

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

“MODELAMIENTO DE LA CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS INICIADORAS LÁCTICAS EN EL HIDROLIZADO DE *Amaranthus caudatus* (KIWICHA)”

AUTOR: Edgar Zárate Sarapura

(PERIODO DE EJECUCIÓN: Del 01 de julio del 2023 al 30 de junio del 2024)

(Resolución de aprobación N° 480-2023-R.)

Callao, 2024

AGRADECIMIENTO

A los alumnos practicantes en el área la microbiología predictiva y tesis de pre y posgrado por su colaboración y participación en los experimentos.

A la Tesista, Bch. Jessica Velásquez Huanca y Bch. Alicia Fernandez por su participación en la obtención de los hidrolizados y elaboración de las curvas de crecimiento.

Al Sr. José Pastor García Cotrina, personal administrativo, por su eficiente trabajo en el mantenimiento de los equipos y ambientes del laboratorio durante el desarrollo del presente proyecto.

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional del Callao por la gestión para la asignación económica parcial, para el desarrollo del proyecto a través del FEDU.

A todas aquellas personas que me proporcionaron un entorno propicio para el desarrollo de las actividades experimentales.

ANEXO 05

INFORMACIÓN BÁSICA

FACULTAD: CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

TITULO: “MODELAMIENTO DE LA CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS INICIADORAS LÁCTICAS EN EL HIDROLIZADO DE *Amaranthus caudatus* (KIWICHA)”

AUTOR: EDGAR ZÁRATE SARAPURA

CODIGO ORCID: 0000-0001-9404-903X

DNI: 09249598

UNIDAD DE ANÁLISIS: HIDROLIZADO DEL GRANO GERMINADO DE *Amaranthus caudatus* (KIWICHA)”

TIPO: EXPERIMENTAL

ENFOQUE: CUANTITATIVO

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: EXPERIMENTAL VERDADERO

TEMA OCDE: 1.06.01 MATEMÁTICA APLICADA- BIOLOGÍA CELULAR, MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

ÍNDICE	N°
	Página
INTRODUCCIÓN	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Descripción de la realidad problemática	5
1.2 Formulación del problema	7
1.3 1.2.1. Problema General	7
1.4 1.2.2. Problemas Específicos	7
1.5 Objetivos	8
1.6 1.3.1. Objetivo General	8
1.7 1.3.2. Objetivos Específicos	8
1.8 Justificación	8
1.9 Delimitantes de la Investigación	9
II: MARCO TEÓRICO	10
2,1 Antecedentes	10
2.1.1. Internacionales	10
2.1.2. Nacionales	14
2.2 Bases teóricas	15
2.3 Marco Conceptual	16
2.4 Definición de términos básicos	21
III: HIPÓTESIS Y VARIABLES	23
3.1 Hipótesis	23
3.1.1 Hipótesis General	23
3.1.2 Hipótesis Específicas	23
3.2 Operacionalización de variables	24
IV. METODOLOGÍA DEL PROYECTO	24
4.1. Diseño metodológico	24
4.2. Método de investigación	24
4.3. Población y muestra	25
4.4. Lugar de estudio y periodo desarrollado	26
4.5. Técnicas e Instrumentos para la recolección de la información	26

4.6.	Análisis y procesamiento de datos	31
4.7.	Aspectos Éticos en investigación	31
V.	RESULTADOS	32
5.1.	Resultados descriptivos	32
5.2.	Resultados inferenciales	33
VI.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	40
6.1	Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados	40
6.2	Contrastación de los resultados con otros estudios similares.	41
6.3.	Responsabilidad ética	45
VII.	CONCLUSIONES	46
VIII.	RECOMENDACIONES	46
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
	ANEXOS	53
	Matriz de consistencia	54

ÍNDICE DE TABLAS

	N° Página
Tabla 1	32
Tabla 2	33
Tabla 3	36
Tabla 4	38
Tabla 5	39
Tabla 6	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	N° Página
Figura 1	34
Figura 2	34
Figura 3	37
Figura 4	37

RESUMEN

El hidrolizado de la harina de granos germinado de *Amaranthus caudatus* (KIWICHA) se caracteriza por su riqueza de nutrientes apropiados para realizar procesos de fermentación como una forma de conservar e incrementar sus propiedades nutricionales asociados a microorganismos fermentadores como las bacterias ácido lácticas. El crecimiento de bacterias ácido lácticas está influenciado por la temperatura, la cual es variable cuando se intenta realizar fermentaciones en condiciones ambientales en lugares con climas de frío o cálido en donde preocupa el consumo de bebidas fermentadas con contenido de toxinas y agentes patógenos que afectan la salud del consumidor y pérdida de la vida útil del producto. El objetivo del presente estudio fue determinar los parámetros cinéticos del crecimiento de las bacterias iniciadoras lácticas *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en el hidrolizado de *Amaranthus caudatus* (kiwicha) a las temperaturas de 15, 25 y 35 °C, El método utilizado fue la numeración de Bacterias iniciadoras lácticas a través de un periodo de 24 horas obteniendo las curvas de crecimiento experimentales y su modelamiento con la ecuación de Baranyi y Roberts consiguiendo los parámetros cinéticos del crecimiento bacteriano: las fases de adaptación, exponencial y la variación poblacional en función del tiempo y temperaturas. Las Velocidades del crecimiento fueron tratadas con el modelo de Arrhenius para obtener la vida útil del producto fermentado. Los resultados indican que la temperatura de 35 °C favorece el incremento de la velocidad de crecimiento para ambas cepas y que el tiempo de vida útil del producto es mayor para *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* que *Streptococcus thermophilus*. . . Se concluye que la harina de grano germinado de Kiwicha es un sustrato nutricional para cultivar microorganismos industrializados o cultivos vivos para producir bebidas fermentadas con potencial nutritivo de manera controlada utilizando los parámetros cinéticos de crecimiento, lo que permite obtener alimentos en condiciones de inocuidad protegiendo la salud de los consumidores

Palabras Claves: Microbiología predictiva, fermentación hidrolizados,

SUMMARY

The hydrolyzate of the germinated grain flour of *Amaranthus caudatus* (KIWICHA) is characterized by its richness of nutrients appropriate for carrying out fermentation processes as a way of preserving and increasing its nutritional properties associated with fermenting microorganisms such as lactic acid bacteria. The growth of lactic acid bacteria is influenced by temperature, which is variable when trying to carry out fermentations under ambient conditions in places with cold or warm climates where there is concern about the consumption of fermented beverages containing toxins and pathogens that affect the consumer health and loss of product shelf life. The objective of the present study was to determine the kinetic parameters of the growth of the lactic acid starter bacteria *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the hydrolyzate of *Amaranthus caudatus* (kiwicha) at temperatures of 15, 25 and 35 °C. The method used was numbering of lactic starter bacteria over a period of 24 hours, obtaining the experimental growth curves and their modeling with the Baranyi and Roberts equation, obtaining the kinetic parameters of bacterial growth: the adaptation and exponential phases and the population variation as a function of the time and temperatures. The growth velocities were treated with the Arrhenius model to obtain the shelf life of the fermented product. The results indicate that the temperature of 35 °C favors an increase in the growth rate for both strains and that the shelf life of the product is longer for *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* than for *Streptococcus thermophilus*. . . It is concluded that Kiwicha sprouted grain flour is a nutritional substrate to cultivate industrialized microorganisms or live cultures to produce fermented beverages with nutritional potential in a controlled manner using kinetic growth parameters, which allows obtaining food in safe conditions while protecting health. of consumers

Keywords: Predictive microbiology, hydrolyzed fermentation,

INTRODUCCION

El Perú a través desde hace siglos ha tenido como base alimentaria a los granos andinos y entre ellos a los pseudocereal como la kiwicha a cual se caracteriza por su alto contenido de proteínas con una calidad y cantidad de aminoácidos superior a la del trigo; es considerada como una buena fuente de energía y micronutrientes como el calcio (kiwicha) y algunas vitaminas, además de aportar fibra dietética de buena digestibilidad. Desde un punto de vista económico es muy importante como materia prima para la exportación y además se deben considerar los productos novedosos que de ella se obtienen. Actualmente se están elaborando productos nuevos, muy atractivos para los consumidores tanto rurales y urbanos los cuales fomentan su consumo, con ello se logra intensificar su cultivo y conservar la biodiversidad andina. Este pseudocereal tiene importancia cultural para sus consumidores que lo fermentan para aprovechar sus principios nutricionales utilizando tecnología de fermentación artesanal, sin parámetros para el control metabólico del uso del sustrato amiláceo del grano y sin garantías de inocuidad y tiempo de vida útil. Ante esta situación, el estudio considera que si se cuenta con una tecnología de fermentación con parámetros que permitan su control en función de tiempo y temperatura el producto fermentado presentará condiciones de inocuidad y vida útil que garanticen la aptitud para los consumidores.

La propuesta del presente estudio es utilizar la fermentación del hidrolizado de la harina germinada el cual ofrece sustratos amiláceos que le confiere atributos sensoriales únicos, así como mejorar su valor nutritivo y su digestibilidad de diversas formas, por otro lado, durante el proceso fermentativo los microorganismos fermentadores pueden producir vitaminas, antioxidantes y moléculas con propiedades funcionales en diversos sistemas de los consumidores.

En los últimos años se ha incrementado el uso de harinas de cereales germinados que se utilizan para la elaboración de productos como panes, galletas u otros. En general esta preferencia de estas harinas está basada en

las ventajas nutricionales de los germinados, pero se requiere tener en cuenta algunos aspectos para abordar el uso de harinas germinadas con garantías de éxito.

Se utilizaron hidrolizados de harina germinada de Kiwicha como sustrato fermentable, considerando la importancia que tiene la germinación del grano y que durante su proceso se sintetizan enzimas amilásicas como la α -amilasas y amiloglucosidasa que tienen acción directa en el desdoblamiento de la amilosa y amilopectina y por otro lado existen enzimas presintetizadas y requieren de su activación como las β -amilasas que en conjunto facilitan la hidrólisis de sus carbohidratos y aumenta el contenido en azúcares, como glucosa y maltosa, y dextrinas y en consecuencia se reduce el contenido de almidón. En el avance de la germinación se presenta la hidrólisis proteica por acción de proteasas que generan polipéptidos y aminoácidos libres, incrementando el contenido en aminoácidos esenciales, los cuales se hacen más solubles haciéndose más biodisponible; así como también se produce la lipólisis por acción de las lipasas y liberación de ácido grasos libre. Estos acontecimientos predisponen un escenario proclive para cubrir los requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas iniciadoras las cuales se verán favorecidas en su crecimiento y de esta forma se generan productos con mucho mayor valor nutritivo y aumentan las posibilidades de incorporar bacterias lácticas probióticas, permitiendo a estos granos ser útiles para la elaboración de alimentos infantiles y geriátricos.

El objetivo del presente estudio fue establecer los parámetros del crecimiento cinético de las bacterias iniciadoras lácticas *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a temperaturas de fermentación en ambientes de 15, 25 y 35 °C para obtener los parámetros cinéticos del crecimiento: Población inicial (N_0), Población final (N_f), Tiempo de la fase Lag (λ), Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) utilizando el modelo de Baranyi y Robert el cual se encuentra instalado en el Programa Demofit del Combase; así mismo, se determinó la energía de activación (E_a) y el valor de la relación V_{max} y Temperatura experimental utilizando em modelo de Arrhenius para

obtener el tiempo de vida útil del producto fermentado.

Los resultados evidencian que cuando se utilizan temperaturas ambientales óptimas para el crecimiento de las bacterias lácticas iniciadoras (*Streptococcus salivarius subsp thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*) se incrementa la velocidad máxima del crecimiento (μ_{max}), se reduce el tiempo de adaptación (λ) y la energía de activación (E_a), condiciones que favorece el incremento del tiempo de vida útil en condiciones de inocuidad.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cereales son considerados como el fruto de espigas de las gramíneas. Su aspecto, uso culinario (como harina o grano) y propiedades nutricionales son similares a los de los pseudocereales andinos, quienes poseen un valor nutricional mayor que los típicos cereales, que los convierte en grandes complementos de las dietas bajas en proteína animal. Por otro lado, se trata de alimentos más fáciles de digerir, por lo que se hace necesario revalorarlos y darle alternativas de transformación para un mejor aprovechamiento de sus nutrientes.

Es muy importante conocer que los pseudocereales no contienen gluten (gliadina y glutenina), pues estas proteínas no tienen ningún interés en la dieta, para nadie, puesto que daña e inflama las paredes intestinales, con todas las consecuencias para la salud en personas sensibles y alérgicas a estos compuestos. Sin embargo, el contenido proteico restante es hidrolizado liberando grandes cantidades de aminoácidos biodisponibles tanto para los humanos como para las Bacterias ácido lácticas (BAL) los cuales los requieren para su crecimiento y fomento de sus actividades enzimáticas.

“existe una variedad de porcentajes en la digestión de los almidones de los pseudocereales teniendo así almidones de rápida, lenta digestión y almidón resistente; dicha clasificación está en función al tiempo de liberación de la glucosa y su absorción en el tracto gastrointestinal” (Chung et al., 2009). Sin

embargo, “el almidón resistente a la digestión es un prebiótico, alto en contenido de amilosa que no puede ser digerido y absorbido por las enzimas amilolíticas en el intestino delgado; pero sí puede ser fermentado lentamente por los microorganismos del intestino grueso produciendo ácidos grasos de cadena corta” (Jyothsna & Hymavathi, 2017; Topping et al., 2003).

Los pseudocereales denotan una riqueza de nutrientes y es consumido porque existe el criterio nutritivo; sin embargo, existe una limitación en su demanda por la presencia cotidiana de productos derivados del trigo o maíz, en consecuencia, su valoración es menor comparada con los granos de los cereales. Estas razones propiciaron utilizar sus propiedades, proteicas y amiláceas, en procesos de fermentación artesanal en comunidades nativas, con poco éxito debido especialmente a una ausencia del control sobre la fisiología microbiana que se utiliza para lograr la fermentación de los sustratos.

Otro aspecto que no está considerando la fermentación artesanal es la no consideración de la existencia de numerosas cepas con capacidad para utilizar nutrientes valiosos y elaborar productos indeseables alterando el producto que se manifiestan como la producción de dióxido de carbono, un exceso de acidificación debido a la producción de ácido láctico, síntesis de exopolisacáridos originando mucosidad, viscosidad, filamentos o la síntesis de sustancias indeseables, como las aminas biógenas.

La tecnología de fermentación artesanal actual no se conduce utilizando parámetros fisiológicos de los microorganismos desconociéndose los tiempos que requieren para adaptarse al sustrato fermentable, así como la velocidad del crecimiento y el tiempo del término de esa etapa; y de esta forma, evitar el metabolismo secundario por el cual se altera las características sensoriales y microbiológicas del producto.

Para la obtención de los parámetros cinéticos del crecimiento se puede utilizar herramientas multimedia de la microbiología predictiva, sin embargo, los

modelos matemáticos no todos son operativos para ajustar las curvas de crecimiento y obtener los parámetros cinéticos del crecimiento y por lo tanto se debe utilizar un modelo matemático que otorgue alta confiabilidad para la expresión matemática del crecimiento utilizando sustratos fermentables hidrolizados de pseudocereales andinos.

Los granos de pseudocereales andinos son factibles de sufrir transformación por mecanismo de fermentación controlada para lograr una mayor disponibilidad de nutrientes y obtener producto amiláceo en forma de harinas que pueden ser hidrolizadas y someterlas a un proceso fermentativo utilizando bacterias ácido lácticas probióticas y de esta forma incrementar la valorización de los productos alimenticios tradicionales.

Muchos estudios reconocen que se deben mejorar los procedimientos tradicionales de transformación agroalimentaria y la calidad de los productos indígenas, en relación estrecha con los criterios de distribución y comercialización en los mercados locales, así como con los gustos y costumbres alimentarias de las poblaciones concernientes. El impacto esperado se plasmará sobre la mejora de las condiciones de vida de las poblaciones indígenas será de doble efecto: en primer lugar, se mejorará la calidad higiénica y el valor nutritivo de los productos alimenticios tradicionales destinados al autoconsumo de la población nativa y, en segundo lugar, aumentará la duración y la conservación de estos productos que asegurará su disponibilidad a lo largo de todo el año. Las poblaciones nativas podrán así planificar y manejar mejor la comercialización de sus productos, incrementando sus beneficios monetarios.

1.1 Descripción de la Realidad Problemática

El alimento artesanal no es considerado como alternativa de desarrollo sostenible y como una oportunidad para regresar a una forma de consumo y de vida, percibida como mejor; así mismo, no destacan su utilidad en la

alimentación por las consecuencias previsibles que nos pueden dar para proteger los recursos naturales y la salud humana. La producción agrícola artesanal tiene una fuerza productiva que traspasa los principios de seguridad alimentaria y de inocuidad, “pudiendo convertirse en una estrategia para la generación de un desarrollo real centrado en la calidad de vida de los habitantes de las comunidades que se ubican en los territorios que sustentan ese tipo de sistemas productivos” Camacho y col. (2019).

Si se considera que los sistemas alimentarios artesanales tienen como eje fundamental el sustento de la vida (económica, social y cultural), entendemos que pueden formar parte importante de la construcción, reconstrucción y defensa de los territorios. Al igual que la agricultura campesina, con la que a veces se fusiona en términos de unidades familiares, la producción artesanal de alimentos tiene la capacidad de reafirmar la identidad cultural y de ser la semilla de la acción colectiva. En ese sentido, este tipo de alimentos tienen una amplia relación con la noción de soberanía alimentaria dado que no sólo contemplan los elementos de la seguridad alimentaria en cuanto a su calidad nutricional y cantidad sino a la aceptación social de la forma de producción y adquisición.

El uso de los pseudocereales andinos en la alimentación es limitado en la industria de la panificación por la ausencia de gluten en la dieta occidental; por otro lado, el tratamiento para los pacientes con la enfermedad celiaca puede ser beneficioso, pero es poco fomentado para ese fin.

Dentro de su composición química los pseudocereales andinos contienen carbohidratos que su uso es limitado para la industria y para el consumo directo porque sus almidones son considerados como resistentes a su digestión por lo cual es una oportunidad de aplicar tratamientos complementarios como su germinación, hidrólisis y fermentación bacteriana para transformarlo en un alimento probiótico, rico en monómeros de amilosa, el cual brinda muchos beneficios para la salud y que puede ser digerido y

absorbido por las enzimas amilolíticas en el intestino delgado; y del mismo modo puede ser fermentado lentamente por los microorganismos del intestino grueso produciendo ácidos grasos de cadena corta (Jyothsna & Hymavathi, 2017; Topping et al., 2003).

Los productos alimenticios tradicionales provenientes de los pseudocereales nativos andinos obtenidos por procesos tecnológicos antiguas deben ser valorados cuando son mejorados por los procedimientos tradicionales de transformación agroalimentaria y la calidad de los productos indígenas, en relación estrecha con los criterios de distribución y comercialización en los mercados locales, así como con los gustos y costumbres alimentarias de las poblaciones concernientes.

El impacto esperado está dirigido a las comunidades andinas quienes deben obtener mejoría de las condiciones de vida , quienes podrán elaborar un producto artesanal con tecnología simple y accesible con doble efecto: por una parte, mejorar la calidad higiénica y el valor nutritivo de los productos alimenticios tradicionales destinados al autoconsumo de los indígenas y, por otra parte, aumentar la duración y la conservación de estos productos para asegurar su disponibilidad a lo largo de todo el año. Las poblaciones indígenas podrán así planificar y manejar mejor la comercialización de sus productos, incrementando sus beneficios monetarios.

1.2 Formulación del problema

1.2.1. Problema General

¿De qué forma la presentación del grano de Kiwicha puede ser útil como sustrato fermentable por bacterias ácido lácticas?

1.2.2. Problemas Específicos

- ¿Cuáles son las condiciones básicas extrínsecas del pseudocereal Kiwicha para el crecimiento de las Bacterias iniciadoras lácticas?

- ¿Cómo influye la temperatura mesofílica sobre el crecimiento de un cultivo iniciador láctico para obtener un producto a base de un hidrolizado del pseudocereales Kiwicha?
- ¿De qué forma el modelamiento matemático puede establecer los parámetros cinéticos predictivos de un cultivo iniciador láctico en un hidrolizado de pseudocereal para determinar su condición de inocuidad a través del tiempo?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

- Determinar los parámetros del crecimiento cinético de iniciadores lácticos compuesto por *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* utilizando el hidrolizado de kiwicha como sustrato útil fermentable.

1.3.2. Objetivo Específico

- Determinar los valores de pH, sólidos totales y ácido láctico generados por el crecimiento de iniciadores lácticos en el hidrolizado de kiwicha.
- Valorar los parámetros cinéticos del crecimiento de las bacterias iniciadoras láctico en el hidrolizado de kiwicha a temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C según el modelo primario de Baranyi - Roberts
- Determinar la vida útil del hidrolizado fermentado de kiwicha por bacterias iniciadoras lácticas mediante el modelo secundario de Arrhenius.

1.4. Justificación

El presente estudio permitirá mejorar los procedimientos tradicionales de transformación agroalimentaria y la calidad de los productos indígenas, en relación estrecha con los criterios de distribución y comercialización en los mercados locales, así como con los gustos y costumbres alimentarias de las poblaciones concernientes. El impacto esperado sobre la mejora de las condiciones de vida de las poblaciones indígenas es de doble efecto: por una parte, mejorar la calidad higiénica y el valor nutritivo de los productos

alimentos tradicionales destinados al autoconsumo de la población indígena y, por otra parte, aumentar la duración y la conservación de estos productos para asegurar su disponibilidad por periodos largos y de esta forma las poblaciones indígenas podrán planificar y mejorar el manejo de la comercialización de sus productos, incrementando sus beneficios monetarios.

Técnicamente los pseudocereales andinos son factibles de sufrir transformación por mecanismo de fermentación para lograr un producto, en muchos casos de tipo probiótico y de esta forma incrementar la valorización de los productos alimenticios tradicionales. Actualmente existe un mayor interés de los consumidores hacia alimentos funcionales con bacterias ácido lácticas y probióticas o la mezcla de ambas.

1.5 Delimitantes de investigación Teórica

La presente investigación se basará en alcances teóricos existentes sobre el proceso de fermentación, en principio los iniciadores lácticos son un grupo filogenéticamente diversos de microorganismos Gram (+) de carácter GRAS; por lo tanto, es escasa y muy variada, se desconoce las características de su crecimiento en matrices de hidrolizados de granos de pseudocereales. Del mismo modo, la fermentación por iniciadores lácticos modificará la composición fisicoquímica y funcional de sustratos vegetales modificando la relación de componentes antinutritivos/nutritivos, lo que modificará la calidad del producto, pero el desconocimiento del tiempo de dichas modificaciones limitará su óptima fermentación y exigirá experimentaciones adicionales.

Teóricamente las bacterias ácido lácticas sintetizan metabolitos formados durante la fermentación que mantienen los procesos de catabolismo y anabolismo algunos de estos compuestos limitarán el máximo aprovechamiento del sustrato fermentable y se pueden controlar utilizando mecanismos físico químicos.

Las limitaciones intrínsecas pueden ser minimizadas seleccionando la Bacteria ácida láctica adecuada y de esta forma mejorar las propiedades

sensoriales, nutricionales y funcionales del producto fermentado.

Temporal

El tiempo del estudio será comprendido en el periodo del año 2023 - 2024 con ensayos repetitivos para etapas de adecuación de métodos y ensayos experimentales para obtener resultados de supervivencia bacteriana. El tipo de pseudocereal que se estudiará a través de la harina hidrolizada es la kiwicha lo será adquirido de una empresa nacional donde sus productos que expenden tengan registro sanitario por la autoridad pertinente.

Espacial

Espacialmente el estudio utilizará la infraestructura del laboratorio de ciencias naturales equipado para realizar pruebas de microbiología y de equipos de computación para desarrollar simultáneamente el registro de la actividad de crecimiento de las bacterias presentes en la harina hidrolizada de pseudocereal kiwicha y el desarrollo del modelamiento matemático respectivo que será monitoreado por una computadora.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes Internacionales

Los procesos fermentativos utilizando granos de cereales andinos germinados fueron estudiados para conocer sus propiedades fisicoquímicas que puedan servir para el desarrollo de bacterias ácido lácticos (BAL) Cañon (2022) evaluaron “las propiedades fisicoquímicas de una bebida fermentada utilizando harina de cereal nativo como la quinua donde alcanzo un rango promedio de pH entre 3.5 y 5 al final de la fermentación, este valor está dado en función de las cepas de BAL empleadas en la fermentación de los tratamientos en las condiciones propias del proceso, como tiempo y temperatura de incubación. El pH más bajo analizado (3.56) se obtuvo en la formulación de una bebida a base de extracto de quinua germinada fermentada con las cepas *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* fermentada durante 16

horas a 36°C". Huapaya y col. (2023). "realizaron fermentaciones en 3 concentraciones diferentes de cultivos probióticos (inóculo): 10%, 5%, 1%, y tres distintos tiempos de fermentación: 8, 10 y 12 horas, con miel, algarrobina, conservantes y saborizante de mango. se lograron condiciones óptimas con 10% de cultivos probióticos y 10 horas de fermentación. El análisis microbiológico confirmó la presencia de microorganismos probióticos a una concentración de 10^8 UFC/mL. El análisis proximal indicó que la composición contenía 84,6 Kcal, 19,3 g de carbohidratos y 1,4 g de proteína por 100 g de bebida".

Calla (2017) preparó "un hidrolizado ácido de harina de quinua que permitió mayor liberación de glucosa (69.4 g/L) y proteínas (23,9g/L) que se usó como medio de cultivo el cual fue evaluado mediante la determinación de la viabilidad de *L. casei rhamnosus* obteniendo 1.6×10^{10} UFC/mL respecto al medio control MRS (8.8×10^9 UFC/mL), durante 24 horas de incubación. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron de 37°C, 80rpm, ambiente anaerobio a pH no controlado (pH inicial 7.0 ± 0.1). Los resultados obtenidos indican que es posible emplear q-lev1 como medio de cultivo para obtener una dosis probiótica de 1.6×10^{10} UFC/mL de *L. casei rhamnosus*.

Terán (2017) determinó "el efecto de la utilización de diferentes concentraciones de amaranto 30, 40 y 50 % de amaranto sin maltear, amaranto malteado y amaranto malteado tostado, las mismas que fueron sometidas a dos tipos de fermentación (ALE y LAGER). Las muestras que mejores valores físico-químicos presentaron (grado alcohólico, pH y acidez total) fueron aquellas que contenían amaranto malteado y amaranto malteado tostado en concentraciones de 30%, indistintamente de la levadura utilizada para su fermentación, obtuvieron valores de grado alcohólico superiores a 3 %v/v, pH dentro del rango ideal de 4,2 a 4,5 y acidez total menor a 0,3 %m/m, requisitos establecidos por la norma INEN NTE2262:2013"

Aguilar (2018) evaluó "el uso de la porción líquida de la kiwicha hidrolizada sobre las características físico químicas y la viabilidad de *Lactobacillus*

paracasei BGP1(L), Bifido bacteria longum SP54 (B) y la mezcla de ambas (LB) durante el proceso de fermentación con concentraciones de hidrolizados de Kiwicha 12.5% y 25%, en las bebidas probióticas de jugo de tarwi. Las formulaciones que contienen jugo de Kiwicha (no contienen extracto hidrolizado de kiwicha EHK) alcanzaron la velocidad de $\mu(1/h)$: 0.1968 (1L), 0.589(2L), 0.8294 (3L), para 12.5% HEK: 0.1102 (1B), 0.3333 (2B), 0.5014 (3B) y para 25% EHK: 0.1262 (1LB), 0.5871(2LB) 0.7206 (3LB). Este mejor comportamiento cinético se aprecia cuando el valor del contenido de HLK es mayor. El crecimiento de microorganismos probióticos alcanzó valores superiores a 10^8 UFC/ml al final de la fermentación, lo que aseguró el mínimo requerido al momento del consumo”

Leroy y Vuyst, (2004) indican que “los cultivos iniciadores son un conjunto de células de al menos un microorganismo en específico que es agregada a una materia prima con el objetivo de elaborar un producto fermentado a través de una fermentación acelerada y dirigida”. Caplice y Fitzgerald, (1999) indican que “Las bacterias ácido-lácticas ocupan un papel importante en la realización de los proceso fermentativos y en su aplicación para la producción de diversos alimentos y bebidas fermentadas”

Carr et al., (2017) mencionan “que las bacterias ácido lácticas (BAL) son organismos Gram positivos, cocos o bacilos, aerobios facultativos o anaerobios, catalasa negativos, no esporulados y con alta tolerancia a pH bajos y se caracterizan por la producción de ácido láctico como principal producto final del metabolismo catabólico de la glucosa. Además, estas bacterias producen sustancias inhibitoras del crecimiento, como las bacteriocinas, peróxido de hidrogeno o diacetilos, que evitan la proliferación de bacterias patógena en los alimentos”.

Paredes y Areche (2021), “obtuvieron una bebida funcional a base de malta de *Amaranthus caudatus* L. (kiwicha) y pulpa de *Hylocereus triangularis* (pitahaya), para su formulación se utilizó (agua 3 L, pulpa de pitahaya 1 L,

harina de kiwicha malteada 100 g, azúcar blanca 220 g, ácido cítrico 3,70 g y CMC 4,5 g, pH 3,7 y 11,50 °Brix, los mismos que están dentro de los límites de la NTP 203.110. 2009. En los resultados microbiológicos hubo ausencia de Aerobios mesófilos, mohos, levaduras y Coliformes. Con los resultados obtenidos se demostró que es una bebida altamente nutritiva y se encuentra apto para su consumo”.

Imbacuán (2023), “Utilizó el extracto de amaranto (*Amaranthus*) y quinua (*Chenopodium*) para evaluar sus fermentaciones con cultivos lácticos *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *L. casei* saborizado con chilguacán. Utilizando los parámetros de fermentación, observaron que las bacterias ácido lácticas *L. casei*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* se adaptaron en la bebida produciendo ácidos orgánicos que disminuyen el pH y aumentan el porcentaje de ácido láctico”.

Carr et al., (2017) mencionan que “las vías por las que se metabolizan las hexosas dividen a las bacterias ácido-lácticas en dos grupos: homofermentativas y heterofermentativas, en función del producto final de la

Khalid (2011), informa que “existe una diversidad de Bacterias ácido lácticas presentes en los productos lácteos fermentados de Namibia no estudiados e informa sobre una producción potencial de compuestos antimicrobianos que es importante en la estandarización de cultivos iniciadores protectores que pueden usarse para controlar el proceso de fermentación y la extensión de la vida útil de los productos lácteos. Son microorganismos cuyo crecimiento óptimo es a un pH aproximado de 5,5 a 5,8 y presenta requerimientos nutricionales complejos de carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos, péptidos, bases nucleotídicas, vitaminas y minerales”.

“En la industria alimentaria, determinadas Bacterias ácido lácticas heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas; por la producción de compuestos aromáticos, como el diacetilo o el acetaldehído”

(Leroy & Vuyst, 2004). Así mismo, “a este grupo bacteriano pertenece la mayoría de los microorganismos probióticos que son utilizados por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados, predominando los géneros de Bifidobacterias y de Lactobacillus” (Chavan et al., 2018).

2.2 Antecedentes Nacionales

Uno de los alimentos que destacan en el grupo de pseudocereales es el Amarantho, cuyo género se denomina *Amaranthus*, siendo una especie más diversas comestibles y malezas que crecen en climas tropicales. Los amarantos son una de las primeras plantas de cultivo consideradas como un superalimento.

La kiwicha contiene abundancia de polisacáridos, es utilizada como un recurso de carbono y energía para los microorganismos presentes de forma natural o añadidos en forma intencional, quienes realizan un proceso de fermentación, en el cual los nutrientes se transforman y cambian sus propiedades.

Estudios realizados en el campo alimentario nos muestran el valor nutricional y los beneficios para salud de la kiwicha, reconociendo su riqueza de proteínas, aminoácidos esenciales (lisina, metionina y treonina), fuentes de vitaminas A, B2 y E, minerales (zinc, calcio, cobre, hierro) y fibra dietética, cualidades para ser considerada como cultivo importante para la alimentación, (Collazos 1993; Repo-Carrasco et al. (2001)

Con respecto a la fermentación de pseudocereales nativos tenemos el estudio de Huapaya (2014), quien “elaboró una bebida probiótica a partir del proceso de fermentación láctica del almidón hidrolizado de harina de quinua a temperaturas de $42.5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante tres diferentes tiempos: 8, 10 y 12 horas. Donde realizó el proceso de hidrolisis del almidón contenido en la harina de quinua utilizando una concentración del 70% de almidón. Realizó 2 procesos a temperaturas de 100°C y 90°C durante 40 min y 60 min respectivamente. Luego agrego la bacteria probiótica a concentraciones de

10%, 5%, 1%. Los resultados determinaron que el mejor tratamiento es el de 10% de bacterias probiótica y 10 h de fermentación con una presencia de bacterias probióticas de 10^8 ufc/ml”.

2.3 Bases teóricas

Rollan (2020) manifiesta que “los numerosos efectos beneficiosos de la fermentación láctica de los cereales y pseudocereales pueden explotarse para diseñar alimentos o ingredientes de granos novedosos y más saludables. El suministro de nuevos productos bio-enriquecidos obtenidos por fermentación de estos cultivos representaría un avance significativo para asegurar una adecuada nutrición a la población en general y especialmente a una franja importante de individuos con necesidades diferentes”.

Bañil y col. (2020) señala que “los alimentos incorrectamente fermentados no están exentos de riesgos y pueden ser vehículos de microorganismos patógenos y/o de deterioro. En este sentido, si bien preparar alimentos fermentados tanto a nivel industrial como en pequeña escala (hogar) presenta grandes beneficios, es recomendable contar tanto con el conocimiento como con la infraestructura adecuada para realizarlo de manera segura”.

Cañizo y col, (2018) reportan que “la microbiota láctica evaluada en granos y masas ácidas de quinoa y amaranto permitió identificar 73 cepas pertenecientes a diferentes géneros y especies: *Lactobacillus* (L.) *plantarum*, *L. hamnosus*, *L. sakei*, *Pediococcus* (P.) *pentosaceus*, *Enterococcus* (E.) *casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. heimaniensis*, *E. hirae*, *E. gallinarum*, *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* (Lc.) *mesenteroides*, *E. durans*.

El uso de la porción líquida de hidrolizado de kiwicha en la elaboración de bebidas probióticas con jugo de tarwi mejoró la viabilidad de las bacterias lácticas evaluadas, especialmente cuando aumentó la cantidad de hidrolizado. Las formulaciones que contenían jugo de tarwi y sacarosa no fueron favorables en el crecimiento de microorganismos, disminución del pH y

aumento de la acidez. El crecimiento de microorganismos probióticos alcanzó valores superiores a 10^8 UFC/ml al final de la fermentación, lo que aseguró el mínimo requerido al momento del consumo. La viabilidad de los microorganismos evaluados aumenta durante la postfermentación incluso con pH bajo; el monocultivo de *Lactobacillus paracasei* y el cocultivo de *Lactobacillus paracasei* con *Bifido bacterium longum* mostraron efectos favorables en comparación con el uso único en el monocultivo de *Bifido bacterium longum*, cuyo crecimiento se ralentiza con la disminución del pH. Los valores de pH y acidez benefician la estabilidad de las bebidas fermentadas frente al crecimiento de microorganismos patógenos. Además, las características sensoriales de las bebidas preparadas fueron favorables.

Colque (2023) La bebida probiótica no láctea se desarrolló utilizando extracto vegetal de tarwi y *Saccharomyces boulardii*. Mediante el estudio se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada uno de los tratamientos, de los cuales el tratamiento A1 con una concentración de sacarosa al 6% e inóculo a 2%, presentó valores óptimos tanto para los parámetros cinéticos como para los modelos de ajuste, mediante los cuales se puede predecir, optimizar y determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de biomasa, y aprovechar cada una de sus diferentes aplicaciones. Los parámetros físicos y fisicoquímicos presentaron comportamientos según la cantidad de sustrato, de modo que se pudo ver el comportamiento de estas en relación a la acción de *Saccharomyces boulardii*; en algunos casos con su disminución como los Brix, densidad y pH y en otros casos en su incremento como la acidez, mostrando así la dinámica de producción de metabolitos propios de una reacción bioquímica.

2.4 Marco Conceptual

Actualmente se viene desarrollando estudios de la biodiversidad microbiana fermentativa la cual requiere su cualificación y cuantificación para poder utilizarlos en programas de asistencia alimenticia y de esta forma combatir al hambre en el mundo. Rebaza (2019), refiere que “el proyecto ProInfant-CYTED, con 7 países iberoamericanos participantes, busca el desarrollo de

alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para paliar carencias nutricionales crónicas en poblaciones infantiles latinoamericanas desfavorecidas. El grupo de la UCSS de Perú, el grupo del IPLA-CSIC entre otros, tiene como objetivo generar una colección de cepas autóctonas de bacterias lácticas (BAL) provenientes de bebidas fermentadas tradicionales. Estudiaron la Chicha de siete semillas, para el posterior estudio del potencial probiótico de las mismas. Las conclusiones demuestran que existe amplia variación en el recuento de bacterias viables entre los 6 productores, oscilando entre 7.7×10^4 a 1.1×10^8 ufc/ml, presencia de aislados de 70 cepas de BAL con morfología similar a la de cocos y bacilos. La identificación de los aislados indica la presencia de especies de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. Actualmente, se está llevando a cabo la tipificación de esta colección de aislados, para proceder a la selección de las cepas y su posterior caracterización. Este estudio proporcionará información sobre la presencia y diversidad de BAL en la Chicha de siete semillas, cuyo potencial probiótico será explorado para cumplir con los objetivos de Perú dentro del proyecto ProInfant-CYTED”.

La fermentación ácido-láctica es uno de los métodos más antiguos, usados para preservar alimentos, en la cual los ácidos producidos por las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de microorganismos alterantes (Arason, 1994). La función principal de las bacterias ácido lácticas es la formación de ácido láctico, entre otros ácidos orgánicos a una velocidad conveniente para asegurar una fermentación consistente (Parra, 2010), en esta fermentación pueden producirse otros componentes en menor proporción, tales como lactato, acetato, diacetil y bacteriocinas (Faruk & Ray, 2013). La fermentación depende de la actividad del tipo de microorganismos añadidos como cultivos iniciadores (Juneja et al., 2017). La principal característica del metabolismo de las bacterias ácido lácticas es la fermentación eficiente de carbohidratos, junto con la fosforilación a nivel de sustrato (Panesar et al., 2007). El uso de enzimas hidrolíticas, como la α -amilasa y la glucoamilasa, mejoran la biodisponibilidad de los nutrientes de los cereales, que se encuentran

formando parte de macromoléculas como el almidón o las proteínas, podría acelerar el proceso de fermentación. (Luana et al., 2014).

Las rutas metabólicas seguidas en la degradación fermentativa de los hidratos de carbono, así como los productos finales formados, varían ampliamente en distintos grupos microbianos. Cada hidrato de carbono o derivado puede ser utilizado como sustrato fermentable por algún microorganismo, incluyendo polisacáridos como almidón, celulosa y quitina, disacáridos como lactosa, maltosa y sacarosa, hexosas como glucosa, fructosa y galactosa, pentosas como arabinosa y xilosa, derivados ácidos como glucónico y glucurónico, y polialcoholes como manitol y glicerol.

La elaboración de bebidas fermentadas mediante bacterias ácido-lácticas (BAL) con inclusión de quinua en su formulación ha sido estudiada por diversos autores, “encontrando resultados satisfactorios en cuanto a viabilidad y características funcionales en el producto terminado utilizando cepas microbianas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Enterococcus* principalmente” (Cerdá et al., 2019), y que según Chiş et al., (2020) “las bacterias ácido lácticas, podrían considerarse como fábricas de células capaces de suministrar compuestos bioactivos e ingredientes alimentarios produciendo mejoras en la calidad de los productos”.

Cuando se trata de tomar el servicio de los recursos naturales renovables del suelo nos referimos a los alimentos obtenidos de dicho componente tratando de utilizar los granos de pseudocereales andinos, en los cuales se reconoce sus valores nutritivos; sin embargo, su consumo es local y con poca frecuencia, siendo reemplazados por alimentos tecnológicamente modernos pero carentes de sentido nutricional. Es así que se requiere transformar alimentos andinos en productos germinados transformado en harinas para luego hidrolizarlos y proceder a su fermentación, cuya tecnología es ancestral en nuestro medio.

La variación de pH en los productos fermentados está condicionado a la biodisponibilidad de glucosa y fructosa desde el inicio del crecimiento

bacteriano y su estado fisiológico. Se observa que cuando existe una mezcla de BAL algunos de ellos son más hábiles para asimilar los nutrientes y lograr disminuir el pH del entorno y de esta manera propiciar ambientes más favorables para el resto, como resulta en el caso del cultivo iniciador de *L. bulgaricus* y *Str. thermophilus*. Al tener la capacidad de descomponer la sacarosa en glucosa y fructosa por la actividad de la invertasa, podría haber ayudado a *L. bulgaricus* a funcionar sin necesidad de mayores cantidades adicionales de fructosa en la formulación. Cuando el sustrato utilizado es la quinua y proviene de un proceso de germinación aumenta el contenido de azúcares reductores fermentados por *L. acidophilus* contribuyendo al incremento de la acidez, explica Maldonado et al., (2018); mientras que, Huapaya (2014), empleando las mismas cepas de BAL con una formulación similar obtiene una bebida fermentada con pH 3.8 luego de 10 horas de fermentación a 42.5°C.

La mayoría de las veces, el modelado del crecimiento microbiano se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, se utiliza un modelo matemático primario para describir la relación entre el tamaño de la población microbiana (N) y el tiempo (t). La curva de crecimiento, que es la representación del logaritmo del número de microorganismos con respecto al tiempo, se utiliza con frecuencia para ilustrar el crecimiento. El crecimiento adopta la forma sigmoideal que normalmente se ve para las curvas de crecimiento en condiciones matemáticas constantes favorables que otorga el modelo. En un segundo paso, se utiliza un modelo secundario para describir la relación entre los parámetros del modelo primario y las condiciones ambientales.

Los datos de crecimiento para cada temperatura se ajustan mediante análisis de regresión no lineal al modelo primario de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994) usando el software DMFit 2.1 para obtener los parámetros cinéticos: fase de latencia (λ), velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y máxima densidad poblacional (N_{max}). El modelo de Baranyi se define mediante la ecuación 1:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{max} A(t) - \ln[1 + (e^{\mu_{max} A(t)} - 1) / e^{(N_{max} - N_0)}] \quad (1)$$

Donde $\ln(N(t))$ es el log de la concentración celular al tiempo t [d(día)] (UFC/ml); $\ln(N_0)$ es el log de la concentración celular inicial (UFC/g); μ_{max} es la velocidad de crecimiento exponencial (log UFC/g día); $\ln(N_{max})$ es el log de la concentración celular final (UFC/g); y A es un parámetro que representa el aumento logarítmico de la población relacionado al estado fisiológico celular, y se determina mediante la ecuación 2:

$$A(t) = t + 1/\mu_{max} \ln(e^{\mu_{max} t} + e^{-\mu_{max} \lambda} - e^{-\mu_{max} (t+\lambda)}) \quad (2)$$

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), descrito en la ecuación (2), es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden de ratio $\mu(t)$, que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. Durante la fase exponencial este coeficiente es igual a μ_{max} , mientras que durante las fases de adaptación y estacionaria se reduce por medio de los coeficientes $\alpha(t)$ y $\gamma(t)$, ambos comprendidos entre cero y uno.

En un segundo paso, se utiliza un modelo secundario para describir la relación entre los parámetros del modelo primario y las condiciones ambientales.

$$dN = \alpha(t) \cdot \mu_{max} \cdot \gamma(t) \cdot N(t) dt \quad (3)$$

En este modelo se describe la fase de adaptación asumiendo que existe una sustancia ficticia $P(t)$ que hace de cuello de botella. El crecimiento de esta sustancia sigue una cinética de Michaelis-Menten, lo que se ve reflejado en el parámetro $\alpha(t)$ tal y como define la ecuación (3).

El modelo de Arrhenius es un modelo secundario que puede describir como varían los parámetros de crecimiento de los modelos primarios, como la velocidad de crecimiento cuando varía el factor temperatura.

La ecuación de Arrhenius fue derivada empíricamente basándose en

consideraciones termodinámicas (Labuza y Riboh, 1982)

$$k = k_0 e^{-E_A / RT} \quad (4)$$

donde: k, constante de velocidad de crecimiento (S^{-1}); k_0 , constante de la ecuación de Arrhenius; E_A , energía de activación ($J \text{ mol}^{-1}$); R, constante universal de los gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T, temperatura ($^{\circ}K$).

2. 5. Definiciones de términos básico

Sustrato

medio o sustancia que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de un microorganismo y que promueve la formación de metabolitos de interés industrial.

Hidrolisis ácida

La hidrólisis ácida, se define como un tratamiento que desorganiza la estructura celular del material para dejar expuesta la celulosa con el objetivo de facilitar la acción de los ácidos en el proceso de hidrolisis e hidrolizar la hemicelulosa hasta glucosa y xilosa principalmente (Morales S. 2015).

Fermentación

El proceso de fermentación se define como un proceso catabólico de oxidación incompleta que ocurre en condiciones anaeróbicas donde el aceptor final de electrones es una molécula orgánica, obteniéndose de esta manera como producto final un compuesto orgánico.

Cultivo iniciador láctico

Se define como microorganismos lácticos que son capaces de descomponer la lactosa mediante el proceso de fermentación, donde convierten el azúcar y sus derivados en ácido láctico.

Acidez titulable

Se define como indicador de porcentaje de ácidos orgánicos contenido en un

alimento, lo cual se obtiene mediante la técnica de titulación utilizando una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N y se expresa en el % de ácido.

Ácido láctico

Se define como un fuerte esterilizador que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas e incrementa la rápida descomposición de materia orgánica, también conocido como aquel compuesto que caracteriza a un alimento fermentado dándole un sabor acidulado.

Sólidos solubles

Se define como aquel compuesto soluble en agua. Además de estar compuesto principalmente por azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa y en menor grado por ácidos orgánicos y algunas proteínas. A su vez el contenido de sólidos solubles se mide con un brixómetro, expresando su resultado en grados °Brix.

Modelo matemático

Alguna de las definiciones establece que es un conjunto básico de hipótesis en los procesos estudiados, representados por medio de funciones y ecuaciones diferenciales. Es una abstracción matemática que facilita la descripción de un modelo específico. (Baranyi y Roberts, 1994). Los modelos matemáticos están basados en diversas hipótesis biológicas como en la interpretación de diferentes fases de crecimiento microbiano.

Modelos predictivo de crecimiento microbiano

Se define como la relación entre el tamaño de la población bacteriana inicial (N) y el tiempo (t) que se describe a través de un modelo matemático (modelo primario). A su vez el crecimiento suele graficarse a través de una curva de crecimiento, que es el logaritmo de la cantidad de bacterias con respecto al tiempo. El crecimiento adopta la forma sigmoideal común para esta curva en condiciones constantes.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

Hipótesis general

La determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de iniciadores lácticos como *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* permitirá valorar la utilidad de hidrolizado de kiwicha como sustrato fermentable.

Hipótesis específicas

- La variación de sólidos totales, Ph y ácido láctico en el hidrolizado de kiwicha. Indicará actividad metabólica óptima de las bacterias iniciadoras lácticas
- Las temperaturas mesofílicas y las concentraciones del hidrolizado de Kiwicha influyen en el crecimiento experimental de las bacterias iniciadoras lácticas en entornos de temperaturas mesofílicas.
- La determinación de los parámetros cinéticos experimentales de las bacterias iniciadoras lácticas en el hidrolizado de Kiwicha permite una bondad de ajuste significativo con el modelo primario de Baranyi y Roberts para obtener los parámetros de crecimiento predictivos.
- El modelamiento de la Velocidad del crecimiento específico (V_{max}) predictivo en el hidrolizado de Kiwicha bajo entornos de temperatura mesofílica utilizando la ecuación de Arrhenius permitirá adoptar una temperatura óptima para controlar el proceso fermentativo de sustrato amiláceo.

3.2. Operacionalización de variables

Variable	Dimensión	Indicador	Índice	Método	Técnica
Independiente: Cultivo iniciador láctico:	Cinética de crecimiento bacteriano	N_0 (población inicial), tiempo, temperatura, Crecimiento	μ_{max} (Log ufc/ml/h) Fase lag Tiempo generacional <i>Estado Fisiolog. (h)</i>	Gráficas del crecimiento Ajuste de curvas de crecimiento	Numeración de Bact. Iniciadoras lácticas (Log ufc/ml) en MRS agar Uso Modelo de Baranyi y Roberts, Arrhenius
Dependiente: Harina hidrolizada de pseudocereal de kiwicha	Fermentación sustrato amiláceo	Sólidos totales Produc. Ac. Lactico	Variación de Azucares Prod. Acido láctico	Espectrofotométrico Refractometría Potenciometría	Enzimática: azucares reductores Titulación ácido base

IV. METODOLOGIA DEL PROYECTO

4.1. Tipo y diseño de la investigación

La investigación es de tipo prospectivo, las variables se caracterizaron en función del tiempo; y experimental, porque se manipuló la variable experimental no comprobada, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir el modo o causa del crecimiento de las bacterias iniciadoras lácticas en el Hidrolizado de la Kiwicha, con tres repeticiones (n=3).

El diseño empleado fue factorial de 3 tratamientos de temperaturas (15, 25 y 35 °C) relacionados a 2 cepas iniciadoras lácticas, completamente al azar.

4.2. Método de investigación

La muestra utilizada fue el hidrolizado de la harina de grano germinado de Kiwicha al 20% v/v repartida, en condiciones de esterilidad, en 6 frascos para

1 litro. A cada litro se determinó sus características físico químicas e inmediatamente se inoculó a 3 frascos, con las cepas de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y los restantes con *Streptococcus thermophyllus* en concentraciones aproximadas de 10^6 UFC/ml. Los cultivos se incubaron a las temperaturas de 15, 25 y 35 °C y cada 2 horas se tomaron de cada frasco volúmenes de 1 ml para cuantificar el Log UFC/ml de cada bacteria ácido láctico hasta alcanzar el tiempo de presentación de la fase estacionaria (24 horas) y de esta forma obtener un curva de crecimiento experimental que fue modelada por la ecuación de Baranyi y Roberts, incorporada en programa Demofit del repositorio digital del Combase, obteniéndose los parámetros cinéticos del crecimiento: μ_{max} , λ , N_0 y N_f .

El parámetro μ_{max} de cada curva de crecimiento, respecto a cada temperatura, se utilizó para obtener el tiempo de vida útil del producto final.

Para los análisis de pH se procedió a colocar 50 ml de muestra del cultivo fermentado en un vaso de precipitación para luego introducir el electrodo. De cada muestra se efectuaron tres lecturas.

Los análisis de acidez titulable requirieron 10ml del cultivo fermentado adicionando 10ml de agua destilada continuando de acuerdo al método basado en titulación.

Para la determinación de los grados Brix se utilizó un refractómetro, que requiere una gota de muestra obteniendo su respectiva lectura.

Se efectuó Análisis de Varianza y pruebas de Tukey para la comparación de medias ($p < 0.05$) y determinar las diferencias estadísticamente significativas de las Velocidades máximas de crecimiento entre las tres temperaturas experimentales.

4.3. Población y muestra

Población

La población estuvo representada por 6 litros de hidrolizado de grano

germinado que se utilizó como sustrato fermentativo que permitió obtener los parámetros cinéticos del crecimiento de las bacterias lácticas iniciadoras.

Muestra

Para el cumplimiento de los objetivos de la investigación la muestra utilizada fue del mismo tamaño de la población de tal forma que el hidrolizado de grano germinado tuvo la posibilidad de ser ensayada manteniendo poblaciones microbianas convenientemente distribuidas que permitieron hacer generalizaciones basadas en los resultados de la muestra sobre cómo actúa la población microbiana.

4.4. Lugar de estudio

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional del Callao, que se encuentra en la Av. Juan Pablo II 306, Bellavista, Callao.

4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información Materiales y Equipos

Equipos	Materiales	Reactivos químicos
Estufa esterilizadora 250 °C	Cajas de petri 14 x 90 mm	<ul style="list-style-type: none"> • Agar MRS • Agar PCA • Plate Count • Agua destilada • NaOH al 0.1N • NaOH (20% p/v) • Fenolftaleína pH 8,2 Ácido clorhídrico HCl 0,01 N Kit para Azúcares y proteínas Material Biológico: Bacterias Iniciadoras lácticas
Estufa Incubadora 70 °C	Beaker de 150 ml	
Autoclave cap 100 L	Matraz Erlenmeyer de 150ml	
Equipo titulación Acido/Base	Frascos c/tapa 250 mL	
Baño agua c/agitador hasta 100°C	Tubos de 16 x 150 mm Tubos 12 x 75 mm	
Nevera -18 – 0 °C	Mango y asas de siembra	
Refrigeradora	Pipeta automática de 10 a 100 µL y de 100 a 1000 µL	
Congelador	Gradillas	
pHmetro ANNA HI2211-01	Mechero a gas y de alcohol	
Selladora al vacío	Bandejas de plástico	
Balanza analítica	Termómetro	
Horno		
Molino de granos		

Técnicas e Instrumentos

Obtención del sustrato

El presente estudio utilizó la técnica de la observación experimental, debido a que elaboró datos en condiciones relativamente controladas por el investigador, manipulando la variable sustrato, que permitió conocer el crecimiento de las bacterias iniciadoras lácticas en forma directa. Con esta técnica se obtuvieron los parámetros cinéticos de ocurrencia natural, evitando en lo posible, sesgos o prejuicios externos que permitió realizar la evaluación de los resultados, con datos precisos.

Calidad microbiológica del fermentado hidrolizado

Se realizarán análisis microbiológicos del hidrolizado de kiwicha para determinar la calidad microbiológica exigida por la norma NTS N°071-MINSA/DIGESA-V,01. Se analizaron los siguientes agentes microbianos: Mesófilos aerobios, mohos y levaduras. Se utilizó 10 ml de muestra de fermentado hidrolizado para aplicar la técnica de dilución 1/10, para ello se dispuso a diluir la muestra en 90ml de una solución de agua peptona al 0.1%; posteriormente la muestra fue homogenizada y a partir de ello se procedió a realizar las diluciones decimales seriadas, correspondientes hasta 10^{-3} .

Determinación del pH

El pH inicial de las muestras preparadas se midió utilizando un medidor de pH/MV de mesa con resolución de 0.01, HANNA HI2211-01. Las mediciones se llevaron a cabo simultáneamente con la toma de las muestras para determinar la concentración de ácido láctico y la numeración de UFC/ml.

Determinación de la producción de ácido láctico

Se utilizó el método de titulación ácido-base, empleando una solución estandarizada de hidróxido de sodio y como indicador la fenolftaleína. Se prepararon las muestras regulando las temperaturas a 20°C. Luego se obtuvieron 10ml del fermentado en un vaso precipitado adicionando 5 gotas de fenolftaleína. Se procedió con la titulación empleado una bureta con NaOH (0.1 N) agregándolo, hasta lograr un cambio del color de la muestra a rosa pálido, observando que se mantenga el color aproximadamente por 30 segundos. como se muestra en la siguiente ecuación (Salinas y Tumbaco,

2016).

$$A = 0.090 V * N / m1 - m * 100$$

Dado que

A = acidez titulable del mosto en porcentaje de ácido láctico respecto a su masa.

V = volumen de la solución de hidróxido de sodio utilizada para la titulación expresada en mililitros.

N = Normalidad de una solución de hidróxido de sodio.

m = masa del matraz Erlenmeyer sin llenar expresada en gramos.

m1 = masa del matraz Erlenmeyer junto con el fermentado expresado en gramos.

Preparación de la cepa iniciadora fermentadora

Se utilizaron cultivos iniciadores de la marca Lyofast compuesto por *Lactobacillus delbrouckii ssp. bulgaricus* (Ldb) y *Streptococcus thermophilus* (St). La activación y propagación se realizó en leche entera en polvo diluida con agua destilada estéril, libre de sustancias inhibidoras (tóxicas, antibióticas) a un volumen de 1.0 litro en el cual se inocularon la totalidad de cultivo de Bacterias iniciadoras lácticas (2.0 g) por 24 horas a 37°C. Luego se dispensó 10 ml de cultivo activado en leche a 100 ml de caldo MRS estéril e incubando a 37°C durante 24 h, periodo después del cual se tomó 1 mL y se dispensó 99 ml de caldo MRS e incubó a la misma temperatura durante 6 horas. Se tomó un mililitro del caldo y se realizaron diez diluciones seriadas por duplicado hasta 1.0×10^{-9} . Se aislaron colonias de cada dilución mediante siembra por estría en el medio de cultivo MRS agar. Después de 24 horas, se incubaron en una estufa bacteriológica a 40 ° C para obtener colonias típicas de Ldb y St. Estas colonias se confirmaron mediante la utilización de sistemas API50 y API20.

Sustrato para fermentar: hidrolizado del grano germinado de Kiwicha.

Se utilizaron 6.0 litros del hidrolizado de Kiwicha los cuales se diluyeron al 20 % con agua destilada estéril para luego dispensarse, en forma individual, 99.9 ml en 18 frascos estériles de 500 ml. Los frascos se dividieron en tres tratamientos (15, 25 y 35°C) y cada uno de ellos estuvo compuesto por 6 frascos con 99 ml de hidrolizado. Tres frascos del tratamiento 15 °C se

inoculacion con 1.0 ml del cultivo de *Ldb activado* (10^8 ufc/ml), y tres frascos con 1.0 ml de *St*, activado (10^8 ufc/ml) para finalmente tener una poblacion bacteriana de 10^6 UFC/ml; para luego ser incubados a temperaturas 15 °C: del mismo modo se practica para el tratamiento 25 °C y 35°C. Los frascos de cada tratamiento, por turno, fueron colocados en un baño de agua con agitador incorporado para mezclar los inóculos de manera constante manteniendo la temperatura de incubación correspondiente, en condiciones estáticas.

Obtención de datos del experimento

Paso 1: Se obtuvieron, en condiciones de esterilidad, 1,0 ml de hidrolizado de los frascos de tratamiento inoculados con *Ldb* a 15 °C, para aplicarle una dilucion seriada al décimo hasta 10^{-3} , luego de cada dilucion se toma 1.0 ml para depositarla en una placa Petri esteril con capacidad de 15 ml. De inmediato se agrego sobre el inóculo 12 ml de agar MRS y que por medio de movimientos rotatorios del cultivo se distribuyo el inóculo por toda el area de la placa petri. Se dejó solidificar el medio de cultivo y luego fue incubado a 15°C por 24 a 48 horas. Del mismo modo se practica para el tratamiento 25 °C y 35°C.

Numeración de Colonias en placa

La lectura de las placas se llevó a cabo después de 24 o 48 horas consistente en la numeración de colonias, utilizando un contador de colonias. Con fines del cálculo de la concentración de colonias de cada cepa sólo fueron considerados las placas que se muestren entre 30 y 300 colonias. Los resultados se expresaron en Logaritmo decimal de las unidades formadoras de colonias por mililitro (Ufc/ml), considerando el factor de dilucion y volumen del inóculo. Para los tratamientos 25 °C y 35 °C se procedió del mismo modo que el tratamiento 15 °C.

Curvas de crecimiento método gráfico

La cuantificación de la concentración de Log Ufc/ml que proviene del Tratamiento 15 °C correspondiente a cada cepa (*Ldb* y *St*) empieza en el Tiempo inicial o cero (T_0) hasta el tiempo final (T_f), en el ínterin de este periodo se obtuvieron muestras cada 2 horas hasta por espacio de 24 horas o alcanzar

la fase estacionaria.

Las concentraciones celulares expresados en términos de Log UFC/ml permitió confeccionar una curva de crecimiento utilizando el método gráfico que permitió la obtención de los parámetros de desarrollo: población inicial ($N_0 = \text{Log ufc/ml}$), población final ($N_f = \text{Log ufc/ml}$), variación poblacional (Log ufc/ml), velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max} = \text{Log ufc/ml/h}$) y la Fase de latencia ($\lambda = \text{horas}$). El mismo procedimiento se aplicó a los tratamientos de 25 y 35 °C.

Obtención de parámetros de crecimiento y cinético mediante el modelo de Baranyi-Roberts.

El modelo de Baranyi y Roberts aporta una base mecanicista o biológica que incluye una fase de crecimiento exponencial lineal, $\mu(x)$, y una fase de latencia que se calculó utilizando una función de ajuste.

Mediante este modelo se obtuvieron la fase de latencia cuyo resultado proviene de una serie de procesos que tienen lugar cuando la célula se adapta a las nuevas condiciones del hidrolizado. Si las células no están preparadas para crecer, o la adaptación es lenta, la fase de latencia será duradera.

Los datos experimentales ingresaron al programa DMFit del Repositorio digital del Combace con la finalidad de lograr el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Baranyi-Roberts y obtener los datos predictivos como los parámetros del crecimiento cinético N_0 (población inicial), N_f (población final), Fase de latencia ($\lambda = \text{horas}$), tasa de velocidad máxima ($\mu_{\max} = \text{Log UFC/ml/h}$). Así mismo, el modelo mostrará el estadístico coeficiente de confiabilidad (R^2) y Error estándar.

Variación de los parámetros de crecimiento de los modelos primarios utilizando modelo secundario de Arrhenius

Para la utilizar la ecuación de Arrhenius se consideraron el promedio de las tasas máximas de crecimiento (μ_{\max}), experimental de cada temperaturas (15, 25 y 35 °C). Con dichas velocidades promedio se elaboraron la gráfica que relaciona $\ln k$ y $1/T$. La relación entre ellas describe una pendiente con valor $-E_A/R$ (Labuza y col., 1992). El valor de la energía de activación ($-E_A$) permitirá

obtener la temperatura óptima en la cual se debe desarrollar el proceso de fermentación del hidrolizado.

Se considera que la ecuación de Arrhenius ajustó bien por encima de la temperatura óptima o por encima de las temperaturas mínimas para el crecimiento (mesofílicas). Las gráficas fueron únicamente exactas en un rango limitado de temperatura para el crecimiento microbiano (Labuza y Fu, 1993) y dentro de ellas se ubicará la temperatura mesofílica óptima para lograr una fermentación con parámetros cinéticos controlados.

4.6. Análisis y procesamiento de datos.

Análisis de datos

El modelo Baranyi-Roberts se utilizó para ajustar las curvas de crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, y las bondades de ajuste de cada uno de ellos se interpretaron utilizando el indicador estadístico Coeficiente de Determinación (R^2). La raíz del cuadrado medio del error (RMSE), que representa el "error estándar del modelo", se utilizó para medir la desviación promedio entre el valor observado y el valor ajustado.

El estadístico ANOVA se utilizó para estimar las diferencias significativas en los parámetros de crecimiento entre el modelo y el proceso fermentativo.

4.7. Aspectos éticos en investigación

La investigación actual ha cumplido con la exigencia de que la ciencia se realice de acuerdo con principios morales que aseguren el avance del conocimiento, la comprensión y la mejora de la condición humana y el progreso de la sociedad. Por lo tanto, se centró en el respeto a la dignidad humana, la autonomía de la voluntad, la protección de sus datos, la privacidad, la confidencialidad, el bienestar humano y la preservación del medio ambiente. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con las normas vigentes y con total acatamiento de los principios, compromisos y requisitos bioéticos y de bioseguridad.

V. RESULTADOS

5.1 Resultados descriptivos

En la tabla 1 se puede evidenciar que los datos del hidrolizado de la harina del grano germinado de Kiwicha (HGGK), caracterizándose por tener un pH promedio (n=6) de 6.8 ± 0.04 , Sólidos totales $10.36 \pm 0.13\%$ y la concentración de ácido láctico $0.181 \pm 0.005\%$. Para todas las características mostradas el coeficiente de variación es mayor para el porcentaje de ácido láctico (0.027); sin embargo, los valores presentados indican que los resultados obtenidos de esta forma, tienen buena precisión que permiten aceptar los experimentos realizados por lo tanto se determina la aceptación de la hipótesis nula (h_0), lo que significa que todas las muestras, de cada una de las propiedades del HGGK son iguales.

Tabla 1. Características físico químicas iniciales del hidrolizado de la harina del grano germinado de Kiwicha (HGGK)			
	pH	%Sólidos totales	% ácido láctico
Promedio (n=10)	6.68	10.36	0.181
Desviación estándar.	0.04	0.13	0.005
Coefficiente Variación.	0.006	0.012	0.027

Elaboración propia

La tabla 2, muestra la calidad microbiológica del HGGK que se caracteriza por presentar los agentes microbianos, pertenecientes a las categorías 1, 2 y 3, por debajo de los límites permisibles que exige la Norma técnica RM 591-2008-MINSA Perú, mostrando condiciones de mucha importancia para experimentar crecimientos bacterianos en sustratos libres de agentes microbianos que se pueden comportar como agentes competidores metabólicos.

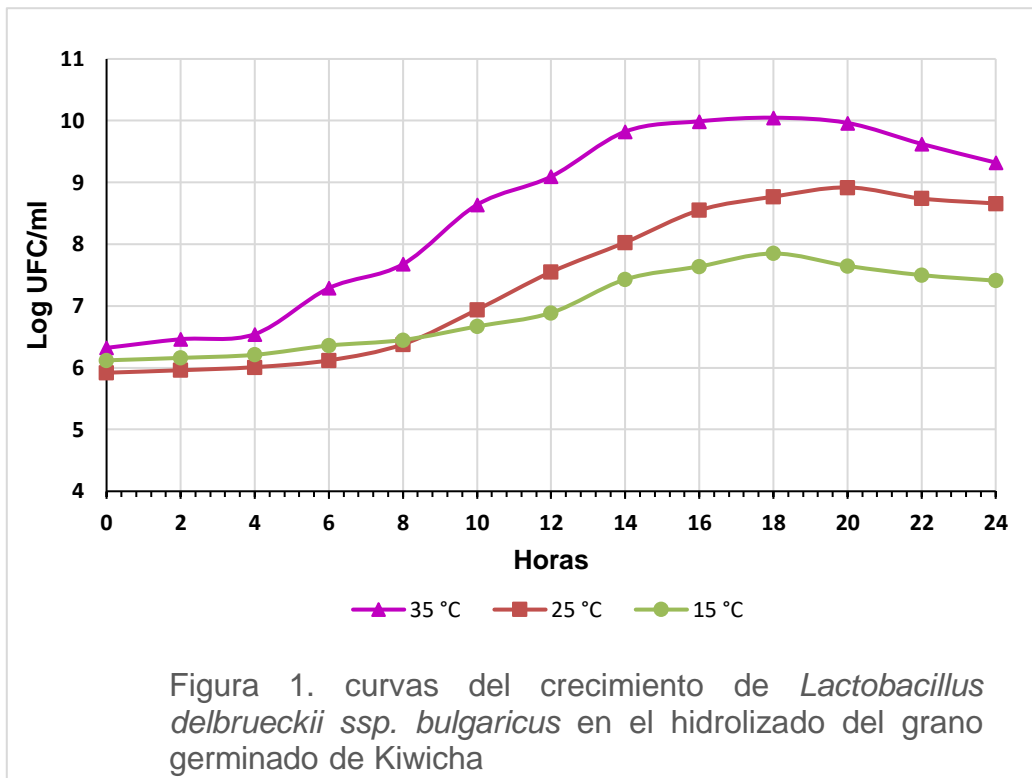
Tabla N°2 Características microbiológicas iniciales del hidrolizado de la harina del grano germinado de kiwicha (HGGK) (NTP RM 591-2008-MINSA)			
Agente Microbiano	Cantidad UFC/ml	Límites permisibles	
		m	M
Levaduras	<10	10 ²	2x10 ³
Mohos	<10	<10	10
Levaduras	<10	<50	50

Fuente elaboración propia

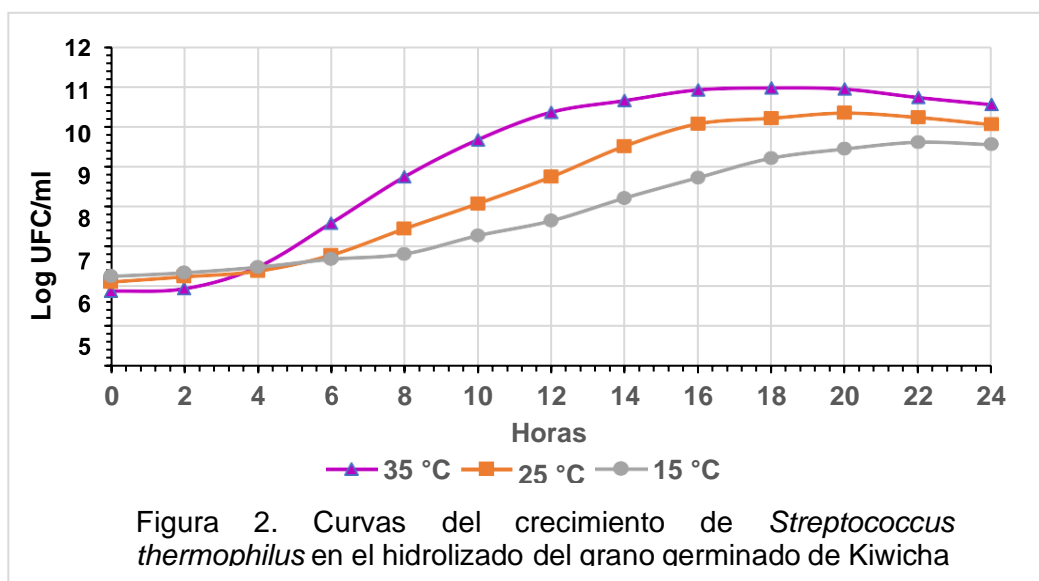
5.2 Resultados inferenciales

Las curvas de crecimiento ofrecen información crucial sobre la fisiología celular y la cinética del crecimiento bacteriano y la fisiología celular. Permiten estimar respuestas de las formas como responden las bacterias ácido lácticas en condiciones de crecimiento como la temperatura, pH, concentración de sales, entre otros factores de crecimiento. Las respuestas que se obtuvieron son los parámetros del proceso del crecimiento para una bacteria en dependencia de la naturaleza del sustrato.

La figura 1 presenta el comportamiento del crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Ldb) en el sustrato HGGK. Se observa la presencia de las tres etapas de un crecimiento sigmoideo caracterizado por una etapa de adaptación (fase lag) corta para las temperaturas de 25 y 30 °C, comparado con la presentado a 15 °C que es muy extensa. Del mismo modo se presenta el crecimiento exponencial (fase log) cuyas pendientes o tangentes es mayor para 35°C, seguido por la de 25 °C y en menor valor la que se presenta a 15 °C. La siguiente etapa denominada como estacionaria se presenta en un tiempo más temprano a la temperatura de 35 °C seguido por el tiempo que corresponde a 25 °C y finalmente el tiempo que corresponde a la temperatura de 15 °C es mas corto comparado con las otras temperaturas. Así mismo, se observa que el crecimiento entra a la fase de muerte celular en las temperaturas experimentadas, siendo la más crítica a 15 °C por su pronta ocurrencia y de mayor intensidad.



La figura 2 muestra el crecimiento de *Streptococcus thermophilus* (St) el cual sigue el mismo patrón del crecimiento bacteriano obtenido para Ldb con las diferencias de que su crecimiento es de mayor valor en relación con la fase Log mostrando una tangente de mayor indicativo que crece más rápido que Ldb y la mejor respuesta de su crecimiento es a 35 °C, requiere de menor tiempo de adaptación (fase Lag) y se sostiene por un tiempo más prolongado en la fase estacionaria. Es notorio la fase de muerte celular de igual forma que Ldb.



Elaboración propia

En la tabla 3, se muestran los valores del crecimiento experimental de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (Ldb) a temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C en el hidrolizado de la harina del grano germinado de kiwicha (HGGK). Los parámetros cinéticos valorados indican que la variación poblacional durante el cultivo de Ldb durante 24 horas es un incremento de 1.73, 3.00, y 3.73 Log UFC/ml ($p < 0.05$), una fase de adaptación (λ) de 8.10, 6.21 y 4.60 horas ($p < 0.05$) y su crecimiento alcanzó las velocidades (μ_{max}) de 0.11, 0.31 y 0.48 Log UFC/ml/h ($p < 0.5$), en forma correspondiente para las temperaturas de 15, 25 y 35 °C.

Del mismo modo, la Tabla 1 muestra los valores de los parámetros cinéticos del crecimiento de *Streptococcus thermophilus* (St) en el mismo sustrato y a las mismas temperaturas. Respecto al incremento de la población se estimó valores de 3.36, 4.23 y 5.09 Log UFC/ml; la fase de adaptación (λ) presenta tiempo de 6.8, 4.61 y 3.42 horas, las velocidades (μ_{max}) de crecimiento fueron 0.29, 0.39 y 0.58 Log UFC/m/h, respectivamente a las temperaturas experimentadas.

Comparativamente se demuestra que las temperaturas utilizadas tienen efecto sobre los parámetros cinéticos evaluados siendo St el que demuestra mejores condiciones de crecimiento en HGGK, así mismo, todos los parámetros cinéticos del crecimiento muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en relación de las temperaturas utilizadas.

La observación del comportamiento de los parámetros cinético entre Ldb y St, se verifica que St tiene mejores condiciones de crecimiento en el sustrato HGGK y entre ambas existe diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Tabla 3. Parámetros cinéticos del crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* sobre el sustrato del hidrolizado del grano germinado de Kiwicha en entornos de temperaturas de 15, 25, 35 °C, obtenidos según el método gráfico.

bacterias iniciadoras lácticas	Temperaturas (°C)	Variación Poblacional (Log UFC/ml)	Fase Lag/ Adaptación (λ = Horas)	Velocidad máxima crecimiento (μ =Log UFC/ml/h)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	15	1.73	8.10	0.11
	25	3.00	6.21	0.31
	35	3.73	4.60	0.48
<i>Streptococcus thermophilus</i>	15	3.36	6.81	0.29
	25	4.23	4.61	0.39
	35	5.09	3.42	0.58

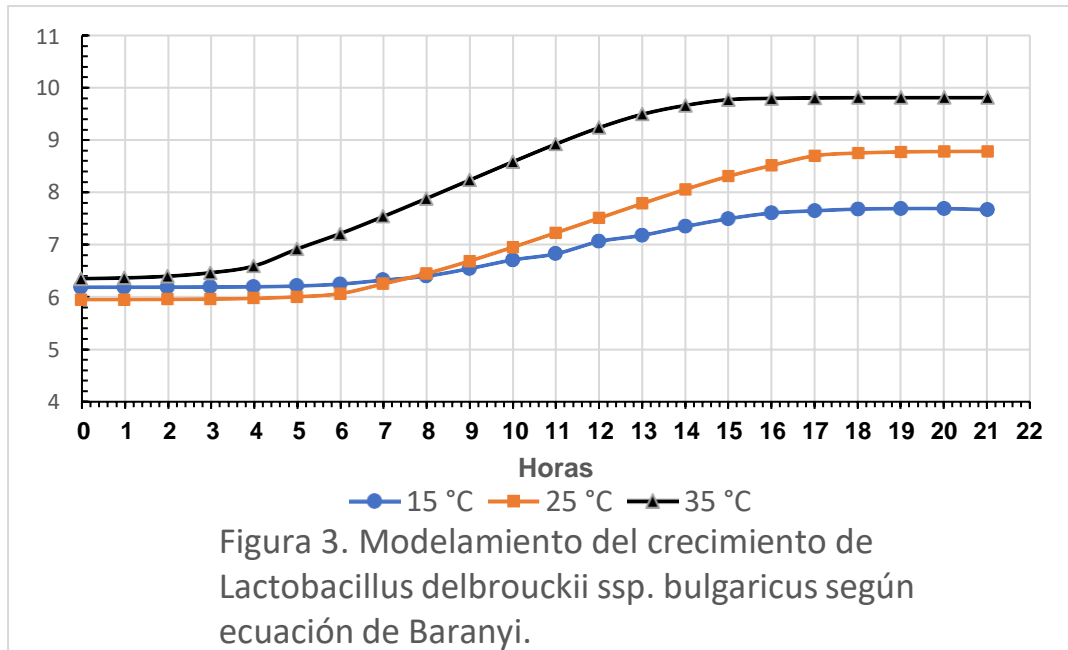
Elaboración propia

Habiéndose obtenido los parámetros de crecimiento experimentales, se requiere darles un tratamiento de modelamiento matemático con la ecuación de Baranyi y Roberts que permitió ajustar todos los datos experimentales para obtener parámetros cinético predictivos que permitió estimar con elevada confianza estadística para poder controlar el proceso de fermentación dentro de tiempos, temperaturas y concentraciones celulares para la harina del grano germinado de Kiwicha. Cuando se traza una curva en forma de S, o una función sigmoide en donde se puede ver sus etapas inicial o adaptativa, etapa exponencial y estacionaria, aporta cuantitativamente los parámetros de la variación poblacional en entornos que brindan concentraciones de sustratos biodisponibles suficientes que permiten sostener el crecimiento.

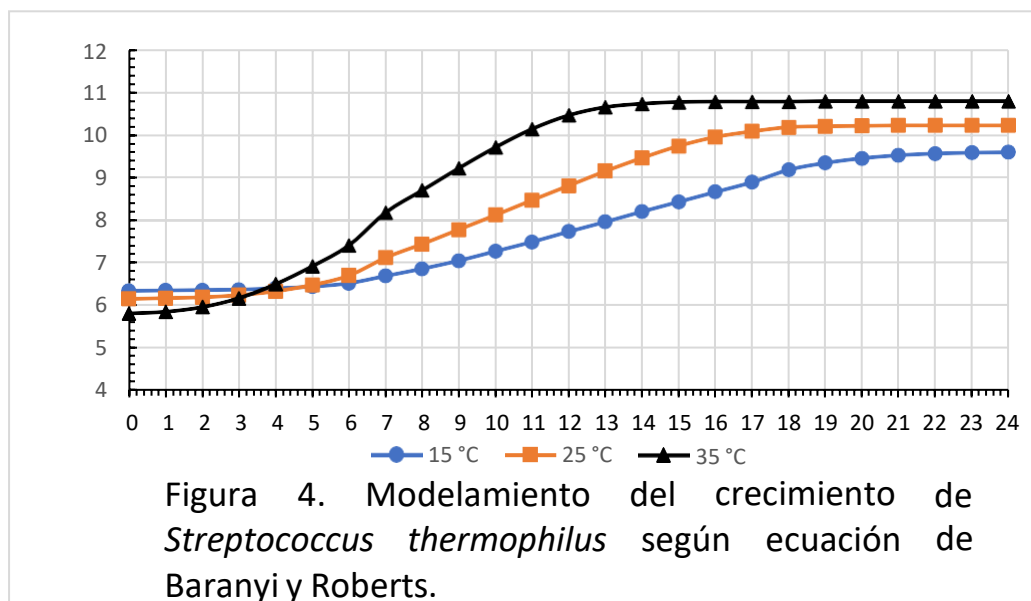
Las figuras 3 y 4, muestran los modelamientos del crecimientos predictivos (Log UFG/ml) de Ldb y St, en el sustrato HGGK utilizando la ecuación de Baranyi y Roberts cuyo resultado muestran un comportamiento de crecimiento de tipo sigmoideo, el cual muestra la fase lag o adaptativa, una fase logarítmica y una fase estacionaria.

Según el modelo, las dos cepas presentan una etapa de adaptación corta, fase de crecimiento exponencial muy rápido y una fase estacionaria que se alcanza muy pronto a 35 °C. El crecimiento a temperaturas 15 y 25 °C muestra

que las dos cepas presentan comportamientos semejantes siendo muy destacado la fase exponencial en donde la velocidad de sus crecimientos es mayor a 25 °C que a 15 °C.



Elaboración propia



Elaboración propia

La tabla 4 muestra los valores del Coeficiente de determinación R^2 , el cual estima el porcentaje de explicación del crecimiento a partir de la aplicación de las temperaturas de 15 °C, 25 °C y 35 °C. Para las dos cepas bacterianas se presenta un valor alto de 0.99 respectivamente a las temperaturas

experimentadas e indica que los cambios en los predictores están relacionados con cambios en la variable de respuesta y que el modelo de Baranyi y Roberts explica mucha de la variabilidad de la respuesta realizando un ajuste perfecto y, por tanto, se considera que el modelo es muy muy fiable para las predicciones del crecimiento de Ldb y St.

Como el R^2 es una medida estadística que indica qué tan cerca están los datos de la línea de regresión ajustada las desviaciones estándar del ajuste presentan valores menores de 1; así mismo, se observa que las variaciones de la temperatura tienen un efecto sobre la velocidad del crecimiento de Ldb y St se realizó el análisis de varianza cuyos valores son $p < 0.05$ que significa que comparativamente el crecimiento de Ldb tiene diferencias significativas con el crecimiento de St cuando utilizan con sustrato fermentativo HGGK.

Tabla 4. Bondad de ajuste del crecimiento de <i>Lactobacillus delbruckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> relacionado con la temperaturas de 15, 25 y 35 °C.						
Estadísticos	Lactobacillus delbruckii ssp. bulgaricus			Streptococcus thermophilus		
	15 °C	25 °C	35 °C	15 °C	25 °C	35 °C
Coeficiente de determinación (R^2)	0.983	0.991	0.971	0.997	0.997	0.995
Desviación Estándar del ajuste	0.09	0.07	0.24	0.08	0.09	0.14
Análisis varianza	p<0.05			p<0.05		

Elaboración propia

La tabla 5, muestra los parámetros cinéticos del Crecimiento predictivo de las Ldb en el hidrolizado de HGGK, obtenidos utilizando el modelo Baranyi-Roberts. El modelo define el crecimiento como una cinética de primer orden que se modificó en función de las condiciones de temperaturas ambientales de 15, 25 y 35 °C y según la fase de crecimiento en que se encuentre la población. La población que se genera se incrementa en niveles logarítmicos de 1.50, 2.82 y 3.46 Log UFC/ml, durante la fase adaptación (λ) este coeficiente es igual a 7.00, 6.78, 3.46 Horas; mientras que la fase exponencial

las velocidades de crecimiento (μ_{\max}) son 0.17, 0.29, 0.37 Log UFC/ml/h, respectivamente a las temperaturas experimentadas.

Para el caso de St. el modelo matemático utilizado muestra que el nivel de la variación poblacional fue de 3.26, 4.07 y 4.98 Log UFC/ml, la fase de adaptación tuvo duraciones de 6.54, 4.75 y 2.92 horas y las velocidades de crecimiento fue 0.17, 0.29 y 0.37 Log UFC/ml/h, en forma respectiva a las temperaturas de 15 °C, 25 °C y 35 °C.

En ambos casos se observa que la temperatura tuvo efecto directo sobre los parámetros cinéticos del crecimiento de Ldb. y St. Para demostrar si los efectos de las temperaturas sobre cada uno de los parámetros cinéticos mostraban diferencias estadísticamente significativas se realizó la comparación de medias (Anva) cuyo resultado indican que los valores presentan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) para todos los parámetros cinético y para las dos cepas estudiadas. Estos resultados muestran que St. crece más rápido que Ldb. en el sustrato de HGGK y según la prueba de Tukey la temperatura más apropiada es 35 °C.

Tabla 5. Parámetros cinéticos del Crecimiento predictivo de las bacterias iniciadoras lácticas en el hidrolizado de kiwicha según modelo Baranyi-Roberts

Bacterias lácticas iniciadoras	Temperaturas (°C)	Variación población Log UFC/ml	Fase Lag /adaptación horas (λ)	Velocidad específica del crecimiento (μ_{\max})
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	15	1.50	7.00	0.17
	25	2.82	6.78	0.29
	35	3.46	3.46	0.37
<i>Streptococcus thermophilus</i>	15	3.26	6.54	0.25
	25	4.07	4.75	0.37
	35	4.98	2.92	0.55

Elaboración propia

Determinación de vida útil del Hidrolizado de la harina del grano germinado de Kiwicha (HGGK) utilizando Iniciadores Lácticos: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* cultivados a temperaturas de 15, 25 y 35 °C.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros de la ecuación de Arrhenius que evalúan el efecto de la temperatura de 15 °C, 25 °C y 35 °C sobre la velocidad específica de crecimiento en un sustrato compuesto por el HGGK. El cálculo la energía de activación (E_a) para Ldb fue = 34184.12 J/mol K y para St fue $E_a = 28555.22$ J/molK ($p < 0.05$) Estos valores sugieren el grado de sensibilidad que cada uno de las cepas experimentadas tienen frente a los cambios térmicos, siendo más sensible Ldb. Así mismo, la constante pre-exponencial ($\ln A$) para Ldb fue 12.62 Ln ufc/ml/h y para St 10.6 Ln ufc/ml/h, cuyo significado es que ambos tienen un potencial significativo para crecer rápidamente bajo condiciones óptimas, ($p < 0,05$). El modelo también aporta valores para la velocidad específica de crecimiento ($\ln \mu$) que para Ldb fue de 0.19 Ln ufc/ml/h y para St 0.27 Ln ufc/ml/h ($p < 0.05$) que los indica que tiene un crecimiento mayor que Ldb dentro de un periodo de tiempo estandarizado. A partir de la operatividad del modelo de Arrhenius puede ser utilizada como referencia para predecir el comportamiento de la bacteria en diferentes escenarios térmicos. La interrelación entre estos parámetros y la temperatura permite anticipar la velocidad de crecimiento de la bacteria bajo distintas condiciones térmicas y de esta manera obtener el tiempo de vida útil del HGGK cuando se utiliza a Ldb St a 4°C fue de 3.02 días y 2.16 días cuando se utiliza St.

Tabla 6. Parámetros del modelo de Arrhenius para la determinación de la vida útil a temperatura de refrigeración del fermentado lácteo con Bacterias Iniciadoras Lácticas en el hidrolizado de la harina del grano germinado de kiwicha		
Parámetros	Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus	Streptococcus thermophilus
$\ln A$ (Ln ufc/ml*h)	12.62	10.65
E_a (Ln ufcK/ml/h/J/mol/ °K)	34,184.12	28,555.22
$\ln \mu$ (LnUFC/ml/h)	0.191	0.266
Tiempo vida útil a 4 °C (días)	3.02	2.16

VI. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

6.1 Contrastación y demostración de la hipótesis con los resultados

Las características nutricionales de la harina del grano germinado del

pseudocereal *Amaranthus caudatus* (Kiwicha) permiten buscar nuevas alternativas de procesos para obtener productos diversos. Una de las tecnologías aplicables es someterlas a un proceso de hidrólisis ácida a temperatura elevadas de 120 °C por 30 minutos, situación que permite utilizarlos como sustratos fermentativos con bacterias iniciadoras lácticas y obtener productos funcionales.

Los procesos fermentativos obtenidos artesanalmente no presentan los tiempos que se requieren para manejar el proceso conociendo el tiempo de cada etapa del crecimiento bacteriano como las fases de latencia o adaptación, la exponencial y estacionaria; es decir se desconoce la función metabólica de los microorganismos durante cada etapa de crecimiento bacteriano. Ante esta problemática se planteó la hipótesis siguiente: las propiedades físico-químicos del hidrolizado de grano germinado de Kiwicha favorecen el desarrollo del proceso de fermentación con bacteria iniciadoras lácticas (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Ldb) y *Streptococcus thermophilus*).

Otros estudio similares confirman “que el hidrolizado de la harina del grano germinado de la Kiwicha contiene elevado contenido de hidratos de carbono, proteínas, lípidos y, en menor cuantía, proteínas y minerales” (Patterson et al., 1980), Estas condiciones permitieron pensar en el uso del producto como un sustrato intrínseco altamente nutritivo para mantener el crecimiento de bacterias iniciadoras lácticas como Ldb y St. durante un período prolongado de tiempo.

Los nutrientes existentes en el HGGK permitieron un desarrollo fermentativo que se tradujo en una curva de crecimiento experimental cuya velocidad de crecimiento (μ_{max}) fue lineal tanto para Ldb. Y St. y así mismo el ajuste del crecimiento por el modelo de Baranyi-Roberts muestran parámetros cinéticos con valores aceptables para asegurar la utilidad del HGGK para cuantificar el proceso fermentativo por las bacteria iniciadoras lácticas siendo la temperatura el factor preponderante para el crecimiento estableciendo diferencias estadísticamente significativas entre las temperaturas experimentadas ($p < 0.05$) y según el estadístico Tukey la temperatura de 35°C

es la óptima. Estos resultados permiten considerar la aceptación de la hipótesis planteada que la determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de iniciadores lácticos *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* permitirá valorar la utilidad de hidrolizado de kiwicha como sustrato fermentable.

6.2 Contrastación de los resultados con otros estudios similares

Las investigaciones similares efectuados para valorar las propiedades físico-químicas y microbiológicas del hidrolizado de la harina del grano germinado de Kiwicha (HGGK) para considerar su uso procuran un pH ligeramente ácido, una cantidad de azúcares solubles, de preferencia maltosa) y escasa presencia de ácido láctico, condiciones que nuestro sustrato investigado lo considera y que por los resultados encontrados lo consideramos ideal para la fermentación por Ldb y St.

Las condiciones químicas iniciales que ofreció el HGGK inoculados con Ldb y St se modificaron durante la fermentación siendo los valores finales de °Brix, pH y concentración de ácido láctico en cantidades significativas en relación con la temperatura óptima de 35 ° que se evidencia por su efecto directo sobre la función metabólica, ocasionando que St muestre mejores capacidades fermentativas y desarrollo, más rápidamente que Ldb.

Procesos fermentativos similares efectuados en diversos granos de cereales son presentados como ideales y se encuentran cercanos a los empleados en esta investigación como lo reportado por Guamán y col. (2022) quienes manifiestan que “para la fermentación, la temperatura fue de 40°C y el pH inicial fue de $6,5 \pm 0,03$ ”; Según Briseño y Castro (2014), "las bebidas fermentadas tienen una reacción acida y es debido a los ácidos orgánicos que se forman por el metabolismo de los agentes fermentativos; como en el caso de los ácidos tartáricos, málico, etc". Carr et al., (2002)) consideran que “las cepas pertenecientes a los géneros de lactobacilos tienen tolerancia a pH menor de 5 y que la temperatura óptima de crecimiento es 40°C”. Sierra y col. (2006), indican “que las condiciones más adecuadas para fermentar con *Lactobacillus ruidii* y el Fermento R-703 es 40°C, pH $6,5 \pm 0,03$ y 120 horas”.

Olivares y Ricaldi (2013) indican que “el tiempo de germinación permite obtener una cantidad de carbohidratos y que después de 96 horas, es de 69%. Cuando es usado en procesos de fermentación (20%) permite un crecimiento favorable para las bacterias lácticas”. Bustamante (2019), encontró que “el grado de Brix del malteado de maíz INIA 603 disminuye hasta 5 Grados durante la fermentación evaluados durante 6 días de fermentación”

El comportamiento de Ldb y St en el sustrato HGGK generaron curvas experimentales las cuales fueron ajustadas por el modelo dinámico de Baranyi y Roberts (1994), el cual “es un modelo matemático predictivo que tiene una parte mecanicista que se fundamenta en que el sustrato contiene sustancias que limitan el crecimiento bacteriano. Considera que los factores fisicoquímicos, el medio extracelular y las condiciones intracelulares pueden determinar el estado de una población homogénea de bacterias. Este modelo describe una curva bacteriana sigmoidea”. El modelo ajustó los datos experimentales y creó los siguientes parámetros: valor poblacional inicial, fase de latencia o retraso, tasa máxima, valor poblacional final y dos parámetros de curvatura. mCurv y nCurv describen las asíntotas de la curva sigmoidea al principio y al final de la fase de crecimiento, respectivamente. Para los fines de la microbiología predictiva el modelo permite cuantificar la cinética del crecimiento microbiano y obtener, como elemento muy importante, la tasa máxima específica de crecimiento.

El modelo de Baranyi y Roberts describió adecuadamente el crecimiento de Ldb y St en cultivos por separado. Se obtuvieron las desviaciones estándares que indicaron que las dispersiones, referente a la media, son pequeñas y el coeficiente de determinación R^2 , indica que la bondad de ajuste por el modelo es elevado 0.99 para ambas cepas, por lo tanto es un ajuste fiable que comparativamente destacan las velocidades de crecimiento (μ_{max}) a las temperaturas de 15, 25 y 35 °C existen diferencias significativas ($p < 0.05$).

Serna y Rodríguez (2005), indican que “la fermentación de harina germinada de maíz con por Ldb y St, el pH disminuyó desde 6,5 a 5,0 y la fase de latencia alcanzó tiempos de 1.78 horas y 2.95 horas, respectivamente, a 42 °C. Por lo tanto, según las características fisiológicas de St, produce entre 0,7 y 0,8 %

de ácido láctico, en ambientes de termo resistencia y se desarrolla en forma óptima a temperaturas entre 42 y 45 °C, con una temperatura mínima de 10 °C y máxima de 50 °C e incluso 65°C por 30 minutos, y tiene menor poder de acidificación que el *Lactobacillus*. Por otro lado, la actividad proteolítica en la leche es baja porque los aminoácidos liberados son consumidos durante su fase de crecimiento logarítmico".

La comparación de los parámetros de crecimiento entre las bacterias iniciadoras lácticas se observa que los parámetros de St son mayores que Ldb, debido a que su metabolismo está relacionado con el pH que se genera durante la fermentación en el HGGK el cual es apropiado para la celulabacteriana. Abdel-Rahman et al, (2013) consideran que "con frecuencia el metabolismo propio está influenciado por el pH. Las bacterias ácido lácticas crecen mejor en condiciones cercanas a la neutralidad; por ejemplo *Streptococcus thermophilus* pH 6,5, *L. delbrueckii ssp bulgaricus* pH 5,8 a 6".

La fase de latencia es un periodo de adaptación para las bacterias lácticas cuando pasan a una nueva condición priorizando la síntesis enzimática necesaria para el crecimiento en un nuevo sustrato. Ani y Wahidin, (2005), consideraron que "el pH es un componente crucial en la producción de biomasa y ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*; a pH 6, la fase lag duró cuatro horas considerado como un tiempo significativamente más corto que los evaluados en condiciones de pH más bajos, en donde las células utilizan el sustrato en forma acelerada al inicio de la fermentación, lo cual favorece para obtener altas tasas de crecimiento celular".

Los parámetros de crecimiento obtenidos en este estudio muestran la desviación estándar más alta y R^2 más bajo para Ldb y St cuando la temperatura fue de 35 °C. Al respecto, Aguilar (2007) "Modeló el crecimiento individual de *Lactobacillus plantarum productora de bacteriocinas* y *Lactobacillus paracasei* no productora de bacteriocinas. El ajuste de estos crecimientos y los parámetros cinéticos estimados: fase lag, tasa de crecimiento, concentración celular inicial y la final, ajustaron adecuadamente a los datos experimentales".

La vida útil de los alimentos es un aspecto crucial en la industria alimentaria, ya que afecta tanto la seguridad como la calidad de los productos (Baldizón y Córdoba, 2008). La determinación de la vida útil implica comprender los procesos de deterioro y establecer estrategias para prolongarla, garantizando así la satisfacción del consumidor y la rentabilidad del producto (De la Cruz Quispe, 2009).

Una forma de prolongar de la vida útil de los alimentos se puede realizar mediante la fermentación con bacterias lácticas (BAL), un método antiguo, simple y económico que además mejora las propiedades sensoriales, la calidad nutricional y funcional de los productos (Rollan, 2020).

El presente estudio enfoca el tiempo de vida útil del hidrolizado de la harina del grano germinado en el que finalizó el proceso de fermentación hasta lograr alcanzar la fase estacionaria del crecimiento de Ldb y St. Los resultados indican que el tiempo de vida útil del fementado es de 3 días cuando se fermenta con Ldb y 2 días cuando se hace con St. a temperaturas entre 15 a 35 °C.

Estudios sobre fermentaciones como el de Chimbo (2019) considera “que la bebida Fermentada a base de maíz (Jora) presento un tiempo de vida útil de 6 a 7 días en condiciones de almacenamiento refrigerado.

Zárate (2023) indica que “la vida útil de la bebida fermentada utilizando Harina de granos de maíz jora inoculado con *Lactobacillus delbruckii ssp bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, variaron después del proceso de fermentación, con duraciones de vida útil que no superan los 3 y 4 días, respectivamente a temperatura de 4°C. Esta limitación se atribuye a la post acidificación que ocurre cuando las bacterias fermentadora continúan produciendo ácido láctico incluso después del proceso de fermentación”,

6.3 Responsabilidad ética.

El autor asume la responsabilidad del informe final debido a que la investigación actual se llevó a cabo de acuerdo con las normas y principios que impiden el uso de la ciencia en perjuicio del ser humano o del entorno.

VII CONCLUSIONES

- El hidrolizado de la harina del grano germinado de kiwicha (*Amaranthus caudatus*) tiene propiedades nutricionales para poder ser fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.
- El crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en el hidrolizado de la harina del grano germinado de Kiwicha de tipo sigmoideo y muestra claramente las fases de latencia, exponencial y estacionaria.
- La aplicación del modelo matemático de Baranyi y Roberts significa tener una herramienta predictiva que permite procesar datos experimentales y obtener los parámetros cinéticos predictivos de la fermentación de la Harina del grano germinado de Kiwicha utilizando *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Experimentar el hidrolizado de Kiwicha en procesos de fermentación utilizando bacterias probióticas.
- Realizar formulaciones de granos de pseudocereales andinos para elaborar bebidas fermentadas fortificadas con antioxidantes y sales de hierro.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, E. F., & Rivera, E. D. P. F. (2018). Assessment of the use of the hydrolyzed liquid fraction of the kiwicha grain in the fermentation process of probiotic drinks from tarwi juice: microbiological, chemical and sensorial analysis. *Food Science and Technology*, 39, 592-598.
- Alessandra, V. (2012). Bioethanol. In P. M. Lima, *Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass*: (pp. 1-29). Italia: INTECH.
- Alvarruiz, A.; Rodrigo, M.; Miquel, J.; Giner, V.; Fera, A. y Vila, R. (1990).- "Influence of brining and packing conditions on product quality of capers". *FoodSci.* 55, 196-198
- Amirdivani, S.; Baba, A. Cambios en las características de fermentación del yogur y potencial antioxidante e inhibición in vitro de la enzima convertidora de angiotensina-1 tras la inclusión de menta, eneldo y albahaca. *LWT* 2011 , 44 , 1458–1464.

- Anderson, R. (1984). Characteristics of the bacterial flora isolated during spontaneous lactic acid-fermentation of carrots and red beets. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 17(5), 282-286.
- Arason, S. (1994). Production of fish silage. In *Fisheries Processing* (pp. 244–272). Springer.
- Axelsson, L. Lactic acid bacteria classification and physiology. Salminen, S. y von Wright, A. 2013. Ed Nueva York: Marcel Dekker.
- Badshah, M. (2012). Bioresource Technology. En M. Badshah, *Evaluation of process parameters and treatments of different raw materials for biogas production*
- Bales, R.P. (1970). "Lactic acid fermentation of outer celery petioles". *J. Food Sci.* 35, 476-478
- Bamforth, C. W. (2001). pH in Brewing: An Overview. *MBAA Tech.Q.*, 38,1–9.
- Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1994). Un enfoque dinámico para predecir el crecimiento de bacterias en los alimentos. *Int J. Food Microbiol*, v.23, p. 277-294.
- Barbosa, M. (1992). Efficient Fermentation of Pinus sp. Acid Hydrolysates by an. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,, 1382-1384
- Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., y Kumar, S. (2014). Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 36, 91–106.
- Birch, C. A New logistic sigmoid growth equation compared with the Richards growth equation. *Ann Bot-London*. 83: 713-723. 1999.
- Blancas A, Alpizar L, Larios G, Saval S & Huitron C (1982) Conversion of henequen pulp to microbial biomass by submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 12: 171-175.
- Botella C, Ory I, Webb C, Cantero D & Blandino A (2005) Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26(2–3): 100-106
- Brizuela M. (2003). Selección de cepas de bacterias ácido lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos [tesis de doctorado]. La Habana: Cuba.
- Calla Carita, A., Alvarez Aliaga, M. T., & Crespo Melgar, C. F. (2017). *Diseño de medios de cultivo a base de grano de quinua (chenopodium quinoa) para la obtención de probióticos a través de tecnología de fermentaciones* (Doctoral dissertation).
- Camacho Vera, Joaquín Huitzilihuitl, Cervantes Escoto, Fernando, Cesín Vargas, Alfredo, & Palacios Rangel, María Isabel. (2019). Los alimentos artesanales y la modernidad alimentaria. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 29(53), e19700. <https://doi.org/10.24836/es.v29i53.700>
- Cañon Rodríguez, D. F. (2022). Evaluación de las Propiedades Fisicoquímicas de una Bebida Fermentada Utilizando Lactosuero Comercial y Harina de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Cultivada en Cundinamarca. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI Programa de Ingeniería de Alimentos.

- Caplice, E., & Fitzgerald, G. (1999). Food fermentations: role of microorganismos in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131-149.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2017). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- CENAN. (2017). Tablas Peruanas de Composición de Alimentos. Instituto Nacional de Salud.
- Chavan, M., Gat, Y., Harmalkar, M., & Waghmare, R. (2018). Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. *LWT - Food Science and Technology*, 91(October 2017), 339-344.
- Chen, Hongzhang. (2014). *Biotechnology of lignocellulose*. Dordrecht: Springer Netherlands
- Chen, K. H., McFeeters, R. F., & Fleming, H. P. (1983). Fermentation characteristics of heterolactic acid bacteria in green bean juice. *Journal of Food Science*, 48(3), 962-966.
- Chiş, M. S., Păucean, A., Man, S. M., Vodnar, D. C., Teleky, B. E., Pop, C. R., ... & Muste, S. (2020). Quinoa sourdough fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 designed for gluten-free muffins—A powerful tool to enhance bioactive compounds. *Applied Sciences*, 10(20), 7140.
- Collazos, C. 1993. *La Composición de Alimentos de Mayor Consumo en el Perú*. 6ta ed. Lima, Perú: Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Nutrición. Banco Central de Reserva.
- Condori Valverde, E. (2010). Obtención de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha (*Amaranthus Caudatus*).de yogurt batido mediante sustitución parcial de leche fresca con extracto de kiwicha (*Amaranthus Caudatus*).
- Crueger W, Crueger A. *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial*. Traducido por Paloma Liras Padín. España: Acribia; 1993.
- Delibes R., Barragan A. (2008). "El consumo ritual de chicha en San José de moro," in *Arqueología Mochica: Nuevos Enfoques*, eds L. J. Castillo, H. Bernier, G. Lockard, and J. Rucabado (Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú), 105–118.
- Dickenson, C. J. (1983). Cambridge prize lecture dimethyl sulphide - its origin and control in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 89, 41–46.
- Eden-Waren GmbH .(1976). "Lactobacillus bavaricus recovery in a pure culture and use for lactic acid fermentation of plant material". *German Federal Republic Patent Application*, 2, 440, 516.
- El salous, A., Arcos, F., Nuñez, P., & Castro, A. (2020). Evaluación sensorial de tres tipos de yogur vegetal a base de leche de arroz, quinua y avena, endulzada con stevia, como alternativa alimenticia. *CentroSur Social Science Journal*, 4(1).
- Elizaquível P., Pérez-Cataluña A., Yépez A., Aristimuño C., Jiménez E, Cocconcelli P.S., Vignolo G., Aznar R. (2015) Pyrosequencing vs.

- culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *Int. J Food Microbiol.* 198:9-18.
- Escobar A., Gardner A., Steinkraus K. H. (1993). South American fermented maize chicha. In K. H. Steinkraus (Ed.), *Handbook of indigenous fermented foods* (pp. 402–406). New York: Marcel Dekker.
- Estrada A. et al. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas Nativas de *Lactobacillus* sp. Contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. 2005. *Revista Facultad Nacional Agronomía de Medellín*. Vol. 58, p. 2601-2609.
- Faruk, T., & Ray, B. (2013). *Lactic Acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications*. (Series H:). NATO ASI Series.
- Fernández Diez, M.J . (1991).- "Frutos y vegetales aderezados".- *Grasas y Aceites* 42, 74-83.
- Fleming, H.P. (1982). "Fermented vegetables" en "Economic Microbiology. Fermented Foods". Vol. 7, p. 227.- A.H. Rose (Ed.). Academic Press Inc., New York.
- Fleming, H.P.; McFeeiers, R.F.; Thompson, R.L y Sanders, D.C. (1983). "Storage stability of vegetables fermented with pH control". *J. Food Sci.* 48, 975-981
- Flores-Mendoza, L., Osorio-Lorenzo, P. V., Pérez-San Juan, A. R., Sánchez-Rosas,. Elaboración de una bebida fermentada tipo cerveza artesanal a base de malta adicionada con tallo de maíz (*Zea mays*) y Mexale. *Revista Tecnológica Agroalimentaria* Vol. 3 Num. 1 (2019) 59.
- García, C., Arrazola, G., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus Casei*. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. Vol 11 No. 1, pp. 136 - 143.
- García, N. M. (2017). *Bebidas vegetales* [Tesis de grado. Universidad Complutense de Madrid, Madrid].
- Haard N. F., Odunfa S. A., Lee C.H., Quintero-Ramírez R., Lorence- Quiñones A., WachterRadarte C. (1999) *Fermented cereals. A global perspective*. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 138.
- Hames, B. (2008). *Preparation of Samples for Compositional Analysis*. *National Renewable Energy Laboratory*, 1-12.
- Helland, M. H., Wicklund, T., & Narvhus, J. A. (2004a). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 305-313. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.007> Helland, M.
- H.,Wicklund, T., & Narvhus, J. A. (2004b). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. *International Dairy Journal*, 14, 957-965.
- Huamani, F. (2018). Evaluación del perfil químico-nutricional y actividad antioxidante de tres ecotipos de Cañihua (*Chenopodium Pallidicaule* AELLEN) procedentes de Puno. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico, Universidad Peruana Cayetano Heredia].
- Huang, C. (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by

- Trichosporon fermentans. *Bioresource Technology* , 4535–4538.
- Huapaya Castillo, C. S. (2014). Elaboración de una bebida probiótica a partir de la fermentación láctica del almidón hidrolizado de harina de quinua chenopodium quinoa [Tesis Universidad Nacional Agraria La Molina].
- Huapaya Castillo, C. S., & Juscamaita Morales , J. G. (2023). Preparation of a probiotic quinoa beverage by enzymatic hydrolysis of its starches and subsequent lactic acid fermentation. *Vitae*, 30(2).
<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v30n2a352397>
- ICMSF. (1988). Comisión Internacional sobre Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos.
- Imbacuán González, M. C. (2023). Evaluación de la fermentación con cultivos lácticos de una bebida a base de extracto de amaranto (Amaranthus) y quinua (Chenopodium quinoa) saborizada con chilguacán. UPEC.
- Joshi, D. C., Sood, S., Hosahatti, R., Kant, L., Pattanayak, A., Kumar, A., Yadav, D., & Stetter, M. G. (2018). From zero to hero: the past, present and future of grain amaranth breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(9), 1807-1823.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
- Laboratorio de Referencia Animal (LANARA). (1981) Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. li- Métodos físico e químicos. Mel. *Ministério da Agricultura*. Brasília, 2(25):1-15.
- Leroy, F., & Vuyst, L. De. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Luana, N., Rossana, C., Antonio, J., Kaisa, P., Marco, G., & Giuseppe, C. (2014). Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 17-26.
- Ludeña Urquiza, F. E. (2022). Caracterización fisicoquímica microbiológica y sensorial de un producto fermentado tipo Yogurt a base de Quinoa (Chenopodium quinoa Willd).
- Maldonado Jibaja, R., Carrillo Herrera, P., Ramírez Cárdenas, L., & Carvajal Larenas, F. (2018). Elaboración de una bebida fermentada a base de quinua (Chenopodium quinoa). *Enfoque UTE*, 9(3), 1–11.
- Martinez-Lopez, A., Millan-Linares, M. C., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., & Montserrat-de la Paz, S. (2020). Nutraceutical value of kiwicha (Amaranthus caudatus L.). *Journal of Functional Foods*, 65, 103735.
- McFeeters, R.F. y Chen, K.- H. (1986). "Utilization of electron acceptors for anaerobic mannitol metabolism by Lactobacillus plantarum. Compounds which sen/e as electron acceptors". *Food Microbiol.* 3, 73-81. 31.
- McFeeters, R.F. y Fleming, H.P. (1991). "pH effect on calcium inhibition of softening of cucumber mesocarp tissue".-*J. Food Sci.* 56, 730-732

- Montes A, Santacruz A, Sañudo J. (2003). Efecto in vitro de *Lactobacillus casei* subsp. *raamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori* [tesis de pregrado. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño].
- Morales, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.
- Nowak, V., Du, J., & Charrondièrre, U. R. (2016). Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Chemistry*, 193, 47-54.
- Obispo Gavino, E. O. ., Dueñas Sanchez, B. F. ., Fernandez Herrera, F. ., Villafuerte Montes, Úrsula ., & Sulca Martínez, P. B. . (2023). Desarrollo de una bebida funcional a base de leche, extracto de kiwicha (*Amaranthus caudatus* L.) y zanahoria (*Daucus carota* L.). *Peruvian Agricultural Research*, 4(2). <https://doi.org/10.51431/par.v4i2.791>
- Onyango, C. (2006). Influence of incubation temperature and time on resistant starch. *Carbohydrate Polymers*, 494–499.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1–14.
- Paredes, I. E., & Areche, F. O. (2021). Elaboración de una bebida funcional a base de malta de *Amaranthus caudatus* L. y pulpa de *Hylocereus triangularis*. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 5(3), 3353-3366.
- Parra, R. (2010). Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.
- Pereira, E., Encina-Zelada, C., Barros, L., Gonzales-Barron, U., Cadavez, V., & C.F.R. Ferreira, I. (2019). Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa) grains: A good alternative to nutritious food. *Food Chemistry*, 280, 110-114.
- Perez-Rea, D., & Antezana-Gomez, R. (2018). The Functionality of Pseudocereal Starches. En M. Sjøo & L. Nilsson (Eds.), *Starch in Food* (2.a ed., pp. 509-542). Elsevier.
- Pilco Quesada, S. (2021). Elaboración de una bebida a base de granos andinos: Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y Kiwicha (*Amaranthus caudatus*). Tesis Doctorado en Ciencia de Alimentos. Universidad Nacional Agraria la Molina. Escuela de posgrado, 2021.
- Ramírez, C. (2005). Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogénicos e estimulantes do sistema imune [tesis de doctorado. Curitiba: Universidad Federal do Paraná].
- Rebaza, T. D., Montes, N. D., & Ruas-Madiedo, P. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de “Chicha de Siete Semillas”, una bebida fermentada tradicional en Perú.

- Rebaza, T. D., Montes, N. D., & Ruas-Madiedo, P. (2019). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas provenientes de “Chicha de Siete Semillas”, una bebida fermentada tradicional en Perú.
- Reguera, M., & Haros, C. M. (2017). Structure and composition of kernels. *Pseudocereals: Chemistry and technology*, 28-48.
- Repo-Carrasco R., Espinoza C., Jacobsen S.E. (2001). Valor nutricional y usos de la quinua (*Chenopodium quinoa*) y de la kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). En *Memorias, Primer Taller Internacional sobre Quinoa – Recursos Genéticos y 121 Sistemas de Producción* (Jacobsen S.-E., Portillo Z., Editores), 10–14 May, UNALM, Lima, Perú, 391-400
- Rodríguez-León, J. A., Bueno, G., Rodríguez, D. E., Delgado, G., Serrano, P., & Brizuela, M. A. (2003). True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. In *New horizons in biotechnology* (pp. 163-172).
- Sindhu, R., & Khatkar, B. S. (2019). Pseudocereals: nutritional composition, functional properties, and food applications. In *Food Bioactives* (pp. 129-147). Apple Academic Press.
- Talebna, F. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment,. *Bioresource Technology*, 4744–4753.
- Terán Fuentes, S. R. (2017). *Evaluación de la utilización de amaranto (Amaranthus spp.) como adjunto y dos cepas de levadura (Saccharomyces cerevisiae) en la fabricación de cerveza* (Bachelor's thesis, Quito, 2017).
- Topping, D. L., Fukushima, M., & Bird, A. R. (2003). Resistant starch as a prebiotic and synbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 171-176.
- Vuyst, L. De, & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production , Purification, and Food. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.

ANEXOS

MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: “MODELAMIENTO DE LA CINÉTICA DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS INICIADORAS LÁCTICAS EN EL HIDROLIZADO DE *Amaranthus caudatus* (KIWICHA)”

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADOR	METODOLOGIA
<p>Problema General ¿De qué forma la presentación del grano de Kiwicha en forma de Hidrolizado puede ser útil como sustrato fermentable por bacterias ácido lácticas?</p> <p>Problemas Específicos ¿Cuáles son las condiciones básicas extrínseca de un hidrolizado de pseudocereales para el crecimiento de las Bacterias iniciadoras lácticas? ¿De qué manera se puede controlar el crecimiento de bacterias iniciadoras lácticas en sustratos fermentables hidrolizados? ¿Cómo influye la temperatura mesofílica sobre el crecimiento de un cultivo iniciador láctico durante la fermentación del hidrolizado de pseudocereales? ¿De qué forma el modelamiento matemático puede establecer los parámetros cinéticos predictivos de un cultivo iniciador láctico en un hidrolizado de pseudocereales para determinar su utilidad como en la fermentación?</p>	<p>Objetivo General - Determinar los parámetros del crecimiento cinético de iniciadores lácticos compuesto por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> utilizando el hidrolizado de kiwicha como sustrato útil fermentable</p> <p>Objetivo Específico •Determinar la variación de sólidos totales, pH y ácido láctico por el crecimiento de iniciadores lácticos en el hidrolizado de kiwicha. •Determinar los parámetros cinéticos experimentales del cultivo iniciador láctico en el hidrolizado de kiwicha a concentración del 75% a temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C utilizando el modelo primario de Baranyi - Roberts •Determinar la temperatura óptima para la fermentación del hidrolizado de kiwicha mediante el modelo secundario de Arrhenius con relación a la velocidad máxima de crecimiento.</p>	<p>Hipótesis general La determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de iniciadores lácticos permitirá valorar la utilidad de hidrolizado de kiwicha como sustrato fermentable.</p> <p>Hipótesis específicas •La variación de sólidos totales, pH y ácido láctico el hidrolizado de kiwicha. Indicará actividad metabólica óptima de las bacterias iniciadoras lácticas •Las temperaturas mesofílicas y las concentraciones del hidrolizado de Kiwicha influyen en el crecimiento experimental de las bacterias iniciadoras lácticas •La determinación de los parámetros cinéticos experimentales de las bacterias iniciadoras lácticas en el hidrolizado de Kiwicha permite una bondad de ajuste significativo con el modelo primario de Baranyi- Roberts para obtener los parámetros de crecimiento predictivos. •El modelamiento de la Velocidad del crecimiento específico predictivo con la ecuación Arrhenius permitirá adoptar una temperatura óptima para controlar el proceso fermentativo de sustrato amiláceo.</p>	<p>Dependientes Fermentación de la harina Hidrolizada de pseudocereales kiwicha.</p> <p>Independientes Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento iniciadores lácticos mediante el modelo Baranyi-Roberts.</p>	<p>Consumo de sustrato e incremento de biomasa</p> <p>Parámetros del crecimiento</p>	<p>Disminución de sustrato amiláceo, incremento biomasa, producción ácido láctico</p> <p>UFC/ml Variación: $\mu_{max} = \text{Log UFC/g/h}$ Fase lag λ (Horas) $T_g = \text{Horas}$</p>	<p>Cultivo bacteriológico</p> <p>Modelo predictivo del programa DMFit del Combase/</p> <p>. Edgar Zárate Sarapura Responsable del Proyecto</p>