ajuste	Resid	Resid est.
15	7,5177	7,2648	0,2529	2,54 R

Residuo grande R

Fermentados sin glucosa

## Método

Codificación de factores (-1; 0; +1)

## Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tiempo	Fijo	5	0; 24; 48; 72; 96

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	4	76,1101	19,0275	975,27	0,000
Error	10	0,1951	0,0195		
Total	14	76,3052			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,139678	99,74%	99,64%	99,42%

## Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	4,8036	0,0361	133,19	0,000	
tiempo					
0	-3,1177	0,0721	-43,22	0,000	1,60
24	-2,1898	0,0721	-30,36	0,000	1,60
48	0,8510	0,0721	11,80	0,000	1,60
72	1,9122	0,0721	26,51	0,000	1,60

## Ecuación de regresión

Log UFC/mL f.con glucosa = 4,8036 - 3,1177 tiempo\_0 - 2,1898 tiempo\_24 + 0,8510 tiempo\_48 + 1,9122 tiempo\_72 + 2,5444 tiempo\_96

Fermentados con glucosa

## Comparaciones en parejas de Tukey

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
96	3	7,348	A
72	3	6,7158	B
48	3	5,655	C
24	3	2,6138	D
0	3	1,6859	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey

## ANEXO N: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE AZUCARES TOTALES.

### Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

### Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tiempo	Fijo	5	0, 24, 48, 72, 96

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	4	3.03652	0.759131	733.59	0.000
Error	10	0.01035	0.001035		
Total	14	3.04687			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0321686	99.66%	99.52%	99.24%

### Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0.87251	0.00831	105.05	0.000	
tiempo					
0	0.8486	0.0166	51.08	0.000	1.60
24	0.0593	0.0166	3.57	0.005	1.60
48	-0.2122	0.0166	-12.78	0.000	1.60
72	-0.3201	0.0166	-19.27	0.000	1.60

### Ecuación de regresión

$$\text{azucares totales sin glucosa} = 0.87251 + 0.8486 \text{ tiempo}_0 + 0.0593 \text{ tiempo}_{24} - 0.2122 \text{ tiempo}_{48} - 0.3201 \text{ tiempo}_{72} - 0.3755 \text{ tiempo}_{96}$$

### Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	azucares totales sin glucosa	Ajuste	Resid	Resid est.
11	1.6667	1.7211	-0.0544	-2.07 R

Residuo grande R

Fermentados sin glucosa

## Método

Codificación de factores (-1, 0, +1)

## Información del factor

Factor	Tipo	Niveles	Valores
tiempo	Fijo	5	0, 24, 48, 72, 96

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiempo	4	4.2126	1.05314	93.78	0.000
Error	10	0.1123	0.01123		
glucosa vs. tiempo		4.3249			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.105974	97.40%	96.36%	94.16%

## Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	6.0087	0.0274	219.60	0.000	
tiempo					
0	0.6888	0.0547	12.59	0.000	1.60
24	0.5733	0.0547	10.48	0.000	1.60
48	-0.2387	0.0547	-4.36	0.001	1.60
72	-0.4110	0.0547	-7.51	0.000	1.60

## Ecuación de regresión

$$\text{azúcares totales con glucosa} = 6.0087 + 0.6888 \text{ tiempo}_0 + 0.5733 \text{ tiempo}_{24} - 0.2387 \text{ tiempo}_{48} - 0.4110 \text{ tiempo}_{72} - 0.6124 \text{ tiempo}_{96}$$

## Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	azúcares totales con glucosa	Ajuste	Resid	Resid est.
12	6.7568	6.5820	0.1748	2.02 R

Fermentados con glucosa

## Comparaciones por parejas de Tukey: tiempo

### Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
0	3	6.69749	A
24	3	6.58199	A
48	3	5.76991	B
72	3	5.59764	B C
96	3	5.39624	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Prueba de Tukey



epoch

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: 24 / 05 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Lourdes Liliana Chisag Toala
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímico Farmacéutico
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.

x



1027-DBRA-UTP-2022