



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA AGROINDUSTRIA

**“VIABILIDAD DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS
DEL SUELO DEL BOSQUE PRIMARIO CASHCA TOTORAS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

AUTORA: DENIS NICOL MOYA GUERRA

Riobamba – Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA AGROINDUSTRIA

**“VIABILIDAD DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS
DEL SUELO DEL BOSQUE PRIMARIO CASHCA TOTORAS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGROINDUSTRIAL

AUTORA: DENIS NICOL MOYA GUERRA

DIRECTOR: CESAR IVÁN FLORES MANCHENO Ph. D

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Denis Nicol Moya Guerra

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, DENIS NICOL MOYA GUERRA, declaro que el presente Trabajo de Titulación 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 Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 09 de agosto del 2022

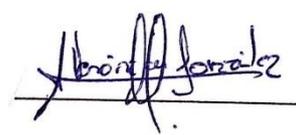
A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval. The signature appears to read "Denis Nicol Moya Guerra".

Denis Nicol Moya Guerra

180392218-4

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA AGROINDUSTRIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Trabajo Experimental **VIABILIDAD DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL SUELO DEL BOSQUE PRIMARIO CASHCA TOTORAS**, realizado por la señorita: **DENIS NICOL MOYA GUERRA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Iván Patricio Salgado Tello. Mcs PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-08-09
Ing. Cesar Iván Flores Mancheno. Ph. D DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-08-09
Bqf. María Verónica González Cabrera. Mcs MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-08-09

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a mi madre quien me dio la vida y ha estado conmigo en todo momento. Gracias, mamá por creer en mí y darme una carrera para mi futuro. A mi tía Mery por su comprensión y paciencia, a mi abuelita Magdalena por su apoyo incondicional, siendo el pilar fundamental en mi vida y mi estímulo para salir adelante, gracias por inculcar en mí la importancia de estudiar y alcanzar nuevas metas. También quiero dedicar este trabajo de titulación a mis primos Erika, Jessica y Fernando porque ellos han sabido darme palabras de aliento y brindarme un consejo cuando lo he necesitado, a mi hermanito pequeño David por ser mi impulso cada día y por creer en mi capacidad de superación para poder cumplir este sueño.

Nicol

AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme tener salud y guiar mi camino por el sendero del bien, quien me ha dado la fortaleza y esperanza para culminar con esta etapa. Agradezco a Escuela Superior Politécnica de Chimborazo quien me abrió las puertas para poder crecer profesionalmente, al grupo de investigación SEALPRA por permitirme formar parte de él, a mis amigos Yessenia, Anita, Kevin y Grasy por su apoyo incondicional en esos momentos difíciles que sentía que no había solución, gracias por brindarme consejos y palabras de aliento cuando más lo he necesitado. De manera especial quiero agradecer también al Ing. Luis Andrés Tello Flores por toda la paciencia, gracias a todos sus conocimientos y el valioso tiempo compartido en la realización de este trabajo de titulación.

Nicol

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	MARCO REFERENCIAL.....	3
1.1.	Bacterias Ácido Lácticas.....	3
1.1.1	<i>Características generales</i>	3
1.1.2.	<i>Clasificación</i>	4
1.2.3.	<i>Uso a nivel Industrial</i>	5
1.2.	Especie <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	5
1.2.1.	<i>Morfología</i>	5
1.2.2.	<i>Clasificación Taxonómica</i>	6
1.2.3.	<i>Características Bioquímicas</i>	6
1.3.	Especie <i>Lactobacillus malefermentans</i>	6
1.3.1.	<i>Morfología</i>	7
1.3.2.	<i>Clasificación taxonómica</i>	7
1.3.3.	<i>Características Fisiológicas</i>	7
1.3.4.	<i>Características bioquímicas</i>	7
1.4.	Fermentación.....	8
1.5.	Sustrato.....	8
1.6.	Extracto de malta de quinua	9
1.7.	Características físico-químicas de extracto malta de quinua.....	9
1.8.	Viabilidad.....	10
1.9.	Crecimiento bacteriano	10
1.9.1.	<i>Factores de crecimiento</i>	10
1.9.2.	<i>Curva de crecimiento bacteriano</i>	11
1.10.	Cinética de crecimiento	12
1.10.1.	<i>Velocidad específica de crecimiento</i>	12

1.10.2.	<i>Rendimiento de la Biomasa</i>	13
---------	--	----

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	14
2.1.	Localización y duración del experimento	14
2.2.	Unidades Experimentales	14
2.3.	Materiales, equipos e insumos	14
2.3.1.	<i>Materiales</i>	14
2.3.2.	<i>Equipos</i>	15
2.3.3.	<i>Insumos</i>	16
2.4.	Tratamiento y diseño experimental	16
2.4.1.	<i>Mediciones experimentales</i>	17
2.4.1.1.	<i>Caracterización del extracto soluble de malta de quinua</i>	17
2.4.1.2.	<i>Población de las bacterias ácido lácticas a las 24, 48, 72 y 96 horas</i>	17
2.4.1.3.	<i>Velocidad específica de crecimiento</i>	17
2.4.1.4.	<i>Rendimiento de la Biomasa</i>	17
2.5.	Análisis estadísticas y pruebas de significancia	17
2.6.	Procedimiento experimental	17
2.6.1.	<i>Preparación del sustrato: Malteado de la Quinua</i>	17
2.6.2.	<i>Bacterias ácido lácticas</i>	18
2.6.2.1.	<i>Reactivación de bacterias ácido lácticas</i>	18
6.3.	Siembra de bacterias ácido lácticas	18
6.3.1.	<i>Inoculación en malta de quinua</i>	18
6.3.2.	<i>Purificación y mantenimiento del cultivo</i>	18
6.3.3.	<i>Siembra para recuento</i>	19
6.4.	Metodología de evaluación	19
6.4.1.	<i>Caracterización físico-química del extracto de malta de quinua</i>	19
6.4.1.1.	<i>Determinación de Azúcares fermentables</i>	19
6.4.1.2.	<i>Determinación del pH</i>	20
6.4.1.3.	<i>Determinación de Acidez titulable</i>	20
6.4.2.	<i>Determinación de la viabilidad de bacterias ácido lácticas (UFC/ml)</i>	21
6.4.3.	<i>Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)</i>	21
6.4.4.	<i>Determinación del rendimiento de la biomasa</i>	22

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	23
3.1.	Caracterización físico- química de la malta de quinua	23
3.1.1.	<i>Azúcares fermentables</i>	23
3.1.2.	<i>pH</i>	24
3.1.3.	<i>Acidez titulable</i>	24
3.2.	Evaluación de la viabilidad de bacterias ácido lácticas	24
3.3.	Evaluación de la velocidad específica de crecimiento (μ)	29
3.4.	Evaluación del Rendimiento de la Biomasa ($Y_{x/s}$)	31
	CONCLUSIONES	33
	RECOMENDACIONES	34
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía de la bacteria <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	6
Tabla 2-1:	Taxonomía de la bacteria <i>Lactobacillus malefermentans</i>	7
Tabla 3-1:	Composición química de la malta de quinua	9
Tabla 4-1:	Factores de crecimiento bacteriano.....	11
Tabla 5-2:	Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba	14
Tabla 6-2:	Esquema del Experimento	16
Tabla 7-3:	Características físico-químicas de la malta de quinua	23
Tabla 8-3:	Viabilidad de bacterias ácido lácticas	25
Tabla 9-3:	Resultados de la velocidad específica de bacterias ácido lácticas	29
Tabla 10-3:	Resultados del rendimiento de la biomasa de bacterias ácido lácticas.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	4
--	---

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-1:	Esquema general del proceso de evaluación de la viabilidad	10
Gráfico 2-1:	Curva crecimiento bacteriano.....	11
Gráfico 3-3:	Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 24 horas.....	26
Gráfico 4-3:	Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 48 horas.....	26
Gráfico 5-3:	Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 72 horas.....	27
Gráfico 6-3:	Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 96 horas.....	27
Gráfico 7-3:	Viabilidad de Bacterias ácido lácticas.....	28
Gráfico 8-3:	Velocidad específica de <i>L. malefermentans</i>	30
Gráfico 9-3:	Velocidad específica de crecimiento de <i>L. parakefiri</i>	30
Gráfico 10-3:	Velocidad específica de crecimiento del cultivo mixto.....	30
Gráfico 11-3:	Rendimiento de la biomasa de bacterias ácido lácticas	32

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA
- ANEXO B:** CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA MALTA DE QUINUA
- ANEXO C:** DATOS PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE MALTOSA
- ANEXO D:** CURVA PATRÓN DE MALTOSA
- ANEXO E:** ANÁLISIS DE VARIANZA (24 HORAS)
- ANEXO F:** MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY ($P < 0.05$)
- ANEXO G:** ANÁLISIS DE VARIANZA (48 HORAS)
- ANEXO H:** MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY ($P < 0.05$)
- ANEXO I:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS (72 HORAS)
- ANEXO J:** MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY ($P < 0.05$)
- ANEXO K:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS (96 HORAS)
- ANEXO L:** MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY ($P < 0.05$)
- ANEXO M:** RESULTADOS DE SUSTRATO INICIAL-FINAL DE *L. malefermentans*
- ANEXO N:** RESULTADOS DEL SUSTRATO INICIAL-FINAL DE *L. parakefiri*
- ANEXO O:** RESULTADOS DEL SUSTRATO INICIAL-FINAL DE *L. parakefiri* + *L. malefermentans*.
- ANEXO P:** NÚMERO DE COLONIAS DE LA BACTERIA *Lentilactobacillus parakefiri*
- ANEXO Q:** UFC/ml PRESENTES EN LA VIABILIDAD (*Lentilactobacillus parakefiri*)
- ANEXO R:** NÚMERO DE COLONIAS DE LA BACTERIA *Lactobacillus malefermentans*
- ANEXO S:** UFC/ml PRESENTES EN LA VIABILIDAD (*Lactobacillus malefermentans*)
- ANEXO T:** NÚMERO DE COLONIAS DEL CULTIVO MIXTO de *Lentilactobacillus parakefiri* + *Lactobacillus malefermentans*)
- ANEXO U:** UFC/ml PRESENTES EN LA VIABILIDAD (*Lentilactobacillus parakefiri* + *Lactobacillus malefermentans*)
- ANEXO V:** RESULTADOS DE UFC/ml DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN 24 HORAS
- ANEXO W:** VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA *Lentilactobacillus parakefiri*

- ANEXO X:** VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA
Lactobacillus malefermentans
- ANEXO Y:** VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO DE
L. malefermentans y *L. parakefiri*.
- ANEXO Z:** RESULTADOS DE BIOMASA EN g/L DE LA BACTERIA *Lactobacillus*
malefermentans
- ANEXO AA:** RESULTADOS DE BIOMASA EN g/L DE LA BACTERIA *Lentilactobacillus*
parakefiri
- ANEXO BB:** RESULTADOS DE BIOMASA EN g/L DE LA BACTERIA *Lactobacillus*
malefermentans + *Lentilactobacillus parakefiri*

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la viabilidad en un sustrato soluble a base de extracto de malta de quinua de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus malefermentans*, *Lentilactobacillus parakefiri* y su cultivo mixto aisladas del suelo del bosque Cashca Totoras. Se realizaron un análisis físico-químico del extracto de malta y un recuento en placa para determinar el número de células viables de cada bacteria. Se aplicaron 3 tratamientos experimentales cada uno con 5 repeticiones que fueron evaluados bajo un diseño completamente al azar, los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ADEVA) con separación de medias a través de Tukey ($p < 0.05$). Los resultados físico-químicos del extracto de malta fueron un pH de 5.1-5.7, una acidez titulable de 0.14-0.18% y para azúcares fermentables valores de 1.56 - 2.26 g/L. Para la viabilidad los resultados obtenidos presentaron diferencias altamente significativas ($p > 0.01$) a las 48 horas, a las 96 horas diferencias significativas ($p > 0.05$) y a las 24 y 72 horas diferencias no significativas ($p < 0.05$), el mejor tratamiento es *L. malefermentans* con valores de 3.6×10^8 , 8.7×10^8 , 2.9×10^9 , 3×10^9 UFC/ ml a las 24, 48, 72 y 96 horas respectivamente. Además, los parámetros cinéticos como la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento de la biomasa fueron de 0.05 h^{-1} y 0.12 g/L . Se concluye que el crecimiento bacteriano presenta una entre las 24 y 72 horas presenta una relación directamente proporcional en función del tiempo ya que el número de UFC/ml aumenta con una tendencia normal. Se recomienda emplear *L. malefermentans* como probiótico en la elaboración de bebidas funcionales dado que su recuento viable es mayor a 10^7 UFC/ml.

Palabras clave: <MICROBIOLOGÍA>, <VIABILIDAD>, < *L. malefermentans* >, <*L. parakefiri*>, <MALTA DE QUINUA>, <AZÚCARES FERMENTABLES>, <VELOCIDAD ESPECÍFICA>, <RENDIMIENTO DE BIOMASA>.


DBRA
Ing. Cristhian Castillo



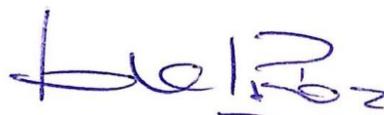
1795-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the viability of lactic acid bacteria *Lactobacillus malefermentans*, *Lentilactobacillus parakefiri* and their mixed culture isolated from the soil of the Cashca Totoras forest in a soluble substrate based on quinoa malt extract. A physicochemical analysis of the malt extract and a plate count were performed to determine the number of viable cells of each bacterium. Three experimental treatments were applied, each with 5 replicates, which were evaluated under a completely randomized design. The results were analyzed by Analysis of Variance (ADEVA) with separation of means by Tukey ($p < 0.05$). The physicochemical results of the malt extract were a pH of 5.1-5.7, a titratable acidity of 0.14-0.18% and for fermentable sugars values of 1.56 - 2.26 g/L. For viability the results obtained showed highly significant differences ($p > 0.01$) at 48 hours, at 96 hours significant differences ($p > 0.05$) and at 24 and 72 hours non-significant differences ($p < 0.05$). The best treatment is *L. malefermentans* with values of 3.6×10^8 , 8.7×10^8 , 2.9×10^9 , 3×10^9 CFU/ml at 24, 48, 72 and 96 hours respectively. In addition, the kinetic parameters such as specific growth rate and biomass yield were 0.05 h^{-1} and 0.12 g/L. It is concluded that bacterial growth presents a directly proportional relationship between 24 and 72 hours as a function of time since the number of CFU/ml increases with a normal trend. It is recommended to use *L. malefermentans* as a probiotic in the elaboration of functional beverages since its viable count is higher than 10^7 CFU/ml.

Keywords: <MICROBIOLOGY>, <VIABILITY>, <*L. malefermentans*>, <*L. parakefiri*>, <QUINOA MALT>, <FERMENTABLE SUGARS>, <SPECIFIC SPEED>, <BIOMASS YIELD>.

1795-DBRA-UTP-2022



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco
0602698904

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido-lácticas (BAL o LAB por sus siglas en inglés) han sido utilizadas durante siglos en fermentaciones industriales y han generado gran atención al ser empleadas en la industria de alimentos principalmente para la obtención de ácido láctico, también por el valor nutritivo que aportan a los productos alimenticios y su capacidad de conferir distintas características sensoriales como textura, sabor y olor agradable. Las BAL son un grupo de microorganismos que fermentan azúcares para producir ácido láctico como consecuencia de la fermentación. (Heredia et al.,2017, p.340). Los géneros aerobios típicos se denominan: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus* excepto *Bifidobacterium* (Sáenz y Ramos, 2008, p.56). Se encuentran distribuidas considerablemente en la naturaleza y se pueden aislar de distintas fuentes como: alimentos, suelo, plantas verdes, el tracto estomacal de mamíferos entre otras. Son ácido tolerantes y crecen en un pH de 4 - 4.5, la mayor parte son mesófilas y se desarrollan a temperaturas de 5°C hasta 45°C, siendo capaces de subsistir naturalmente en medios donde otras bacterias no tolerarían la actividad producida por los ácidos orgánicos. Las colonias tienden a ser medianas o pequeñas, convexas, de bordes enteros, opacas y sin pigmentación. (Sánchez,2020; citado en Carr y Chill et al.,2002)

Por viabilidad se entiende a la habilidad que las bacterias poseen para multiplicarse y producir una colonia macroscópica en un medio de cultivo sólido o líquido durante un cierto tiempo (Guerra y Castro,2017, p.139). Para la proliferación de las BAL se requieren ciertos factores de crecimiento como: azúcares (glucosa - lactosa), aminoácidos y vitaminas (Estrada et al., 2017, p.2). En la actualidad existen medios de cultivo sintéticos y naturales. Un medio típico natural y satisfactorio para el desarrollo de las BAL es la leche, sin embargo, existen otro tipo de alimentos que también son excelentes medios para la producción de metabolitos, entre ellos están las masas de cereales, el extracto de malta entre otros. En este caso se ha optado por aprovechar el extracto de malta de quinua como un medio de cultivo natural, tomando en cuenta la investigación realizada por (Alvarez,2012, p.70) sobre la elaboración y caracterización de bebidas proteicas a base de malta de quinua quien reporta un valor de carbohidratos de 72.97 ya que estos constituyen una fuente de carbono para muchos seres vivos por lo cual podría convertirse en un sustrato ideal para el desarrollo y crecimiento de bacterias. Además, su uso como medio de cultivo trae ventajas económicas en comparación con un medio de cultivo sintético.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos benefactores en los alimentos y en la salud del ser humano ya que mejoran el tracto gastrointestinal y evitan el desarrollo de microorganismos patógenos capaces de producir enfermedades (Campo et al.,2008, p.2). Es por ello que con la presente

investigación se busca evaluar la viabilidad o habilidad para multiplicarse de dos bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans* y *Lentilactobacillus parakefiri*) aisladas del suelo del bosque primario Cashca Totoras, en un sustrato soluble a base de extracto de malta de quinua, con el fin de aprovechar las bacterias silvestres y poder aplicarlas posteriormente en la industria alimentaria en la elaboración de vino y cerveza o incluso para aumentar el valor nutricional y mejorar las características sensoriales como el sabor, olor y textura en otro tipo de alimento fermentando. (León, 2012, p.5)

Por lo mencionado anteriormente se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar la viabilidad de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*, *Lentilactobacillus parakefiri* y el cultivo mixto) aisladas del suelo del bosque primario Cashca Totoras en un sustrato soluble a base de malta de quinua.
- Realizar una caracterización físico - química del sustrato a base de extracto soluble de malta de quinua.
- Cuantificar la población de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*, *Lentilactobacillus parakefiri* y el cultivo mixto) en el sustrato soluble a base de malta de quinua a 24,48,72,96 horas.
- Establecer la velocidad específica de crecimiento de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*, *Lentilactobacillus parakefiri* y el cultivo mixto) en un sustrato soluble a base de malta de quinua.
- Determinar el rendimiento de la biomasa de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus malefermentans*, *Lentilactobacillus parakefiri* y el cultivo mixto) en un sustrato soluble a base de malta de quinua.

CAPÍTULO I

1. MARCO REFERENCIAL

1.1. Bacterias Ácido Lácticas

Al denominar a las “bacterias ácido lácticas” se caracteriza a un grupo de bacterias que degradan azúcares para convertirlos en ácido láctico, debido a su capacidad para crecer en varios sustratos y en diversas condiciones biológicas el grupo de las BAL es considerado el más abundante y propagado en la naturaleza (Aguádelo et al., 2015; citado en Moreira, 1993). Son un conjunto diverso de microorganismos Gram – positivos con un tamaño de 0.5 -1.2 x 1-10 µm, que se distinguen por algunos rasgos comunes, morfológicos, metabólicos y fisiológicos. Poseen forma de cocos o bacilos, la gran parte son anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes, no móviles, no reducen el nitrato a nitrito, no esporulados, carentes de catalasa y producen ácido láctico como único producto de fermentación de carbohidratos, (Ramírez et al., 2011, p.3).

1.1.1 Características generales

Las bacterias ácido lácticas son mesófilas, capaces de desarrollarse a temperaturas muy bajas como 5°C y a temperaturas muy altas como 45°C, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 25°C - 30°C. Con respecto al pH de crecimiento pueden sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo de 3.2 y un pH alto de hasta 9.6, pero la mayor parte crece en un pH entre 4.0 - 4.5, (Salagata,2018, p.18). Se caracterizan por la producción de ácido láctico como resultado metabólico final de glucólisis anaeróbica, con un alto rendimiento y productividad. Por sus características bioquímicas pueden ser homofermentativas (producen ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico, etanol, acetato y CO₂) (Agudelo et al., 2015, p.2)

Además, según (Aragón, 2015, p.17) se caracterizan por:

- Capacidad de biosíntesis débil, lo cual produce su poliauxotropía para distintos aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas y ácidos grasos.
- No poseen citocromos por lo cual pueden realizar respiraciones aeróbicas y anaeróbicas.
- Bacterias anaerobias facultativas microaerófilas.

- No tienen un ciclo de Krebs funcional y adquieren energía por fosforilación a nivel de sustrato a la vez que oxidan hidratos de carbono.
- Son tolerantes a los ácidos, capaces de sobrevivir en un pH menor a 5 y a una temperatura de 5 - 45°C. Lo cual implica una ventaja competitiva frente a otros microorganismos no resistentes los cuales se desarrollan en medios neutros o básicos

Son especialmente empleados como cultivos iniciadores en la fabricación de productos lácteos como: yogurt, mantequilla, crema y quesos, así como también en el procesamiento de carnes o vegetales o sus derivados como: salame, salchichas Frankfurt, chucrut, kimchi y bebidas alcohólicas como por ejemplo vinos y cerveza (Ramírez et al., 2011, pp.1-2). Las BAL son microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre y los animales en cantidades apropiadas mejoran la salud, son considerados probióticos y se usan en la industria de los alimentos en la elaboración de productos fermentados o como suplementos alimenticios, también en el área pecuaria para optimizar la producción animal (Olivera, 2011, pp. 3-4).

1.1.2. Clasificación

La clasificación de las BAL en géneros diferentes se basa en la morfología, la forma de fermentación (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas (mesófilas o termófilas), la configuración del ácido láctico producido, la capacidad para crecer a altas concentraciones de sal (halotolerantes o no halotolerantes) y la tolerancia a la alcalinidad y acidez. En la naturaleza se puede encontrar los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Pedipoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagonococcus* y *Weisiella* los cuales poseen células en forma de cocos y bacilos. Sin embargo, los más característicos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconococcus*, (Ramírez et al., 2011, p.2). Ver en la figura 1-1.

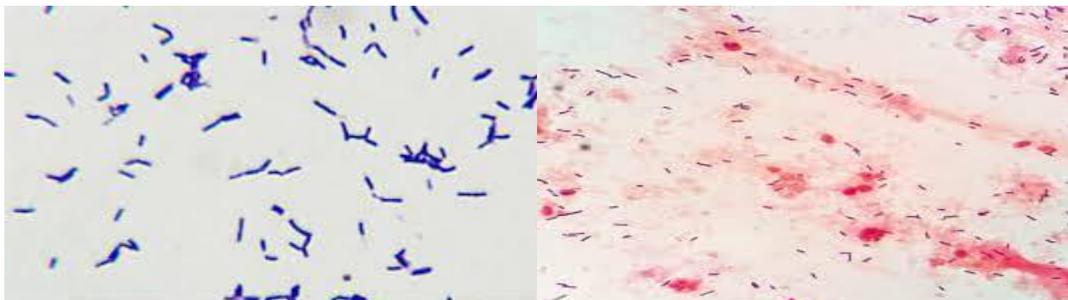


Figura 1-1. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*

Fuente: Guevara et al., 2017, p.329.

1.2.3. Uso a nivel Industrial

Las BAL son utilizadas en la elaboración y conservación de alimentos, además suelen ser empleadas en la industria alimentaria para la producción de sabores y olores específicos en alimentos fermentados. El progreso constante de la industria alimentaria y en particular el manejo de nuevas materias primas ha establecido la necesidad de obtener productos nuevos lo que explica la importancia hacia este grupo de bacterias, ya que son utilizadas a gran escala en procesos de producción comercial como bebidas alcohólicas, conserva de vegetales, fermentaciones cármicas, pan y otros productos alimentarios a los cuales les otorga características nutricionales, (Cajas, 2017, p.28)

Las funciones tecnológicas de las BAL en los productos alimentarios son las siguientes, (Parra, 2010, pp. 95-96):

- Formación del sabor ácido.
- Inhibición de microorganismos patógenos.
- Gelificación de la leche.
- Reducción del contenido de lactosa.
- Creación de aroma.
- Creación de gas para la formación de agujeros en los quesos.
- Proteólisis requerida en la maduración de los quesos.
- Probióticos
- Producen CO₂ que concede el carácter espumoso de varias leches fermentadas.
- Aseguran la calidad y uniformidad del producto final.
- Incrementan el valor nutricional de los productos alimenticios.

1.2. Especie *Lentilactobacillus parakefiri*

Lentilactobacillus parakefiri es una especie del género *Lentilactobacillus* que se aisló por primera vez del grano de kéfir, se caracteriza por ser una bacteria mesófila anaerobia facultativa que se desarrolla a una temperatura de 30°C (Takizawa et al., 2020, p.345).

1.2.1. Morfología

Son bacilos gram-positivos inmóviles, de 0.5 x 1.2 a 1.0 x 3.5 µm. Se representan de forma individual, en pares y en ocasiones en cadenas cortas. A una temperatura de 30 °C y en un pH de

5.4 después de 5 días las colonias son de 0.5 - 2 mm circulares, irregulares o planas. Algunas tienden a ser opacas o blancas y rugosas, (Georgaliki et al.,2021, pp.2-4).

1.2.2. Clasificación Taxonómica

En la tabla 1-1 se indica la clasificación taxonómica de la especie *Lentilactobacillus parakefiri*.

Tabla 1-1: Taxonomía de la bacteria *Lentilactobacillus parakefiri*

Dominio	Bacterias
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilos
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Lentilactobacillus</i>
Especie	<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>

Fuente: (Takizawa et al., 2020, p.1)

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

1.2.3. Características Bioquímicas

Entre las principales características están las siguientes, (Takizawa et al., 2020, p.1):

- Produce ácido L-Láctico y CO₂ por heterofermentación.
- Resultados positivos para hidrolisis de arginina (NH₃ arginina).
- Fermentan: galactosa, lactosa, maltosa y ribosa con la producción de gas.
- Resultados negativos para catalasa.
- Fermentan fructosa, gluconato, manitol, manosa, rafinosa, sacarosa, trehalosa y xilosa.
- Resultados variables en la fermentación de melizitosa y melibiosa.

1.3. Especie *Lactobacillus malefermentans*

Lactobacillus malefermentans es una bacteria heterofermentativa que se aisló de la cerveza en la que se muestra como contaminante. El microorganismo se diferencia principalmente porque fermenta únicamente glucosa, maltosa e inulina produciendo ácido láctico, pero no gas, por lo cual, se le ha denominado *L. malefermentans*. (Russell y Walker, 1953, p.160)

1.3.1. Morfología

Son gram-positivos inmóviles con forma de vara, miden de 2-6 μm de largo. Microorganismo anaerobio facultativo que no posee esporas, capsulas ni flagelos. Poseen un diámetro de 1 a 2 μm formando células individuales, pares o cadenas cortas. Sus colonias son nudosas, grisáceas, brillantes o tienden a ser blancas y opacas (Russell y Walker, 1953, pp.2-3).

1.3.2. Clasificación taxonómica

En la tabla 2-1 se indica la clasificación taxonómica referente a la especie *Lactobacillus malefermentans*.

Tabla 2-1: Taxonomía de la bacteria *Lactobacillus malefermentans*

Dominio	Bacterias
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilos
Orden	<i>Lactobacillales</i>
Familia	<i>Lactobacillaceae</i>
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>Lactobacillus malefermentans</i>

Fuente: (Zheng et al.,2020, p.160)

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

1.3.3. Características Fisiológicas

Según (Russell y Walker, 1953, p.161), entre las principales características están las siguientes:

- Crecen a una temperatura óptima de 25 a 34°C, min de 10°C y máx de 37°C.
- Anaerobio facultativo.
- pH óptimo de 4.3 que puede variar de 4.1 a 6.9.
- No se desarrolla en medios de NaCl al 4%, 6.5% o 8%.
- Resisten temperaturas de 60 a 65°C.

1.3.4. Características bioquímicas

Entre las principales características están las siguientes, (Russell y Walker, 1953, p.161):

- Presenta catalasa negativa.
- Fermenta glucosa, maltosa, ribosa e inulina sin afectar a otros carbohidratos.
- Presenta resultados positivos para hidrolisis de arginina (NH₃ arginina), quimotripsina y alfa-glucosidasa.
- Fermentación variable con obtención de ácido láctico a partir de gluconato.

1.4. Fermentación

Es un proceso metabólico a través del cual algunos microorganismos obtienen energía y nutrientes a partir de ciertos compuestos orgánicos. Al ser una reacción anaeróbica no requiere la presencia de oxígeno. La fermentación es utilizada por los microorganismos como mecanismo de producción de energía en forma de ATP, dicha energía se obtiene a partir de la degradación de moléculas orgánicas como el almidón o el azúcar (Puerta,2010, p.2). Los carbohidratos son buenos sustratos ya que las bacterias convierten dichos carbohidratos en ácido láctico, sin embargo, pueden también ser capaces de fermentar ácidos orgánicos, aminoácidos, piridinas y pirimidinas (Bravo, 2011, p.1)

1.5. Sustrato

Por sustrato se entiende a la parte donde ciertos seres vivos desarrollan sus funciones vitales y se relacionan entre sí (Pérez y Gardey, 2021, p.1). Para que cualquier sustancia o residuo sea considerado como sustrato debe cumplir requisitos como: contener una fuente suficientemente rica de carbono y nitrógeno, oligoelementos y sales minerales básicas para que los microorganismos desarrollen sus funciones, tamponador de pH y una composición equilibrada sin exceso ni limitación de ningún nutriente necesario (Erlota et al.,2007, p.34). Uno de los sustratos empleados como fuente de carbono mayormente es:

- **Extracto de malta**

Proviene como residuo del malteado generalmente de la cebada en la fabricación de la cerveza, presenta fuentes de carbono fácilmente asimilables de las cuales las más comunes son la maltosa glucosa y maltotriosa y variadas ricas fuentes de nitrógeno (aminoácidos, proteínas y péptidos).

Dada su composición, se pueden producir condensaciones de Maillard durante el proceso de esterilizado. El extracto líquido es de color café con un suave olor y dulzor a malta pura (Bozzo, 2012, p. 9)

1.6. Extracto de malta de quinua

Su producción comienza germinando la quinua, la cual posteriormente ha sido secada y tostada en un proceso denominado “malteado”. El propósito de maltear un grano es activar las enzimas que comienzan a convertir el almidón en azúcares fermentables, también contiene pequeñas cantidades de otros azúcares como sacarosa y fructosa. La malta sumergida en agua a 60-70 °C forma una masa cuyo valor de pH es crítico, y se le debe mantener entre 5.2 y 5.7 debido al efecto sobre las enzimas que convierten el almidón en azúcar. (Ñahuero, 2018, p.51)

1.7. Características físico-químicas de extracto malta de quinua

Según (Cárdenas y Melgarejo, 2019, p.48) en su investigación sobre elaboración de cerveza a partir de malta de maíz y quinua manifiestan que los valores obtenidos en cuanto a los componentes de la malta de quinua fueron: un pH de 5.77 - 5.88, una humedad de 3.83 - 5.35 %, un contenido de cenizas de 1.24 - 1.91 %, un total de azúcares reductores de 1.36 - 3.30 mg/g y finalmente una acidez de 0.07 - 0.17 %.

En la tabla 3-1 se presenta la composición química de la malta de quinua, en la cual se puede apreciar también los valores de proteína, lípidos, fibra, cenizas e hidratos de carbono (g/100g).

Tabla 3-1: Composición química de la malta de quinua

Malta de quinua (%)	
Proteínas	10.59
Lípidos	6.62
Fibra	2.82
Carbohidratos	77.97
Humedad	7.02
Cenizas	2.80
Energía Total	364.9

Fuente: Ñahuero, 2018, p.

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

1.8. Viabilidad

La viabilidad en microbiología se define como la capacidad o habilidad de una población microbiana para multiplicarse y producir una colonia macroscópica en un medio de cultivo sólido o líquido adecuado (Copari, 2021, p.5). Para evaluar la viabilidad de bacterias y hongos, primero la muestra debe ser regenerada, luego se hacen diluciones seriadas las cuales se utilizan para inocular un medio de cultivo específico y finalmente se verifica el crecimiento y pureza (Guerra y Castro, 2017, p.4) ver en el gráfico 1-1.

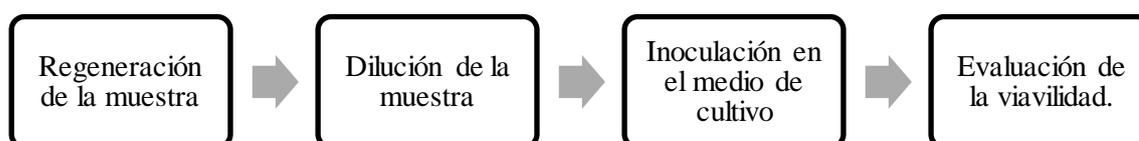


Gráfico 1-1. Esquema general del proceso de evaluación de la viabilidad

Fuente: (Guerra y Castro, 2017, p.4)

La viabilidad de las bacterias se puede establecer de forma simple al evaluar el crecimiento bacteriano en los medios nutritivos. Para ello, se pueden enumerar las colonias en los medios de cultivos sólidos, donde el resultado se expresará en unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) y no como células bacterianas por ml, ya que más de una célula podría formar una colonia. Las bacterias que no crecen en medios de cultivo se puede establecer evaluando la integridad de la membrana celular como criterio de viabilidad ya que la membrana sustenta todos los procesos que acontecen dentro de la célula (Guerra y Castro, 2017, p.141).

1.9. Crecimiento bacteriano

Por crecimiento bacteriano se entiende al incremento en la cantidad de constituyentes y estructuras celulares, cuando hay crecimiento en ausencia de división celular hay incremento de tamaño y peso de la célula, pero si el crecimiento se da seguido de división celular hay un incremento en el número de células (Copari, 2021, p.6). El crecimiento microbiano es el sinónimo de multiplicación, y se refiere al aumento del número de células de una población en un tiempo determinado (López, 2016, p.6).

1.9.1. Factores de crecimiento

Los microorganismos al ser seres vivos necesitan de condiciones apropiadas de temperatura, humedad y nutrientes para desarrollarse o crecer en un determinado medio ambiente, cada factor es diferente para cada microorganismo y si estas condiciones son óptimas una sola bacteria puede producir más de 2 millones de células (Montes, 2012, p.1)

En la tabla 4-1 se incluyen los factores físicos y químicos de crecimiento bacteriano

Tabla 4-1: Factores de crecimiento bacteriano

Factores Físicos	Factores Químicos
Temperatura	Diversos elementos constitutivos de las
Presión osmótica	bacterias
pH	

Fuente: Vega, 2009, p.17

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

1.9.2. Curva de crecimiento bacteriano

La curva tradicional de un microorganismo unicelular es representada en una gráfica. Las curvas de crecimiento son diferentes según el tipo de microorganismo y según varíe las condiciones del cultivo. Sin embargo, todas ellas mantienen en común una serie de fases llamadas fase de latencia, fase exponencial o logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte. En el gráfico 2-1 se representa un curva típica de crecimiento de una población donde se ha relacionado el tiempo transcurrido con el número de células bacterianas, (Zarco, 2015, p.28).

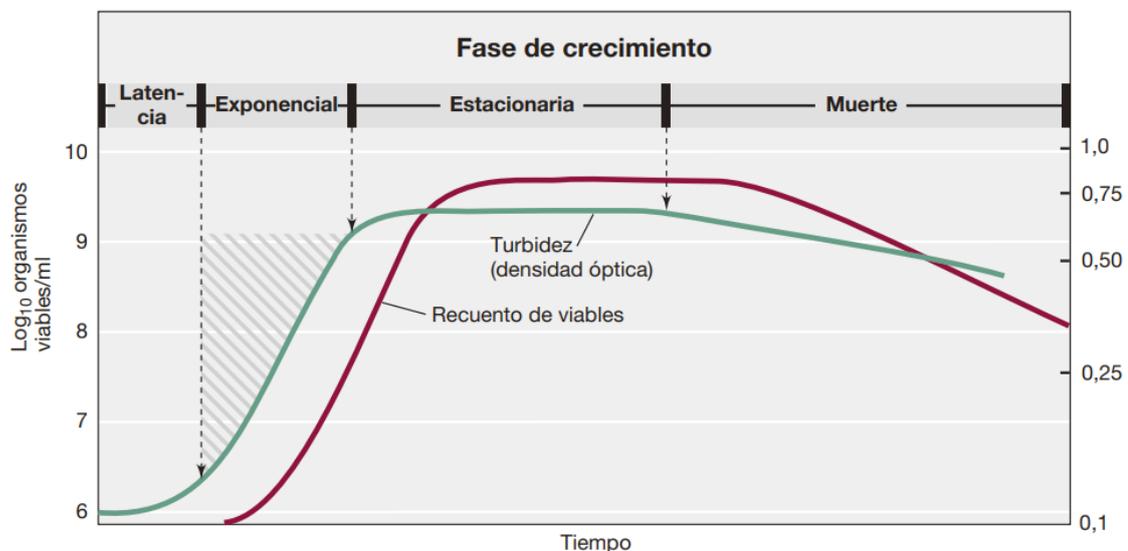


Gráfico 2-1. Curva crecimiento bacteriano

Fuente: Madigan et al., 2015, p.158

El gráfico 2-1 describe un ciclo de crecimiento completo e incluye las fases de:

- **Fase de lag o fase de latencia:** es una fase de adaptación en el cual la célula se prepara para consumir los nutrientes que el medio le proporciona, no existe un incremento del número de células ya que permanece prácticamente constante (Benintende y Sánchez, 2015, p.4).
- **Fase exponencial o logarítmica:** es la fase en la cual los microorganismos se multiplican con gran rapidez. Durante la duplicación se producen tantas nuevas células como se habían producido anteriormente de manera acumulada, la fase continúa mientras haya factores que limiten el crecimiento. (García, 2014, p.8).
- **Fase estacionaria:** en esta fase se da la acumulación de metabolitos tóxicos, por la disminución del oxígeno o cambios en las condiciones de pH del medio de cultivo, por ende, no hay variación en el número de microorganismos. Las limitaciones de crecimiento se dan por agotamiento de cierto nutriente esencial y la velocidad de crecimiento empieza a disminuir hasta hacerse nula. (Benintende y Sánchez, 2015, p.4).
- **Fase de muerte o declive:** la población microbiana empieza a disminuir, las bacterias se quedan sin nutrientes y mueren. Se caracteriza por la disminución continua del número de células viables y el aumento de la tasa de mortalidad de las mismas. (García, 2014, p.8).

1.10. Cinética de crecimiento

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo permite la predicción del tiempo de fermentación. La evaluación de velocidades y rendimientos otorga información útil para implantar estrategias de producción (Portillo y Ramírez, 2009, p.39)

1.10.1. Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento es el incremento del número de células por unidad de tiempo. Un cultivo de microorganismos que se desarrolla de manera equilibrada representa una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad de las bacterias para su duplicación es proporcional ya que el número de células o masa aumenta durante ese periodo de tiempo (Santos, 2007, p.54). Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio) y las características genéticas del microorganismo influyen directamente en la tasa de crecimiento exponencial (Madigan et al., 2015, p.158)

En una investigación para la determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos *Lactobacillus plantarum* y bacterias ácido lácticas de yogurt la velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial fue de 0.53 h^{-1} , este valor depende de las concentraciones de nutrientes. En otra investigación similar el microorganismo *L. plantarum* bajo condiciones óptimas puede llegar a tener una velocidad específica de crecimiento mayor a 0.5 h^{-1} (Agudelo et al., 2010, p.4). Otro autor manifiesta que la velocidad específica de *L. casei* al emplear diferentes sustratos y condiciones presento valores de 0.087 usando melaza y 0.052 usando lactosuero observándose en la melaza un crecimiento 40% mayor al del lactosuero en lo reportado por (Yáñez, 2016, pp.49-50). Otros autores reportan que *L. casei* alcanzo una velocidad específica de crecimiento (h^{-1}) de 0.705 en un medio MRS (D-glucosa 20 g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4 g/L) y 2.187 (h^{-1}) en un medio Pro (10 g/L azúcar blanco; 15 g/L leche de soya; 150 g/L leche en polvo 15 g/L salvado de trigo) alcanzando una gran concentración celular en la fase logarítmica (Jurado et al., 2014, p.31).

1.10.2. Rendimiento de la Biomasa

El rendimiento de la biomasa se define como la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido, que hace referencia a la fuente de carbono y energía. El rendimiento celular se define mediante el concepto de nutriente limitante. Un nutriente limitante es aquel sustrato que cuyo consumo controla la velocidad de obtención de biomasa. Lo que quiere decir que la velocidad de crecimiento celular está en función de tal nutriente (Arana et al., 2009, p.2)

Algunos estudios reportan que para *Lactobacillus casei* el valor global promedio de rendimiento de la biomasa por sustrato $Y_{x/s}$ se sitúa en 0.09990 g de biomasa/g de sustrato. Sin embargo, puede haber concentraciones más altas de biomasa al final de la fermentación y rendimientos superiores (Aguirre et al., 2009, p.72). Otros estudios manifiestan que *Lactobacillus* en un medio con 7% de lactosa el rendimiento de la biomasa producido fue de 0.90 g/g (León, 2013, pp.133-144). En su investigación (Agudelo et al., 2010, p.4) reporta que el rendimiento de la biomasa/ sustrato $Y_{x/s}$ para *L. plantarum* en la primera siembra fue de 0.401 lo cual indica la eficiencia del nutriente para resistir la biosíntesis. Otros investigadores reportan un rendimiento biomasa /glucosa de 0.143 en un medio MRS al pasar 48 horas de fermentación, sin embargo se encuentran reportes de rendimientos de biomasa/glucosa de 0.21 en caldo MRS (Georgieva et al., 2014, p.5) y un rendimiento de 0.49 en un medio con almidón de yuca para la bacteria *L. plantarum*, este rendimiento va a depender del tipo de sustrato empleado ya que en medios con lactosa los rendimientos varían desde 0.27 hasta 0.47 dependiendo del pH (Wenge y Mathews, 1999, p.163).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización y duración del experimento

Este trabajo de Investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Ciencias Biológicas y Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH, ubicada en Av. Panamericana Sur km 1 ½ en la ciudad de Riobamba, provincia de Chimborazo. El trabajo experimental se realizó en un periodo de 90 días laborables.

Tabla 5-2: Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba

Variable Meteorológica	Valor	Unidad
Precipitación	1462	mm/año
Temperatura	4 - 14	°C promedio anual
Humedad relativa	85	%

Fuente: Atlas, 2022, p.1.

Realizado por: Moya, Nicol, 2022

2.2. Unidades Experimentales

Las unidades experimentales estaban conformadas cada una por 9 ml de extracto soluble de malta de quinua más 1 ml de solución de la bacteria. Se evaluaron 3 bacterias diferentes por lo que se utilizó un total de 15 unidades experimentales.

2.3. Materiales, equipos e insumos

2.3.1. Materiales

- Materiales de protección (mandil, cofia, guantes)
- Detergente, jabón y desinfectante
- Papel: aluminio - industrial
- Toallas absorbentes
- Alcohol al 96 %
- Mechero de Bunsen
- Probetas
- Gradilla para tubos

- Cajas Petri
- Asa de inoculación
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Pipetas 1-10 ml
- Puntas para micropipetas 1000µl
- Frascos termorresistentes
- Soporte universal
- Bureta
- Tubos de eppendorf
- Balones aforados
- Matras Erlenmeyer
- Barillas de agitación
- Vaso de precipitación
- Hidróxido de sodio
- Ácido 3.5 dinitrosalicílico
- Tartrato de Na y K
- Maltosa pura
- Fenolftaleína
- MRS (Caldo – Agar)
- Tanque de gas
- Envases de vidrio color ámbar
- Bolsas de papel
- Bandejas de plástico

2.3.2. Equipos

- Autoclave
- Micropipeta
- Agitador magnético
- Estufa
- Balanza analítica
- Mufla
- Vortex
- Cámara de flujo laminar

- Incubadora
- pHmetro
- Refrigeradora
- Espectrofotómetro
- Cuenta colonias
- Termómetro
- Cocina

2.3.3. Insumos

- Malta de quinua
- Cepas silvestres de bacterias ácido lácticas (*L. malefermentans* y *L. parakefiri*)
- Agua destilada

2.4. Tratamiento y diseño experimental

Se evaluó la viabilidad de diferentes bacterias ácido lácticas (*L. malefermentans* y *L. parakefiri* y una mezclas de ambas) aisladas del suelo del bosque primario Cashca Totoras, usando como sustrato el extracto soluble de malta de quinua, por lo que se tuvo 3 tratamientos experimentales cada uno de ellos con 5 repeticiones. Las unidades experimentales estuvieron distribuidas bajo un diseño completamente al azar (D.C.A). En el siguiente tabla 4-3 se representa el esquema del experimento utilizado.

Tabla 6-2: Esquema del Experimento

TRATAMIENTOS	CÓDIGO	REP.	T.U. E	Total, ml/Trat
1 ml <i>Lactobacillus malefermentans</i> + 9 ml extracto de malta de quinua	T1	5	10	5
1 ml <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + 9 ml extracto de malta de quinua	T2	5	10	5
0.5 ml <i>Lactobacillus malefermentans</i> + 0.5 ml <i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + 9 ml extracto de malta de quinua	T3	5	10	5
			TOTAL	15

T.U.E: Tamaño de la Unidad Experimental, 10 ml

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

2.4.1. Mediciones experimentales

2.4.1.1. Caracterización del extracto soluble de malta de quinua

- Azúcares fermentables, g/L
- Potencial de hidrógeno, unidades de pH
- Acidez, ácido láctico %

2.4.1.2. Población de las bacterias ácido lácticas a las 24, 48, 72 y 96 horas

- *Lactobacillus malefermentans*, UFC/ ml
- *Lentilactobacillus parakefiri*, UFC/ml
- Cultivo Mixto (mezcla de las dos bacterias), UFC/ml

2.4.1.3. Velocidad específica de crecimiento

- Recuento de microorganismos, h⁻¹

2.4.1.4. Rendimiento de la Biomasa

- Gramos de biomasa / gramos de sustrato

2.5. Análisis estadísticas y pruebas de significancia

Los datos experimentales obtenidos fueron evaluados mediante los siguientes análisis estadísticos:

- Análisis de varianza (ADEVA), para las diferencias.
- Separación de medias ($P < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.
- Estadística descriptiva, haciendo referencia a las medidas de tendencia central (media) y las medidas de dispersión (desviación estándar)

2.6. Procedimiento experimental

2.6.1. Preparación del sustrato: Malteado de la Quinua

El malteado de la quinua se efectuó empleando 500 g (1lb) de quinua, poniendo en práctica los parámetros óptimos de trabajo. Basado en el diagrama de flujo descrito por (Álvarez, 2012, pp.51-52) quien manifiesta las siguientes operaciones: recepción de la materia prima, limpieza y desinfección, lavado, remojo, germinación, secado, horneado (60, 70 y 80 °C), limpieza de la malta, maceración y un filtrado final.

2.6.2. Bacterias ácido lácticas

Los microorganismos de trabajo empleados fueron *L. malefermentans* y *L. parakefiri* aisladas previamente del suelo del bosque primario Cascha Totoras los cuales fueron proporcionados por el grupo de investigación SEALPRA de la facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.6.2.1. Reactivación de bacterias ácido lácticas

Usar un vial completo para reactivar la cepa. Descongelar rápidamente los viales conservados a -20°C en baño termostato a 37°C por 30 segundos, luego trasladar unas gotas del contenido del vial al medio sólido adecuado para el desarrollo de la cepa y el resto a un tubo con 5-10 ml del mismo medio pero líquido. Incubar a la temperatura y las condiciones óptimas y finalmente sembrar por lo menos una vez antes de ser ocupada como cepa de trabajo (Escardino,2016, p.1).

6.3. Siembra de bacterias ácido lácticas

6.3.1. Inoculación en malta de quinua

(Flores, 2013, p.27) indica que el procedimiento de inoculación en tubos de ensayo es el siguiente:

- Esterilizar y Enfriar el asa de inoculación.
- Inocular por agitación hasta que se homogenice correctamente.
- Ubicar los tubos inoculados en la gradilla.
- Inocular nuevamente el asa de inoculación.
- Incubar en condiciones apropiadas de temperatura (termófilo, mesófilo, psicotrofo) y disponibilidad gaseosa (aerobio o anaerobio) de 12 a 24 horas.

6.3.2. Purificación y mantenimiento del cultivo

Ejecutar varias diluciones sucesivas de la muestra bajo condiciones de esterilidad con la finalidad de sembrar después en cantidades iguales en una serie paralela de cajas Petri, cuando la dilución es alta se procede a preparar diluciones en sucesiones de 1:10, alcanzando diluciones de hasta 10^{-7} . Para lo cual, se agrega 1 ml de la muestra en 9 ml de diluyente, es decir de cada 10 ml de esta dilución 1/10, 1 ml corresponde a la muestra, el proceso se debe repetir tantas veces como sea necesario. Como se establece en el procedimiento desarrollado por (Sanz, 2011, p.22)

6.3.3. Siembra para recuento

Para efectuar la siembra de recuento se tomó en cuenta las indicaciones que establece la norma técnica NTE INEN 1529-1:2013, la cual indica que se debe preparar el agar MRS según las especificaciones del envase y esterilizar el mismo en frascos termorresistentes, luego con una pipeta esterilizada trasladar 1 ml de cada dilución de la muestra a una serie de cajas Petri y finalmente en cada caja Petri con agar MRS mezclar el inóculo por medio de rotación suave, dejar solidificar el agar totalmente e incubar las cajas a la temperatura adecuada en posición invertida. Una vez transcurrido el periodo de incubación, examinar las cajas.

6.4. Metodología de evaluación

Para las mediciones experimentales, la metodología aplicada fue la siguiente:

6.4.1. Caracterización físico-química de la malta de quinua

La evaluación físico-química de la malta de quinua se efectuó con los siguientes métodos:

6.4.1.1. Determinación de Azúcares fermentables

Se realizó a través del método DNS ácido 3,5 dinitrosalicílico (técnica de Miller), el cual reacciona con los azúcares reductores presentes en la muestra, disminuyendo al compuesto en 3-amino-5-nitrosalicílico (Burgos, 2019, pp. 59-60). Y para ello se requiere de los siguientes parámetros:

- Preparación del Reactivo DNS: se pesa 1.6 g de NaOH, 43.8 g de tartrato de Na-K y 1 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico. El reactivo se prepara siguiendo los procesos y recomendaciones que sugiere el autor (López, 2016, p.34)

- Patrón de maltosa: para realizar la solución patrón de maltosa las concentraciones son las siguientes: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 g/L. Se agrega 0.25 ml de cada solución y 0.25 ml de reactivo DNS en tubos de ensayo como se muestra en el procedimiento de (Burgos, 2019, pp. 59-60).

Finalmente se toma 0.25 ml de muestra de extracto malta de quinua y 0.25 ml de reactivo DNS tomando en cuenta el procedimiento de toma de muestras de (Burgos, 2019, pp. 59-60) y se hace la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro. Con los datos obtenidos se realiza una curva de calibración y una regresión lineal de la misma despejando la variable de concentración en función de la absorbancia medida y se reemplazan los datos obtenidos para obtener los resultados deseados.

6.4.1.2. Determinación del pH

Calibrar el aparato (potenciómetro o pHmetro) a la temperatura de la muestra, empleando una solución tampón o buffers de referencia cuyo pH sea similar al deseado en la muestra. Colocar la muestra en un vaso de precipitación, aproximadamente 20 ml e introducir los electrodos y verificar la determinación del pH (AOAC: 973.41, 1990).

6.4.1.3. Determinación de Acidez titulable

Se determinó siguiendo la norma técnica (NTE INEN 13, 1983) cuyo procedimiento consiste en: tomar 2 ml de muestra del medio de cultivo a valorar en un matraz Erlenmeyer y se le añaden 18 ml de agua destilada, luego se agrega gotas de fenolftaleína al 1% como indicador. Con ayuda de una pipeta agregar gota a gota la solución de NaOH al 0.1 N, a la vez agitar lentamente el Erlenmeyer. La titulación se da por culminada cuando en la muestra se mantenga un color rosatenue. Cuando la muestra no presente cambios en el color se toma la lectura de los mililitros usados de NaOH con la finalidad de calcular la acidez presente en la muestra

La acidez titulable se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{Vc * N * PmE}{Vm} \times 100$$

Donde:

Vc: volumen de NaOH 0.1 N gastados en la titulación, en ml.

N: Normalidad de la solución de NaOH.

V_m: Volumen o peso de la muestra en ml.

P_{mE}: peso miliequivalente del ácido representativo (ácido)

6.4.2. Determinación de la viabilidad de bacterias ácido lácticas (UFC/ml)

Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizó el recuento de células viables de *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto en el extracto de malta de quinua en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). Según las recomendaciones de (Alarcón y Olivas, 2007, pp.30-31) se toma en cuenta exclusivamente las cajas petri que contengan de 30 - 300 colonias y por medio de un cuenta colonias se realiza el conteo de todas las colonias que se hayan desarrollado. Cuando la carga bacteriana es elevada se divide en 3 cuadrantes, un cuadrante con carga alta, otro con carga media y el último con carga baja se efectúa la sumatoria de los cuadrantes y se realiza un promedio. Las placas que tengan más de 300 colonias se reportan como incontables.

A continuación, se muestra la fórmula que se aplica para determinar el número de UFC/ml UFC/g que se encuentra establecida en la norma técnica NTE INEN 1 529-5, 2006.

$$\frac{UFC}{ml} \text{ ó } \frac{UFC}{g} = \frac{\text{No. de colonias por plaxa} * \text{el factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

6.4.3. Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento de *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto utilizando como sustrato extracto soluble a base de malta de quinua se estableció a partir de ecuaciones de crecimiento. La velocidad específica se define como:

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

La velocidad específica de crecimiento es el aumento en la concentración celular por unidad de tiempo, entonces la ecuación indica que:

$$\mu(t) = \frac{d(\ln)}{dt}$$

La velocidad de crecimiento específica se puede calcular como la inclinación de la curva de crecimiento cuando el logaritmo natural (ln) de $x(t)$ se traza contra el tiempo. Entonces la velocidad específica de crecimiento puede calcularse por medio de la siguiente ecuación (Escartin, 2017, p.41):

$$\mu = \frac{\ln N_f - \ln N_o}{t_f - t_o}$$

Donde N_f y N_o son el número de células viables al final y al inicio de la fase exponencial y t_f y t_o el tiempo final e inicial respectivamente.

6.4.4. Determinación del rendimiento de la biomasa

El rendimiento de la Biomasa de *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto se determinó bajo la siguiente ecuación:

$$Y \left(\frac{x}{s} \right) = \frac{X - X_o}{S_o - S}$$

Donde $Y \left(\frac{x}{s} \right)$ (g de biomasa/ g sustrato) es el rendimiento, X es la concentración final de biomasa (g/L); X_o es la concentración inicial de la biomasa (g/L), S es la concentración final del sustrato (g/L) y S_o es la concentración inicial del sustrato (g/L)

Los datos de biomasa que se requieren para realizar los cálculos se determinaron mediante el método de peso seco mediante el procedimiento que sugiere (Martinez,2019, p.4) para evaluar la concentración. Se aplicó la relación propuesta por (Martinez,2019, p.4) quien menciona que 1 mg de peso seco equivale a 5×10^9 bacterias, para obtener la concentración la biomasa en g/L se efectuó las respectivas conversiones. La concentración del sustrato en g/L se determinó con ayuda de un espectrofotómetro.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

3.1. Caracterización físico- química del extracto de malta de quinua

Luego de haber realizado los análisis físico-químicos del extracto de malta de quinua los resultados obtenidos se reportan en la tabla 7-3.

Tabla 7-3: Características físico-químicas de la malta de quinua

Variables	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Azúcares fermentables (g/L)	1.87	0.29	1.57	2.15
pH	5.4	0.30	5.1	5.7
Acidez Titulable (%)	0.16	0.02	0.14	0.18

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

3.1.1. Azúcares fermentables

La concentración de maltosa de la muestra aplicando el método DNS se determinó bajo la ecuación de la recta obtenida al graficar los datos de las soluciones de maltosa como se observa en el anexo D. Al cuantificar la concentración de maltosa presente en el extracto de malta de quinua se alcanzó una media de 1.87 ± 0.29 g/L, un valor máximo de 2.15 g/L y un valor mínimo de 1.57 g/L como se puede observar en la tabla 7-3. Al maltear la quinua el almidón se convierte en azúcar, el resultado de la síntesis del almidón que se logra de la germinación del cereal se conoce como maltosa, este azúcar es un disacárido formado por la unión de dos glucosas (Torre, 2019, p.1). La maltosa se considera como un azúcar fermentable ya que puede ser usada como fuente de alimentación de levaduras y bacterias, pero también como azúcar reductor ya que posee un grupo carbonilo intacto (Moreano, 2015, p. 21). Teniendo en cuenta estos criterios, en este estudio se aplicó la técnica de Miller con el ácido 3,5 dinitrosalicílico cuyo método busca encontrar azúcares reductores usando el reactivo DNS a través de una reacción redox sometiendo al calor, sintetizando el ácido a 3-amino-5 nitrosalicílico y cambiando el color de la muestra que se oxida y presenta una tonalidad amarilla-café. (Burgos, 2019, p. 58). En base a todo lo citado anteriormente y al comparar los resultados obtenidos con los valores de azúcares reductores de 1.36 a 3.30 mg/g de glucosa reportados por (Cárdenas y Melgarejo, 2019, p. 48) se puede deducir que estos son inferiores y que la variación que existe se da por el patrón utilizado para la cuantificación de los azúcares.

3.1.2. pH

Con respecto al pH, el valor promedio obtenido fue de 5.4 ± 0.30 , con resultados que varían de 5.7 a 5.1 como se ve en la tabla 7-3. La escala de pH va de 1 a 14, siendo el pH de 7 la disolución neutra y la disolución ácida cuando el valor es inferior al establecido (Vásquez y Rojas, 2016, p.24). Tomando en consideración el resultado obtenido y lo manifestado anteriormente el extracto de malta de quinua se establece como una sustancia ácida. En los resultados de los autores (Cárdenas y Melgarejo, 2019, p. 48) el extracto de malta de quinua marco valores de pH de 5.77 a 5.88, al hacer una comparación entre los resultados estos tienen similitud, con una variación que puede verse influida por la acidez.

3.1.3. Acidez titulable

En cuanto a la acidez titulable el extracto de malta de quinua reporto una media de 0.16 ± 0.02 % con valores que van de 0.14 a 0.18 % expresados como ácido láctico como se presenta en la tabla 7-3. Según (Cárdenas y Melgarejo, 2019, p. 48) en su investigación los resultados alcanzaron valores de acidez de 0.07 a 0.17 %, al comparar dichos valores con los que se obtuvo se puede decir que estos coinciden ya se encuentran dentro del rango estimado al igual que el reporte de (Alvarez, 2012, p.41) que obtuvo una acidez que varía de 0.154 a 0.164 %.

Al caracterizar el extracto de malta de quinua los resultados indican que esta puede ser utilizada como sustrato según sus características físico- químicas puesto que el pH que presenta es idóneo y la cantidad de maltosa que contiene favorecerán el desarrollo de las bacterias ácido lácticas.

3.2. Evaluación de la viabilidad de bacterias ácido lácticas

Los resultados obtenidos mediante el recuento microbiológico de células viables de cada BAL se puede observar en la tabla 8-3.

Tabla 8-3: Viabilidad de bacterias ácido lácticas

Periodo de evaluación	Tratamientos						E. E	Prob.
	<i>L. malefermentans</i>		<i>L. parakefiri</i>		<i>L. malefermentans</i> + <i>L. parakefiri</i>			
	UFC/ml		UFC/ml		UFC/ml			
0 horas¹	1.5x10 ⁶	a	1.5x10 ⁶	a	1.5x10 ⁶	a	0.00	0.0000
24 horas¹	3.6x10 ⁸	a	3.1x10 ⁹	a	3.3x10 ⁹	a	0.06	0.3066
48 horas¹	8.7x10 ⁸	a	7.2x10 ⁹	b	1.4x10 ⁹	c	0.05	0.0001
72 horas¹	2.9x10 ⁹	a	2.1x10 ⁹	a	2.4x10 ⁹	a	0.09	0.7080
96 horas¹	3x10 ⁹	a	2.5x10 ⁹	ab	2.7x10 ⁹	b	0.05	0.0561

1: Datos ajustados por medio de logaritmo natural.

E.E: Error estándar, Prob: Probabilidad, T1: *L. malefermentans*, T2: *L. parakefiri*, T3: cultivo mixto. Letras similares muestra que no existe diferencias significativas

p > 0,05 no significativo (ns).

p < 0,05 significativo (*).

p < 0,01 altamente significativo (**).

Realizado por: Moya Nicol, 2022.

Durante las primeras 24 horas tras su inoculación los distintos tratamientos no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) como se puede ver en la tabla 9-3, es decir todas las medias son iguales ya que durante las 24 horas las bacterias se encuentran en la fase de latencia en la cual se adaptan al medio y se preparan para hacer uso de los nutrientes que el extracto de malta de quinua les proporciona, pero sin embargo numéricamente se puede ver que el cultivo mixto posee la mayor cantidad de UFC ya que presenta un valor de 3.3×10^9 UFC/ml y el menor valor de 3.1×10^8 UFC/ml corresponde a *L. parakefiri*. La variación que se da en las 24 horas se ve en el gráfico 3-3.

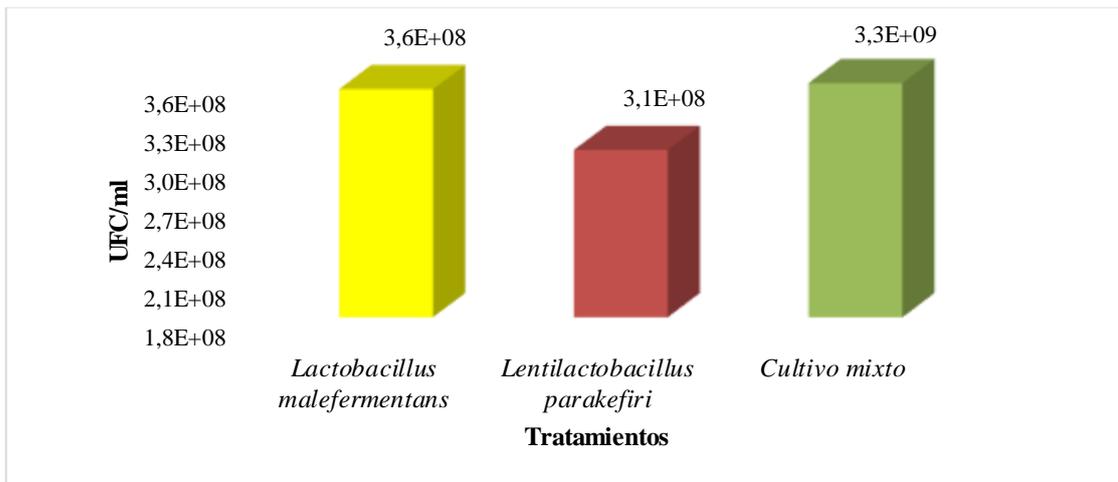


Gráfico 3-3. Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 24 horas
 Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

Al transcurrir las 48 horas los distintos tratamientos muestran diferencias altamente significativas ($p < 0.01$), siendo el cultivo mixto el tratamiento con un mayor número de células viables con un valor de 1.4×10^9 UFC/ml y *L. parakefiri* el tratamiento con un valor menor de 7.2×10^8 UFC/ml. Dicho comportamiento existe por la elevada carga bacteriana que se da al mezclar las dos cepas. En el gráfico 4-3 se puede ver la variación entre los mismos.

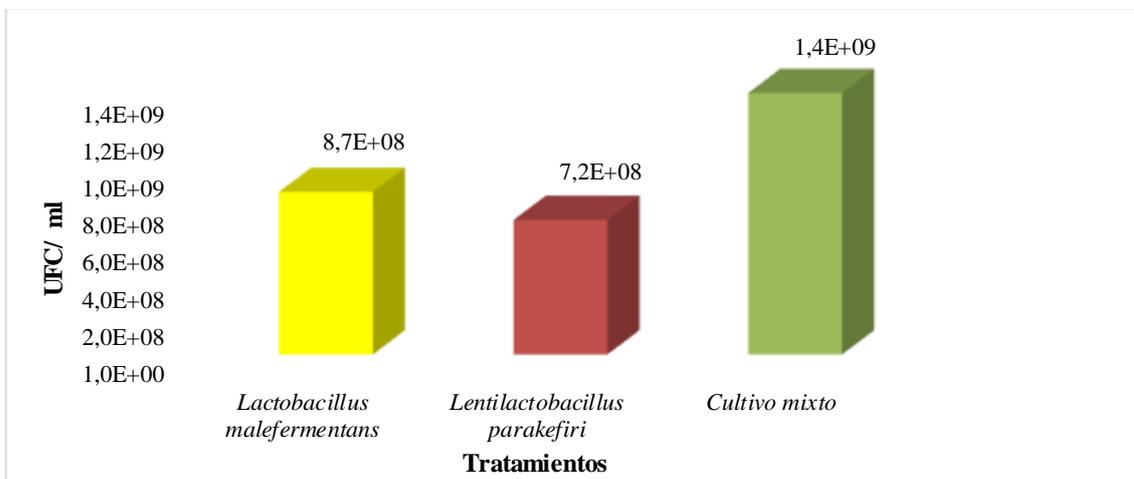


Gráfico 4-3. Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 48 horas.
 Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

A las 72 horas el recuento microbiológico de los tratamientos en el medio de cultivo no presentan diferencias significativas entre si ($p > 0.05$) ya que las bacterias al hallarse en la etapa exponencial presentan una relación directamente proporcional en función del tiempo es decir el número de UFC incrementan mientras el número de horas transcurra. Sin embargo, numéricamente se puede observar que el mayor valor de 2.9×10^9 UFC/ml pertenece a *L. malefermentans*, mientras que el

menor valor de 2.1×10^9 UFC/ml corresponde a *L. parakefiri*, como se puede apreciar en el gráfico 5-3.

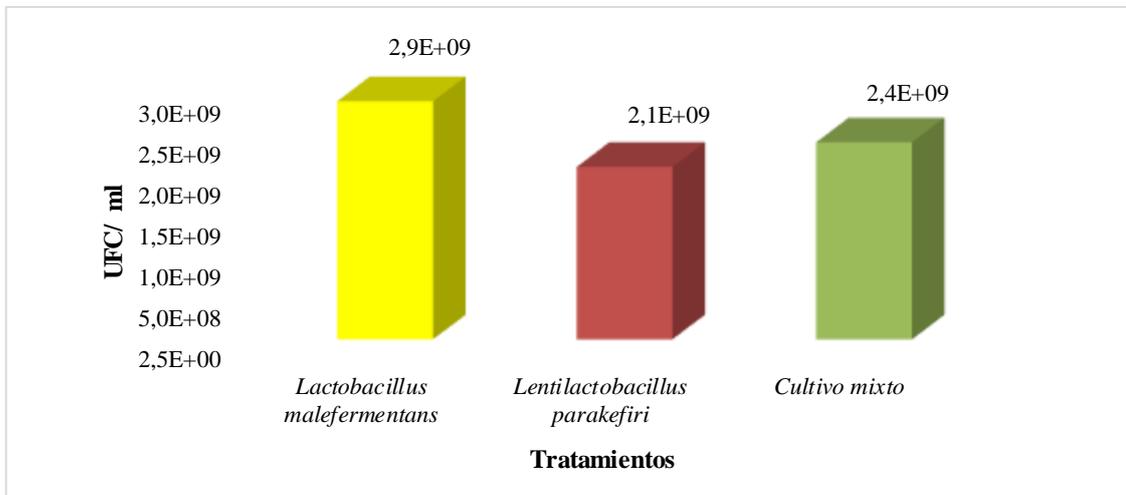


Gráfico 5-3. Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 72 horas.

Realizador por: Moya, Nicol, 2022.

Finalmente, en el recuento a las 96 horas los distintos tratamientos presentan diferencias significativas ($p > 0.05$). Siendo *L. malefermentans* la bacteria que registra el mayor número de UFC con un valor de 3×10^9 UFC/ml y *L. parakefiri* la bacteria con un valor menor de 2.5×10^9 UFC/ml. Por lo tanto, se considera que *L. malefermentans* es la que crece con mayor facilidad debido a su capacidad para degradar maltosa. En el gráfico 6-3 se da una mejor interpretación de la variación de la viabilidad de las bacterias.

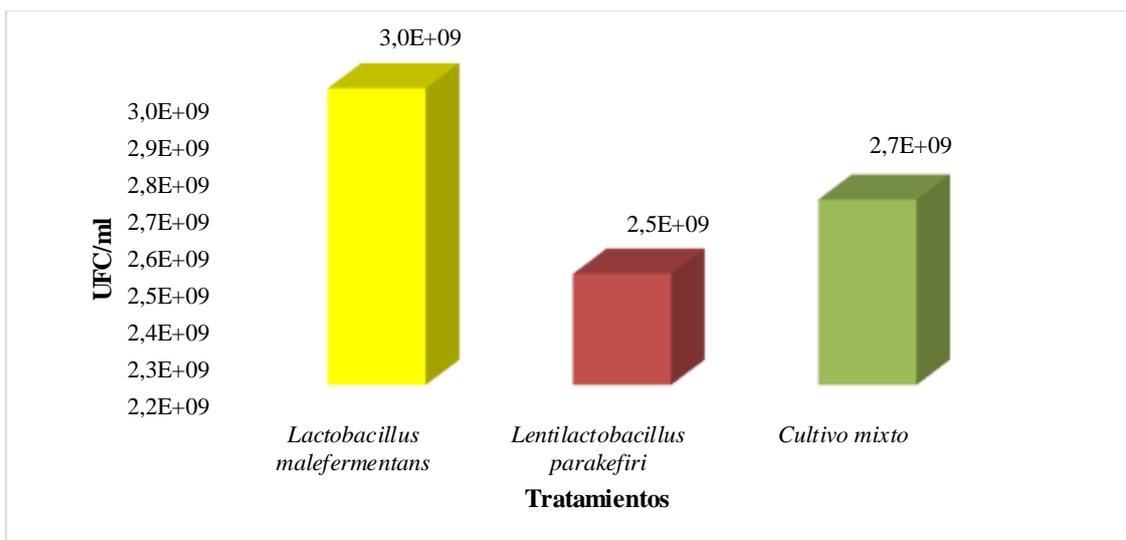


Gráfico 6-3. Evaluación de la viabilidad de bacterias a las 96 horas.

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

Al comparar con un estudio similar de la viabilidad de *Lactobacillus spp casei* ATTC 393 desarrollado por (Velásquez et al., 2012, p.28) quien evaluó su crecimiento en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo y obtuvo recuentos de células viables de 10^8 , 10^9 y 10^{10} UFC/ ml en muestras tomadas a las 72 horas, podemos decir que los resultados son homogéneos ya que existe un crecimiento que se produce por la presencia de maltosa en el sustrato, la cual sirve como alimento para las bacterias permitiéndoles mantenerse vivas durante cierto periodo de tiempo. Además, el valor del pH de 5.4 que posee el extracto de malta de quinua es considerado el óptimo para su crecimiento favoreciendo el proceso de adquisición de nutrientes a través de la membrana bacteriana. Conjuntamente, (Vergara, 2007, pp.20-21) recomienda que la viabilidad debe ser mayor a 10^7 UFC/ml para que un microorganismo pueda ser utilizado como cultivo probiótico, los datos alcanzados en este trabajo están dentro de este rango por lo que dichos microorganismos pueden ser empleados en la elaboración de alimentos funcionales sin causar ningún efecto en la salud del consumidor.

Con los datos que se obtuvieron en la tabla 9-3, se construye el gráfico 7-3 en el cual además de observar la etapa de adaptación de las BAL a las condiciones del medio que las rodea en las 24 horas iniciales, es posible identificar también la etapa de crecimiento exponencial entre las 24, 48 y 72 horas de *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto respectivamente, posteriormente se espera que los microorganismos entren en la fase estacionaria, pero a las 96 horas la concentración de microorganismos es mayor a la que se tiene en las 48 y 72 horas.

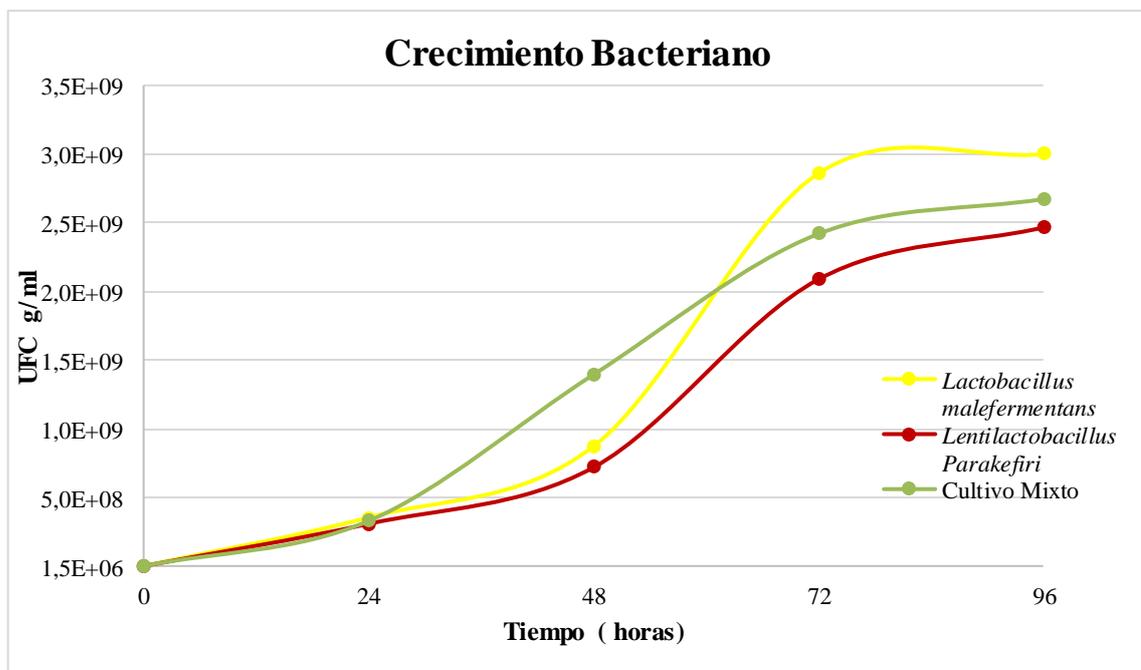


Gráfico 7-3. Viabilidad de Bacterias ácido lácticas

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

En el gráfico 7-3 se ve el crecimiento de cada una de las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) empleadas en este estudio, en base a estos resultados tenemos que la cepa de *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto muestran una relación directamente proporcional en función del tiempo en la fase de crecimiento logarítmico que va desde las 24 a las 72 horas con una tendencia normal de una curva típica de crecimiento y mientras las condiciones ideales de pH, disponibilidad de nutrientes y agua se mantengan la curva seguirá incrementando. Se puede notar claramente el crecimiento de los microorganismos partiendo desde el primer día con una población inicial de 1.5×10^6 UFC/ ml y al cuarto día de iniciado el experimento el valor que alcanza es de 3×10^9 UFC/ml. Sin embargo, no es posible distinguir la fase estacionaria y de muerte microbiana de las bacterias, esto puede asociarse al fenómeno de crecimiento diáuxico, el cual consiste en que el microorganismo ha agotado su fuente de carbono principal, pero entra en una nueva fase de adaptación donde empieza a consumir otro tipo de compuesto que se encuentra en el sustrato (Calderón, 2017, p.53)

3.3. Evaluación de la velocidad específica de crecimiento (μ)

Una vez realizado el recuento de las UFC/ml de cada bacteria ácido láctica. En la tabla 9-3 se muestran los valores calculados de velocidad específica de las bacterias inoculadas en el sustrato a través de un modelo matemático.

Tabla 9-3: Resultados de la velocidad específica de bacterias ácido lácticas

Bacterias Ácido lácticas	Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
<i>L. malefermentans</i>	0.050
<i>L. parakefiri</i>	0.065
<i>L. malefermentans</i> + <i>L. parakefiri</i>	0.063

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

Los valores de velocidad específica de crecimiento de *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto no varían mucho entre sí, como se puede evidenciar en la tabla 9-3. Esto sucede por la facilidad que los microorganismos poseen para sintetizar los nutrientes o fuentes de carbono requeridos para su crecimiento.

Las gráficas de velocidad específica de cada bacteria ácido láctica analizada en un periodo de tiempo de 24 horas son las siguientes:

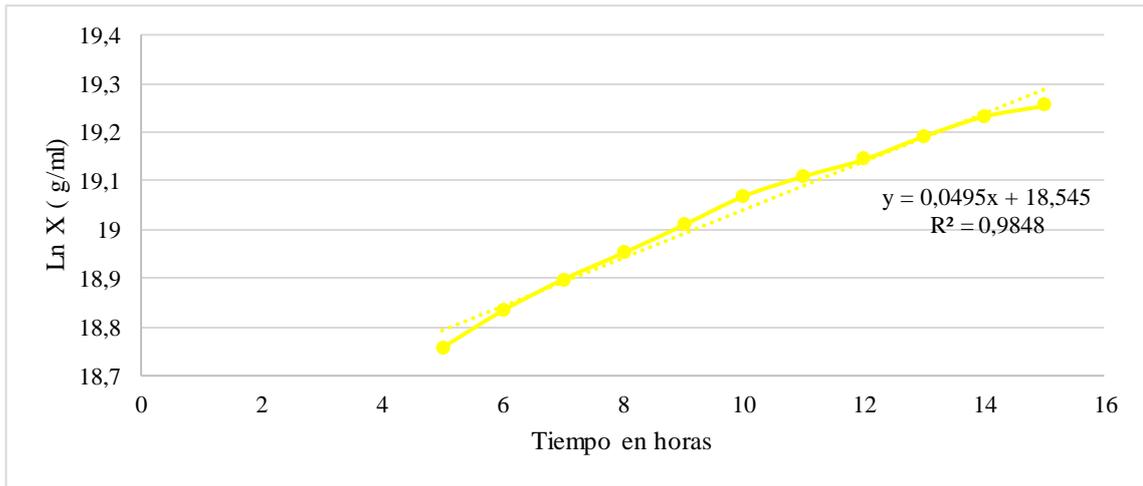


Gráfico 8-3. Velocidad específica de *L. malefermentans*

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

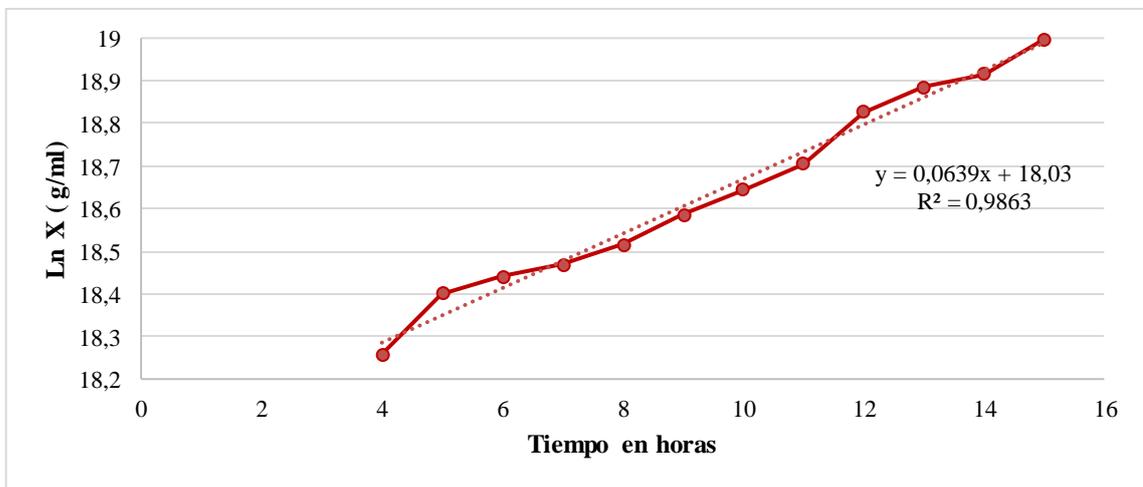


Gráfico 9-3. Velocidad específica de crecimiento de *L. parakefiri*

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

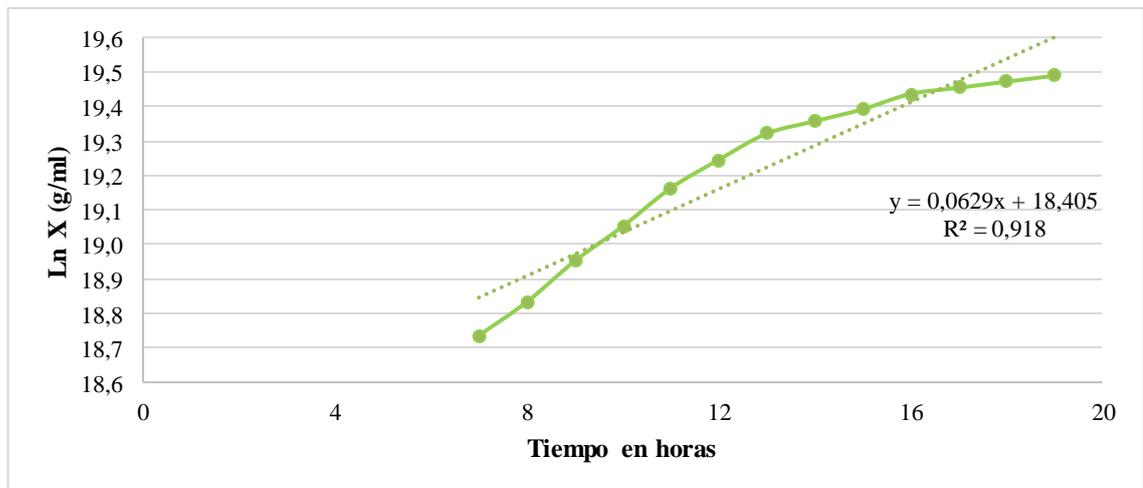


Gráfico 10-3. Velocidad específica de crecimiento del cultivo mixto

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

La velocidad específica de crecimiento (μ) de las BAL empleando como sustrato extracto soluble de malta de quinua a una temperatura de experimentación de 37°C teniendo en cuenta esta como la temperatura óptima para que se desarrollen adecuadamente según (Ossa et al., 2010, p.5) fue de 0.05, 0.65 y 0.63 h⁻¹ para *L. malefermentans*, *L. parakefiri* y el cultivo mixto respectivamente como se puede apreciar en la tabla 3-6. Al contrastar los resultados con el aporte de (Yáñez, 2016, p.61-62) quien manifiesta que la velocidad específica de *L. casei* en melaza osciló de 0.020 a 0.087 h⁻¹, se puede apreciar que los resultados reflejan valores cercanos debido a que estos se encuentran dentro de los rangos expuestos por el autor. La velocidad específica de crecimiento varía según la concentración de los nutrientes es decir a altas concentraciones alcanzara valores máximos para la transcripción y traducción de ADN (Orozco y Solarte, 2003, pp.46-47). Depende de variables como la temperatura, pH y la concentración del sustrato y del producto, pero bajo condiciones óptimas puede alcanzar un valor mayor a 0.5 h⁻¹ (Agudelo et al., 2010, p.11). En otra investigación realizada por (Jurado et al., 2014, p.31) reportan que *L. casei* tiene una velocidad específica de 0.71 h⁻¹ en un medio MRS (D-glucosa 20 g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4 g/L) y 2.2 h⁻¹ en un medio Pro (10 g/L azúcar blanco; 15 g/L leche de soya; 150 g/L leche en polvo 15 g/L salvado de trigo) al comparar los valores de la velocidad específica expuestos son superiores a los resultados obtenidos y esto sucede debido a la baja concentración de maltosa en el sustrato ya que las bacterias utilizan este azúcar como la única fuente de carbono para su crecimiento, a las condiciones ambientales, a las características genéticas del microorganismo o también se puede dar porque el medio ha sido enriquecido y los microorganismos tienen una gran concentración de nutrientes.

3.4. Evaluación del Rendimiento de la Biomasa ($Y_{x/s}$)

El rendimiento de la biomasa $Y_{biomasa/maltosa}$ de cada una de las bacterias ácido lácticas evaluadas en el sustrato a base de extracto soluble de malta de quinua se muestra en la tabla 10-3.

Tabla 10-3: Resultados del rendimiento de la biomasa de bacterias ácido lácticas

Bacterias Ácido lácticas	Rendimiento de la biomasa (g/L)
<i>L. malefermentans</i>	0.12
<i>L. parakefiri</i>	0.07
<i>L. malefermentans</i> + <i>L. parakefiri</i>	0.08

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

Al determinar el rendimiento de la biomasa a una temperatura de 37°C los resultados que se obtuvieron para las dos cepas y el cultivo mixto en estudio en un tiempo de 96 horas tienen un valor de 0.09 g/L para *L. malefermentans*, 0.07 g/L para *L. parakefiri* y 0.08 g/L para el cultivo mixto como se indica en la tabla 10-3. Si se compara los resultados del rendimiento entre los microorganismos los valores no difieren considerablemente entre sí, sin embargo, en el gráfico 11-3 se puede observar que *L. malefermentans* tiene un mayor rendimiento (0.12 g/L) con respecto a las demás bacterias.

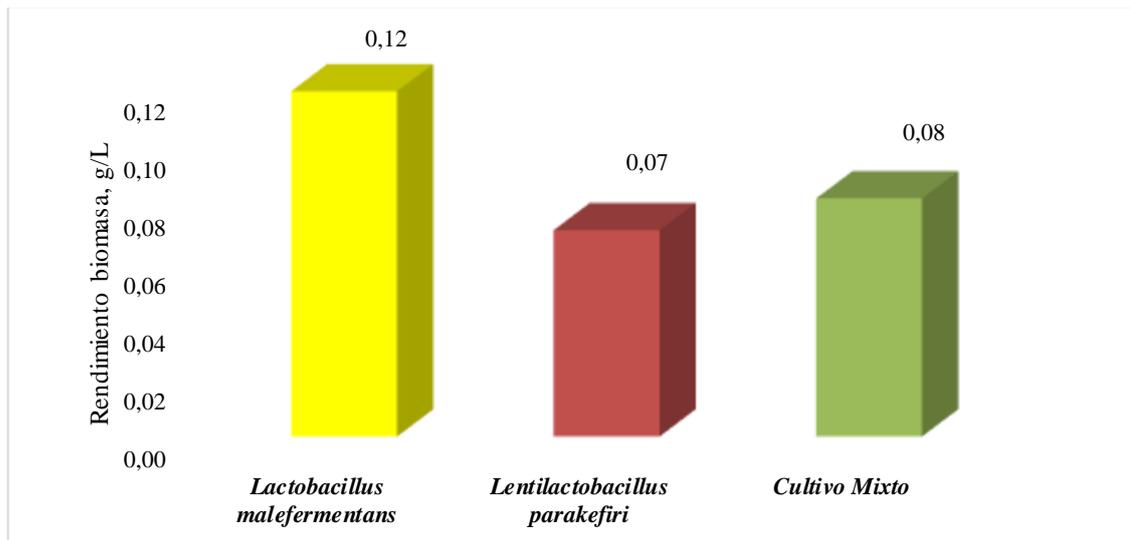


Gráfico 11-3. Rendimiento de la biomasa de bacterias ácido lácticas

Realizado por: Moya, Nicol, 2022.

(Agudelo et al., 2010, p.4) en sus resultados de $Y_{biomasa/glucosa}$ obtiene valores de 0.401 g/L en la primera siembra de *L. plantarum* incubado a 35°C durante un periodo de 48 horas en un medio alternativo. En los resultados el rendimiento obtenido tiene un valor promedio de 0.090 g/L, al comparar el valor obtenido es menor y puede estar sujeto a que las cepas utilizadas son silvestres, a factores importantes como el pH y la temperatura los cuales influyen directamente, otra variable que puede afectar es la inhibición de los microorganismos por la acumulación del producto o la limitación de nutrientes en el medio (Adamberg et al., 2003, p. 172). Sin embargo al ser comparado con la investigación de (Georgieva et al., 2014, p.5) quienes obtienen un rendimiento de biomasa/glucosa de 0.029 a 1.43 g/L para *L. plantarum* en un medio MRS tras 48 horas de fermentación, los rendimientos son similares aunque la variación que existe se da por el tipo de sustrato utilizado, por el tiempo empleado para su evaluación (96 h) y por la capacidad que cada microorganismo tiene para convertir con mayor rapidez los hidratos de carbono en ácido láctico ya que no todas las cepas tienen la misma capacidad. Cabe recalcar que estos rendimientos dependen de las condiciones del proceso las cuales pueden cambiar a lo largo de toda la fermentación.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos al evaluar los parámetros físico-químicos del extracto soluble de malta de quinua fueron los siguientes: de 0.14 a 0.18 % de acidez titulable y un pH que va de 5.1 a 5.7. En lo que se refiere a azúcares fermentables una concentración de maltosa de 1.56 a 2.26 g/L. Teniendo en cuenta los resultados arrojados se considera que el extracto de malta es un medio idóneo para el crecimiento de las bacterias *L. malefermentans* y *L. parakefiri* empleadas en el estudio.
- Las cepas inoculadas en malta de quinua entre las 24 y 72 horas en la fase de crecimiento logarítmico presentaron una relación directamente proporcional en función del tiempo es decir el número de UFC/ml aumentaba con una tendencia normal. Siendo T1 que corresponde a *L. malefermentans* a las 96 h el mejor tratamiento ya que alcanza el mayor crecimiento con un número de células viables <3000 UFC/ ml.
- La velocidad específica de crecimiento (μ) de las bacterias ácido lácticas en la malta de quinua presento valores que no difieren mucho entre sí. Estableciéndose que la bacteria que crece con mayor rapidez y la que obtiene el mejor resultado de velocidad específica de crecimiento es *L. malefermentans* con un valor de 0.50 h^{-1} ya que el tiempo empleado para su desarrollo y crecimiento es menor en comparación con *L. parakefiri* y el cultivo mixto.
- En cuanto al rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$ de los microorganismos en el sustrato soluble a base de malta de quinua los valores obtenidos no fueron tan altos. Sin embargo el mejor rendimiento de biomasa corresponde a la bacteria *L. malefermentans* siendo entonces el microorganismo que posee la habilidad para convertir con mayor rapidez la fuente de carbono en ácido láctico.

RECOMENDACIONES

- Utilizar otra especie de bacterias ácido lácticas u otro tipo de microorganismos, aislados a partir del suelo de bosque.
- Realizar nuevos estudios de viabilidad utilizando sustratos diferentes como malta de otros cereales, leche, suero de leche, extracto de carne o vegetales, etc.
- Emplear *L. malefermentans* como probiótico en la elaboración de bebidas (funcionales, vinos, cerveza, etc.) ya que tiene el mejor crecimiento bacteriano y el recuento viable es mayor a 10^7 UFC/ml, y analizar la vida de anaquel mediante un estudio de viabilidad del microorganismo dentro del producto.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMBERG, Kaarel; et al. "El efecto de la temperatura y pH en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas: estudio de pH- auxostato". *Internacional de Microbiología de Alimentos* [en línea], 2003, (Tallin -Estonia) 85, pp.171-183. [Consulta: 16 abril 2022]. Disponible en: 2003AdambergetalIJFMLABpH-auxoaccelerostat.af.es.pdf

AGUIRRE, E; et al. "Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra". *Redalyc.org* [en línea], 2009, 8(1), p. 68-76. [Consulta: 16 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62011375006.pdf>

AGUDELO, Claudia; et al. "Determinación de Parámetros Cinéticos de dos Inóculos Lácticos: *Lactobacillus Plantarum* A6 y Bacterias Ácido Lácticas de Yogurt". *Scielo* [en línea], 2010, 8(2), pp.11-15. [Consulta: 22 marzo 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n2/v8n2a02.pdf>

AGUDELO LONDOÑO, Natalia; et al. "Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos". *Alimentos hoy* [en línea], 2015, (Medellín-Colombia) 23 (36), pp. 186-205. [Consulta: 21 octubre 2021]. Disponible en: 356-644-1-PB (3).pdf

AGUIRRE, E; et al. "Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra". *Redalyc.org* [en línea], 2009, 8(1), p. 68 -76. [Consulta: 16 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/620/62011375006.pdf>

ALARCON, Luis & OLIVAS, Evangelina. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología básica y microbiología de alimentos [En línea] (Programa de Nutrición). Universidad Autónoma de la ciudad de Juárez, México. 2007. pp. 30-103. [Consulta: 2022-03-10]. Disponible: <https://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011297.pdf>

ALVAREZ CARITA, Yenny Cecilia. ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DOS BEBIDAS PROTEICAS, UNA A BASE DE QUINUA MALTEADA Y LA OTRA A BASE DE QUINUA SIN MALTEAR (*Chenopodium quinoa*) [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional Jorge Basadre GROHMANN-TACNA, Facultada de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Tacna (Perú). 2012. p. 70. [Consulta: 2021-10-20]. Disponible en:

http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/2920/17_2012_alvarez_carita_yc_fcag_industrias_alimentarias.pdf?sequence=1&isAllowed=y

AOAC: 973.41. *pH of Water*

ARAGÓNARIAS, Jhon Jairo. Evaluación de fuentes alternativas de nitrógeno en fermentación láctica [En línea] (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Nacional de Bogotá, Facultad de Ingeniería Química y Ambiental, Colombia. 2015. pp. 17-134. [Consulta: 2021-10-21]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/56343/1015410877.2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ARANA, Inés; et al. Cálculo de la Biomasa [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea, España, 2009. pp.2-7. [Consulta: 2021-10-20]. Disponible en: https://ocw.ehu.eus/file.php/48/Tema_3._calculo_de_biomasa.pdf

BENITINDE, Silvia & SANCHEZ, Cecilia. “Crecimiento Bacteriano”. Revista de Ciencias Agropecuarias [en línea]. 2015, pp.4-8. [Consulta: 04 marzo 2022]. Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano

BOZZO HERRERA, A. Optimización de proceso en planta productora de extracto de malta [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y matemáticas, Escuela de Ingeniería Química y Biotecnología, Santiago de Chile. 2012. pp. 9-86. [Consulta: 2022-03-28]: Disponible en: https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/112048/cf-bozzo_as.pdf?sequence=1&isAllowed=y

BRAVO, Karla. “*Fermentación*” [blog]. [Consulta: 21 abril 2022]. Disponible en: <https://www.academia.edu/38971756/FERMENTACION>

BURGOS MONTAÑEZ, Lady. “Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico”. *Fundación Universidad de América* [en línea]. 2019, 13 (1), pp.60-64. [Consulta: 09 abril 2022]. ISSN 2001- 639x. Disponible en: [326-Texto del artículo-791-1-10-20210603 \(1\).pdf](326-Texto%20del%20articulo-791-1-10-20210603%20(1).pdf)

CAJAS ANCHUNDIA, L. Caracterización de bacterias ácido lácticas presentes en el mucílago de cacao (*theobroma cacao l.*) nacional y trinitario, Quevedo, Ecuador 2017 [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería en Alimentos, Los Ríos- Ecuador. 2017. pp. 28-70. [Consulta: 2021-10-20]. Disponible en: <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2286/1/T-UTEQ-0049.pdf>

CALDERÓN VARGAS, Juan F. Ajuste de un Modelo Cinético para el Crecimiento de *Lactobacillus Acidophilus* en la fermentación de un Sustrato Complejo [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de América, Facultad de Ingenierías, Escuela de Ingeniería Química, Bogotá, Colombia. 2017.pp.53-78. [Consulta: 2022-03-5]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6598/1/6121940-2017-2-IQ.pdf>

CAMPO, Martín; et al. “Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos”. *e – Gnosis* [en línea], 2008, (Guadalajara, México) 6 (5), pp.2-17. [Consulta: 20 octubre 2021]. ISSN 1665-5745. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/730/73011197005.pdf>

CÁRDENAS, Laura; et al. “Evaluación de melaza como medio de cultivo para la producción de bacterias ácido- lácticas”. *UGciencia* [en línea], 2018, (Colombia) 23, p. 18. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible: <https://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/919/1419>

CÁRDENAS, Flor Virginia & MELGAREJO, Jhone Richard. Elaboración de Cerveza a partir de malta de maíz (*Zea Mays*) y quinua (*Chenopodium quinoa*) [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional Hermilio Valdizán Huánuco, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial, Huánuco – Perú, 2019, pp.48- 127. [Consulta: 2021-10-18]. Disponible en: <https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/5394/TAI00154S25.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

COPARI, Erlan. Fases de crecimiento bacteriano [en línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de Moquegua, Escuela profesional de Ingeniería Ambiental, Ilo – Perú, 2021, pp. 5-6. [Consulta: 2021-12- 16]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/ErlanGustavoCopariLa/fases-del-crecimiento-bacteriano>.

ERLOTA, R; et al. Microbiología Industrial [en línea]. Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Organización de los Estados Americanos. Washington D. C. USA, 2007. [Consulta: 18 enero 2022]. Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/favela/Microbiologia_Industrial_Libro.pdf

ESCARDINO, Agustín. “Instrucciones viales de conservación (Bacterias y Levaduras)”. *Universidad de Valencia* [En línea].2016, (Valencia- España), p.1.[Consulta: 23 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.uv.es/cect2/Instrucciones%20Viales%20bac%20%20338%20lev.pdf>

ESCARTIN TORRES, Alejandra. Producción de un exopolisacárido por la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04 en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante un sistema en lote y lote alimentado [en línea] (trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Veracruzana, Xalapa, México, 2017, pp.41-70. [Consulta:2022-03-24]. Disponible: <https://www.uv.mx/mca/files/2018/01/Escartin-Torres-Alejandra.pdf>

ESTRADA, Osmaida; et al. “Caracterización e Identificación de BAL procedentes de gallos de gallos de león y perdices”. *RERVET* [en línea], 2017, (España-Málaga) 18, p. 2-13. [Consulta:18 diciembre 2021]. ISSN 1695-7504. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/636/63651262011.pdf>

FLORES MANCHENO, IVAN C. *Guía de prácticas de laboratorio de microbiología y parasitología de los alimentos*. 1ª ed. Riobamba – Ecuador: Copy Center, 2013, pp. 27-64.

GARCÍA, Hylary. “Curva de crecimiento microbiano” [blog]. 30 octubre, 2014. [Consulta: 25-03-2022. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html#:~:text=La%20curva%20del%20crecimiento%20bacteriano,crecido%20previamente%20hasta%20la%20saturaci%C3%B3n>.

GEORGALIKI, Marina; et al. “*Lactobacillus kefiranofaciens*: From Isolation and Taxonomy to Probiotic Properties and Applications”. *Microorganisms* [en línea], 2021, 2 (1), pp.2-27. [Consulta: 18 febrero 2022]. Disponible en: [microorganisms-09-02158-v2\(1\).pdf](#)

GEORGIEVA, R; et al. “Parámetros de crecimiento de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum*, aislado del queso blanco tradicional”. *Biotechnología* [en línea], 2015, pp. 5-6. [Consulta: 18 marzo 2022]. Disponible en: [Growth_Parameters_of_Probiotic_Strain_Lactobacillu.af.es.pdf](#)

GUERRA, Matías & CASTRO, Jean. “Evaluación de viabilidad de microorganismos”. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA*, vol.8 (2017), n°428, p.139.

GUEVARA NUÑEZ, Daiana; et al. “*Bifidobacterium scardovii* aislado de 2 muestras consecutivas de orina”. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2017, (Buenos Aires, Argentina) 49(4), pp. 329-331. [Consulta: 17 febrero 2022]. Disponible en: [Bifidobacterium_scardovii_aislado_de_2_muestras_co.pdf](#)

HEREDIA, Priscilia; et al. “Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos”. *Interciencia* [en línea], 2017 (Caracas, Venezuela) 42 (6), pp.340-346. [Consulta: 22 octubre 2022]. ISSN 0378-1844. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621002.pdf>

JURADO GÁMEZ, Henry; et al. “Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos”. *Veterinaria y Zootecnia* [en línea], 2014 (Pasto- Colombia) 8 (2), pp.31-35. [Consulta: 22 marzo 2022]. ISSN 2011-5415. Disponible en: <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v8n2a02.pdf>

LEÓN, Dante; et al. “Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque”. *Ciencia y tecnología* [en línea], 2013, (México) 1 (12), pp. 141-144. [Consulta: 26 marzo 2022]. Disponible en: [Dialnet-FormulacionYOptimizacionDeUnMedioDeCultivoEconomic-4745491 \(5\).pdf](#)

LEÓN REISSIG, María Fernanda. Evaluación in vitro de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de la República, Facultad de Ciencias, Escuela de Licenciatura en Bioquímica, Montevideo (Uruguay). 2012. pp.5-54. [Consulta: 2021-10-20]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1432/1/uy24-15766.pdf>

LÓPEZ, L. Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Nacional de Asunción, Paraguay. 2016. pp.6-27. [Consulta: 2021- 10- 22]. Disponible en: https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia_de_conocimientos_Liz_Lopez_2015.pdf

LÓPEZ VANEGAS, A & RODRÍGUEZ BUITRAGO, J. Obtención de azúcares fermentables por medio de hidrólisis subcrítica en una unidad de laboratorio semicontinua, a partir de la hoja de maíz (*Zea mays*) [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de la Salle, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería ambiental y sanitaria, Bogotá, Colombia. 2016. 34-79. [Consulta: 2022 – 04- 09]. Disponible en: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1339&context=ing_ambiental_sanitaria

MADIGAN, Michael T; et al. *Brock. Biología de los microorganismos* [en línea]. 14ª edición. Madrid – España: Pearson Educación, S.A, 2015. [Consulta: 15 marzo 2022]. Disponible en: [Biologia_de_los_microorganismos_BROCK.pdf](#)

MARTÍNEZ, Elizabeth. “*Determinación de biomasa*” [blog]. 02 diciembre, 2019. [Consulta: 10 abril 2022]. Disponible en: https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/184697/mod_resource/content/1/2019%20TP4%20Farmacia.pdf

MONTES LUNA, Marifé. *Factores que favorecen el crecimiento bacteriano* [blog]. 22 mayo, 2012. [Consulta: 10 marzo 2022]. Disponible en: <https://gestionintegra.com/factores-que-favorecen-el-crecimiento-bacteriano/>

MOREANO, Mayra. Determinación de azúcares reductores y su relación con carbohidratos no absorbidos en niños (a) del centro de educación inicial “María Montessori” del cantón Latacunga en el período 2014- 2015 [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad técnica de Ambato, Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de laboratorio clínico, Ambato, Ecuador. 2015.pp. 21-98. [Consulta: 2022- 04-09]. Disponible en: [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10569/1/TESIS%20MAYRA%20MOREANO%20\(1\).pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/10569/1/TESIS%20MAYRA%20MOREANO%20(1).pdf)

NTE INEN 13: 1983-029. LECHE. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TITULABLE.

NTE INEN 1 529-5: 2006. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS. REP.

NTE INEN 1529-1: 2013. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

ÑAHUERO GUZMAN, Maxely. Caracterización Físicoquímica de la malta de quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) en dos variedades a condiciones de laboratorio [En línea] (Trabajo de titulación. Universidad Nacional de Hualcavelica, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Acobamba- Huancavelica. 2018. pp. 51-135. [Consulta: 2021-10-20]. Disponible en: <https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/2622/TESIS-2018-ING-AGROINDUSTRIAL-%c3%91AHUERO%20GUZMAN.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

OLIVERA, Jorge. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Escuela de Licenciatura en Bioquímica. 2011. pp.3-45. [Consulta: 2021-11-14]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/1331/1/uy24-15316.pdf>

OSSA, Juliana. “Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*”. *Scielo* [en línea], 2010, (Bogotá- Cundinamarca, Colombia) 13 (1), pp. 101-104. [Consulta: 10 marzo 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n1/v13n1a11.pdf>

OROZCO, Patricia & SOLARTE, Juan. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa [En línea]. (Trabajo de titulación). Universidad de Colombia, Facultad de ingeniería y arquitectura, Escuela de Ingeniería Química. 2003. Pp. 44-45. [Consulta: 25 abril 2022]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/2617/mariaorozcojuansolarte.2003.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

PARRA HUERTAS, Ricardo A. “Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los Alimentos”. *SCIELO* [en línea], 2010, 8 (1), pp.95-102. [Consulta: 27 enero 2022]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>

PÉREZ PORTO, J & GARDEY, A. “Definición de Sustrato” [blog]. 15 abril 2010. [Consulta: 17 marzo 2022]. Disponible en: <https://definicion.de/sustrato/>

PORTILLO CUELLAR, J & RAMIREZ MARTINEZ, A. Obtención de amilasa por cinética de crecimiento con el microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando como medio de

cultivo cascara de papa [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad del Salvador, Facultad de Química y Farmacia, Escuela de Licenciatura en Química y Farmacia, San Salvador, Centro América. 2009. pp. 39-116. [Consulta: 2022-03-18]. Disponible en: <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2828/1/16100894.pdf>

PUERTA, GLORIA I. “Fundamentos del Proceso de Fermentación”. *Cenicafé* [en línea], 2010: Colombia, pp.2-12. [Consulta: 21 abril 2022]. ISSN 0120-0178. Disponible en: <https://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>.

RAMÍREZ, José; et al. “Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud”. *Tecnología de alimentos* [en línea], 2011, (México), pp. 3 – 16. [Consulta: 21 octubre 2021]. ISSN 2007-0713. Disponible en: <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/436/1/Bacterias%20l%C3%A1cticas%20e%20Importancia%20en%20alimentos%20y%20sus%20efectos%20en%20la%20salud.pdf>

RUSSELL, C & WALKER, T. “*Lactobacillus malefermentans n.sp., Aislado de cerveza*”. *College of Technology* [en línea], 1953, 8, pp. 160-162. [Consulta: 21 octubre 2022]. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/8/1/mic-8-1-160.pdf?expires=1649009032&id=id&accname=guest&checksum=27D3B65ADA34357B77704DA1E1FF94E>

SÁENZ, Tomás & RAMOS, Juan. “Bacterias Ácido Lácticas: Biopreservante de los Alimentos”. *Biotiempo* [en línea], 2008,8, pp.54-64. [Consulta: 22 octubre 2021]. Disponible en: [865-Texto del artículo-1883-1-10-20170902 \(6\).pdf](865-Texto del artículo-1883-1-10-20170902 (6).pdf)

SALAGATA TIRADO, Karla Liliana. Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de residuos agroindustriales y su uso potencial como probiótico [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Estatal Amazónica, Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Puyo (Ecuador). 2018. pp. 18-67. [Consulta: 2021-10-20]. Disponible en: <http://201.159.223.17/bitstream/123456789/694/1/T.AGROIN.B.UEA.0069.pdf>

SÁNCHEZ JIMÉNEZ, Jordy Javier. Evaluación de la viabilidad de las bacterias ácido – lácticas usadas para la elaboración de yogurt frente a fluido gástrico simulado [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Química de los Alimentos, Quito, Ecuador. 2020. pp.9-10. [Consulta: 2021-10- 20]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/21958/1/T-UCE-0008-CQU-242.pdf>

SANTOS, Joaquín. Estudio del comportamiento Cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos [En línea] (Trabajo de titulación) (Doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Barcelona, España. 2007. pp. 54-282. [Consulta: 2022-03-10]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1de1.pdf>

SANZ CERVERA, SUSANA A. *Prácticas de Microbiología* [en línea]. 2a ed. publicaciones.unirioja.es, 2011. pp. 24-26. [Consulta: 6 febrero 2022]. Disponible en: [Dialnet-PracticasDeMicrobiologia-100835 \(4\).pdf](https://publicaciones.unirioja.es/bitstream/handle/10803/100835/4.pdf)

TAKIZAWA; et al. “*Lactobacillus (Lentilactobacillus) parakefiri*”. *ABIS ENCYCLOPEDIA* [en línea], 2020, 44 (3), pp. 435-439. [Consulta: 20 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.tgw1916.net/Lactobacillus/parakefiri.html>

TORRE, Fernanda. *Azúcar de la malta* [blog]. México, 30 abril, 2019. [Consulta 09 abril 2022]. Disponible en: <https://gourmetdemexico.com.mx/bebidas/que-es-el-malteado/>

VÁSQUEZ CONTRERAS, E & ROJAS PÉREZ, Tania. pH: Teoría y 232 problemas [En línea]. Universidad Autónoma Metropolitana, Facultad de Ciencias Naturales, Escuela de Licenciatura en Biología Molecular, México D.F. 2016, pp. 24-25. [Consulta:2022-03-28]. Disponible en <http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/17pHTeoriayproblemas.pdf>

VEGA CASTILLO, LUIS F. Nutrición y Crecimiento Bacteriano [En línea] (Trabajo de titulación) (Maestría). Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. 2009, pp.10-30. [Consulta: 2022- 03- 18]. Disponible en: https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/108647/secme14625_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

VELÁSQUEZ, John A. “Viabilidad de *Lactobacillus casei ssp casei* atcc 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo”. *Vitae* [en línea], 2012 (Medellín- Colombia, 19(1), pp.28-29. [Consulta: 10 abril 2022]. ISSN 0121-4004. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914060.pdf>

VERGARA SOBARZO, Ana. Estudio de Viabilidad de *Lactobacillus casei* en Jugo de Pera [En línea] (Trabajo de titulación). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias,

Escuela de Ingeniería en alimentos, Valdivia-Chile.2007, pp.20-21. [Consulta: 2022-04- 10].
Disponibile en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fav4941e/doc/fav4941e.pdf>

WEATHER ATLAS. *Previsión meteorológica y clima mensual Riobamba, Ecuador* [blog].
[Consulta: 04 enero 2022]. Disponible en: <https://www.weather-atlas.com/es/ecuador/riobamba-clima>

WENGE, FU & MATHEWS A. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of Ph, substrate, and oxygen. “*Enginieering Journal*”, vol. 3(1999), pp. 163-170.

YÁNEZ TISALEMA, G. Uso de sustratos para el desarrollo de Biomasa Bacteriana [En línea] (Trabajo de titulación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela de Ingeniería en Industrias Pecuarias, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 50-112.
[Consulta: 2022-03-24]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5788/1/27T0301.pdf>

ZARCO, PRISCILA. “*Crecimiento Bacteriano*” [blog]. [Consulta: 15 noviembre 2021].
Disponibile en: <https://slideplayer.es/slide/3247624/>

ZHENG, J; et al. Descripción taxonómica de *Lactobacillus beijerick* y *Leunonostoc*. *NCBI* [en línea], 2020, 70(4), p.1. [Consulta: 30 septiembre 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=176292>

ANEXOS

ANEXO A: ESQUEMA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Formula	Grados de Libertad
Total	(n-1)	14
Tratamiento	(t-1)	2
Error	(n-1) - (t-1)	12

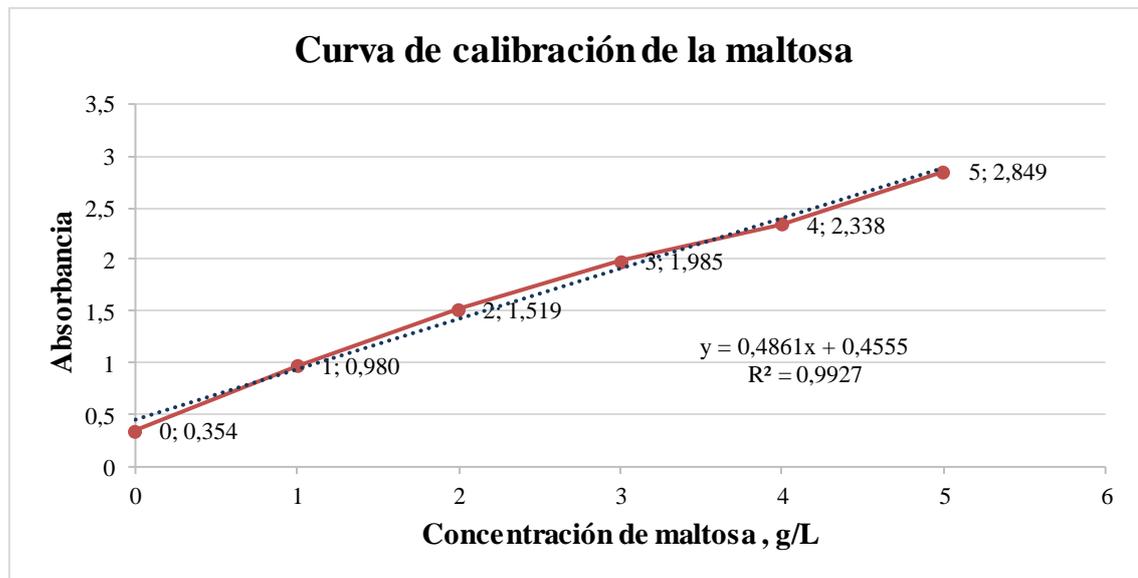
ANEXO B: CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA MALTA DE QUINUA

Muestra	Resultado			Resultado Promedio
	R1	R2	R3	
pH	5.1	5.4	5.7	5.4
Acidez titulable	R1	R2	R3	Resultado Promedio
	0.16	0.14	0.18	0.16
Azúcares fermentables	R1	R2	R3	Resultado Promedio
	1.57	2.26	1.91	1.91

ANEXO C: DATOS PARA LA ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE MALTOSA

Longitud de Onda (nm)	Concentración (g/L)	Absorbancia
540	0	0.354
	1	0.980
	2	1.519
	3	1.985
	4	2.338
	5	2.849

ANEXO D: CURVA PATRÓN DE MALTOSA



ANEXO E: ANALISIS DE VARIANZA (24 HORAS)

F.V.	S.C.	gl.	CM	F	P-valor
Tratamientos	0.05	2	0.03	1,29	0,31
Error	0.25	12	0.02		
Total	0.30	14			

ANEXO F: MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY (P < 0.05)

Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rango
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	3.6×10^8	5	0.06	a
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	3.1×10^9	5	0.06	a
<i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	3.3×10^9	5	0.06	a

Medias con una letra común no son significativos diferentes ($p > 0,05$)

ANEXO G: ANALISIS DE VARIANZA (48 HORAS)

F.V.	S.C.	gl.	CM	F	P-valor
Tratamientos	1.12	2	0.56	47.24	0,001
Error	0.14	12	0.01		
Total	1.26	14			

ANEXO H: MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY (P< 0.05)

Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rango
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	8.7x10 ⁸	5	0.05	a
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	7.2x10 ⁹	5	0.05	b
<i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	1.4x10 ⁹	5	0.05	c

Medias con una letra común no son significativos diferentes (p>0,05)

ANEXO I: ANALISIS DE VARIANZA DE LAS (72 HORAS)

F.V.	S.C.	gl.	CM	F	P-valor
Tratamientos	0.27	2	0.13	3.18	0,07
Error	0.51	12	0.4		
Total	0.77	14			

ANEXO J: MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY (P< 0.05)

Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rango
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	2.9 x10 ⁹	5	0.09	a
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	2.1 x10 ⁹	5	0.09	a
<i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	2.4 x10 ⁹	5	0.09	a

Medias con una letra común no son significativos diferentes (p>0,05)

ANEXO K: ANÁLISIS DE VARIANZA DE LAS (96 HORAS)

F.V.	S.C.	gl.	CM	F	P-valor
Tratamientos	0.10	2	0.05	3.70	0,06
Error	0.17	12	0.1		
Total	0.27	14			

Anexo L: MEDIAS Y ASIGNACIÓN DE RANGOS DE ACUERDO CON LA PRUEBA DE TUKEY (P<0.05)

Tratamiento	Medias	n	E.E.	Rango
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	3 x10 ⁹	5	0.09	a
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	2.5 x10 ⁹	5	0.09	ab
<i>Lactobacillus malefermentans</i> + <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	2.7 x10 ⁹	5	0.09	b

Medias con una letra común no son significativos diferentes (p>0,05)

ANEXO M: RESULTADOS DE SUSTRATO INICIAL-FINAL DE *L. malefermentans*

Repetición	Maltosa al tiempo 0 h		Maltosa al tiempo 96 h	
	Absorbancia	Concentración (g/L)	Absorbancia	Concentración (g/L)
LM1	1.218	1.5686	0.8250	0.7601
LM2	1.375	1.8916	0.8200	0.7498
LM3	1.478	2.1035	0.8900	0.8938
LM4	1.501	2.1508	0.8670	0.8465
LM5	1.364	1.8690	0.8160	0.7416

ANEXO N: RESULTADOS DEL SUSTRATO INICIAL-FINAL DE *L. parakefiri*

Repetición	Maltosa al tiempo 0 h		Maltosa al tiempo 96 h	
	Absorbancia	Concentración (g/L)	Absorbancia	Concentración (g/L)
LP1	1.336	1.8114	1.0190	1.1592
LP2	1.325	1.7887	0.9840	1.0872
LP3	1.468	2.0829	1.0670	1.2580
LP4	1.352	1.8443	0.9800	1.0790
LP5	1.184	1.4987	0.9750	1.0687

ANEXO O: RESULTADOS DEL SUSTRATO INICIAL-FINAL DE *L. parakefiri* + *L. malefermentans*.

Repetición	Maltosa al tiempo 0 h		Maltosa al tiempo 96 h	
	Absorbancia	Concentración (g/L)	Absorbancia	Concentración (g/L)
LMP1	1.361	1.8628	0.9330	0.9823
LMP2	1.475	2.0973	1.0030	1.1263
LMP3	1.287	1.7106	0.9250	0.9659
LMP4	1.516	2.1816	0.9700	1.0584
LMP5	1.346	1.8319	0.9560	1.0296

ANEXO P: NÚMERO DE COLONIAS DE LA BACTERIA *Lentilactobacillus parakefiri*

Muestra	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
		No. Colonias	No. Colonias	No. Colonias	No. colonias
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	LP1	282	780	1733	2248
	LP2	260	672	2383	2578
	LP3	265	715	1798	2166
	LP4	368	693	1993	2340
	LP5	368	737	2535	>3000

ANEXO Q: UFC/ml PRESENTES EN LA VIAVILIDAD (*Lentilactobacillus parakefiri*)

Muestra	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>	LP1	2,8x10 ⁸	7,8x10 ⁸	1,7x10 ⁹	2,2x10 ⁹
	LP2	2,6x10 ⁸	6,7x10 ⁸	2,4x10 ⁹	2,6x10 ⁹
	LP3	2,7x10 ⁸	7,2x10 ⁸	1,8x10 ⁹	2,2x10 ⁹
	LP4	3,7x10 ⁸	6,9x10 ⁸	2x10 ⁹	2,3x10 ⁹
	LP5	3,7x10 ⁸	7,4x10 ⁸	2,5x10 ⁹	>3000

ANEXO R: NÚMERO DE COLONIAS DE LA BACTERIA *Lactobacillus malefermentans*

Muestra	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
		No. Colonias	No. Colonias	No. Colonias	No colonias
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	LM1	347	866	>3000	>3000
	LM2	325	852	2600	>3000
	LM3	390	932	>3000	>3000
	LM4	412	912	2925	>3000
	LM5	303	802	2773	>3000

ANEXO S: UFC/ml PRESENTES EN LA VIABILIDAD (*Lactobacillus malefermentans*)

Muestra	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	LM1	3,5x10 ⁸	8,7x10 ⁸	3 x10 ⁹	>3000
	LM2	3,3x10 ⁸	8,5x10 ⁸	2,6x10 ⁹	>3000
	LM3	3,9x10 ⁸	9,3x10 ⁸	3 x10 ⁹	>3000
	LM4	4,1x10 ⁸	9,1x10 ⁸	2,9x10 ⁹	>3000
	LM5	3x10 ⁸	8x10 ⁸	2,8x10 ⁹	>3000

ANEXO T: NÚMERO DE COLONIAS DEL CULTIVO MIXTO de *Lentilactobacillus parakefiri* + *Lactobacillus malefermentans*

Muestra	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
		No. Colonias	No. Colonias	No. Colonias	No colonias
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Lactobacillus malefermentans</i>	LMP1	282	1126	1993	2318
	LMP2	303	1300	2643	2903
	LMP3	347	1365	1473	2145
	LMP4	390	1386	>3000	>3000
	LMP5	325	1798	2990	>3000

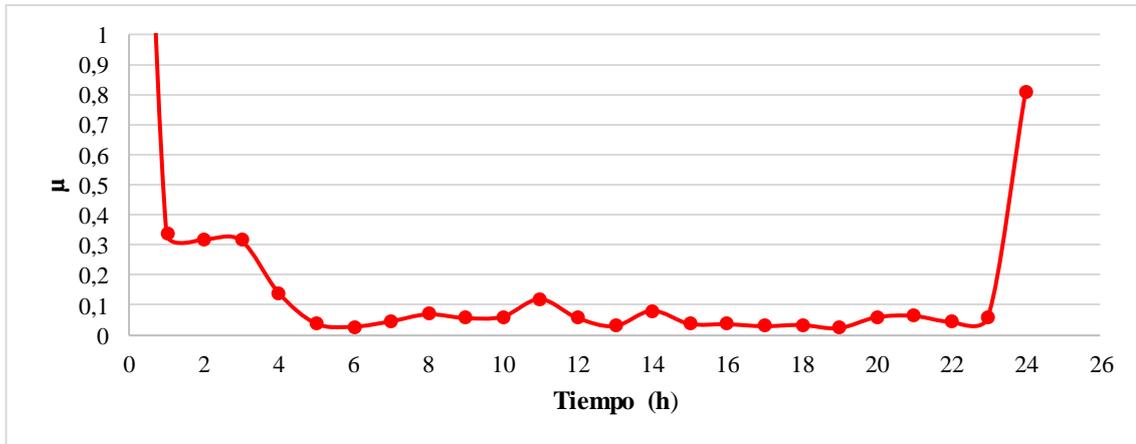
ANEXO U: UFC/ml PRESENTES EN LA VIABILIDAD (*Lentilactobacillus parakefiri* + *Lactobacillus malefermentans*)

Muestra	Repetición	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>Lentilactobacillus parakefiri</i> + <i>Lactobacillus malefermentans</i>	LMP1	2,8x10 ⁸	1,1x10 ⁹	2 x10 ⁹	2,3x10 ⁹
	LMP2	3x10 ⁸	1,3x10 ⁹	2,6x10 ⁹	2,9x10 ⁹
	LMP3	3,5x10 ⁸	1,4x10 ⁹	1.5 x10 ⁹	2,1x10 ⁹
	LMP4	3.9x10 ⁸	1,4x10 ⁹	3x10 ⁹	>3000
	LMP5	3.3x10 ⁸	1,8x10 ⁹	3x10 ⁹	>3000

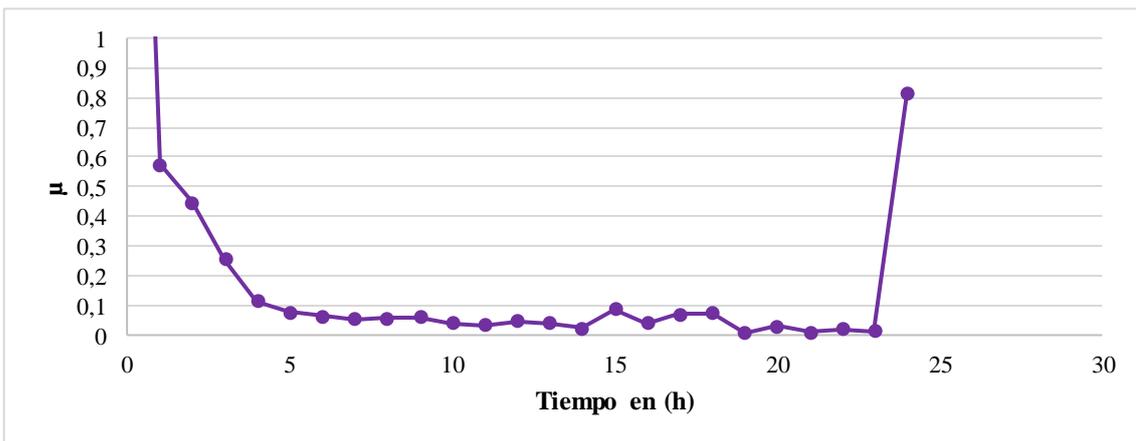
ANEXO V: RESULTADOS DE UFC/ml DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN 24 HORAS

Tiempo (h)	<i>Lactobacillus malefermentans</i>		<i>Lentilactobacillus parakefiri</i>		Cultivo Mixto	
	Nº Colonias	UFC/ml	Nº Colonias	UFC/ml	Nº Colonias	UFC/ml
0	1.5	1,50E+06	1.5	1,50E+06	1.5	1,50E+06
1	35	3,50E+07	32	3,20E+07	42	4,20E+07
2	62	6,20E+07	45	4,50E+07	64	6,40E+07
3	97	9,70E+07	62	6,20E+07	83	8,36E+07
5	125	1,25E+08	85	8,50E+07	96	9,61E+07
5	140	1,40E+08	98	9,80E+07	101	1,01E+08
6	151	1,51E+08	102	1,02E+08	116	1,16E+08
7	161	1,61E+08	105	1,05E+08	137	1,37E+08
8	170	1,70E+08	110	1,10E+08	151	1,51E+08
9	180	1,80E+08	118	1,18E+08	170	1,70E+08
10	191	1,91E+08	125	1,25E+08	188	1,88E+08
11	199	1,99E+08	133	1,33E+08	210	2,10E+08
12	206	2,06E+08	150	1,50E+08	228	2,28E+08
13	216	2,16E+08	159	1,59E+08	246	2,46E+08
14	225	2,25E+08	164	1,64E+08	250	2,50E+08
15	230	2,30E+08	178	1,78E+08	264	2,64E+08
16	251	2,51E+08	185	1,85E+08	276	2,76E+08
17	261	2,61E+08	192	1,92E+08	281	2,81E+08
18	280	2,80E+08	198	1,98E+08	286	2,86E+08
19	301	3,01E+08	205	2,05E+08	291	2,91E+08
20	303	3,03E+08	210	2,10E+08	300	3,00E+08
21	312	3,12E+08	223	2,23E+08	320	3,20E+08
22	315	3,15E+08	238	2,38E+08	322	3,22E+08
23	321	3,21E+08	249	2,49E+08	325	3,25E+08
24	325	3,25E+08	265	2,65E+08	329	3,29E+08

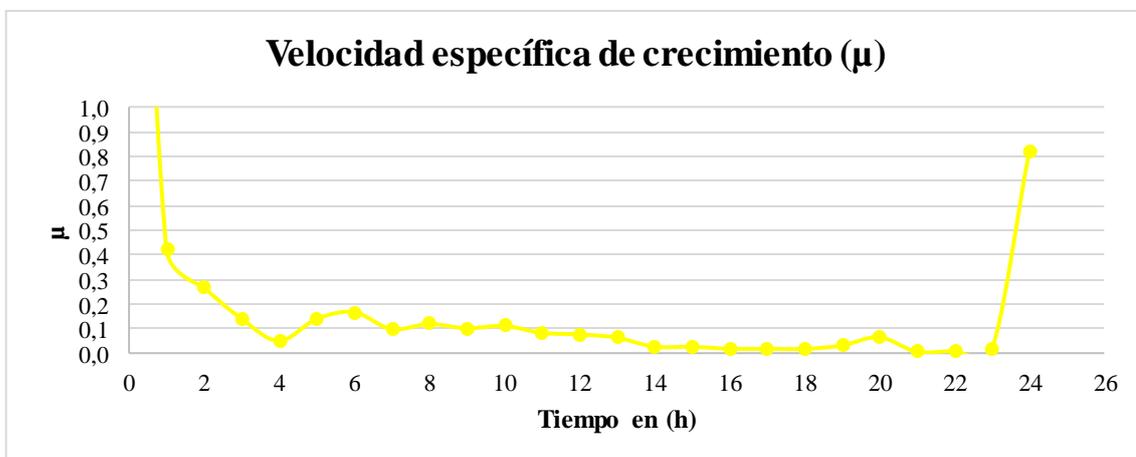
ANEXO W: VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA
Lentilactobacillus parakefiri



ANEXO X: VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DE LA BACTERIA
Lactobacillus malefermentans



ANEXO Y: VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO DEL CULTIVO MIXTO DE
L. malefermentans y *L. parakefiri*.



ANEXO Z: RESULTADOS DE BIOMASA EN g/L DE LA BACTERIA *Lactobacillus malefermentans*

Repetición	Caja inicial	Filtro inicial	Caja final	Filtro final	Biomasa g/ml	Biomasa g/L
LM1	101,6103	1,0037	102,028	1,0076	92,77	0,093
LM2	98,3614	0,9986	99,6925	1,0076	90,76	0,091
LM3	98,1133	0,9982	99,9639	1,0085	91,06	0,091
LM4	98,2861	0,9989	99,4167	1,0074	90,50	0,090
LM5	101,7431	1,0034	102,8787	1,0118	93,62	0,094

ANEXO AA: RESULTADOS DE BIOMASA EN g/L DE LA BACTERIA *Lentilactobacillus parakefiri*

Repetición	Caja inicial	Filtro inicial	Caja final	Filtro final	Biomasa g/ml	Biomasa g/L
LP1	82,5115	0,9994	83,5485	1,0053	76,20271	0,076
LP2	89,3614	0,9987	90,4984	1,0049	82,46729	0,082
LP3	90,2363	0,9985	91,3743	1,0051	83,25592	0,083
LP4	83,3691	1,0036	84,0810	1,0056	76,64933	0,077
LP5	91,6324	0,9989	92,7694	1,0048	84,51107	0,085

ANEXO BB: RESULTADOS DE BIOMASA EN g/L DE LA BACTERIA *Lactobacillus malefermentans* + *Lentilactobacillus parakefiri*

Repetición	Caja inicial	Filtro inicial	Caja final	Filtro final	Biomasa g/ml	Biomasa g/L
LMP1	97,1124	0,9985	98,54658	1,0068	89,74229	0,090
LMP2	84,5431	0,9988	85,6778	1,0067	78,13031	0,078
LMP3	96,1364	0,9997	97,2711	1,0073	88,56479	0,089
LMP4	97,1863	1,0036	98,221	1,0610	89,46301	0,089
LMP5	85,5681	0,9978	86,5028	1,0069	78,85311	0,079

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 20/09/2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Denis Nicol Moya Guerra
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias Pecuarias
Carrera: Agroindustria
Título a optar: Ingeniera Agroindustrial
f. responsable: Ing. Cristhian Castillo



1795-DBRA-UTP-2022

Ing. Cristhian Castillo