Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos

Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita "*Capsicum frutescens*"

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR

Nathaly Karol RODRIGUEZ ARANA

ASESORES

Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Carlos Alfredo VEGAS PÉREZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Rodriguez N. Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita "*Capsicum frutescens*" [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos; 2018.

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita *"Capsicum frutescens"*

Que presenta la Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos:

NATHALY KAROL RODRIGUEZ ARANA

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

17 Diecisiete (Sobresaliente)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Título Profesional de Licenciado (a) en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 09 de julio de 2018

Dra. Yadira Fernández Jeri
Presidente

Dr. Roberto Jhalver Vega Paulino
Miembro

Mg. Oscar Acosta Conchucos
Miembro

Q.F. Robert Dante Almonacid Román
Miembro

SINEACE

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú
Teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1
E-mail: decanofyb@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe

DEDICATORIA

A mi madre Maritza, por acompañarme día a día, por sus sacrificios en todos estos años y que mis logros serán los suyos.

A mi padre Alfredo, por su apoyo incondicional, por su esfuerzo diario en vencer las dolencias constantes y enseñarme que debo ser firme en mis metas.

A mis hermanos Mariana y Christopher, que siempre los llevo conmigo y espero ser un modelo a seguir.

A mi familia, por su motivación constante.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme y bendecir a cada miembro de mi familia y darnos la fortaleza necesaria en los momentos de debilidad.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi querida Alma Mater, y a la Escuela Profesional de Ciencia de los Alimentos, por orientarnos y formarnos como profesionales competitivos.

A mi asesora de tesis, Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes por la confianza depositada en mí, por motivarme a seguir investigando y por su valioso conocimiento brindado.

A mi Co-asesor, Dr. Carlos Alfredo Vegas Pérez, por su asesoría brindada, a través de sus conocimientos y su tiempo dedicado para el desarrollo de esta tesis.

Al equipo de investigación del laboratorio de Biología Molecular, por su ayuda brindada para el desarrollo de esta investigación.

A los docentes miembros del Jurado Examinador y Calificador, por sus valiosas sugerencias en la redacción final de la tesis.

A todos mis amigos y compañeros que me mostraron su entusiasmo, motivación y apoyo con sus buenos deseos y alegrías compartidas.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el financiamiento del Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad Innóvate Perú, Contrato 230-FINCyT-IA-2013.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN 1
II. OBJETIVOS 2
III. MARCO TEÓRICO 3
3.1 Ají charapita 3
3.1.1 Clasificación taxonómica del ají charapita 3
3.1.2 Descripción botánica 4
3.1.3 Distribución 4
3.1.4 Composición química 6
3.1.5 Valor nutricional 6
3.1.6 Importancia tecnológica 7
3.2 Fermentación 8
3.2.1 Orígenes 8
3.2.2 Beneficios de la fermentación 8
3.3 Fermentación de vegetales 9
3.3.1. Tipos de procesos para la fermentación de vegetales 9
3.3.1.2 Fermentación controlada 9
3.3.1.3 Fermentación espontánea 9
3.4 Fermentación acido láctica 12
3.4.1 Bacterias ácido lácticas 12
3.4.2 Levaduras 15
3.4.3. Otros microorganismos 15
3.5 Taxonomía de las BAL 16
3.6 Taxonomía de levaduras 19
3.7 Métodos de identificación 21
3.7.1 Métodos fenotípicos 21
3.7.1.2 Pruebas bioquímicas 22
3.7.2 Métodos moleculares 22
3.7.3 Nuevas tecnologías de identificación de microorganismos 27
IV.METODOLOGIA 29
4.1 Recolección de la materia prima 29
4.2 Preparación de la fermentación espontánea del ají charapita 29
4.3 Muestreo de la fermentación espontánea 30
4.4 Análisis fisicoquímicos 30

4.5 Análisis microbiológicos 30
4.6 Identificación fenotípica 31
4.7 Caracterización molecular 31
4.7.1 Extracción de ADN 31
4.7.2 Análisis molecular a nivel de cepa 31
4.7.3 Analisis molecular a nivel de especie 32
4.7.4 PCR Múltiple 32
4.8 Secuenciación de los productos PCR 33
V. RESULTADOS 34
5.1 Análisis fisicoquímicos 34
5.2 Análisis microbiológicos 35
5.3 Identificación fenotípica de BAL y levaduras 36
5.4 Caracterización molecular de BAL y levaduras 36
5.4.1 Análisis molecular de microorganismos del ají charapita en su estado natural mediante REP- PCR. 37
5.4.2 Análisis molecular a nivel de cepa de los microrganismos aislados de la fermentación espontánea del ají charapita 39
5.4.3 Análisis molecular a nivel de especie de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita mediante ARDRA - PCR y RFLP - PCR 41
5.5. Relación filogenética de BAL de los aislados del ají en su estado natural y de la fermentación espontánea 44
5.6. Relación filogenética de levaduras de los aislados del ají en su estado natural y de la fermentación espontánea 45
VI. DISCUSION 46
VII. CONCLUSIONES 51
VIII. RECOMENDACIONES 52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53
X. ANEXOS 61

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytic Chemists.

ATCC. American Type Culture Collection.

BAL. Bacterias ácido lácticas

CO_2. Dióxido de carbono

DNS. Ácido 3,5 – dinitrosalicílico

FAL. Fermentación ácido láctica

FC. Fermentación controlada

FE. Fermentación espontánea

g/L. Gramos por litro

L. Litro

mL. Mililitros

p/v. Peso sobre volumen

VT. Viables totales

UFC.mL^{-1} Unidades formadoras de colonia por mililitro

V/V Volumen sobre volumen

µL Microlitros

µM Micromolar

MRS. Man, Rogosa y Sharpe

NaCl. Cloruro de sodio

$MgCl_2$ Cloruro de magnesio

YPD. Yeast Peptone Dextrose

ADN Ácido desoxiribonucleico

ADNc ADN complementario

ARN	Ácido ribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Log	Logaritmo
pb	Pares de bases
pH	Potencial de hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
REP	Amplificación por PCR de elementos palindrómicos repetitivos
ITS	Espacios transcritos internos
TBE	Buffer formado por tris, borato y EDTA
TE	Buffer formado por tris y EDTA
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura **Titulo** **Pagina**

Figura 1. Principales países productores de ají 4
Figura 2. Vías metabólicas desarrolladas en la fermentación acido láctica 14
Figura 3. Árbol de consenso, basado en el análisis comparativo de secuencias de ARNr 16S 18
Figura 4. Representación de la organización de los genes ribosómicos en levaduras 23
Figura 5. Diagrama del método de RFLP…… 25
Figura 6. Métodos actuales para la identificación taxonómica de microorganismos 26
Figura 7. Diagrama de análisis de métodos proteómicos 28
Figura 8. Flujograma de elaboración de la fermentación espontánea del ají charapita 29
Figura 9. Análisis fisicoquímicos de azúcares reductores, pH y acidez total titulable durante el proceso de fermentación espontánea del ají charapita. 34
Figura 10. Recuento microbiano de la fermentación espontánea del ají charapita 35
Figura 11. Geles de agarosa conteniendo los perfiles de ADN de los microorganismos aislados de ají en su estado natural utilizando REP - PCR. 37
Figura 12. Geles de agarosa con perfiles de ADN de los microorganismos aislados del ají charapita en su estado natural 38
Figura 13. Geles de agarosa conteniendo los perfiles de ADN de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita mediante REP - PCR. 40
Figura 14. Geles de agarosa con los perfiles de ADN amplificados y cortados de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita. 42
Figura 15. Relación filogenética de los aislados del ají charapita en su estado natural y la fermentación espontánea con base a las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S. 44
Figura 16. Relación filogenética de los aislados del ají en su estado natural y la fermentación espontánea del ají charapita junto a cepas de referencia de levaduras. 45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla **Titulo** **Pagina**

Tabla 1. Clasificación taxonómica del ají charapita..... 3
Tabla 2. Principales cultivos de Capsicum en Perú 5
Tabla 3. Composición química del ají charapita..... 6
Tabla 4. Diversos productos a base de ají nativo..... 7
Tabla 5. Especies microbianas desarrolladas en las etapas de fermentación espontánea de vegetales 10
Tabla 6. Principales microorganismos aislados de vegetales crudos o de fermentados espontáneamente..... 11
Tabla 7. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativa. 13
Tabla 8. Otras fermentaciones bacterianas de los azúcares que proceden a través de la ruta glucolítica 16
Tabla 9. Distribución general de BAL y levaduras aisladas en su estado natural y de la fermentación espontánea del ají charapita mediante técnicas microbiológicas y moleculares..... 43

RESUMEN

En el presente estudio se identificaron taxonómicamente los microorganismos aislados de la fermentación espontánea de ají charapita "*Capsicum frutescens"* mediante técnicas moleculares, fenotípicas y microbiológicas. Para ello, se realizó el seguimiento al proceso fermentativo mediante técnicas fisicoquímicas y microbiológicas tanto de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras en medios MRS y YPD. En la identificación molecular de especies bacterianas se utilizaron los genes ribosómicos 16S amplificados y cortados con *AluI, HaeIII y MseI;* y para levaduras se amplificó la región 5.8S con los espaciadores intergénicos colindantes (ITS) y se cortaron con *HinfI, CfoI y HaeIII.* De igual forma, se realizó la genotipificación de cepas, bacterias y levaduras mediante la técnica REP - PCR usando el primer (GTG)5. Asimismo, se realizó la secuenciación parcial de los genes ribosómicos amplificados 16S y la región 5.8S - ITS para bacterias y levaduras respectivamente. Además, se analizó la microbiota del ají charapita sin fermentar. De este modo, se identificó a *Lactobacillus plantarum, Leuconostoc pseudomesenteroides y Weissella confusa,* la última especie se aisló solo en el ají charapita sin fermentar. Con respecto a las levaduras se identificaron a *Kodamaea ohmeri, Hanseniaspora opuntiae, Debaryomyces nepalensis, Pichia kudriavzevii y Candida parapsilosis*. En conclusión, mediante técnicas microbiológicas y moleculares, se identificaron a las BAL y levaduras, siendo *Lactobacillus plantarum* predominante en la fermentación espontánea del ají charapita.

Palabras claves: genes ribosómicos 16S, región 5.8S - ITS, bacterias ácido lácticas, levaduras, fermentación espontánea, ají charapita, *Capsicum frutescens*.

SUMMARY

In the present study identified taxonomically the microorganisms present in the spontaneous fermentation of charapita chili "*Capsicum frutescens"* using molecular, phenotypic and microbiological techniques. This was followed by the fermentation process by means of physicochemical and microbiological analyses of lactic acid bacteria (LAB) and yeasts in MRS and YPD media. In the molecular identification of bacterial species was used the technique of analysis of amplified fragments of the 16S ribosomal genes using *AluI, HaeIII and MseI*; and for yeast the region 5.8S with the adjacent intergenic spacers (ITS) with the enzyme *HinfI, CfoI and HaeIII*. In the same way, the genotyping of strains was performed by the REP- PCR technique using (GTG)5 as a primer for both microorganisms. Likewise, partial sequencing of 16S amplified ribosomal genes and 5.8S - ITS region for bacteria and yeasts respectively was performed. Also, charapita chili unfermented was evaluated. In this way, the bacteria *Lactobacillus plantarum, Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Weissella confusa* were identified, the last mentioned was identified only in the unfermented charapita chili; and to the yeasts *Kodamaea ohmeri, Hanseniaspora opuntiae, Debaryomyces nepalensis, Pichia kudriavzevii* and *Candida parapsilosis*. In conclusion, by means of microbiological and molecular techniques, the BAL and yeasts were identified, being predominant *Lactobacillus plantarum,* in the spontaneous fermentation of the charapita chili.

Key words: 16S ribosomal genes, 5.8S - ITS region, lactic acid bacteria, yeasts, spontaneous fermentation, charapita chili, *Capsicum frutescens*.

I. INTRODUCCIÓN

En la última década, la participación de los microorganismos en fermentados vegetales ha mejorado la calidad nutritiva y organoléptica de productos alimenticios tales como: aceitunas, pepinillos, coles, soya, entre otros. A la vez, contribuyeron a optimizar el bioproceso y la vida útil del producto.

Una forma de optimizar el bioproceso es determinar las condiciones adecuadas, así como identificar los microorganismos participantes en las diversas etapas del fermentado. Por lo tanto, es necesario contar con técnicas que permitan identificar las bacterias ácido lácticas (BAL), levaduras y otros microorganismos que predominen en las fermentaciones. En este aspecto, las técnicas microbiológicas y moleculares permiten la identificación y caracterización de un determinado taxón.

Actualmente, existen técnicas moleculares que son independientes o dependientes de cultivos, estas últimas son usadas mayormente por la practicidad y especificidad, ya sea a nivel de especie como la amplificación de los genes ribosómicos 16S cortados con enzimas de restricción (ARDRA - PCR), usadas comúnmente para BAL o la amplificación de la región 5.8S y las regiones intergénicas colindante (5.8S - ITS) cortadas con de enzimas de restricción para levaduras (RFLP - PCR). Para el caso de genotipificación tanto de BAL y levaduras, las técnicas más utilizadas son: RAPD - PCR, REP - PCR, entre otras *(Rodas y col, 2003; Zarzoso y col., 1999; Williams y col., 1990; Gevers y col., 2001*).

En tal sentido, el propósito de esta investigación es identificar taxonómicamente los microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita utilizando técnicas microbiológicas, fenotípicas y moleculares.

II. OBJETIVOS

General

Identificar los principales microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita "*Capsicum frutescens".*

Específicos

1. Aislar bacterias ácido lácticas y levaduras durante el proceso de fermentación espontánea del ají charapita.
2. Caracterizar fenotípicamente bacterias ácido lácticas y levaduras aisladas de la fermentación espontánea del ají charapita.
3. Identificar taxonómicamente los microorganismos aislados de la fermentación espontánea del ají charapita.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Ají charapita

Su origen no se ha podido constatar, pero en el Perú se han hallado restos arqueológicos de esta especie que datan de los años 1200 a.C, utilizado como alimento, artesanías y en rituales mágico-religiosos[1,2].

Es una de las especies que proporciona variedades muy picantes siendo la más representativa de la selva peruana, el cual es cultivado de manera tradicional[3].

3.1.1 Clasificación taxonómica del ají charapita

El ají charapita pertenece al género *Capsicum* que está conformado por más de 25 especies domesticadas desde épocas prehispánicas, y aún se siguen describiendo nuevas variedades de este género[4].

Tabla 1. Clasificación taxonómica del ají charapita

Reino	*Plantae*
División	*Magnoliophyta*
Subdivisión	Angiospermas
Clase	*Magnoliopsida*
Orden	*Solanales*
Familia	*Solanáceae*
Género	*Capsicum*
Especie	*frutescens*

Fuente: Arévalo 2014 [2]

Debido a la amplia gama de ajíes en el Perú, se han realizado estudios para determinar las variedades existentes en las regiones del país y dar a conocer la existencia de posibles duplicados[5]. La Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) e instituciones regionales han realizado diversas investigaciones, contando con un banco de germoplasma de *Capsicum* con más de 900 accesiones, pese a ello, aún se siguen realizando estudios de sistematización y ubicación taxonómica de los ajíes en el Perú[6].

3.1.2 Descripción botánica

C. frutescens alcanza el metro de altura, aunque su tamaño depende de los nutrientes del suelo y la temperatura, desarrollándose en climas cálidos. Presenta un follaje denso y compacto que otras especies de *Capsicum.* Las hojas son ovoides, lisas, de color verde claro y unos 8 cm de largo. Las flores son pentalobuladas. La corola es lisa, de color blanquecino o verdoso[3]. Los frutos, son bayas de forma globosa, cónica, alargada o redonda y de tamaño variable, suelen ser de color amarillo al madurar y miden entre 2 a 5 cm de largo. Es una planta que produce más de 120 frutos, aunque disminuye abruptamente con la edad de la planta[7].

3.1.3 Distribución

El *C. frutescens* y otras variedades, se desarrollaron en Norteamérica sobre todo en México y Centroamérica, difundiéndose paulatinamente por el área del Caribe y América del sur como Perú, Brasil, Colombia, Ecuador y Venezuela. Además, en África se encuentran variedades derivadas del *C. annuum* y en Asia variedades de *C. Chínense*[3]. Asimismo, algunos de estos países en mención son los principales productores de ají (Figura 1).



Figura 1. Principales países productores de ají. (APEGA y col., 2009 [5])

En Perú las especies y variedades de ají son muy numerosas, ubicándolos en distintas regiones, siendo las más conocidas C. *baccatum, C. chinense, C. frutescens*. Estos son cultivados principalmente en la región de la selva alta amazónica, salvo el ají amarillo, el cual es cultivado en la costa, mientras que otros ajíes, como el rocoto serrano, son cultivados en casi todos los departamentos que tengan el agroecosistema de la sierra[5,6].

Tabla 2. Principales cultivos de *Capsicum* en Perú

Tipos de ají	Nombre científico	Nombre común	Principales regiones de producción
Principales	*Capsicum pubescens*	Rocoto	Valles interandinos
			Ceja de selva y selva alta
	Capsicum baccatum	Ají amarillo	Costa centro y sur
	Capsicum chinense	Ají panca	Costa centro y sur
Medianos	*Capsicum baccatum L.var.pendulum*	Ají montaña	Selva alta
Menores	*Capsicum baccatum*	Verde, largo criollo	Costa norte
		Cacho de cabra, Uña de gavilán, Uña de pava	Costa norte
		Pacae	Costa sur
		Ayuyo, chaguaruro	Amazonia
	Capsicum chinense	Limos: Paringo, miscucho, Bola picante	Costa norte
		Mochero, Amaucho	Costa central
		Dulce, pucunucho	Amazonia
	Capsicum annuun	Cerezo redondo, Cerezo triangular	Costa norte
	Capsicum frutescens	Pipi de mono	Amazonia
		Malagueta	
		Charapita	

Fuente: APEGA y col 2009 [5], ADEX y col 2009 [8]

3.1.4 Composición química

La principal característica del género *Capsicum* es su picosidad que varía en cada especie de acuerdo con las cantidades de capsaicina, su acumulación en los frutos está relacionado con la edad, tamaño, estado de desarrollo y contenido en carotenoides de los mismos[9].

Tabla 3. Composición química del ají charapita

Compuesto químico	Concentración por 100g
Humedad (%)	85.23
Cenizas (%)	0.35
Grasas (%)	0.46
Proteínas (%)	1.20
Carbohidratos (%)	12.76
Calorías (Kcal)	59.98
Fibra bruta (%)	2.35
Capsaicinoides (mg)	576.60
Vitamina E (mg)	11.50
Vitamina C (mg)	18.04
Flavonoides (mg)	2.50
Quercetina (mg)	2.50
Azúcar (g)	10.90
Grasa (g)	9.20
Calcio (mg)	31.50

Fuente: Carranza 2013 [7], Libreros 2013 [10]

3.1.5 Valor nutricional

Podemos encontrar ajíes dulces como picantes, llamados así por el grado de picor que presentan, la capsaicina responsable del picor se le ha atribuido propiedades como facilitante de la digestión, aumentando la producción de saliva y jugos gástricos. Al contener bajos niveles de hidratos de carbono son considerados como fuente de fibra y por la variedad de coloraciones se destaca el contenido de provitamina A y vitaminas del complejo B, atribuyéndole propiedades antioxidantes y protectoras al organismo[11].

3.1.6 Importancia tecnológica

La capsaicina al ser extraída de diferentes variedades de ajíes tanto picantes como dulces, son muy empleadas en la industria alimenticia destinadas a la elaboración de bebidas, colorantes y salsas, además presentan la oleorresina *Capsicum* (OC) el cual proviene de la agrupación de aceites esenciales ceras y varios capsaicinoides[12], es usada en la industria farmacéutica en la elaboración de medicamentos que alivian los dolores musculares, actuando como desinflamante, antibacteriano y otros. También se utiliza en la elaboración de cosméticos, gel de duchas y cremas corporales, en la agricultura para el control de plagas y aerosoles para defensa personal[1,5].

Tabla 4. Diversos productos a base de ají nativo

Industria	Productos	Referencias
Alimentaria	Encurtidos Salsas y cremas Bebidas, néctares Colorantes Productos deshidratados Chips Mermeladas	*APEGA y col., 2009;* *Jäger M y col., 2013;* *Restrepo M. y col 2006;* *Vázquez F y col., 2007;* *INIA Chile., 2005.*
Agrícola	Insecticidas Aerosoles	*Restrepo M. y col., 2006;* *INIA Chile., 2005.*
Cosmética	Geles de ducha Cremas corporales Lociones de control de caída de cabello	*Vázquez F y col., 2007;* *APEGA y col., 2009.*
Farmacéutica	Cremas desinflamatorias, anestésicas	*INIA Chile., 2005;* *Jäger M y col., 2013.*

Fuente: Elaboración propia a partir de las diferentes fuentes mencionadas en el cuadro.

3.2 Fermentación

3.2.1 Orígenes

El proceso de fermentación viene desde épocas antiguas, los primeros indicios se dieron hace 8000 años atrás, con la viticultura en las zonas caucásicas de Georgia, posteriormente las culturas se irían desarrollando con la producción de pan con levadura en el antiguo Egipto, fermentación de leche en Babilonia, en la India con sus variedades de alimentos vegetales fermentados y en Asia central con el natto (soja fermentada), Kimchi (col fermentada), salsa de pescado fermentado, entre otros[12]. Con el paso de los años el proceso de fermentación se ha ido distribuyendo en países sudamericanos adoptando los alimentos nativos de cada país, por lo que hoy en día se conoce una gran variedad de alimentos fermentados ya sean vegetales, lácteos, carnes, etc[12,13].

La fermentación se define como un proceso en el que un sustrato se transforma en diversos productos, por la acción de los microorganismos. De esta base las demás ramas de la ciencia parten para adecuar el concepto de acuerdo con sus características como el punto bioquímico, el cual refiere a un mecanismo de obtención de energía a través del catabolismo de compuestos orgánicos ocurrido en ausencia de O_2[13,14]. Para que la fermentación se realice se necesita la presencia de un sustrato, microorganismos y condiciones físicas adecuadas tales como pH, temperatura, aireación, agitación, entre otros.

3.2.2 Beneficios de la fermentación

La fermentación aporta lo siguiente;[14]

- Restaura y conserva la flora intestinal e impide el crecimiento de microorganismos patógenos y sus toxinas.
- Mejora las características organolépticas y sensoriales.
- Incrementa el valor nutritivo, a través de la síntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales, proteínas y la degradación de factores antinutricionales que realizan los microorganismos.
- Proporciona estabilidad a los alimentos, por el desarrollo de compuestos antimicrobianos, permitiendo extender su vida útil.

Asimismo, este proceso en mención requiere menor consumo energético que otros métodos de conservación de alimentos[14].

3.3 Fermentación de vegetales

La fermentación de vegetales involucra una serie de factores físicos, químicos y microbiológicos. En los últimos años, se ha descrito diversas investigaciones sobre fermentaciones, donde destacan el uso de *Lactobacillus sp*., el cual emplea azúcares naturales de los frutos y los convierte en ácido láctico, la generación y aumento de ácido láctico proporciona diversos cambios favorables, como nutrientes. Por el contrario, durante el proceso fermentativo puede llevarse a cabo la formación de compuestos que alteren las condiciones fisicoquímicas originado defectos en la calidad del producto y la aparición de microorganismos indeseables, por ello es vital mantener las condiciones adecuadas del proceso fermentativo[15].

3.3.1. Tipos de procesos para la fermentación de vegetales

3.3.1.2 Fermentación controlada

En este tipo de fermentación se utilizan cultivos iniciadores, los cuales disminuyen la posibilidad que se produzcan alteraciones debido al mayor control del fermentado.

Los microrganismos participantes, como cultivos iniciadores, son seleccionados por su producción de compuestos antimicrobianos o posibles inhibidores de microrganismos patógenos. De acuerdo con lo mencionado se sigue investigando para obtener cultivos starters (iniciadores) específicos para cada vegetal y tipo de fermentación a realizarse, y así gradualmente reemplazar el empleo de cepas con mezclas “desconocidas”[16].

3.3.1.3 Fermentación espontánea

Este tipo de fermentación es muy utilizada en la industria alimentaria consiste en el previo condicionamiento de frutos frescos, que son colocados en concentración de salmuera de diferente composición, variando de acuerdo al tipo de producto a elaborar. La velocidad de crecimiento y la proliferación de los diversos microorganismos dependerán de la materia prima, las condiciones ambientales, la concentración de sal, la presencia de compuestos inhibidores naturales y de la materia prima, siendo los mencionados los factores más influyentes durante el proceso fermentativo[14,15].

En la fermentación de vegetales se puede diferenciar cuatro etapas (Tabla 5), que a nivel industrial solo son deseables las primeras dos etapas en donde interviene en mayor proporción las BAL y en menor proporción las levaduras.

Tabla 5. Especies microbianas desarrolladas en las etapas de fermentación espontánea de vegetales

Etapa	Microorganismos
Inicio	Bacterias Gram (+) y Gram (-)
Fermentación primaria	Bacterias lácticas y levaduras
Fermentación secundaria	Levaduras
Post-fermentación	Levaduras, mohos y bacterias esporuladas

Fuente: Seseña 2005 [14]

Al realizar estas etapas la fermentación espontánea puede presentar limitantes del rendimiento en el proceso, ya que es difícil predecir el curso de la fermentación, siendo poco controlables durante el desarrollo de los microorganismos, por ello es vital darle las condiciones óptimas al proceso de fermentación a fin de evitar defectos en el producto.

A continuación, en la Tabla 6 se muestra los principales microorganismos aislados a partir de vegetales o fermentados espontáneamente más representativos según diversos autores.

Tabla 6. Principales microorganismos aislados de vegetales crudos o de fermentados espontáneamente

Microorganismo	Origen	Referencia
Lb. plantarum	Calabacines, zanahorias, pepinos, berenjenas, remolachas, remolachas, coles.	*Di Cagno y col,2008,2010,2011; Pleghvidhya y col,2007; Pulido y col,2012; Sánchez y col,2000; Tamminen y col,2004.*
Lb. pentosus	Alcaparras. Berenjena, pepinos.	*Di Cagno y col,2011; Pulido y col,2012; Sánchez y col,2000; Tamminen y col,2004.*
Lb. fementum	Judías verdes, remolachas, alcaparras, berenjenas.	*Di Cagno y col,2008; Offony y Achi,1998; Pulido y col,2012; Sánchez y col,2000; Seseña y col,2007.*
Lb. brevis	Alcaparras. Berenjena, pepinos, coles.	*Di Cagno y col,2008; Offony y Achi,1998; Pleghvidhya y col,2007; Pulido y col,2012; Sánchez y col,2000; Seseña y col,2007.*
Lb. paraplantarum	Coles y alcaparras	*Pleghvidhya y col,2007; Pulido y col,2012;*
Leuconostoc mesenteroides sbsp. mesenterides	Coles blancas, zanahorias, pimientos, pepinos, berenjenas, lechugas.	*Di Cagno y col,2008; Lee y col 2011; Pleghvidhya y col,2007; Pulido y col,2012; Sánchez y col,2000.*
W. confusa, W. cibaria	Pimientos	*Di Cagno y col,2008 ,2009, 2011.*
Enterococcus faecalis, E. faecium	Judías verdes, alcaparras	*Di Cagno y col,2008 Offony y Achi,1998; Pleghvidhya y col,2007 Pulido y col,2012*

Fuente: Di Cagno y col 2013, Domínguez 2013 [16,17]

3.4 Fermentación acido láctica

La fermentación acido láctica es un proceso anaeróbico que se lleva a cabo por bacterias acido lácticas, se obtiene como resultado de la combinación de dos factores; la concentración de la sal y el descenso del pH de la salmuera, manifestándose en la transformación de azucares presentes en el vegetal, obteniendo ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono[16,17].

El aumento de la acidez en la salmuera se debe al ácido láctico por la presencia de las BAL, principalmente de la familia *Lactobacillaceae,* estas se transforman por homofermentacion o heterofermentacion para la obtención de ácido láctico y otras sustancias químicas, siendo en la primera, la transformación de la glucosa, en ácido láctico por medio de la vía EMP, (esto es debido que las bacterias homolácticas poseen la enzima aldolasa y son capaces de extraer de una determinada cantidad de glucosa, que es el doble de energía con respecto a las bacterias heterolácticas (Tabla 7)), mientras que en la segunda utilizan a los fosfocetolasa que degradan la glucosa por la vía de las pentosas, obteniendo ácido láctico que constituye el 50% de los productos finales siendo el resto ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico[17,18] (Figura 2).

3.4.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como bacterias Gram positivas, no esporuladas de morfología cocoide o bacilar, catalasa negativa, con la característica principal de ser estrictamente fermentativas; las BAL se encuentran en una amplia variedad de hábitats, especialmente aquellos ricos en carbohidratos como los vegetales, que por procesos de adaptación colonizan otros sustratos y se desarrollan a expensas de la descomposición de los tejidos vegetales[19].

Los requerimientos nutricionales de las BAL suelen ser complejos y requieren medios nutritivos que favorezcan el crecimiento, siendo los suplementos más idóneos: las vitaminas del grupo B, péptidos, aminoácidos preformados, bases púricas entre otros, favoreciendo el crecimiento y el aislamiento de las BAL[19,20].

Tabla 7. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativa.

Homofermentativas	Heterofermentativa	Heterofermentativa facultativas
Lactobacillus: *Lb. acidophilus* *Lb. delbrueckii subesp.bulgaricus.* *Lb. helveticus* *Lb. jensenii* *Lb. delbrueckii subesp.lactis* *Lb. farciminis* *Lb. salivarius subespsalivarius* *Lb. gasseri* *Lb. gallinarium*	**Lactobacillus:** *Lb. brevis* *Lb. buchneri* *Lb. fermentum* *Lb. reuteri* *Lb. hilgardii* *Lb. trichodes* *Lb. fructivorans* *Lb. collinoides* *Lb. maleferementans*	**Lactobacillus:** *Lb. acetotolerans* *Lb. hamsteri* *Lb. casei* *Lb. coryniformis* *Lb. curvatus* *Lb. plantarum* *Lb. sake* *Lb. paracasei* *Lb. rhamnosus* *Lb. pentosus*
Pediococcus: P*. damnosus* *P. dextranicum* *P. parvulus*	**Leuconostoc:** *Lc. amelibiosum* *Lc. mesenteroides* *Lc. gelidum*	**Pediococcus:** P*. acidilactici* *P. pentosaceus* *P. damnosus* *P. dextrinicus* *P. inopinatus*
Streptococcus: S. *bovis* *S. thermophilus*	**Carnobacterium:** *C. divergens* *C. mobile* *C. gallinarum* *C. piscicola*	
Lactococcus: L. *lactis subesp. lactis* *L. lactis subesp. cremoris* *L. lactis subesp. hordmiae* *L. garviae* *L. plantarum*	**Weissella**: W*. confusa* *W. paramesenteroides* *W. confusus* *W. halotolerans* *W. minor* *W. viridescens*	

Lb*, Lactobacillus;* P*, Pediococcus;* Lc*, Leuconostoc;* P, *Pediococcus;* S, *Streptococcus;* C, *Carnobacterium;* L, *Lactococcus;* W*, Weissella.*

Fuente: Ramírez 2005 [19]

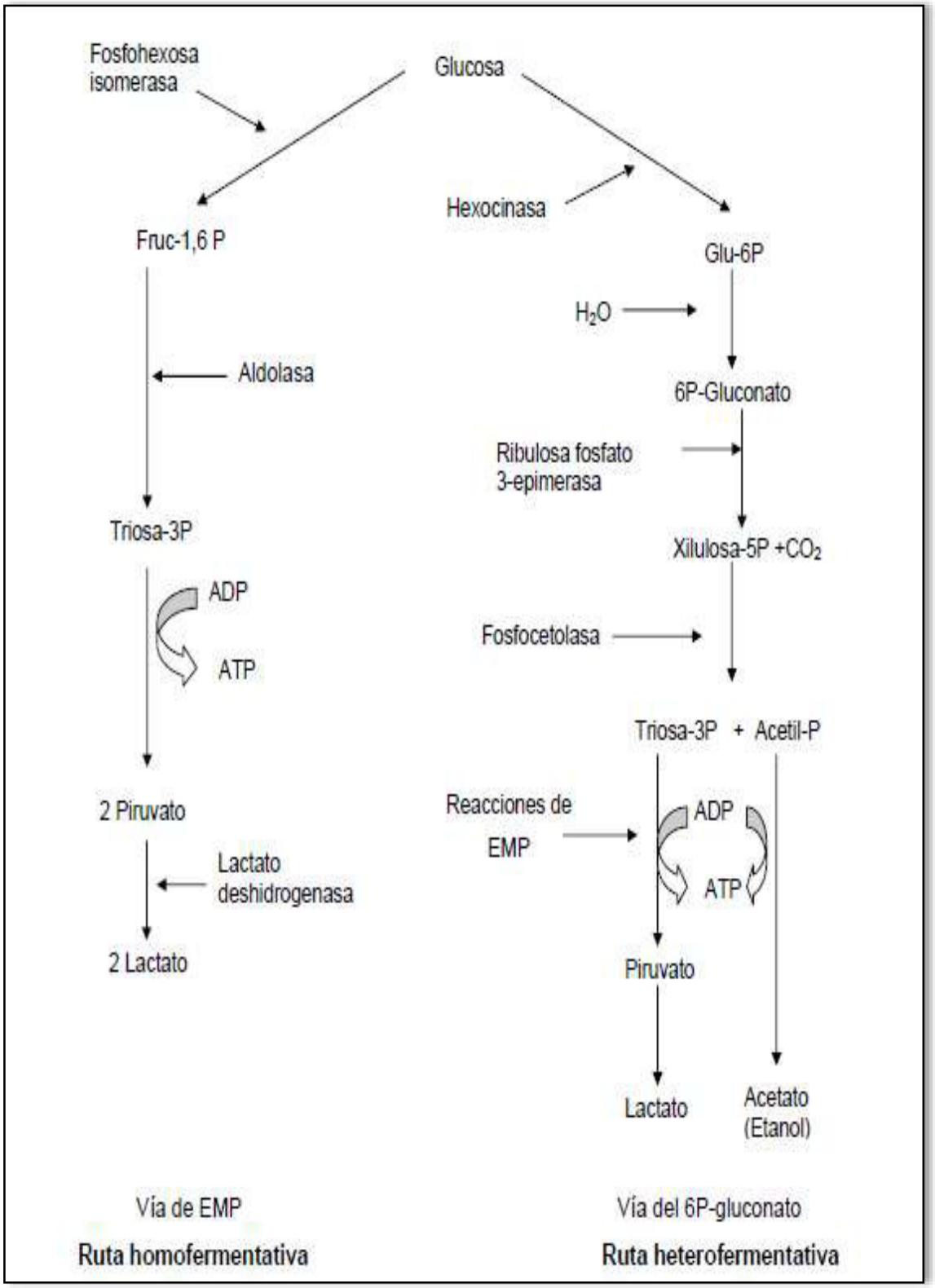


Figura 2. Vías metabólicas desarrolladas en la fermentación acido láctica (FAL). (Ramírez 2005 [19])

3.4.2 Levaduras

Las levaduras son organismos que pueden crecer tanto en presencia como ausencia de oxígeno, toleran condiciones de acidez (menos en hongos) se desarrollan adecuadamente en un rango de pH (4.0 - 4.5) y prefieren ambientes con alta concentración de sustratos como la sal o el azúcar. Las levaduras pueden estar presentes durante las diversas etapas de la fermentación, como la primaria y en la fermentación alcohólica. En la fermentación secundaria de pepinillos y aceitunas son los microorganismos predominantes; sin embargo, en el caso de otros vegetales como la col, su desarrollo es escaso, se atribuye en parte a las bajas concentraciones de sal, que favorecen especialmente a las bacterias ácido lácticas. Además, una de las características principales de las levaduras es inhibir el crecimiento de otras levaduras y/o bacterias gracias a su actividad micogénica o "killer"[21,22].

Bioquímicamente, las levaduras metabolizan la glucosa siguiendo la ruta glucolítica hasta la formación de piruvato, estos microorganismos a diferencia de las bacterias ácido lácticas, poseen la enzima piruvato y descarboxilasa, que actúa sobre el piruvato para dar CO_2 y acetaldehído. El acetaldehído se puede reducir a etanol con oxidación del NADH a NAD, originando en total dos moles de ATP por mol de glucosa fermentada[21].

Los géneros más descritos son: *Saccharomyces (S. cerevisiae, S. boulardii*), *Cándida (C. utilis), Debaryomyces* y *Kluyveromyces (K. fragilis)* para cervecería, vinificación, destilería, panificación y elaboración de alimentos orientales a base de cereales (arroz y soja). En la producción de pan intervienen *Saccharomyces cerevisiae, Cándida krusei, Cándida tropicalis, Torulopsis holmii* y bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus, Leuconostoc* y *Pediococcus*[23,24].

3.4.3. Otros microorganismos

Además de las levaduras y las BAL existes otros grupos de bacterias presentes, que pueden seguir la ruta glucolítica y ser considerados indeseables debido a la posibilidad de alterar la calidad del producto final. Dentro de estos alterantes pueden estar las bacterias del género *Propionibacterium*, que realizan la fermentación propiónica de los azucares, su principal función radica en la facultad que tienen de metabolizar anaeróbicamente el ácido láctico[21,23]. Esta fermentación es bastante frecuente en las aceitunas verdes aderezadas,

dándose la “cuarta etapa de fermentación” la cual tiene lugar al final de la fermentación láctica. En esta etapa los azúcares disminuyen, debido a una menor disociación de los ácidos acéticos y propiónicos con respecto al ácido láctico, produciéndose un incremento de pH superando el valor de 4.5, dando inestabilidad al fermentado. Con el fin de inhibir el desarrollo de las bacterias propiónicas, es habitual en la industria incrementar el contenido de NaCl de la salmuera hasta superar el 8% en el equilibrio[23]. En la Tabla 8 se muestra diferentes fermentaciones llevadas a cabo por bacterias Gram positivas o negativas durante la fermentación espontánea de vegetales.

Tabla 8. Otras fermentaciones bacterianas de los azúcares que proceden a través de la ruta glucolítica

Clase de fermentación	Productos principales del ácido pirúvico	Bacterias
Acida-mixta	Ácido láctico	Escherichia
	Ácido acético	
	Acido succínico	
	Ac. Fórmico ($C0_2$ y H_2)	
	Etanol	
Butanodiolica	Ítem anterior, además 2,3-Butanodiol	Enterobacter
Butírica	Acido Butírico	Clostridium
	Ácido Acético	
	CO_2 y H_2	
Acetona-Butanolica	Ítem anterior, además, Butanol, Etanol, Acetona, Isopropanol.	Clostridium
Propionica	Ácido Propiónico	Propionibacterium
	Ácido acético	
	CO_2	

Fuente: Montaño 1992 [21]

3.5 Taxonomía de las BAL

Actualmente existen 19 géneros de BAL, de los cuales 12 son mayormente usados en la industria alimentaria, estos han sido determinados por estudios o información brindada tanto a nivel fenotípico como genotípico, los avances de técnicas moleculares contribuyeron a ello, como la secuenciación de fragmentos largos de ARN, mediante el uso de la transcriptasa inversa por *Lane y col., 1988,* no obstante, las primeras clasificaciones se originó por *Orla-Jensen y col., 1919*, basándose en la morfología, disposición celular, el tipo de fermentación y la capacidad a desarrollarse entre 10 a 45 °C [24,25].

En la edición 7ma y 8va de Bergeys, modificó la clasificación incluyendo a cuatro géneros dentro de las BAL; *Streptococcus, Lactobacillus, Leuconostoc y Pediococcus*; y las cepas se clasificaron con los mismos criterios de Orlan-Jensen 1919[25]. Con el paso del tiempo, el género *Lactobacillus* a resultado el más extenso con respecto a otros, en cuanto a nuevas especies, siendo en la actualidad más de 100 especies validadas[26].

En la 8va edición del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" el género *Leuconostoc* estaba formado por seis especies: *Lc. mesenteroides, Lc. dextranicum*, Lc. *cremoris*, Lc. *lactis,* Lc. *oenos* y Lc. *paramesenteroides.* Estudios posteriores de hibridación ADN - ADN y ARN - ADN demostraron que las tres formaron subespecies de *Lc. mesenteroides* (*cremoris, dextranicum y mesenteroides*)[25].

Recientemente, cuatro especies del género *Leuconostoc* (Lc. *durionis*, Lc. *ficulneum*, Lc. *fructosus,* y Lc. *pseudoficulneum*) descritas en los últimos años se han reclasificado en un nuevo género *Fructobacillus* con los nombres de F. *durionis*, F. *ficulneum*, F. f*ructosus* y F. *pseudoficulneum*[27]. Además, otras especies nuevas como Lc. *holzapfelii,* Lc. *inhae* y Lc. *kimchii* han sido clasificadas dentro del género, de manera que, en la actualidad, *Leuconostoc* está formado por 11 especies (*Lc. carnosum, Lc. citreum, Lc. fallax, Lc. gasocomitatum, Lc. gelidum, Lc. holzapfelii, Lc. inhae, Lc. kimchii, Lc. lactis, Lc. mesenteroides* y *Lc. pseudomesenteroides*)[28,29].

Finalmente, se han descrito nuevas especies pertenecientes al género *Pediococcus*, de forma que actualmente contiene las siguientes: P. *acidilactici*, P. *argentinicus* P. *cellicola*, P. *claussenii*, P. *damnosus*, P. *dextrinicus,* P. *ethanolidurans*, P. *inopinatus*, P. *parvulus*, P. *pentosaceus*, P. *siamensis* y P. *stilesii* [30,31]. A la fecha el género *Oenococcus* contenía una única especie O. *oeni.* Sin embargo, recientemente se ha descrito la existencia de una bacteria láctica que pertenece a este mismo género y para la que se propone el nombre de *Oenococcus kitaharae*[25.27].

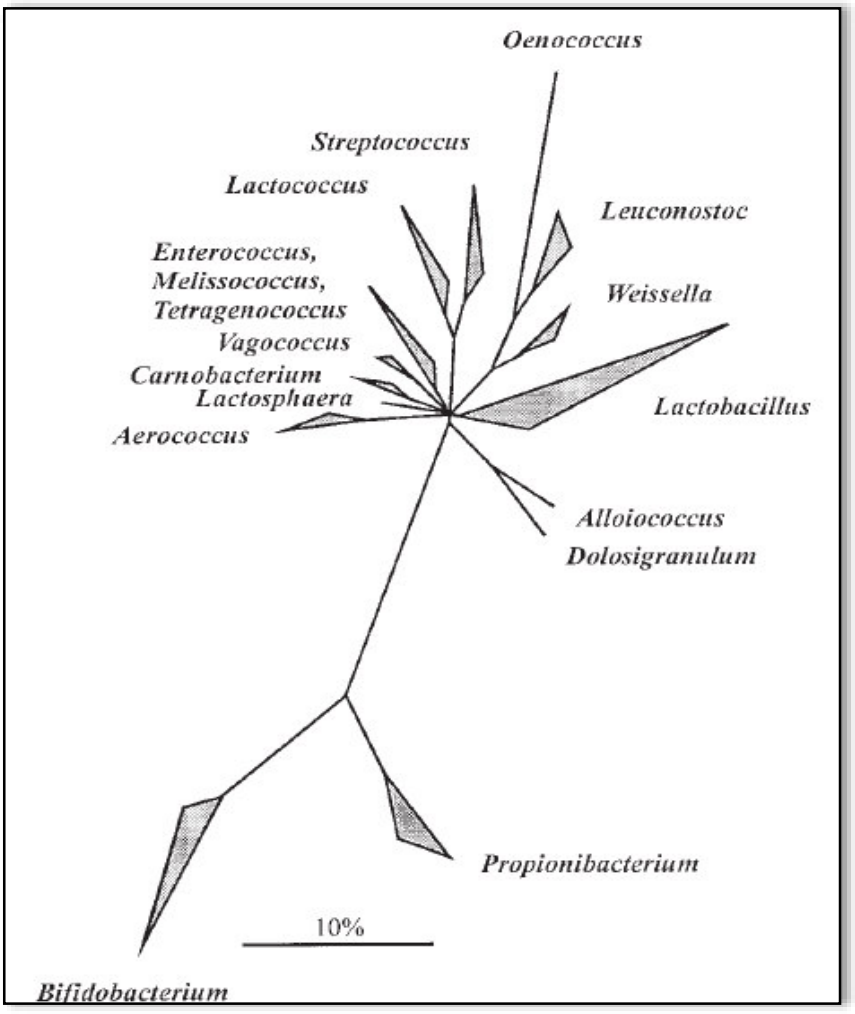


Figura 3. Árbol de consenso, basado en el análisis comparativo de secuencias de ARNr 16S, muestra los principales grupos filogenéticos de bacterias del ácido láctico. (Holzapfel y col 2001 [29])

3.6 Taxonomía de levaduras

Estos microorganismos se definen como hongos de morfología predominante unicelular, son considerados descomponedores. Sin embargo, se ha demostrado que favorecen las cualidades organolépticas de las fermentaciones debido a su metabolismo, participando en alimentos de alta concentración de sal, bajo pH y bajas temperaturas, el desarrollo de estas características es a menudo específicas de la cepa, por lo que su uso en la industria alimentaria es esencial[35].

Las levaduras no conformaban por si mismas una entidad taxonómica propiamente dicha y su caracterización, al igual que el resto de los hongos, se basa en pruebas morfológicas, fisiológicas y genotípicas. No obstante, esto ha ido cambiando a medida del desarrollo de nuevas técnicas de identificación, como las moleculares[17,32].

A fin de delimitar el reconocimiento de especies en hongos se desarrolló el análisis de secuenciación múltiple adoptando el concepto de "código de barras de ADN" para la rápida identificación de hongos logrando integrar el concepto de especie filogenética. Actualmente, el marcador "código de barras de ADN" para hongos corresponde a la región entre los espacios transcritos internos (ITSs) de los genes ribosomales[32,33].

Hoy en día la secuencia del genoma de unas 100 especies está disponible y principalmente de aquellas levaduras con un interés genético y biotecnológico.

A continuación, se detallarán algunos géneros representativos;[34,35].

El género *Zygosaccharomyces* fue descrito en 1901 por Barker y desde entonces ha sufrido varias modificaciones. Actualmente, cinco de las especies antes clasificadas en este género han sido situadas en nuevos géneros o en géneros ya existentes. Los nuevos géneros que se han constituido son *Lachancea y Zygotorulaspora* que acogen a las especies *Lachancea cidri* y L. *fermentati* y *Zygotorulaspora florentinus,* Z. *mrakii* (*James y Stratford, 2011)*. En la actualidad, el género *Zygosaccharomyces* ha sido reducido a seis especies: Z. *bailii, Z. bisporus, Z. kombuchaensis, Z. lentus, Z. mellis y Z. rouxii* [35].

Z. *rouxii* es una levadura con importantes aplicaciones biotecnológicas, participa en la producción de alimentos fermentados orientales (soja, miso, kimchi), en

los que es capaz de fermentar tanto los azucares como los aminoácidos a altas concentraciones de NaCl[36].

Los géneros Debaryomyces y Meyerezyma pertenecen al grupo de levaduras ascosporógenas, dentro del género hay once especies aceptadas: D. *coudertii,* D*. fabryii*, D*. hansenii*, D*. maramus,* D*. mycophilus,* D*. nepalensis*, D*. prosopidis,* D*. robertsiae,* D*. singareniensis y* D*. subglobosus*[35,36].

D*. hansenii* es alterante de productos alimenticios como lácteos, carne procesada, alimentos fermentados y conservados con ácidos orgánicos o con elevado cloruro de sodio. Sin embargo, influye positivamente en las características organolépticas durante la maduración y secado de productos cárnicos. Además D. *hansenii* es osmotolerante, siendo esta propiedad ventajosa para la aplicación en la industria biotecnológica ya que puede ser inoculada en medios de cultivo que son resistentes a la contaminación, aumentando el rendimiento y contribuyendo a una reducción del coste[35,37].

El género *Meyerozyma* incluye especies anteriormente clasificadas en el género *Pichia,* se reconocen hoy en día dos especies fenotípicamente idénticas, como *M. guilliermondii y M. caribbica* que han sido aisladas de diversos sustratos naturales como las frutas, el suelo, las plantas, larvas de insectos o alimentos. Además, es considerada un patógeno oportunista en animales entre los que se incluyen los humanos. Aunque *M. guilliermondii* se aísla frecuentemente de fruta deteriorada y presenta actividad fermentativa, no se ha podido demostrar que sea la responsable de su descomposición[35,38].

Finalmente, el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas, a diferencia del Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica, no especifica el procedimiento técnico para el reconocimiento de especies nuevas [34, 39], si bien se suele seguir el método polifásico como en las BAL, tienen mayor prioridad aquellos resultados que se obtiene de la caracterización genotípica para las circunscripciones del género y la delimitación de la especie nueva[35].

3.7 Métodos de identificación

Para la identificación de microorganismos como bacterias acido lácticas o levaduras se recurre a una serie de técnicas que permiten detectar las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares. Sin embargo, a ninguno de ellos se conoce como un único medio de identificación, es decir, entre todo se complementan. El avance y la eficacia de métodos moleculares han permitido el perfeccionamiento de la sensibilidad, resolución y sobre todo universalidad, permitiendo desarrollar nuevos métodos de tipificación que facilitan y aportan mayor precisión a la identificación y clasificación taxonómica[40].

3.7.1 Métodos fenotípicos

Son métodos tradicionales que se basan en características observables como su morfología, propiedades bioquímicas y metabólicas. Cuando el cultivo es factible, sigue siendo el método de diagnóstico de elección; permitiendo la obtención de las características del microorganismo implicado.

El método comienza con los exámenes morfológicos de las colonias aisladas en medio sólidos, evaluándose en forma microscópica y macroscópica. Para la detección de las bacterias, se realiza la prueba de tinción Gram, a partir de aquí, se inoculan las pruebas bioquímicas tradicionales, donde se requieren cultivos puros del microorganismo implícito para obtener una biomasa suficiente capaz de evidenciar los cambios en las pruebas realizadas[40,41].

La identificación fenotípica a nivel de género y especie se basa en las siguientes características[41];

- Crecimiento y sobrevivencia a las diferentes temperaturas.
- Producción de amoniaco a partir de arginina.
- Sobrevivencia a tratamiento térmico.
- Producción de acetoína, hidrolisis de esculina.
- Fermentación de carbohidratos: fructuosa, D-galactosa, D (+) galactosa, Dl-arabinosa, D (+) trehalosa ramnosa, D (+)-glucosa, Maltosa, D (+) rafinosa, manosa, D (+)-xilosa, dextrosa, lactosa, celobiosa, melezitosa, melobiosa, ribosa, sorbitol y sucrosa.

Asimismo, los métodos fenotípicos de tipificación son menos reproducibles y poseen menor poder de discriminación que los métodos genotípicos, debido a sus características inherentes, es decir es susceptible a modificarse cuando las condiciones ambientales varían. Sin embargo, este método es ampliamente utilizado para la identificación de bacterias acido lácticas, levaduras y otros microorganismos proporcionando una información descriptiva de gran interés constituyendo la base para la descripción formal de la taxa, familias y géneros hasta incluso especie y subespecie[14,42].

3.7.1.2 Pruebas bioquímicas

En este tipo de pruebas se manifiesta las características bioquímicas del microorganismo en cuestión, como la presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, crecimiento a temperaturas dadas, crecimiento en presencia de inhibidores, entre otros.

Se pueden diferenciar por su actividad enzimática, con la prueba de oxidasa y catalasa. Esta prueba es usada para la diferenciación de dos grupos de cocos de Gram positivos, estreptococos (catalasa (-)) y estafilococos (catalasa (+)) siendo de identificación preliminar con lectura inmediata[42,43].

3.7.2 Métodos moleculares

La utilización de los métodos moleculares implica el estudio del contenido genético de la célula, lo que emplea diversas metodologías de análisis de ADN o ARN, en el caso de las BAL se incluyen habitualmente metodologías de análisis de secuencia del gen que codifica la subunidad del ribosoma 16S, considerándolo un tamaño adecuado, es decir ni demasiado pequeño, (que no aportaría suficiente información genética, como la subunidad 5S de los genes ribosomales) ni demasiado grandes, (que impondría ciertas dificultades a la secuenciación, como la subunidad ribosomal 23S) además de las cualidades de este gen ADNr 16S se considera que posee alto grado de resolución taxonómico, con lo que facilitaría la identificación[34.]

En cambio, para levaduras las técnicas se basan en comparación de secuencias nucleotídicas de la región ribosómica. Este DNA ribosómico contiene copias múltiples repetidas en tándem, siendo las zonas codificantes altamente conservadas; 18S, 5.8S, 26S y 5S[35]. Entre los genes 18S y 26S existen regiones

no codificantes, los espaciadores internos (ITS1 e ITS2) que junto con el gen 5.8S constituyen la región 5.8S - ITS. Los cebadores universales para esta región fueron desarrollados por *White et al., 1990.* Cabe destacar que recientemente esta región ha sido seleccionada como la diana de referencia para la identificación molecular de hongos[44,45].

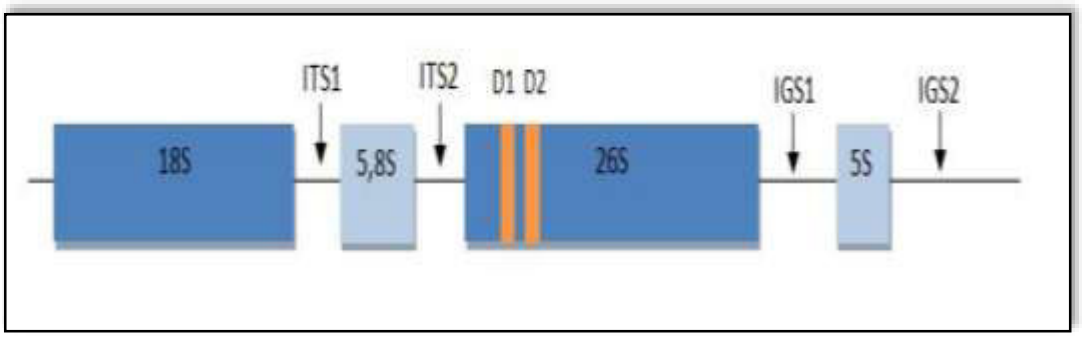


Figura 4. Representación de la organización de los genes ribosómicos en levaduras. (Wrent P. 2016 [35])

Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado (ARDRA)

Esta técnica se basa en la digestión de los genes ribosómicos previamente amplificados mediante PCR, con lo cual el producto obtenido se separa mediante electroforesis en gel de agarosa para una identificación adecuada. Se ha utilizado con éxito para identificar aislados de *Lactobacillus* obtenidos en muestras de mosto, vino y aceitunas, así como para monitorizar cultivos iniciadores[14], siendo una técnica de fácil uso, rápida, rentable y efectiva[46].

Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD),

Esta técnica consiste en una amplificación aleatoria del ADN utilizando un cebador corto (8-10 nucleótidos) que se une al azar a sitios inespecíficos distribuidos en las regiones del genoma, por lo que no requiere un conocimiento previo de la secuencia de la especie a identificar, ya que generan un patrón de bandas características[41]. RAPD ha sido utilizada con éxito en estudios de biodiversidad genética en productos lácteos y en encurtidos. Además, se ha demostrado su eficacia como técnica de identificación cuando se incluyen en los ensayos cepas de referencia con las que se establece comparaciones[47].

La desventaja de la técnica es ser muy sensible a las condiciones de amplificación, (calidad y concentración de ADN) influyendo en la reproducibilidad del método.

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP- PCR)

Los AFLP es básicamente la combinación de la digestión completa del ADN genómico total con enzimas de restricción, seguida de la amplificación selectiva de los fragmentos obtenidos para detectar polimorfismos debido a mutaciones en la secuencia de ADN y en los sitios de restricción. Este proceso permite discriminar entre todos los fragmentos de restricción que se forman y amplificar solo aquellos en donde los iniciadores encuentren las secuencias complementarias tanto para el adaptador como para la base adicional[48], siendo así una técnica discriminativa y sensible. Sin embargo, los principales inconvenientes de esta técnica es su laboriosidad, el elevado coste del equipo, la obtención de bandas complejas y el análisis de los mismo con un software adecuado. Debido a ello el AFLP hace que se utilice en laboratorios especializados[47,48].

Polimorfismo de longitud de fragmento de Restricción (RFLP)

Esta técnica consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción. De esta forma, en un gel de electroforesis aparece un patrón de bandas polimórficas correspondientes a los fragmentos de diferentes tamaños, que se generan con el corte de cada endonucleasa[49,50].

El más amplio uso que se le ha dado a la técnica de RFLP ha sido en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial, como la identificación de levaduras vínicas, a cepas de levaduras aisladas en fermentaciones de aceitunas, utilizando la región del rDNA 5.8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 (5.8S – ITS). La región 5.8S es codificada, conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie. Sin embargo, la zona ITS, es una región no codificadora y variable, permite medir las relaciones interespecíficas entre levaduras de los genes ribosómicas 18S y 26S[51,52].

La ventaja de esta técnica radica en la rapidez y simplicidad, que permite la obtención de resultados en una sola corrida, y la reproducibilidad de los patrones de restricción, siendo eficiente a bajo costo[51,52].

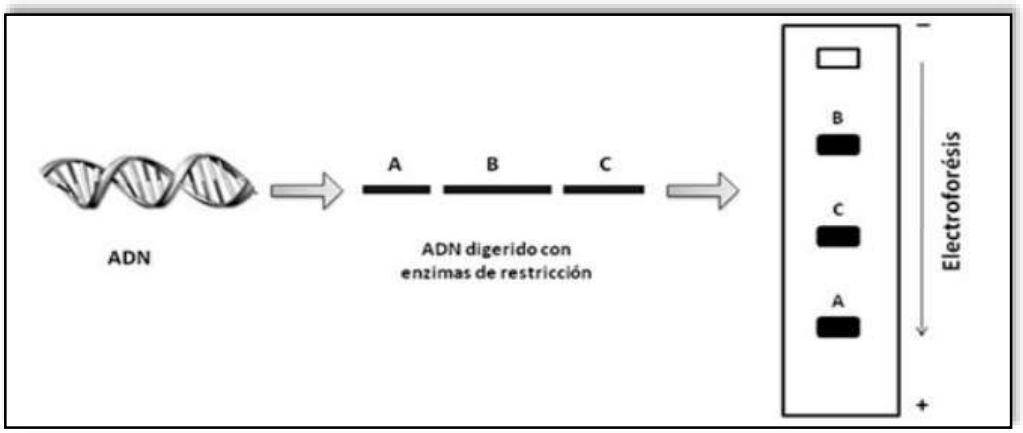


Figura 5. Diagrama del método de RFLP. (García 2007 [41])

Palindrómica extragénica repetitiva (REP - PCR)

Esta técnica es muy útil para identificar, rastrear y analizar diversidad de microorganismos, siendo altamente reproducible; la utilidad de este método, es para clasificar a las bacterias con base en sus patrones de huellas dactilares genómicas, se fundamenta en el uso de iniciadores de ADN correspondientes a los elementos repetitivos naturales intercalados en las bacterias, como REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Entero-bacterial Repetitive Intergenic Consensus) y BOX (Entero-bacterial Repetitive Sequences) y la reacción de PCR, que colectivamente reciben la denominación de REP - PCR. En diversos estudios se destaca el uso de REP - PCR usando el trinucleotidos cortos, tales como (GTG)5, en la identificación de *Lactobacillus*, *Enterococcus* en fermentaciones de semillas de cacao[53,54].

Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (Múltiple PCR)

Esta técnica se basa en amplificar simultáneamente secuencias especificas o dianas mediante el uso de múltiples pares de cebadores en una mezcla de reacción; el cual implica que los reactivos usados y el programa utilizado sean suficientes adecuados para permitir la detección de cada diana y no inhibir entre ellas[55]. Para ello es necesario tener en cuenta lo siguiente;

- Diseñar oligonucleótidos que no interaccionen entre sí, es decir, que no formen dímeros; con temperaturas de alineamiento similares;
- Generación de amplicones con tamaño suficientemente diferente para separarlos y diferenciarlos tras la amplificación[55].

La PCR múltiple se proyecta como una herramienta de diagnóstico muy útil, asimismo, esta técnica se ha utilizado por *Torriani y col., 2001* para la diferenciación de *Lb. plantarum, Lb. paraplantarum, Lb. pentosus* en diversos alimentos, desarrollándose con éxito en alimentos fermentados como las aceitunas, entre otros[54,55].

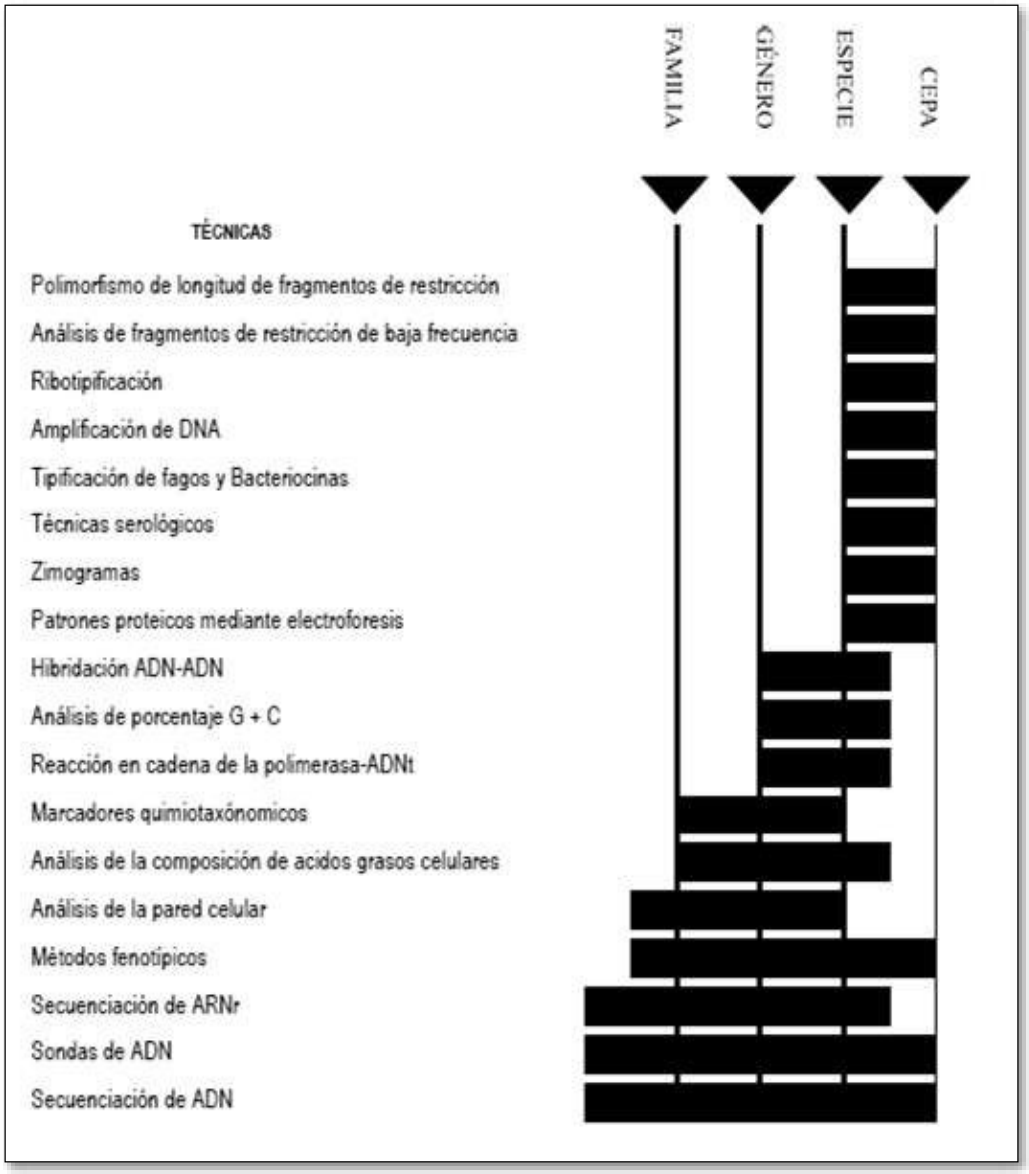


Figura 6. Métodos actuales para la identificación taxonómica de microorganismos. (García 2007 [41])

3.7.3 Nuevas tecnologías de identificación de microorganismos

Actualmente existen métodos prometedores para la identificación y cuantificación de microorganismos como la detección de perfiles proteómicos MALDI- TOF, microarreglos, pirosecuenciacion, métodos de microdilución rápida (métodos comerciales fenotípicos), entre otros. Estas técnicas o métodos representan una alternativa prometedora en el campo de alimentos, debido a la rapidez, sensibilidad y eficiencia para la detección temprana de microorganismos patógenos.

Microarreglos (Microarray DNA).

Esta técnica utiliza la complementariedad de las bases nitrogenadas del ADN y consiste en un arreglo ordenado de cientos o miles de secuencias de ADN depositados sobre una superficie sólida, midiendo el nivel de hibridación entre la sonda específica (*probe*,) y la molécula diana (*target*) se expresan generalmente mediante fluorescencia a través de un análisis de imagen, lo cual indica el nivel de expresión del gen[56]. Varios microarreglos se han desarrollado para la detección e identificación de *Shigella, Listeria* incluso *Salmonella* basado en genes de virulencia determinantes[56].

Pirosecuenciación

Permite determinar una secuencia de ADN gran escala, mediante luminiscencia, se basa en la detección de liberación de pirofosfatos (ocurre cuando se incorporan los nucleótidos a la cadena que se está sintetizando), que es captado por el secuenciador reproduciéndolo como un pico en un pirograma y varía en función de la intensidad de la señal luminosa. Esta técnica identifica a potenciales patógenos bacterianos o virales en un menor tiempo, siendo sensible y especifica[56].

Métodos proteómicos

La proteómica es el estudio y caracterización del conjunto de proteínas expresadas por un genoma. Las técnicas más usadas se basan en la electroforesis y en la espectrometría de masas[57].

Dependiendo del objetivo del estudio se agrupan de acuerdo con el tipo de técnica a utilizar:

- Técnicas empleadas para analizar globalmente el proteoma y separar sus proteínas.
- Técnicas usadas para analizar individualmente las proteínas, utilizando distintos tipos de espectrometría de masas, con el propósito de identificarlas.
- Técnicas que se usan para estudiar interacciones entre proteínas y los sistemas yeast *two hybrids* de alto rendimiento o la técnica Phage *Display*.

El reto principal de la proteómica es su automatización y la integración de las tecnologías mencionadas y con el apoyo de la bioinformática, optimizará mejores resultados[56,57].

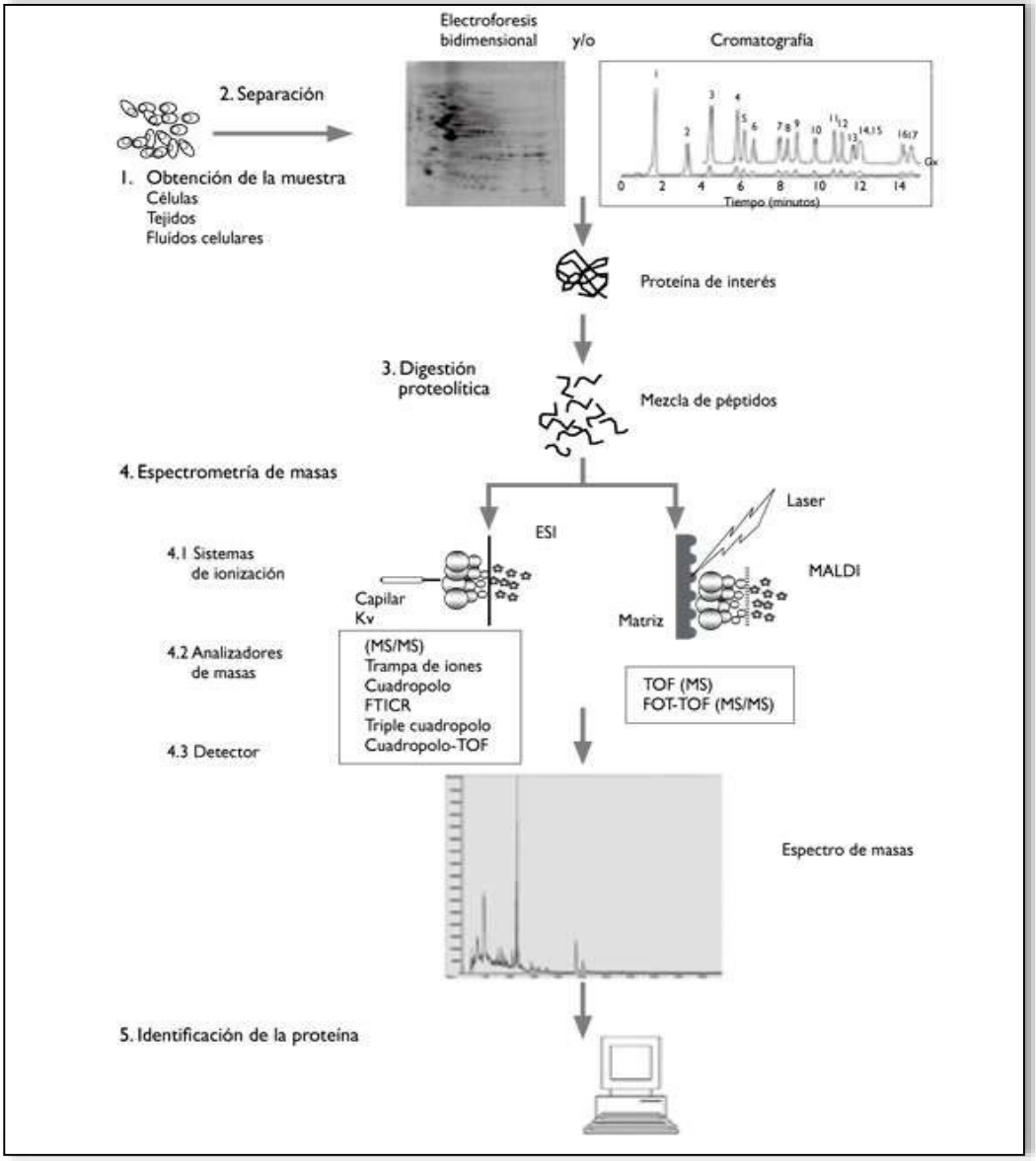


Figura 7. Diagrama de análisis de métodos proteómicos. (Pando R y col 2009 [57])

IV.METODOLOGIA

4.1 Recolección de la materia prima

Los ajíes fueron recolectados de la comunidad de Zungarococha, ciudad de Iquitos, región Loreto[69]. Se transportaron en contenedores refrigerados (4°C – 8°C), al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

4.2 Preparación de la fermentación espontánea del ají charapita

La fermentación espontánea se realizó a escala de laboratorio (1.8 L), bajo condiciones asépticas, se estableció el siguiente flujograma;

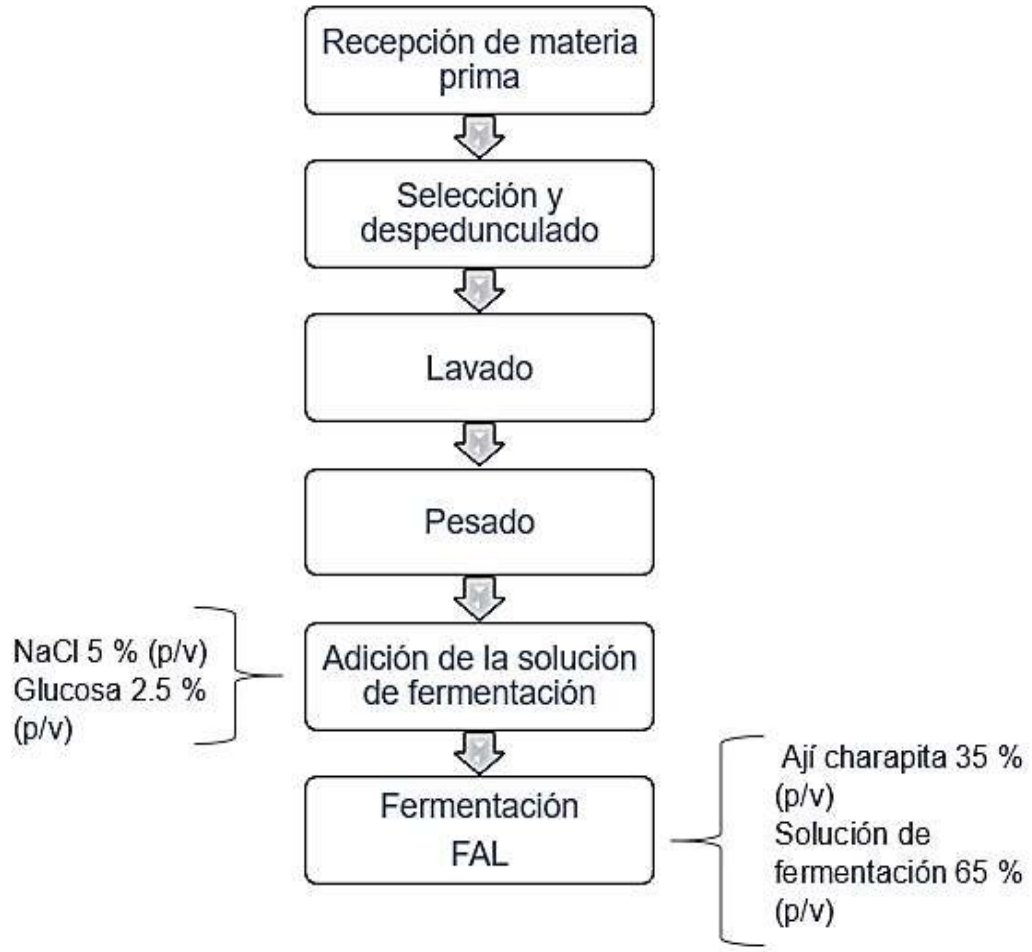


Figura 8. Flujograma de elaboración de la fermentación espontánea del ají charapita

Recepción de materia prima, Las muestras de ajíes fueron recepcionadas en el laboratorio y conservadas a 4 °C.

Selección y despedunculado, Se seleccionaron los ajíes amarillos y se retiró el pedúnculo descartando a aquellos que presentaron coloración verdosas o marrones y/o abolladuras.

Lavado, Los ajíes se lavaron con agua destilada estéril para eliminar tierra, hojas, pedúnculo y otras partículas extrañas.

Pesado y adición de la solución de fermentación, Se pesaron los ajíes representando el 35 % (p/v) del volumen total de fermentación. Estos fueron agregados a envases estériles y se aforó con la solución de fermentación (NaCl 5% (p/v) y glucosa 2.5 % (p/v))[69] hasta completar el volumen total.

Fermentación, Los envases fueron sellados herméticamente para evitar contaminación, comenzando así el proceso de fermentación espontánea del ají charapita. La fermentación se realizó a temperatura ambiente y por triplicado.

4.3 Muestreo de la fermentación espontánea

Durante el proceso de fermentación se tomaron muestras a los 0, 3, 12, 27, 37 y 47 días. Realizando los análisis fisicoquímicos, microbiológicos, fenotípicos y moleculares. Asimismo, se tomaron muestras del ají charapita en su estado natural.

4.4 Análisis fisicoquímicos

En los análisis fisicoquímicos de la fermentación se evaluaron la acidez titulable según AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists)[58] (anexo 1) y los azúcares reductores por el método de *Miller y col.,1959*[59] y pH[60] (anexo 2).

4.5 Análisis microbiológicos

Para el aislamiento de los microorganismos presentes durante la fermentación espontánea se utilizaron cuatro medios de cultivo; MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) para bacterias acido lácticas suplementado con azida sódica 100 mg/L (para la inhibición de bacterias Gram negativas) y nistatina 100 mg/L (para la inhibición de hongos y levaduras) (Merck, Darmstadt, Alemania), YPD para levaduras suplementado con cloranfenicol 100 mg/L (para la inhibición de bacterias) (Applichem GmbH, Darmstadt, Alemania), Agar Mc Conkey para

Enterobacterias y Agar Cetrimide para Pseudomonas[70] (anexo 3). Se realizó el conteo celular por la técnica de recuento de células viables en placa (anexo 4).

4.6 Identificación fenotípica

En base al muestreo tomado para la fermentación espontánea del ají charapita, se aislaron colonias de BAL y levaduras en los medios correspondientes, los aislados se analizaron según criterios morfológicos evaluados macroscópicamente para ambos tipos de aislados. No obstante, para las bacterias acido lácticas se realizó las pruebas de tinción Gram (anexo 5) y las pruebas de catalasa y oxidasa[61] (anexo 6).

4.7 Caracterización molecular

4.7.1 Extracción de ADN

De los aislados de BAL y levaduras, se requirió un cultivo fresco de 18 h. Para ello se tomaron colonias al azar de las etapas inicial, intermedia y final de la fermentación. Posteriormente se realizó la extracción de ADN de las BAL, según el protocolo de *Sambrook y col., 1999*[62] (anexo 7) y para levaduras mediante el protocolo de *Querol y col.,1992*[63] (anexo 8).

4.7.2 Análisis molecular a nivel de cepa

La técnica utilizada fue REP - PCR con el primer (GTG)5 (5´-GTGGTGGTGGTGGTG-3') descrita por *Gevers y col., 2001*[64] esta técnica fue usada tanto para BAL como para levaduras.

Las condiciones de PCR fueron: una incubación inicial de 94 °C por 5 min; seguido de 30 ciclos de amplificación que consistió en una etapa de desnaturalización por 1 min a 94 °C, seguido de hibridación 40 °C durante 1 min, polimerización a 65 °C por 8 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 0.8 % (p/v) en buffer TBE. Se utilizó el marcador 100 pb Plus DNA Ladder para determinar el peso molecular de las bandas pequeñas y el marcador con la mezcla de DNA del fago lambda digerido con *HindIII-EcoRI y HindIII* para las más grandes. Finalmente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV (anexo 9).

4.7.3 Análisis molecular a nivel de especie

La identificación molecular de las BAL se realizó mediante la técnica de ARDRA - PCR de los genes ribosómicos 16S, según protocolo descrito por *Rodas y col., 2003*[65] se utilizó el termociclador (Perkim Elmer 2400, Norwalk, USA) y los amplificados fueron digeridos con tres enzimas de restricción; *AluI, MseI y HaeIII.*

Las condiciones de PCR fueron: una incubación inicial de 94 °C por 5 min; seguido de 30 ciclos de amplificación que comprende una etapa de desnaturalización durante 30 seg a 94 °C, seguido de hibridación 56 °C durante 30 seg, pasando por el proceso de polimerización a 72 °C durante 1 min. Los productos amplificados fueron detectados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) type IIIA, High EEO (Sigma-Aldrich) en buffer TBE 1X. Se usó el marcador de ADN de 100 pb Plus DNA Ladder, para estimar el tamaño de peso molecular de los productos amplificados. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizados con luz UV (anexo 9.1).

4.7.4 PCR Múltiple

Para la diferenciación de *Lb. plantarum* que presenta cercanía genética con *Lb. pentosus* y *Lb. paraplantarum*, se utilizó el método de *Torriani y col., 2001*[66]*.* Esta técnica utilizó cebadores basados en genes recA;

paraF (59-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-39),

pentF (59-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-39),

planF (59-CCG TTT ATG CGG ACC ACC TA-39) y

pREV (59-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-39).

Las condiciones de PCR fueron una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, hibridación a 56 °C por 10 seg y polimerización a 72 °C por 30 seg y extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % en Buffer TAE (anexo 9.2).

Estas técnicas fueron comprendidas para BAL a continuación se detallará la técnica para identificación a nivel de especie para levaduras;

Para la identificación de levaduras se utilizó el protocolo de *Zarzoso y col., 1999*[67] utilizando la técnica de RFLP - PCR en la región 5.8S - ITS. Al igual que las BAL se utilizó el termociclador (Perkim Elmer 2400, Norwalk, USA) y para la digestión se usaron las enzimas; *HaeIII, CfoI* y *HinfI*.

Las condiciones de PCR fueron: una incubación inicial de 95 °C por 5 min; seguido de 30 ciclos de amplificación que comprende una etapa de desnaturalización durante 30 seg a 95 °C, seguido de la hibridación 52 °C durante 1 min, pasando por el proceso de polimerización a 72 °C durante 1 min. Los productos amplificados fueron detectados por electroforesis en geles de agarosa (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) al 0.8 % (p/v), con buffer TBE 1X. Se utilizó el marcador de ADN de 100 pb Plus DNA Ladder, para estimar el tamaño de peso molecular de los productos amplificados. Finalmente, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV (anexo 9.3).

4.8 Secuenciación de los productos PCR

Los productos amplificados tanto para las BAL como para las levaduras fueron purificados y secuenciados por la empresa Macrogen (USA) bajo las condiciones estandarizadas por ellos. Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas mediante el software Chromas Pro v. 1.42 ® y comparadas con las reportadas en el GenBank usando el algoritmo “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Para la realización del árbol filogénico de BAL y levaduras, se utilizó el software MEGA7[68], mediante el método Neighbour - Joining, la robustez de las ramas está indicada por los valores de bootstrap (%) calculado para 1000 réplicas.

V. RESULTADOS

Se tomaron muestras de ají durante el proceso de fermentación espontánea a los 0, 3, 12, 27, 37 y 47 días. A partir de ello se realizaron los análisis fisicoquímicos, microbiológicos, fenotípicos y moleculares.

5.1 Análisis fisicoquímicos

En la figura 9 se muestran los valores de análisis fisicoquímico durante el proceso de fermentación espontánea, estos análisis se realizaron por triplicado. Al inicio de la fermentación, la acidez total titulable, el pH y azúcares reductores fueron 0.22 ± 0.05 (p/v), 5.47 ± 0.06 y 20.25 ± 1.28 (g/L) respectivamente. En la etapa intermedia (27 días), la acidez total titulable fue 1.58 ± 0.23 (p/v), el pH 3.62 ± 0.03 y azucares reductores 7.95 ± 0.03 (g/L). La finalización de la fermentación fue el día 47, los azúcares reductores mostraron valores de 0.3 ± 0.04 (g/L), pH 3.27 ± 0.01 y la acidez total titulable se mantuvo constante desde la etapa intermedia hasta finalizar la fermentación.

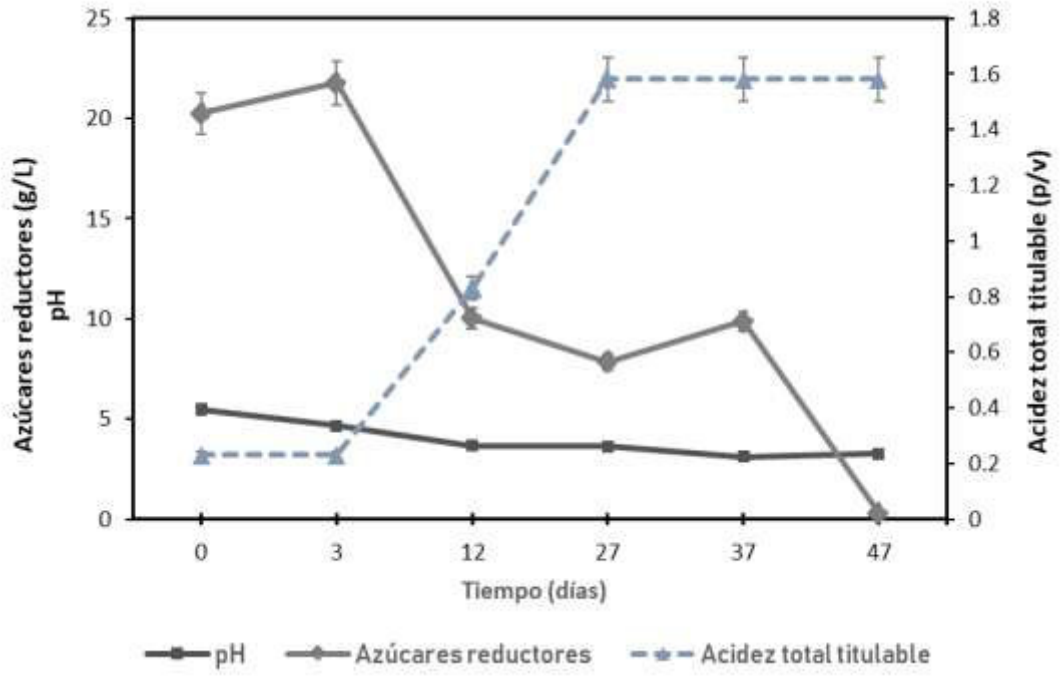


Figura 9. Análisis fisicoquímicos de azúcares reductores, pH y acidez total titulable durante el proceso de fermentación espontánea del ají charapita.

5.2 Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron en los medios MRS y YPD, para BAL y levaduras respectivamente, Mc Conkey (enterobacterias) y Cetrimide (Pseudomonas). Asimismo, el recuento de células viables fue en placa por triplicado.

En la figura 10, se muestra la población de bacterias acido lácticas con 5.10 log_{10} $UFC.mL^{-1}$ en el ají sin fermentar. Con respecto a los días evaluados de la fermentación espontánea del ají en la etapa inicial, intermedia y final, se obtuvo la predominancia de las BAL en los días 0, 3, 12, el cual inicio con 5.73 log_{10} $UFC.mL^{-1}$ y finalizó con 6.44 log_{10} $UFC.mL^{-1}$. A la vez, la población de levaduras se incrementó a partir del día 27 con 5.47 log_{10} $UFC.mL^{-1}$ y finalizó con 6.58 log_{10} $UFC.mL^{-1}$. Las enterobacterias fueron aisladas desde el inicio de la fermentación y finalizó a los 3 días con 1.00 log_{10} $UFC.mL^{-1}$. Por el contrario, las pseudomonas se aislaron solo en el ají sin fermentar con 2.92 log_{10} $UFC.mL^{-1}$ y en el día 0, hallándose en bajas poblaciones.

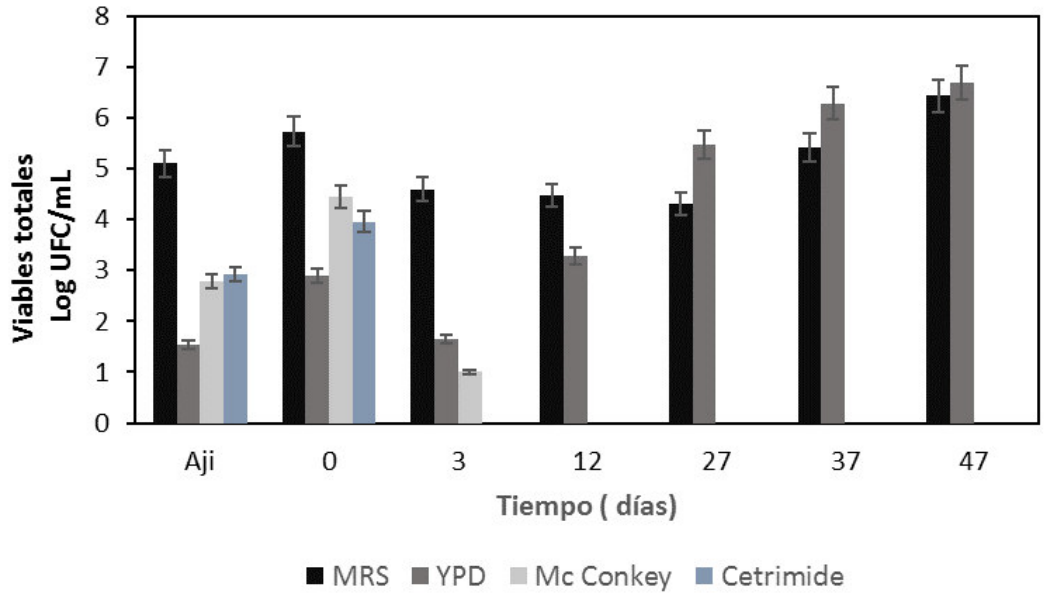


Figura 10. Recuento microbiano de la fermentación espontánea del ají charapita.
BAL (MRS), levadura (YPD), enterobacterias (Mc Conkey), pseudomonas (Cetrimide).

5.3 Identificación fenotípica de BAL y levaduras

De las levaduras se obtuvieron 40 aislados en medio YPD suplementado con cloranfenicol. Las colonias se seleccionaron por características de color, borde, consistencia y forma. Así, la mayoría de las colonias fue de consistencia cremosa, blanca y crema con tonalidades amarillas. La forma de las colonias varió entre redonda, ovalada y esférica (anexo 5.1).

De las bacterias acido lácticas se obtuvieron 45 aislados, las colonias fueron redondas, blanquecinas aproximadamente de 1.0 a 1.5 mm de diámetro, con aspecto cremoso, superficie convexa y borde entero.

Las pruebas catalasa y oxidasa para los aislados BAL fueron negativas, asimismo, se observaron bacilos y cocos Gram positivos, siendo características de este grupo bacteriano.

5.4 Caracterización molecular de BAL y levaduras

Durante el proceso de fermentación espontánea del ají charapita se recolectaron muestras aleatorias que correspondieron a 0, 12, 27 y 47 días. Asimismo, se muestreó al ají charapita en su estado natural, a fin de dar a conocer la microbiota propia de la muestra.

Los métodos utilizados fueron dependientes de cultivo, por lo cual se cultivaron en los medios correspondientes de BAL y levaduras, de este modo, se obtuvo la biomasa para la extracción de ADN según los protocolos de *Sambrook y col., 1999*[62] para bacterias acido lácticas y de *Querol y col., 1992*[63] para levaduras.

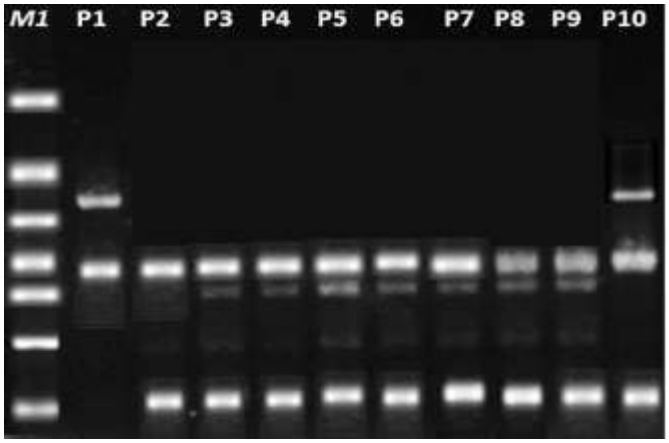
De los 45 aislados de BAL se identificaron tres especies, mediante la técnica ARDRA - PCR, asimismo, se amplificó los genes ribosómicos 16S y la secuenciaron parcialmente. Además, se realizó la PCR Múltiple para la diferenciación de cepas de *Lactobacillus plantarum*, utilizando como referencia a *Lb. plantarum* ATCC 14917.

De los 40 aislados de levaduras, se identificaron a cinco especies mediante la técnica de RFLP - PCR de la región 5.8S conteniendo los espaciadores intergénicos colindantes, asimismo, esta región fue secuenciada parcialmente.

5.4.1 Análisis molecular de microorganismos del ají charapita en su estado natural mediante REP - PCR.

Del ají charapita se aislaron diez colonias de BAL y cuatro de levaduras. De los diez aislados de BAL se obtuvieron tres perfiles de ADN denominados PBAL1A, PBAL2A y PBAL3A. Con respecto a las levaduras, se obtuvieron los perfiles PLEV1A, PLEV2A y PLEV3A (Figura 11).

A)



B)

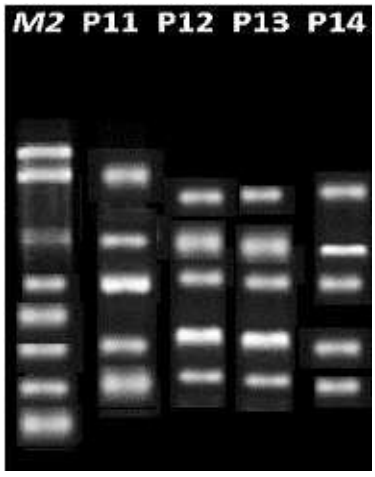


Figura 11. Geles de agarosa conteniendo los perfiles de ADN de los microorganismos aislados de ají en su estado natural utilizando REP - PCR.

A) M1, marcador 100pb; P1- P10 aislados BAL, correspondiendo P1 a PBAL1A; P2 al P9 a PBAL2A y P10 a PBAL3A. **B)** M2, Marcador ADN lambda/Eco RI + HindIII. P11- P14, aislados de levaduras correspondiendo: P11 a PLEV1A, P12 y P13 a PLEV2A y P14 PLEV3A.

De igual forma, a nivel de especie en las BAL se observaron perfiles diferentes, con referente a los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos después de la digestión de los genes ribosómicos 16S. Con respecto a las levaduras mediante la digestión de la región 5.8S – ITS, el perfil L4 y L5 presentaron variabilidad entre sí, con las enzimas de restricción utilizadas.

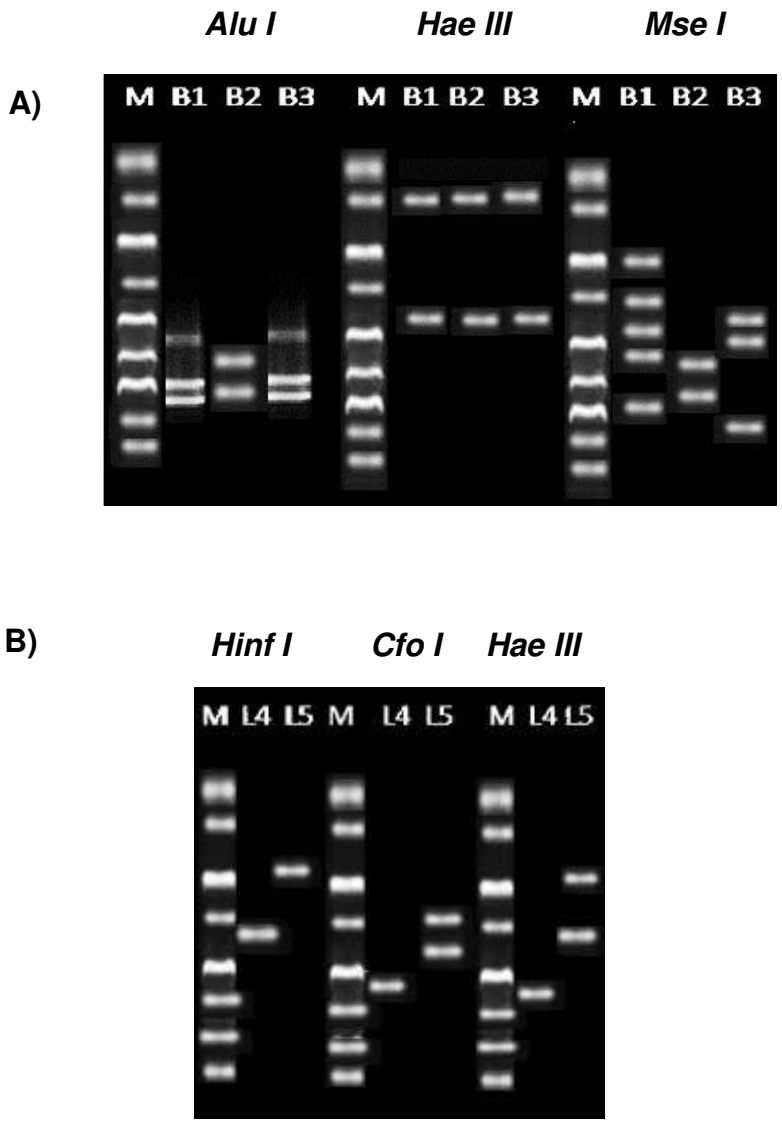


Figura 12. Geles de agarosa con perfiles de ADN de los microorganismos aislados del ají charapita en su estado natural.

A) Genes ribosómicos 16S amplificados de BAL y cortados con enzimas. **B)** Región 5.8S – ITS amplificada de levaduras y cortada con enzimas.

5.4.2 Análisis molecular a nivel de cepa de los microrganismos aislados de la fermentación espontánea del ají charapita

En el proceso fermentativo de la ají charapita se diferenció tres etapas, inicial (hasta el décimo segundo día), intermedia (vigésimo séptimo día) y final (cuadragésimo séptimo día). En la figura 13 se muestran los perfiles de ADN de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita mediante REP- PCR (GTG)5.

Al inicio de la fermentación, los perfiles de ADN de las bacterias ácido lácticas (P1 y P2) se muestran en la figura A y las levaduras en la figura B, correspondientes a P3 a P11 mostraron diferencias entre sí.

El décimo segundo día del proceso fermentativo del aji charapita, se identificó un perfil de BAL. Para levaduras se encontráron dos perfiles del dia evaluado. En el vigésimo séptimo día se aislaron 10 colonias para BAL, encontrando cuatro perfiles que corresponden a P1, P2, P5 y P9. Además, para las levaduras se aislaron 10 colonias obteniendo dos perfiles (resultados no mostrados). Finalmente, en el cuadragésimo séptimo día de la fermentación espontánea del ají charapita, se obtuvieron 10 aislados para BAL y cinco para levaduras.

De los aislados que presentaron perfiles de ADN diferentes durante la fermentación espontánea del ají charapita se amplificaron los genes ribosómicos 16S para BAL y la región 5.8S con espaciadores intergénicos colindantes para levaduras. Los productos amplificados se enviaron a secuenciar para determinar el género o especie.

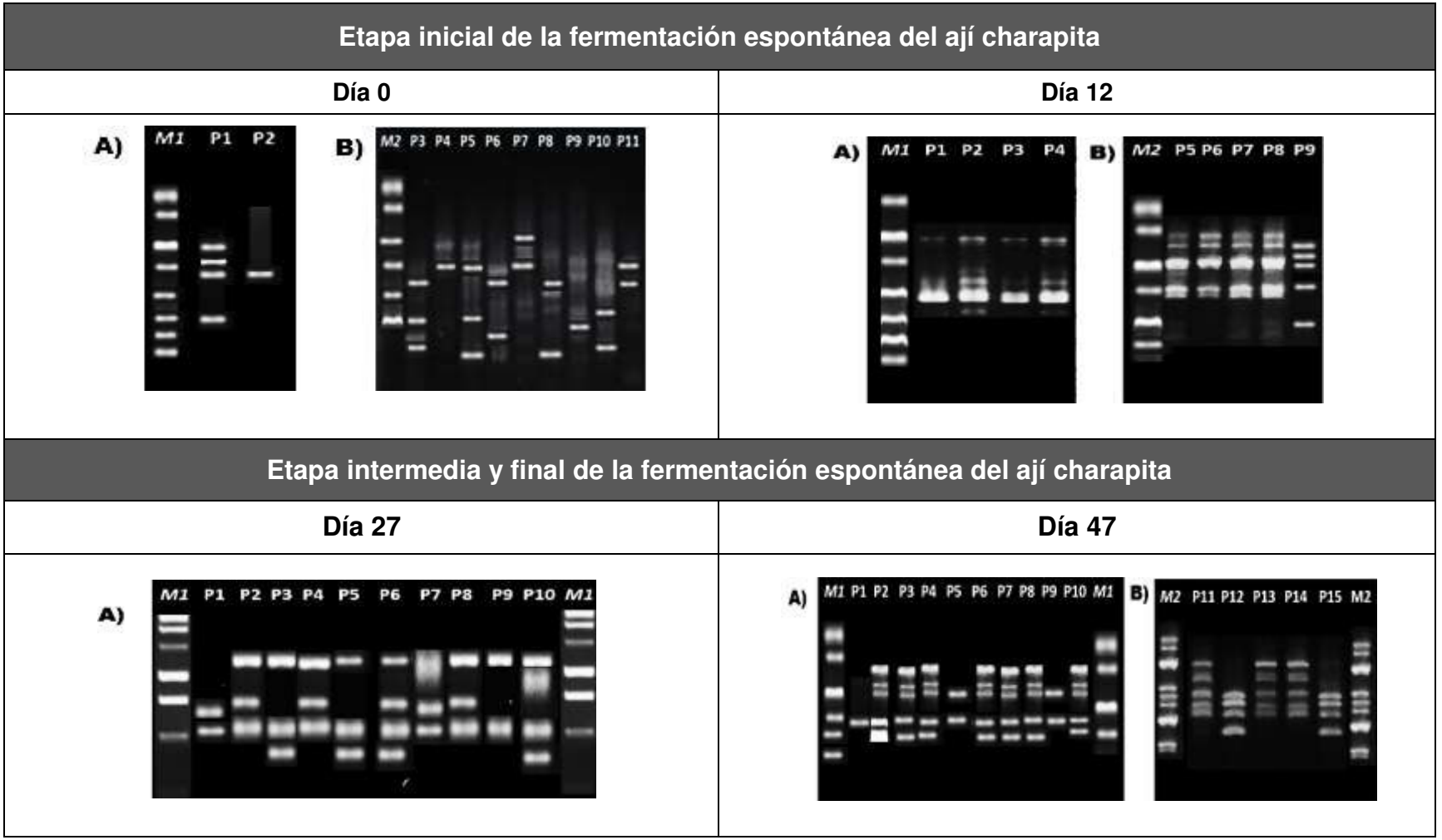


Figura 13. Geles de agarosa conteniendo los perfiles de ADN de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita mediante REP - PCR.

A) BAL; M1, marcador 100pb. **B)** levaduras; M2: Marcador ADN lambda / EcoRI+ Hind III.

5.4.3 Análisis molecular a nivel de especie de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita mediante ARDRA - PCR y RFLP - PCR

La identificación a nivel de especie se realizó amplificando los genes ribosómicos 16S para BAL y en la región 5.8S - ITS para levaduras. Además, se utilizó a *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 como cepa de referencia (CR).

En la etapa inicial, los perfiles B2 y B3 mostraron similitud de fragmentos de ADN con respecto a CR. Los perfiles B1, B2 y B3 de los 27 y 47 días muestran perfiles de ADN similares a *Lb. plantarum* con las diferentes enzimas de restricción. Sin embargo, *Lb. plantarum* presenta cercanía genética con *Lb. pentosus* y *Lb. paraplantarum,* por lo cual se utilizó la técnica de PCR múltiple mediante el protocolo de *Torreani y col.*, 2001 pero no se encontraron diferencias entre las especies mencionadas. De esta manera se confirmó las cepas de *Lactobacillus plantarum* pertenecen a esta especie, el mismo resultado fue obtenido por secuenciación de los genes ribosómicos 16S. No obstante, el perfil B1 perteneciente a la etapa inicial de la fermentación, presentó fragmentos de ADN diferentes a los de *Lb. plantarum*, mediante secuenciación se identificó como *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

Con relación a las levaduras, en la etapa inicial se obtuvieron cuatro perfiles que se identificaron mediante secuenciación de la región 5.8S y regiones intergénicas colindantes como *Hanseniaspora opuntiae, Debaryomyces nepalensis*, *Kodamaea ohmeri* y *Candida parapsilosis.*

Mientras que en el vigésimo séptimo día se demostró la predominancia de *Kodamaea ohmeri*. A la vez, en el cuadragésimo séptimo día, se identificaron a *Pichia kudriavzevii*, *Hanseniaspora opuntiae* y *Kodamaea ohmeri* (Tabla 9).

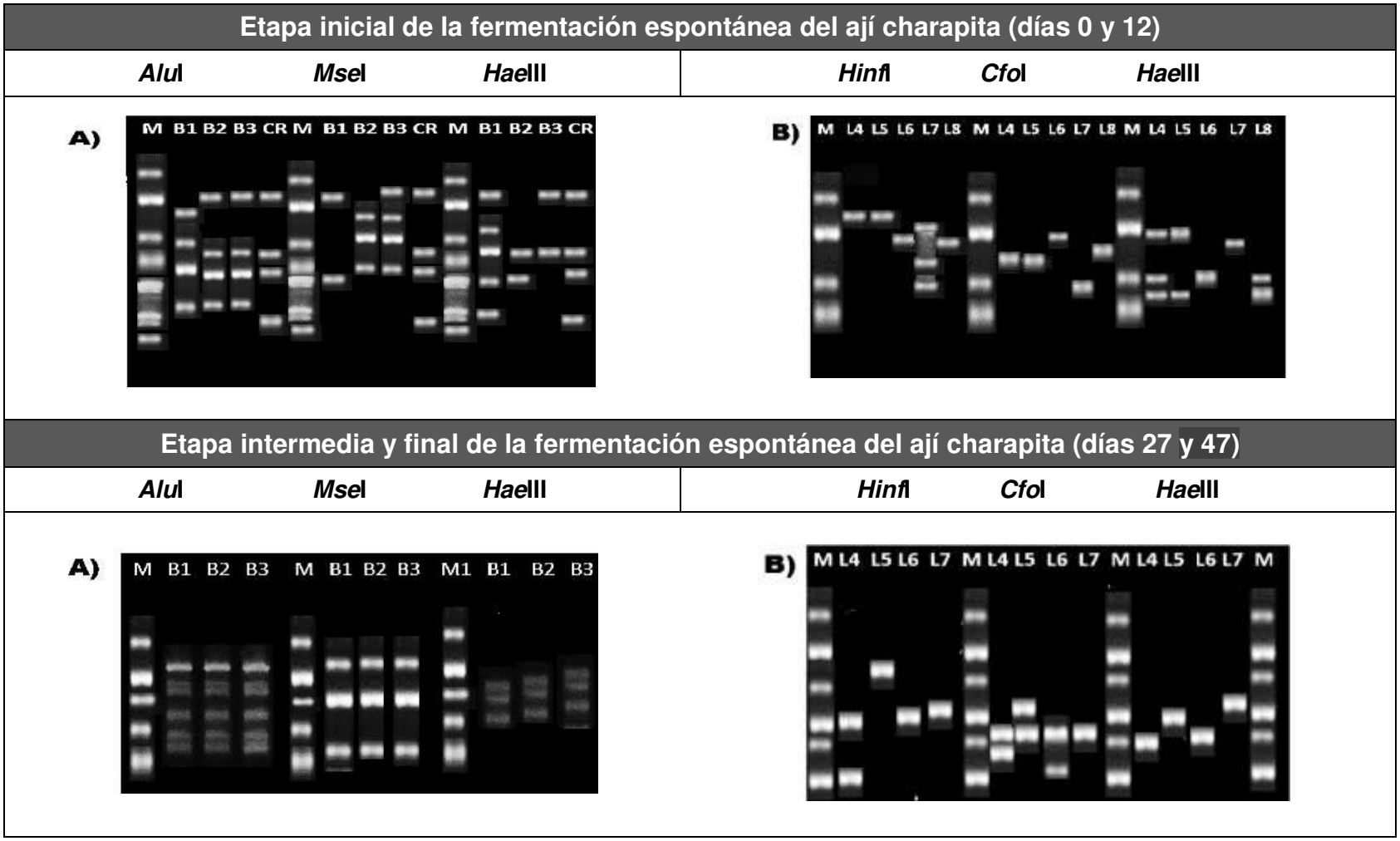


Figura 14 . Geles de agarosa con los perfiles de ADN amplificados y cortados de los microorganismos aislados durante la fermentación espontánea del ají charapita.

A) Digestión de genes ribosómicos 16S de BAL según enzima de restricción; CR: *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. **B)** Digestión de la región 5.8S-ITS de levaduras. M; marcador 100 pb.

Tabla 9. Distribución de BAL y levaduras, aisladas de la fermentación espontánea del ají charapita mediante técnicas microbiológicas y moleculares

			Días de fermentación			
	Microorganismos	**Ají sin fermentar**	**0**	**12**	**27**	**47**
Bacterias ácido lácticas	*Weissella confusa*	+	-	-	-	-
	Leuconostoc pseudomesenteroides	-	+	-	-	-
	Lactobacillus plantarum	-	+	+	+	+
Levaduras	*Candida parapsilosis*	+	+	-	-	-
	Pichia kudriavzevii	-	-	-	-	+
	Debaryomyces nepalensis	-	-	+	-	-
	Kodamaea ohmeri	-	-	+	+	+
	Hanseniaspora opuntiae	-	+	-	-	+

Presencia (+)
Ausencia (-)

5.5. Relación filogenética de BAL aislada del ají en su estado natural y de la fermentación espontánea con las referencias obtenidas del GenBank

De las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las BAL se realizó el árbol filogenético, dichas secuencias se ensamblaron y alinearon mediante el software Chromas Pro y MEGA7 respectivamente. Las secuencias de los aislados del ají charapita (A2) así como los de la fermentación espontánea correspondieron a D0, D12, D27 y D47 (anexo11). Además, se utilizaron las secuencias de los genes ribosómicos 16S del GenBank como referencias (anexo 10).

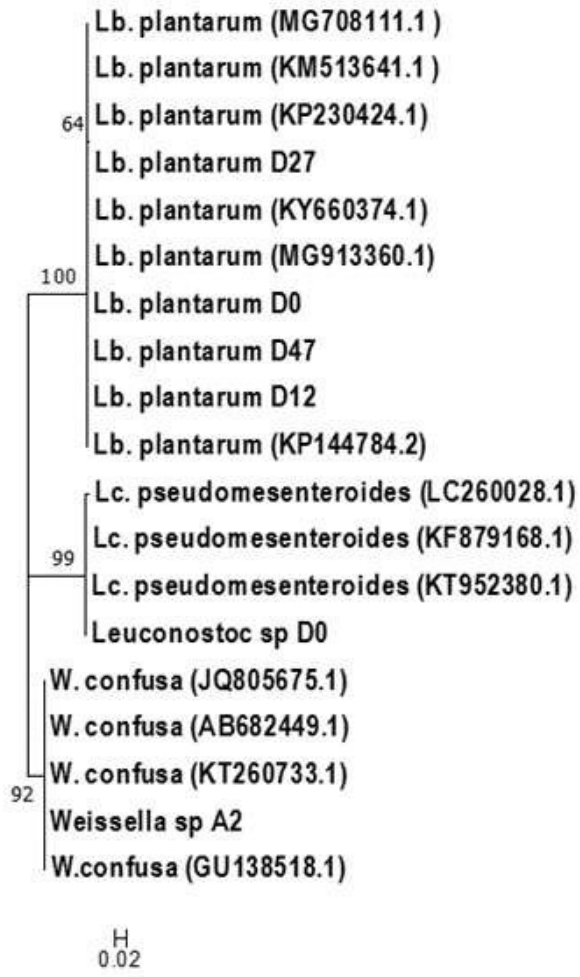


Figura 15 . Relación filogenética de los aislados del ají charapita en su estado natural y de la fermentación espontánea con base a las secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S.

Para la construcción del árbol filogenético se usó el método neighbour-joining. La robustez está indicada en valores bootstrap (%) calculado para 1000 repeticiones. Lb, *Lactobacillus*; Lc, *Leuconostoc;* W, *Weissella.*

5.6. Relación filogenética de levaduras de los aislados del ají en su estado natural y de la fermentación espontánea con las referencias obtenidas del GenBank

De manera similar a las BAL, se realizó el árbol filogenético utilizando las secuencias obtenidas de las levaduras aisladas de la fermentación espontánea, así como de su estado natural siendo D0, D12, D27, D47 y A2 respectivamente (anexo 13); Asimismo, se utilizaron secuencias del GenBank como referencias mediante programa informático BLAST (anexo 12). En la figura 16 se observa a los cinco géneros obtenidos de los aislados de la fermentacion espontánea.

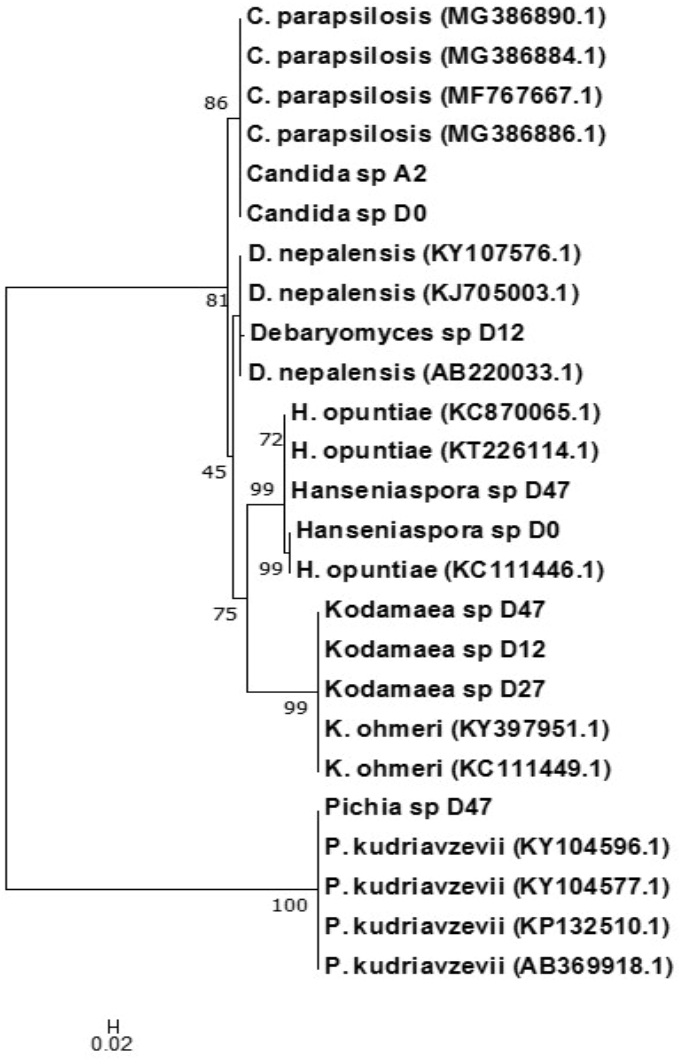


Figura 16 . Relación filogenética de los aislados del ají en su estado natural y la fermentación espontánea del ají charapita junto a cepas de referencia de levaduras.

Para la construcción del árbol filogenético se usó el método neighbour-joining. La robustez está indicada en valores bootstrap (%) calculado para 1000 repeticiones. C, *Candida*; D, *Debaryomyces*; H, *Hanseniaspora*; K, *Kodamaea*; P, *Pichia*.

VI. DISCUSION

Actualmente, la tendencia por el consumo de productos naturales está ganando importancia, incrementándose la exigencia de alimentos que cumplan con los estándares de calidad y brinden beneficios saludables al consumidor. En base a ello, se están desarrollando productos de valor agregado utilizando alimentos nativos, sin embargo, se requiere optimizar los procesos para alargar la vida útil y el rendimiento del producto. En tal sentido, el objetivo de esta investigación se centra en la identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita, usando métodos microbiológicos, fenotípicos y moleculares para dar a conocer los microorganismos predominantes en el proceso fermentativo.

En la fermentación espontánea de vegetales participan diversos microorganismos, la predominancia de uno o más dependerá de las condiciones que se le dé al proceso de fermentación. Los microorganismos mayormente desarrollados son las bacterias ácido lácticas y levaduras; formando así un consorcio microbiano según las concentraciones de sal, azúcares y factores ambientales. En tal sentido, Sueros, 2017[69] en el estudio de la optimización de la fermentación espontánea del ají "charapita", determinó en escala piloto las concentraciones de NaCl (5%) y glucosa (2.5%) (p/v), con la finalidad de aumentar la acidez, y disminuir la proliferación de microorganismos indeseables. Estas condiciones permitieron desarrollar el proceso de fermentación espontánea y controlada a los 47 y 37 días respectivamente. No obstante, las concentraciones finales de ambos tipos de fermentación fueron similares con respecto al pH, acidez total titulable y azúcares reductores; cabe señalar que las concentraciones de acidez fueron de 0.23 a 1.58 ± 0.16 (p/v) favorecieron la proliferación de BAL durante la fermentación espontánea del ají charapita. Este trabajo coincide con lo reportado por Vegas y col., 2016[70] donde señalan la predominancia de las BAL, seguido de las levaduras, siendo mutuamente estimuladas para su desarrollo a lo largo de la fermentación de ajíes. Asimismo, las enterobacterias y las pseudomonas predominaron en bajas cantidades en ambos tipos de fermentaciones[60-71]. La presencia de BAL y levaduras es debido al co-metabolismo existente entre ambos microorganismos, es decir, el ácido

láctico favorece el desarrollo de ciertas levaduras, que a su vez contribuye a la formación de sustancias nutritivas y las cualidades organolépticas[72,73].

Por otro lado, el estudio de la microbiota del ají charapita en su estado natural, mostró mayor presencia de bacterias acido lácticas que levaduras; y en menor proporción de enterobacterias y pseudomonas. Al utilizar este fruto en la fermentación espontánea, las BAL predominaron hasta los 12 días, después se incrementaron las levaduras las cuales finalizaron el proceso fermentativo (Figura 10). Sin embargo, el aislamiento de microrganismos en los medios MRS, YPD, Mc Conkey y Cetrimide puede ser afectado por el estado viable no cultivable, es decir, aquellos microorganismos que no se adaptan a los medios o condiciones utilizadas en el estudio, no obstante, aún siguen siendo fuente de investigación[74].

En la caracterización molecular de los microorganismos aislados durante el proceso fermentativo del ají charapita se utilizaron las técnicas ARDRA para la identificación de BAL y RFLP - PCR para levaduras. La técnica REP - PCR se utilizó para la genotipificación a nivel de cepa en ambos casos, estas técnicas en conjunto con la secuenciación fueron utilizadas para la identificación de los microorganismos aislados del ají en su estado natural y en la fermentación espontánea. Asimismo, se realizó el análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los microorganismos aislados y las cepas de referencia del GenBank de este modo se construyó los arboles filogenéticos para BAL y levadura presentados en la figura 15 y 16 respectivamente.

La fermentación espontánea del ají charapita se caracterizó por presentar tres etapas: iniciación, donde se muestra una microbiota heterogénea conformada por bacterias Gram negativas y positivas, predominando las BAL, la intermedia comprendida por BAL y levaduras y la finalización se caracterizó por el incremento de levaduras (Figura 10). En este contexto, las BAL se presentan mayormente en diversas fermentaciones de vegetales, siendo lo más descritos los géneros de *Lactobacillus y Pediococcus.* En algunos casos están presentes en las etapas finales, dependerá de los productos utilizados y las condiciones del fermento[34].

La etapa inicial de la fermentación del ají charapita, se caracterizó por presentar, una población mayoritaria de bacterias ácido lácticas, enterobacterias y pseudomonas, esta última disminuyó en el tercer día por incremento de las BAL. Además, en la etapa inicial se determinaron cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc sp,* estos microorganismos predominaron desde el día 0 hasta el día 12 de la fermentación. En el caso del género *Leuconostoc* es sensible a temperatura ambiental, ya que según Montaño y col.[21] describe en la fermentación de col acida que este microorganismo en mención se desarrolla en la fase primaria de 8 °C a 18 °C, pero al incrementar la temperatura entre 32 °C a 37 °C disminuye el periodo de crecimiento, favoreciendo el desarrollo de *Lb. plantarum* coincidiendo con lo reportado en esta investigación. Con respecto a las levaduras, mediante RFLP - PCR y REP - PCR se identificaron a los géneros *Hanseniaspora* y *Debaryomyces* en el día 0. Asimismo, en el día 12 se identificaron a *Kodamaea* y *Candida.* No obstante, Chanprasartsuk y col., 2013[75] describen la presencia de *Hanseniaspora uvarum, Hanseniaspora opuntiae, Pichia guilliermondii, Aureobasidium pullulans, Saccharomycodes ludwigii, Candida tropicalis, Pichia fermentans y Zygosaccharomyces bailii*, en la fermentación espontánea del jugo de *Ananas comosus L.* en Tailandia. De igual forma, Lagos, 2017[76] reportó en fermentados de cacao diversidad de microorganismos similares a los mencionados, utilizando RFLP - PCR de la región 26S. Indicando que estos microorganismos están presentes en diversos alimentos de origen vegetal.

En las etapas media y final de la fermentación espontánea del ají charapita, correspondientes a los días 27 y 47 respectivamente, se caracterizaron por el crecimiento exponencial de *Lactobacillus plantarum*, siendo la BAL predominante en los días muestreados del fermento. En particular, la predominancia de ciertos microorganismos depende de las condiciones de la fermentación y los factores ambientales o geográficos de la muestra vegetal. En la fermentación espontánea, el pH de la salmuera desciende, hasta 3.27 y por consiguiente la acidez total titulable aumenta llegando a valores de 1.58 ± 0.23 (p/v), contribuyendo al desarrollo de las BAL (Figura 9).

La solución de fermentación o líquido de fermentación, compuesto por la salmuera y los azúcares, proporciona un medio propicio para el crecimiento de microorganismos exigentes como el *Leuconostoc mesenteroides* que juega un papel importante en la fermentación de la col siendo predomínate en la fermentación primaria. Sin embargo, en la fermentación de aceitunas y pepinillos se encuentra en menor proporción debido a la mayor concentración de NaCl utilizada para estos últimos productos[72]. Esta concentración no debería exceder al 8% (p/v) en la solución de fermentación con el fin de no retardar el desarrollo de las BAL[21]. No obstante, el líquido de fermentación favorece la formación de compuestos orgánicos y otros componentes que potencian las cualidades organolépticas de la fermentación influyendo en la calidad del producto final. El proceso fermentativo del ají charapita, finalizó cuando la concentración de azúcares reductores en la fermentación disminuyó a 0.3 ± 0.04 g/L para el día 47. Estos resultados fueron similares a los descritos por Lucena, 2016[34] quien determinó la diversidad microbiana asociada a la fermentación de aceitunas verdes de mesa, indicando que *Lactobacillus pentosus* fue responsable de liderar la fermentación y en menor proporción *Lactobacillus paracollinoides/collinoides, Pediococcus parvulus, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus parafarraginis*, entre otras. Además, las levaduras principalmente descritas fueron *Candida, Pichia, Saccharomyces*, según la técnica de PCR - DGGE. Asimismo, Di Cagno y col., 2009[77] identificaron en pimientos fermentados *(Capsicum annum L.)* a *Lactobacillus curvatus, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum* y *Weissella confusa*, siendo las BAL semejantes a las identificadas en la fermentación espontánea del ají charapita.

Con respecto a las levaduras se identificaron en el día 12 a los géneros *Candida y Kodamaea*, este último microorganismo predomino en el día 27; mientras que el día 47 se encontraron a los géneros *Pichia, Hanseniaspora* y *Kodamaea.* No obstante, el recuento de levaduras fue inferior a las BAL en los días iniciales. Cabe mencionar que, al agotarse los nutrientes en el proceso fermentativo de vegetales, se desarrollan microorganismos pertenecientes al género *Propionibacterium* que consume los ácidos orgánicos generados durante la fermentación. De este modo, los niveles de pH se incrementan, alterando al producto final. Esta etapa se conoce como cuarta etapa o “post fermentación”,

ocasionada por levaduras de metabolismo oxidativo, dicha alteración del producto se corrige mediante cambios en el pH y la concentración salina[21,34,72].

Algunas de las levaduras aisladas podrían resultar beneficiosas e incluso influir positivamente durante la fermentación mejorando el producto final y sus cualidades organolépticas. Además, las levaduras poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de otras levaduras y hongos gracias a su actividad micogénica[32]. Por otra parte, la relación existente de las levaduras en el fermento y su interacción con otras especies es compleja pero importante para mejorar los procesos y productos[78].

VII. CONCLUSIONES

1. En la fermentación espontánea del ají charapita, se aislaron BAL y levaduras por medio de técnicas microbiológicas. Asimismo, se identificaron fenotípicamente ambos microorganismos.
2. Las técnicas moleculares permitieron la identificación de las BAL: *Lactobacillus plantarum Weissella confusa y Leuconostoc pseudomesenteroides.* Siendo *Lactobacillus plantarum,* de mayor predominancia y el responsable de iniciar la fermentación en conjunto con *Leuconostoc pseudomesenteroides.*
3. Se identificaron mediante secuenciación de la región 5.8S - ITS a las levaduras: *Candida parapsilosis, Hanseniaspora opuntiae, Debaryomyces nepalensis, Pichia kudriavzevii y Kodamaea ohmeri*.
4. Las BAL fueron predominantes al iniciar el proceso y las levaduras, en simultáneo con las BAL, finalizaron la fermentación espontánea del ají charapita.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el empleo de técnicas moleculares dependientes e independientes de cultivo, trabajándolas en conjunto, a fin de tener un mayor poder resolutivo.
2. Con respecto a la estimación del número de muestreos en el fermento se recomienda que sea más amplio y que estos puedan dar a conocer nueva microbiota del fermento de ají charapita.
3. En base a la predominancia de ciertos microorganismos beneficiosos a la fermentación, se recomienda su uso potencial como inóculos, previo estudio de producción de compuestos inocuos, a fin de optimizar el proceso fermentativo.
4. Se recomienda estudiar la variabilidad de BAL y levaduras en el ají charapita según la estacionalidad y la región geográfica.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jäger M, Jiménez A, Amaya K. Guía de oportunidades de mercado para los ajíes nativos de Perú. Cali, Colombia: Bioversity International; 2013.
2. Arévalo Ramírez J. Efecto de cuatro dosis de thihormona en el cultivo de ají charapita (*Capsicum frutescens* L) variedad nativa, bajo condiciones agroecológicas en la provincia de Lamas [Tesis de pregrado]. Tarapoto: Perú, UNSM; 2014.
3. Rengifo J, Saavedra J. Procesamiento y evaluación de la calidad de encurtido picante tipo pickle de *Averrhoa carambola L*. (carambola), *Averrhoa bilimbí* L. (Limón chino) y *Capsicum frutescens* (ají charapita). [Tesis de pregrado] Iquitos: Perú, UNAP; 2015.
4. Arroyo M. Efecto del tratamiento térmico en las propiedades reológicas de salsas de ajíes nativos del Perú (*Capsicum sp*). [Tesis de pregrado] Lima: Perú, UNALM; 2017.
5. APEGA, UNALM, INIA U. Ajíes peruanos: Sazón para el mundo. El Comercio editor, Lima: Perú; 2009
6. MINAN, Alvarado C. Servicio de elaboración del contenido para un catálogo de pasaporte de la colección de germoplasma de *Capsicum*". Lima: Perú; Dirección general de diversidad biológica; 2015.
7. Carranza J. Estudio fluido dinámico del ají charapita (*Capsicum frutescens*). [Tesis de Maestría] Lima: Perú, UNI; 2013.
8. ADEX, Gómez R. Capsicum peruanos: Análisis y Retos. Lima; 2017.
9. Oruña M. Estudio de modificaciones químicas en *Capsicum annuun* L. durante su conservación [Tesis de doctorado] España, USC; 1996.
10. Libreros D, Zonneveld M, Petz M y col. Catálogos de ajíes (*Capsicum spp.)* peruanos promisorios conservados en el banco de semillas del INIA-Perú. Cali, Colombia: Bioversity International; 2013.
11. Vázquez F, F, Miranda H, Monforte M, Gutiérrez G y col. La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. Revista Fitotecnia Mexicana.2007;30(4):353-360. Recuperado de: http://doi id=61030402.
12. Restrepo M. Oleorresinas de *Capsicum* en la industria alimentaria. Revista La sallista de Investigación. 2006.3(2):43-47. Recuperado de: http://doi id=69530208.

13. Ranjan M. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. Biotechnology Research international. India; 2014.Recuperado de: http://doi:id=10.1155/2014/250424
14. Seseña S. Caracterización tecnológica de cepas autóctonas y selección de cultivo iniciadores para la fermentación de la berenjena de Almagro. [Tesis de doctorado]. Universidad de Castilla, España;2005.
15. Ross, R.P., Morgan, S. y Hill, S. Preservation and fermentation: past, present and future. Int. J. Food Microbiol. 2002; 79, 3-16. Recuperado de: http://doi id=12382680
16. Di Cagno R, Coda R, y col. Expolation vegetables and fruits through lactic acid fermentation, food microbiology. 2013; 33: 1-10.
17. Domínguez J. Estudio de las relaciones entre los microorganismos presentes en las fermentaciones de la aceituna de mesa [Tesis doctoral]. Universidad de Sevilla, España; 2013.
18. García Y. Desarrollo de vegetales fermentados con cepas iniciadoras potencialmente probióticas [Tesis de maestría]. Universidad de la Habana, Cuba; 2010.
19. Ramírez M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. [Tesis de licenciatura Químico de alimentos]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, España; 2005.
20. Agurto T, Ramos J. Bacterias ácido lácticas: Biopreservante de los alimentos. Biotempo. 2008 vol. 8: 54-64.
21. Montaño A., De Castro A., Rejano L. Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. Instituto de la grasa y sus derivados, Sevilla; España;1992.
22. Palpacelli V, Ciani M, Rosini G Activity of different “killer” yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. FEMS Microbio Lett. 1991. 84:75–78.
23. Moreau C. Microbiología alimentaria Capítulo 3: los mohos. Parte I: los microorganismos de las fermentaciones. Acribia S.A. Zaragoza. España. 1995. vol.2: 35-54.

24. Rodriguez de la borbolla J., Rejano l. La preparación de la aceituna estilo sevillano. La fermentación de vegetales. Grasas y aceites.1981. vol.32: 103-113.
25. Rodriguez S. Estudio comparativo, constructivo y microbiológico, de los sistemas de fermentación industrial de aceitunas de mesa en la provincia de Córdoba. [Tesis doctoral], Universidad de Córdoba, España; 2012.
26. Felis G. y Dellaglio, F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issues Intestinal Microbiology. 2007. vol.8: 44-61.
27. Endo A, Okada S. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov. *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008. 58: 2195-2205.
28. Kim J, Chun J, Han HU. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2000. 50:1915-1919.
29. Holzapfel W, Haberer P y col. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Society for Clinical Nutrition. 2001.73:365S–73S.
30. De Bruyne K, Franz C, Vancanneyt M, Schillinger U y col. *Pediococcus argentinicus* sp. nov. From Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2008.58: 2909 – 2916.
31. Tanasupawat S, Pakdeeto A, y col. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. The Journal of General and Applied Microbiology. 2007.53: 7-15.
32. Straford, M.Food and berevage spoilage yeast. In: Querol, A. and Fleet, H Yeast in food and beverage. Sringer-Verlag, Berlin.2006. 335-339.
33. Herbert P, Cywinska A,y col. Biogical identification through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London (311-321);2003.
34. Lucena H. Análisis de la diversidad microbiana asociada a la fermentación de aceitunas verdes de mesa por técnicas moleculares

dependientes e independientes de cultivo, [Tesis doctoral], Universidad Pablo de Olavide; Sevilla: España; 2016.

35. Wrent P. Desarrollo de métodos moleculares para la detección y tipificación de cepas de levaduras con interés industrial. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid: España; 2015.
36. Cao, X., Hou, L., Lu, M., Wang, C., Zeng, B. Genome shuffling of Zygosaccharomyces rouxii to accelerate and enhance the flavour formation of soy sauce. Journal of the Science of Food and Agriculture 2010. 90: 281-285.
37. Cano-Garcia, L., Flores, M., Belloch, C. Molecular characterization and aromatic potential of Debaryomyces hansenii strains isolated from naturally fermented sausages. Food Research International. 2013. 52: 42-49.
38. Aryuman, P., Lertsiri, S., Visessanguan, W., Niamsiri, N.y col. A. Glutaminase-producing Meyerozyma (Pichia) guilliermondii isolated from Thai soy sauce fermentation. International Journal of Food Microbiology 2015.192: 7-12.
39. Hibett D y Taylor J. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand. Nature reviews microbiology. 2013. 11: 129-133.
40. Bou G, Fernández-Olmos A, García C y col. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Elsevier, España; 2011. Recuperado de http:/ doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012.
41. García J. Identificación de bacterias acido lácticas mediante perfiles de fermentación y ribotipificación. [Tesis para obtener el título de químico de alimentos] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, España; 2007.
42. Ortiz M. Identificación bioquímicas de bacterias acido lácticas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo, [Tesis para obtener el título de químico de alimentos] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, España; 2006.
43. Fernández A, García C, Sáez J y col. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España; 2010.

44. White J, Bruns T, Lee S y col. Amplication and direct secuencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in: innis, M.A, Gelfand, Sninsky J, White T. PCR protocols academic press.1990.315-322.
45. Schoch C, Seifert k, Huhndorf S, y col. Nuclear ribosomal intenal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012. 109: 6241-6246.
46. Massol A, Odelson D, HIckey R y Tiedje J. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA), Molecular Microbial ecology manual. 1995.vol: 3.3.2: 1-8.
47. Narváez R., Claudio, Valenzuela B. y col. Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. agricultura técnica. 2000.60(4): 320-340. Disponible en: https://dx.doi.org/10.4067/s0365
48. Kunene R, Geornaras L, et al. Characterizacion and determination of origen of lactic acid bacteria from a sorghum-based fermented wearing food by analysis of soluble proteins and amplified fragment length polymorphism fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology. 2000.66: 1084-1092.
49. Segura L, Kirchmayr M, et al. PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas. e-Gnosis. 2010.8:1-12. Recuperado de: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73013006002.
50. Orbera T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam Micol. 2004. vol.21: 15-19.
51. Belloch C, Barrio E., García MD, Querol A. Inter and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus Kluyveromyces. Yeast. 1998. vol. 14: 1341-1354.
52. Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP analysis on the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch Microbiol. 1998. 169: 387-392
53. Vuyst L, Camu N, De Winter T, y col. Validation of the (GTG)5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic

acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. International Journal of Food Microbiology. 2008.125: 79–90.

54. Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F, Lupski J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Meth Mol Cell Biol. 1994. 5:25-40.

55. Bolívar A, Rojas A, García P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Instituto de Inmunología Clínica. 2014. vol. 3(1): 25-33.

56. Palomino C y González Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Rev PeruMedExp Salud Publica. 2014. 31(3): 535-46.

57. Pando-Robles R, Lanz-Mendoza H. La importancia de la proteómica en la salud pública. 2009. 3: S386-S394.

58. Association of Official Analytical Chemist (AOAC). Official Methods of Analysis.18va ed. Meryland: Association of Offical Analytical Chemists. Inc.; 2012.

59. Miller, G. Use of Dinitrosalisyc Acid Reagents for determination of reducing sugar. Anaytical Chemistry. 1959.31: 426-428

60. Hurtado A. Cuantificación de bacterias ácido lácticas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real en la fermentación controlada de *Capsicum frutescens*, ají “charapita”. [Tesis de pregrado]. Perú. UNMSM; 2017.

61. MacFaddin JF. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica [Internet]. 3ª ed. Montevideo: Médica Panamericana. 2000. [citado el 09 de enero 2018]. Disponible en: https://books.google.com/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_

62. Sambrook J. y D.W. Russel. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; 2001.

63. Querol, A., E. Barrio, T. Huerta y D. Rambn. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. 1992. 58: 2948-2953.

64. Gevers D, G. Huys y J. Swings.Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS Microbiol; 2001. Disponible en: http://dx.doi.org/ 10.1111/j.1574-6968.2001.
65. Rodas, A., S. Ferrer e I. Pardo. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. System. Appl. Microbiol. 2003. 26: 412-422. Disponible en http://doi: 10.1078/072320203322497446.
66. Torreani S., Felis G., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus* plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers. Applied and environmental microbiology. 2001. 3450–3454. Disponible en: http/doi: 10.1128/aem.67.8.3450–3454.
67. Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburul y A. Querol. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8s rRNA gene and the two-ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. System. Bacteriol. 1999. 49: 329-337. Disponible en http://doi: 10.1099/00207713-49-1-329.
68. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 2016. 33:1870-1874.
69. Sueros S. Optimización de la fermentación láctica espontánea del ají "Charapita" (*Capsicum frutescens*). [Tesis de pregrado]. Perú. UNMSM; 2017.
70. Vegas C, Hurtado A, Amparo I, et al. Análisis de la dinámica de poblaciones microbianas durante las fermentaciones espontánea y controlada del Ají "Charapita" (*Capsicum frutescens*). Sci Agropecuaria. 2016. vol. 7(3): 201–6.
71. Gonzáles D, Sueros S, Vegas C, et al. Caracterización molecular de los microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají "Charapita" (*Capsicum frutescens*). Agron.Colomb.2016. Vol.34(1):1336-1339.
72. Fleming, H. Fermented vegetables. In A.H. Rose (ed.), Economic microbiology. Fermented foods, vol. 7. Academic Press, New York. 1982. 227 pp.

73. Abriouel, H.; Benomar, N.; Lucas, R.; Gálvez, A. Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally fermented Aloreña green table olives. International Journal of Food Microbiology. 2011. 144: 487–496.
74. Fakruddin M, Khanjada-Shahnewaj B. y Stewart A. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective.Hindawi Publishing Corporation ISRN Microbiology. 2013.
75. O. Chanprasartsuk, Ch. Prakitchaiwattana, and R. Sanguandeekul, Comparison of Methods for Identification of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Freshly Crushed Pineapple Juices, J. Agr. Sci. Tech. 2013. vol. 15: 1479-1490.
76. Lagos F, Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (*Theobroma cacao*) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador. [Tesis para la obtención del título de ciencias biológicas] Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito; 2017.
77. Di Cagno R, Surico R, Minervini G, Rizzello G, Gobbetti M. Use of autochthonous starters to ferment red and yellow peppers (*Capsicum annum L.*) to be stored at room temperature. Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiology Applicata, University of Bari, Bari, Italy.2009.
78. Arroyo-Lopez F, Romero V, Bautista J, Rodriguez F, Jimenez R. Yeast in table olive proceccing: desirable or spoliage microorganisms. International Journal of Food Microbiology. 2012.160:42-49.

X. ANEXOS

Anexo 1. Acidez Total Titulable (AOAC 2012)

El método se basa en determinar el volumen de NaOH 0.5 N estándar necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula, el punto final se considera por el cambio de color del indicador Fenolftaleína al 1% p/v.

Procedimiento:

- A 1 mL de la muestra de fermentada espontánea del ají “charapita” y diluir con 100 mL de agua destilada.
- Añadir tres gotas de fenolftaleína al 1%.
- Valorar con la solución de NaOH 0.5 N hasta obtener la coloración rosada.

Cálculo:

$$\text{Porcentaje de acidez (expresado en ácido láctico)} = \frac{Vg \times N \times Milieq \times 100}{Vm}$$

Vg: Volumen de gasto del NaOH (mL).

N: Normalidad de la base (0.5 N).

Milieq: 0,09 para ácido láctico.

Vm: Volumen de muestra (mL).

Anexo 2. Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959)

Es una técnica de óxido - reducción que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3.5 - dinitrosalicílico bajo determinadas condiciones; esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Se evidencia por medio de la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro, lo que conlleva a la aplicación de la Ley de Beer-Lambert (Miller, 1959).

Reactivo:

Ácido 3.5 - dinitrosalicílico (DNS): Se adicionó 50 mL de agua destilada y 1.6 g de Hidróxido de sodio, se disolvió mediante agitación continua en plancha magnética a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciono lentamente 43.8 g de Tartrato de sodio y potasio hasta que se disolvió por completo (60 °C por 10 min). Recubrir el recipiente con papel Kraft (con el fin de proteger de la luz) y se agregó lentamente 1 g de ácido 3.5 - dinitro salicílico. Se completó con agua destilada hasta 100 mL en balón aforado. Se mantuvo la mezcla a un frasco oscuro y se dejó agitando durante 12 horas aprox. Filtrar antes de utilizar el reactivo.

Procedimiento:

Las muestras obtenidas de la FAL del ají “charapita” fueron centrifugadas a 10000 RPM por 10 minutos. Después, se mezcló 0.125 mL del sobrenadante con 0.125 mL de DNS. Esta mezcla se calentó a 100 °C por 5 min. Luego, se enfrió sobre hielo por 5 min y posteriormente se adiciona 1.25 mL de agua destilada. Dejar en reposo 15 min. Esta solución es leída a una longitud de onda de 540 nm.

Nota: la ecuación de la curva patrón es una ecuación lineal: Y = $ax + b$

Despejar X para hallar la concentración de azúcar de la muestra problema:

x = $y - b/a$

Y; es la Absorbancia hallada de la muestra problema.

Anexo 3. Composición de medios utilizados

MRS (Man, Rogosa y Sharpe) (Merck, Darmstadt, Alemania)

Formula MRS	gramos por litro
Mezcla de peptona	10.0
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sorbitán monoleato	0.001
Sulfato de manganeso	0.05
pH: 6.5 ± 0.2	

Al medio MRS 52.2 g (Merck, Darmstadt, Alemania) se añadió agar 20 g (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y agua destilada cantidad suficiente hasta un litro. Se añade Ázida Sódica 100 mg/L (para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas), autoclavar a 121 °C, 15 psi por 15 min. Se enfrió hasta 50 °C y se añade 100 mg/L de nistatina (Merck, Darmstadt, Alemania) para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras).

YPD (Yeast Peptone Dextrose) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido)

Medio YPD	gramos por litro
Peptona	20.0
Glucosa	20.0
Extracto de levadura	10.0
Agar	20.0
pH: 6.5 ± 0.2	

Se añadió 100 mg/L de Cloranfenicol (Applichem GmbH Damstardt, Alemania), la mezcla de todos los productos se disuelve con agua destilada. Luego se esteriliza mediante la autoclave a 121 °C, 15 psi por 15 min.

Agar Mc Conkey (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido)

Formula Mc Conkey	gramos por litro
Peptona	20.0
Lactosa	10.0
Sales biliares	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	12.0
Rojo neutro	0.075
pH: 7.4 ± 0.2	

La mezcla se disuelve con agua destilada y se autoclava a 121 °C, 15 psi por 15 minutos.

Agar Cetrimide (Merck, Darmstadt, Alemania)

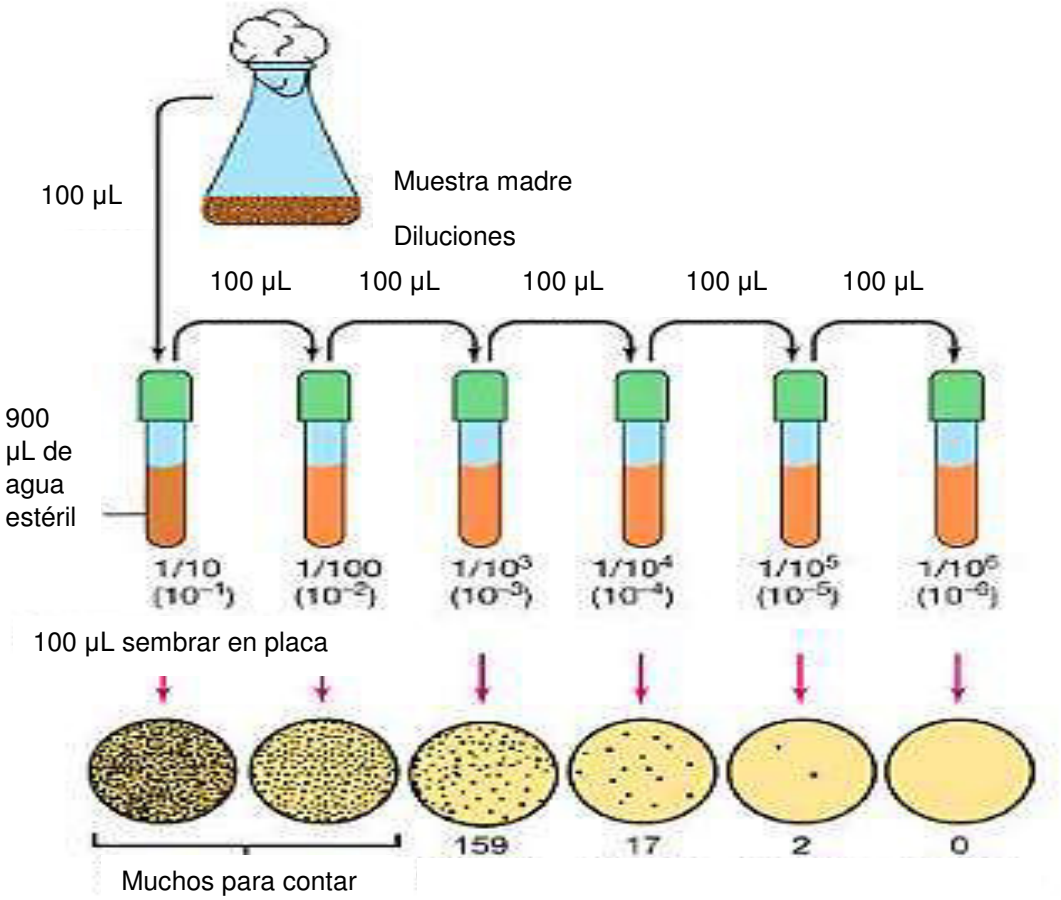
Formula Mc Conkey	gramos por litro
Bromuro de N-Cetil-N, N, N-trimetilamonio (Cetrimida)	0.3
$MgCl_2$	1.4
Peptona de gelatina	20.0
K_2SO_4	10.0
Agar	13.6
Glicerol	10.0
pH: 7.0 - 7.4 ± 0.2	

La mezcla se disuelve con agua destilada y se autoclava a 121 °C, 15 psi por 15 minutos.

Fuente: Vegas y col, 2016[70]

Anexo 4. Técnica de recuento de colonias

Esta técnica consiste en el conteo total de colonias formadas en placa, usualmente se expresa en UFC (Unidades Formadoras de Colonias). Estas colonias representan una agrupación de células con similares características proveniente de una célula madre. Se realizan diluciones seriadas, es decir, de un alícuota 100 µL de muestra se lleva a 1 mL con agua destilada estéril, así sucesivamente de acuerdo con la dilución, como se muestra en el ejemplo;



Cálculo:

$$(\#cel\ contadas)\ (Fact.\ dilución)\ (10) = \text{UFC/mL}$$

Fuente: Vegas y col,. 2016[70]

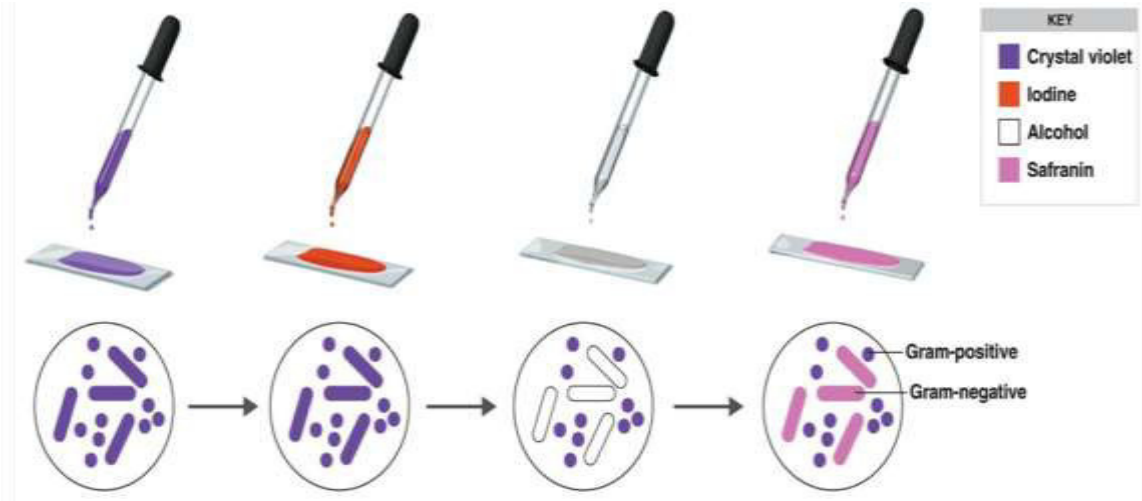
Anexo 5. Método de tinción Gram (MacFaddin, 2000)

Procedimiento:

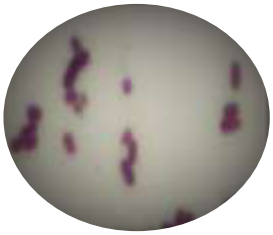
Se depositó sobre un portaobjetos limpio una gota de agua destilada, posteriormente se tomó una parte de una colonia de la muestra a analizar con la ayuda de un asa de siembra y se mezcló con la gota de agua, se dejó secar y fijó a la flama. Se cubrió con la solución de cristal violeta durante 1 min., y se desechó el colorante y se lavó ligeramente al chorro de agua, posteriormente se aplicó la solución de yodo durante 1 min.; se desechó y se lavó al chorro del agua nuevamente. Con el portaobjetos inclinado, se agregó gota a gota la solución de alcohol-cetona y se lavó al chorro del agua. Por último, se cubrió con safranina durante 10 a 20 seg., se desechó el colorante y se lavó al chorro del agua.

Reactivos:

Solución de cristal violeta, solución de yodo de Gram al 1%, solución de safranina al 0.25% y solución de alcohol: cetona 70:30.



Anexo 5.1. Morfología de los microorganismos aislados de la fermentación del ají charapita

Morfologías de bacterias acido lácticas	
	
	

° Tinción Gram de muestras aisladas de bacterias. (Aumento 100X).

Morfologías de levaduras	
	
	

° Características de colonias representativas de levaduras.

Anexo 6. Prueba de catalasa (MacFaddin, 2000)

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de las bacterias aerobias esta enzima descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, provocando el desprendimiento de burbujas lo que significa que hay producción de oxígeno indicando que la prueba es positiva.

Procedimiento (método del portaobjetos):

- Con el asa de siembra se toma una colonia aislada de BAL y se coloca sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Se agrega con la pipeta Pasteur una gota de H_2O_2 al 30% sobre el cultivo de BAL.
- Observar la formación inmediata de burbujas.

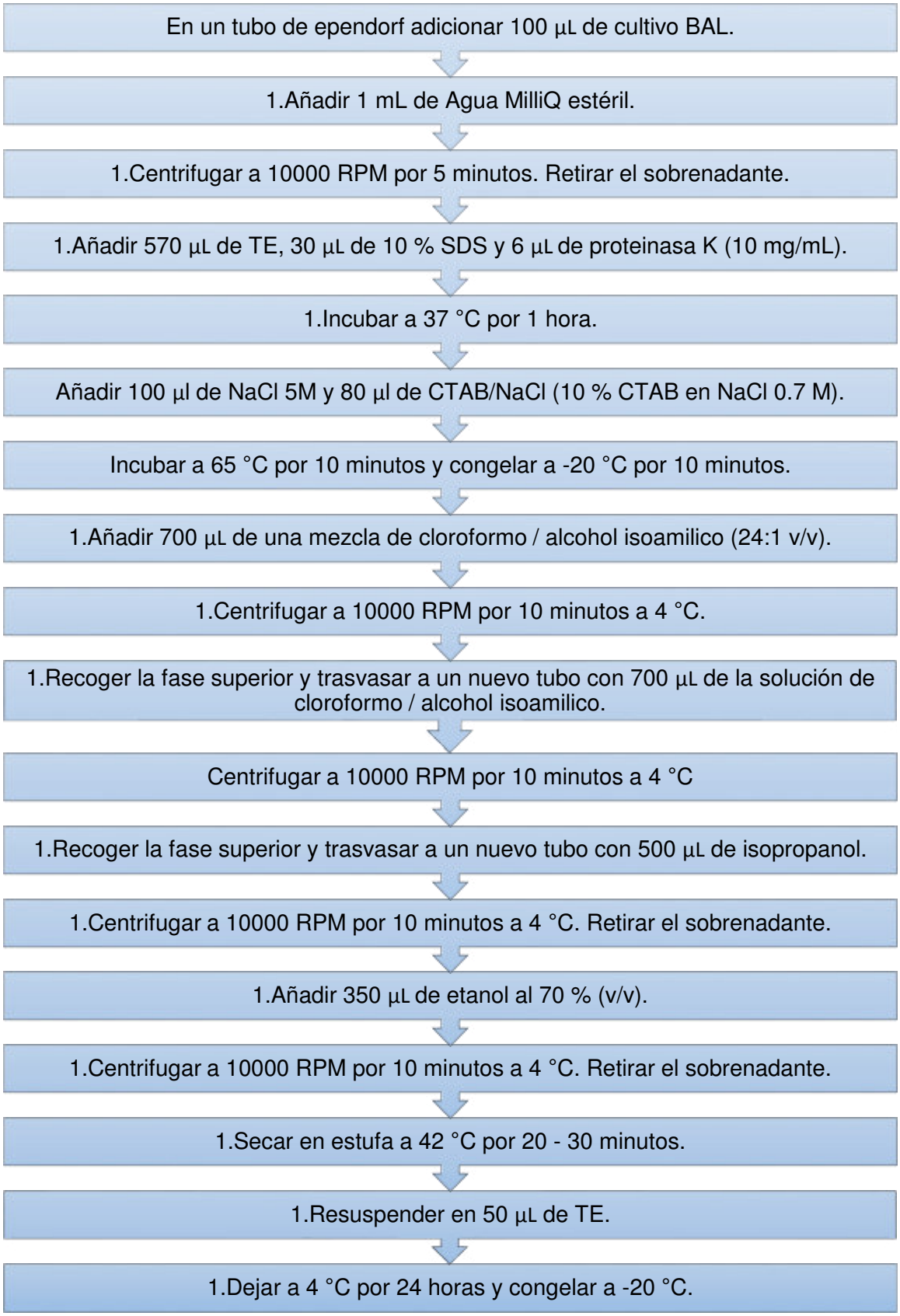
6.1 Prueba de oxidasa (MacFaddin, 2000)

La prueba de oxidasa es usada para determinar si una bacteria produce alguna del citocromo c oxidasa. La prueba hace uso de discos impregnados con el reactivo clorihidrato de tetrametil-p-fenilendiamina (TMFD) (1%), el cual es un indicador redox. El reactivo pasa de azul oscuro a un rojo - fucsia al ser oxidado, y se vuelve transparente al ser reducido.

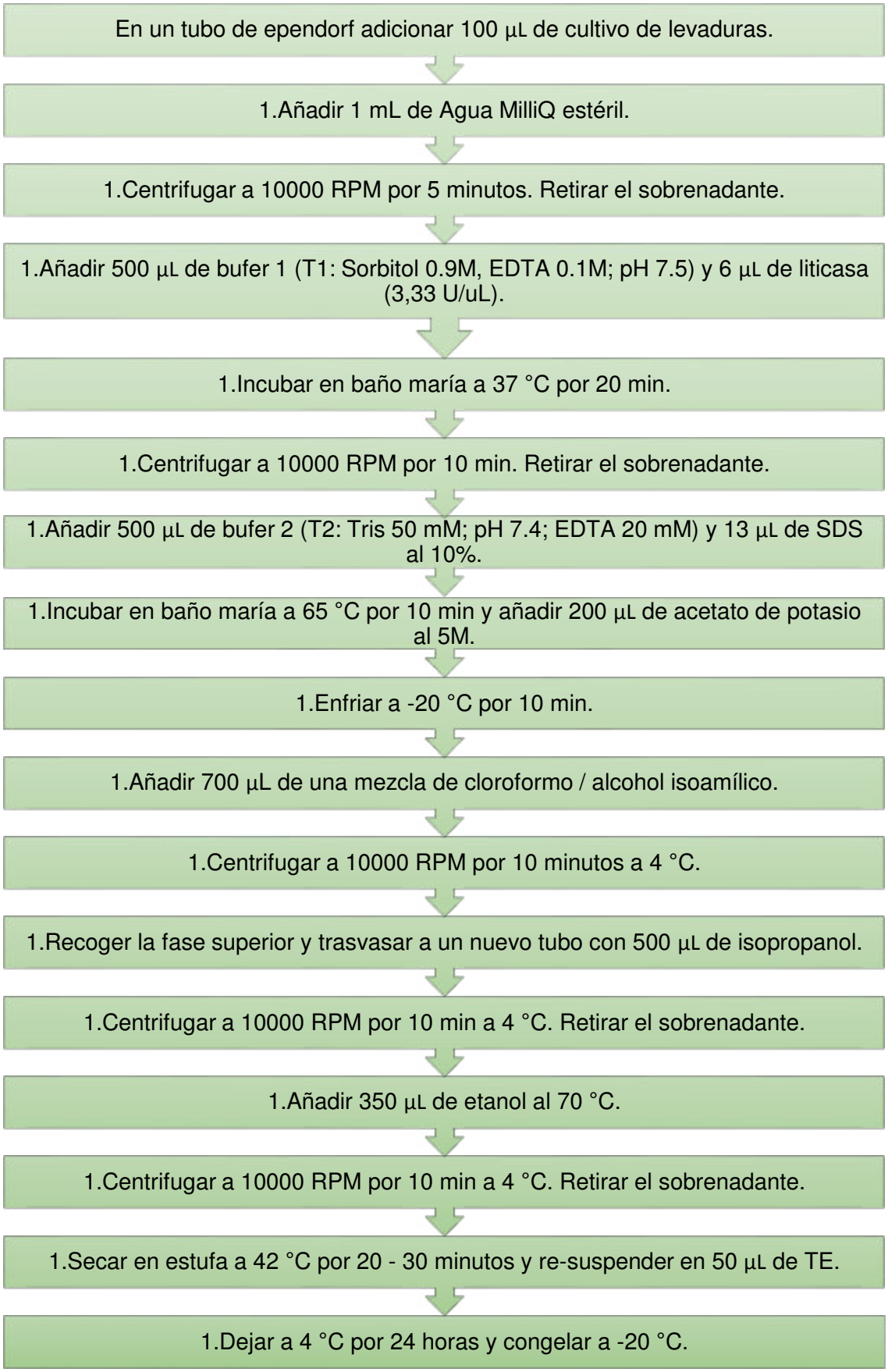
Procedimiento:

- Se toma con el asa bacteriológica una colonia aislada de la muestra de BAL.
- La muestra se pone en contacto con la tira o disco impregnado del reactivo.
- Se observa una coloración morada en un lapso no mayor a 30 segundos para que sea positivo, de lo contrario el resultado es negativo.

Anexo 7. Protocolo de extracción de ADN de BAL



Anexo 8. Protocolo de Extracción de ADN de levaduras.



Anexo 9. Técnicas moleculares

REP- PCR (GTG)5, (Repetitive Extragenic Palindromic)

Las condiciones de PCR se basaron en el protocolo descrito por *Gevers et al., 2001.* El tamaño de los fragmentos de ADN después del amplificado vario de 300 a 4000 pb.

Primer usado:

(GTG)5: 5´-GTGGTGGTGGTGGTG-3'

La mezcla de amplificación fue para un volumen final de 25 µL.

H_2O MilliQ	14.30 µL
Buffer 10X	2.50 µL (1X)
$MgCl_2$	1.50 µL
dNTPs (10 mM)	0.50 µL (0.2 mM)
$(GTG)_5$ (10 uM)	5.00 µL (2 µM)
Taq polimerasa	(5U / µL) 0.20 µL
ADN	1.00 µL
TOTAL	25.00 µL

Condiciones de PCR;

Incubación 5 min a 94 °C

30 ciclos de:

1 min a 94 °C

1 min a 40 °C

8 min a 65 °C

Al final 16 min a 65 °C

Anexo 9.1

ARDRA, (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)

Rodas et al., 2003, desarrollaron esta metodología para la identificación de BAL mediante el análisis de fragmento de restricción del gen ribosomal 16S, El tamaño de los fragmentos de ADN después del amplificado fue de aproximadamente 1500 pb.

Los primers usados fueron:

pA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

pH: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

La mezcla de amplificación fue para un volumen final de 50 µL.

H_2O MilliQ	27.60 µL
Buffer 10X	5.00 µL (1X)
$MgCl_2$	3.00 µL (1.5 mM)
dNTPs (10 mM)	1.00 µL (0.2 mM)
pA (forward)	5.00 µL (1 µM)
pH (reverse)	5.00 µL (1 µM)
Taq polimerasa	0.40 µL (2 U)
ADN	3.00 µL
TOTAL	50.00 µL

Condiciones de PCR;

Incubación 5 min a 94 °C

30 ciclos de:

30 seg a 94 °C

30 seg a 56 °C

1 min a 72 °C

Al final 5 min a 72 °C.

Anexo 9.2

PCR múltiple con el gen *Rec A*

Se utilizó para la discriminación entre las especies de *Lb. plantarum* (318 pb), *Lb. pentosus* (218 pb) *y Lb. paraplantarum* (107 pb), mediante la técnica de *Torreani et al, 2001.*

Esta técnica se basa en las diferencias de secuencias que existen en el gen Rec A, entre las especies mencionadas de *Lactobacillus*, el cebador reverso es común a las tres especies; sin embargo, el forward es para cada una de las especies en mención. En la mezcla se añaden los cuatro primers, existiendo amplificación cuando los primers logra hibridarse, obteniendo productos de diferente peso molecular[67], el tamaño de los amplificados para los primers forward fue de 92 a 98 pb y para el primer reverse fue de 206 a 211 pb.

Los primers usados fueron:

paraF (59-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-39),

pentF (59-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-39),

planF (59-CCG TTT ATG CGG ACC ACC TA-39) y

pREV (59-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-39).

La mezcla de amplificación se llevó a cabo para un volumen final de 20 µL, 2 µL de ADN, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 100 µM, PentF y ParaF y pREV 1 µM, PlanF 0.12 µM y Taq polimerasa 1U.

Condiciones de PCR

Incubación 3 min a 94 ° C

30 ciclos de:

30 seg, a 94 °C

10 seg. 56 °C

30 seg. 72 °C

Al final 5 min. a 72 °C.

Anexo 9.3

PCR - RFLP de la región 5.8S de ARN ribosomal más los ITS colindantes. (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Para esta técnica se utilizó el descrito por *Esteve-Zarzoso et al., 1999,* que desarrollaron esta metodología para la identificación de levaduras. El tamaño de los fragmentos de ADN después del amplificado vario de 500-600 pb.

Los primers usados fueron:

ITS1: 5'- TCCGTACGTGAACCTGCGG - 3'

ITS4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'

La mezcla de amplificación fue para un volumen final de 50 µL.

H_2O MilliQ	36.80 µL
Buffer 10X	5.00 µL (1X)
$MgCl_2$	3.00 µL (1.5 mM)
dNTPs (10 mM)	1.00 µL (0.2 mM)
ITS1 (forward)	0.50 µL (0.5 µM)
ITS4 (reverse)	0.50 µL (0.5 µM)
Taq polimerasa	0.20 µL
ADN	3.00 µL
TOTAL	50.00 µL

Condiciones de PCR

Incubación 5 min a 95 °C

30 ciclos de:

30 seg a 95 °C

1 min a 52 °C

1 min a 72 °C

Al final 5 min a 72 °C.

Anexo 10. Resultado BLAST de la región 16S de la secuencia de nucleótidos del estudio de bacterias acido lácticas.

Numero de acceso	Descripción	Match score	E-evalue	Ident. (%)
MG708111.1	*Lactobacillus plantarum*	2773	0.0	100
KY660374.1		2773	0.0	100
MG913360.1		2773	0.0	100
KM513641.1		2773	0.0	100
KP230424.1		2773	0.0	100
KP144784.2		2792	0.0	100
LC260028.1	*Leuconostoc pseudomesenteroides*	2755	0.0	100
KT952380.1		2746	0.0	100
KF879168.1		2750	0.0	100
JQ805675.1	*Weissella confusa*	2811	0.0	100
AB682449.1		2811	0.0	100
KT260733.1		2811	0.0	100
GU138518.1		2811	0.0	100

Anexo 11. Secuencias parciales de la región 16S de BAL de los microorganismos aisladas en la fermentación espontánea del ají charapita

Weissella sp.

>Contig. 1. (1455 pb)

TAATCATCTGTCCCACCTTAGACGGCTGGCTCCCGAAGGTTACCCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGT
GTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGA
CTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCTCGCGGGTTGG
CAACTCGTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCA
CCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGC
TCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGA
AGGGAACGCTCCATCTCTGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAAC
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAG
TGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTTAAGGGCGGAAACCCTCAAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGTGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGC
CACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCTACTGCACTCAAGTCAT
CCAGTTTCCAAAGCAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACTTCAGACTTAAATAACCGTCTGCGCTCGCTTTAC
GCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAACATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTTCCTTTCTG
GTAAGATACCGTCACACATTGAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACC
CTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGA
GTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGTAAGCCAT
TACCTTACCAACTAGCTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAGAACCATCTTTTAAATAACAACCATGC
GGTTGTCATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTA
CTCACCCGTTCGCCACTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAAAGCG
TTCGACTGC

Leuconostoc sp.

>Contig. 2. (1430 pb)

TCTGTCCTGCCTTAGACGGCTCCTTCCTAAAAGGTTAGGCCACCGGCTTTGGGCATTACAAACTCCCATGGTGTGA
CGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGGAACGTATTCACCGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC
ATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCTCGCGGGTTGGCAAC
TCGTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCGCCTT
CCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCATCTGAATGCTGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCTCCGAAGAG
AACACTTCTATCTCTAAAAGCTTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAACACT
TAATGCGTTAGCTTCGGCACTAAGAGGCGGAAACCTCCTAACACCTAGTGTTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCCTTCGCCACT
GGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTACCTCTACTGCACTCAAGTTAACCAG
TTTCCAATGCCATTCCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAATCAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCCC
AATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTCCCTTTCTGGTAT
GGTACCGTCAAACTAAAATCATTCCCTATTCTAGCTGTTCTTCCCATACAACAGTGCTTTACGACCCGAAAGCCTTC
ATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCAGCCTCCCGTAGGAGTT
TGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTGTCTTGGTAGGCCTTTAC
CCCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGTGACGCCAAAGCGCCTTTTAACTTTGTGTCATGCGACA
CTAAGTTTTATTCGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTGTCCACGTGTTACTCAC
CCGTTCGCCACTCACTTGAAAGGTGCAAGCACCTTTCGCTGTGCGTTCGACTGCA

Lactobacillus sp.

>Contig. 3. (1440 pb)

TCATCTGTCCCACCTTAGGCGGCTGGTTCCTAAAAGGTTACCCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGT
GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACT
TCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGTTCGCA
ACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACC
TTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCACCAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTC
GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAAG
GGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAAACCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATG
CTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTCATCGTTTACGGTATGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCA
CTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCC
AGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGC
CCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGT
TAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCT
TCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT
TTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTT
ACCCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAGCTCGGACCATG
CGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGTGTT
ACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCG

Anexo 12. Resultado BLAST de la región 5.8 - ITS de la secuencia de nucleótidos del estudio de las levaduras.

Numero de acceso	Descripción	Match score	E- evalue	Ident. (%)
MG386890.1	*Candida parapsilosis.*	1110	0.0	100
MG386884.1		1110	0.0	100
MF767667.1		1110	0.0	100
MG386886.1		1110	0.0	100
KY107576.1	*Debaryomyces nepalensis*	1121	0.0	99
KJ705003.1		1121	0.0	99
AB220033.1		1119	0.0	99
KT226114.1	*Hanseniaspora opuntiae*	979	0.0	100
KC111446.1		979	0.0	100
KC870065.1		978	0.0	100
KY397951.1	*Kodamaea ohmeri*	996	0.0	99
KC111449.1		979	0.0	100
KY104596.1	*Pichia kudriavzevii*	979	0.0	100
KY104577.1		979	0.0	100
KP132510.1		979	0.0	100
AB369918.1		979	0.0	100

Anexo 13. Secuencias parciales de la región 5.8 - ITS de levaduras de los microorganismos aislados en la fermentación espontánea del ají charapita

Hanseniaspora sp.

>Contig. 1. (574 pb)

AGGAAAAGAAACCAACTGGGATTACCTTAGTNACGGCGAGTGAAGCGGTAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTA
CTTTCAGTGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAATTTGTCTTTGATTAGGTCCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTC
ATAGAGGGTGAGAATCCCGTTTGGCGAGGATACCTTTTCTCTGTAAGACTTTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGA
ATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGT
GATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTTGA
TCAGACATGGTGTTTTTTGCATGCACTTGCCTCTCGTGGGCTTGGGCCTCTCAAAAATTTCACTGGGCCAACATCAA
TTCTGGCAGTAGGATAAATCATTAAGAATGTAGCTACCTCGGTAGTGTTATAGCTTATTGGAATACTGCTAGCTGG
GATTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATGTTGGCATAATGGTTAAATGCCGCCCGT

Debaryomyces sp.

>Contig 2. (585 pb)

GAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGC
ACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACTTTGGAGTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGAC
GTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTT
GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTA
CAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT
GAGATCAGACTTGGTATTTTGCGATCCTTTCCTTCTTGGTTGGGTTCTCCGCAGCTTACTGGGCCAGCATCGGTTTG
GATGGTAGGATAATGATTAAGGAATGTATCTCTACTTCGGTGGAGTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCTGTCTA
GACCGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCTTAAGCCACCCGTCTTGAAACCACGGACCA

Kodamaea sp.

>Contig. 3. (560 pb)

ACATGCGCTCACATCCTACGTATAGCGCAGTCGGCCTCATATTTTGCATATCAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAG
GGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCCCCCCGGGGAGTTGTAATTTGAAG
ATTGCGTCTTGGAGGCGACCGTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGGCAC
GGCCCCCGGCTCCTTATAAGGCGCTCTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCAAAGTGGGTGGTAAATT
CCATCTAAAGCTAAATACAGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGA
AAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATGCCGTCAGATTGTCAGTGTGGGTAAGAA
GCGGGGTACAAAGACTGTGGAACGTGGCCCTCGGGTGTTATAGCCGCAGTTCATGCCCCGTCTCTTTCCGAGGCC
TGCTTTGAGGACACCGACGTAATGACGGTACGCCGCCCGTCTTGA

Pichia sp.

>Contig. 4. (500 pb)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGGAACGAAAACAACAAC
ACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTACGAAAAACAAACAAAACTTTCAACAACGGAT
CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCG
AGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCGCGT
GCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGTGTAAAGAGCGTCGGAGCTGCGACTCGCCTGAAAGGGAGCG
AAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGGCGGCCGAGAGCGAGTGTTGCGAGACAACAAAA
AGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

Candida sp.

>Contig. 5. (565 pb)

AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGCA
CTTTCAGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTATCTTTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGT
CACAGAGGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGTCCCAGACCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTAC
AGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTT
GAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTTACTCTCTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTACCGGGCCAGCATCAGTTTGA
GCGGTAGGATAAGTGCAAAGAAATGTGGCACTGCTTCGGTAGTGTGTTATAGTCTTTGTCGATACTGCCAGCTTA
GACTGAGGACTGCGGCTTCGGCCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTA