

## Mediciones de pH y Recuentos de Microorganismos Durante la Producción de Koko

Rodríguez López<sup>1</sup>, Cecilia Carmen<sup>2</sup>, Fernando Falcón<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central de Venezuela, Venezuela

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad de Carabobo, Venezuela

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Clínicas, Universidad de Oriente, Venezuela

### Abstracto

Las fermentaciones espontáneas o naturales de ácido láctico se han utilizado en África durante siglos para preservar y mejorar el estado nutricional de los alimentos. La papilla de mijo koko es uno de estos productos y es consumida diariamente por muchas personas en el norte de Ghana como almuerzo o comida intermedia.

**Palabras clave:** Koko, Bacterias Del Ácido Láctico, Identificación, Probióticos

### 1. Introducción

Las fermentaciones espontáneas o naturales de ácido láctico han sido utilizado en África durante siglos para preservar y mejorar el estado nutricional de los alimentos. La papilla de mijo koko es una de estos productos y es consumida diariamente por muchas personas en Norte de Ghana como almuerzo o comida intermedia. Koko la producción se lleva a cabo mediante un remojo nocturno de mijo perla (*Pennisetum glaucum*), desecho de agua empinada y molienda húmeda de los granos de mijo junto con especias, generalmente jengibre, guindilla, pimienta negra y clavo, adición de agua a los materiales molidos haciendo una espesa suspensión, tamizado de la suspensión, fermentación y sedimentación. de la suspensión durante 2–3 h, decantación de la capa superior líquida, ebullición de la capa superior durante 1–2 h, y finalmente adición de la capa inferior sedimentada hasta obtener la consistencia deseada. Todo el proceso comienza en la noche remojando el mijo granos y el producto final está listo para el consumo alrededor del día siguiente [1]. El producto se vende como papilla en bolsas de plástico o cuencos y normalmente se consume después de la adición de azúcar. La capa superior líquida fermentada también se usa fresca, es decir, sin hervir como tratamiento para los estómagos alterados o como bebida refrescante. Este producto se llama agua griakoko (KSW) y se supone que contiene una gran cantidad de viables bacterias del ácido láctico (LAB) que pueden ser responsables de los efectos beneficiosos reclamados por la población local. Sin embargo, No hay evidencia científica de este efecto aún disponible [2].

La microbiota de muchos LAB africanos tradicionales fermentados productos de cereales han sido investigados, p. maíz productos como kenkey y ogi, productos de sorgo como ogi-baba, hussuwa y kisa, productos de mijo como kanu-zarki, kamu y ambali (Antony y Chandra), productos mixtos de sorgo y mijo como biolor y productos de sésamo como osigda. Según estos estudios los más predominantes especies LAB encontradas en estos productos de cereales fermentados son *Lactobacillus plantarum* y *Lact. fermentum* Tal No se han realizado estudios para la fermentación de koko [3].

### 2. Metodos

Los estudios del LAB a partir de alimentos africanos fermentados demostró una actividad anti microbiana hacia patógenos bacterias basadas principalmente en la presencia de ácido láctico y baja pH. En el mundo entero la diarrea es una causa importante de morbilidad y mortalidad de millones de niños. Entre los más bien documentados [4]. Los efectos beneficiosos para la salud de LAB son el acortamiento de los períodos de diarrea. Se necesita progreso en el desarrollo de tratamientos que acortan, alivian o incluso prevenir la diarrea en el mundo en desarrollo. Además de esto, En un entorno africano existe la necesidad de una eficacia, aceptación, Productos baratos y de fácil acceso para prevención o tratamiento. de diarrea La producción de alimentos fermentados LAB es un proceso tradicional africano y estos productos tienen potencial como productos probióticos, debido a los altos niveles de LAB con posibles efectos beneficiosos para la salud. Además, estos productos también sería las necesidades de ser aceptable, barato y De fácil acceso para la población Africana [5].

El propósito de este estudio es identificar la microbiota y su actividad antimicrobiana y tolerancia a ácidos y bilis, para mijo producido en diferentes sitios en el norte de Ghana. Se hará especial hincapié en KSW, utilizado por la tradición de la gente local para aliviar el mal estomacal de los adultos y niños o como refresco líquido [6].

La producción de Koko en el norte de Ghana se lleva a cabo normalmente diariamente en producciones a pequeña escala de 50 a 60 litros. La producción de koko se representa quemáticamente, donde también se señala el KSW. Los cinco sitios de producción de koko incluidos en el estudio fueron nombrados después de los pueblos donde las producciones se llevaron a cabo, y fueron Tamale, Nyankpala A, Nyankpala B, Savelugu y Pong-Tamale. Para los sitios de producción de Tamale y Nyankpala A, el conjunto se investigó el proceso de koko, mientras que para Nyankpala B, Savelugu y Pong-Tamale solo se investigó el KSW [7].

De los sitios de producción de Tamale y Nyankpala A, muestras fueron tomadas de las siguientes etapas en la línea de producción: granos de mijo, agua para remojar muestreada de recipientes de producción, agua después del remojo, mijo molido y especias, lodo antes y después del tamizado, fermentado al jugador (KSW), capa inferior fermentada y producto final. El muestreo se realizó durante junio y julio de 2000, y todos se tomaron muestras por duplicado. De los tres restantes sitios de producción, es decir, Savelugu, Nyankpala B y Pong-Tamale solo KSW fue muestreado. Esto se realizó cada día durante 20 días en agosto de 2001. Mediciones de pH (Medidor de pH Jenway, modelo 3310; Buch & Holm A / S, Herlev, Dinamarca) se llevaron a cabo para todas las muestras. Para todas las muestras, 200 ml se recogieron asepticamente en recipientes estériles y 1 ml 10 veces diluido en solución salina de peptona [9 g l) 1 de NaCl, 1 g l) 1 de peptona (pH 6.8) (Difco)]. por Se recogieron muestras sólidas de 200 g y se pesó 1 g en 9 ml de solución salina de peptona, homogeneizada (Vortex-genie2; Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, EE. UU.) Y siguió por diluciones de 10 veces. De las diluciones apropiadas, 1 ml fue vertido en De Man, Rogosa y Sharpe (MRS; Oxoid) agar (45 C ± 1.0) e incubado a 37 C durante 72 h. Los el promedio ponderado de las unidades formadoras de colonias (UFC) fue calculado a partir de los conteos de UFC de las diluciones que tienen entre 10 y 300 UFC [8]. Ocho a 10 colonias fueron aisladas al azar de las diluciones más altas, transferido a MRS caldo (oxoide) e incubado durante 16 h a 37 C con rayos ultravioleta sobre agar MRS para purificación. por identificación tentativa de LAB, prueba de catalasa (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y Se realizaron pruebas de Gram (KOH al 3%), además de la fase Microscopía de contraste (Olympus CH30, Tokio, Japón). Todas las bacterias catalasas negativas, gram positivas y no móviles se guardaron para su posterior identificación. Para las muestras de sitios donde solo se analizó KSW, maltosa, extracto de levadura, agar glucosa y peptona (MYGP) (5 g l) 1 maltosa (oxoide), 5 g l) 1 extracto de levadura (Difco), 10 g l) 1 glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania), 10 g l) 1 peptona (Difco), 20 g l) 1 agar (Difco), pH 5.6 se utilizó para recuentos de levadura y tripton agar de soja (TSA; Oxoid) con agar lactosabilis rojo violeta (VRBLA; Oxoid) sobre capa se utilizó para el recuento de coliformes bacterias, además del aislamiento y enumeración LAB [9].

### 3. Experimentos

Los análisis microbiológicos incluyen aislamiento y purificación, catalasa y prueba de Gram, así como microscopía de los aislamientos se realizaron en el laboratorio UDS / DANIDA en la Universidad para Estudios de Desarrollo en Tamale, Norte de Ghana. Los aislamientos fueron transportados en agar sesgo a Dinamarca donde se realizó el trabajo restante. Los aislamientos se almacenaron a 40 C en caldo MRS con 30% (v / v) glicerol. De Tamale y Nyankpala A koko Se obtuvieron 186 sitios de producción en total de 186 aislamientos de todas las etapas de producción, de estos 24 aislamientos se obtuvieron de Etapa KSW. De Nyankpala B, Pong-Tamale y Savelugu donde las muestras se recolectaron solo de la etapa KSW, en Se recogieron un total de 29 aislamientos. Por lo tanto, en total 215 aislamientos fueron utilizados para futuras investigaciones [10].

La capacidad de los aislamientos para producir CO<sub>2</sub> a partir de glucosa se investigó por inoculación en caldo MRS con un tubo de Durham a 37 ° C durante 48 h.

Identificación por API 50 CHL (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Francia) se llevó a cabo de acuerdo con el instrucciones del fabricante y uso de la base de datos proporcionado por bioMérieux [11].

Para el aislamiento de ADN, 1 ml de un aislado de 16 h (37 C) en El caldo MRS se centrifugó durante 5 minutos a 10 000 g (4 ° C) y Se añadieron 0.1 g de cuentas de vidrio de 106 micras (Sigma) al pellet junto con 400 μl Tris – EDTA (TE) buffer, pH 8.0 (1 mol l) 1 Tris / HCL pH 8.0, 0.25 mol l) 1 EDTA pH 8.0. Las células se rompieron en un FastPrep FP120 Savant (Qiogene, Carlsbad, NM, EE. UU.) Durante 40 s a 6 m s) 1. La PCR fue realizado en un volumen de reacción de 50 μl que contiene 1 [12] · Taq tampón de polimerasa (Amersham

Pharmacia Biotech Inc., Buckinghamshire, Reino Unido), 1  $\times$  10<sup>5</sup> UI de Taq polimerasa (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 0.4  $\mu$ mol l de cada uno de los cebadores cy5-16S-1500 y 23S-32 (DNA Technology, Aarhus, Dinamarca), 210  $\mu$ mol l de desoxinucleósido trifosfato, 2 mmol l de MgCl<sub>2</sub>, 1% (v/v) formamida y 1  $\mu$ l de ADN. Las mezclas se sometieron a 5 minutos a 94 °C; 10 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 48 °C y 30 s a 72 °C; 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, y 7 min a 72 °C, todo en un GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EE. UU.). Del transgénico intergénico espaciador (ITS)-PCR producto se purificó 15  $\mu$ l y se digirió con 10  $\mu$ l de tampón de enzima de restricción con 500 UI de Taq I (Nueva Inglaterra BioLabs Inc., Beverly, MA, EE. UU.) y se dejó reaccionar a 65 °C durante 3 h. Para los análisis de tamaños de fragmentos, los productos de PCR fueron separados por agarosa (Seakem GTG, BMA, Rockland, ME, EE. UU.) y electroforesis en un gel al 2%. Electroforesis se realizó a 100 V durante 60 min. Un tamaño de 72–1353 pb marcador ( $\lambda$  174 DNA-HaeII Digest; New England BioLabs Inc.) fue incluido. El gel se tiñó con EtBr (8 mg l<sup>-1</sup>) para visualizar los fragmentos debajo de un u.v. fuente [13].

Para cada aislado, la longitud del fragmento de restricción ITS-PCR se midieron los tamaños de los fragmentos de polimorfismo (RFLP) (en pb) en comparación con el marcador de tamaño usando Kodak 1D Image Software de análisis de versión 3.5 (VWR International ApS, Albertslund, Dinamarca). Una técnica analítica de datos multivariada, El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para agrupar los aislamientos según sus patrones de ITS-PCR RFLP. Véase la sección de Análisis estadístico para más detalles.

Este método se realizó en base a la selección de los resultados de ITS-PCR RFLP y API 50 CHL. Para el aislamiento de ADN, se centrifugaron 1.5 ml de un cultivo de 16 h (37 °C) en caldo MRS durante 5 min a 10 000 g y el sobrenadante se descartó. Se centrifugaron 0.1 g, 106 micras; Sigma) y 400  $\mu$ l de tampón TE, se añadió pH 8.0 al sedimento. Las células se rompieron en un Agitador FastPrep FP120 durante 45 s a 6 m/s y se mantuvo en hielo. La PCR se realizó en un volumen de reacción de 100  $\mu$ l que contenía 1  $\times$  Taq polimerasa buffer, 5 UI de Taq polimerasa, 0.4  $\mu$ mol l de cada cebador LAB universal (U968gc y L1401; DNA Technology), 200  $\mu$ mol l de desoxinucleósido trifosfato, 1 a 5 mmol l de MgCl<sub>2</sub> y 2  $\mu$ l de ADN extraído. Las mezclas se sometieron a 3 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 56 °C, y 30 s a 72 °C, y 7 min a 72 °C, todo en un GeneAmp PCR system 9700. De la PCR el producto se purificó por QIAquick PCR Kit de purificación 250 según el fabricante (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Según el fabricante de Kit de secuencia de ciclo del terminador de tinte CEQ (N / P 608000) (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EE. UU.) Otra PCR se realizó en un volumen de reacción de 10  $\mu$ l que contiene 0.32  $\mu$ mol l de cebador 1372R y 970F (tecnología de ADN), 6  $\mu$ l mezcla de secuenciación (Beckman Coulter Inc.) y 1 a 5  $\mu$ l purificada ADN. La mezcla se sometió a 30 ciclos de 20 s a 96 °C, 20 s a 50 °C y 4 min a 60 °C. El producto de PCR luego se mezcla con 1  $\mu$ l de 20 mg/ml de glucógeno y 4  $\mu$ l de una solución de parada que contiene 1  $\times$  10<sup>-5</sup> mol l de NaOAc, 50 mmol l de EDTA, seguido de precipitación con 60  $\mu$ l de etanol al 96% (v/v) a 20 °C (Beckman Coulter Inc.). Las soluciones fueron centrifugadas a 4 °C durante 15 min a 14 000 g y el sobrenadante descartado. Los pellets se lavaron dos veces con 200  $\mu$ l de etanol al 70% (v/v) a 20 °C, cada vez se centrifuga a 4 °C durante 2 min. Los pellets se disolvieron en 20  $\mu$ l de solución de carga de muestra (Beckman Coulter Inc.) y las muestras se procesaron en CEQTM 2002 (Sistema de análisis de ADN; Beckmann, Ramcom A / S, Birkerød, Dinamarca). Para la identificación de la secuencia de ADN se comparó con las bases de datos de Internet disponibles.

El método se realizó con la modificación de Jacobsen de usar 120 UI/ml de enzima de restricción SfiI (New England BioLabs Inc.) y incubación durante 16 h a 50 °C. Análisis de conglomerados utilizando Bio-Numerics versión 1.01 (Applied Maths BVBA, Kortrijk, Bélgica) se realizó en los patrones de fragmentos en orden para identificar cepas idénticas.

Para la detección de actividad antimicrobiana, tanto la mancha de agar prueba y la prueba de difusión del pozo ligeramente modificadas después de Schillinger y Lucke fueron utilizadas. Como indicador de tensiones para los ensayos *Listeria innocua* (ATTC 33090), como modelo de patógeno humano *L. monocytogenes* y *Lactobacillus* sensible a bacteriocina se utilizaron sakei (NCFB 2714). *Listeria innocua* era mantenido en agar o caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) (Oxoid) como control positivo para los ensayos antimicrobianos. *Pediococcus acidilactici* PA-2 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) un productor de la bacteriocina PA-1, que tiene un efecto inhibitorio general contra LAB y *L. monocytogenes* se utilizó. Como control negativo estéril se usó caldo MRS. Además, para estandarizar la concentración de los organismos indicadores utilizados para ambos ensayos de difusión en agar, D.O. (620 nm) se midió en cultivos durante la noche (16 h, 37 °C) de *L. innocua* y *Lact. sakei*. La cantidad equivalente en microlitros a un D.O. (620 nm) de 0.1 para *L. innocua* y 0.2 para *Lact.*

sakei fueron utilizados para ambas pruebas. El mayor D.O. utilizado para Lact. sakei se debió a subajata de crecimiento. Prueba de aislamientos, organismos indicadores y positivo control fueron incubados en su respectivo crecimiento medios a 37 ° C durante 16 h antes del uso. Para la prueba puntual 2Æ5 l de los aislados de prueba se usaron para detectar. Para ambas pruebas se usó agar nutritivo (Difco) cuando L. innocua era el indicador organismo.

Además, ambos ensayos se usaron para probar el antimicrobial no actividad de sobrenadantes libres de células de aislados de prueba. Los aislamientos se incubaron en caldo MRS durante 16 h a 37 ° C, se centrifugaron (10 000 g durante 10 min) y los sobrenadantes se probaron tanto no filtrado y esterilizado (0Æ22 l; Osmonic, Cameo 25AS, Minnetonka, MN, EE. UU.).

Los ensayos fueron modificados después de Jacobsen y realizado en placas de título de micropocillos de fondo plano (Nunc A / S, Roskilde, Dinamarca). Un volumen de 200 l de cada uno de las combinaciones MRS (pH 2Æ5), MRS [0Æ3% (v / v) bilisoxgall (Difco)], MRS [pH 2Æ5, 0Æ3% (v / v) bilisoxgall] o puro MRS, se inoculó con un nivel de ca 10<sup>7</sup> UFC ml) 1 de el aislado de prueba en caldo MRS a 37 ° C durante 16 h. Se incluyeron cuatro micropocillos por combinación. Como controles, MRS en todas las combinaciones respectivas pero con Se utilizó la inoculación. Cambios en D.O. (620 nm) fueron medidos (Multiscan MCC 340, Labsystems, Vantaa, Finlandia) a 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min a 37 C. Además de la capacidad de crecer, la supervivencia bajo el se examinaron diferentes condiciones después de 4 h de incubación (37 C) colocando 100 µl en agar MRS e incubando durante 48 h a 37 C.

Se realizó la comparación de medias por análisis de varianza (ANOVA) usando el Tukey honestamente prueba de diferencia de significancia (HSD) al nivel del 5% (P < 0Æ05) (Paquete estadístico para las ciencias sociales, SPSS-X, Chicago, Estados Unidos).

PCA, un modelado bi-lineal método, demostrado ser una herramienta muy útil para ayudar en la interpretación de grandes matrices de datos como las producidas por ITS-PCR fue utilizado. PCA implica la descomposición de una única matriz de datos, X, en una interpretable parte de estructura y una parte de ruido o error que es la fracción de la varianza que no debe interpretarse. En general, el algoritmo PCA identifica direcciones de máxima variabilidad en el espacio de datos multivariante, de modo que la mayoría importante fuente de variación sistemática se establece como la primera Componente principal (PC 1) y el segundo más grande. La fuente de variación ortogonal se configura como PC 2 y así sucesivamente. Inspección gráfica de parcelas bivariadas de las primeras PC da una visión general de los principales grupos de información en los datos de entrada. PCA revela relaciones entre las variables (cargas) y las puntuaciones. En el presente estudio cada aislado constituyen las cargas y la banda tamaño (pb) son las puntuaciones.

El PCA se realizó en los patrones de pb de ITS-PCR. Los fragmentos RFLP de los aislamientos LAB de todos los sitios y etapas de producción de koko. En el análisis de PCA, 0 o 1 indicadores fueron asignados donde los fragmentos de banda estaban presentes para cada aislado. Los datos se analizaron centrados, no ponderados, con validación cruzada completa y el software de descifrado (versión 7Æ8; Se utilizó CAMO ASA, Trondheim, Noruega).

Un método bi-lineal en el campo analítico de datos multivariados que puede usarse para determinar las relaciones entre conjuntos de variables es la regresión de mínimos cuadrados parciales. PLSR en oposición a PCA, involucra dos matrices de datos donde un conjunto de datos se establece como X y el otro como la matriz Y. Similar a PCA, las asociaciones entre X e Y se interpretan por números de PC, que explican la mayor porcentaje de la co-variación total. Validación técnica como la validación cruzada, como se usa también en PCA, es utilizado para determinar la cantidad de PC que son confiables interpretable, y para estimar la varianza explicada y estabilidad de los parámetros del modelo obtenido. En general, la varianza explicada y los coeficientes de correlación se utilizan para determinar las relaciones entre las variables X e Y.

Un uso especial de dos bloques PLSR es mínimos cuadrados parciales La regresión (APLSR) (el uso ANOVA como PLSR) se aplicó en el presente estudio. En este APLSR las variables X fueron 0/1 variables de diseño para los sitios de producción y / o etapas de producción y / o los aislamientos LAB y la matriz Y se estableció como los patrones pb de los fragmentos ITS-PCR RFLP de el LAB aislado, es decir, las variables de respuesta. Esta forma de PLSR proyecta las variables de respuesta en las variables de diseño para determinar qué grado cada uno de los diseños. Las variables en X contribuyen a la variación en la respuesta variables Y. Todos los análisis APLSR se realizó utilizando

el software Unscrambler (Versión 7Æ8). En todos los análisis de regresión los datos fueron analizados, centrados y con las matrices X e Y sin estandarizar.

Para los dos sitios de producción, Tamale y Nyankpala A, donde se inv estigarontodas las etapas de producción de koko, el El pH del agua para remojar y mezclar fue  $6\text{Æ}0 \pm 0\text{Æ}5$ . Después el remojo nocturno del mijo el pH del agua empinadateníadisminuyó a  $4\text{Æ}3 \pm 0\text{Æ}2$ . El pH de la suspensión de mijo antes y después del tamizado fue  $4\text{Æ}7 \pm 1\text{Æ}4$ . El pH disminuyó aún más a  $3\text{Æ}7 \pm 0\text{Æ}2$  durante la fermentación y en el producto final fue  $3\text{Æ}9 \pm 0\text{Æ}1$ . De todo el grano de mijo crudo y en el agua para remojar y mezclar, los recuentos de LAB fueron 103 UFC ml) 1. Las muestras de agua fueron tomadas de contenedores utilizados para la producción de koko, por lo tanto, el LAB también podría ser origen de estos. Después de remojar y durante todo el proceso los recuentos de LAB fueron del orden de 108 UFC ml) 1. Después de hervir la capa superior y en el producto final, viable LAB varió de no detectable (<102 UFC ml) 1) a 103 UFC ml) 1 (resultados no mostrados).

El pH de KSW de los sitios de producción (p. Ej. Savelugu, Pong-Tamale y Nyankpala B) y sobre el Se determinó que 20 días de investigación fueron  $3\text{Æ}6 \pm 0\text{Æ}2$ . El nivel de LAB encontrado en KSW de las tres producciones los sitios estaban en el orden de 108 UFC ml) 1. además, el nivel de levadura fue de aproximadamente 104 UFC ml) 1. El número de los coliformes siempre fueron bajos, es decir, 102 UFC ml) 1 o menos (resultados no mostrados).

Un total de 215 aislamientos de la producción de koko (dos sitios) y la producción de KSW (tres sitios) fueron todos identificados tentativamente como LAB (Gram-positivo, no móvil y negativo a catalasa). Prueba de capacidad para producir CO<sub>2</sub> a partir de glucosa, ITS-PCR RFLP y REA-PFGE se realizaron en todos los aislamientos API 50 CHL se realizó para representar ante aislamientos de todos los grupos obtenidos por ITS-PCR RFLP, en total de 64 aislamientos. La secuenciación del gen 16S rRNA fue realizada para 40 aislamientos representativos de KSW producidos en los cinco sitios diferentes.

Los patrones de fragmentos obtenidos por ITS-PCR RFLP para los 215 aislamientos se dividieron usando PCA, en cuatro grupos distintos como se ven en la Fig. 2. Para ayudar en la interpretación de, los nombres de los grupos como identificados por secuenciación del gen 16S rRNA (ver más abajo) han sido asignados. Se encontró que el modelo PCA tenía tres PC importantes (PC1 = 70%, PC2 = 21% y PC3 = 8%) totalizando el 99% de la variación explicada en los datos. Estas tres PC fueron requeridas para diferenciar claramente el aislamiento de los cuatro grupos distintos. Los cuatro grupos consistieron respectivamente 49Æ8% (*Weissella confusa*, grupo 1), 36Æ7% (*Lactobacillus fermentum*, grupo 2), 7Æ4% (*Lact. salivarius*, grupo 3) y 6Æ1% (*Pediococcus* spp., grupo 4) de los aislamientos. Los dos grupos dominantes de ITS-PCR RFLP se descubrió que producen CO<sub>2</sub> a partir de glucosa, mientras que los dos grupos más pequeños no fueron (resultados no mostrados). *W. confusa* y *Lact. fermentum* es heterofermentativo, mientras que *Lact. salivarius* y *Pediococcus* spp. son conocidos como Homofermentativos.

Para los 53 aislamientos de LAB de KSW, la muestra de identificaciones obtenidas de ITS-PCR RFLP, 16S rRNA secuenciación y REA-PFGE. Se ve que la relación entre la agrupación ITS-PCR RFLP y la identificación por la secuenciación de 16S rRNA es muy consistente. Los aislamientos de la el grupo predominante 2 fueron todos *Lact. fermentum*, para el grupo 1 todos eran *W. confusa*, para el grupo 3 todos eran *Lact. salivarius* grupo 4 compuesto por *ped. pentocasei* y *ped. acidilactici* y finalmente el grupo 5 comprendió dos aislamientos determinados como *Lact. paraplantarum*. Las identificaciones por API 50 CHL fueron significativamente consistentes y en varios casos el porcentaje de certeza para la identificación correcta fue baja (resultados no mostrados). El análisis de PCA de los perfiles de API no se pudo encontrar grupos de especies LAB individuales, lo que indica una consideración de biodiversidad dentro de la especie. Al investigar la capacidad de la especie para fermentar carbohidratos específicos de API 50 CHL, debe mencionarse que los aislados de *W. confusa*, *Lact. salivarius*, *Lact. fermentum* y *ped. fermentum* todos fueron capaces de fermentar glucosa, fructosa y manosa. Para la celobiosa, solo todos los aislamientos de *Pediococcus* fueron capaces de fermentando esta planta polisacárido esquelético, en contraste con 50%, 7% y 0% de los aislamientos de *W. confusa*, *Lact. fermentum* y *Lact. salivarius*, respectivamente. Para maltosa ca 95% de los aislamientos de *W. Confusa* y *Lact. fermentum* fueron capaces de fermentación, en contraste con el 70% y el 40% de los *Pediococcus* y *Lact. salivarius*, respectivamente. Cincuenta y 30% de los aislamientos de *W. confusa* y *Pediococcus*, respectivamente fueron capaces de fermentar sacarosa, mientras que la mayoría de los aislamientos de *Lact. salivarius* y *Lact. fermentum* (> 80%) fueron capaces de fermentar este carbohidrato.

A continuación, las identificaciones basadas en ITS-PCR se utilizan RFLP y secuenciación de 16S rRNA. Los 16S secuenciación de rRNA y la siguiente comparación con el bases de datos de Internet dio un alto nivel de identificación de los aislamientos que coinciden con la secuencia del 99-100% similitud (resultados no mostrados).

El REA-PFGE de los 215 aislamientos demostró una diversidad pronunciada a nivel de subespecie con muy pocos aislamientos que muestran patrones de bandas idénticos. Entre los 53 aislados de KSW, se observaron 43 patrones diferentes por comparación visual de los geles. Usando cluster análisis todos los 215 LAB aislados sin agrupamientos significativos fueron encontrados posibles.

Univariante y se realizaron análisis multivariados para investigar y representar gráficamente la distribución de LAB entre las etapas de producción de koko también como en KSW entre sitios de producción. El método alternativo multivariante APLSR se llevó a cabo para mostrar cómo se pueden presentar fácilmente grandes conjuntos de datos e interpretado a partir de un solo gráfico. Desde la Tabla 2 se ve que *Lact. fermentum* fue el dominante LAB en todas las etapas de la producción de Tamale koko, excepto agua para remojo y mijo molido. En el agua para empapando *Pediococcus* spp. y *W. confusa* juntos fueron dominantes, mientras que en el mijo molido *W. confusa* era encontrado para ser el LAB dominante. Del análisis APLSR de la producción de Tamale koko (Fig. 3a) dos componentes significativos fueron encontrados, teniendo una varianza explicada válida en PC1 y PC2 de 55 y 31%, respectivamente. Como en la producción de Tamale Koko también se vio en la Fig. 3a que los aislamientos de *W. confusa* estaban altamente correlacionados con los molidos mijo, así como *Lact. fermentum* los aislamientos de *fermentum* se correlacionaron con todas las otras etapas excepto agua para remojar. Además, *Pediococcus* spp. los aislamientos estaban altamente correlacionados con el agua para remojar y capa inferior como estaba también indicado en.

Del sitio de producción de Nyankpala A koko es notable que las etapas del agua para remojar, agua después de remojar, la mezcla de mijo antes y después el tamizado solo contenía *W. confusa*. Las etapas restantes fueron dominadas por *W. confusa*, sin embargo *Lact. fermentum* también presente. *Pediococcus* spp. fueron encontrados en los granos de mijo y en la capa inferior, lo que indica su capacidad para sobrevivir a lo largo de la producción de koko. Al comparar (Nyankpala A) con el único diagrama APLSR en el se pueden hacer las mismas interpretaciones, en el sentido de que el diagrama APLSR es representando *Pediococcus* spp. tan altamente correlacionado con el agua para remojar y la capa inferior y *W. confusa* como dominante en todas las etapas de producción. La figura 3b tenía dos componentes significativos con varianza explicada válida en PC1 y PC2 de 77 y 16%, respectivamente.

Al comparar la producción de Tamale y Nyankpala A sitios se encontró que Nyankpala A en todo el koko producción, tenía una microbiota muy diferente en comparación con el sitio de Tamale. En un diagrama APLSR esto fue confirmado por aislamientos de los dos sitios de producción que son opuestos correlacionados, lo que indica que el LAB de las dos producciones se distribuyeron de manera diferente en todas las etapas de producción (la trama no se muestra).

La muestra la distribución de LAB aislada de KSW de los cinco sitios de producción de koko individuales. Desde cuatro de los cinco sitios, es decir, Tamale, Nyankpala B, Savelugu y Pong-Tamale, *Lact. fermentum* se descubrió que el *fermentum* era el especies dominantes que representan el 44-78% de los aislamientos. KSW de Nyankpala A fue dominado por *W. confusa*, representando el 83% de los aislamientos. *Lactobacillus salivarius* y *Lact. paraplantarum* solo se encontraron en un sitio de producción único, es decir, Tamale y Savelugu, respectivamente. El único diagrama APLSR confirmó estas observaciones, en que una fuerte correlación en el gráfico APLSR se puede hacer entre *W. confusa* y los sitios Nyankpala A y Pong-Tamale. *Lactobacillus fermentum* fue visto para ser altamente correlacionado con Nyankpala B y Savelugu y *Lact. salivarius* altamente correlacionado con Tamale. Aislamientos de *Pediococcus* spp. fueron encontrados en tres de los cinco sitios de producción y también se ve que no se correlacionan fuertemente con un solo sitio de producción. En el diagrama APLSR que representa PC2 y PC3 quedó claro que *Pediococcus* spp. los aislamientos estuvieron altamente correlacionados con los sitios de producción de Nyankpala B (no mostrado). El APLSR tenía tres componentes significativos con varianza explicada válida en PC1, PC2 y PC3 de 48, 23 y 19%, respectivamente.

Los resultados de los dos métodos de difusión de agar, es decir, el ensayo bien y la prueba puntual demostró antimicrobiana débil actividad hacia *L. innocua* para prácticamente todos los aislamientos en el orden de zonas de inhibición de 1 a 3 mm en el ensayo de pozo y Zonas de inhibición de 0 a 5 mm para el ensayo puntual, comparado con  $6 \pm 2$  mm del control positivo (resultados no mostrados). *Lactobacillus sakei* fue inhibido muy débilmente por

algunos aislados (resultados no mostrados). Para ambos ensayos, la inhibición las zonas después de 72 h de incubación fueron en general más grandes en comparación con 24 h de incubación (resultados no mostrados). Debido al medio de crecimiento modificado con bajo contenido de glucosa, las inhibiciones observadas probablemente no sean causadas por Formación de ácido y pH bajo.

Aunque *Lact. salivarius* pareciera tener el mayor actividad antimicrobiana sin diferencias significativas ( $P = 0.08$ ) se observaron entre las especies investigadas. Lo mismo aplicó cuando los aislamientos se agruparon de acuerdo con su Etapa de producción. Sobrenadantes ( $pH = 4.3 \pm 0.2$ ) del LAB los aislamientos no mostraron actividad inhibitoria hacia ninguno de los dos cepas indicadoras.

Las pruebas se realizaron en 100 de los aislamientos LAB que tienen mostró actividad antimicrobiana en los ensayos de difusión en agar. En general, los aislamientos mostraron las mismas tendencias (resultados no mostrados). Ninguno de los aislamientos fue capaz de crecer en MRS a pH 2.5. Sin embargo, aproximadamente el 85% de los aislamientos fueron capaces de sobrevivir a un nivel de  $10^5$  UFC/ml) 1 después de 4 h de incubación en MRS a pH 2.5. Cuando el MRS además del pH 2.5 contenía 0.3% (v/v) bilis oxigall aproximadamente el 70% de los aislados fueron capaces de sobrevivir a un nivel de  $10^5$  UFC/ml) 1 después de 4 h de incubación. Todos los aislamientos fueron, después de 4 h de incubación, capaces de crecer en MRS puro y MRS agregó 0.3% (v/v) bilis de bola de buey, sin embargo, el crecimiento se midió como un aumento en D.O. se redujo en aproximadamente un 20% en comparación con MRS. No se encontró una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) se encontró entre los cuatro diferentes Especies LAB en su capacidad de resistir las diferentes combinaciones de bilis y pH en MRS (resultados no mostrados).

Al agrupar todos los aislamientos de cada etapa de producción, un se observó una tendencia que aislada de la producción anterior. Las etapas mostraron una menor tasa de crecimiento y capacidad para tolerar el ácido y bilis que los aislados de más adelante en la producción. Sin embargo, estas observaciones no fueron significativas ( $P > 0.05$ ). Entre los cinco sitios de producción no se encontraron diferencias significativas entre los aislados de la KSW con respecto a su capacidad para tolerar las diferentes combinaciones de ácido y bilis en MRS después de 4 h de incubación (resultados no mostrados).

Por agrupación inicial de LAB por ITS-PCR RFLP seguida de identificación mediante secuenciación del gen 16S rRNA, el LAB dominante de cinco sitios de producción de koko en Se descubrió que el norte de Ghana era *W. confusa* y *Lact. fermentum*, seguido por el *Lact. salivarius* y *Pediococcus* spp. Para fermentaciones espontáneas de ácido láctico de los cereales, el LAB más comúnmente asociado, parece ser *Lact. plantarum* y *Lact. fermentum*. *Lactobacillus salivarius* y *Pediococcus* spp. Ha estado reportado ocurrir en números más bajos en forma espontánea de productos de cereales fermentados. Solo unos pocos autores tienen descubrimientos reportados de *W. confusa* en tales productos y normalmente en números más bajos que los encontrados en el presente estudio. Sin embargo, *W. confusa* se conocen de otros fermentados. productos tales como un producto de pescado tailandés bajo ensal, la bebida andes abushera, vino de arroz balinés y el Ingrediente alimentario de Malasia chili bo. los pocos estudios microbiológicos realizados en fermentaciones espontáneas de productos de mijo han reportado hallazgos de *Lact. salivarius*, *Lact. Casei*, *Lact. acidophilus*, *Lact. jensenii*, *Lact. celbioso*, *Lact. plantarum*, *Pediococcus* spp. y *Leuconostoc* spp.

De los resultados de REA-PFGE, una gran diversidad de cepas de las diferentes especies se encontraron en Koko y KSW. Incluso en las etapas posteriores de la producción de koko, es decir, después de la fermentación, sin sucesión de cepas individuales de LAB que condujo a una micropoblación más uniforme. Se ha afirmado el desarrollo de una micropoblación uniforme. en otros estudios. Entre el pocos estudios basados en genotipado a nivel de subespecies Hayford y col investigaron los aislamientos dominantes de *Lact. fermentum* de masa de maíz fermentado de Ghana y furgoneta der Aa Ku'hle y col investigaron *Saccharomyces cerevisiae* de cerveza de sorgo de Ghana. Ambos estudios descubrimos que incluso en las últimas etapas de producción varios las cepas estuvieron involucradas en la fermentación, apoyando los hallazgos del presente estudio, de que no se convierte una sola cepa dominante durante las fermentaciones espontáneas.

El API 50 CHL no se encontró particularmente útil en el estudio presente. Sin embargo, el uso combinado de la Método molecular de ITS-PCR RFLP y multivariante El análisis de datos y doprofundamente en la identificación y en la comprensión de la relación entre el origen de LAB predominante, así como su asociación con etapas de procesamiento y sitios de producción. Pocos autores tienen PCA utilizado anteriormente para interpretar patrones de banda para

microorganismos que se obtienen de métodos moleculares, sin embargo a nuestro conocimiento APLSR no se han utilizado previamente para correlacionar especies LAB con sus etapas de procesamiento y Sitios de producción. De esto parece que el multivariante El análisis de datos no se está utilizando en todo su potencial para interpretación de resultados microbiológicos. No hay evidencia explicación de por qué dominan los diferentes microorganismos en los diferentes sitios de producción, pero es probable que se causado por microorganismos retenidos en la producción y no utilizados en los diferentes sitios y variación de microorganismos en las materias primas. Las razones para observar diferentes microorganismos dominantes en los diferentes Es probable que las etapas de producción se expliquen por cambios en el entorno microbiológico, p. pH, presencia de diferentes microorganismos en diferentes recipientes de producción, cambios en la viscosidad del producto y la competencia. entre los microorganismos.

#### 4. Conclusiones

Al probar los aislamientos de koko y KSW para actividad antimicrobiana un medio de crecimiento modificado con baja se usó el contenido de glucosa para minimizar la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácidos orgánicos. Esto se llevó a cabo para obtener un inhibición únicamente de la producción de otros antimicrobianos compuestos y posible competencia por nutrientes. Sólo unos cuantos los aislamientos mostraron inhibición hacia los sensibles a bacteriocina Lact. sakei, lo que indica que los aislados de LAB no son produciendo bacteriocinas.

Como la mayoría de los aislamientos fueron encontrados capaces de sobrevivir El ambiente ácido y biliar de la prueba in vitro de la estudio actual, hay buenas razones para creer que el los aislados podrían alcanzar el tracto intestinal en alto números. Otros autores también han informado que LAB como Lact. fermentum aislado de cereales fermentados en África son capaz de sobrevivir niveles fisiológicos de ácido y bilis. KSW con sumo y pH bajo de 3.6 y un contenido del orden de 10<sup>8</sup> LAB en vivo por mililitro capaz de sobrevivir al pH 2.5 y 0.3% Se supone que la bilis durante varias horas tiene un potencial probiótico efecto. Una ingesta diaria de 100 ml correspondería a un total de 10<sup>10</sup> lactobacilos, que está en línea con la dosis considerada eficaz para las bacterias probióticas. Además el LAB predominan muestra una actividad antimicrobiana, que parece más allá El efecto del bajo pH y la producción de ácido. Mientras que el diversidad taxonómica se pronunció el antimicrobiano actividad junto con la bilis y la tolerancia al ácido fueron bastante uniforme entre los LAB predominantes según Las investigaciones actuales. Las asociaciones microbianas en el nivel de especies también fue similar de vez cuando y para el cinco sitios de producción investigados indicando que estos Las fermentaciones espontáneas son consistentes. En general es concluyó que, la confirmación de los posibles efectos probióticos de Koko y KSW requerirían una intervención integral estudiar con humanos.

#### Referencias

- [1] Bakare, S., Smith, S.I., Olukoya, D.K., Akpan, E. (1998) "Comparison of Survival of Diarrhoeagenic Agents in Two Local Weaning Foods (Ogi And Koko)", *Journal of Tropical Pediatrics*, 44 (6), pp. 332-334.
- [2] Prins, H. (1995) "I've Got a Little List' (Koko: Mikado ). But is it Any Use?: Comments on the Forensic Aspects of 'Supervision Registers' for the Mentally Ill", *Medicine, Science and the Law*, 35 (3), pp. 218-224.
- [3] Vilkkumaa, I. (1994) "The whole picture of rehabilitation", *Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja*, 110 (15), pp. 1394-1402.
- [4] Tsumura, T. (1989) "The Spiritual World of "Koko". 1. Returning to the Innocence of the Newborn", *[Josanzu] The Japanese journal for midwife*, 43 (4), pp. 342-343.
- [5] Idolor, J.J., Edema, C.U. (2018) "Human Health Risk Assessments of Heavy Metal Contamination through Consumption of Periophthalmus Papilio, Eleotris Senegalensis, Hanoichthys Africana and Hoplobatrachus Occipitalis from Benin River, Koko, Nigeria", *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 20 (3), pp. 701-707.
- [6] Khan, Y.R., McDonough, P., Cockcroft, D.W., David, B.E., Hendeles, L. (2005) "Nebulizer Output for Methacholine Challenges with the KoKo Digidoser [2]", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116 (4), pp. 924-926.
- [7] Lei, V., Jakobsen, M. (2004) "Microbiological Characterization and Probiotic Potential of Koko and Koko Sour Water, African spontaneously Fermented Millet Porridge and Drink", *Journal of Applied Microbiology*, 96 (2), pp. 384-397.
- [8] Essé, C., Koffi, V.A., Kouamé, A., Dongo, K., Yapi, R.B., Moro, H.M., Kouakou, C.A., Palmeirim, M.S., Bonfoh, B., N'Goran, E.K., Utzinger, J., Raso, G. (2017) "'Koko et Les Lunettes Magiques": An Educational



- Entertainment Tool to Prevent Parasitic Worms Anddiarrheal Diseases in Côte d'Ivoire”, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11 (9), pp. e0005839.
- [9] Song, X.L., Guo, J., Wu, Y., Yang, D.G., Wang, J.H., Tao, B. (2018) “Effects of Different Planting Management Methods on Bacterial Community Structure”, *Boletin de malarilogia y salud ambiental*, 58 (2), pp. 52-58.
- [10] Duran RDC, Gonzalez RDC, Rodriguez CEAM, Romero CEM, Ferrer RA (2016) “Adaptation and Validation of the AQ-R on Venezuelan Population: AQ-R. Ve, Initial Study”, *Medula*, 25 (2), pp. 66-72.
- [11] Heikkilä, J. (1978) “Is the Size of the Myocardial Infarct under the Physician's Control?”, *Duodecim*, 94 (18), pp. 1087-1091.
- [12] Valkonen, I. (1976) “Coverage of student's development organization format of district public health services”, *Sairaanhoitaja. Sjukskoterskan*, (18), pp. 8-11.
- [13] TAVAST, M. (1956) “Sizes and Form of Foot in Finnish Men; Studies Carried out for the Shoe Industry.”, *Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja*, 72 (5), pp. 409-417.

## Measurements of pH and Counts of Microorganisms during Koko Production

### Abstract

Spontaneous or natural lactic acid fermentations have been used in Africa for centuries to preserve and improve the nutritional status of foods. The millet porridge koko is one of these products and is consumed daily by many people in Northern Ghana as lunch or an in-between meal.

**Keywords:** Koko, Lactic Acid Bacteria, Identification, Probiotics