

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería



Análisis de la microbiota y cinética de fermentación de una bebida  
fermentada de Rosa de Jamaica.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por:  
Diego Raúl José Gómez Salazar  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial.

Guatemala,

2021



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ingeniería




Análisis de la microbiota y cinética de fermentación de una bebida  
fermentada de Rosa de Jamaica.

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por:  
Diego Raúl José Gómez Salazar  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial.

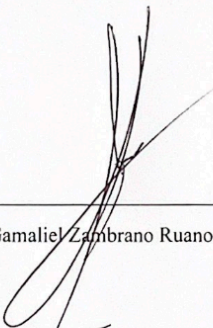
Guatemala,


2021

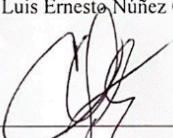
Vo. Bo. :

(f)   
Ing. Luis Ernesto Núñez González

Tribunal Examinador:

(f)   
Ing. Gamaliel Zambrano Ruano

(f)   
Ing. Luis Ernesto Núñez González

(f)   
Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda

Fecha de aprobación: Guatemala 15 de junio de 2021

## **Prefacio**

El presente trabajo se llevó a cabo debido a la necesidad de darle soporte científico y técnico a una bebida artesanal fermentada de Rosa de Jamaica. La investigación tuvo el objetivo principal de demostrar si la bebida fermentada de Rosa de Jamaica cumplía o no con las características para ser identificada como bebida probiótica.

Quiero rendir mi profunda gratitud a Dios, por darme la fortaleza y salud para realizar no solo este proyecto de investigación, sino todo lo que he logrado en mi vida. Agradezco también el sacrificio, esfuerzo y amor incondicional de mis Padres a quienes admiro, respeto y amo con todas mis fuerzas. Agradezco también el amor y apoyo de mis dos hermanos, los cuales me inspiran y motivan a dar lo mejor de mí. Finalmente, agradezco a mis amigos, los cuales hacen de mis días algo más feliz.

Deseo también dar las gracias a la Universidad del Valle de Guatemala por la formación profesional que me ha dado, especialmente al Ingeniero Gamaliel Zambrano, mi director de carrera; quien me apoyó durante los 5 años de estudios. Así también, deseo agradecer al Ingeniero Luis Núñez, por su dedicación y apoyo como asesor de mi trabajo de graduación, y como catedrático de muchos de mis cursos de formación profesional. También agradezco a todos mis catedráticos y auxiliares que brindaron su conocimiento y experiencia a mi educación. Finalmente agradezco el apoyo recibido por la Licenciada Ana Luisa Mendizábal en el análisis de mis muestras en el HPLC.

## Índice

Prefacio .....	V
Lista de cuadros .....	X
Lista de figuras.....	XII
RESUMEN.....	XV
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. JUSTIFICACIÓN .....	2
III. OBJETIVOS .....	3
1. General.....	3
2. Específicos .....	3
IV. MARCO TEÓRICO.....	4
1. Rosa de Jamaica .....	4
1.1. Descripción botánica.....	4
1.1.1. Descripción morfológica.....	4
1.1.2. Descripción de cultivo .....	5
1.2. Usos de la Rosa de Jamaica .....	5
1.2.1. Usos culinarios.....	5
1.2.2. Usos medicinales.....	5
1.2.3. Alimentación animal.....	6
1.3. Fitoquímica. ....	6
1.3.1. Valor nutricional .....	6
1.3.2. Ácidos orgánicos.....	6
1.3.3. Ácido hibiscus.....	6
1.3.4. Flavonoides .....	7
1.3.5. Compuestos volátiles .....	8
1.4. Actividad biológica y farmacológica .....	9
1.4.1. Efecto muscular.....	9
1.4.2. Efecto antibacterial, antifúngico y actividad antiparasitaria.....	9
2. Probióticos .....	9
2.1. Antecedente histórico de los probióticos .....	10
2.2. Uso y actualidad de los probióticos .....	11

2.3.	Principales microorganismos probióticos.....	12
2.3.1.	Cepas con propiedades probióticas del género Lactobacillus.....	12
2.3.1.1.	Beneficios a la salud del consumidor en bacterias del género Lactobacilos .....	13
2.3.2.	Cepas específicas con propiedades probióticas del género Bifidobacterium .....	14
2.3.2.1.	Beneficios a la salud del consumidor en bacterias del género Bifidobacterium.....	14
2.3.3.	Cepas específicas con propiedades probióticas del género Saccharomyces.....	15
2.3.4.	Cepas específicas con propiedades del género Lactococcus .....	16
2.3.5.	Cepas específicas con propiedades probióticas en los géneros Streptococcus y Enterococcus.....	16
2.3.6.	Cepas específicas con propiedades probióticas del género Bacillus.....	17
2.3.7.	Cepas con propiedades probióticas del género Escherichia.....	17
2.4.	Beneficios para la salud de los microorganismos probióticos. ....	18
3.	Alimentos y bebidas probióticas.....	19
4.	Técnicas de biología molecular.....	20
4.1.	Reacción de Polimerasa en cadena .....	21
4.2.	Secuenciación del Genoma .....	22
4.2.1.	Secuenciación Sanger .....	22
5.	Cinética de fermentación microbiana .....	23
5.1.	Fases de crecimiento microbiano .....	24
5.1.1.	Fase de retardo .....	24
5.1.2.	Fase exponencial.....	24
5.1.3.	Fase estacionaria .....	25
5.1.4.	Fase de muerte .....	25
5.2.	Modelos cinéticos .....	25
V.	METODOLOGÍA .....	26
1.	Localización.....	26
2.	Población y muestra.....	26
3.	Materiales y equipo.....	26

3.1	Fermentación de la bebida probiótica de Rosa de Jamaica.....	26
3.1.1	Materiales.....	26
3.1.2	Equipo y cristalería .....	26
3.2	Análisis de microbiología clásica: .....	27
3.2.1	Materiales:.....	27
3.2.2	Equipo y cristalería: .....	27
3.3	Conteo celular de la fermentación: .....	28
3.3.1	Materiales y equipo.....	28
3.4	Determinación de las concentraciones de sustratos y productos: .....	28
3.4.1	Materiales:.....	28
3.4.2	Equipo y cristalería .....	28
3.5	Determinación del modelo cinético: .....	28
3.5.1	Software: .....	28
4.	Procedimiento: .....	28
4.1	Fermentación de la bebida probiótica de Rosa de Jamaica.....	28
4.2	Análisis de microbiología clásica .....	29
4.3	Conteo microbiano utilizando el equipo Muse .....	30
4.4	Determinación de concentraciones de sustratos y productos con HPLC.....	31
	Determinación del modelo cinético .....	31
4.5	.....	31
4.6	Análisis de biología molecular.....	32
VI.	RESULTADOS.....	33
1.	Análisis de microbiología clásica .....	33
2.	Análisis de biología molecular.....	35
3.	Análisis de determinación de la concentración de microorganismos, sustratos y productos en el medio .....	36
4.	Determinación del modelo cinético. ....	42
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	44
1.	Aislamiento y clasificación de microorganismos. ....	44
2.	Análisis de biología molecular.....	50

3.	Fermentación, crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto. ....	52
4.	Modelo cinético de la fermentación.....	55
VIII.	CONCLUSIONES .....	58
IX.	RECOMENDACIONES.....	59
X.	BIBLIOGRAFÍA .....	60
XI.	ANEXOS .....	65
1.	Microbiología clásica.....	65
2.	Análisis de biología molecular.....	77
3.	Determinación de la concentración de sustratos y productos. ....	86
4.	Determinación de la concentración de sustratos y productos usando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución .....	87
5.	Determinación del modelo cinético de la fermentación microbiana de Rosa de Jamaica.....	97
6.	Cálculo de muestra.....	102
7.	Cálculo de porcentaje de error. ....	103

## Lista de cuadros

Cuadro 1. Compuestos principales en extracto con agua de Rosa de Jamaica. ....	8
Cuadro 2: Modelos cinéticos utilizados para describir la velocidad específica de crecimiento microbiano.....	25
Cuadro 3: Resumen del análisis de diversidad microbológica en la bebida fermentada de Rosa Jamaica.....	33
Cuadro 4: Identificación de microorganismos aislados de la bebida fermentada de Rosa de Jamaica.....	34
Cuadro 5: Identificación del microorganismo responsable de la fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica .....	35
Cuadro 6: Parámetros cinéticos ajustados a datos experimentales de concentración de células, sustrato y producto.....	42
Cuadro 7: Identificación de microorganismos con numerales de acuerdo con la morfología, aspecto y tamaño de colonia.....	68
Cuadro 8: Secuencia de nucleótidos en la región ITS (Espaciador transcrito interno) en formato FASTA .....	78
Cuadro 9. Curva de calibración ácido acético.....	87
Cuadro 10. Curva de calibración sacarosa .....	87
Cuadro 11. Curva de calibración glucosa .....	88
Cuadro 12. Curva de calibración fructosa.....	89
Cuadro 13. Curva de calibración etanol.....	89
Cuadro 14: Crecimiento microbiano en el tiempo .....	91
Cuadro 15: Concentración de sacarosa en el tiempo .....	92
Cuadro 16: Concentración de etanol en el tiempo .....	93
Cuadro 17: Concentración de glucosa en el tiempo.....	94
Cuadro 18: Concentración de fructosa en el tiempo .....	95
Cuadro 19: Concentración de ácido acético en el tiempo .....	96
Cuadro 20. Datos experimentales y cálculo de parámetros del modelo de Monod para la fermentación microbiana de la bebida de Rosa de Jamaica.....	97
Cuadro 21. Porcentaje de error de la primera propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de células.....	98

Cuadro 22. Porcentaje de error de la primera propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de sustrato.....	99
Cuadro 23. Porcentaje de error de la primera propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de producto.....	99
Cuadro 24. Porcentaje de error de la segunda propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de celulas.....	100
Cuadro 25. Porcentaje de error de la segunda propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de sustrato.....	101
Cuadro 26. Porcentaje de error de la segunda propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de sustrato.....	101

## Lista de figuras

Figura 1. Ácido cítrico y sus derivados.....	7
Figura 2. Estructura química de las principales antocianinas. ....	7
Figura 3. Conjunto de bacterias del genero <i>Lactobacilos</i> observadas bajo el microscopio. ....	13
Figura 4. Conjunto de bacterias del genero <i>Bifidobacterium</i> observadas bajo el microscopio.....	14
Figura 5. Conjunto de bacterias del genero <i>Saccharomyces</i> observadas bajo el microscopio. ....	15
Figura 6. Conjunto de bacterias del genero <i>Lactococcus</i> observadas bajo el microscopio. ....	16
Figura 7. Productos necesarios para la realización de la PCR. ....	21
Figura 8. Amplificación del fragmento diana del ADN de forma exponencial.....	22
Huertas, 2019 .....	22
Figura 9. Explicación del proceso Sanger (incorporación de didesoxinucleótidos y posterior señal emitida por fluorescencia de los diferentes fragmentos).....	23
Figura 10. Curva de crecimiento microbiano con sus respectivas fases de crecimiento. ...	24
Figura 11: Identificación gráfica del microorganismo responsable de la fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica.....	35
Figura 12: Curva de crecimiento microbiano en relación con el tiempo.....	36
Figura 13: Curva de consumo de sacarosa con relación al tiempo .....	37
Figura 14: Curva de producción de etanol con relación al tiempo .....	38
Figura 15: Curva de consumo de glucosa en relación con el tiempo.....	39
Figura 16: Curva de consumo de fructosa con relación al tiempo.....	40
Figura 17: Curva de producción de ácido acético en relación con el tiempo .....	41
Figura 18. Ajuste de curvas del modelo cinético a los sets de datos experimentales para el crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto utilizando Berkeley-Madonna.....	43
Figura 19. Placas con medio PDA .....	65
Figura 20. Placas con medio MRS.....	65
Figura 21. Reactivos y equipo para inoculación de microorganismos en el medio .....	66

Figura 22. Reactivos de Tinción Gram y azul de Lactofenol .....	66
Figura 23 Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa Petri con medio nutritivo después de 24 horas de incubación a 37 °C.....	67
Figura 24: Tinción de Gram en el microorganismo aislado en medio nutritivo .....	67
Figura 25: Diversidad microbiológica en medio MRS con relación al tiempo de la fermentación.....	68
Figura 26: Diversidad microbiológica en medio PDA con relación al tiempo de la fermentación.....	68
Figura 27: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C .....	69
Figura 28: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C .....	69
Figura 29: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C .....	70
Figura 30: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C .....	70
Figura 31: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C .....	71
Figura 32: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C.....	71
Figura 33: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C.....	72
Figura 34: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C.....	73
Figura 35: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C.....	73
Figura 36: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C.....	74
Figura 37: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 1.....	74
Figura 38: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 2.....	75
Figura 39: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 3.....	75
Figura 40: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 4.....	76
Figura 41: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 5.....	76
Figura 42: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 6.....	77

Figura 43. Preparación de muestras para análisis de biología molecular .....	77
Figura 44. Selección de los iniciadores para la reacción de polimerasa en cadena .....	78
Figura 45: Cromatograma de la secuenciación sanger efectuada en el ADN extraído del microorganismo responsable de la fermentación en la bebida de Rosa de Jamaica. ....	79
Figura 46. Información de la cepa en la NCBI .....	80
Figura 47. Secuencias con alineaciones significativas al resultado obtenido .....	81
Figura 48. Equipo de análisis celular Muse, para la determinación de la concentración celular.....	86
Figura 49. Determinación de la concentración de células obtenida utilizando el equipo MUSE.....	86
Figura 50. Curva de calibración de ácido acético .....	87
Figura 51. Curva de calibración de sacarosa.....	88
Figura 52. Curva de calibración de glucosa.....	88
Figura 53 Curva de calibración de fructosa .....	89
Figura 54. Curva de calibración de etanol .....	90
Figura 55. Cromatograma de determinación de sustratos y productos fermentativos .....	90
Figura 56. Cromatograma de determinación de sustratos y productos fermentativos 2 ....	90
Figura 58. Primera propuesta del modelo cinético de la fermentación de Rosa de Jamaica con datos experimentales y ajuste de parámetros .....	98
Figura 59. Segunda propuesta del modelo cinético de la fermentación de Rosa de Jamaica con datos experimentales y ajuste de parámetros .....	100

## RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser consumidos en concentraciones adecuadas proveen de beneficios para la salud de quien los consume. Por esto el objetivo de esta investigación es determinar si una bebida fermentada de Rosa de Jamaica puede considerarse un alimento probiótico o no. Para esto se llevó a cabo un análisis de microbiología clásica y biología molecular con el fin de identificar a nivel de especie el microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación; y un análisis de fermentación y cinética microbiana.

Se identificó que el microorganismo presente durante todo el periodo de fermentación fue la levadura *Wickerhamomyces anomalus*, la cual no se considera probiótica. Se logró determinar además que la concentración máxima de microorganismos fue menor a la requerida por la Food and Drug Administration (FDA) para considerar el alimento fermentado como un alimento probiótico. Finalmente se logró proponer un modelo cinético que ajustó a el comportamiento de las diferentes variables de la fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica.

# I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son seres vivos que se pueden observar solamente con un microscopio, estos habitan casi en todos los ambientes, y llevan a cabo una infinidad de procesos. Los microorganismos como bacterias, levaduras y virus han sido, por mucho tiempo, asociados con la causa de muchas enfermedades y procesos de descomposición; sin embargo, hoy en día se ha descubierto que la gran mayoría de microorganismos no representan un riesgo para los seres humanos. Es más, se ha descubierto que muchos de estos, al ser consumidos en cantidades adecuadas, pueden ser de beneficio para la salud de quien los consume, a estos microorganismos se les conoce como probióticos, (Specter, 2012).

Dada la capacidad de ciertos microorganismos para aportar beneficios a la salud, hoy en día se producen, formulan y comercializan muchos productos probióticos. Los productos se encuentran principalmente, como alimentos, bebidas y suplementos. Muchas bacterias de diferentes géneros y la levadura *Saccharomyces boulardii* son microorganismos probióticos a los cuales se les ha atribuido promover de beneficios a la salud, tales como: Protección al recubrimiento del intestino, disminución de síntomas gastrointestinales como diarrea y estreñimiento, entre otros, (Ganguly, 2011).

La identificación de microorganismos en alimentos, bebidas y otros medios de cultivo, se da a través de técnicas de microbiología clásica, tales como: Aislamiento en medios de cultivo, tanto en medios nutritivos como específicos; tinción y observación bajo el microscopio, pruebas de motilidad y baterías bioquímicas. Así como técnicas de biología molecular, como lo son: Extracción, purificación y amplificación de ADN, y secuenciación del genoma, (Diz, 2020).

Para poder determinar la concentración de sustratos y productos de una fermentación es necesario llevar a cabo técnicas analíticas tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y conteo de células por medio de equipos analíticos, tales como el equipo de conteo celular Muse. Estas técnicas analíticas permiten determinar el modelo cinético de una fermentación, el cual sirve para calcular la variación de parámetros fermentativos con respecto al tiempo, (Lee, 2009).

## II. JUSTIFICACIÓN

El proceso artesanal de producción de bebidas probióticas en Guatemala generalmente carece de un respaldo técnico y científico que permita asegurar la calidad del producto final. Aún cuando se han establecido los beneficios del consumo de bebidas probióticas para la salud, es de importancia tener un fundamento experimental del proceso fermentativo de las mismas.

Debido a que no se conoce la concentración ni la identidad de los microorganismos presentes en la bebida, tampoco se pueden determinar las concentraciones de los productos fermentativos que se obtienen a partir de la fermentación de los azúcares en ella. Según la administración de alimentos y medicamentos de América (FDA), para que un alimento sea considerado un alimento probiótico este debe de contener por lo general una concentración mayor de entre  $10 \times 10^6$  y  $10 \times 10^8$  UFC/mL o una concentración de entre  $10 \times 10^8$  y  $10 \times 10^{10}$  UFC/dosis de células viables por porción, (Sánchez *et. al*, 2015).

Llevar a cabo un análisis de microbiología clásica y biología molecular permite identificar los microorganismos presentes en un alimento fermentado. Analizar la concentración de sustratos y productos de la fermentación permite proponer un modelo cinético que modele la variación de los parámetros fermentativos en el tiempo. Ambos estudios científicos, junto con los estándares previamente mencionados, permiten determinar si un alimento, bebida o suplemento puede considerarse como un producto probiótico.

### **III. OBJETIVOS**

#### **1. General**

- Identificar, por microbiología clásica y biología molecular, las especies presentes en la microbiota de una bebida fermentada de Rosa de Jamaica para establecer su capacidad probiótica, y proponer un modelo de su cinética de reacción.

#### **2. Específicos**

- Aislar y clasificar usando microbiología clásica, los microorganismos presentes en una bebida probiótica, fermentada de Rosa de Jamaica; para seleccionar los microorganismos y llevar a cabo la secuenciación de genoma.
- Realizar la extracción, purificación y secuenciación de genoma de los microorganismos seleccionados, para identificar a nivel de especie, las bacterias y levaduras de la bebida fermentada y su capacidad probiótica.
- Determinar el cambio de la concentración de microorganismos, sustratos y productos fermentativos en función del tiempo, utilizando técnicas analíticas, para la determinación del modelo cinético.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 1. Rosa de Jamaica

La Rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) es una planta originaria de la India, la cual se utiliza para infusiones o extracciones para bebidas. La planta es una hierba que crece de 2 a 2.5 m de altura. La misma se cosecha en climas cálidos de baja altura de alta precipitación. Las hojas poseen de 3 a 5 lóbulos y de 8 a 15 cm de largo. La planta se considera comestible y útil debido a sus propiedades medicinales. Son ricas en vitaminas, carbohidratos naturales, proteínas, taninos, gomas y otros antioxidantes y minerales. Por cada 100 g de Rosa, posee 49 calorías, 84.5% de agua, 1.99 g de proteína, 0.1 g de grasa, 12.3 g de carbohidratos, 2.3 g de fibra, 1.2 g de cenizas, 1.72 mg de calcio, 57 mg de fósforo, 2.9 mg de hierro, 300 mg de vitamina A y 14 mg de ácido ascórbico (Salazar, *et. al.*, 2012).

#### 1.1.Descripción botánica

El genero *Hibiscus* esta compuesta por más de 300 especies de hierbas, arbustos o arboles (Wang *et. al.*, 2012). La distribución y el origen de esta es incierta, aunque se cree que fue en la India el origen de esta especie. Hoy en día, la Rosa de Jamaica se cultiva en regiones tropicales y subtropicales (Morton, 1987) de las que se incluyen India, China, Malasia, Egipto, México, Guatemala, entre otros. Aunque no se tiene un registro específico de cómo llegó la especie a Guatemala, se cree que fue debido a los esclavos provenientes de Jamaica, que laboraron en el primer ingenio azucarero de Centro América, fundado por los frailes Dominicos en 1569 (Hidalgo *et. al.*, 2009). Existen dos variedades principales del *Hibiscus*: la *Hibiscus altissima wester*, cultivada por su fibra similar al yute y la segunda es la *Hibiscus sabdariffa*. La segunda variedad incluye formas tupidas más cortas. La primera variedad posee cálices comestibles verdes, con rayas rojas; mientras que la segunda posee cálices comestibles de color amarillo verdoso y también producen fibra (Morton, 1987).

##### 1.1.1. Descripción morfológica

La especie de *Hibiscus sabdariffa* es un subarbusto herbáceo, erecto, tupido que puede llegar a medir hasta 2.5 m de altura, con tallos lisos, cilíndricos y rojos. Las hojas poseen un tamaño de 7.5 a 12.5 cm de largo, son de color verde con características rojizas y pecíolos largos o cortos. Las flores que nacen miden hasta 12.5 cm de ancho, son amarillas o beige con un toque Rosa o marrón, y se vuelven rojizas a medida que se marchitan al finalizar el día de cosecha. Con respecto al sabor, el cáliz, los tallos y las hojas son ácidos y poseen un sabor similar a los arándanos (Ross, 2003).

### **1.1.2. Descripción de cultivo**

La especie de *Hibiscus sabdariffa* se puede cultivar en suelos drenados, aunque también puede cultivarse en suelos secos, por lo que puede aguantar sequías. Requiere un crecimiento de 4 a 8 meses con temperaturas de mayores a 20 C, así como también 13 h de luz solar, con una precipitación de entre 130-250 mm mensuales. La alta cantidad de lluvia, así como también la alta humedad de cosecha pueden provocar alteraciones en la calidad de los cálices y reducir el rendimiento. La calidad de la flor está determinada por el stock de semillas, las condiciones de cultivo, el manejo post cosecha y el secado. La mayoría de veces, la planta crece como cultivo complementario y es susceptible a hongos, bacterias e insectos. Una sola planta puede producir 1.5 kg de fruto. Dichos rendimientos pueden ser de 10 t/ha (EcoCrop., 2007).

## **1.2. Usos de la Rosa de Jamaica**

Existen diferentes usos que se le da a la flor de Rosa de Jamaica, de las cuales se incluyen usos culinarios, medicinales y cosméticos debido a sus distintas propiedades.

### **1.2.1. Usos culinarios**

La flor seca de Rosa de Jamaica se utiliza principalmente para la elaboración de bebidas naturales, las cuales, con añadidos como azúcar, generan un fresco tradicional. De igual manera, se utilizan en la preparación de bebidas a bases de hierbas, bebidas calientes, bebidas fermentadas, vino, mermeladas, dulces, helados, chocolates, entre otros. En Guatemala, se utiliza principalmente para la elaboración de un fresco tradicional de la región (Hidalgo *et. al.*, 2009). En otras partes, se utiliza la infusión de Rosa de Jamaica como colorante en la industria textil. En Sudán, las hojas se comen verdes o secas, se cocinan con cebolla, mientras que en Malasia las hojas cocidas se comen como verduras (Ismail, Ikram & Nazri, 2008). Por otra parte, en China como en África Occidental, las semillas se utilizan para la extracción de aceite, así como también como sustituto del café (Morton, 1987).

### **1.2.2. Usos medicinales**

En India, África, México, Guatemala y otros países, se utilizan las infusiones de Rosa de Jamaica debido los efectos diuréticos, coleréticos, febrífugos e hipotensores de la bebida. Esto provoca una disminución de la viscosidad de la sangre y estimula la perístasis intestinal. De igual manera, en Egipto se utiliza dicha infusión para el tratamiento contra problemas cardiovasculares y nerviosas. En la medicina popular china, se utiliza para tratar los trastornos hepáticos y la presión arterial alta (Morton, 1987).

### **1.2.3. Alimentación animal**

Las hojas de la Rosa de Jamaica se pueden utilizar para forraje y fibra para animales. Las semillas se pueden utilizar para alimentar aves de corral y ovejas y el residuo de la extracción de aceite de las semillas se puede utilizar para ganado y pollos (Plotto, 2004).

## **1.3. Fitoquímica**

### **1.3.1. Valor nutricional**

La composición nutricional de la Rosa de Jamaica varía entre variedades, condiciones genéticas, ambientales, ecológicas y de cosecha. Principalmente, la Rosa de Jamaica posee 1.9% de proteína, 0.1% de grasas, 12.3% carbohidratos y 2.3% de fibra. Por otra parte, posee 14 mg/100 g de vitamina C y 57 mg/100 g de hierro (Ismail, Ikram & Nazri, 2008). Por otra parte, las semillas contienen 21.85% de aceite, 27.78% de proteína, 21.25% de carbohidratos, 16.44% de fibra cruda y 6.2% de cenizas. Con respecto a los minerales que posee, el potasio es el que mayor prevalece con 1.329%, luego el sodio con 0.659%, calcio con 0.647% (Nzikou *et al.*, 2011).

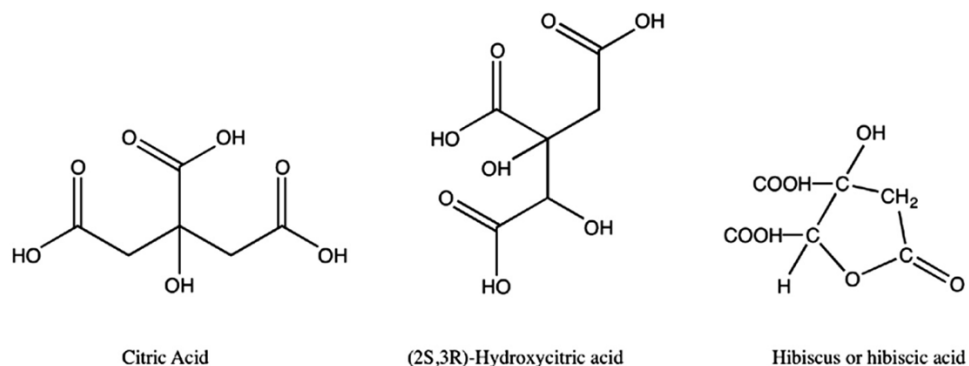
### **1.3.2. Ácidos orgánicos**

Los extractos de Rosa de Jamaica poseen una alta concentración de ácidos orgánicos como ácido cítrico, ácido hidroxícítrico, ácido de hibisco, ácido málico, entre otros. De igual manera al valor nutricional, la concentración de ácidos varía por distintos factores de los que se incluyen la cosecha y el procesamiento. El ácido de hibisco representa del 13 al 24%, el ácido cítrico es de 12 a 20%, ácido málico de 2 a 9%, ácido tartárico 8% y de 0.02% a 0.05% de ácido ascórbico (Eggensperger y Wilker, 1996).

### **1.3.3. Ácido hibiscus**

La Figura 1 es la forma lactona del ácido hidroxícítrico. Se compone del ácido cítrico con un grupo hidroxilo adicional en el segundo carbono y posee dos diastereómeros debido a que posee dos centros quirales en la molécula. El ácido hidroxícítrico, ácido hibiscus y sus derivados son los principales ácidos orgánicos en los extractos de Rosa de Jamaica (Beltran-Debon *et al.*, 2010).

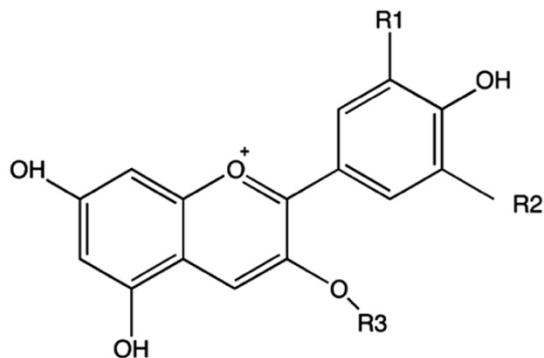
Figura 1. Ácido cítrico y sus derivados.



### 1.3.3. Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de derivados de flavonoides y pigmentos naturales presentes en las flores secas de Rosa de Jamaica. El color de estos compuestos varía con respecto al pH. Una de las primeras antocianinas aisladas en la Rosa de Jamaica fue la hibiscina. A partir de los pigmentos de Rosa de Jamaica, se aislaron tres antocianinas diferentes. Generalmente, el contenido de estas en los extractos varía de 1.7% al 2.5% (Subramanian & Nair, 1972). La Figura 2 representa la estructura química de la antocianina.

Figura 2. Estructura química de las principales antocianinas.



### 1.3.4. Flavonoides

La Rosa de Jamaica posee alto contenido de polifenoles del tipo flavonol y flavonol en forma simple o polimerizada. Se han determinado los principales flavonoides en los extractos, los cuales son hibiscitrina, sabdaritrina, gosipitrina, gositrina, entre otros (McKay, 2009). Otros antioxidantes presentes en la Rosa de Jamaica se encuentran el ácido clorogénico, ácido protocatecuico, ácido pelargonídico, eugenol, entre otros (McKay, 2009).

### 1.3.5. Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles presentes en la Rosa de Jamaica constituyen más de 25 compuestos de los que se incluyen derivados de ácidos grasos como el 2-etilfurano, derivados de azúcar como el 5-metil-2-furaldehído, derivados fenólicos como el eugenol, terpenos como el limoneno y compuestos diversos como el ácido acético, entre otros (Chen, Huang, Ho y Tsai, 1998). El Cuadro 1 muestra una descripción general de los constituyentes presentes en el extracto con agua de Rosa de Jamaica.

**Cuadro 1. Compuestos principales en extracto con agua de Rosa de Jamaica.**

<i>Organic acid</i>	Hydroxycitric acid Hibiscus acid Hibiscus acid glucoside Hibiscus acid 6-methyl ester
<i>Anthocyanins</i>	Delphinidin-3-sambubioside Cyanidin-3-sambubioside
<i>Flavonoids and phenolic acid</i>	Gallic acid Chlorogenic acid isomer I Chlorogenic acid Chlorogenic acid isomer II 5-Hydroxymethylfurfural Methyl gallate 2-O- <i>trans</i> -Caffeoyl-hydroxycitric acid 5-Caffeoylquinic acid Myricetin-3-arabinogalactoside 3-Caffeoylquinic acid Protocatechuic acid Protocatechuic acid glucoside Coumaroylquinic acid Quercetin-3-sambioside Quercetin-3-rutinoside 5-O-Caffeoylshikimic acid Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside) Quercetin-3-glucoside Kaempferol-3-O-rutinoside Feruloyl derivative Methyl(AS in Methylpigallocatechin) Myricetin N-Feruloyltyramide 4-Caffeoylquinic acid Caffeoylquinic acid isomer Kaempferol-3- <i>p</i> -coumarylglucoside Quercetin Caffeic acid Galloyl ester Feruloyl quinic acid derivative Kaempferol-3-glucoside Quercetin derivative Tiliroside

(Da-Costa, 2013)

## **1.4. Actividad biológica y farmacológica**

### **1.4.1. Efecto muscular**

Diferentes estudios se han realizado de manera in-vivo, principalmente con animales. Los primeros estudios demostraron que el extracto alcohólico de Rosa de Jamaica tenía un efecto antiespasmódico al relajar el útero y las puntas del intestino in vitro (Sharaf, 1962). De igual manera se determinó un efecto relajante en el músculo liso aórtico del conejo (Obiefuna, Owolabi, Adegunloye, Obiefuna y Sofola, 1994). Se determinó que los extractos de Rosa de Jamaica inducían el efecto relajante en la aorta torácica aislada de ratas, mediante la estimulación de enzimas. Esto principalmente debido a los polifenoles. (Sarr *et al.*, 2009).

### **1.4.2. Efecto antibacterial, antifúngico y actividad antiparasitaria**

Diferentes compuestos presentes en los extractos de Rosa de Jamaica, como el ácido protocatéquico. Estudios realizados determinaron que el ácido protocatéquico (a una concentración de 5 mg/ml de extracto) inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Liu, Tsao y Yin, 2005). Además, el ácido protocatéquico mostró una mayor actividad antimicrobiana contra estos patógenos en el caldo que en el plasma humano. El extracto de Rosa de Jamaica de igual manera demostró efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans* y especies de *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter fetus*) que contamina carnes como aves, res y cerdo en un rango de concentración de 96 a 152 mg/ml (Yin y Chao, 2008). Por otra parte, el extracto presentó un efecto positivo en la inhibición contra varias cepas bacterianas, como *S. aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marsecensis*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Bacillus cereus* y fluorescencia de *Pseudomonas* (Olaleye, 2007), así como también inhibición efectiva contra el crecimiento de bacterias que deterioran los alimentos como *Salmonella typhimurium*. Finalmente, los extractos de Rosa de Jamaica, a una concentración de 200 mg/l, mostraron efectos antimicrobianos contra tres tipos de bacterias Gram-negativas. El extracto exhibió una mayor actividad contra *Salmonella* seguida de *Shigella* y *Enterobacter* (Nwaiwu, Mshelia y Raufu, 2012).

## **2. Probióticos**

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2001) y la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002), los probióticos se definen como microorganismos vivos

que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Esta definición de probióticos también es adoptada por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) y se utiliza en la mayoría de las publicaciones científicas. Sin embargo, esta definición no es aceptada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) o la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en este momento, ya que insisten en que la declaración de propiedades saludables incorporada en la definición no es medible debido a la hecho de que los mercados comerciales han superado la capacidad de la ciencia para corroborar la evidencia. (Rijkers, 2014)

Como consecuencia, no se han aprobado declaraciones de propiedades saludables fundamentadas para ningún probiótico en los EE. UU. Sin embargo, las declaraciones de propiedades saludables, como el tratamiento y la cura de enfermedades con probióticos, se pueden medir y se pueden probar con un tipo de estudios similar a los que se realizan con los.

Aunque la humanidad conoce desde hace siglos los beneficios de consumir alimentos fermentados; mucho antes de que se descubrieran los microorganismos; el concepto de administrar microorganismos para conferir un beneficio positivo para la salud comenzó hace más de un siglo cuando Metchnikoff teorizó que la salud podría mejorarse, y también la senilidad podría retrasarse, manipulando el microbioma intestinal con bacterias amigables para el huésped que se encuentran en el yogur (Reid, 2012).

## **2.1. Antecedente histórico de los probióticos**

Está científicamente establecido que determinadas especies de microorganismos nos enferman e incluso pueden llegar a matarnos. Entre los microorganismos más letales a lo largo de la historia, ya sea por el número global de muertes, la tasa de mortalidad o la producción de toxinas letales, generalmente incluimos *Yersinia pestis*, virus de la influenza, virus del SIDA / VIH, *Clostridium tetani*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio cholerae*, solo por nombrar un pocos. Recientemente; muchas bacterias resistentes a múltiples fármacos han causado importantes infecciones asociadas a la atención de la salud y serotipos peligrosos han causado intoxicaciones alimentarias emergentes graves debido a la producción de enterotoxinas. Algunas de estas bacterias de importancia médica incluyen: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *enterococos* resistentes a la vancomicina (VRE), *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos y *Escherichia coli enterohemorrágica* (EHEC) (Gruber, 2013).

Por lo tanto; a lo largo de la historia de la microbiología, la mayoría de los estudios en humanos se han centrado en los organismos causantes de enfermedades que se encuentran en las personas; mientras que pocos estudios han examinado los beneficios de las bacterias residentes. Como se señaló en varias revisiones, la flora endógena del cuerpo humano es poco conocida. Sin embargo, estamos rodeados de un importante sistema biológico de microorganismos que viven en o sobre el cuerpo humano y son beneficiosos. Este

sistema biológico es el microbioma humano. Se sabe desde hace algún tiempo que el cuerpo humano está habitado por al menos 10 veces más bacterias que el número de células humanas en el cuerpo, y que la mayoría de esas bacterias se encuentran en el tracto gastrointestinal humano. La composición de la microbiota intestinal varía durante la infancia hasta que el individuo alcanza la edad adulta. La relación entre el huésped y la microbiota intestinal es simbiótica. La microbiota intestinal principalmente comensal contribuye a mejorar la resistencia contra las infecciones, la diferenciación del sistema inmunológico del huésped, la síntesis de ciertos nutrientes como las vitaminas, los ácidos grasos de cadena corta y otras moléculas de baja masa molecular. Sin embargo, se sabe poco de forma sistemática sobre el conjunto de pruebas para evaluar el papel de la microflora autóctona intestinal y las consecuencias de los desequilibrios microecológicos, así como las consecuencias metabólicas que pueden afectar la progresión de la enfermedad metabólica (Fijan, 2012).

Después del exitoso proyecto del genoma humano que mapeó todo el genoma humano, el Consorcio Internacional sobre el Microbioma ha lanzado proyectos similares de mapeo del microbioma humano con dos brazos principales: el proyecto NIH Human microbiome y el EU FP 7 MetaHit Project. Una observación importante es que, si bien nuestra salud está ciertamente influenciada por genes, también puede estar influenciada de manera aún más poderosa por nuestro microbioma. Aunque ya se han realizado estudios de microbiota humana, los proyectos que investigan las percepciones de los pacientes de los probióticos de bioingeniería y analizan los marcos regulatorios existentes para la regulación federal de los probióticos son de interés para la salud pública y, por lo tanto, están financiados, (Specter, 2012).

## **2.2. Uso y actualidad de los probióticos**

Durante las últimas dos décadas ha habido un creciente interés en la ciencia básica y clínica de los probióticos, lo que ha dado lugar a más de 6000 publicaciones en la literatura biomédica, con más del 60% publicado en los últimos 5 años, algunas en las revistas científicas de mayor rango. Los tipos más comunes de microorganismos utilizados como probióticos son las bacterias del ácido láctico y las bifidobacterias, aunque también se utilizan otras bacterias y determinadas levaduras. Es importante enfatizar que los efectos biológicos de los probióticos son específicos de la cepa y que el éxito o fracaso de una cepa no se puede extrapolar a otra cepa. Por lo tanto, la identificación adecuada de la cepa utilizando nuevas tecnologías moleculares y de base es imperativa [18]. La identificación de especies se puede realizar mediante análisis de la secuencia del gen del ARNr 16S y técnicas de hibridación ADN-ADN. La identificación de cepas se puede realizar además mediante varios métodos moleculares reproducibles o utilizando rasgos fenotípicos únicos. Ejemplos de métodos moleculares son: electroforesis en gel de campo pulsado y ADN polimórfico amplificado aleatoriamente. Los rasgos fenotípicos para la identificación de cepas incluyen: determinación de la presencia de elementos genéticos extracromosómicos, fermentación de una variedad de azúcares y detección de productos finales de fermentación obtenidos de la utilización de glucosa (Rijkers, 2014)

Otro aspecto importante que mencionar al afirmar los beneficios para la salud de los probióticos es que un efecto beneficioso solo puede demostrarse mediante estudios *in vivo*. Aunque los estudios *in vitro* o modelos animales no pueden probar un efecto probiótico, pueden usarse para caracterizar un posible mecanismo de acción probiótica, determinar la seguridad de microorganismos probióticos o transmitir otros conocimientos sobre cepas probióticas, (Tulumoglu, 2013). Por lo tanto, los estudios *in vitro* proporcionan el primer paso en la evaluación de los probióticos para uso alimentario y deben ir seguidos de ensayos en humanos, doble ciego, aleatorizados y controlados con placebo. Se recomiendan estudios *in vitro* específicos de diana apropiados que se correlacionen con *in vivo*. Por ejemplo, se demostró que la resistencia a las sales biliares *in vitro* se correlaciona con la supervivencia gástrica *in vivo*. El conocimiento de las cepas probióticas es, por tanto, el primer paso realizado a través de estudios *in vitro*. Las propiedades más importantes de las cepas para ser consideradas incluso para uso probiótico incluyen: resistencia a la acidez gástrica, resistencia a los ácidos biliares, adherencia al moco y células epiteliales humanas y líneas celulares, actividad antimicrobiana contra bacterias u hongos potencialmente patógenos, capacidad para reducir patógenos adhesión a superficies, actividad hidrolasa de sales biliares, mejora la viabilidad de los probióticos, (Ganguly, 2011).

## **2.3.Principales microorganismos probióticos.**

### **2.3.1. Cepas con propiedades probióticas del género *Lactobacillus***

El género *Lactobacillus* incluye varias bacterias Gram positivas anaerobias facultativas o microaerofílicas en forma de bastoncillos. Son una parte importante del grupo de bacterias del ácido láctico (LAB) (incluidas las especies *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*) que pueden convertir azúcares hexosa en ácido láctico produciendo así un ambiente ácido que inhibe el crecimiento de varias especies. especies de bacterias nocivas, (Makarova, 2006). En los seres humanos, los lactobacilos normalmente están presentes en la vagina, el tracto gastrointestinal, (Walter, 2008) y son, junto con *Bifidobacterium*, una de las primeras bacterias en colonizar el intestino del lactante después del parto (Walker, 2013). Se han publicado las secuencias del genoma completo de los siguientes *Lactobacilli* comensales: *Lactobacillus plantarum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. sakei*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*.

**Figura 3. Conjunto de bacterias del genero *Lactobacilos* observadas bajo el microscopio.**



Estrada *et. al.*, 2017.

Algunos lactobacilos se utilizan para la producción de yogur, queso, chucrut, encurtidos, masa madre, vino y otros productos fermentados (Siragusa, 2013). En todos los casos, los azúcares se metabolizan en ácido láctico; creando así un entorno hostil para los microorganismos que estropean y permitiendo la conservación de los alimentos.

Se ha encontrado que los bebés con alergias alimentarias exhiben un desequilibrio entre las bacterias beneficiosas y potencialmente dañinas, es decir, disminución de las especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Enterococcus* y aumento de las especies de coliformes, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium*; lo que sugiere que los habitantes microbianos del cuerpo humano pueden desempeñar un papel patógeno o protector en las alergias. Con base en estos datos, se han llevado a cabo en niños muchos ensayos clínicos que abordan el uso de probióticos en el contexto de trastornos alérgicos. Sin embargo, actualmente, no se puede sacar ningún elemento concluyente (Compare, 2013).

#### **2.3.1.1. Beneficios a la salud del consumidor en bacterias del género *Lactobacilos***

Los estudios han demostrado que determinadas cepas de Lactobacilli son eficaces para prevenir la diarrea asociada a antibióticos (Hempel, 2012). Las especies de lactobacilos se seleccionan comúnmente como probióticos ya que expresan muchas propiedades cruciales como: alta tolerancia al ácido y la bilis, capacidad de adherirse a las superficies intestinales, resistir pH bajo, jugo gástrico, inhibir especies potencialmente patógenas (actividad antimicrobiana), resistir antibióticos, producir exopolisacáridos y eliminación del colesterol (Tulumuglu, 2013). *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 incluso ha sido eficaz para reducir el daño pulmonar asociado a virus mediante el control de las respuestas inmuno-coagulativas y la eliminación de virus respiratorios (Zelaya, 2014). En un metanálisis publicado (Johntson, 2013) se ha demostrado que, aunque las cepas probióticas de Lactobacillus eran seguras y eficaces para prevenir las

infecciones recurrentes del tracto urinario en mujeres adultas, los autores concluyeron que se deberían realizar más ensayos clínicos aleatorizados para lograr una mayor recomendación definitiva.

### 2.3.2. Cepas específicas con propiedades probióticas del género *Bifidobacterium*

El género *Bifidobacterium* incluye varias bacterias anaerobias Gram positivas inmóviles. Son habitantes endosimbóticos del tracto gastrointestinal y la vagina de los mamíferos, incluidos los humanos (Chen, 2007). Las cepas del género *Bifidobacterium* también se utilizan frecuentemente como bacterias probióticas ya que son conocidas por su variedad de mecanismos de resistencia a las sales biliares, lo cual es importante ya que los efectos beneficiosos de las bacterias probióticas deben generarse en presencia de este fluido biológico.

**Figura 4. Conjunto de bacterias del genero *Bifidobacterium* observadas bajo el microscopio**



Guevara *et. al.*, 2017.

Incluso se ha demostrado que, aunque la tolerancia a la bilis depende de la cepa, tanto las cepas bifidobacterias sensibles a la bilis de tipo salvaje como las cepas de *Lactobacilli* pueden adaptarse progresivamente a la presencia de sales biliares subcultivando y aumentando gradualmente la concentración de bilis. Varias cepas de bifidobacterias se consideran probióticos importantes que incluyen: *Bifidobacterium infantis*, *B. adolescentis*, *B. animalis subsp animalis*, *B. animalis subsp lactis*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. breve*. Las empresas suelen utilizar nombres comerciales para algunas de estas bifidobacterias inventando nombres comerciales que suenan científicamente.

#### 2.3.2.1. Beneficios a la salud del consumidor en bacterias del género *Bifidobacterium*

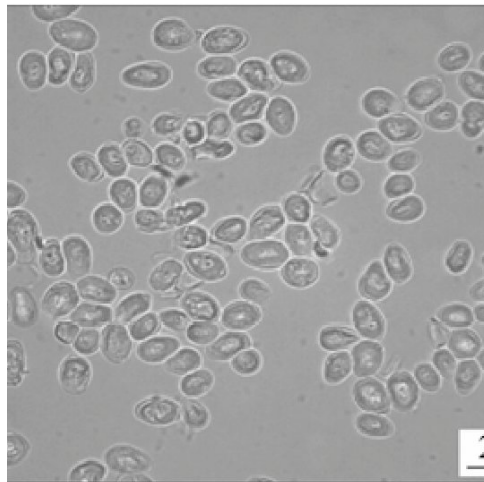
Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que las especies de *Bifidobacterium* junto con otros probióticos tratan el estreñimiento (Ruiz, 2013), la diarrea del viajero (McFarland, 2007), la diarrea asociada

a antibióticos (Hempel, 2012), manteniendo la remisión de la actividad de la enfermedad de inflamación intestinal y colitis ulceRosa moderada (Dylag, 2014), prevención y tratamiento de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos (Di Gioia, 2014), reducción de la diarrea inducida por radiación, reducción del desarrollo de riesgo de enfermedad por eccema, alergias alimentarias, capacidad para reducir el colesterol.

### 2.3.3. Cepas específicas con propiedades probióticas del género *Saccharomyces*

El género *Saccharomyces* incluye varias levaduras como: *Saccharomyces cerevisiae* (utilizada para hacer vino, pan, cerveza), *Saccharomyces bayanus* (utilizada para hacer vino) y *Saccharomyces boulardii* utilizada en medicina como probiótico. Las levaduras *Saccharomyces* también forman matrices simbióticas con bacterias para formar kéfir ya veces son un componente de la kombucha (Marsh, 2014).

**Figura 5. Conjunto de bacterias del genero *Saccharomyces* observadas bajo el microscopio.**



Hilhor *et al.*, 2019.

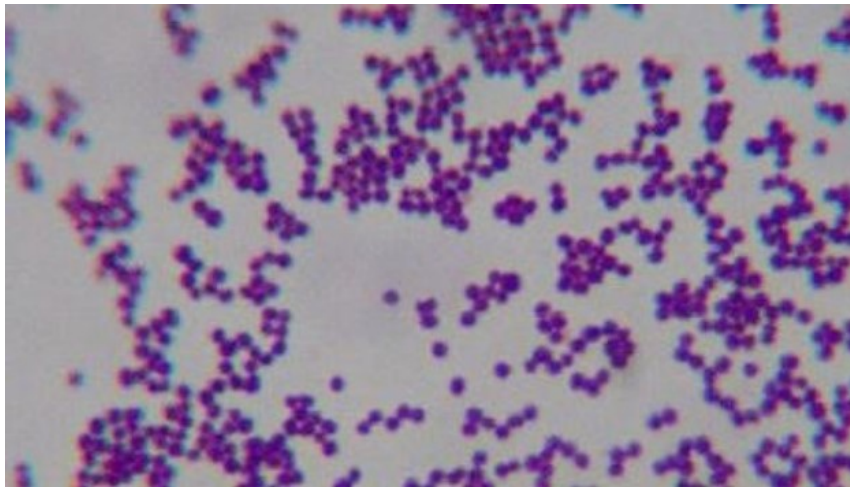
*S. boulardii* se comercializa a menudo como probiótico en forma liofilizada para tratar la diarrea, manteniendo una excelente reputación de seguridad. La mayoría de los informes muestran un beneficio clínico de *S. boulardii* al disminuir la duración de la diarrea independientemente de la causa y, por lo tanto, reducir la estancia hospitalaria, lo que resulta en beneficios sociales y económicos (Szajewska, 2005). La administración de *S. boulardii* ha mostrado efectos positivos para los pacientes con síndrome del intestino irritable (Choi, 2011), previniendo y tratando las recaídas de la enfermedad inflamatoria intestinal y para el tratamiento de los síntomas moderados de la colitis ulceRosa. La colitis pseudomembranosa recurrente causada por *Clostridium difficile* también puede reducirse significativamente mediante la administración de dosis diarias de *S. boulardii* junto con antibióticos estándar (Fitzpatrick, 2013). En la revisión mencionada

anteriormente sobre la seguridad de los probióticos durante el embarazo no se notificaron malformaciones. Por otro lado, no debe descuidarse que en individuos inmunodeprimidos u otros pacientes, *S. boulardii* puede causar fungemia o infecciones localizadas (Hennequin, 2000)

#### 2.3.4. Cepas específicas con propiedades del género *Lactococcus*

*Lactococcus* es un género de bacterias Gram positivas del ácido láctico que se utilizan comúnmente en la industria láctea para fabricar productos fermentados. Son importantes para prevenir el crecimiento de bacterias de descomposición en los productos lácteos debido a la acidificación. A veces también se recomiendan como probióticos.

**Figura 6. Conjunto de bacterias del genero *Lactococcus* observadas bajo el microscopio.**



Stoyanova, et al., 2016.

Ciertas cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis* tiene propiedades probióticas como la adhesión a las células epiteliales vaginales y la producción de nisina (*Lactococcus lactis subsp. lactis* CV56) (Yang, 2013) y también se utilizan para tratar la diarrea asociada a antibióticos en combinación con otros probióticos.

#### 2.3.5. Cepas específicas con propiedades probióticas en los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*

Los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* también forman parte de las bacterias del ácido láctico y contienen varias cepas asociadas con infecciones graves asociadas al cuidado de la salud como: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (Hadj-Sfaxi, 2011) Sin embargo, otras cepas forman parte del microbioma humano comensal de la boca, la piel y el intestino, como *Enterococcus faecium* PC4.1 y otras. Algunas cepas tienen propiedades probióticas: como *Enterococcus durans* y *Streptococcus thermophilus* (Pieniz, 2013) la cual también utilizadas para la producción de yogur junto con *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*.

Aunque *Enterococcus faecium* tiene una larga historia de uso de probióticos, especialmente para prevenir la diarrea asociada a antibióticos, ciertas cepas son patógenos oportunistas que presentan un reservorio potencial de genes de virulencia y resistencia a los antibióticos (estudio en animales) (Dirienzo, 2014) y, por lo tanto, generalmente no lo son tratados como seguros (GRAS) para los seres humanos, pero representan importantes probióticos para los animales.

### **2.3.6. Cepas específicas con propiedades probióticas del género *Bacillus***

El género *Bacillus* incluye miembros aeróbicos o aeróbicos facultativos formadores de esporas Gram positivas con propiedades probióticas reivindicadas que incluyen: *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. cereus*. *Bacillus coagulans*, junto con otros microorganismos, ha demostrado ser más eficaz para prevenir o tratar la diarrea asociada a antibióticos.

Las esporas de *Bacillus subtilis* se han considerado probióticos para el consumo animal y se han propuesto para el tratamiento de la diarrea y la erradicación de *H. pylori* en humanos. Sin embargo, un informe de una septicemia recurrente en un paciente inmunodeprimido debido al tratamiento con esporas de la cepa probiótica *B. subtilis* y cuatro casos de bacteriemia nosocomial causada por la absorción de una preparación oral que contiene esporas de *B. subtilis* han mostrado el alto riesgo de utilizar esporas de *Bacillus subtilis* como probióticos en pacientes inmunodeprimidos, y que la ingestión es segura solo para los seres humanos en condiciones normales del huésped, (Hosoi, 2003). *B. cereus* NVH 75/95 también ha demostrado ser un probiótico eficaz para los animales [80]. Algunas cepas de *B. cereus* son letales para los humanos y muy tóxicas, mientras que otras cepas tienen propiedades probióticas.

Otro informe destacó la importancia de confirmar las identidades de las cepas evitando así vínculos casuales entre microorganismos probióticos y cepas aisladas de huéspedes inmunodeprimidos. Este informe también demostró que la colangitis por *Bacillus* en un hospital francés no fue causada por un probiótico, (Spinoza, 2000).

### **2.3.7. Cepas con propiedades probióticas del género *Escherichia***

Aunque el género *Escherichia*, que pertenece a la familia Gram negativa *Enterobacteriaceae*, es principalmente conocido por sus serotipos severamente virulentos (p. Ej., *E. coli* O157: H7), *Escherichia coli* es un habitante muy común del intestino grueso e incluso una cepa probiótica es conocida: *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). Como se mencionó anteriormente, *Escherichia coli* Nissle 1917, junto con otros probióticos, ha demostrado su eficacia para tratar el estreñimiento y la enfermedad inflamatoria intestinal. Esta cepa también podría aliviar los trastornos gastrointestinales, la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn incluso el cáncer de colon; sin embargo, se necesitan más investigaciones (Behnsen, 2013).

#### **2.4. Beneficios para la salud de los microorganismos probióticos.**

Muchas publicaciones que utilizan ensayos bien diseñados y realizados corroboran los beneficios para la salud de cepas específicas de probióticos en la reducción del riesgo y el manejo de una variedad de enfermedades y afecciones. Algunas de las declaraciones de propiedades saludables documentadas de los probióticos propuestas por sus autores incluyen: estimulación de varios componentes del sistema inmunológico, respuesta inmune intestinal y homeostasis intestinal; prevención y tratamiento de la diarrea, mejora de las propiedades fecales y de la microbiota, tratamiento del síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal y estreñimiento; prevención y tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en adultos y niños; alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa y otras alergias alimentarias; prevención de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros; disminución del nivel de colesterol plasmático; mejora de los regímenes de erradicación de *Helicobacter pylori*; efectos terapéuticos al apoyar la respuesta inmunitaria de niños y adultos infectados por el VIH, actividad antiproliferativa en las células tumorales; reducción del daño pulmonar asociado a virus mediante el control de las respuestas inmunocoagulativas y la eliminación de virus respiratorios; propiedades inmunoestimuladoras de moléculas de baja masa molecular producidas por bacterias probióticas (Kmonickova, 2012).

Aunque los probióticos incluso se han propuesto como tratamiento para el eccema, los ensayos controlados aleatorios hasta la fecha no tienen pruebas suficientes para recomendar los probióticos como prevención primaria. Es importante agregar que se debe hacer mucho más para identificar mecanismos de acción científicamente probados con estudios de seguridad preclínicos traslacionales, así como con ensayos clínicos rigurosos. Para probar una declaración de propiedades saludables, el tamaño de la muestra de los ensayos debe ser suficiente, se debe permitir la heterogeneidad de los diseños de los estudios (población objetivo) y se debe realizar una identificación precisa de las cepas, (Elazab, 2013).

Además, varios estudios en animales han observado efectos positivos de la administración de probióticos que pueden tener un efecto positivo consecuente en la salud pública de los seres humanos al reducir el consumo de antibióticos de los animales utilizados en la producción de alimentos. En consecuencia, esto reducirá la presencia de medicamentos y organismos multirresistentes en el medio ambiente (incluido el

agua potable). Los estudios en animales también son la base para los ensayos en humanos in vivo que dan como resultado conocimientos complejos. Sin embargo, se debe tener precaución, ya que el uso exitoso de probióticos en estudios con animales no significa necesariamente que protocolos similares sean exitosos para ensayos en humanos, especialmente para pacientes. Tal fue el caso del estudio sobre el uso de probióticos en pacientes con pancreatitis aguda grave, donde se observó una mortalidad significativamente mayor en el grupo de probióticos que en el grupo de placebo, aunque estos resultados fueron inesperados a la luz de los resultados de estudios con animales. Sin embargo, este caso no es representativo ya que normalmente no se administraría un probiótico a esta categoría de pacientes con insuficiencia multiorgánica. Más tarde se postuló que un error en el tratamiento, que condujo a la cascada adversa de eventos que causaron insuficiencia orgánica y finalmente la muerte, se debió quizás a la alta incidencia de isquemia intestinal en el grupo de tratamiento (McClave, 2009).

### **3. Alimentos y bebidas probióticas**

Los probióticos son microorganismos vivos que, al ingerirlos en cantidades moderadas, pueden proporcionar efectos benéficos para la salud del consumidor, así como también agregan un valor nutricional al alimento. La mayoría de estos microorganismos se conocen como lactobacilos y bifidobacterias que se encuentran principalmente en los productos fermentados (Gilliland, Morelli, & Reid, 2002).

Las características que debe las bacterias para considerarlas probióticas son:

- No deben de producir infecciones en ningún órgano o sistema.
- Deber ser toleradas por el sistema inmunitario local
- Deben resistir la acción del ácido del estómago y de las sales biliares para llegar vivas al intestino.
- Capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal
- Capacidad de colonizar un segmento intestinal
- Se sinérgicas con la microflora endógena normal
- Capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio
- Capacidad de potenciar el sistema inmunitario del huésped.

(Saez, 2008)

La calidad del producto probiótico depende del proceso de fabricación de este. Los elementos importantes para la determinación de la calidad probiótica incluyen el mantenimiento de la viabilidad (expresado por las unidades formadoras de colonias, UFC) hasta el final de la vida útil del producto, y el uso de la nomenclatura actual para identificar el género, la especie y la cepa de todos organismos incluidos en el producto (Gilliland, Morelli, & Reid, 2002).

La dosis de probióticos necesaria varía dependiendo de la cepa y el producto elaborado. Algunos productos probióticos en el mercado aportan entre 1-10 mil millones de UFC/dosis. Por otra parte, algunos productos han demostrado efectividad a bajo consumo de estos. Debido a la variabilidad de las funciones dependiendo de la cepa utilizada, no es posible establecer una dosis general necesaria de probióticos, por lo que es recomendable un estudio que demuestre un beneficio para la salud (Gilliland, Morelli, & Reid, 2002).

Actualmente, se utilizan probióticos para aplicaciones clínicas como también para la fortificación del valor nutricional de los alimentos, teniendo esto un mejor costo-efectividad. La fortificación es la adición de uno o más nutrientes esenciales a un alimento, con el propósito de corregir una deficiencia presentada en una población. Entre las aplicaciones clínicas para las cuales se utilizan los probióticos, se encuentran: prevención del cáncer colorrectal, tratamiento y prevención de la diarrea, tratamiento de los efectos del *Helicobacter pylori*, prevención y tratamiento de la encefalopatía hepática, prevención de la enfermedad intestinal inflamatoria, tratamiento del síndrome de intestino irritable, cólicos, entre otros (Hernandez, 2005).

Para la elaboración de las bebidas probióticas de Rosa de Jamaica se empieza con la preparación del medio de cultivo. El medio se produce al hervir la flor de Rosa de Jamaica en agua caliente a cierto tiempo agregándole cierta cantidad de azúcar. Luego de cierto tiempo se deja enfriar y se procede a agregarle el cultivo madre específico para la Rosa de Jamaica. Finalmente, la mezcla se envasa y se deja a temperatura ambiente hasta identificar que la bebida empezó el proceso fermentativo al observar pequeñas burbujas de gas dentro de envase.

#### **4. Técnicas de biología molecular**

La microbiología ha sido durante muchos años una disciplina muy manual, basada en cultivos, realizando pruebas bioquímicas u observando características físicas y de tinción. La identificación de microorganismos ha cambiado drásticamente en los últimos años debido a los avances en las técnicas de identificación basadas en la biología molecular. Entre las técnicas de biología molecular, existen muchas variantes para amplificar, detectar y secuenciar ácidos nucleicos (ADN o ARN en base a sospecha clínica). La técnica básica es la reacción en cadena de la polimerasa y en ella se han desarrollado diferentes modificaciones para mejorar el proceso de diagnóstico e interpretación, incluyendo PCR en tiempo real o PCR cuantitativa, RT-PCR, microarrays y secuenciación.

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos y para detectar, e identificar tanto microorganismos, como diferentes genotipos dentro de una misma especie y genes de resistencia al tratamiento farmacológico. Todas estas técnicas necesitan un paso previo de extracción de ADN o ARN. Una vez extraído debe purificarse de forma adecuada para evitar la presencia en la muestra de inhibidores o sustancias que contaminen y que impidan la correcta realización de la técnica posterior. La extracción del

ADN es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular. Se suelen utilizar kits comercializados que incluyen el protocolo específico para la extracción<sup>8</sup>. Los métodos de extracción de ADN se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los demás restos celulares. Pueden ser de diferentes tipos: rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica), por tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles) o por digestión enzimática (proteínasa K) (Gómez, 2016)

#### 4.1.Reacción de Polimerasa en cadena

La técnica de la PCR consiste en la amplificación de una región específica de ADN utilizando unos primers o cebadores (secuencias de ADN que delimitan la zona de amplificación, que tienen una longitud de 15-30 nucleótidos y son complementarios a la región del ADN que se quiere amplificar). Se basa en la acción de diferentes enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, que incorpora los nucleótidos en la síntesis de nuevas cadenas de ADN (amplificación), (Huertas, 2019)

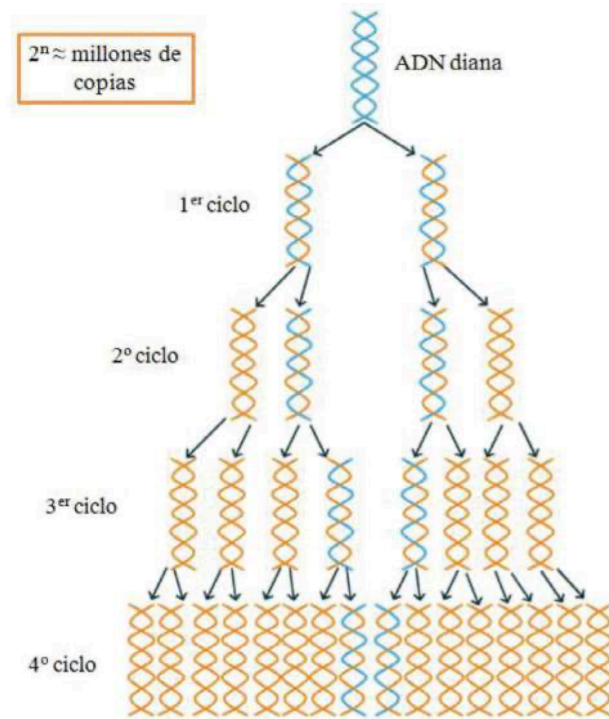
**Figura 7. Productos necesarios para la realización de la PCR.**



Huertas, 2019.

En esta técnica se reproduce lo que tiene lugar en el interior de la célula. La muestra de ADN se añade en un tubo eppendorf junto con los primers, los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), una ADN polimerasa termoestable y un cofactor de esta enzima (normalmente magnesio). Una vez introducidos todos los reactivos necesarios para el desarrollo de la técnica, se someterán a una serie de ciclos (25-40 ciclos), con cambios de temperatura característicos y que permitirán amplificar la región concreta del ADN de la muestra (Huertas, 2019)

**Figura 8. Amplificación del fragmento diana del ADN de forma exponencial.**



Huertas, 2019

## 4.2. Secuenciación del Genoma

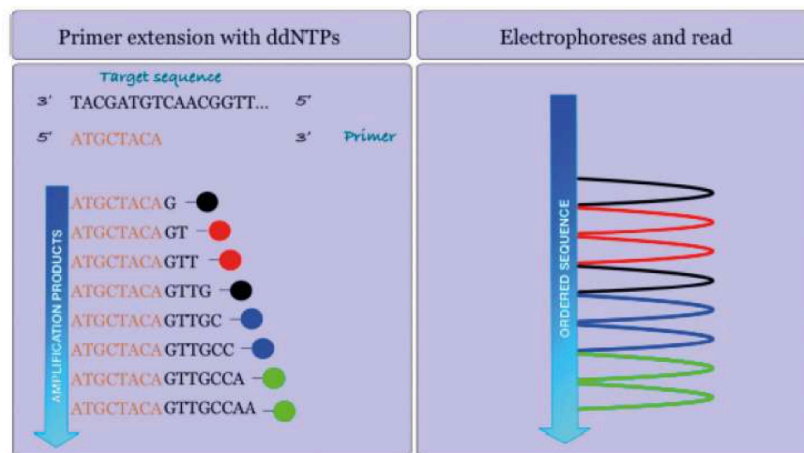
La secuenciación del genoma consiste en determinar la secuencia completa de ADN (orden de las bases Adenina, Citosina, Guanina y Timina) en el genoma. La secuenciación es fundamental para determinar los aminoácidos que codifican un gen en concreto, para el diagnóstico de enfermedades y la detección de mutaciones y resistencias a tratamientos farmacológicos. Estos métodos de secuenciación se basan en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que sintetiza ADN a partir de otro fragmento de ADN produciendo su hebra complementaria, (Angarita, 2017).

### 4.2.1. Secuenciación Sanger

Fue uno de los primeros métodos desarrollados para secuenciar. Se pueden obtener secuencias de hasta 500 pares de bases aproximadamente. Se examinan genes específicos o incluso regiones concretas de un gen. La secuenciación Sanger aporta alta precisión y baja probabilidad de falsos negativos, pero es un método laborioso, (Angarita, 2017).

Se basa en el empleo de didesoxinucleótidos que están marcados por una molécula fluorescente. La ADN polimerasa irá añadiendo de forma inespecífica didesoxinucleótidos o desoxinucleótidos e irá alargando los fragmentos. Cada vez que se añade un didesoxinucleótidos la reacción se detiene y se emite una señal fluorescente, que será diferente en función del nucleótido que se haya incorporado. Tras múltiples ciclos de amplificación, se obtendrán gran cantidad de fragmentos con diferente numero de nucleótidos, según se hayan ido incorporando a la reacción. Posteriormente se lleva a cabo una electroforesis capilar y se detectarán las diferentes señales que se producen por la molécula fluorescente. Con esto se obtiene la secuencia final del fragmento, (Angarita, 2017).

**Figura 9. Explicación del proceso Sanger (incorporación de didesoxinucleótidos y posterior señal emitida por fluorescencia de los diferentes fragmentos).**



Angarita, 2019.

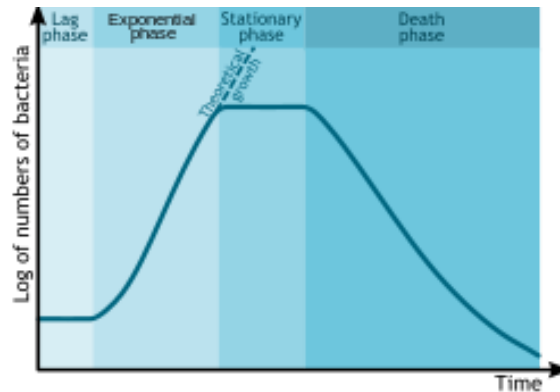
## 5. Cinética de fermentación microbiana

El **crecimiento** microbiano es la proliferación de microorganismos en dos células hijas, en un proceso llamado fisión binaria. Siempre que no ocurra ningún evento, las células hijas resultantes son genéticamente idénticas a la célula original. Por tanto, se produce el crecimiento microbiano. Ambas células hijas de la división no necesariamente sobreviven. Sin embargo, si el número que sobrevive excede la unidad en promedio, la población bacteriana experimenta un crecimiento exponencial.

## 5.1. Fases de crecimiento microbiano

En estudios de microbiología, el crecimiento de bacterias y otros microorganismos, como protozoos, microalgas o levaduras, en cultivo discontinuo se puede modelar con cuatro fases diferentes: fase de retardo, fase logarítmica o fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Figura 10. Curva de crecimiento microbiano con sus respectivas fases de crecimiento.



### 5.1.1. Fase de retardo

Durante la fase de retraso, las bacterias se adaptan a las condiciones de crecimiento. Es el período en el que las bacterias individuales están madurando y aún no pueden dividirse. Durante la fase de retraso del ciclo de crecimiento bacteriano, se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas. Durante la fase de retardo, las células cambian muy poco porque las células no se reproducen inmediatamente en un nuevo medio. Este período de poca o ninguna división celular se llama fase de retraso y puede durar de 1 hora a varios días. Durante esta fase, las células no están inactivas (Christine, 2010).

### 5.1.2. Fase exponencial

Es un período caracterizado por la duplicación de células. El número de nuevas bacterias que aparecen por unidad de tiempo es proporcional a la población actual. Si el crecimiento no está limitado, la duplicación continuará a una tasa constante, por lo que tanto el número de células como la tasa de crecimiento de la población se duplicarán con cada período de tiempo consecutivo. Para este tipo de crecimiento exponencial, trazar el logaritmo natural del número de células frente al tiempo produce una línea recta. La pendiente de esta línea es la tasa de crecimiento específica del organismo, que es una medida del número de divisiones por célula por unidad de tiempo. La tasa real de este crecimiento depende de las condiciones de crecimiento, que afectan la frecuencia de los eventos de división celular y la probabilidad de que ambas células hijas sobrevivan. En condiciones controladas, las cianobacterias pueden duplicar su población cuatro veces al día

y luego triplicar su población. Sin embargo, el crecimiento exponencial no puede continuar indefinidamente porque el medio pronto se agota de nutrientes y se enriquece con desechos, (Zwietering, 1990).

### 5.1.3. Fase estacionaria

La fase estacionaria se debe a menudo a un factor limitante del crecimiento, como el agotamiento de un nutriente esencial o la formación de un producto inhibitor, como un ácido orgánico. La fase estacionaria resulta de una situación en la que la tasa de crecimiento y la tasa de mortalidad son iguales. El número de nuevas células creadas está limitado por el factor de crecimiento y, como resultado, la tasa de crecimiento celular coincide con la tasa de muerte celular. El resultado es una parte lineal horizontal con pendiente igual a cero de la curva durante la fase estacionaria, (Novick, 1955).

### 5.1.4. Fase de muerte

En la fase de muerte, las bacterias mueren. Esto podría deberse a la falta de nutrientes, la temperatura ambiental por encima o por debajo del rango de tolerancia para la especie u otras condiciones nocivas, (Novick, 1955).

## 5.2. Modelos cinéticos

Un modelo cinético es una expresión matemática que relaciona las variables que influyen en el crecimiento microbiano. Para describir apropiadamente la cinética es necesario que el modelo considere los parámetros de cultivo, como: El sustrato limitante y las variaciones de producto, etc. (Tebanni, *et al.*, 2014).

**Cuadro 2: Modelos cinéticos utilizados para describir la velocidad específica de crecimiento microbiano**

Nombre	Modelo	Descripción
Monod	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S}$	Modelo más utilizado por su simplicidad y por considerar el efecto del sustrato limitante en el crecimiento microbiano.
Contois	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S * X + S}$	Este modelo contempla el efecto simultáneo del sustrato limitante y la concentración de células en el crecimiento. Suele utilizarse para describir cultivos de microorganismos fotosintéticos, dado que la concentración celular disminuye la penetración de la luz en el sistema.
Haldan	$\mu = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}$	Es un modelo complementario al de Monod que introduce el efecto de la inhibición del sustrato. $K_I$ representa la constante de inhibición y es igual a la concentración de sustrato que inhibe el crecimiento.

Tebanni, *et al.*, 2014

## V. METODOLOGÍA

### 1. Localización.

Las muestras se obtuvieron de una empresa guatemalteca que se dedica a la formulación y comercialización de alientos probióticos. La preparación de la bebida se llevó a cabo en las instalaciones de la empresa ya mencionada, así como la inoculación del cultivo inicial de microorganismos. La fermentación se llevó a cabo en la Ciudad San Cristóbal, Zona 8 de Mixco, en el departamento de Guatemala. El conteo de microorganismos se llevó a cabo en el Laboratorio de Operaciones Unitarias, del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala. Los análisis de microbiología clásica se hicieron en el laboratorio de bioprocesos del Centro de Innovación y Tecnología (CIT) de la Universidad del Valle de Guatemala. Los análisis de determinación de la concentración de sustratos y productos utilizando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo en el laboratorio de análisis instrumental avanzado en el Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. (Localización geográfica Latitud 14o36'15.41''N; 90o29'23.78'' O, elevación 1515 msnm).

### 2. Población y muestra.

Población: Bebida fermentada de Rosa Jamaica formulada el 7 de diciembre de 2020.

Muestra: Bebida probiótica de Rosa de Jamaica elaborada de forma artesanal el día 7 de diciembre de 2020 a las 7:30 de la mañana. La muestra fue entregada en una botella de vidrio de 650 mL y colocada en refrigeración a 6°C.

### 3. Materiales y equipo

#### 3.1 Fermentación de la bebida probiótica de Rosa de Jamaica

##### 3.1.1 Materiales

- Bebida de Rosa de Jamaica 300 mL
- Glicerol al 99% marca Sigma Aldrich

##### 3.1.2 Equipo y cristalería

- Tubos plásticos estériles de 50 mL
- Estufa de gas
- Probeta de 10 mL

- Refrigeradora a 6 °C.
- Congelador a -4°C.

### **3.2 Análisis de microbiología clásica:**

#### **3.2.1 Materiales:**

- Medio Agar patata dextrosa (PDA)
- Medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS)
- Tinte de cristal violeta
- Tinte de fijación Lugol
- Tinte de Safranina
- Solución de alcohol acetona
- Tinte de azul de metileno
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Etanol al 70%
- Papel parafilm

#### **3.2.2 Equipo y cristalería:**

- Autoclave
- Estufa con agitación magnética
- Pastilla de agitación magnética
- Campana de extracción con Flujo Laminar
- Recipiente de vidrio de 1L
- Placas petri de 20mL
- Refrigeradora a 4°C.
- Incubadora a 37°C.
- Incubadora a temperatura ambiente
- Asa de microbiología
- Portaobjetos de vidrio
- Mecheros de etanol
- Chispero
- Microscopio

### **3.3 Conteo celular de la fermentación:**

#### **3.3.1 Materiales y equipo**

- Tubo eppendorf de 1.5 mL
- Pipeta eppendorf de 1 - 10 ± 0.05 mL
- Micropipeta IKA de 10 - 100 ± 0.5 µL
- Contador de células Muse® modelo 0500-3115 con un rango de 10,000-500,000 células/mL

### **3.4 Determinación de las concentraciones de sustratos y productos:**

#### **3.4.1 Materiales:**

- Estándar de sacarosa
- Estándar de glucosa
- Estándar de fructosa
- Estándar de ácido acético
- Estándar de Etanol

#### **3.4.2 Equipo y cristalería**

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

### **3.5 Determinación del modelo cinético:**

#### **3.5.1 Software:**

- Berkeley-Madonna version 10.1.3

## **4. Procedimiento:**

### **4.1 Fermentación de la bebida probiótica de Rosa de Jamaica**

- Preparación de la fermentación: Para la fermentación de la bebida probiótica de Rosa de Jamaica se utilizó una muestra de Rosa Jamaica elaborada de forma artesanal. Para la distribución de la muestra

vertió un volumen de 10 mL en un tubo estéril de plástico de 50 mL. Se repitió el vertido en 24 tubos adicionales. Se cerraron los tubos y se guardaron en refrigeración a 6°C.

- Esterilización del glicerol: Para la esterilización del glicerol, se vertió en un recipiente que pueda ser calentado en una estufa. Después de ser vertido en el recipiente adecuado, este se colocó en una estufa y se calentó hasta que este ebulló por un tiempo de 15 minutos. Se dejó enfriar con una tapadera para evitar contaminación.
- Detención de la fermentación a través de congelamiento: Se vertieron 1.5 mL de glicerol estéril en el primer tubo. Se mezcló para obtener una mezcla más homogénea y se llevó a congelación a una temperatura de -4°C. Se repitió el mismo procedimiento con el resto de los tubos por un periodo de 25 días.

## **4.2 Análisis de microbiología clásica**

- Preparación medio PDA: Se pesaron 39 gr del medio deshidratado disponible comercialmente y se disolvió en un litro de agua destilada. Se dejó en reposo por 5 minutos. La mezcla se calentó agitando frecuentemente hasta su disolución total. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Preparación medio MRS: Se agregaron 68,25 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Se dejó reposar 5 minutos. Se calentó agitando frecuentemente y se llevó a ebullición durante 1 ó 2 minutos para disolución total. Se distribuyó en recipientes apropiados y se esterilizó en autoclave a 121 oC durante 15 minutos. Se enfriaron y distribuyeron en placas Petri estériles.
- Uso del autoclave: Se aseguró que el nivel de agua llegara hasta el falso fondo perforado. Se colocó el material a esterilizar convenientemente acondicionado y distribuido. Se cerró el autoclave ajustando la tapa a la brida mediante leve presión de las tuercas. Se controló que la válvula esté abierta. Se abrió la llave de paso de gas y se encendió la fuente de calor. Se mantuvo la válvula abierta hasta que por ella salga un chorro continuo de vapor. Una vez transcurrido el tiempo de esterilización, se apagó la fuente de calor y se cerró la llave de paso de gas. Cuando la aguja del manómetro indicó cero, entonces se abrió la válvula para compensar las presiones interna y se dejó enfriar completamente el equipo. Se abrió la tapa y se retiró el material estéril.
- Vertido del medio en placas petri: Se encendió la campana de flujo laminar, y mecheros para mantener la inocuidad. Con cuidado se abrió el recipiente que contiene el medio de cultivo, se flameó la boquilla del contenedor y se vertió una cantidad adecuada de medio líquido en una placa petri abierta. Se tuvo cuidado de no llenar de más la placa petri. Se colocó la tapa de la placa petri sobre la placa, se dejó secar. Se cerró la placa petri, se rotuló con nombre del ejecutor, fecha y nombre de medio y se selló con papel parafilm. Se almacenó la placa petri al revés, es decir con el medio viendo hacia abajo.

- Inoculación de muestra en placa petri: Se preparó una mesa limpiándola con etanol al 70%. Se encendieron dos mecheros de etanol para mantener la inocuidad. Se tomó una micropipeta con puntas estériles y se tomó una alícuota de 500µl de la bebida de Rosa de Jamaica, se vertió la alícuota justo sobre el centro de la placa petri con medio de cultivo. Se aseguró de que la bebida inoculada cubra todo el medio. Se selló con papel parafilm y se incubó a la temperatura deseada.
- Crecimiento microbiano: Se ingresó la placa petri inoculada con la muestra, se utilizó la incubadora a 37°C por 24 horas, se promovió el crecimiento microbiano.
- Fijación de muestra para tinción: Se preparó y limpió el área de trabajo con etanol al 70%. Se colocaron dos mecheros de etanol. Se tomó una placa petri con colonias aisladas. Se tomó un asa de metal, y se esterilizó con el mechero, se dejó enfriar sin sacar del halo de inhibición. Se tomó con el asa una colonia y se colocó sobre una gota de agua sobre un portaobjetos de vidrio. Se flameó hasta que la muestra quedó seca.
- Tinción gram: Se aplicó el tinte de cristal violeta sobre el portaobjetos y se esperó un minuto. Se enjuagó la muestra con agua y se aplicó un fijador de lugol. Se lavó de nuevo el portaobjetos con una mezcla de alcohol y acetona durante unos segundos. Se añadió una tinción de safranina o fucsina y se lavó con agua. Se observó la muestra al microscopio donde se visualizarán de color violeta las gram positivas y de color Rosa-rojizo las gram negativas.
- Tinción con azul de metileno: Se puso una gota de agua en el portaobjetos y se extendió en ella la muestra del microorganismo, se utilizó el asa de siembra. Se pasó el portaobjetos varias veces por encima de la llama del mechero de alcohol, sin permitir que llegue a hervir, hasta que se seque. Se añadió Azul de metileno y se esperó 2 minutos. Se lavó con agua. Se observó con el objetivo 40; luego se añadió aceite de inmersión y se observó con el objetivo 100.
- Vista bajo el microscopio: Se encendió el microscopio. Se tomó el portaobjetos con el microorganismo fijado y teñido. Se colocó sobre el área de visualización y se enfocó con el microscopio.

### **4.3 Conteo microbiano utilizando el equipo Muse**

- El muestreo de cultivo microbiano se realizó al finalizar el tiempo de fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica. Para esto, se extrajo 1mL de cultivo con una jeringa esterilizada y este se introdujo en un tubo Eppendorf.
- Inicialmente, se limpió el equipo Muse® colocando un tubo Eppendorf con agua destilada en la cavidad de medición y se levantó para introducirlo al equipo.
- Se seleccionó la opción “Muse System Cleaning” seguido por “Complete System Clean” y “Run Complete Clean”.

- Primero se corrió el proceso de “Run DI Water” y una vez finalizado, se cargó un tubo Eppendorf con solución de limpieza Guava ICF.
- Se presionó la opción “Continue” para correr el proceso de “Run ICF”.
- Luego de la limpieza, se seleccionó la opción “Count & Viability”.
- Previo a colocar cada muestra dentro del equipo, estas fueron homogenizadas utilizando el instrumento Vortex.
- Se llevó a cabo una dilución de la bebida de Rosa de Jamaica en una relación de 1:10. El cálculo se llevó a cabo de la siguiente forma:

$$1000\mu\text{L} * \left(\frac{1}{10}\right) = 100 \mu\text{L de muestra}$$

$$1000\mu\text{L totales} - 100 \mu\text{L muestra} = 900 \mu\text{L agua destilada}$$

- Empleando una micropipeta de 100  $\mu\text{L}$  se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra homogenizada y se introdujo a un tubo de 1.5mL.
- Con una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  se tomaron 900  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se mezclaron en el tubo de 1.5mL.
- La muestra se homogenizó nuevamente y se cargó al equipo y se corrió el conteo celular.
- Este proceso se repitió con todas las muestras.
- Al finalizar todas las lecturas, se corrió nuevamente el proceso de limpieza y se cargó un tubo con agua destilada al equipo para luego apagarlo en “Power Options” seguido por “Power Off”.

#### **4.4 Determinación de concentraciones de sustratos y productos con HPLC**

- El análisis de determinación de la concentración de sustratos y productos fue llevado a cabo en el laboratorio de análisis instrumental avanzado en el centro de investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.

#### **4.5 Determinación del modelo cinético**

- Se seleccionó el modelo cinético de Monod para describir el efecto del reactivo limitante en el crecimiento microbiano.
- Inicialmente se determinaron las velocidad máxima de crecimiento  $\mu_{\text{max}}$  y la constante de saturación media de sustrato  $K_S$  empleando la linealización del modelo de Monod.
- En el programa Berkeley-Madonna se escribió el código presentado en la Figura 59 de Anexos.
- Se exportaron los datos experimentales para crecimiento microbiano (CN) y consumo de sustrato (CS) de la fermentación experimental de la bebida de Rosa de Jamaica.

- Se utilizó un método de aproximación Runge-Kutta 4 y se estableció un tiempo inicial 0, un tiempo final de 30 y un incremento diferencial de 1. El tiempo fue establecido en días.
- Utilizando la herramienta “Curve Fitting” y la opción “Multiple Curve Fittings” se ajustó la velocidad máxima de crecimiento  $\mu_{max}$  y la constante de saturación media de nitrato KS a los datos experimentales utilizados.
- Finalmente, se ajustaron los rendimientos  $Y_{X/S}$ .

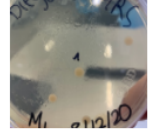
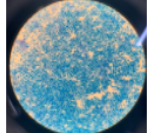

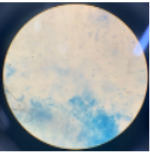

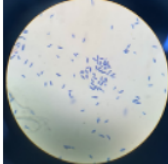
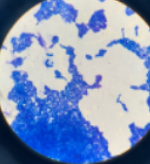

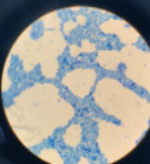

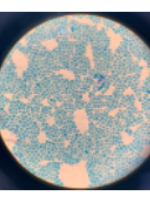

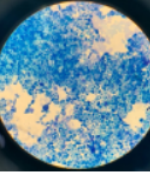
#### **4.6 Análisis de biología molecular**

- El análisis de biología molecular se llevó a cabo en el laboratorio Macrogen, ubicado en Seúl, Corea del Sur. Las muestras fueron preparadas en el laboratorio de procesos biológicos industriales, en el centro de Innovación y Tecnología de la Universidad del Valle de Guatemala. Las muestras fueron enviadas a Corea del Sur utilizando el servicio de FedEx.

# VI. RESULTADOS

## 1. Análisis de microbiología clásica

**Cuadro 3: Resumen del análisis de diversidad microbiológica en la bebida fermentada de Rosa Jamaica**

Microorganismo	Aspecto	Tamaño	Forma y textura	Color	Gram	Azul metileno	Medio
1		Mediana	Colonia, redonda lisa.	Blanca, opaca.	NA		MRS
2		Grande	Sin forma, ligosa.	Transparente y brillante.	NA		MRS
3		Poqueta	Colonia, redonda lisa.	Blanca y brillante			MRS
4		Muy Grande	sin colonias definidas.	Blanca y opaca	NA		PDA
5		Mediana	Sin forma	Blanca y opaca	NA		PDA
6		Mediana	Redonda	Blanca brillante	NA		PDA

\*El cuadro muestra las diferentes colonias observadas en los cultivos realizados con medio PDA y medio MRS. El aspecto, tamaño, forma, color, tinción Gram, tinción de azul de metileno y la fecha de muestro y de análisis de microbiología.

**Cuadro 4: Identificación de microorganismos aislados de la bebida fermentada de Rosa de Jamaica**

<b>Microorganismo</b>	<b>Identificación</b>	<b>Metodo de identificación</b>
1	Levadura	Observación bajo el microscopio y tinción de azul de metileno
2	Bacteria	Observación bajo el microscopio y tinción de Gram
3	Levadura	Observación bajo el microscopio y tinción de azul de metileno
4	Levadura	Observación bajo el microscopio y tinción de azul de metileno
5	Levadura	Observación bajo el microscopio y tinción de azul de metileno
6	Levadura	Observación bajo el microscopio y tinción de azul de metileno

## 2. Análisis de biología molecular

**Figura 11: Identificación gráfica del microorganismo responsable de la fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica**

```

>JQ241273.1 Wickerhamomyces anomalus strain CZS2-Y5 internal transcribed
spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=232

Score = 409 bits (221), Expect = 4e-110
Identities = 224/225 (99%), Gaps = 1/225 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 6  ATTCATTGCAGCGCTTATTGCGCGGCGAT-AACCTTACACACATTGTCTAGtttttttGA 64
      |||
Sbjct 6  ATTCATTGCAGCGCTTATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTGA 65

Query 65 ACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACAttttttAAT 124
      |||
Sbjct 66 ACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTAAT 125

Query 125 GTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTAAACAAAATTTAAATCTTCAAAAC 184
      |||
Sbjct 126 GTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTAAACAAAATTTAAATCTTCAAAAC 185

Query 185 TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC 229
      |||
Sbjct 186 TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGC 230
  
```

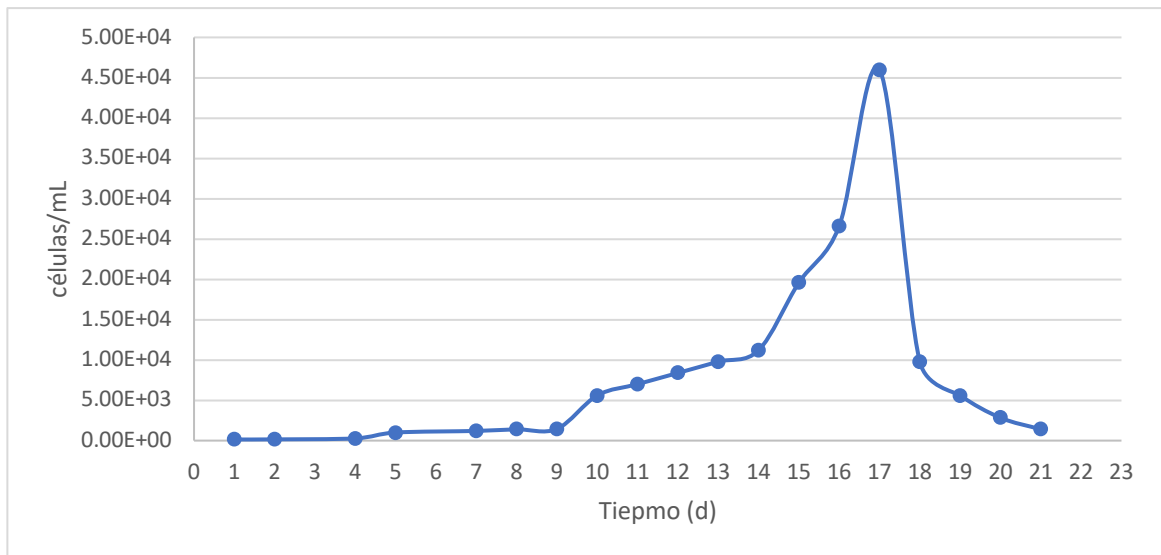
**Cuadro 5: Identificación del microorganismo responsable de la fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica**

Microorganismo	Especie	% de ajuste
Microorganismo 1	Wickerhamomyces anomalus cepa CZS2-Y5	99

\*Este resultado se obtuvo al llevar a cabo una reacción de PCR utilizando el primer ITS y una secuenciación sanger.

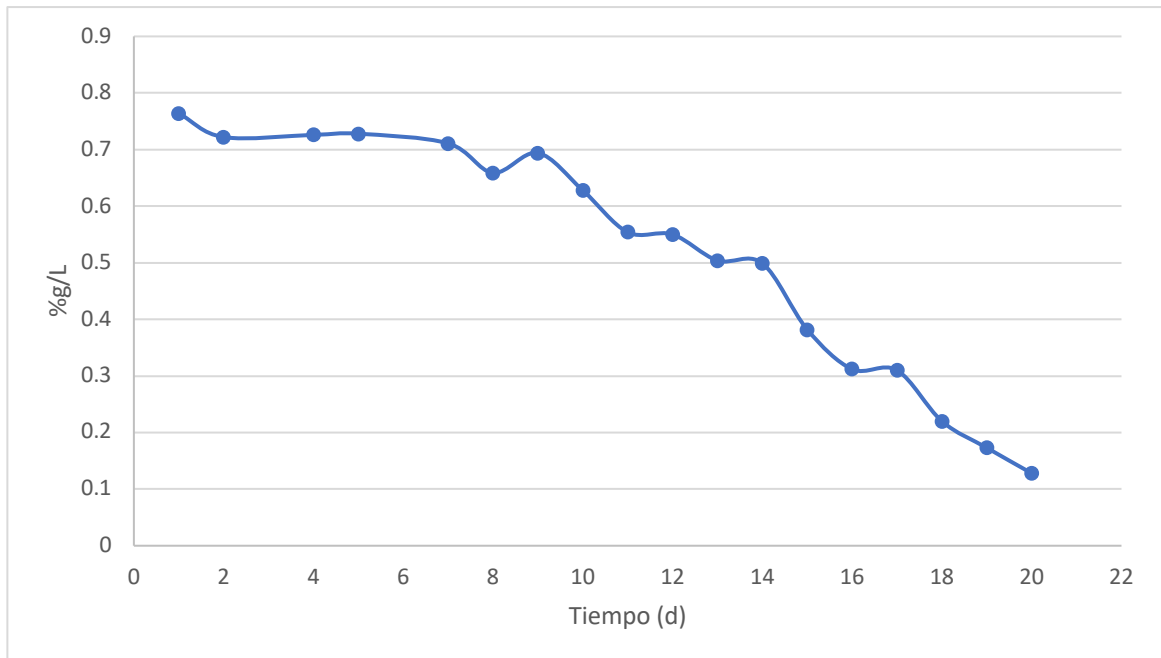
### 3. Análisis de determinación de la concentración de microorganismos, sustratos y productos en el medio

Figura 12: Curva de crecimiento microbiano en relación con el tiempo



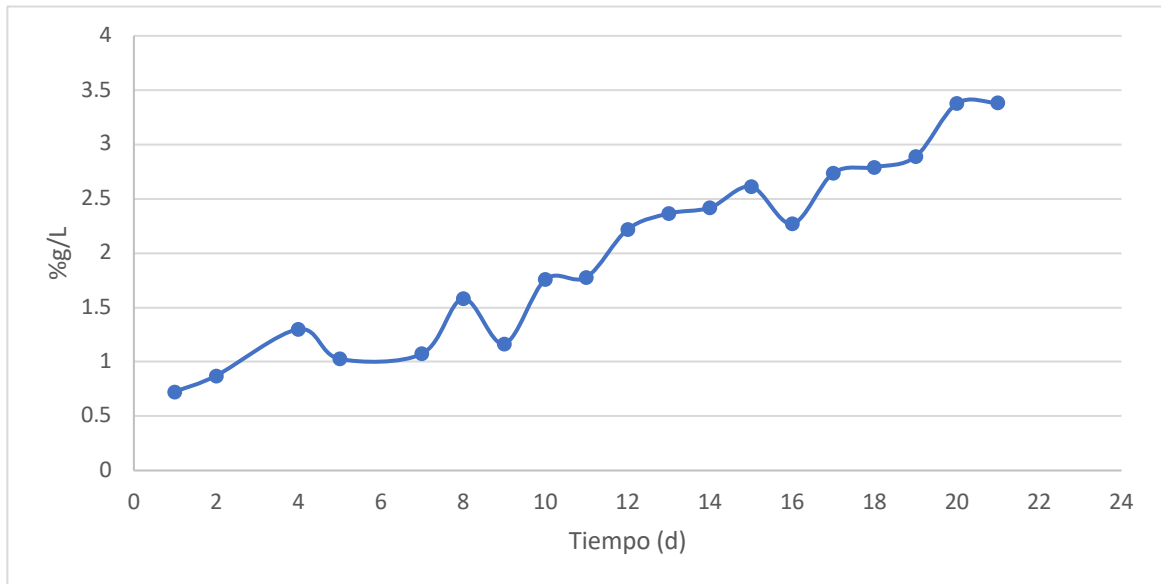
\*El eje Y corresponde a la concentración de microorganismos en cantidad de células/mL. La concentración de microorganismos fue determinada utilizando un equipo especializado para conteo de microorganismos llamado Muse. El eje x que representa el tiempo, se encuentra en días.

**Figura 13: Curva de consumo de sacarosa con relación al tiempo**



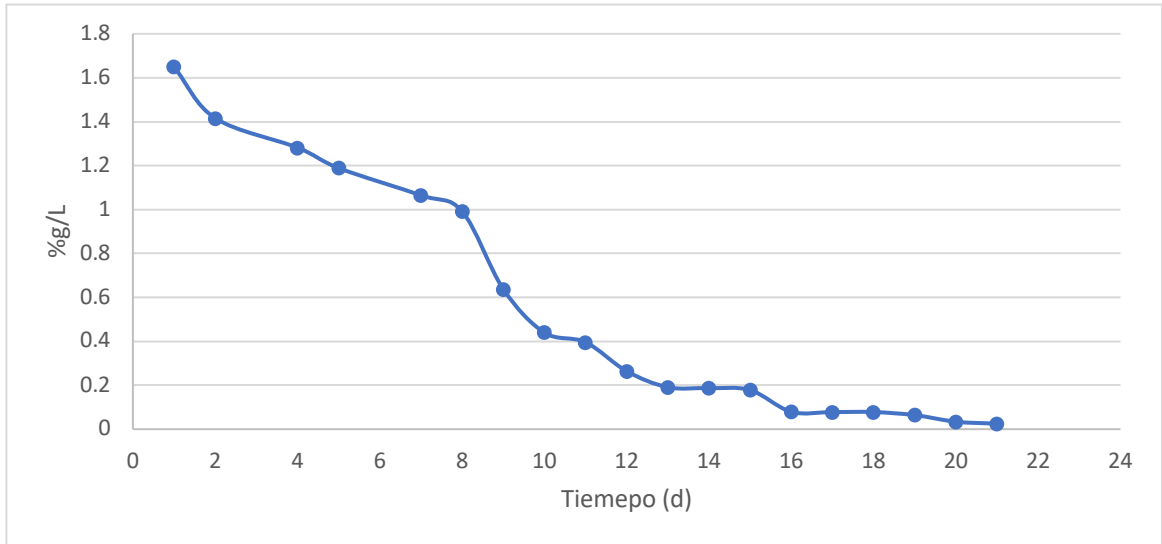
\*El eje Y corresponde a la concentración de sacarosa en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Figura 14: Curva de producción de etanol con relación al tiempo**



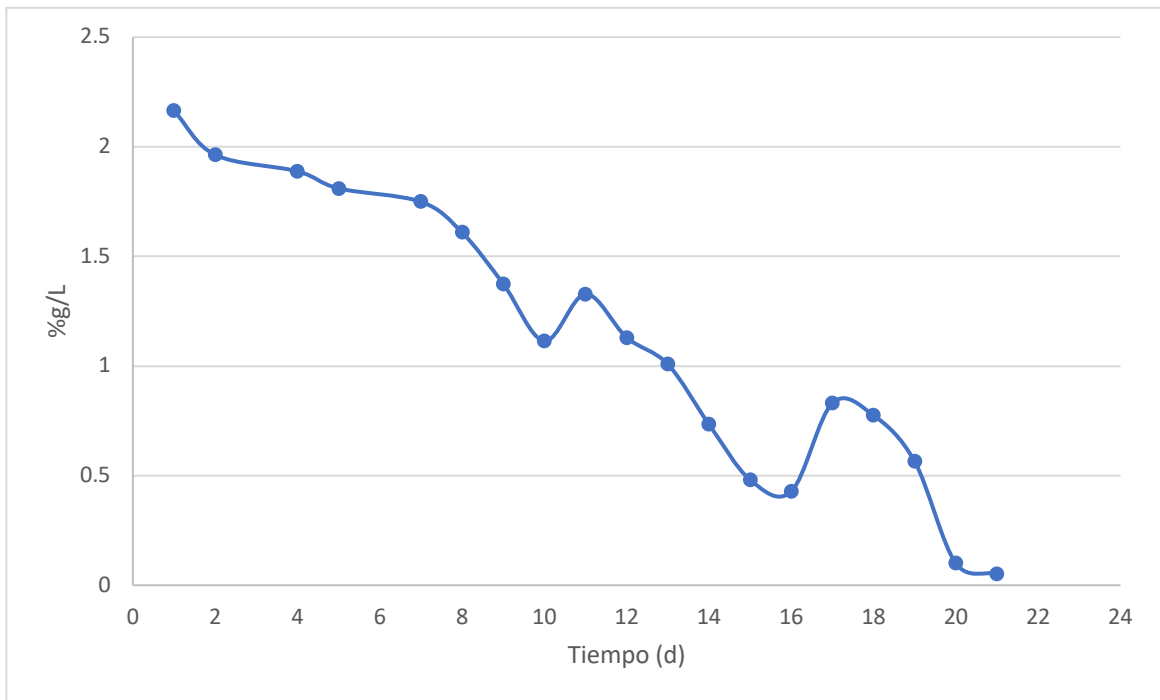
\*El eje Y corresponde a la concentración de etanol en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Figura 15: Curva de consumo de glucosa en relación con el tiempo**



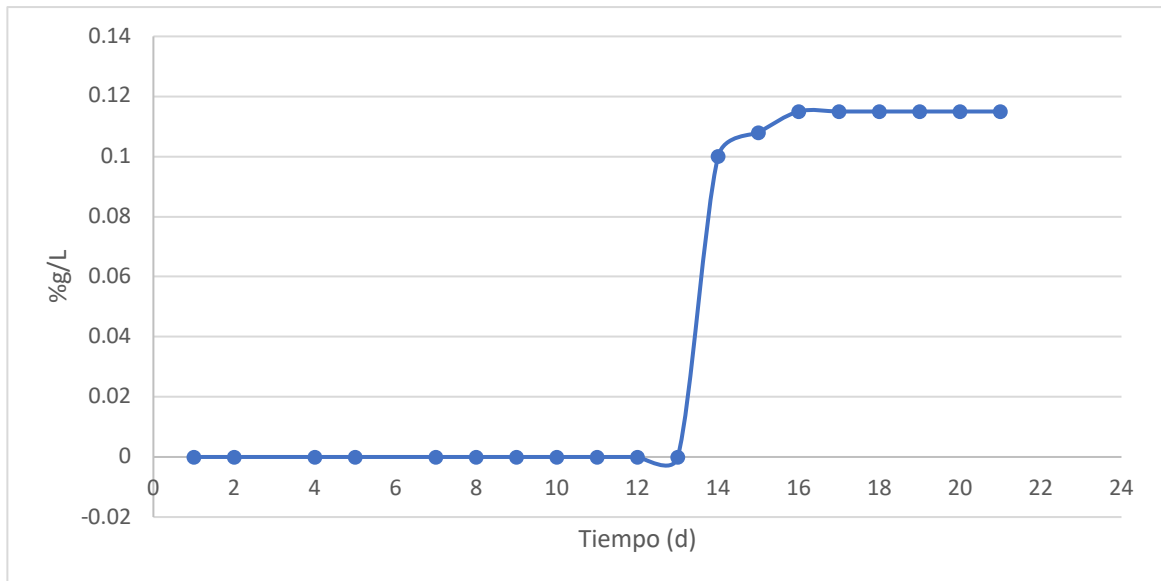
\*El eje Y corresponde a la concentración de glucosa en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Figura 16: Curva de consumo de fructosa con relación al tiempo**



\*El eje Y corresponde a la concentración de fructosa en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Figura 17: Curva de producción de ácido acético en relación con el tiempo**



\*El eje Y corresponde a la concentración de ácido acético en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días

## 4. Determinación del modelo cinético.

**Ecuación 1:** Primera ecuación del modelo cinético propuesto para describir el crecimiento de microorganismos, consumo de sustrato y formación de producto en una bebida fermentada de Rosa de Jamaica.

$$\mu = \mu_{max} * \left( \frac{C_S^n}{K_S + C_S} \right)$$

**Ecuación 2:** Segunda ecuación del modelo cinético propuesto para describir el crecimiento de microorganismos, consumo de sustrato y formación de producto en una bebida fermentada de Rosa de Jamaica.

$$C_S = C_{S0} - \left( \frac{C_x - C_{x0}}{Y_{XS}} \right)$$

**Ecuación 3:** Tercera ecuación del modelo cinético propuesto para describir el crecimiento de microorganismos, consumo de sustrato y formación de producto en una bebida fermentada de Rosa de Jamaica.

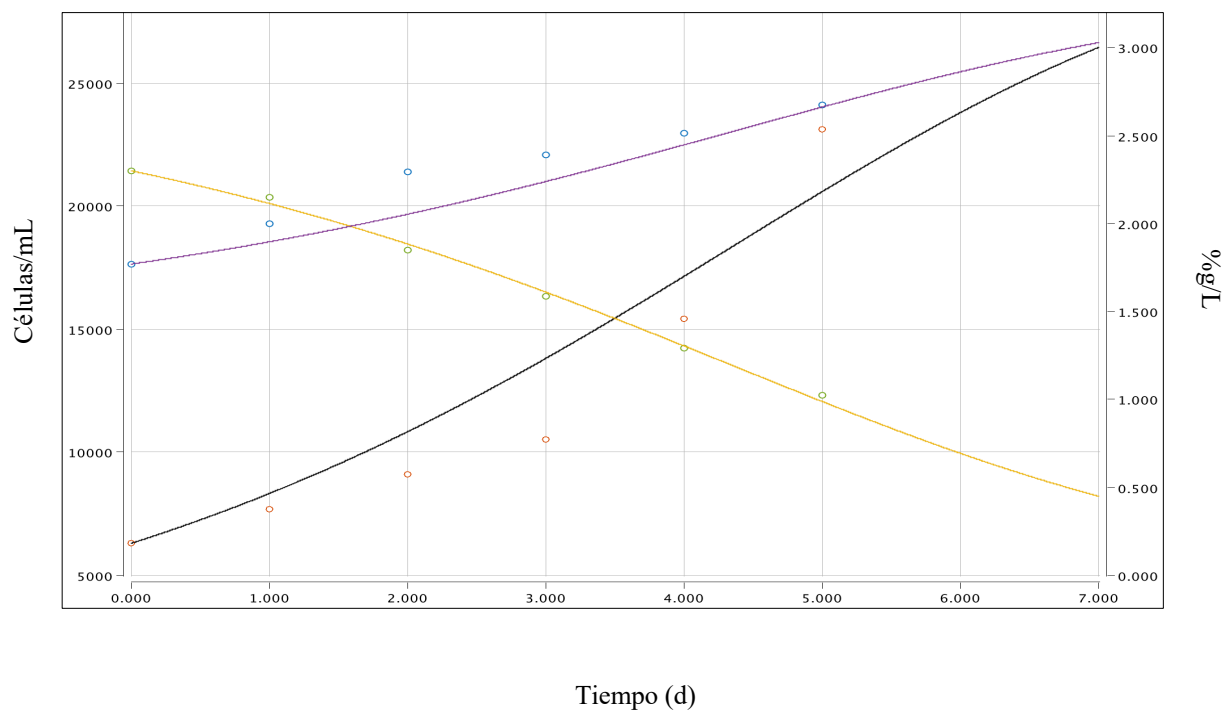
$$C_a = C_{a0} + (C_{S0} - C_S) * Y_{AS}$$

**Cuadro 6: Parámetros cinéticos ajustados a datos experimentales de concentración de células, sustrato y producto**

Parámetro	Valor
Velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ )	0.83836 d-1
Constante de saturación media para el sustrato (KS)	2.84204 mg/células
Rendimiento del sustrato (YX/S)	10888.39652 células/mg sustrato
Rendimiento del producto (YA/S)	0.68037 mg etanol/mg de sustrato
Constante empírica de fermentación (n)	0.47705

\*Se utilizó el programa Berkeley-Madonna para realizar el ajuste de curvas empleando 3 sets de datos experimentales de concentración de células, consumo de sustrato y formación de producto.

**Figura 18. Ajuste de curvas del modelo cinético a los sets de datos experimentales para el crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto utilizando Berkeley-Madonna.**



\*La línea negra representa el crecimiento de microorganismos en el tiempo, la línea morada representa la formación de etanol en el tiempo, y la línea amarilla representa el consumo de sustrato en el tiempo.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 1. Aislamiento y clasificación de microorganismos.

Para el aislamiento y clasificación de los microorganismos se hizo un análisis inicial de crecimiento microbiano en medio nutritivo. Se utilizó un medio nutritivo, y no un medio selectivo para promover el crecimiento de todos los microorganismos presentes en la bebida de Rosa de Jamaica. Tras permitir el crecimiento microbiano por 24 horas se observó la formación de colonias sobre el medio. La morfología de las colonias se observó como de mediano tamaño, de color blanco opaco, y con una concavidad no tan pronunciada. De acuerdo con la morfología de la colonia es difícil determinar con certeza si la colonia pertenece a una especie de levadura o de bacteria. Sin embargo, las características observadas previamente sugieren que la identidad de las colonias podría pertenecer a una especie de levadura. Adicionalmente se puede mencionar que al abrir la caja Petri con las colonias formadas se percibió un olor fuerte a pan, lo cual corresponde a un olor característico perteneciente a las levaduras del género *Saccharomyces*.

A partir de la observación por morfología se llevó a cabo el proceso de fijación tinción y observación bajo el microscopio. Se observó bajo el microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión que los microorganismos presentaron el tamaño y forma de una levadura. La forma fue ovoide. Además, se observaron ciertas levaduras en etapa de gemación. El tamaño fue aproximado de 5  $\mu\text{m}$ , lo cual corresponde al tamaño promedio de una levadura. Se observó además que las células presentaron una tonalidad azul, la cual se obtuvo por la tinción de Gram, lo cual es acertado ya que las levaduras al igual que las bacterias Gram positivas muestran una coloración azul, en vez de rojiza.

Tras llevar a cabo el aislamiento en medio nutritivo, y solo obtener colonias de levaduras se hizo un análisis de crecimiento microbiano en dos tipos de medios selectivos: Medio Patata DextRosa (PDA) el cual promueve un crecimiento de hongos filamentosos y levaduras, y un medio Man Rogosa y Sharpe (MRS) el cual es selectivo y promueve el crecimiento de lactobacilos. Se observó que en ambos medios se dio el crecimiento de colonias muy similares a las obtenidas en el primer aislamiento en medio nutritivo. Se observaron colonias de tamaño mediano, redondas, blancas con tonalidad opaca y con una concavidad poco pronunciada. Al llevar a cabo la tinción de azul de metileno, se observó la morfología de las células, la cual fue nuevamente de forma ovoide, característica de levaduras, además de presentar el mismo tamaño que la colonia observada en la observación anterior. Al obtenerse la misma colonia de levadura, con las mismas características morfológicas tanto en la colonia como en las células, en medio nutritivo y en medios selectivos se puede inferir que la diversidad de microorganismos en la bebida es baja. La baja diversidad de microorganismos podría deberse a la actividad aséptica que presenta la Rosa de Jamaica como planta.

Especialmente debido a que la bebida fermentada es una infusión de la flor de Jamaica, la cual presenta metabolitos secundarios que tienen funciones asépticas tales como: hexano, acetato de etilo y metanol. (Patel, 2012)

Al finalizar el análisis de microbiología clásica en la primer muestra de bebida de Rosa de Jamaica fermentada y obtener resultados similares con diferentes tipos de medios, se decidió llevar a cabo un análisis de microbiología con cinco muestras de diferentes fechas. Esto con el objetivo de identificar la diversidad de microorganismos en función del tiempo. Las muestras escogidas para este estudio fueron las muestras del 08 de diciembre de 2020, 17 de diciembre de 2020, 25 de diciembre de 2020, 31 de diciembre de 2020, y 03 de enero de 2021. El inóculo fue por vertido con 500 µl de la bebida en medio PDA y MRS.

Cómo se observa en la Figura 25 el crecimiento de los microorganismos en medio MRS fue diversificándose a medida que avanzó el tiempo de fermentación y disminuyó nuevamente al final de esta. Como se observa en la Figura 27 la placa identificada con el nombre M1, perteneciente a la fecha del 8 de diciembre de 2020, mostró el crecimiento de un solo tipo de colonia, su morfología fue redonda, con bordes lisos, con concavidad poco prominente y sin brillo. Se observaron 8 colonias aisladas, y se identificó a esta colonia como la colonia #1. Cabe mencionar que la placa M1 mostró un aroma muy característico a pan.

En la placa identificada como M2, perteneciente a la fecha del 17 de diciembre de 2020, en medio MRS, se identificó el crecimiento de dos diferentes tipos de colonias. Al observar la placa detenidamente, se observó el crecimiento de la colonia previamente identificada como colonia #1. De la cual fueron identificadas 7 colonias. Además de la colonia #1 se observó una colonia con morfología y tamaño diferente, la cual fue nombrada colonia #2. La morfología en la colonia #2 fue de tamaño más grande que la colonia #1, además no se observó una forma determinada, ya que los bordes de la colonia fueron irregulares. Al tocar la colonia con un asa estéril, se observó que la textura y consistencia de esta fue ligosa y poco firme. De esta colonia se observaron 2 formaciones, las cuales permanecieron pegadas la una a la otra.

En la placa identificada como M3, perteneciente a la fecha del 25 de diciembre de 2020, en medio MRS, se observó el crecimiento de la colonia #1 y la colonia #2. De la colonia #1 se observaron 5 colonias, mientras que de la colonia #2 se observó solamente una formación. Además de estas dos colonias se observó una tercerca formación de colonias. La tercer formación de colonias fue identificada como colonia #3. En la colonia #3 se observó que el tamaño de esta, comparado con el tamaño de la colonia #1 y la colonia #2, fue más pequeño. Se observó además en la colonia #3 que la forma fue redonda, definida y con bordes lisos. También se observó que el color, forma, concavidad y brillo fue igual al de la colonia #1, dejando solo al tamaño de la colonia como particularidad de la colonia #3 con respecto a la colonia #1. Esto podría sugerir que la colonia #1 y la colonia #3, pertenecen al mismo microorganismo, en diferentes etapas de crecimiento. Pero al observarse también la colonia #1 en la placa M3, con el mismo tiempo y condiciones de crecimiento,

se decidió mantener la identidad de ambas colonias de forma separada, manteniendo así la nomenclatura utilizada anteriormente, es decir, colonia #1, colonia #2 y colonia #3.

En la placa identificada como M4, perteneciente a la fecha del 31 de diciembre de 2020, en medio MRS, se identificó la presencia de tanto la colonia identificada como colonia #1 y colonia #3. En esta placa ya no se dio el crecimiento de la colonia #2. También se observó que la población de la colonia #1 y #3 fue mucho mayor, por lo que no se pudo determinar con seguridad el número de unidades de ambos tipos de colonia. En esta además se observó que el tamaño de la colonia #1 y la colonia #3 permaneció igual a la observación en la placa M2. Esto sugiere nuevamente que, a pesar de la similitud en tamaño, color, forma, y brillo de ambas colonias, estas pertenecen a diferentes tipos de microorganismos. Se infiere además que la ausencia de las colonias identificadas como colonia #2 pudo deberse a diferentes razones.

Primero, pudo haberse dado debido a la competencia por nutrientes en el medio de cultivo. Al existir diferentes especies de microorganismos en la bebida, y todos aprovecharse de la misma fuente de nutrientes, es normal que los microorganismos compitan por el alimento. Tanto las bacterias como levaduras tienen mecanismos de defensa, por lo que es posible que las colonias #1 y #3 hayan competido con la colonia #2 y la hayan destruido por falta de alimento.

La segunda posible razón es que las condiciones del medio hayan sido modificadas por la formación de producto de la fermentación. Al llevarse a cabo una reacción metabólica de fermentación, se obtienen productos tales como etanol, ácido acético y otros ácidos orgánicos. La formación de estos productos es clave en el comportamiento del crecimiento microbiano, ya que estos pueden representar una fuente de intoxicación tanto para las bacterias como levaduras en el medio, y además una disminución en el potencial de hidrogeno, es decir el pH, de la bebida. Ciertas levaduras del género *Saccharomyces* poseen una mayor tolerancia a productos fermentativos como etanol, así como una mayor resistencia a pH mas bajos. Esto nuevamente sugiere que la posible identidad de los microorganismos responsables de la fermentación sean levaduras del genero *Saccharomyces*.

La tercer posible razón es que la colonia #2 sea una contaminación en el medio de cultivo, pero al haber crecido de forma adecuada en dos diferentes tiempos de muestreo no se puede concluir con certeza que la colonia #2 sea una contaminación.

En la placa identificada como M5, perteneciente a la fecha del 03 de enero de 2021, en medio MRS, se observó el crecimiento de la colonia #1 y la colonia #3 nuevamente. Se logró observar una gran cantidad de colonias, por lo que no se pudo identificar con exactitud la cantidad de ellas en el medio. Nuevamente no se muestra la formación de la colonia #2, lo que podría deberse a las razones mencionadas con anterioridad.

Cómo se observa en la Figura 26 el aumento de la diversidad de microorganismos en medio PDA no fue como la obtenida en el medio MRS. Como se observa en la Figura 32 la placa identificada con el nombre M1, perteneciente a la fecha del 8 de diciembre de 2020, mostró el crecimiento de un solo tipo de colonia, la cual cubrió por completo la placa Petri M1. Esta colonia se observó de color blanco opaco, con ciertos bordes visibles, y con un olor muy fuerte a pan. El crecimiento de esta colonia fue mucho mayor al observado en medio MRS, debido al medio que se utilizó para su crecimiento. Como se mencionó antes, el medio PDA promueve el crecimiento específico de hongos filamentosos y levaduras. Tanto la morfología, como el crecimiento en toda la placa y el olor característico del microorganismo sugiere que la identidad del microorganismo es una levadura. A partir de la forma de la colonia se identificó a esta como la colonia #4. Cabe mencionar que, al observar las características morfológicas, con excepción de la forma, y al uso del medio, se tiene una leve sospecha de que la colonia #4 sea la misma que la colonia #1.

En la placa identificada como M2, perteneciente a la fecha del 17 de diciembre de 2020, en medio PDA, se identificó el crecimiento de un tipo de colonia solamente. Al observar la placa detenidamente, se observó el crecimiento de la colonia previamente identificada como colonia #4. De la cual fueron identificadas aproximadamente 24 colonias. Estas colonias no tuvieron una forma completamente redonda, los bordes no fueron lisos, sin embargo, el color, el brillo y el olor a pan fue igual al de la colonia #1. Lo cual podría significar que la colonia #1 y #4 podrían pertenecer a la misma especie de levadura y que la diferencia en los bordes sea efecto del medio de cultivo utilizado en esta observación, es decir medio PDA.

En la placa identificada como M3, perteneciente a la fecha del 25 de diciembre de 2020, en medio PDA, se observó el crecimiento de la colonia #4 y la colonia #3. Nuevamente como se observó con anterioridad en la placa 3 con medio MRS, se mostraron dos tipos diferentes de colonias, muy similares en forma, color, y brillo; pero diferentes en tamaño. Se observó a la colonia identificada como colonia #4 y a una colonia más pequeña del mismo tamaño, color, forma y brillo que la colonia #3 encontrada anteriormente. Nuevamente podría tratarse de la misma colonia, pero en diferentes tiempos de desarrollo, pero al igual que en la observación previa, se mantuvo la identificación de ambas colonias debido a la diferencia de tamaño.

En la placa identificada como M4, perteneciente a la fecha del 31 de diciembre de 2020, en medio PDA, se observó el crecimiento exclusivo del microorganismo identificado como colonia #4. Al momento de identificar el microorganismo se tuvo problema, debido a su similitud con el microorganismo de la colonia #1. Después de un análisis cualitativo se decidió identificar la colonia como colonia #4, ya que al momento de observar de forma detallada la forma irregular de las colonias se observó un mayor ajuste a la observación realizada en la colonia #4. En esta placa se observó como el crecimiento de las colonias formó patrones de crecimiento en líneas, además se logran observar pocas colonias aisladas de forma solitaria, y se observó la misma morfología, es decir: tamaño, forma, color, y brillo de las ya observadas previamente en las placas M1, M2 y M3 en PDA.

En la placa identificada como M5, perteneciente a la fecha del 03 de enero de 2021, en medio PDA, se observó la formación de un solo tipo de colonia. La morfología de la colonia, no se ajustó a la observación de ningún tipo de colonia vista antes. Esta presentó un leve color amarillo, presentó una forma circular con bordes irregulares, las colonias crecieron de una forma separada las unas de las otras, y presentaron un olor desagradable. Las colonias observadas en la placa M5 en medio PDA fueron identificadas como colonia #6.

Como se mencionó antes, la diversidad microbiológica de la bebida fermentada de Rosa de Jamaica en medio PDA fue de solamente dos tipos diferentes de colonias, la colonia #4 y la colonia #6. Esto muestra como en la fermentación de la bebida de Jamaica participa una pequeña cantidad de diversas especies de microorganismos. Esto se debe a dos principales razones. Primero, la preparación de la bebida pasa por un proceso de infusión en donde el agua y las hojas de la Rosa de Jamaica llegan a una temperatura de ebullición. Este paso en la formulación de la bebida juega una parte muy importante en el impacto biológico de la diversidad de microorganismos, debido a que la alta temperatura para lograr la infusión de la Rosa de Jamaica a su vez mata los microorganismos presentes en el agua y en las flores de Jamaica. Segundo, la formación de metabolitos secundarios producidos por la Rosa de Jamaica, de los cuales muchos presentan propiedades antisépticas.

Al llevar a cabo la identificación y clasificación de los microorganismos por medio de microbiología clásica se llevó a cabo la tinción y observación bajo el microscopio de las colonias previamente observadas. Se observó tal y como se muestra en la Figura 37 que la morfología del microorganismo #1 bajo el microscopio en objetivo 100X y aceite de inmersión fue ovoide, se observaron ciertas células en etapa de gemación, al observarse pequeñas células de forma ovoide adheridas a la pared celular de otras células de la misma forma, pero más grandes. Además, se observó que el tamaño de las células fue de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , tamaño característico de levaduras del género *Saccharomyces*. Adicionalmente cabe mencionar que se seleccionó llevar a cabo la tinción fue de azul de metileno, debido a la sospecha inicial de la naturaleza fúngica de la colonia #1. Tras el análisis de morfología de colonia, y la observación del microorganismo bajo el microscopio se puede concluir que la identidad del microorganismo #1 es la de una levadura, con sospechas de que esta pertenezca al género *Saccharomyces*.

Al llevar a cabo la tinción de azul de lactofenol y observación bajo el microscopio en objetivo 100X y aceite de inmersión en el microorganismo #2 se observó la existencia de células pequeñas de un tamaño aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , de forma alargada, y localizadas en grupos. De acuerdo con el tamaño y forma de los microorganismos, se puede sugerir que la identidad de estos sea de bacterias en forma de bacilos.

En el microorganismo #3 se decidió llevar a cabo una tinción de azul de lactofenol debido a la sugerencia, obtenida por la observación morfológica de la colonia, de la naturaleza fúngica del microorganismo. Al llevar a cabo la tinción, y observación en el microscopio con un objetivo de 100X y aceite de inmersión, se observó la existencia de células de un tamaño aproximado de 5  $\mu\text{m}$ , de forma ovoide,

y con la observación de ciertas células en etapa de gemación. Cabe mencionar que el tamaño, forma y características reproductivas del microorganismo #3 son iguales a nivel microscópico que las del microorganismo #1. Esto podría sugerir que ambos microorganismos pertenezcan a la misma especie de levadura.

Al llevar a cabo la tinción de lactofenol y observación en el microscopio en objetivo 100X y aceite de inmersión del microorganismo #4, se observó la existencia de células ovoides, de tamaño muy similar al de los microorganismos #1 y #3. Se observó también la existencia de células en etapa de gemación. La forma, tamaño y características de tanto la colonia, como de las células observadas en el microscopio, sugieren que la identidad de los microorganismos es fúngica, más específicamente la de una especie de levadura.

La morfología, tamaño y observación de células en etapa de gemación también pudieron observarse de manera clara en la tinción y observación en el microscopio en objetivo 100X de los microorganismos #5 y #6. La identificación de los microorganismos #1, #3, #4, #5 y #6 como levaduras, puede indicar que la aparición del microorganismo #2, pudo deberse a una fuente de contaminación en el proceso de crecimiento, aislamiento y observación de microorganismos.

Al finalizar el análisis de microbiología clásica se determinó que el único microorganismo que estuvo presente en todo el tiempo de la fermentación fue el microorganismo #1. Se observó el crecimiento del microorganismo #1, para todas las fechas de muestreo, tanto en medio nutritivo, como en medios selectivos de MRS y PDA. Debido a esto, se seleccionó al microorganismo #1 para llevar a cabo los análisis de biología molecular consecuentes.

## 2. Análisis de biología molecular.

En el Cuadro 8 se puede observar la secuencia de bases nitrogenadas en el genoma del microorganismo 1, en la región ITS del ADN. La secuencia se identifica con las letras A, C, G y T; en donde A se utiliza como abreviado de Adenina, C de Citosina, G de Guanina y T de Timina. Los resultados en formato FASTA muestran solamente la detección de los nucleótidos por medio del detector del secuenciador Sanger utilizado para llevar a cabo la secuenciación de la región ITS y tal y como se observa en el Cuadro 8 se pudieron detectar 411 pares de bases. Estas pares de bases en la secuencia dada, permiten la identificación del microorganismo a través de análisis de acoplamiento de la secuencia determinada de forma experimental con secuencias específicas para cada microorganismo.

En la Figura 45 se muestra el cromatograma de la secuenciación sanger efectuada en el ADN que pertenece a la región ITS del genoma microbiano del microorganismo responsable de efectuar la fermentación en la bebida de Rosa de Jamaica. La región ITS del genoma se encuentra situado en medio de la pequeña subunidad de ARN ribosomal, y la subunidad larga de ARN ribosomal en el cromosoma transcrito a la región policistronica del ARN. Esta región del genoma se utiliza mucho para poder identificar la identidad de especies desconocidas. Tal y como se observa en la Figura 45 se muestran 411 pares de bases nitrogenadas de ADN de la secuencia genética de la región ITS en el microorganismo #1. En el cromatograma se asignó la letra A y las curvas de color verde para mostrar la posición de la base nitrogenada Adenina, en la secuencia de nucleótidos del ADN. Por el otro lado se asignó la letra G y las curvas de color negro para mostrar la posición de la base nitrogenada Guanina, en la secuencia de nucleótidos del ADN. También se asignó la letra T y las curvas de color rojo para mostrar la posición de la base nitrogenada Timina, en la secuencia de nucleótidos del ADN. Finalmente se asignó la letra C con las curvas de color azul para mostrar la posición de la base nitrogenada Citosina, en la secuencia de nucleótidos del ADN. El cromatograma de bases nitrogenadas de la secuenciación permite, validar los resultados obtenidos en la secuencia FASTA, al poder analizar los datos de una manera cualitativa. Tal y como se observa en la Figura 45 no se muestra ruido en la base de la gran mayoría de nucleótidos del cromatograma. El ruido se identifica, por medio de curvas adicionales en la base de las bases nitrogenadas identificadas. Se puede observar ruido en la posición 55 del cromatograma, así como en la posiciones 99 y 153. Esto quiere decir, que, de las 411 bases nitrogenadas detectadas, existió ruido solamente en 3, lo cual supone un porcentaje de error menor al 1%, lo que indica que la detección de nucleótidos en la secuenciación fue exitosa. Cuando el detector de secuenciador no logra identificar nucleótidos de forma adecuada, el cromatograma muestra una letra n en vez de las letras correspondientes a los nucleótidos del ADN. Como se observa en la Figura 45 se lograron identificar los nucleótidos correspondientes para toda la secuenciación del ADN, al no existir ninguna entrada identificada con la letra n en todo el cromatograma. Se puede observar además que a partir de la posición 235 del

cromatograma, las lecturas de nucleótidos disminuyeron considerablemente, esto se debe a medida que avanza el gel, pierde resolución. Esto es normal; los picos se ensanchan y cambian, lo que dificulta distinguirlos e identificar las bases con precisión. Aun así, se observa como las bases nitrogenadas pudieron ser identificadas hasta el final.

Al llevar a cabo la secuenciación de genoma, se identificó que el microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación en la bebida de Rosa de Jamaica fue *Wickerhamomyces anomalus cepa CZS2-Y5*, con un porcentaje de ajuste del 99%. Al observar la Figura 11 se observa como se llevó a cabo una comparación de los resultados experimentales de la secuenciación, con datos de referencia pertenecientes a la levadura *Wickerhamomyces anomalus cepa CZS2-Y5*, obtenidos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI). En esta se observa como a partir de la posición 6 de la secuenciación, hasta la posición 230, la secuencia experimental del microorganismo #1 es 99% idéntica a la secuencia de referencia, con una sola diferencia en la base número 35. Al observar que de las 224 pares de bases experimentales, 223 se acoplen perfectamente a la secuencia de consulta, se puede determinar que la identidad del microorganismo encontrado y aislado de la bebida de Rosa de Jamaica sea la levadura *Wickerhamomyces anomalus cepa CZS2-Y5*.

Los resultados obtenidos por los estudios preliminares de microbiología clásica se ajustan al resultado obtenido por los estudios de biología molecular. Esto debido a que el estudio de microbiología sugirió que la identidad del microorganismo responsable de efectuar la fermentación en el medio era una levadura debido a la morfología de colonia, la observación en el microscopio, y las características cualitativas del microorganismo.

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de la levadura *Wickerhamomyces anomalus*. En esta revisión se encontró que la cepa responsable de efectuar la fermentación de la bebida de Rosa de Jamaica es utilizada ampliamente debido a su multitud de características biotecnológicamente importantes en la mejora del sabor, el procesamiento de alimentos y granos, la conservación biológica, la fermentación láctea y el tratamiento de aguas residuales. Esta versatilidad se ve favorecida por la capacidad de tolerar condiciones ambientales extremas como estrés oxidativo, salino, osmótico, así como choques de pH y temperatura. Las características del microorganismo encontrado explican la razón por la cual la diversidad de microorganismos no fue alta, especialmente al tratarse de una bebida fermentada de forma artesanal. Estas también explican como la bebida tiene una actividad fermentativa, aun al llevarse a cabo a condiciones de temperatura más altas.

### 3. Fermentación, crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto.

Al finalizar el tiempo de fermentación se llevó a cabo el conteo de células en la bebida con un analizador de células Muse, marca Millipore Sigma. Como se observa en el Cuadro 14 para la fecha inicial de la fermentación, es decir el 08 de diciembre de 2020, la concentración de microorganismos fue de  $1.40 \times 10^1$  células/mL. Cabe mencionar que la medición fue realizada con una dilución de la bebida de Rosa de Jamaica, en agua destilada de 1:10. La concentración máxima de células se obtuvo en el día 17 el cual corresponde a la fecha del 24 de diciembre del 2020, en donde la concentración de microorganismos fue de  $4.60 \times 10^3$  células/mL. La concentración final de microorganismos durante el tiempo de la fermentación fue para el día 21 de fermentación el cual pertenece a la fecha del 28 de diciembre de 2020, y alcanzó una concentración de microorganismos de  $1.40 \times 10^2$  células/mL.

Al observarse la Figura 12 se pueden observar las diferentes etapas del crecimiento de microorganismos en la bebida de Rosa de Jamaica. Se observa como del día 1, correspondiente al 8 de diciembre de 2020, al día 9, correspondiente al 16 de diciembre de 2020, el crecimiento microbiano se encuentra en su fase de adaptación o lag. En este periodo de tiempo los microorganismos se adaptaron a los nutrientes de la infusión, especialmente a la sacarosa como principal fuente de carbono, y a los nutrientes nitrogenados como fuente principal de fuente de nitrógeno. Como se mencionó con anterioridad, la Rosa de Jamaica posee ciertos metabolitos secundarios, que funcionan como compuestos antisépticos, por lo que es probable que el largo tiempo de adaptación de los microorganismos se deba a la adaptación de estos para soportar las concentraciones de los compuestos antisépticos de la Rosa de Jamaica. La fase de adaptación tomó lugar en un periodo de 9 días.

Del día 10, correspondiente a la fecha del 17 de diciembre de 2020, al día 17, correspondiente al 24 de diciembre de 2020, se observa la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos. A partir del día 10, se observó como la concentración de microorganismos aumentó de  $5.60 \times 10^2$  células/mL, a una concentración de  $4.60 \times 10^3$  células/mL. Al llevar a cabo una regresión de tipo exponencial en el tiempo de crecimiento exponencial de la fermentación se obtuvo un  $R^2$  de 0.9431, lo cual se ajusta de forma adecuada. Durante esta etapa se obtuvo la velocidad de crecimiento más grande de la fermentación, la etapa exponencial de la fermentación tomó lugar por un periodo de tiempo de 7 días.

Al observar la Figura 12 en la cual se muestra el crecimiento de los microorganismos presentes en la bebida de Rosa de Jamaica en el tiempo, se observa como el crecimiento microbiano nunca tomó una pendiente cercana a 0 que corresponde a la fase estacionaria. Teóricamente durante la fase estacionaria de crecimiento microbiano, la razón de división y crecimiento celular es igual a la tasa de muerte celular, lo que inhibe el crecimiento poblacional de microorganismos. Como se observa en la Figura 12, no existió una fase

estacionaria, esto pudo haberse dado debido a la formación de algún producto fermentativo de naturaleza tóxica, a la alteración de pH del medio, o a la actividad inhibidora de algún otro compuesto, o a la falta de nutrientes en el medio. Finalmente, a partir del día 17, hasta el día 21, correspondiente al 28 de diciembre de 2020, se presentó la fase de muerte celular.

Se llevó a cabo la cuantificación del consumo del sustrato en el medio. Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para determinar la concentración de tanto la sacarosa, la cual es el sustrato principal de la bebida, como la determinación de la concentración de glucosa y fructosa, las cuales son obtenidas a través de la hidrólisis enzimática de la amilasa producida por las células en el medio. Tal y como se muestra en el Cuadro 17 la concentración inicial de la glucosa para el día 1, en la fecha del 8 de diciembre de 2020 fue de 0.735 % (g/L), y la concentración de sacarosa disminuyó considerablemente hasta llegar a una concentración final de 0.128 % (g/L) al día 21 en la fecha correspondiente al 28 de diciembre de 2020. Tal y como se observa en la Figura 13 la tendencia del consumo de sacarosa se ajusta de manera lógica al crecimiento microbiano, al observarse un consumo moderado y con una pendiente cercana a cero, hasta el día nueve, tiempo que pertenece a la fase de crecimiento de adaptación. Además, se observa como el consumo de azúcares se hace mayor desde el día 10 en adelante, tiempo que pertenece al crecimiento microbiano en la fase exponencial.

Con respecto a la glucosa, la concentración inicial de glucosa, para el 8 de diciembre de 2020, en el medio fue de 1.65 % (g/L) y esta disminuyó durante el tiempo de la fermentación hasta alcanzar una concentración del 0.025 % (g/L) para el 28 de diciembre de 2020. Al observar la Figura 15 se observa que, al igual que con el consumo de la sacarosa, el consumo de la glucosa se ajusta de manera lógica con el crecimiento microbiano, ya que se observa una velocidad de consumo moderado desde el día uno, hasta el día 8, es decir el 15 de diciembre de 2020, el cual pertenece al periodo de tiempo que se identificó como fase de adaptación. Se observa adicionalmente que el consumo de glucosa se acelera a partir del día 8, es decir el 15 de diciembre de 2020, y que este permanece acelerado hasta el día 17, es decir el 24 de diciembre de 2020, en donde ocurre la muerte celular.

Para la fructosa, el consumo también ocurrió, ya que se observó que la concentración de fructosa al inicio de la fermentación, el 8 de diciembre de 2020, fue de 2.164 % (g/L) y la concentración para la fecha final de la fermentación, el 28 de diciembre de 2020, fue de 0.052 % (g/L). Como se observa en la Figura 16 la velocidad del consumo de fructosa fue fluctuando durante todo el tiempo de la fermentación, pero se observó un consumo más grande entre el día 10, es decir el 17 de diciembre de 2020, y el día 16, es decir el 23 de diciembre de 2020, de la fermentación, periodo de tiempo que se ha identificado como fase exponencial de crecimiento microbiano.

Con respecto a la concentración de sustrato, se observó como en general ocurrió un consumo de azúcares en el medio, como vía para permitir el crecimiento microbiano, el mantenimiento celular, y la

formación de productos fermentativos, tales como etanol, ácido acético y otros ácidos orgánicos. Se observó como el consumo de sustrato fue mayor en la fase exponencial de crecimiento, y como es que la concentración de sustrato se agotó de forma significativa al finalizar la fermentación. Además, se identificó el consumo de sacarosa, pero también de glucosa y fructosa. Al ser la sacarosa el azúcar utilizado para la formulación de la bebida se puede demostrar que ocurre una hidrólisis enzimática en el medio, efectuada por enzimas hidrolíticas extracelulares como la amilasa. Lo cual a su vez muestra que existe una actividad metabólica en el medio, llevada a cabo por los microorganismos hallados en la bebida.

Además de la determinación de sustratos por medio de HPLC, se llevó a cabo la cuantificación de productos fermentativos en el medio. Como se observa en el cuadro 16 la concentración inicial de etanol en la bebida para la fecha del 8 de diciembre de 2020 fue de 0.726 %(g/L), y la concentración final de etanol fue de 3.383 %(g/L). La concentración de etanol al finalizar la fermentación fue alta, considerando que la bebida se comercializa como bebida probiótica, y casi obtener un 4% de etanol, el cual es utilizado en bebidas alcohólicas como cerveza o cidra. Se puede observar en la Figura 14 que la producción de etanol fue constante a lo largo de la fermentación. La formación de etanol se da durante todo el tiempo de la fermentación debido a que este es el desecho metabólico de la glucosa, al darse una fermentación facultativa. La formación de etanol no se limita a ser producido en cierto tiempo de la fermentación solamente, ya que no se considera un metabolito secundario de la fermentación.

Además del etanol, se llevó a cabo la cuantificación de metanol, ácido acético y lactosa. No se cuantificó ninguna concentración de metanol, lo cual es un resultado adecuado, debido al riesgo que representa el metanol para los seres humanos. Tampoco se cuantificó ninguna concentración de lactosa. Pero como se muestra en el cuadro 19 se observó que para el día 14, correspondiente a la fecha del 21 de diciembre de 2020, se formó ácido acético, con una concentración de 0.1 %(g/L), y llegó a una concentración máxima de 0.115 %(g/L) para el día 16, correspondiente a la fecha del 23 de diciembre de 2020. La formación del ácido acético se logró dar debido a la formación de etanol en el medio, como producto fermentativo de los microorganismos, y por la naturaleza facultativa de la fermentación. Como se observa en la Figura 17 el ácido acético se forma antes de la fecha en la que inició la fase de muerte celular. Puede inferirse que la muerte celular pudo haberse llevado a cabo por una intoxicación de ácido acético, o por la disminución del pH en el medio, o por la formación de los compuestos antisépticos formados por la cepa *Wickerhamomyces anomalus* mencionados anteriormente.

## 4. Modelo cinético de la fermentación.

En la ecuación 1, se presenta el modelo cinético propuesto para el crecimiento de los microorganismos responsables de llevar a cabo la fermentación en la bebida de Rosa de Jamaica. La ecuación 1 no solamente modela el crecimiento de los microorganismos, sino que también toma en cuenta el consumo de sustrato, que en este estudio fueron los azúcares fermentables de sacarosa, glucosa y fructosa; y la formación del producto principal de la fermentación que fue el etanol. El modelo que se utilizó como base para la ecuación 1 fue el modelo de Monod, el cual fue seleccionado debido a que el nutriente de los microorganismos en el medio fue limitante, ya que una vez se formuló la bebida de Rosa de Jamaica, no se le agregó ningún azúcar adicional al medio.

Se seleccionaron los azúcares fermentables como el sustrato limitante, debido a su importancia en el metabolismo del carbono, el cual es vital para el mantenimiento celular. Durante el proceso de fermentación, la sacarosa utilizada como fuente de carbono sufre una hidrólisis enzimática para formar una molécula de glucosa y una de fructosa, la fructosa más adelante sufre reacciones de conversión para tornarse en glucosa, ya que esta es la molécula utilizada como fuente exclusiva para la formación de piruvato, y consecuentemente ATP, con el fin de suplir a las células con energía para su mantenimiento, y para la formación de productos, como en este caso, el etanol y en menor medida, el ácido acético. De forma más específica, se seleccionó la fuente de carbono como el sustrato limitante, ya que esta no se generó durante la fermentación, sino que solamente se consumió.

Por el otro lado, la fuente de nitrógeno del medio fueron los compuestos nitrogenados presentes en la Rosa de Jamaica, tales como aminoácidos, nitratos y otros compuestos orgánicos; los cuales al igual que la sacarosa, no fueron adicionados durante el proceso de fermentación. A diferencia de la fuente de carbono, sí existió una fuente de nitrógeno viable que se generó durante la fermentación, la cual fue la población de células que murieron mientras se fermentó el medio. Las células de levaduras muertas, poseen aun una gran cantidad de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, que sirven como fuente nutritiva de nitrógeno para nuevas células. Por lo que no se seleccionó ningún compuesto del nitrógeno, como sustrato limitante.

La cinética de crecimiento microbiano se llevó a cabo con los datos experimentales tomados de una fermentación de una bebida de Rosa de Jamaica a una temperatura promedio de 6 °C. No se llevaron a cabo análisis adicionales a temperaturas distintas, debido a que la bebida fermentada al comercializarse incluye las instrucciones de mantenerse en refrigeración. Tampoco se tomó en consideración la formación de CO<sub>2</sub> debido a que la botella posee un cierre no completamente hermético, lo que permite que el CO<sub>2</sub> abandone el medio antes de poder diluirse en él, e impactar el metabolismo de los microorganismos.

Una de las limitantes del modelo de Monod en la predicción de modelos cinéticos en crecimiento microbiano, se da durante las fases de adaptación, estacionaria y de muerte, por lo que el modelo presentado en la ecuación 1, realmente modela el comportamiento de crecimiento de microorganismos en la fase exponencial solamente. Esto quiere decir, que el modelo se fija durante los días en los que el crecimiento microbiano, presentó la mayor velocidad de reproducción. Dicho periodo de tiempo abarca la fermentación entre las fechas del 18 de diciembre del 2020, al 23 de diciembre del 2020, lo que se resume a 6 días de fermentación. Tal y como se mencionó con anterioridad, al asignar una regresión exponencial a la función de la concentración de células, en los tiempos ya mencionados, se obtiene un  $R^2$  de 0.92, lo cual indica que, durante esas fechas, el crecimiento microbiano se dio de forma exponencial.

Tal y como se observa en la ecuación 1 el modelo incluyó los siguientes términos:  $\mu$ ,  $K_s$ ,  $C_s$  y  $n$ . El símbolo  $\mu$  se utiliza para hacer referencia a la velocidad de crecimiento de los microorganismos, la cual se expresa en  $\text{días}^{-1}$ . El modelo esta en función de  $\mu$  ya que el parámetro más importante del modelo es la variación de células en el tiempo. Por el otro lado,  $\mu_{\max}$  hace referencia a la velocidad de crecimiento microbiano máxima, la cual se sitúa en la fase exponencial del crecimiento microbiano. Tal y como se muestra en el Cuadro 6, el valor de  $\mu_{\max}$  fue de  $0.83836 \text{ d}^{-1}$ , esto indica que la velocidad más alta que alcanzó el crecimiento microbiano durante la fermentación fue  $0.83836 \text{ d}^{-1}$ . El valor de  $\mu_{\max}$  se obtuvo a través del ajuste de datos llevado a cabo en el programa analítico de Berkeley-Madonna.

El parámetro  $K_s$ , hace referencia a la saturación media para el sustrato en el medio. Este parámetro es muy importante, ya que este dicta la afinidad que poseen los microorganismos al sustrato empleado en la fermentación. Tal y como se mencionó con anterioridad, el sustrato limitante de este modelo fue el azúcar fermentable en el medio. Tal y como se observa en el Cuadro 6 el valor de  $K_s$  para el modelo cinético fue de  $2.84204 \text{ mg/células}$ . En el caso de  $K_s$ , mientras más pequeño sea el valor, mayor es la afinidad de los microorganismos al sustrato. El valor obtenido de  $K_s$  en el modelo fue bajo, lo que permite declarar que la afinidad del microorganismo al sustrato fue alta. Esto se ajusta muy bien a la literatura, ya que el sustrato de mayor afinidad para microorganismos fermentativos es el azúcar fermentable, tales como la glucosa, fructosa y sacarosa. Esto se debe principalmente a que el paso inicial de toda fermentación microbiana es la glucólisis, en donde el sustrato principal, tal y como sugiere su nombre, es la glucosa. Cabe mencionar que el valor de  $K_s$  fue determinado al llevar a cabo un ajuste de datos utilizando el programa analítico de Berkeley-Madonna.

Con respecto a  $C_s$ , este se calculó por medio de la ecuación 2 en donde participan datos experimentales de la concentración inicial de sustrato ( $C_{s0}$ ), concentración inicial de microorganismos ( $C_{x0}$ ), y el rendimiento celular, ( $Y_{x/s}$ ). La concentración inicial de sustrato se obtuvo por medio de la determinación de azúcares en el medio, la cual fue de  $2.3 \text{ \% (g/L)}$ , la concentración inicial de microorganismos en el medio se determinó utilizando un analizador de células Muse, con lo que se obtuvo un valor de 6300 células. Por el otro lado, el rendimiento celular, se calculó por medio de ajuste de curvas con el programa analítico de Berkeley-

Madonna, el cual dio un valor de 10888.39652 células/mg de sustrato, lo que se interpreta que por cada mg de sustrato consumido, se formó una cantidad de 10888.39652 células, el rendimiento es grande, por lo que se puede inferir que la mayor cantidad de sustrato se utilizó con el fin de aumentar la población celular. Por el otro lado, se calculó el valor del rendimiento de producto, el cual fue de 0.68037 mg de etanol/mg de sustrato, el cual demuestra que, por cada miligramo de sustrato consumido por las células, se produce 0.68037 mg de etanol. Este rendimiento no es del 100% debido a que parte del sustrato se utiliza para la formación de células nuevas en el medio, otra parte para la formación de otros productos fermentativos, tales como el CO<sub>2</sub> y otros ácidos orgánicos de la bebida, y otra fracción se utiliza para la importante tarea de llevar a cabo el mantenimiento celular.

Adicional a los parámetros ya discutidos previamente, se empleó el uso de una constante empírica de fermentación, la cual se utilizó con el fin de acoplar mejor el modelo cinético calculado, con el juego de datos experimentales de la fermentación. El valor de la constante empírica de fermentación (A) fue de 0.47705, la cual permitió obtener un modelo más aproximado a los datos experimentales obtenidos. El valor se obtuvo por medio de ajustes realizados por el programa analítico de Berkeley-Madonna.

Se llevaron a cabo múltiples intentos de ajuste de curvas en el modelo cinético escogido, con el fin de obtener el modelo más cercano posible a los datos experimentales de la fermentación. La cercanía del modelo se calculó como una diferencia de porcentaje de error entre los puntos experimentales de la concentración celular, concentración de sustrato y concentración de producto, a los valores correspondientes a la curva ajustada del modelo cinético. Tras múltiples intentos, se escogió el modelo y parámetros previamente discutidos, al haber obtenido el porcentaje de error más bajo encontrado. El porcentaje de error para la curva y datos experimentales del cambio en la concentración de células fue del 10%. Por el otro lado el porcentaje de error para la curva y datos experimentales del cambio en la concentración de sustrato fue del 4%. Finalmente, el porcentaje de error para la curva y datos experimentales del cambio en la concentración de producto fue del 4%. El porcentaje de error del modelo, para los tres juegos de datos experimentales fue del 6%. Un porcentaje de error del 6% es aceptable, ya que se recomienda en literatura que el porcentaje de error para modelos cinéticos no sea mayor al 10%.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Se identificó con técnicas de microbiología clásica la presencia de cinco diferentes microorganismos, los cuales fueron clasificados como levaduras. Además, se determinó que el microorganismo presente durante toda la fermentación fue el microorganismo identificado como microorganismo #1.
2. Se llevó a cabo la extracción, purificación y secuenciación del microorganismo identificado como microorganismo #1, determinando que la identidad a nivel de especie fue la levadura llamada *Wickerhamomyces anomalus* cepa CZS2-Y5. Con un ajuste genómico del 99%.
3. Se propuso un modelo cinético que se ajustó a los datos experimentales de microorganismos, sustratos y productos en fermentación, el cual se basa en el modelo de Monod, con parámetros cinéticos de  $\mu_{\max} = 0.83836 \text{ dia}^{-1}$  y  $K_s = 2.84202 \text{ mg/células}$ .
4. Se determinó que la bebida fermentada de Rosa de Jamaica estudiada posee limitadas posibilidades de tener capacidad probiótica debido a que el microorganismo fermentativo identificado en la bebida como *Wickerhamomyces anomalus* cepa CZS2-Y5, no tiene ningún efecto probiótico en el cuerpo. Y debido a que la concentración máxima de células obtenida en la fermentación no fue la requerida de acuerdo con FDA, para tener un efecto probiótico, ya que fue de  $4.60 \times 10^3$  células/mL siendo la cantidad requerida de entre  $10 \times 10^6$  y  $10 \times 10^8$  células/mL.

## IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda llevar a cabo fermentaciones adicionales, variando parámetros de temperatura y pH, con el fin de evaluar el efecto de estos parámetros en el crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de producto.
2. Se recomienda que, para futuras réplicas de este estudio, se incluya un estudio de microbiología clásica adicional de baterías bioquímicas, y pruebas de motilidad. Los estudios adicionales recomendados, permitirían una mejor clasificación de los microorganismos aislados de la bebida fermentada de Rosa de Jamaica, y una mejor identificación de los microorganismos seleccionados para estudios consecuentes de biología molecular.
3. Se recomienda llevar a cabo la determinación de la concentración de los compuestos antimicrobianos, de acetato de etilo, acetato de isoamilo y propionato de etilo, producidos por la cepa *Wickerhamomyces anomalus*, con el fin de evaluar la actividad antiséptica de la cepa *Wickerhamomyces anomalus* en la bebida fermentada de Rosa de Jamaica.
4. Se recomienda llevar a cabo la secuenciación de los otros 4 microorganismos hallados en la bebida fermentada de Rosa de Jamaica, para evaluar si alguno de ellos es considerado como microorganismo probiótico.
5. Al determinar que la concentración máxima de células en el medio no alcanzó la dosis establecida para considerar la bebida como un alimento probiótico, se recomienda llevar a cabo la investigación de una nueva formulación de la bebida, con un cultivo inicial de células adecuado, con el fin de alcanzar la concentración de células requerida.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. *Acid Bacteria*. 2001. Available online: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf) (accessed on 20 January 2014).
2. Aloisio, I.; Santini, C.; Biavati, B.; Dinelli, G.; Cencič, A.; Chingwaru, W.; Mogna, L.; Di Gioia, D. *Characterization of Bifidobacterium spp. strains for the treatment of enteric disorders in newborns. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 561–576.
3. AngaritaM, TorresM, DíazA. *Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev Habanera Ciencias Medicas.* 2017; *16*(5): 796–807.
4. Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R. (2012). *Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease*. Venezuela: Universidad Nacional Experimental.
5. Bauer, R.; du Toit, M.; Kossmann, J. *Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by Lactobacillus reuteri DSMZ 20016 and its accumulation by wine Lactobacilli. Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *137*, 28–31.
6. Behnsen, J.; Deriu, E.; Sassone-Corsi, M.; Raffatellu, M. *Probiotics: Properties, examples, and specific applications. Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, doi:10.1101/cshperspect.a010074.
7. Beltran-Debon, R., Alonso-Villaverde, C., Aragones, G., Rodriguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., et al. (2010). *The aqueous extract of Hibiscus sabdariffa calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. Phytomedicine*, *17*(3–4), 186–191.
8. C.-C. Chang, M.-H. Yang, H.-M. Wen, J.-C. Chern, *Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods, J. Food Drug Anal.* *10* (2002) 178–182.
9. Choi, C.H.; Jo, S.Y.; Park, H.J.; Chang, S.K.; Byeon, J.S.; Myung, S.J. *A randomized, double-blind, placebo-controlled multicenter trial of Saccharomyces boulardii in irritable bowel syndrome: Effect on quality of life. J. Clin. Gastroenterol.* **2011**, *45*, 679–683.
10. Christine; Funke, Berdell; Tortora, Gerard. *Microbiology An Introduction* (Tenth Edition)(2010)
11. Compare, D.; Nardone, G. *The role of gut microbiota in the pathogenesis and management of allergic diseases. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2013**, *17*, 11–17.
12. De Vuyst, L.; Van Kerrebroeck, S.; Harth, H.; Huys, G.; Daniel, H.M.; Weckx, S. *Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? Food Microbiol.* **2014**, *37*, 11–29.
13. Di Gioia, D.; Aloisio, I.; Mazzola, G.; Biavati, B. *Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 563–577.
14. Dirienzo, D.B. *Effect of probiotics on biomarkers of cardiovascular disease: implications for heart-healthy diets. Nutr Rev.* **2014**, *72*, 18–29.

15. Dylag, K.; Hubalewska-Mazgaj, M.; Surmiak, M.; Szmyd, J.; Brzozowski, T. *Probiotics in the mechanism of protection against gut inflammation and therapy of gastrointestinal disorders. Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 1149–1155.
16. EcoCrop. (2007). *Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa*. In *Food and Agriculture Organization of the UN (FAO)*.
17. Eggensperger, H., & Wilker, M. (1996). Hibiscus-Extrakt – Ein hautverträglicher Wirkstoffkomplex aus AHA's und Polysacchariden. *Parfumerie und Kosmetik*, *9*, 540–543.
18. Elazab, N.; Mendy, A.; Gasana, J.; Vieira, E.R.; Quizon, A.; Forno, E. *Probiotic administration in early life, atopy, and asthma: A meta-analysis of clinical trials. Pediatrics* **2013**, *132*, e666–e676.
19. Fijan, S.; Šostar-Turk, S. *Hospital textiles, are they a possible vehicle for healthcare-associated infections? Int. J. Environm. Res. Public Health* **2012**, *9*, 3330–3343.
20. Fitzpatrick, L.R. *Probiotics for the treatment of Clostridium difficile associated disease. World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **2013**, *4*, 47–52
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic
22. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization FAO/WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*; Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food: London, Ontario, Canada, 2002.
23. Gilliland, S., Morelli, L., & Reid, G. (2002). *Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para evaluación*. Ontario: FAO.
24. Gomez de la Torre JC. *Diagnostico molecular de enfer- medades infecciosas*. 2016.
25. Gruber, I.; Heudorf, U.; Werner, G.; Pfeifer, Y.; Imirzalioglu, C.; Ackermann, H.; Brandt, C.; Besier, S.; Wichelhaus, T.A. Multidrug-resistant bacteria in geriatric clinics, nursing homes, and ambulant care-prevalence and risk factors. *Int. J. Med. Microbiol.* **2013**, *303*, 405–409.
26. Guarner, F. Et Al. (2017). *Prebióticos y probióticos*. Madrid: WGO.
27. Hempel, S.; Newberry, S.J.; Maher, A.R.; Wang, Z.; Miles, J.N.; Shanman, R.; Johnsen, B.; Shekelle, P.G. *Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. JAMA* **2012**, *307*, 1959–1969.
28. Hennequin, C.; Kauffmann-Lacroix, C.; Jobert, A.; Viard, J.P.; Ricour, C.; Jacquemin, J.L.; Berche, P. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2000**, *19*, 16–20.
29. Hernandez, A. (2005). *Microbiología Industrial*. Madrid: EUNED.
30. Hidalgo-Villatoro, S. G., de León Cifuentes-Reyes, W. A., Ruano-Solís, H. H., & Cano-Castillo, L. E. (2009). *Caracterización de trece genotipos de rosaRosa de jamaica Hibiscus sabdariffa en Guatemala. agronomía mesoamericana*, *20*(1), 101-109.
31. Hosoi, T.; Hirose, R.; Saegusa, S.; Ametani, A.; Kiuchi, K.; Kaminogawa, S. *Cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells to the nonpathogenic bacterium Bacillus subtilis (natto). Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *82*, 255–264.

32. Huertas C, Urbano E, Torres M. *Diagnostico molecular una alternativa para la detección de patógenos en alimentos. Rev haban cienc méd. 2019; 18(3): 513–28.*
33. I.F.F. Benzie, J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, Anal. Biochem. 239 (1996) 70–76.*
34. *Identification of probiotic lactic acid bacteria strains. Mikrobiol Z. 2008, 70, 3–9.*
35. Ismail, A., Ikram, E. H. K., & Nazri, H. S. M. (2008). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition protein quality and health benefits. *Food, 2(1), 1–16.*
36. Johnston, B.C.; Goldenberg, J.Z.; Vandvik, P.O.; Sun, X.; Guyatt, G.H. *Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. Cochrane Database Syst. Rev. 2011, 11, CD004827, doi: 10.1002/14651858.CD004827.pub2.*
37. Kmonickova, E.; Kverka, M.; Tlaskalová-Hogenová, H.; Kostecka, P.; Zidek, Z. Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low-molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol Lett. 2012, 33, 166–172.*
38. Liaskovs'kyi, T.M.; Pidhors'kyi, V.S.; Kovalenko, N.K.; Harmasheva, I.L.; Muchnyk, F.V.
39. Lin MY, Yen CL, Chen SS. *Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. Dig Dis Sci 1998;43:133–7.*
40. Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; *et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2006, 103, 15611–15616.*
41. Marsh, A.J.; O'Sullivan, O.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. *Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. Food Microbiol. 2014, 38, 171–178.*
42. McClave, S.A.; Heyland, D.K.; Wischmeyer, P.E. Comment on: Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J. Parenter Enteral Nutr. 2009, 33, 444–446.*
43. McFarland, L.V. *Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel Med. Infect. Dis. 2007, 5, 97–105.*
44. McKay, D. (2009). *Can hibiscus tea lower blood pressure? AfroFood Industry Hi-Tech, 20(6), 40–42.*
45. Morton, J. F. (1987). *Fruits of warm climates.* Florida Flair Books.
46. N. Turkmen, F. Sari, Y.S. Velioglu, *Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods, Food Chem. 99 (2006) 835–841.*
47. Novick A (1955). *"Growth of Bacteria". Annual Review of Microbiology. 9: 97–110.*
48. Nwaiwu, N. E., Mshelia, F., & Raufu, I. A. (2012). *Antimicrobial activities of crude extract of Moringa Oleifera, Hibiscus sabdariffa and Hibiscus esculentus seeds against some enterobacteria. Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation, 1(1), 11–16.*

49. Nzikou, J. M., Bouanga-Kalou, G., Matos, L., Ganongo-Po, F. B., Mboungou-Mboussi, P. S., Moutoula, F. E., et al. (2011). *Characteristics and nutritional evaluation of seed oil from Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) in Congo-Brazzaville. Current Research Journal of Biological Sciences*, 3(2), 141–146.
50. P. Jamal, A.A. Barkat, A. Amid, *Distribution of phenolics in various Malaysian medicinal plants, J. Applied Sci.* 10 (2010) 2658–2662.
51. P. Stratil, B. Klejdus, V. Kubán, *Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals, Talanta* 71 (2007) 1741– 1751.
52. Pieniz, S.; Andrezza, R.; Pereira, J.Q.; de Oliveira Camargo, F.A.; Brandelli, A. *Production of selenium-enriched biomass by Enterococcus durans. Biol Trace. Elem. Res.* **2013**, 155, 447–454 , I.; El-Ghaish, S.; Ahmadova, A.; Batdorj, B.; Le Blay-Laliberté, G.; Barbier, G.; Haertlé, T.; Chobert, J.M. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Contr.* **2011**, 22, 2020–2027.
53. Plotto, A. (2004). *Hibiscus: post-production management for improved market access. In: Food and Agriculture Organization of the UN (FAO).*
54. Reena Patel, Aditi Patel, Dharmesh Vaghasiya and Anju Nagee Ashok and Rita Patel. *Antimicrobial Evaluation of Hibiscus rosa-sinensis plant extracts against Some Pathogenic Bacteria.* Institute of Integrated Study and Research in Biotechnology and Allied Sciences, New V.V. Nagar, 388 121, Gujarat, India
55. Reid, G. Microbiology: *Categorize probiotics to speed research. Nature* **2012**, 485, 446, doi:10.1038/485446a.
56. Rijkers, G.T.; De Vos, W.M.; Brummer, R.J.; Morelli, L.; Corthier, G.; Marteau, P. *Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. Br. J. Nutr.* **2011**, 106, 1291–1296.
57. Ross, I. A. (2003). *Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses (Vol. 1).* Humana Press Inc.
58. Ruiz, L.; Margolles, A.; Sánchez, B. *Bile resistance mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium. Front Microbiol.* **2013**, 4, 396, doi:10.3389/fmicb.2013.00396.
59. Sachdev, H.P.S.; Batish, V.K.; Kanagasabapathy, A.S.; Muthuswamy, V.; Kathuria, S.C.; et al. *ICMR-DBT guidelines for evaluation of probiotics in food. Indian J. Med. Res.* **2011**, 134, 22–25.
60. Saez, R. (2008). *Tratamiento de las enfermedades digestivas.* Madrid: Panamericana.
61. Salazar-González, C., Vergara-Balderas, F. T., Ortega-Regules, A. E., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2012). Antioxidant properties and color of Hibiscus sabdariffa extracts. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 39(1), 79-90.
62. Siragusa, S.; De Angelis, M.; Calasso, M.; Campanella, D.; Minervini, F.; Di Cagno, R.; Gobbetti, M. *Fermentation and proteome profiles of Lactobacillus plantarum strains during growth under food-like conditions. J. Proteomics.* **2013**, 96, 366–380.

63. Siragusa, S.; De Angelis, M.; Calasso, M.; Campanella, D.; Minervini, F.; Di Cagno, R.; Gobbetti, M. *Fermentation and proteome profiles of Lactobacillus plantarum strains during growth under food-like conditions. J. Proteomics.* **2013**, *96*, 366–380.
64. Specter, M. Germs are us. *Bacteria make us sick. Do they also keep us alive? New Yorker* **2012**, *22*, 32–39.
65. Spinosa, M.R.; Wallet, F.; Courcol, R.J.; Oggioni, M.R. *The trouble in tracing opportunistic pathogens: Cholangitis due to Bacillus in a French hospital caused by a strain related to an Italian probiotic? Microb. Ecol. Health Dis.* **2000**, *12*, 99–101.
66. Subramanian, S. S., & Nair, A. G. R. (1972). *Flavonoids of four malvaceous plants. Phytochemistry, 11(4), 1518–1519.*
67. Szajewska, H.; Mrukowicz, J. Meta-analysis: *Non-pathogenic yeast Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea. Aliment Pharmacol. Ther.* **2005**, *22*, 365–372.
68. Tulumoglu, S.; Yuksekdog, Z.N.; Beyatli, Y.; Simsek, O.; Cinar, B.; Yaşar, E. *Probiotic properties of Lactobacilli species isolated from children's feces. Anaerobe* **2013**, *24*, 36–42. Ganguly, N.K.; Bhattacharya, S.K.; Sesikeran, B.; Nair G.B.; Ramakrishna, B.S.;
69. V.L. Singleton, J.A. Rossi Jr., *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Am. J. Enol. Vitic.* *16* (1965) 144–158.
70. Walker, W.A. *Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. Ann. Nutr. Metab.* **2013**, *63*, 8–15.
71. Walter, J. *Ecological role of Lactobacilli in the gastrointestinal tract: Implications for fundamental and biomedical research. Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4985–4996.
72. Wang, M. L., Morris, B., Tonnis, B., Davis, J., & Pederson, G. A. (2012). *Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically important Hibiscus species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(26), 6620–6626.*
73. Yang, X.; Wang, Y.; Huo, G. *Complete Genome Sequence of Lactococcus lactis subsp. lactis KLDS4.0325. Genome Announc.* **2013**, *1*, doi:10.1128/genomeA.00962-13.
74. Zelaya, H.; Tsukida, K.; Chiba, E.; Marranzino, G.; Alvarez, S.; Kitazawa, H.; Agüero, G.; Villena, J. *Immunobiotic Lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. Int. Immunopharmacol.* **2014**, *19*, 161–173.
75. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 'T Riet K (1990). *"Modeling of the Bacterial Growth Curve". Applied and Environmental Microbiology.* *56* (6): 1875–1881.

# XI. ANEXOS

## 1. Microbiología clásica

Figura 19. Placas con medio PDA

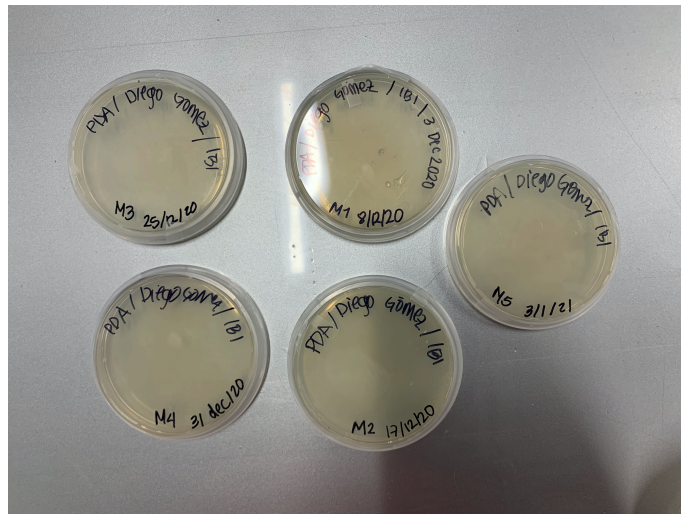
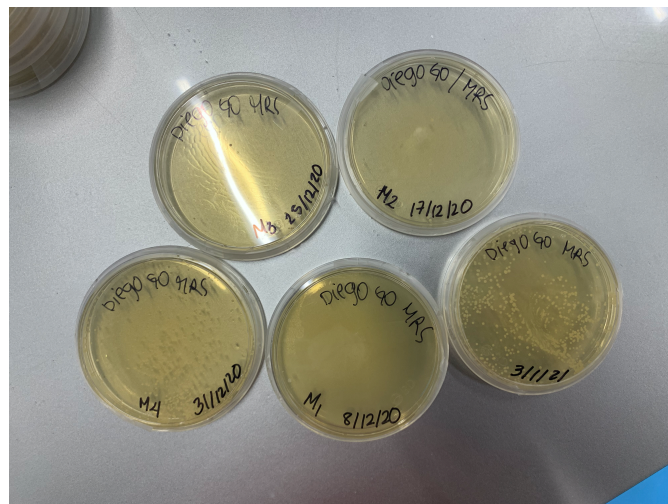
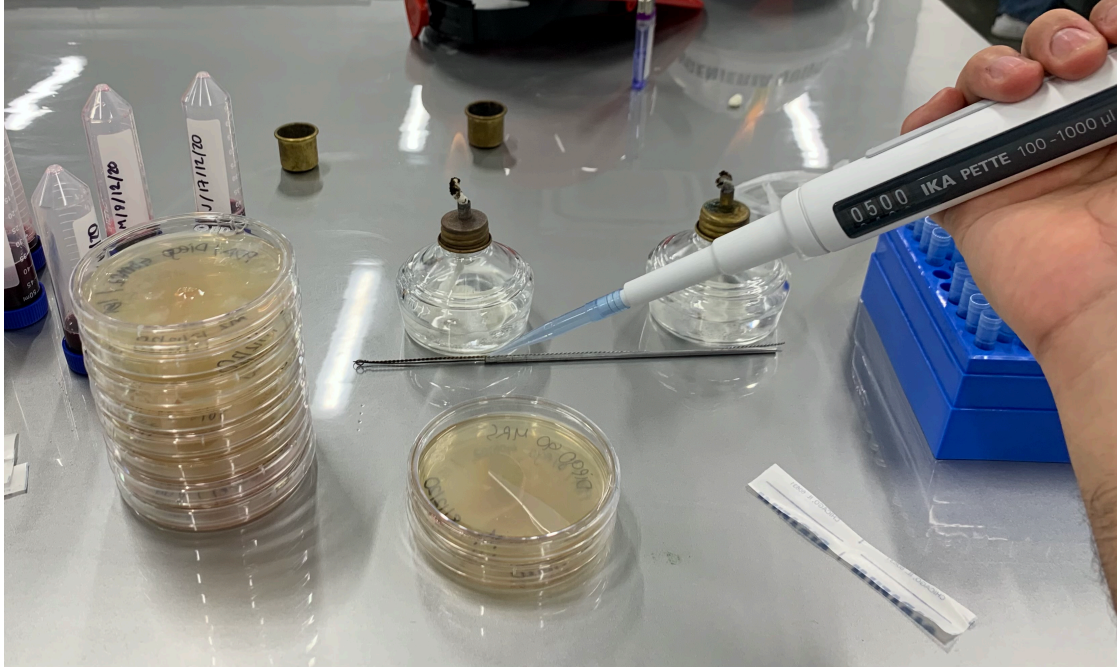


Figura 20. Placas con medio MRS



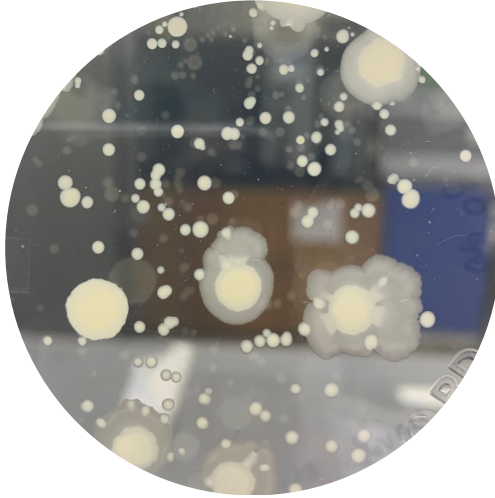
**Figura 21. Reactivos y equipo para inoculación de microorganismos en el medio**



**Figura 22. Reactivos de Tinción Gram y azul de Lactofenol**

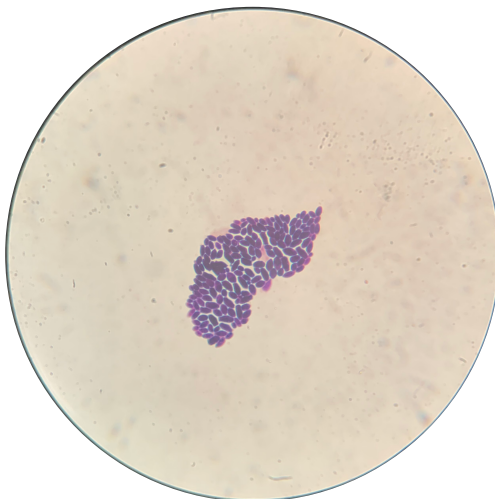


**Figura 23 Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa Petri con medio nutritivo después de 24 horas de incubación a 37 °C**



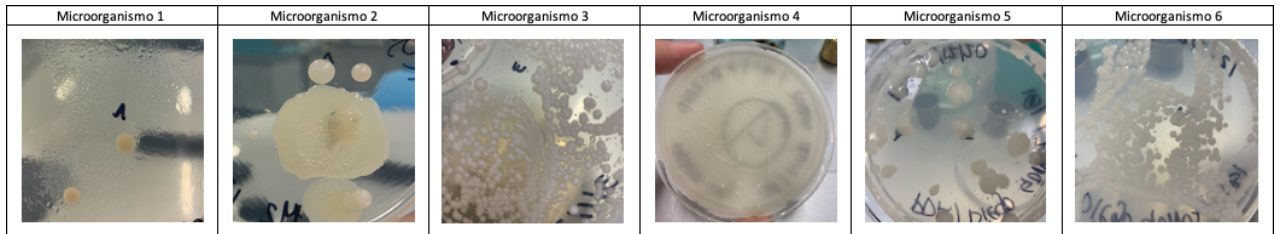
\*El inóculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500 µl. El inóculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000 µl. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 8 de diciembre de 2020, la cual corresponde al primer día de fermentación.

**Figura 24: Tinción de Gram en el microorganismo aislado en medio nutritivo**



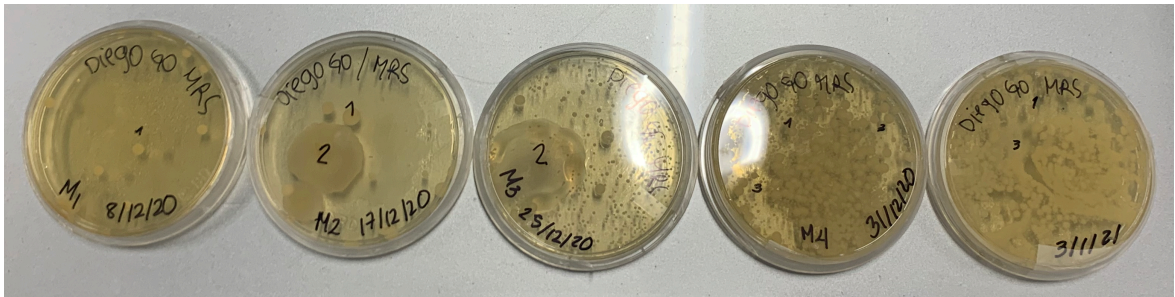
\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

**Cuadro 7: Identificación de microorganismos con numerales de acuerdo con la morfología, aspecto y tamaño de colonia**



\*La clasificación de los microorganismos encontrados fue realizada de acuerdo con el tamaño, forma, color y aspecto de las colonias microbianas.

**Figura 25: Diversidad microbiológica en medio MRS con relación al tiempo de la fermentación**



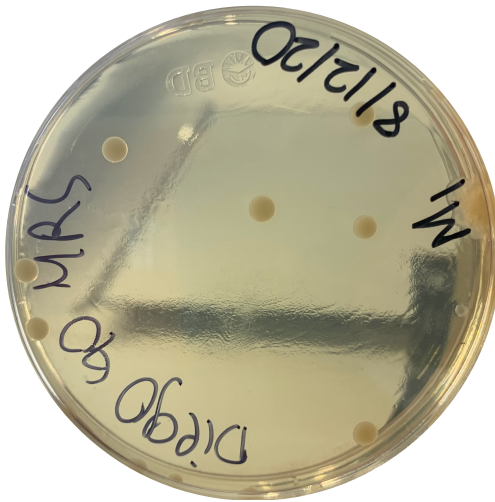
\*Esta figura muestra la diversidad de colonias en medio MRS, con respecto al tiempo, en las fechas de: 08/12/2020; 17/12/2020; 25/12/2020; 31/12/2020 y 03/01/2021.

**Figura 26: Diversidad microbiológica en medio PDA con relación al tiempo de la fermentación**



\*Esta figura muestra la diversidad de colonias en medio PDA, con respecto al tiempo, en las fechas de: 08/12/2020; 17/12/2020; 25/12/2020; 31/12/2020 y 03/01/2021.

**Figura 27: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C**



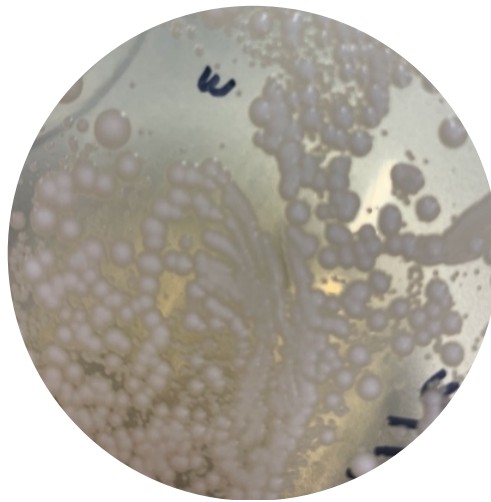
\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 8 de diciembre de 2020, la cual corresponde al primer día de fermentación.

**Figura 28: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C**



\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 17 de diciembre de 2020, la cual corresponde al décimo día de fermentación.

**Figura 29: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C**



\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 25 de diciembre de 2020, la cual corresponde al décimo octavo día de fermentación.

**Figura 30: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C**



\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 31 de diciembre de 2020, la cual corresponde al vigésimo cuarto día de fermentación.

**Figura 31: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio MRS después de 24 horas de incubación a 37 °C**



\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 3 de enero de 2021, la cual corresponde al vigésimo séptimo día de fermentación.

**Figura 32: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C**



\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 8 de diciembre de 2020, la cual corresponde al primer día de fermentación.

**Figura 33: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C**



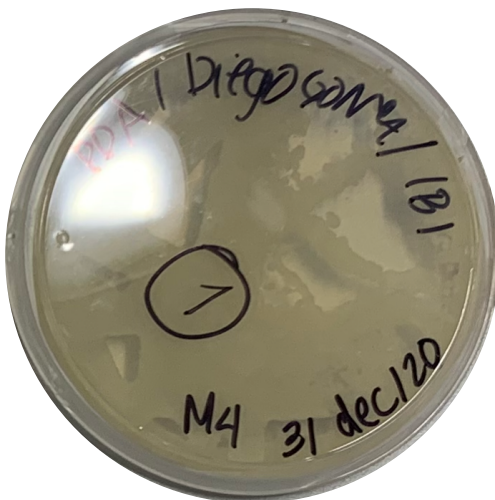
\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 17 de diciembre de 2020, la cual corresponde al décimo día de fermentación.

**Figura 34: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C**



\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 25 de diciembre de 2020, la cual corresponde al décimo octavo día de fermentación.

**Figura 35: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C**



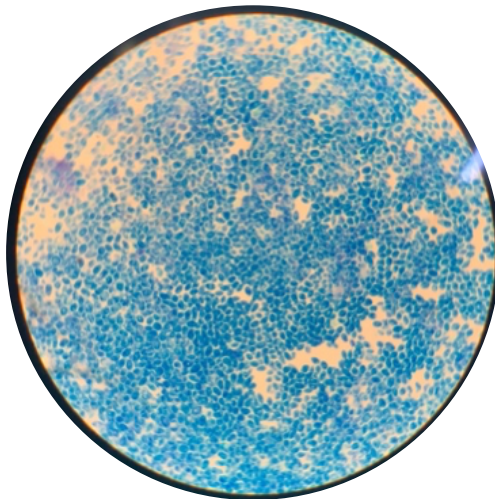
\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 31 de diciembre de 2020, la cual corresponde al vigésimo cuarto día de fermentación.

**Figura 36: Morfología de colonia inoculada con bebida fermentada de Rosa de Jamaica en placa petri con medio PDA después de 24 horas de incubación a 24°C**



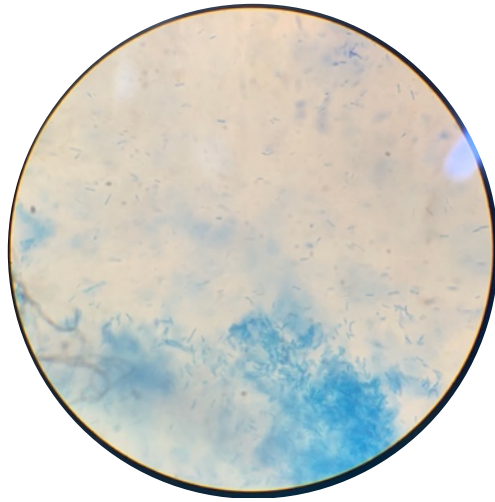
\*El inculo de bebida fermentada de Rosa de Jamaica fue de 500  $\mu$ l. El inculo se llevó a cabo con una micropipeta de 1000  $\mu$ l. La muestra de bebida inoculada tiene fecha del 3 de enero de 2021, la cual corresponde al vigésimo séptimo día de fermentación.

**Figura 37: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 1**



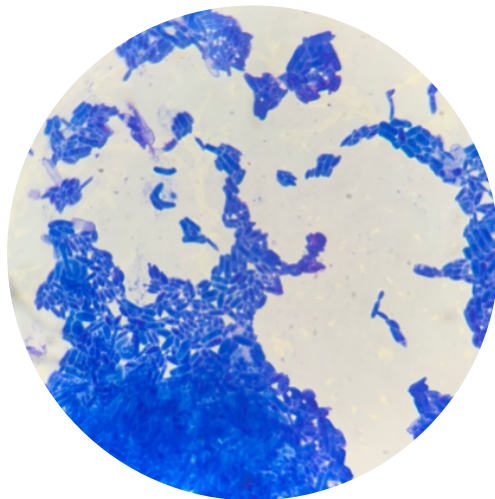
\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

**Figura 38: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 2**



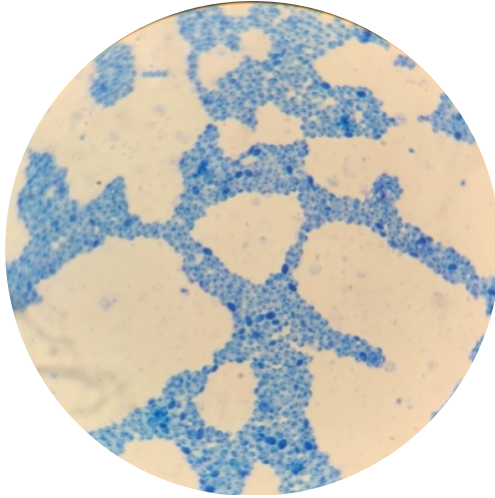
\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

**Figura 39: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 3**



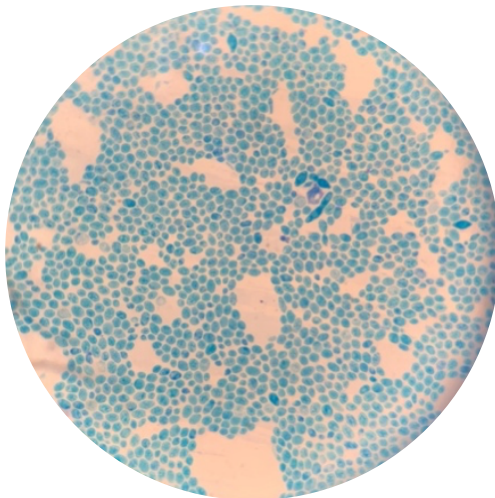
\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

**Figura 40: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 4**



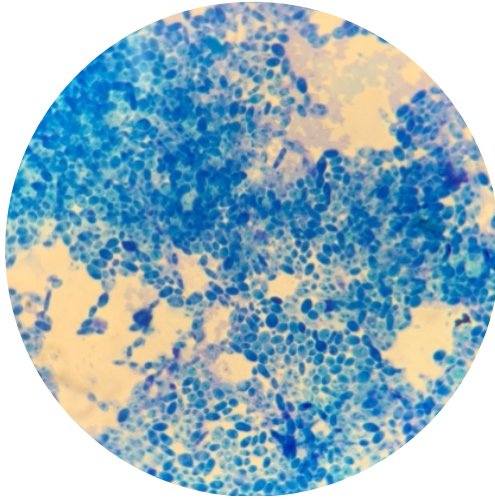
\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

**Figura 41: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 5**



\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

**Figura 42: Tinción de azul de lactofenol en el microorganismo 6**



\*Se utilizó un microscopio en objetivo 100X con aceite de inmersión.

## **2. Análisis de biología molecular**

**Figura 43. Preparación de muestras para análisis de biología molecular**



**Figura 44. Selección de los iniciadores para la reacción de polimerasa en cadena**

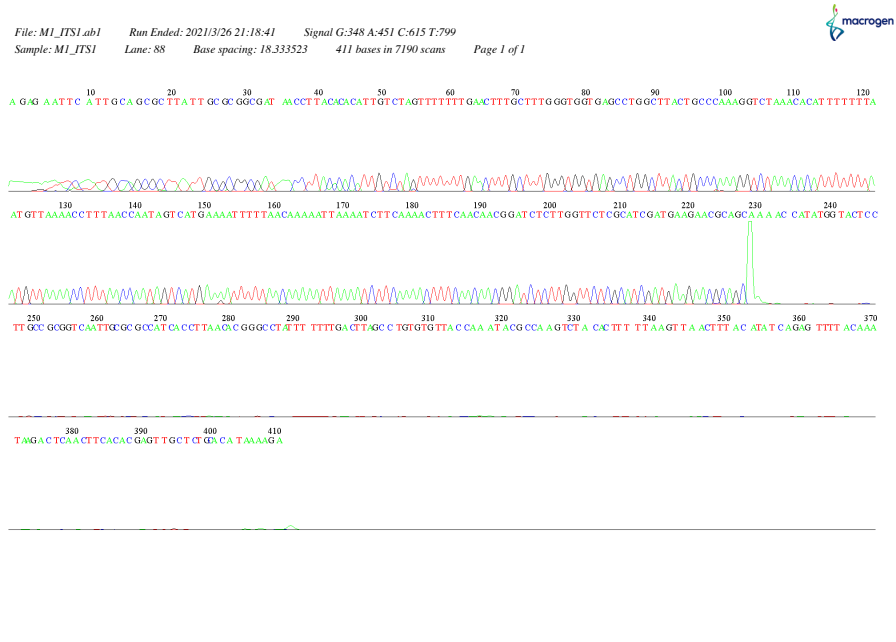
#	Primer Name	Type	Sequence
1	ITS1	Universal	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
2	ITS2	Universal	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

**Cuadro 8: Secuencia de nucleótidos en la región ITS (Espaciador transcrito interno) en formato FASTA**

Secuencia de nucleótidos en la región ITS
AGAGAATTCATTGCAGCGCTTATTGCGCGGCGATAACCTTACACACATTG TCTAGTTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCA AAGGTCTAAACACATTTTTTTAATGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATG AAAATTTTAAACAAAATTAAAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTC TTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAACCATATGGTACTCCTTG CCGCGGTCAATTGCGCGCCATCACCTAACACGGGCCTATTTTTTTGACT TAGCCTGTGTGTTACCAAATACGCCAAGTCTACACTTTTTAAGTAACTT TACATATCAGAGTTTTACAAATAAGACTCAACTTCACACGAGTTGCTCTG CACATAAAAGA

\*En donde A es Adenina, G es Guanina, T es Timina, y C es Citosina.

**Figura 45: Cromatograma de la secuenciación sanger efectuada en el ADN extraído del microorganismo responsable de la fermentación en la bebida de Rosa de Jamaica.**



\*En donde A es Adenina, G es Guanina, T es Timina, y C es Citosina

Figura 46. Información de la cepa en la NCBI

## Wickerhamomyces anomalus strain CZS2-Y5 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: JQ241273.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS JQ241273 232 bp DNA linear PLN 26-MAR-2012  
DEFINITION Wickerhamomyces anomalus strain CZS2-Y5 internal transcribed spacer  
1 and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION JQ241273  
VERSION JQ241273.1  
KEYWORDS .  
SOURCE Wickerhamomyces anomalus  
ORGANISM [Wickerhamomyces anomalus](#)  
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina;  
Saccharomycetes; Saccharomycetales; Phaffomycetaceae;  
Wickerhamomyces.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 232)  
AUTHORS Hemalatha,B.N., Venkatesan,T., Jalali,S.K. and Sriram,S.  
TITLE Studies on endosymbionts of Chrysoperla zastrowi sillemi  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 232)  
AUTHORS Hemalatha,B.N., Venkatesan,T., Jalali,S.K. and Sriram,S.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (06-DEC-2011) Biotechnology, NBAIL, Bellary Road, Hebbal,  
Bangalore, Karnataka 560024, India  
FEATURES  
source Location/Qualifiers  
1..232  
/organism="Wickerhamomyces anomalus"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="CZS2-Y5"  
/isolation\_source="gut"  
/host="Chrysoperla zastrowi sillemi"  
/db\_xref="taxon:4927"  
/note="PCR\_primers=fwd\_name: its-1f, rev\_name: its-1r"  
[misc\\_RNA](#)  
<1..>232  
/note="contains internal transcribed spacer 1 and 5.8S  
ribosomal RNA"  
ORIGIN  
1 gttggattca ttgcagcgt tattgcgcg cgataaacct tacacacatt gtctagtttt  
61 tttgaacttt gctttgggtg gtgagcctgg cttactgcc aaaggtctaa acacatTTTT  
121 ttaatgttaa aacctttaac caatagtcac gaaaatTTTT aacaaaaatt aaaatcttca  
181 aaactttcaa caacggatct cttggttctc gcatcgatga agaacgcagc ca  
//

Figura 47. Secuencias con alineaciones significativas al resultado obtenido

Sequences producing significant alignments:			(Bits)	Value
<a href="#">JQ241273.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain CZS2-Y5 internal tran...	<a href="#">409</a>	4e-110	
<a href="#">JQ241272.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain CZS2-Y4 internal tran...	<a href="#">407</a>	1e-109	
<a href="#">AB467307.1</a>	Pichia anomala gene for ITS1, strain: TL0202	<a href="#">407</a>	1e-109	
<a href="#">KC462060.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain BKR2 internal transcr...	<a href="#">401</a>	6e-108	
<a href="#">AB467305.1</a>	Pichia anomala gene for ITS1, strain: TL0903	<a href="#">401</a>	6e-108	
<a href="#">KF728776.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate B-NC-12-OM14 interna...	<a href="#">399</a>	2e-107	
<a href="#">KM603609.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate F4 internal transcri...	<a href="#">398</a>	8e-107	
<a href="#">KM603604.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate F3 internal transcri...	<a href="#">398</a>	8e-107	
<a href="#">KM603601.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate F2 internal transcri...	<a href="#">398</a>	8e-107	
<a href="#">JN835453.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate 6H1 18S ribosomal RN...	<a href="#">398</a>	8e-107	
<a href="#">KP238319.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate H2 internal transcri...	<a href="#">396</a>	3e-106	
<a href="#">AB467306.1</a>	Pichia anomala gene for ITS1, strain: TL1002	<a href="#">396</a>	3e-106	
<a href="#">AF335926.1</a>	Pichia anomala strain CBS 605 18S ribosomal RNA gene,...	<a href="#">396</a>	3e-106	
<a href="#">KX422803.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate FET-TEZU internal tr...	<a href="#">394</a>	1e-105	
<a href="#">KY209903.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain MGR 6 internal transc...	<a href="#">394</a>	1e-105	
<a href="#">KU522146.1</a>	Wickerhamomyces anomalus internal transcribed spacer ...	<a href="#">394</a>	1e-105	
<a href="#">KC544480.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate B-WHX-12-11 internal...	<a href="#">394</a>	1e-105	
<a href="#">JF300165.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate PYDP1 internal trans...	<a href="#">394</a>	1e-105	
<a href="#">KY605162.1</a>	[Candida] membranifaciens strain ASY4 internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY657575.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate MY-Cal4 internal tra...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105874.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate MY-Cal3 internal tra...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KX253664.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain VIT-ASN01 18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KX887501.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain 183 small subunit rib...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105895.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:251 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105893.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:1981 ...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105892.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:1772 ...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105889.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:2576 ...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105883.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:260 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105882.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:259 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105876.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:113 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105875.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:606 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105874.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:5702 ...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105871.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:247 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105870.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:2230 ...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105867.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:257 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105864.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:8125 ...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105862.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:250 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105861.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:605 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KY105854.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:248 s...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KU962018.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain AMC_WA005 internal tr...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KU962017.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain AMC_WA004 internal tr...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KU962016.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain AMC_WA003 internal tr...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KU962015.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain AMC_WA002 internal tr...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KU962014.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain AMC_WA001 internal tr...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KX766197.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain JG-10 18S ribosomal R...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KU052060.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain 09TJ067 internal tran...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KT883963.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain IHZ 18S ribosomal RNA...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">LC120363.1</a>	Wickerhamomyces anomalus genes for 18S rRNA, ITS1, 5...	<a href="#">392</a>	4e-105	
<a href="#">KM580797.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate WA92_CNA 18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105	

<a href="#">KT580795.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	WA45-CN4	18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KT580793.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	WA40-CN4	18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KT175181.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	16	internal transcri...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KT175180.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	14	18S ribosomal RNA...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KR024781.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	YE06	18S ribosomal RN...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KJ451674.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	LMICRO150	18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KT207144.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	DBAI17	18S ribosomal ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP269059.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	OUCMBI110149	internal...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KM384612.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	yHBJ2	internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KJ816901.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	9871	internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP710194.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	API-1	18S ribosomal R...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP675493.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	M297B	internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP675055.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	H318B	internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP675054.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	H318A	internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP132889.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	WM 02.425	isolate ISH...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP132887.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	PMM10-516L	isolate IS...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP132886.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	PMM10-1024113L	isolat...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP132885.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	PMM08-751L	isolate IS...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KP132884.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	PMM08-1902L	isolate I...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KM368826.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	voucher	UFLA FFT5.1	internal...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KM402087.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	UFLA CWFY49	18S ribos...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KM402085.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	UFLA CWFY47	internal ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KM246175.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	AM20	18S ribosomal R...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">LK392318.1</a>	Pichia anomala	genomic DNA	containing	ITS1, 5.8S	rRNA...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KJ527055.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	Y22-I	internal transcr...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KJ502663.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	YN4	18S ribosomal RN...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KJ502660.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	YN1	18S ribosomal RN...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KF057708.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	LL11_035	internal tra...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KF057582.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	LL11_091	18S ribosoma...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KC568565.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	40	18S ribosomal RNA ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">JN016738.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	DMic 113926	internal ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">JN562719.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	NRRL Y-1785	internal ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">JN942844.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	DAOM 216362	internal ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">JN210893.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate	Tcy27	18S ribosomal ...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">HM601458.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	Tcy3	18S ribosomal RN...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">HQ631071.1</a>	Pichia sp. 1	TMS-2011	voucher	SC9d50p12-4	18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">FN868149.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA	containing	18S r...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">FN394001.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	18S rRNA	gene (partial),	ITS...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">GU133332.1</a>	Wickerhamomyces	sp. ZMS4	18S ribosomal	RNA gene, part...		<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">GQ376075.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	UOA/HCPF 2651	isolate...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">GQ280811.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	EG2	18S ribosomal RNA...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">FJ515180.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	SM19	18S ribosomal RN...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">EU343844.1</a>	Candida membranifaciens	strain	MUCL	30392	18S ribosom...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">AB469881.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genes for	18S rRNA, ITS1, 5....		<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">EU380207.1</a>	Pichia anomala	isolate	0732-1	18S ribosomal RNA gene...		<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">DQ249195.2</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	WM 825	isolate ISHAM...	<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">AY231606.1</a>	Pichia anomala	strain	MTCC 237	18S ribosomal RNA gene...		<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">AF270936.1</a>	Pichia anomala	18S ribosomal	RNA gene, partial	sequen...		<a href="#">392</a>	4e-105
<a href="#">KT809049.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	F20	18S ribosomal RNA...	<a href="#">390</a>	1e-104
<a href="#">KJ527063.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	Y38-I	internal transcr...	<a href="#">390</a>	1e-104
<a href="#">KF057684.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	LL12_076	internal tra...	<a href="#">390</a>	1e-104
<a href="#">KF057675.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	LL12_075	internal tra...	<a href="#">390</a>	1e-104
<a href="#">KC408984.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	L7713	isolate ISHAM-I...	<a href="#">390</a>	1e-104
<a href="#">JF416789.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	Tcy25	internal transcr...	<a href="#">390</a>	1e-104
<a href="#">HM601460.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain	Czsy17	18S ribosomal ...	<a href="#">390</a>	1e-104

<a href="#">LN871206.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA sequence contain...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">LN871205.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA sequence contain...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">LN871204.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA sequence contain...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT175201.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate 54 18S ribosomal RNA...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KJ451711.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate LMICRO187 18S riboso...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207256.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBH77 18S ribosomal R...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207087.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAH16 internal trans...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207056.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK9 18S ribosomal R...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207053.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK3 18S ribosomal R...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207052.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK1 18S ribosomal R...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207050.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAJ78 18S ribosomal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207047.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK46 internal trans...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207046.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK44 internal trans...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207045.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK42 18S ribosomal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207044.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK41 18S ribosomal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207043.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBAK40 18S ribosomal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207036.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBM73 18S ribosomal R...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KT207024.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBM78 internal transc...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KP638728.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate CAT 1 L1 18S ribosom...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384621.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHRM29 internal trans...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384620.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHRM12 internal trans...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384618.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHKS400 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384617.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHKS399 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384616.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHKS398 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384615.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHKS397 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384614.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHKS235 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM384613.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain yHBJ18 internal trans...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KP132883.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain IHEM 4425 isolate ISH...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KP132882.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain IHEM 10271 isolate IS...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KP132881.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain IHEM 10268 isolate IS...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KP132880.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain IHEM 10262 isolate IS...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KP069017.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain WM 05.34 isolate ISHA...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KM402086.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain UFLA CWFY48 internal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KJ706464.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DBMY247 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KJ706399.1</a>	Candida membranifaciens	strain	DBMY181 18S ribosomal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KJ502666.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate YN7 18S ribosomal RN...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KJ659884.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	18S ribosomal RNA gene, part...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KF057651.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain LL12_045 internal tra...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KF057650.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain LL12_044 internal tra...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">KF057520.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain LL12_037 internal tra...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">JX174410.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	isolate KDLYL8-1 18S ribosom...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">JN016737.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain DMic 113925 internal ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">JN839959.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain SX1 18S ribosomal RNA...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">FN556015.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA containing ITS1 ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">FN556014.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA containing ITS1 ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">FN556013.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	genomic DNA containing ITS1 ...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">JF781436.1</a>	Zygosaccharomyces	sp. H5Y25	internal transcribed spac...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">JN944023.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain WM 03.6 internal tran...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">HQ696994.1</a>	Wickerhamomyces	sp. Tcyl0	internal transcribed spacer...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">EF568036.1</a>	Wickerhamomyces	anomalus	strain WM 1039 isolate ISHAM...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">FJ176542.1</a>	Uncultured eukaryote	clone FS2_2_12	18S ribosomal RNA...	<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">AM711382.1</a>	Uncultured compost fungus	partial 18S rRNA gene, ITS1...		<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">EU330185.1</a>	Pichia anomala	internal transcribed spacer 1, partial...		<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">AY349443.1</a>	Pichia anomala	isolate P7 18S ribosomal RNA gene, par...		<a href="#">387</a>	2e-103
<a href="#">AY231612.1</a>	Pichia anomala	strain MTCC 3815	18S ribosomal RNA gen...	<a href="#">387</a>	2e-103

<a href="#">KU949596.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate QAUWA03 internal tra...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">KT580792.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate WA40-CN1 internal tr...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">KM374065.1</a>	Fungal sp. 107 MCS-2014 internal transcribed spacer 1...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">KJ527065.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y40-I internal transc...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">KJ527061.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y36-I internal transc...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">KJ527047.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y5-I internal transcr...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">JN811059.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain UPM01-09 18S ribosoma...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">NR_111210.1</a>	Wickerhamomyces anomalus CBS 5759 ITS region; from T...	<a href="#">385</a>	6e-103
<a href="#">KC812504.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain MOS2958 internal tran...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">KR909092.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain 73 CF01 18S ribosomal...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">KT207128.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain DBY71 internal transc...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">JF781453.1</a>	Wickerhamomyces sp. H6Y19 internal transcribed spacer...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">JF781448.1</a>	Wickerhamomyces sp. Z5Y39 internal transcribed spacer...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">JF781442.1</a>	Wickerhamomyces sp. W8Y6 internal transcribed spacer ...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">JF781435.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y10 internal transcribed spacer...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">JF781401.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y11 internal transcribed spacer...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">JF781399.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y3 internal transcribed spacer ...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">AF321543.1</a>	Pichia anomala 18S ribosomal RNA gene, partial sequen...	<a href="#">383</a>	2e-102
<a href="#">KX904346.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain ADJ2 small subunit ri...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KP638741.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate 103 3 L1 internal tr...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KM374164.1</a>	Fungal sp. 9 MCS-2014 internal transcribed spacer 1, ...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KM374161.1</a>	Fungal sp. 2 MCS-2014 internal transcribed spacer 1, ...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KJ706941.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain DBMY724 18S ribosomal...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KJ706876.1</a>	Candida membranifaciens strain DBMY659 18S ribosomal ...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KJ527050.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y12-I internal transc...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KF984346.1</a>	Uncultured Wickerhamomyces clone LZQZ-19 18S ribosoma...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KF057596.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain LL11_104 18S ribosoma...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">GU941361.1</a>	Uncultured eukaryote clone N205T_217 18S ribosomal RN...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">DO534406.1</a>	Pichia anomala strain YF07b 18S ribosomal RNA gene, p...	<a href="#">381</a>	8e-102
<a href="#">KY626331.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain CHX39 small subunit r...	<a href="#">379</a>	3e-101
<a href="#">KY605149.1</a>	[Candida] membranifaciens strain STY3 internal transc...	<a href="#">379</a>	3e-101
<a href="#">JF781444.1</a>	Wickerhamomyces sp. Z4Y32 internal transcribed spacer...	<a href="#">379</a>	3e-101
<a href="#">KY605151.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain KY8 internal transcri...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">KM603618.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate F5 internal transcri...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">KM374072.1</a>	Fungal sp. 124 MCS-2014 internal transcribed spacer 1...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">HF952836.1</a>	Wickerhamomyces anomalus partial 26S rRNA gene, isola...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">JF781439.1</a>	Wickerhamomyces sp. S522Y18 internal transcribed spac...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">JF781431.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y7 internal transcribed spacer ...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">JF781398.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y1 internal transcribed spacer ...	<a href="#">377</a>	1e-100
<a href="#">KU147493.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate QY11 internal transc...	<a href="#">375</a>	4e-100
<a href="#">KM374244.1</a>	Fungal sp. 499 MCS-2014 internal transcribed spacer 1...	<a href="#">375</a>	4e-100
<a href="#">JF781429.1</a>	Wickerhamomyces sp. S542Y40 internal transcribed spac...	<a href="#">375</a>	4e-100
<a href="#">EU409802.1</a>	Wickerhamomyces anomalus internal transcribed spacer ...	<a href="#">375</a>	4e-100
<a href="#">KU301793.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain XS-1 internal transcr...	<a href="#">374</a>	1e-99
<a href="#">JQ857021.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate H1Wh internal transc...	<a href="#">374</a>	1e-99
<a href="#">JF416788.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain TcAP1 internal transc...	<a href="#">374</a>	1e-99
<a href="#">KM603603.1</a>	Saccharomyces cerevisiae isolate E1 internal transcri...	<a href="#">372</a>	5e-99
<a href="#">HF952837.1</a>	Wickerhamomyces anomalus partial 26S rRNA gene, isola...	<a href="#">372</a>	5e-99
<a href="#">JX679223.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain BCRC 20857 internal t...	<a href="#">372</a>	5e-99
<a href="#">KT175179.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate 13 18S ribosomal RNA...	<a href="#">370</a>	2e-98
<a href="#">KM374162.1</a>	Fungal sp. 3 MCS-2014 internal transcribed spacer 1, ...	<a href="#">370</a>	2e-98
<a href="#">HF952838.2</a>	Wickerhamomyces anomalus partial 26S rRNA gene, isola...	<a href="#">370</a>	2e-98
<a href="#">JF781411.1</a>	Wickerhamomyces sp. Z5Y38 internal transcribed spacer...	<a href="#">370</a>	2e-98
<a href="#">JF781492.1</a>	Wickerhamomyces sp. S532Y19 internal transcribed spac...	<a href="#">368</a>	6e-98
<a href="#">JF781480.1</a>	Wickerhamomyces sp. Z8Y23 internal transcribed spacer...	<a href="#">368</a>	6e-98

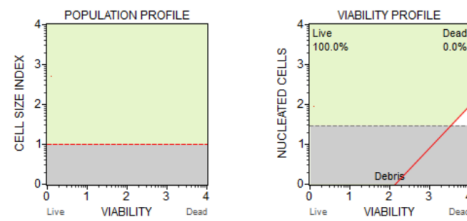
<a href="#">JF781470.1</a>	Wickerhamomyces sp. S512Y39 internal transcribed spac...	<a href="#">368</a>	6e-98
<a href="#">KY626330.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain STY49 small subunit r...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">KY605160.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain ASY7 small subunit ri...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">KY605142.1</a>	[Candida] membranifaciens strain CHY38 small subunit ...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">JF781458.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y2 internal transcribed spacer ...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">JF781452.1</a>	Wickerhamomyces sp. W8Y13 internal transcribed spacer...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">JF781433.1</a>	Wickerhamomyces sp. Z9Y6 internal transcribed spacer ...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">JN209855.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate TKH2A13 internal tra...	<a href="#">366</a>	2e-97
<a href="#">MF398485.1</a>	Uncultured eukaryote isolate DGGE gel band H internal...	<a href="#">364</a>	8e-97
<a href="#">GO466356.1</a>	Wickerhamomyces anomalus internal transcribed spacer ...	<a href="#">364</a>	8e-97
<a href="#">KY605152.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain KY20 internal transcr...	<a href="#">363</a>	3e-96
<a href="#">JX188244.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain P01A017 internal tran...	<a href="#">363</a>	3e-96
<a href="#">JF781467.1</a>	Wickerhamomyces sp. H1Y23 internal transcribed spacer...	<a href="#">363</a>	3e-96
<a href="#">KY605153.1</a>	[Candida] membranifaciens strain GMY1 internal transc...	<a href="#">361</a>	1e-95
<a href="#">KY605145.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain SYY6 small subunit ri...	<a href="#">361</a>	1e-95
<a href="#">KU892651.1</a>	Wickerhamomyces anomalus voucher UFLA YRCS72 internal...	<a href="#">361</a>	1e-95
<a href="#">KU892650.1</a>	Wickerhamomyces anomalus voucher UFLA YRCS71 internal...	<a href="#">361</a>	1e-95
<a href="#">JF781456.1</a>	Wickerhamomyces sp. H9Y12 internal transcribed spacer...	<a href="#">361</a>	1e-95
<a href="#">KY626334.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain CHY22 small subunit r...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">KY626333.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain STY20 small subunit r...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">KU892648.1</a>	Wickerhamomyces anomalus voucher UFLA YRCS45 internal...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">KR935449.1</a>	Uncultured fungus clone OTU_195 18S ribosomal RNA gen...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">KJ706782.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain DBMY565 18S ribosomal...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">KJ706717.1</a>	Candida membranifaciens strain DBMY500 18S ribosomal ...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">JF781475.1</a>	Wickerhamomyces sp. H4Y33 internal transcribed spacer...	<a href="#">359</a>	4e-95
<a href="#">KM603607.1</a>	Saccharomyces cerevisiae isolate E7 internal transcri...	<a href="#">357</a>	1e-94
<a href="#">KM402066.1</a>	Galactomyces candidum strain UFLA CWFY28 18S ribosoma...	<a href="#">357</a>	1e-94
<a href="#">KC597821.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain KY1 internal transcri...	<a href="#">357</a>	1e-94
<a href="#">JN887370.1</a>	Saccharomyces cerevisiae/ Pachysolen tannophilus fusa...	<a href="#">357</a>	1e-94
<a href="#">HM754427.1</a>	Uncultured fungus clone FGS3 18S ribosomal RNA gene, ...	<a href="#">357</a>	1e-94
<a href="#">JF781489.1</a>	Wickerhamomyces sp. Z8Y28 internal transcribed spacer...	<a href="#">355</a>	5e-94
<a href="#">JF781465.1</a>	Wickerhamomyces sp. W8Y5 internal transcribed spacer ...	<a href="#">355</a>	5e-94
<a href="#">KY626332.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain STY53 small subunit r...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KY605161.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain CHX26 small subunit r...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KY105879.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:1667 ...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KY105853.1</a>	Wickerhamomyces anomalus culture-collection CBS:262 s...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KY073538.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate US-Y-6 internal tran...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KY073537.1</a>	Wickerhamomyces anomalus isolate US-Y-5 internal tran...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KX175688.1</a>	Uncultured fungus clone Otul365 internal transcribed ...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KU892647.1</a>	Wickerhamomyces anomalus voucher UFLA YRCS32 internal...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KR080291.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain varun 18S ribosomal R...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KU218509.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain NCIM 3341 18S ribosom...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KM374062.1</a>	Fungal sp. 8 MCS-2014 internal transcribed spacer 1, ...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KJ706623.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain DBMY406 internal tran...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KJ706558.1</a>	Candida membranifaciens strain DBMY341 18S ribosomal ...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">JX188246.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain RChB001 small subunit...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">JX188245.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain P42B001 small subunit...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KC515371.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Sc17 18S ribosomal RN...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">JX566694.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y197-13 internal tran...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">FJ865436.1</a>	Pichia anomala isolate M10 18S ribosomal RNA gene, pa...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">AY231607.1</a>	Pichia anomala strain MTCC 462 18S ribosomal RNA gene...	<a href="#">353</a>	2e-93
<a href="#">KU892649.1</a>	Wickerhamomyces anomalus voucher UFLA YRCS46 internal...	<a href="#">351</a>	6e-93
<a href="#">KT809091.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain F62 18S ribosomal RNA...	<a href="#">351</a>	6e-93
<a href="#">KJ527066.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y41-I internal transcr...	<a href="#">351</a>	6e-93
<a href="#">WJ527066.1</a>	Wickerhamomyces anomalus strain Y41-I internal transcr...	<a href="#">351</a>	6e-93

### 3. Determinación de la concentración de sustratos y productos.

Figura 48. Equipo de análisis celular Muse, para la determinación de la concentración celular



Figura 49. Determinación de la concentración de células obtenida utilizando el equipo MUSE



Viable Cells / mL :	1.40E+02
Viability % :	100.00 %
Total Cells / mL :	1.40E+02
Total Viable Cells in Original Sample :	1.40E+03
Total Cells in Original Sample :	1.40E+03
Dilution Factor :	10.00
Original Volume :	10.00 mL
Events Acquired :	1

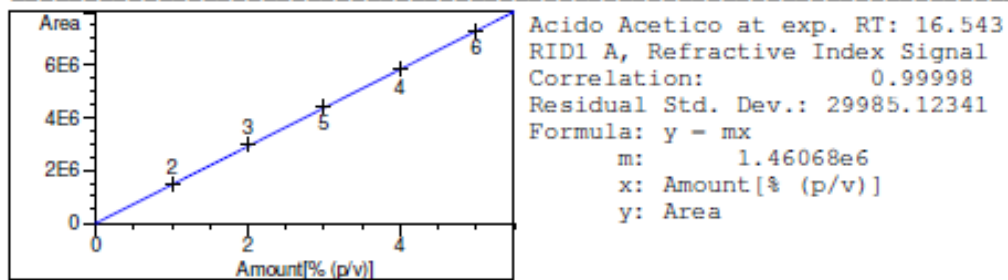
\*En este formato se obtuvieron el resto de los datos experimentales de la concentración celular.

#### 4. Determinación de la concentración de sustratos y productos usando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución

Cuadro 9. Curva de calibración ácido acético

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
16.543	1	2	1.00000	1.48097e6	6.75232e-7	Acido Acetico
		3	2.00000	2.97034e6	6.73323e-7	
		5	3.00000	4.39325e6	6.82866e-7	
		4	4.00000	5.82024e6	6.87256e-7	
		6	5.00000	7.29096e6	6.85781e-7	

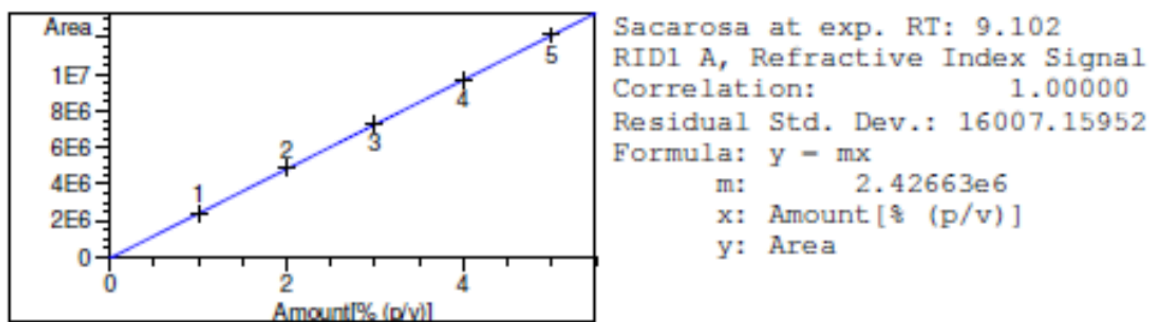
Figura 50. Curva de calibración de ácido acético



Cuadro 10. Curva de calibración sacarosa

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
9.102	1	1	1.00000	2.42980e6	4.11556e-7	Sacarosa
		2	2.00000	4.86822e6	4.10827e-7	
		3	3.00000	7.29768e6	4.11089e-7	
		4	4.00000	9.71145e6	4.11885e-7	
		5	5.00000	1.21119e7	4.12816e-7	

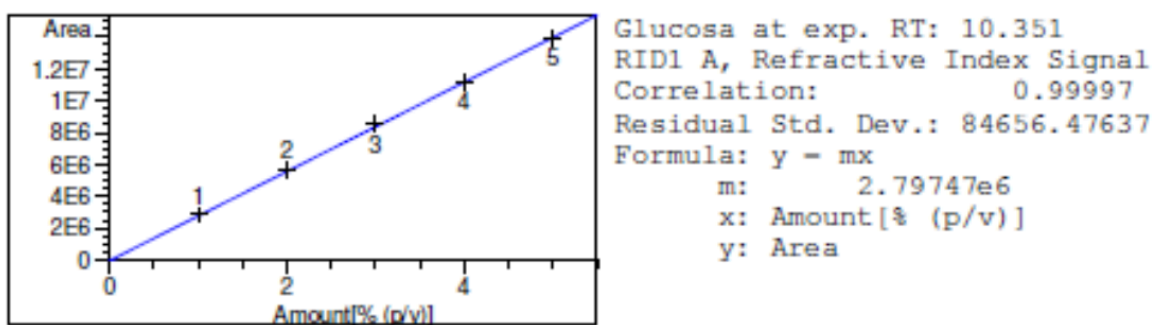
Figura 51. Curva de calibración de sacarosa



Cuadro 11. Curva de calibración glucosa

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
10.351	1	1.00000	2.84734e6	3.51206e-7	Glucosa
		2.00000	5.66195e6	3.53235e-7	
		3.00000	8.50834e6	3.52595e-7	
		4.00000	1.11667e7	3.58206e-7	
		5.00000	1.38995e7	3.59725e-7	

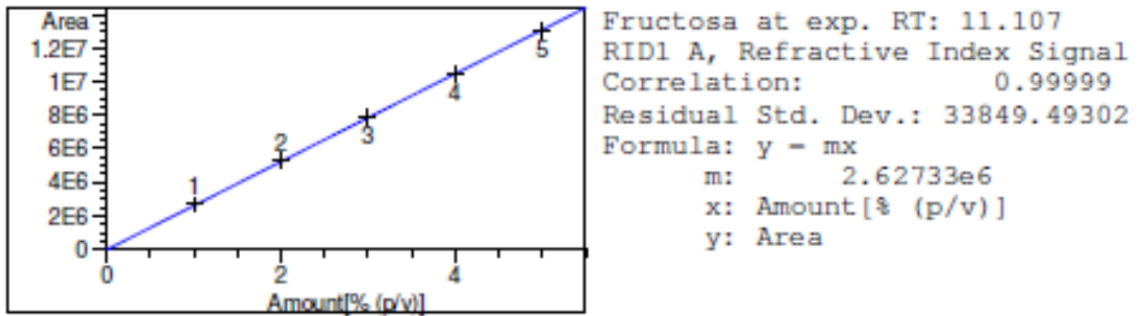
Figura 52. Curva de calibración de glucosa



Cuadro 12. Curva de calibración fructosa

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
11.107	1	1	1.00000	2.66911e6	3.74657e-7	Fructosa
		2	2.00000	5.26535e6	3.79842e-7	
		3	3.00000	7.91628e6	3.78966e-7	
		4	4.00000	1.05163e7	3.80363e-7	
		5	5.00000	1.30979e7	3.81740e-7	

Figura 53 Curva de calibración de fructosa



Cuadro 13. Curva de calibración etanol

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [% (p/v)]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name	
21.968	1	4	1.00000	9.41314e5	1.06234e-6	ETANOL
		5	2.00000	1.90400e6	1.05042e-6	
		6	4.00000	4.04722e6	9.88334e-7	
		7	5.00000	4.72448e6	1.05832e-6	

Figura 54. Curva de calibración de etanol

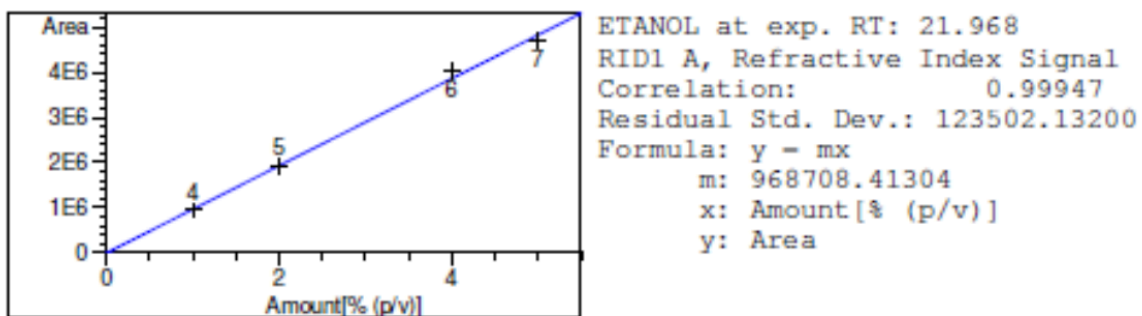


Figura 55. Cromatograma de determinación de sustratos y productos fermentativos

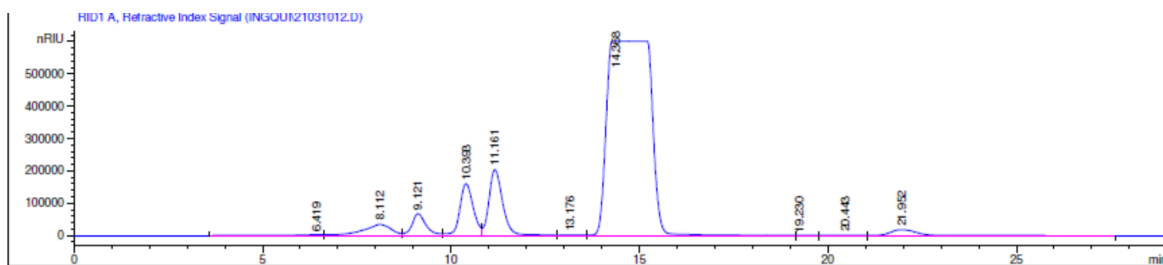
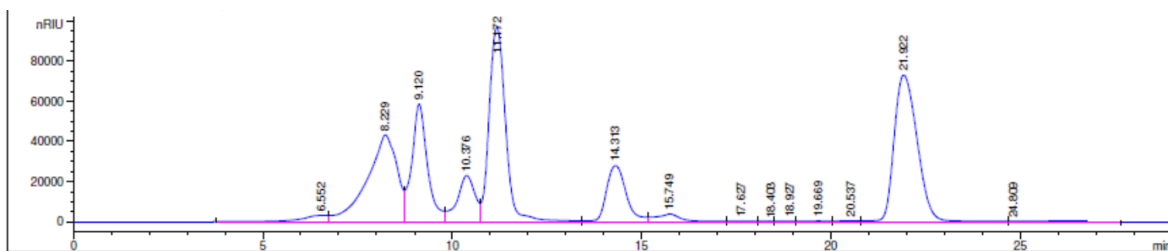


Figura 56. Cromatograma de determinación de sustratos y productos fermentativos 2



**Cuadro 14: Crecimiento microbiano en el tiempo**

Fecha	DIA	[CELULAS]
8-dic-20	1	1.40E+02
9-dic-20	2	1.53E+02
11-dic-20	4	2.80E+02
12-dic-20	5	1.00E+03
14-dic-20	7	1.20E+03
15-dic-20	8	1.40E+03
16-dic-20	9	1.45E+03
17-dic-20	10	5.60E+03
18-dic-20	11	7.00E+03
19-dic-20	12	8.39E+03
20-dic-20	13	9.79E+03
21-dic-20	14	1.12E+04
22-dic-20	15	1.96E+04
23-dic-20	16	2.66E+04
24-dic-20	17	4.60E+04
25-dic-20	18	9.76E+03
26-dic-20	19	5.60E+03
27-dic-20	20	2.83E+03
28-dic-20	21	1.40E+03

\*La concentración de microorganismos fue determinada utilizando un equipo especializado para conteo de microorganismos llamado Muse.

**Cuadro 15: Concentración de sacarosa en el tiempo**

Fecha	DIA	[SACAROSA]
8-dic-20	1	0.735
9-dic-20	2	0.764
11-dic-20	4	0.722
12-dic-20	5	0.726
14-dic-20	7	0.728
15-dic-20	8	0.711
16-dic-20	9	0.659
17-dic-20	10	0.694
18-dic-20	11	0.628
19-dic-20	12	0.554
20-dic-20	13	0.55
21-dic-20	14	0.504
22-dic-20	15	0.499
23-dic-20	16	0.382
24-dic-20	17	0.312
25-dic-20	18	0.31
26-dic-20	19	0.22
27-dic-20	20	0.173
28-dic-20	21	0.128

\*Los datos de la concentración de azúcar en el medio fueron obtenidos en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

**Cuadro 16: Concentración de etanol en el tiempo**

Fecha	DIA	[ETANOL]
8-dic-20	1	0.726
9-dic-20	2	0.873
11-dic-20	4	1.3
12-dic-20	5	1.027
14-dic-20	7	1.074
15-dic-20	8	1.581
16-dic-20	9	1.166
17-dic-20	10	1.758
18-dic-20	11	1.779
19-dic-20	12	2.219
20-dic-20	13	2.365
21-dic-20	14	2.419
22-dic-20	15	2.611
23-dic-20	16	2.271
24-dic-20	17	2.738
25-dic-20	18	2.792
26-dic-20	19	2.89
27-dic-20	20	3.377
28-dic-20	21	3.383

\*El eje Y corresponde a la concentración de etanol en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Cuadro 17: Concentración de glucosa en el tiempo**

Fecha	DIA	[GLUCOSA]
8-dic-20	1	1.65
9-dic-20	2	1.416
11-dic-20	4	1.282
12-dic-20	5	1.189
14-dic-20	7	1.065
15-dic-20	8	0.992
16-dic-20	9	0.638
17-dic-20	10	0.44
18-dic-20	11	0.396
19-dic-20	12	0.264
20-dic-20	13	0.191
21-dic-20	14	0.187
22-dic-20	15	0.178
23-dic-20	16	0.079
24-dic-20	17	0.078
25-dic-20	18	0.078
26-dic-20	19	0.064
27-dic-20	20	0.034
28-dic-20	21	0.025

\*El eje Y corresponde a la concentración de glucosa en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Cuadro 18: Concentración de fructosa en el tiempo**

Fecha	DIA	[FRUCTOSA]
8-dic-20	1	2.164
9-dic-20	2	1.963
11-dic-20	4	1.888
12-dic-20	5	1.81
14-dic-20	7	1.749
15-dic-20	8	1.609
16-dic-20	9	1.375
17-dic-20	10	1.114
18-dic-20	11	1.328
19-dic-20	12	1.13
20-dic-20	13	1.008
21-dic-20	14	0.734
22-dic-20	15	0.481
23-dic-20	16	0.428
24-dic-20	17	0.831
25-dic-20	18	0.775
26-dic-20	19	0.564
27-dic-20	20	0.1
28-dic-20	21	0.052

\*El eje Y corresponde a la concentración de fructosa en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

**Cuadro 19: Concentración de ácido acético en el tiempo**

Fecha	DIA	[ÁCIDO ACÉTICO]
8-dic-20	1	0
9-dic-20	2	0
11-dic-20	4	0
12-dic-20	5	0
14-dic-20	7	0
15-dic-20	8	0
16-dic-20	9	0
17-dic-20	10	0
18-dic-20	11	0
19-dic-20	12	0
20-dic-20	13	0
21-dic-20	14	0.1
22-dic-20	15	0.108
23-dic-20	16	0.115
24-dic-20	17	0.115
25-dic-20	18	0.115
26-dic-20	19	0.115
27-dic-20	20	0.115
28-dic-20	21	0.115

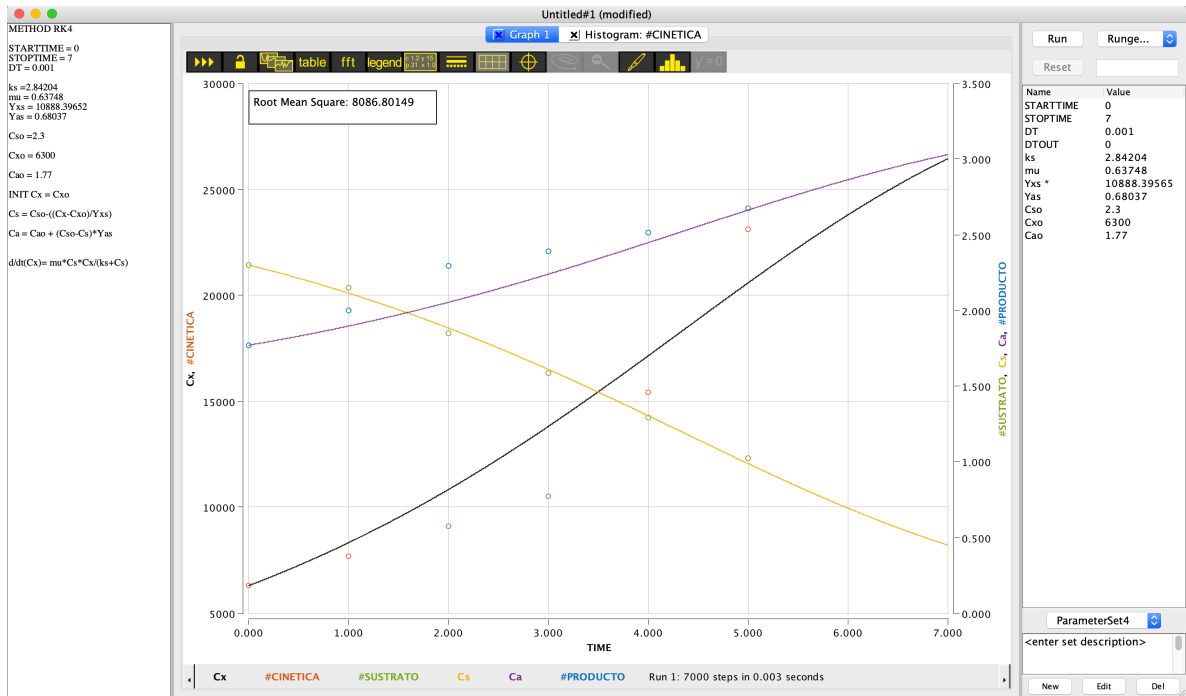
\*El eje Y corresponde a la concentración de ácido acético en el medio en %g/L determinada a través de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El eje x que representa el tiempo, el cual se encuentra en días.

## 5. Determinación del modelo cinético de la fermentación microbiana de Rosa de Jamaica.

**Cuadro 20. Datos experimentales y cálculo de parámetros del modelo de Monod para la fermentación microbiana de la bebida de Rosa de Jamaica**

#	Fecha	DIA	[CELULAS]	LN(CELULAS)	(PROMEDIO)	d(Cn/dt)=rn	mu	1/mu	[SACAROSA]	[GLUCOSA]	[FRUCTOSA]	[Azucars]	[ETANOL]	[ÁCIDO ACÉTICO]	1/CS
1	8-dic-20	1	1.40E+02	4.941642423	1.5	0	0.088795499	11.26183212	0.735	1.65	2.164	4.549	0.726	0	1.334222815
2	9-dic-20	2	1.53E+02	5.030437921	3	1.30E+01	0.302175841	3.30931405	0.764	1.416	1.963	4.143	0.873	0	1.34589502
3	11-dic-20	4	2.80E+02	5.634789603	4.5	6.35E+01	1.272965676	0.785567136	0.722	1.282	1.888	3.892	1.3	0	1.38121547
4	12-dic-20	5	1.00E+03	6.907755279	6	7.20E+02	0.091160778	10.9696299	0.726	1.189	1.81	3.725	1.027	0	1.375515818
5	14-dic-20	7	1.20E+03	7.090076836	7.5	1.00E+02	0.15415068	6.487159195	0.728	1.065	1.749	3.542	1.074	0	1.389854065
6	15-dic-20	8	1.40E+03	7.244227516	8.5	2.00E+02	0.03599132	28.49707578	0.711	0.992	1.609	3.312	1.581	0	1.459854015
7	16-dic-20	9	1.45E+03	7.279318835	9.5	5.00E+01	1.351203041	0.740081223	0.659	0.638	1.375	2.672	1.166	0	1.4781966
8	17-dic-20	10	5.60E+03	8.630521877	10.5	4.15E+03	0.223143551	4.481420118	0.694	0.44	1.114	2.248	1.758	0	1.512859304
9	18-dic-20	11	7.00E+03	8.853663428	11.5	1.40E+03	0.181130371	5.520885273	0.628	0.396	1.328	2.352	1.779	0	1.692047377
10	19-dic-20	12	8.39E+03	9.034795799	12.5	1.39E+03	0.154320936	6.480002166	0.554	0.264	1.13	1.948	2.219	0	1.811594203
11	20-dic-20	13	9.79E+03	9.189116736	13.5	1.40E+03	0.134552322	7.4320531	0.55	0.191	1.008	1.749	2.365	0	1.897533207
12	21-dic-20	14	1.12E+04	9.323669057	14.5	1.41E+03	0.559615788	1.786940293	0.504	0.187	0.734	1.425	2.419	0.1	1.994017946
13	22-dic-20	15	1.96E+04	9.883284845	15.5	8.40E+03	0.30538165	3.274590996	0.499	0.178	0.481	1.158	2.611	0.108	2.27014756
14	23-dic-20	16	2.66E+04	10.18866649	16.5	7.00E+03	0.547730181	1.825716448	0.382	0.079	0.428	0.889	2.271	0.115	2.88184438
15	24-dic-20	17	4.60E+04	10.73639668	17.5	1.94E+04	-1.550348996	-0.645016059	0.312	0.078	0.831	1.221	2.738	0.115	3.215434084
16	25-dic-20	18	9.76E+03	9.186047679	18.5	-3.62E+04	-0.555525803	-1.800096404	0.31	0.078	0.775	1.163	2.792	0.115	3.773584906
17	26-dic-20	19	5.60E+03	8.630521877	19.5	-4.16E+03	-0.682489886	-1.465223178	0.22	0.064	0.564	0.848	2.89	0.115	5.089058524
18	27-dic-20	20	2.83E+03	7.948031991	20.5	-2.77E+03	-0.703804475	-1.420849164	0.173	0.034	0.1	0.307	3.377	0.115	6.644518272
19	28-dic-20	21	1.40E+03	7.244227516	21	-1.43E+03			0.128	0.025	0.052	0.205	3.383	0.115	7.8125

**Figura 58. Primera propuesta del modelo cinético de la fermentación de Rosa de Jamaica con datos experimentales y ajuste de parámetros**



**Cuadro 21. Porcentaje de error de la primera propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de células**

CELULAS			
Tiempo	Data	Modelo	% de error
0	6300	6300	0%
1	7695	8326.23182	8%
2	9090	10835.61674	19%
3	10495	13813.7163	32%
4	15400	17145.23591	11%
5	23100	20586.13042	11%
			14%

\*El porcentaje de error se cálculo utilizando el programa de Microsoft Exel.

**Cuadro 22. Porcentaje de error de la primera propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de sustrato**

SUSTRATO			
Tiempo	Data	Modelo	% de error
0	2.3	2.3	0%
1	2.15	2.11390906	2%
2	1.8485	1.8834449	2%
3	1.587	1.60993357	1%
4	1.2915	1.30396383	1%
5	1.0235	0.987949	3%
			2%

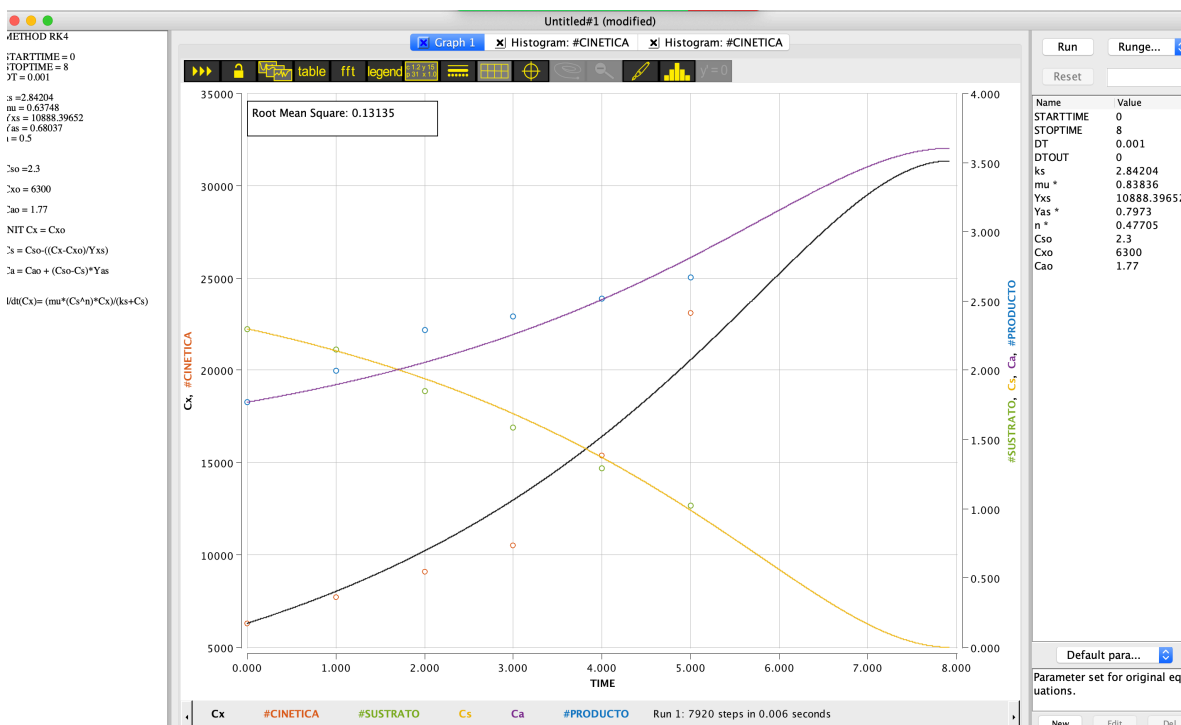
\*El porcentaje de error se cálculo utilizando el programa de Microsoft Exel.

**Cuadro 23. Porcentaje de error de la primera propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de producto**

PRODUCTO			
Tiempo	Data	Modelo	% de error
0	1.7685	1.77	0.000848176
1	1.999	1.8966107	5%
2	2.292	2.05341159	10%
3	2.392	2.2395005	6%
4	2.515	2.44767313	3%
5	2.673	2.66268014	0%
			4%

\*El porcentaje de error se cálculo utilizando el programa de Microsoft Exel.

**Figura 59. Segunda propuesta del modelo cinético de la fermentación de Rosa de Jamaica con datos experimentales y ajuste de parámetros**



**Cuadro 24. Porcentaje de error de la segunda propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de células**

CELULAS			
Tiempo	Data	Modelo	% de error
0	6300	6300	0%
1	7695	8027.230236	4%
2	9090	10217.8139	12%
3	10495	12979.07451	24%
4	15400	16414.50134	7%
5	23100	20564.81545	11%
			10%

\*El porcentaje de error se cálculo utilizando el programa de Microsoft Exel.

**Cuadro 25. Porcentaje de error de la segunda propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de sustrato**

SUSTRATO			
Tiempo	Data	Modelo	% de error
0	2.3	2.3	0%
1	2.15	2.14136964	0%
2	1.8485	1.94018449	5%
3	1.587	1.68658787	6%
4	1.2915	1.37107522	6%
5	1.0235	0.98990669	3%
			4%

\*El porcentaje de error se cálculo utilizando el programa de Microsoft Exel.

**Cuadro 26. Porcentaje de error de la segunda propuesta modelo cinético con el juego de datos experimentales para la concentración de sustrato**

PRODUCTO			
Tiempo	Data	Modelo	% de error
0	1.7685	1.77	0.000848176
1	1.999	1.89647655	5%
2	2.292	2.0568822	10%
3	2.392	2.2590757	6%
4	2.515	2.51063507	0%
5	2.673	2.81454211	5%
			4%

\*El porcentaje de error se cálculo utilizando el programa de Microsoft Exel.

## 6. Cálculo de muestra

**Cálculo 1.** Dilución 1:10 de bebida de Rosa de Jamaica y agua destilada para conteo microbiano en el equipo Muse.

$$1000\mu\text{L} * \left(\frac{1}{10}\right) = 100 \mu\text{L de muestra}$$

$$1000\mu\text{L totales} - 100 \mu\text{L muestra} = 900 \mu\text{L agua destilada}$$

\*Este cálculo se llevó a cabo para todas las muestras de bebida de Rosa de Jamaica.

**Cálculo 2.** Determinación de la velocidad de crecimiento microbiano en el tiempo

$$r_n = \frac{C_n}{dt} = \mu C_n$$

$$d\left(\frac{Cn}{dt}\right) = \frac{[Celulas_1] - [Celulas_0]}{Tiempo_1 - Tiempo_0}$$

Ejemplo:

$$d\left(\frac{Cn}{dt}\right) = \frac{2.80 \times 10^2 \text{ celulas} - 1.53 \times 10^2}{\text{dia 2} - \text{dia 1}} = 6.35 \times 10^1 \frac{\text{celulas}}{\text{dia}}$$

\*Este cálculo se llevó a cabo para todas las muestras de bebida de Rosa de Jamaica.

**Cálculo 3.** Determinación de la velocidad específica de crecimiento microbiano en el tiempo

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

$$d\left(\frac{Cn}{dt}\right) = \frac{\ln[Celulas_1] - \ln[Celulas_0]}{Tiempo_1 - Tiempo_0}$$

Ejemplo:

$$\mu = \frac{8.63 - 7.27}{\text{dia } 10 - \text{dia } 9} = 1.35 \frac{\text{celulas}}{\text{dia}}$$

\*Este cálculo se llevó a cabo para todas las muestras de bebida de Rosa de Jamaica.

## 7. Cálculo de porcentaje de error.

$$\text{Porcentaje de error} = \left( \frac{\text{Valor experimental} - \text{Valor teórico}}{\text{Valor teórico}} \right) * 100$$

Ejemplo:

$$\left( \frac{1.999 - 1.8964}{1.8964} \right) * 100 = 5\% \text{ de error}$$