



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias
Experimentales

Bacillus spp. en la producción de alimentos

Autor: María del Pilar Robles Cuadrado

Grado: Biología

Fecha: 07/06/2024



CREA

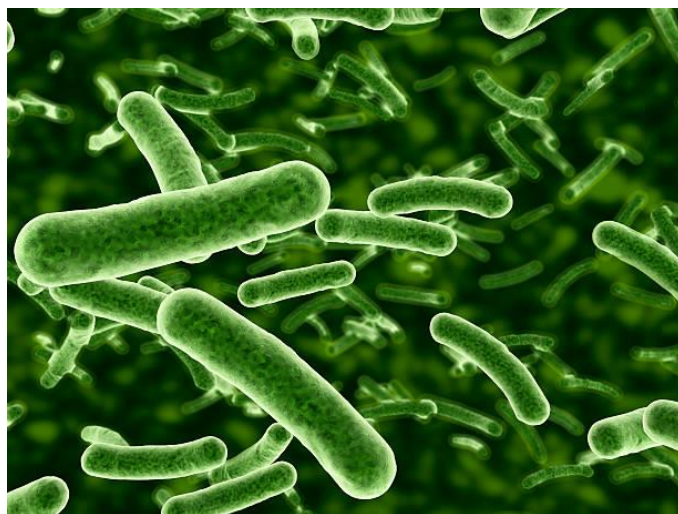


Universidad de Jaén



Trabajo Fin de Grado

***Bacillus* spp. en la producción de alimentos**



Firma:

Alumna: María Del Pilar Robles Cuadrado

Jaén, junio de 2024

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
Palabras clave	1
1.1 Abstract	1
Keywords	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Clasificación y características generales del género <i>Bacillus</i>	2
2.2 Ciclo de esporulación de <i>Bacillus</i> spp.	2
2.3 Aplicaciones del género <i>Bacillus</i>	3
2.3.1 Uso de especies <i>Bacillus</i> en la industria alimentaria.....	5
2.3.2 Uso de especies <i>Bacillus</i> como probióticos.....	10
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. METODOLOGÍA	16
5. RESULTADOS.....	18
5.1 <i>Bacillus subtilis</i>.....	18
5.1.1 Kinema.....	18
5.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> var. <i>Natto</i>	19
5.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	21
5.3 Amilasas de especies <i>Bacillus</i> para aplicaciones industriales .	23
5.3.1 α -amilasas.....	25
6. DISCUSIÓN.....	27
7. CONCLUSIONES.....	28
8. BIBLIOGRAFÍA.....	30

1. RESUMEN

Las bacterias juegan un papel importante en la producción de alimentos desde la fermentación de los mismos hasta su capacidad de mejorar la textura, sabor y valor nutricional del producto. Así, con esta revisión bibliográfica se pretende evidenciar el uso del género *Bacillus* en la producción de alimentos.

Empleando diferentes bases de datos como Google Scholar, Pubmed y Scielo se obtuvieron varios artículos que ponían de manifiesto el uso de *Bacillus* en la elaboración de alimentos fermentados, en concreto, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. pumilus* y *B. brevis*. Por otro lado, *B. cereus* muestra preocupación ya que es capaz de producir toxinas dando lugar a intoxicaciones alimentarias.

Estas especies destacan por su resistencia a condiciones extremas de pH y temperatura como resultado de formar esporas, lo que también las hace útiles como probióticos. Además, *Bacillus* spp. es una gran fuente de producción de enzimas como las amilasas, las cuales presentan un gran potencial en la industria alimentaria.

Palabras clave: *Bacillus* spp.; industria de alimentos; fermentación; amilasas

1.1 Abstract

Bacteria play an important role in food production from food fermentation to their ability to improve the texture, flavor, and nutritional value of the product. Thus, this literature review aims to demonstrate the use of the genus *Bacillus* in food production.

Using different databases such as Google Scholar, Pubmed and Scielo several articles were obtained that showed the use of *Bacillus* spp. in the production of fermented foods, specifically, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. pumilus* and *B. brevis*. On the other hand, *B. cereus* causes concern as it is capable of producing toxins leading to food poisoning.

These species are noted for their resistance to extreme pH and temperature conditions as a result of forming spores, which also makes them useful as probiotics. In addition, *Bacillus* spp. is an excellent source of enzymes such as amylases, which have great potential in the food industry.

Keywords: *Bacillus* spp.; food industry; fermentation; amylases

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Clasificación y características generales del género *Bacillus*

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Ferdinand Cohn en 1872, quien identificó a las bacterias de este género como bacterias resistentes al calor y productoras de endosporas (Villareal-Delgado et al., 2018).

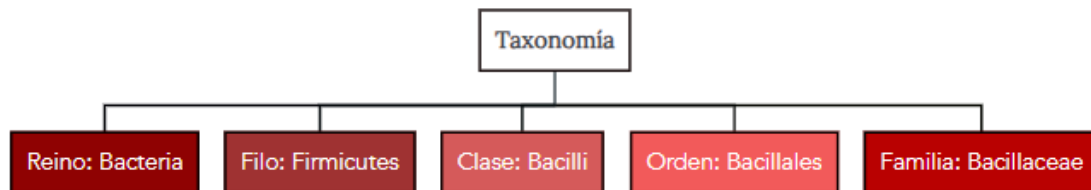


Figura 2.1. Clasificación del género *Bacillus* (adaptado de Villareal-Delgado et al., 2018).

Son bacterias Gram positivas de un tamaño comprendido entre 0.5 a 10 μm , su movilidad es a través de flagelos y presentan morfología bacilar (Villareal-Delgado et al., 2018). Este género presenta una amplia distribución, encontrándose en el aire, agua, plantas, animales o suelo, en este último participando en la descomposición de la materia, así como protección y crecimiento de las plantas frente a organismos patógenos (Dobrzyński et al., 2023). Destacan por su resistencia a ambientes extremos como la sequía, radiación ultravioleta o bajo contenido de nutrientes en el medio ambiente como resultado de formar esporas (Villareal-Delgado et al., 2018).

2.2 Ciclo de esporulación de *Bacillus* spp.

La formación de esporas les permite su diseminación por los distintos ecosistemas, ambientes acuáticos, terrestres o bajo condiciones extremas y ocurre en su segundo ciclo de vida (Villareal-Delgado et al., 2018). El ciclo de vida de este género, está dividido en dos fases:

1. Crecimiento vegetativo
2. Esporulación

El crecimiento vegetativo, ocurre cuando las condiciones para el desarrollo de la bacteria son favorables, de manera que la población bacteriana crece por fisión binaria de forma exponencial (González-León et al., 2022).

Por otra parte, la bacteria utiliza la fase de esporulación (figura 2.2) como una táctica de supervivencia ante cualquier situación de estrés como cambio de temperatura, pH, escasez de nutrientes, entre otros. Se inicia la formación de la endospora con la creación de dos compartimentos a causa de la división celular: una célula madre y una preespora, esta última será engullida por la célula madre hasta su maduración. Finalmente, ocurre la muerte de la célula madre por lisis celular liberando la endospora (Villareal-Delgado et al., 2018).

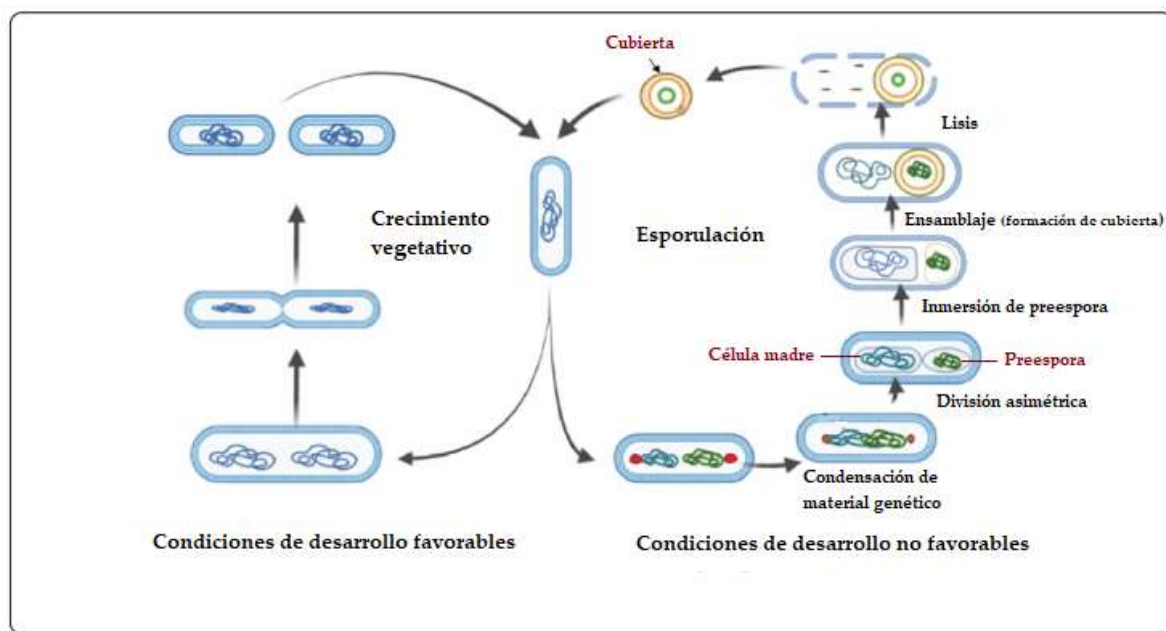


Figura 2.2 Ciclo de vida del género *Bacillus* (adaptado de González-León et al., 2022).

2.3 Aplicaciones del género *Bacillus*

El mayor reservorio de este género es el suelo, donde se pueden encontrar tanto en la rizosfera o como endófitos creándose una asociación simbiótica con las plantas. En esta situación, la planta le aportará nutrientes mientras que la bacteria le aporta protección ante patógenos mediante la producción de péptidos antimicrobianos (Z. Li et al., 2023). Además, *Bacillus* puede producir una amplia gama de metabolitos que mejoran la disponibilidad de nutrientes para las plantas, lo que conlleva a un aumento en el crecimiento y rendimiento de las mismas, entre otras cosas (Akinsemolu et al., 2024).

Por otro lado, este género contribuye significativamente en el control de plagas y la producción de antibióticos. Existen varias especies de *Bacillus* que producen lipopéptidos los cuales actúan contra microorganismos patógenos de plantas, donde

destaca *B. thuringiensis* entre los biopesticidas a base de bacterias más usados en el mundo. En ámbito medicinal, estos lipopéptidos producidos por *Bacillus* presentan una gran importancia frente a una amplia variedad de virus (Herrmann et al., 2024).

A nivel industrial, algunas cepas de *Bacillus* spp. pueden causar una mejora en la calidad del producto actuando como organismo fermentador del mismo (Z. Li et al., 2023). Cuando se utiliza en la producción de alimentos, este género es capaz de proporcionar una serie de cualidades beneficiosas como sabor y propiedades saludables (Herrmann et al., 2024).

Además de la capacidad de producción de alimentos, esta bacteria posee una serie de propiedades cuando es utilizada como aditivo alimentario. La más común es su función probiótica, la cual confiere beneficios al huésped cuando es ingerida. (Herrmann et al., 2024).

Por otro lado, existen especies patógenas del grupo *B. cereus* que pueden provocar enfermedades que se asocian principalmente con la intoxicación alimentaria provocando síndrome diarreico, aunque también existe una relación de esta especie con graves infecciones oculares, neumonía progresiva e infecciones destructoras del sistema nervioso pudiendo ocasionar incluso la muerte (Bottone, 2010).



Figura 2.3 Presencia de *Bacillus* spp. en diferentes nichos ambientales. Resaltado en color rojo se indican las diferentes interacciones de mutualismo que existen entre este género con la vegetación y el ser humano; resaltado de color morado se indican las diferentes interacciones patógenas (Z. Li et al., 2023).

2.3.1 Uso de especies *Bacillus* en la industria alimentaria

El uso microorganismos vivos en la fermentación de alimentos cada vez es mayor. La mayoría de alimentos fermentados están constituidos por bacterias del ácido láctico (BAL) o levaduras, pero el género *Bacillus* tiene gran importancia en algunos alimentos fermentados (Z. Li et al., 2023). Esta bacteria tiene la capacidad de conferir beneficios como el sabor del alimento y propiedades positivas para la salud. Además, es capaz de crecer en ambientes que no requieren un control extremo y tiene un bajo costo de producción (Herrmann et al., 2024).

El proceso de fermentación con esta bacteria se conoce como fermentación alcalina (Kimura & Yokoyama, 2019) aunque también se pueden desarrollar en fermentación sumergida o en estado sólido, dependiendo de la fermentación deseada, todas presentan ventajas y resultados exitosos (Herrmann et al., 2024).

Bacillus spp. es utilizado en las fermentaciones de alimentos como legumbres, tubérculos o cereales en Asia, África y América del Sur (Z. Li et al., 2023).

En la fermentación de cereales como la soja o el arroz una de las principales especies del género *Bacillus* fue en el alimento natto, de origen asiático. Esta especie fue denominada *Bacillus natto*, aunque posteriormente fue reconocida como *B. subtilis* (Harwood, 1989) (Herrmann et al., 2024).

Destacan como especies fermentadoras *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. pumilus* y *B. brevis* (Kimura & Yokoyama, 2019).

A continuación, se muestra una descripción de alimentos fermentados que incluyen especies del género *Bacillus* como principales organismos fermentadores (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Alimentos fermentados con presencia de bacterias del género *Bacillus* (adaptado de Z. Li et al., 2023).

Producto	Sustrato	Principales microorganismos	Región de uso	Origen alimentario
Natto	Soja	<i>B. subtilis</i> var. <i>natto</i>	Japón	Sustituto de carne
Cheonggukjang	Soja, legumbres locales	<i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>Rhizopus oligosporus</i>	Corea	Sustituto de carne
Doenjang	Soja, legumbres locales	<i>B. subtilis</i> , <i>Rhizopus</i> spp. y <i>Aspergillus</i> spp.	Corea	Condimento
Gochujang	Soja, arroz y pimienta	<i>Bacillus</i> spp., incluidos <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Aspergillus</i> spp. y <i>Rhizopus</i> spp.	Corea	Condimento
Hawaijar	Soja entera	<i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>Alkaligenes</i> spp.	India (Asia)	Alimento básico
Sufu	Tofu (cuajada de soja)	<i>Bacillus</i> spp o <i>Micrococcus</i> spp.	China (Asia)	Guarnición

Dawadawa	Algarroba y legumbres	<i>Bacillus</i> spp., incluidos <i>B. subtilis</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>B.</i> <i>subtilis</i> var. <i>natto</i>	África Occidental y central	Sustituto de carne
Ugba	Algarroba y legumbres locales	<i>Bacillus</i> spp, incluidos <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>Staphylococcus</i> spp. y <i>Micrococcus</i> spp.	Nigeria	Guarnición
Ntoba Mbodi	Hojas de yuca	<i>Bacillus</i> spp., incluidos <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. pumilis</i> , <i>B. sphaericus</i> y <i>B. xylanilyticu</i>	Congo	Alimento básico
Agbelina	Mandioca	<i>Bacillus</i> spp., incluyendo <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>B. pumilus</i> ; BAL y levaduras	África Occidental	Alimento básico
Cinta	Mandioca	<i>Bacillus</i> spp., incluidos <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> y <i>B. thuringiensis</i>	Indonesia	Postre

Elubo (ñame)	Batatas	<i>Lactiplantibacillus</i> , <i>Levilactobacillus</i> y <i>B. subtilis</i>	África Occidental	Alimento básico
Taruba	Mandioca	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Amazonas	Bebida
Vainilla	Vainas de semillas de Vainilla planifolia	<i>Bacillus</i> spp., incluidos <i>B. subtilis</i> , <i>B. fusiformis</i> y <i>B. pumilus</i>	Indonesia, México y otros	Condimento
Daqu	Granos de trigo, arroz, sorgo y cebada	<i>Bacillus</i> spp., incluyendo <i>B. subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. velezensis</i> y <i>B.</i> <i>licheniformis</i> ; BAL, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Saccharomyces</i> y <i>Saccharomycopsis</i>	China	Licores y vinagre
Salsa de pescado	Pez	<i>Filobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Virgibacillus</i> , <i>Halobacillus</i> , <i>Halococcus</i> , <i>Tetragenococcus</i> <i>halophilus</i>	Sudeste Asiático	Condimento

Por otro lado, existe una gran preocupación con la especie *B. cereus* ya que es capaz de producir ciertas enterotoxinas perjudiciales para el organismo. Parte de esas toxinas también pueden ser producidas por las especies *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis* y *B. anthracis* (Herrmann et al., 2024).

La intoxicación por *B. cereus* se manifiesta de dos formas, un síndrome diarreico o un síndrome emético. Este último es causado por la toxina cereulida, se trata de una toxina termoestable capaz de causar vómitos, así como daños hepáticos y cerebrales cuando se encuentra en dosis altas. Por otro lado, el síndrome diarreico se debe a la ingestión de las esporas o células vegetativas enterotoxigénicas de la bacteria, lo cual, conduce a dolor abdominal y diarreas (Jovanovic et al., 2021).

En ambos tipos, la fuente de intoxicación son las esporas de *B. cereus* ya que es un microorganismo capaz de crecer después de cocinarlo y enfriarlo. Esta especie se encuentra especialmente en alimentos vegetales, aunque también lo podemos encontrar en productos lácteos, huevos o carne (Granum & Lund, 2006).

Tabla 2.2 Características generales de las dos enfermedades producidas por *B. cereus* en alimentos (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Características	Enfermedad diarreica	Enfermedad emética
Tipo de toxina	Proteína; enterotoxinas: Hbl, Nhe, CytK implicadas	Péptido cíclico; toxina emética (cereulida)
Ubicación de la producción de toxinas	En el intestino delgado del huésped.	Preformado en alimentos
Dosis infecciosa	$10^5 - 10^8$ UFC (total). El número total requerido es menor para las esporas en comparación con las células vegetativas	$10^5 - 10^8$ células g^{-1} se encuentra a menudo en los alimentos implicados, pero no se requieren células vivas para la intoxicación. Cereulida: 8-10 $\mu g\ kg^{-1}$ de peso corporal (modelos animales)

Tiempo de incubación	8-16 h (ocasionalmente >24h)	0.5 a 6 horas
Duración de la enfermedad	12-24 h (ocasionalmente varios días)	6-24 horas
Síntomas	Dolor abdominal, diarrea acuosa y ocasionalmente náuseas. Se ha producido letalidad.	Náuseas, vómitos y malestar. Algunos casos letales (posiblemente debido a daño hepático)
Alimentos más frecuentes implicados en la enfermedad	Alimentos proteicos; productos cárnicos, sopas, verduras, pudines, salsas, leche y productos lácteos	Alimentos ricos en almidón; Arroz, pasta, repostería y fideos fritos y cocidos

La mayoría de brotes por *B. cereus* a causa de productos alimenticios están asociados al consumo de arroz, pasta, carne y productos lácteos. Sin embargo, aunque es famoso por causar enfermedades transmitidas por los alimentos está autorizado el uso de algunas especies como probiótico tanto en humanos como en animales (K. Zhu et al., 2016).

2.3.2 Uso de especies *Bacillus* como probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos capaces de mejorar la salud del huésped atribuyendo algunos beneficios cuando son administrados en cantidades adecuadas (Cutting, 2011). La competencia entre los probióticos y los patógenos que son ingeridos de forma accidental, pueden impedir que el organismo sea colonizado por los patógenos y refuerza los mecanismos de defensa. Los probióticos son incorporados como aditivos y benefician en la fisiología del organismo más allá del valor nutricional que posee (Milián et al., 2008).

Los microorganismos que sean utilizados como probióticos deben presentar una serie de características (Molina, 2019):

- No ser patógenos para el ser vivo.
- Deben mostrar resistencia a factores físicos y ambientales como calor, desecación o radiación ultravioleta.
- Deben ser viables durante su manejo, almacenamiento y procesamiento.
- Colonizar el tubo digestivo adhiriéndose a su pared y resistir el ambiente del mismo.
- Su crecimiento en cultivo debe ser rápido y poco costoso para que su producción y uso sea rentable.

De los géneros *Lactobacillus* (comprenden bacterias del ácido láctico) y *Bifidobacterium* provienen la mayoría variedad de probióticos, sin embargo, el género *Bacillus* ha cobrado valor sobre esta aplicación gracias a la capacidad de formar esporas (Herrmann et al., 2024). Estas esporas muestran ventajas respecto a otros géneros como *Latobacillus* spp. ya que se puede mantener la viabilidad del producto a temperatura ambiente. Además, las esporas del género *Bacillus* son resistentes a pH ácidos y al ser ingeridas llegan intactas al tubo intestinal lo que no ocurre con ciertas especies de *Lactobacillus*.

Dentro del género, las especies más examinadas como probióticos son *Bacillus subtilis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* y *Bacillus licheniformis* (Cutting, 2011).

Los probióticos, suelen ser aplicados en el consumo humano como productos dietéticos y animal, aportando una serie de beneficios. En el caso del ser humano, la influencia de las bacterias probióticas reduce los síntomas asociados a la intolerancia a la lactosa, disminuyen los niveles de colesterol sanguíneo, producen vitaminas del grupo B, actúan como inmunomoduladores, inhiben el crecimiento de patógenos potenciales y reestablecen la flora intestinal durante una terapia a base de antibióticos (Taranto et al., 2005).

A continuación, se muestran una serie de probióticos para el uso humano (tabla 2.3).

Tabla 2.3 Probióticos para el uso humano (Adaptado de Cutting, 2011).

Producto	Fabricante	Especie
Bactisubtil®	Producido por Marion Merrell (Levallois-Perret, Francia), pero también por Hoechst y luego por Aventis Pharma tras fusiones y adquisiciones.	Cápsula que contiene 1×10^9 esporas de <i>Bacillus cereus</i> cepa IP5832 (ATCC 14893)
Bio Kult®	Cuidado de la salud de Protexin	<i>B. subtilis</i> , componente de 14 cepas contenidas en este suplemento probiótico
Biosporina®	Biofarm, Dniepropetrovsk, Ucrania Garars, Rusia	Mezcla de dos cepas de bacterias antagonistas vivas <i>B. subtilis</i> 2335 y <i>B. licheniformis</i> 2336. Originalmente aislado de forraje para animales.
Biovicerina®	Geyer Medicamentos SA Porto Alegre, RS, Brasil	<i>B. cereus</i> cepa GM. Suspensión de 10^6 esporas ml^{-1} .
Bispan®	Binex Co. Ltd., Busan, Corea del Sur	Comprimido que contiene esporas ($1,7 \times 10^7$) de <i>B. polyfermenticus</i> SCD.
Domuvar	BioProgress SpA, Anagni, Italia	Vial que contiene 1×10^9 esporas de <i>Bacillus clausii</i> en suspensión, etiquetado como portador de <i>B. subtilis</i> . Ya no se comercializa.
Lactospora	Sabinsa Corp., Piscataway, Nueva Jersey, EE. UU.	Etiquetado como <i>Lactobacillus sporogenes</i> pero contiene <i>B. coagulans</i> $6-15 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$.

Equilibrio de flora	Flora-Balance, Montana, EE. UU	Cápsulas etiquetadas como portadoras de <i>Bacillus laterosporus</i> pero que contienen de <i>Brevobacillus laterosporus</i>
Sustenex®	Ganeden Biotech Inc., Ohio, EE. UU	<i>B. coagulans</i> GanedenBC ³⁰ Cepa patentada que cuenta con la aprobación GRAS en los EE. UU
Medilac Vita	Hanmi Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing, China	<i>B. subtilis</i> cepa RO179 (a 10^8 g ⁻¹) en combinación con <i>Enterococcus faecium</i> .
El primer alimento de la naturaleza	Primera ley de la naturaleza, San Diego, CA, EE. UU.	42 especies enumeradas como probióticos, incluidas: <i>B. subtilis</i> , <i>B. polymyxa</i> , <i>B. pumilus</i> y <i>B. laterosporus</i> .
Neolactofloreno	Newpharma Srl, Milán, Italia	Mezcla de bacterias del ácido láctico inc. <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> y <i>L. sporogenes</i> . <i>L. sporogenes</i> a $3,3 \times 10^5$ UFC g ⁻¹ cuyo nombre válido es <i>B. coagulans</i> y está mal etiquetado como una cepa de <i>B. subtilis</i> .
Enterogermina®	Sanofi Winthrop SpA, Milán, Italia	Vial (5 ml) que contiene 1×10^6 esporas de <i>B. clausii</i> en suspensión. Al menos cuatro cepas diferentes de <i>B. clausii</i> presentes y el producto originalmente etiquetado como portador de <i>B. subtilis</i> .

Por otro lado, en el consumo animal provocan un aumento de la tasa de conversión alimentaria y aumento de peso, mejora de la salud intestinal y respiratoria, disminución de la emisión de nitrógeno y la producción de compuestos bioactivos (Herrmann et al., 2024).

Existen diversidad de alimentos fermentados producidos con especies del género *Bacillus* y citado anteriormente, solo algunas cepas de *Bacillus* están involucradas en la fermentación de estos alimentos. La finalidad de este trabajo es analizar las especies más relevantes de este género en la producción de alimentos y evidenciar cuales son los beneficios que aportan a los mismos describiendo los productos más comercializados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evidenciar el uso de especies *Bacillus* más relevantes en la preparación de alimentos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar que especies del género *Bacillus* se utilizan en la producción de alimentos.
- Exponer las distintas especies y sus ventajas en la utilización por parte de la industria.
- Describir el potencial de enzimas producidas por *Bacillus* en la industria alimentaria.

4. METODOLOGÍA

En este estudio, se ha llevado a cabo una revisión sistemática de diferentes artículos científicos sobre el género *Bacillus* y su implicación en la elaboración de alimentos en la industria.

Las principales bases de datos donde se ha realizado la búsqueda de la información son Google Scholar, Scielo o Pubmed. Como términos adecuados de búsqueda se emplearon “*Bacillus* spp” y “*Bacillus* en la industria alimentaria”, aunque también se utilizaron términos como: “Probióticos basados en *Bacillus*” “Alimentos fermentados con *Bacillus*”, “Aplicaciones de *Bacillus* en la industria”, “Producción de amilasas por *Bacillus*”, tanto en español como en inglés.

Se revisaron 972 artículos y estudios realizados en los últimos 20 años, sin embargo, de las fuentes encontradas únicamente se seleccionaron aquellos artículos o estudios que hacían referencia a la producción alimentaria basada en *Bacillus*. De manera que, se excluyeron aquellos artículos y estudios escritos en un idioma distinto al español o inglés, así como, los que no presentaban contenido de especial interés sobre el papel de este género en la producción de alimentos.

Por otro lado, también se excluyó toda la información sobre la especie *B. cereus* puesto que destaca por su capacidad de producir distintas toxinas perjudiciales para la salud humana debido al consumo de alimentos que están contaminados por dicho microorganismo (Sánchez et al., 2016), aunque es mencionado en alguna ocasión como un aspecto beneficioso cuando su uso es como probiótico. Finalmente, todo artículo que presentara algún tipo de restricción para su lectura o que presentara fecha de publicación muy antigua también fue excluido, ya que sólo se utilizaron aquellos artículos publicados en los últimos 20 años (figura 4.1).



Figura 4.1 Esquema de los criterios de inclusión que se han tenido en cuenta para la selección de los artículos (Elaboración propia).

Tal y como se indica en la figura 4.2, en una primera búsqueda, se encontraron 972 artículos en total, de los cuales 837 se descartaron por no cumplir los criterios descritos anteriormente. Se recuperaron 135 artículos, de los cuales se hizo una revisión del título y resumen, seleccionando 38 artículos. Tras una lectura analítica de los mismos, se seleccionaron 26 artículos de los cuales se pudo recoger la información necesaria para realizar el estudio. De tal manera, en cada uno de estos artículos y estudios, se consideró toda la información de interés para la elaboración del trabajo, y así responder a los objetivos previamente expuestos.

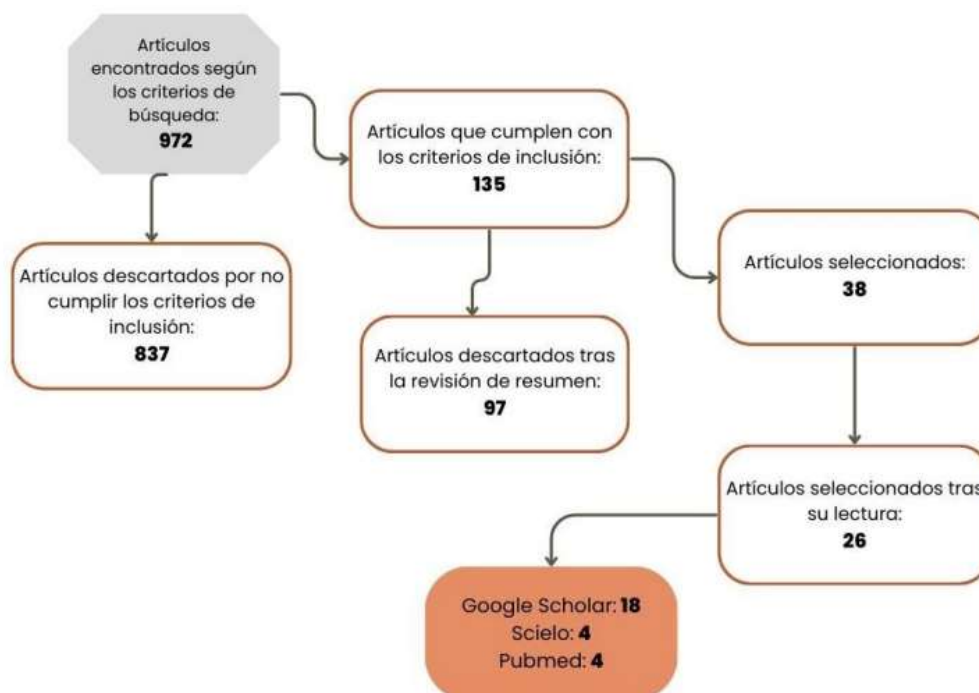


Figura 4.2 Diagrama de flujo de las diferentes búsquedas y selección de artículos (Elaboración propia).

5. RESULTADOS

5.1 *Bacillus subtilis*

Gracias a la adaptabilidad de este microorganismo en distintas situaciones adversas le permiten proporcionar cultivos eficientes y posicionarse en varios dominios industriales y agrícolas de manera rentable, desde producción de enzimas, biocontrol, síntesis de biopelículas, uso de probióticos hasta su implicación en la producción de alimentos tradicionales fermentados a partir de soja. En el proceso de fermentación, esta bacteria tiene la capacidad de producir enzimas que descomponen la soja confiriendo sabores, consistencias y propiedades nutricionales exclusivas, un aspecto crucial para una exitosa producción industrial (Akinsemolu et al., 2024).

Algunos de los alimentos fermentados a base de soja con la implicación de este microorganismo son Cheonggukjang, Deonjang, Gochujang, Natto japonés, Kinema y Thua nao, los cuales su sabor y textura los hace únicos gracias a la presencia de *B. subtilis* (Ghosh et al., 2018).

5.1.1 Kinema

Es un alimento fermentado a base de soja de la comunidad nepalí, presenta una textura pegajosa y un color grisáceo. Durante su producción se seleccionan las semillas de soja las cuales se lavan y remojan durante toda la noche. Posteriormente, estas semillas remojadas se hierven durante 2-3 horas aproximadamente hasta que se ablandan. Con la ayuda de un mortero se parten los cotiledones de las semillas lo que proporciona una aceleración en la fermentación por parte de *Bacillus* spp. Finalmente, la sémola de soja se coloca en un recipiente de bambú y se cubre con una bolsa dejando fermentar a temperatura ambiente (25-40°C) de 1 a 3 días en un horno de barro (Tamang, 2015).

La producción de dicho alimento, es una fuente de ingresos para muchas familias en el Himalaya ya que es vendido en todos los mercados locales, pero su fabricación es reconocida como una industria pequeña y aún no cuenta con apoyo financiero por lo que está limitada a la producción nacional. Como especie dominante de este producto destaca *B. subtilis* aunque se han aislado varias especies de *Bacillus* incluidas *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* (Tamang, 2015).



Figura 5.1 A, kinema fresco y kinema secado al sol; B y C, kinema al curry (adaptado de Tamang, 2015).

Es considerado un alimento funcional ya que aporta numerosos beneficios para la salud, donde se incluye antioxidantes, aminoácidos esenciales siendo rico en ácido linoleico, complejo de vitamina B, entre otros. Además, con respecto a alimentos como leche u otros productos animales es la fuente de proteína vegetal más económica (Tamang, 2015).

5.1.2 *Bacillus subtilis* var. *Natto*

Bacillus subtilis var. *Natto* (también conocido como *Bacillus natto*) se trata de una subespecie de *Bacillus subtilis* y destaca por ser una bacteria de la comida tradicional en Japón. El alimento de soja fermentada representante en el norte del país es, Natto, el cual se puede tomar de varias formas, como itohiki natto, daitokuji natto y hamanatto (Afzaal et al., 2022).

- Itohiki-natto, tipo de natto que es inoculado con bacterias y se cultiva sin sal durante 1 día.
- Daitokuji natto o hamanatto, tipo de natto que se prepara inyectando moho y levantándolo de 4 a 6 meses con adicción de sal.

Este alimento presenta una actividad proteasa que fue descrita por Sawamura (1906). Esto se debe a la fermentación con *Bacillus* spp. la cual proporciona una degradación de los componentes de la soja y una producción de compuestos bioactivos como la nattoquinasa, riboflavina, etc (D. Li et al., 2022).

Su producción consiste en lavar y remojar las semillas de soja durante toda la noche con agua acaliente. Se refrigeran a 45°C antes de la inoculación bacteriana y posteriormente, se cuecen durante media hora lo que permitirá la inoculación de esporas. Finalmente, natto fermenta de 18 a 20 horas aproximadamente a 40-45°C (Afzaal et al., 2022).



Figura 5.2 Natto, normalmente consumido como producto de soja fermentada, frío o caliente. Este es un ejemplo donde es vendido como snack con soja seca recubierta y un polvo blanco de *B. subtilis* var. *Natto*, necesario para el sabor y textura del Natto (Cutting, 2011).

Se han asociado ciertos beneficios para la salud con el consumo de este alimento, incluyendo la estimulación del sistema inmunológico. Además, nattoquinasa, es una serina proteasa secretada por todas las cepas de *B. subtilis* pero en especial en la cepa Natto, donde se produce en niveles muy altos. Esta proteasa es capaz de reducir la coagulación sanguínea mediante fibrinólisis. Es considerada generalmente como segura ("Generally recognized as safe" - GRAS), se purifica y es vendida como suplemento en todo el mundo (Cutting, 2011).

5.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

Al igual que el resto de especies del género *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* es una bacteria aerobia Gram-positiva formadora de endosporas, la cual, presenta morfología de bastón y se puede encontrar en distintos nichos ambientales como suelo, aire o alimentos (Saint-Pierre et al., 2023). Resiste condiciones extremas por su capacidad de formar endosporas y esto le confiere un papel importante en sectores como el alimentario, farmacéutico, agrícola o medioambiental (WoldemariamYohannes et al., 2020).

Destaca como bacteria fermentadora según la fuente de materia prima, incluyendo productos como cereales y legumbres, frutas, lácteos, carnes, pescados y bebidas. En este proceso de fermentación, tiene varias funciones en la producción de alimentos como mejorar la calidad (sabor, gusto), proporcionar seguridad (antimicrobianos, desintoxicación, biopelícula) y participar en la producción de distintos subproductos (alcohol, vitaminas, proteínas) (WoldemariamYohannes et al., 2020).

Tabla 5.1 Aplicación de *Bacillus amyloliquefaciens* en algunos alimentos fermentados tradicionales (adaptado de WoldemariamYohannes et al., 2020).

Cepa	Categoría	Origen	Comida
<i>B. amyloliquefaciens</i> XR44A	Bebida	India	Cerveza
<i>B. amyloliquefaciens</i> JP21	Bebida	Porcelana	Baijiu (licor chino)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Bebida	Corea	Makgeolli
<i>B. amyloliquefaciens</i> CFR15	Cereal y legumbre	India	Masa de dosa
<i>B. amyloliquefaciens</i> PCA-5	Cereal y legumbre	Porcelana	Doubanjiang
<i>B. amyloliquefaciens</i> E22	Cereal y legumbre	Indonesia	Tempeh
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	Lácteo, carne y pescado	Brasil	Queso

<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>subtilis</i> FS-05	Lácteo, carne y pescado	Malasia	Salsa de pesado
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Lácteo, carne y pescado	EEUU	Sabor a yogur
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Fruta y vegetales	India	Pepinillo de mango
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Fruta y vegetales	Porcelana	Piel de naranja y salsa de frijoles
<i>B. amyloliquefaciens</i> CEPA 15111	Raíces y tubérculos	Alemania	Fibras de pulpa de papa

Los cereales y las legumbres son las principales fuentes de alimentos fermentados donde se estudia la aplicación de *B. amyloliquefaciens*. Un uso representativo de esta bacteria es la producción de Koji, el cual es empleado para preparar alimentos y bebidas como el miso (pasta de soja japonesa), el sake (vino de arroz japonés), el doenjang (pasta de soja coreana), el gochujang (pasta de pimienta coreana) y el kanjang (pasta de soja coreana) (Seo et al., 2018).

El Koji se trata de una mezcla de granos o soja fermentada que contiene enzimas hidrolizadoras de almidón, proteinasas, celulasas y fitasas, entre otras (Y. Zhu & Tramper, 2013). Su preparación implica la fermentación de cereales previamente cocidos como arroz, trigo o cebada, o soja con hongos como *Rhizopus*, *Penicillium*, *Monascus* y *Aspergillus*, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias como *B. subtilis*, *B. natto* y *B. amyloliquefaciens*. (Seo et al., 2018).

Los productos derivados del Koji ejercen efectos beneficiosos para la salud, ya que además de aportar sabor y aroma, tienen actividades antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes y antiplaquetarias. A continuación, se muestran algunos ejemplos (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Beneficios para la salud por parte del Koji y sus derivados (Adaptado de Y. Zhu & Tramper, 2013).

Koji y derivados	Posibles efectos sobre la salud
Arroz integral Koji	Actividad de reducción del estrés
Koji por sake o miso	Actividad antimutagénica
Polvo de Koji	Actividad antioxidante
Koji de cebada	Actividad antitumoral
Cultivo del moho Koji	Reducir el colesterol
Salsa de soja	Eliminación de la alergia al gluten

5.3 Amilasas de especies *Bacillus* para aplicaciones industriales

Las enzimas amilolíticas o amilasas fueron descritas por primera vez por Kirchoff (1811), una de sus principales funciones es modificar la estructura del almidón (Farias et al., 2021).

El almidón es un hidrato de carbono importante en la alimentación y es enzimáticamente procesado en una amplia variedad de productos como jarabes de glucosa, derivados de maltodextrina o ciclodextrinas, hidrolizados de almidón, los cuales son utilizados con fines en la industria alimentaria (Souza & Magalhães, 2010). Las amilasas destacan como enzimas industriales importantes y se pueden obtener una amplia gama de productos e ingredientes alimentarios dependiendo del tipo de amilasa (Farias et al., 2021).

La producción industrial de estas enzimas fue a partir de una fuente fúngica en 1894, pero tiempo después se han desarrollado técnicas de fermentación a partir de diferentes microorganismos para su obtención.

Estas enzimas aparte de ser producidas por una amplia variedad de seres vivos también pueden obtenerse de plantas, animales, bacterias y hongos. El género *Bacillus* destaca entre los microorganismos productores de dicha enzima, en concreto, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* producen amilasas mediante fermentación sumergida a escala industrial (Farias et al., 2021).

Tabla 5.3 Enzimas producidas por *Bacillus* procesadoras de almidón con fin alimentario (adaptado de Farias et al., 2021)

Microorganismo (enzima)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Aplicación
<i>B. acidopullulyticus</i> (pululanasa)	5	50	Preparación de jarabe de maltotriosa
<i>B. pseudofirmus</i> (pululanasa)	7-8	45	Hidrólisis del almidón
<i>B. licheniformis</i> (glucoamilasa)	5	50	Maltotriosa y glucosa del almidón de patata
<i>B. megaterium</i> (α -amilasa)	6	93	Producción de maltooligosacáridos
<i>B. amyloliquefaciens</i> (α -amilasa)	7	65	Hidrólisis del almidón
<i>B. subtilis</i> (amilasa)	7	70	Ingredientes de panadería
<i>B. lehensis</i> (amilasa)	7	40	Producción de maltooligosacáridos
<i>B. subtilis</i> (α -amilasa)	7	60	Producción de maltotriosa y maltotetraosa
<i>B. subtilis</i> (α -amilasa)	7	50	Preparación de pan de masa
<i>B. mojavensis</i> (α -amilasa)	6	70	Digestión de almidón soluble de manzanas rojas y verdes
<i>B. sonorensis</i> (α -amilasa)	10	55	Producción de maltooligosacáridos

Las amilasas forman parte de la familia de glucósido hidrolasa (GH), en concreto en la familia GH13, se encuentran la mayoría de enzimas que degradan el almidón incluyendo alfa-amilasa, alfa-glucosidasas, pululanasa, ciclomaltodextrina glucanotransferasa y isoamilasa. Aunque también se pueden encontrar en la familia GH14 beta-amilasas y en GH15 glucoamilasas, con gran importancia industrial (Farias et al., 2021).

5.3.1 α -amilasas

Las alfa-amilasas pertenecen a la familia de las endoamilasas y se encuentran distribuidas en toda la naturaleza (microorganismos, plantas, organismos superiores). Su función es catalizar la hidrólisis al azar de los enlaces alfa-1,4 glicosídicos en la molécula de almidón dando lugar a oligosacáridos más cortos (Farias et al., 2021). Existen otras enzimas amilolíticas que participan en la hidrólisis del almidón, pero alfa-amilasa es la más importante para el inicio del proceso (Souza & Magalhães, 2010). Estas enzimas presentan un gran potencial en gran cantidad de procesos industriales como la industria alimentaria, textil, de fermentación, papelera, de detergentes y farmacéutica (Souza & Magalhães, 2010). Este potencial se debe a que presentan características bioquímicas como pH y temperaturas óptimas dependiendo de la fuente microbiana (Farias et al., 2021).

Como se ha mencionado anteriormente, puede ser producida por gran variedad de microorganismos, sin embargo, en aplicaciones comerciales alfa-amilasa procede principalmente del género *Bacillus* (Souza & Magalhães, 2010). Actualmente, las alfa-amilasas con mayor utilidad en industria alimentaria se obtienen de bacterias de dicho género como *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* (Farias et al., 2021).

En industria alimentaria estas enzimas se emplean en variedad de productos como alimentos procesados, pan, cerveza, jugos de frutas, pasteles y jarabes de almidón, aunque destacan en la industria panadera (Souza & Magalhães, 2010).

En la elaboración del pan, estas enzimas pueden agregarse a la masa de pan para así descomponer el almidón de la harina en dextrinas de menor tamaño que serán fermentadas por la levadura. Como resultado de la adición de alfa-amilasa a la masa de pan se obtienen varias ventajas con respecto a este producto (Souza, & Magalhães, 2010):

- Mejora la velocidad de fermentación.
- Reduce la viscosidad de la masa.
- Mejora el volumen y textura del producto.
- Genera azúcar en la masa mejorando el sabor, color y cualidades del horneado del pan.
- Efecto anti-endurecimiento en el horneado aumentando la vida útil del producto.

Además, las amilasas también se utilizan en la clarificación de cerveza y zumos de frutas. Uno de los jugos más consumidos en el mundo es el jugo de manzana que crudo, presenta un aspecto turbio, viscoso y durante su almacenamiento precipita debido a la presencia de polisacáridos como pectina y almidón, entre otros. Sin embargo, las alfa-amilasas junto con pectinasas, celulasas y hemicelulasas reducen la turbidez de este producto (Farias et al., 2021).

6. DISCUSIÓN

La habilidad que presenta *Bacillus* spp. para formar endosporas, confiere al género una serie de resistencias para su aislamiento en ambientes bajo condiciones extremas (Villareal-Delgado, MF *et al* 2018). Esta adaptación de la bacteria a diferentes ambientes la ha posicionado en varios sectores industriales donde destacamos su uso como probióticos y en la industria alimentaria (Akinsemolu *et al.*, 2024).

Bacillus spp. presenta un papel importante en la fermentación de alimentos, en concreto, legumbres, tubérculos o cereales en países asiáticos (Z. Li *et al.*, 2023).

En el proceso de fermentación *Bacillus* proporciona sabores, texturas, consistencias y propiedades nutricionales al producto (Akinsemolu *et al.*, 2024). Algunos de los alimentos fermentados a base de soja en los que existe la presencia de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son Cheonggukjang, Deonjang, Gochujang, Natto japonés, Kinema, entre otros (Ghosh *et al.*, 2018).

A parte de su gran potencial en alimentos fermentados, *Bacillus* spp. destaca por su producción de enzimas como amilasas las cuales proporcionan una variedad de productos alimenticios (Farias *et al.*, 2021).

Ahora bien, existen dos formadores de esporas como son *B. cereus* y *B. anthracis* que son conocidos como patógenos humanos, por tanto, existen pocos productos derivados de *Bacillus* aprobados en el Occidente. Sin embargo, se ha revisado ampliamente la seguridad de las especies *Bacillus* en la elaboración de alimentos y la mayoría de enfermedades asociadas a este género se deben a infecciones oportunistas o diagnósticos erróneos. Se han llevado a cabo varios estudios tanto en animales como estudios *in vitro* en varias cepas como *B. subtilis* var. *Natto*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, entre otros, y ninguno muestra efectos adversos (Cutting, 2011).

Además, existen estudios que muestran que estas bacterias pueden crecer en el tracto intestinal considerándose residentes temporales. Esto es clave ya que indica que estas bacterias no son extrañas para el organismo y pueden ejercer una relación simbiótica con el huésped (Cutting, 2011).

No obstante, todos estos resultados concluyen que las especies del género *Bacillus* se convertirán en cultivos iniciadores de una amplia variedad de alimentos fermentados nuevos y mejorados.

7. CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Las diferentes propiedades bioquímicas capaces de resistir como pH y temperaturas extremas como resultado de formar esporas, hace que *Bacillus* spp. sea útil en la industria alimentaria.
2. *Bacillus* spp. juega un papel importante en la elaboración de productos fermentados.
3. Las cepas *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* destacan en la producción de alimentos a base de soja fermentada.
4. *Bacillus* spp. puede mejorar la calidad del producto en cuanto a sabor, textura y valor nutricional gracias a la producción de enzimas como las amilasas.
5. Los alimentos fermentados elaborados a partir de *Bacillus* spp. aportan beneficios para la salud.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi tutora, por su apoyo incondicional, confianza y orientación constante durante la guía del Trabajo de Fin de Grado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Afzaal, M., Saeed, F., Islam, F., Ateeq, H., Asghar, A., Shah, Y. A., Ofoedu, C. E., & Chacha, J. S. (2022). Nutritional health perspective of natto: A critical review. *Biochemistry Research International*, 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2022/5863887>
- Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S., & Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300614>
- Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 382–398. <https://doi.org/10.1128/cmr.00073-09>
- Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*, 28(2), 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Dobrzyński, J., Wróbel, B., & Górská, E. B. (2023). Taxonomy, ecology, and cellulolytic properties of the genus *Bacillus* and related genera. *Agriculture*, 13(10), 1979. <https://doi.org/10.3390/agriculture13101979>
- Farias, T. C., Kawaguti, H. Y., & Bello Koblitiz, M. G. (2021). Microbial amylolytic enzymes in foods: Technological importance of the *Bacillus* genus. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 35(102054), 102054. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102054>
- Ghosh, K., Kang, H. S., Hyun, W. B., & Kim, K.-P. (2018). High prevalence of *Bacillus subtilis*-infecting bacteriophages in soybean-based fermented foods and its detrimental effects on the process and quality of Cheonggukjang. *Food Microbiology*, 76, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.007>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Granum, P. E., & Lund, T. (2006). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*, 157(2), 223–228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x>

- Herrmann, L. W., Letti, L. A. J., Penha, R. de O., Soccol, V. T., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2024). *Bacillus* genus industrial applications and innovation: First steps towards a circular bioeconomy. *Biotechnology Advances*, 70(108300), 108300. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108300>
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- Kimura (木村 啓太郎), K., & Yokoyama (横山 智), S. (2019). Trends in the application of *Bacillus* in fermented foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.09.001>
- Li, D., Hou, L., Hu, M., Gao, Y., Tian, Z., Fan, B., Li, S., & Wang, F. (2022). Recent advances in nattokinase-enriched fermented soybean foods: A review. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(13), 1867. <https://doi.org/10.3390/foods11131867>
- Li, Z., Zheng, M., Zheng, J., & Gänzle, M. G. (2023). *Bacillus* species in food fermentations: an underappreciated group of organisms for safe use in food fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 50(101007), 101007. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101007>
- Milián, G., Pérez, M., & Bocourt, R. (2008). Empleo de probióticos basado en *Bacillus* sp y de sus endosporas en la producción avícola. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 42(2), 117–122.
- Molina, A. (2019). Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía mesoamericana: organo divulgativo del PCCMCA, Programa Cooperativo Centroamericano de Mejoramiento de Cultivos y Animales*, 601–611. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>
- Saint-Pierre, G., Henríquez, D., Paredes, L., & Gaete, M. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 40(3), 289–290. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182023000300289>
- Sánchez, J., Universidad de Antioquia, Correa, M., Castañeda-Sandoval, L. M., Universidad de Antioquia, & Universidad de Antioquia. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2). <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12>

- Seo, H. S., Lee, S., Singh, D., Shin, H. W., Cho, S. A., & Lee, C. H. (2018). Untargeted metabolite profiling for koji-fermentative bioprocess unravels the effects of varying substrate types and microbial inocula. *Food Chemistry*, 266, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.048>
- Souza, P. M. de, & Magalhães, P. de O. e. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822010000400004>
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Tamang, J. P. (2015). Naturally fermented ethnic soybean foods of India. *Journal of Ethnic Foods*, 2(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.jef.2015.02.003>
- Taranto, P., Médici, M., & Valdez, M. (2005). Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*, 4, 26–34.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología: la revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- WoldemariamYohannes, K., Wan, Z., Yu, Q., Li, H., Wei, X., Liu, Y., Wang, J., & Sun, B. (2020). Prebiotic, probiotic, antimicrobial, and functional food applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(50), 14709–14727. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06396>
- Zhu, K., Hölzel, C. S., Cui, Y., Mayer, R., Wang, Y., Dietrich, R., Didier, A., Bassitta, R., Märthlbauer, E., & Ding, S. (2016). Probiotic *Bacillus cereus* strains, a potential risk for public health in China. *Frontiers in microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00718>
- Zhu, Y., & Tramper, J. (2013). Koji – where East meets West in fermentation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.001>