



**“Evaluación de lactosuero como medio de cultivo para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de leche bovina cruda proveniente de haciendas ganaderas de Pasochoa, Pichincha- Ecuador”**

Yáñez Vega, Heidi Katherine

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ponce Loaiza, Lourdes Karina B. Sc., M. Sc.

19 de agosto del 2021

## Hoja de Resultados de la Herramienta Copyleaks



Yanez Vega Heidi Katherine\_Proyecto de Titulación\_Corregid...

Scanned on: 4:47 March 14, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	286
Words with Minor Changes	58
Paraphrased Words	213
Omitted Words	0



DESCARGA GRATUITAMENTE POR  
LOURDES  
KARINA PONCE  
LOAIZA



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación, **“Evaluación de lactosuero como medio de cultivo para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de leche bovina cruda proveniente de haciendas ganaderas de Pasocha, Pichincha- Ecuador”** fue realizado por la señorita **Yánez Vega, Heidi Katherine**, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad, por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de agosto del 2021

Firma:

**Ponce Loaiza, Lourdes Karina B. Sc., M. Sc.**

C.C.: 0914304779



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Responsabilidad de Autoría**

Yo, **Yánez Vega, Heidi Katherine**, con C.C.: 1722797352, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de lactosuero como medio de cultivo para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de leche bovina cruda proveniente de haciendas ganaderas de Paschoa, Pichincha- Ecuador”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 19 de agosto del 2021

Firma:

**Yánez Vega, Heidi Katherine**

C.C.: 1722797352



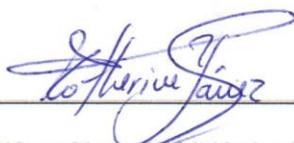
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Autorización de Publicación**

Yo, **Yánez Vega, Heidi Katherine**, con C.C.: 1722797352, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de lactosuero como medio de cultivo para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de leche bovina cruda proveniente de haciendas ganaderas de Paschoa, Pichincha - Ecuador”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de agosto del 2021

Firma:



**Yánez Vega, Heidi Katherine**

C.C.: 1722797352

**Dedicatoria**

*Con amor a mis padres, Franklin y Fanny.*

*Y a mis hermanas, Kelly y Karen.*

*Heidi Katherine Yáñez Vega*

## **Agradecimientos**

*Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a Franklin y Fanny, mis padres, que a lo largo de mi vida me han brindado su amor, comprensión, apoyo moral y económico.*

*A mis hermanas, Kelly y Karen que siempre con una palabra de aliento han sabido animarme a continuar.*

*A mi familia en general, que siempre ha estado pendiente de mi bienestar y mi éxito profesional.*

*A mis queridos amigos de vida y a mis amigos de aula, gracias por su amistad y compañía. Hicieron aún más grato este transcurso universitario.*

*A los docentes y técnicos de laboratorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE por compartirme los conocimientos profesionales con los que cuento ahora.*

*¡Simplemente, gracias a todos ustedes! Han sido un pilar fundamental en mi desarrollo personal y profesional.*

## Índice de Contenido

Hoja de Resultados de la Herramienta Copyleaks .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de Autoría .....	4
Autorización de Publicación .....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Índice de Contenido .....	8
Índice de Tablas.....	13
Índice de Figuras .....	15
Abreviaturas .....	16
Resumen.....	17
Abstract.....	18
Capítulo 1 .....	19
Introducción.....	19
Formulación del Problema.....	19
Justificación del Problema .....	21
Objetivos de la Investigación .....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Específicos .....	23
Capítulo 2.....	24
Marco Teórico .....	24
Bacterias Ácido Lácticas (BAL) .....	24
Crecimiento a Diferentes Temperaturas .....	24
Metabolismo de Azúcares .....	25

	9
Requerimientos Nutricionales.....	25
Medios de Cultivo para BAL.....	26
Importancia Tecnológica de las BAL.....	27
Bacterias Ácido Lácticas Nativas de Leche Cruda de Vaca.....	29
Industria Láctea en Ecuador.....	31
Lactosuero o Suero de Leche .....	32
Lactosuero Dulce .....	32
Lactosuero Ácido .....	33
Composición Nutricional del Lactosuero .....	33
Problemas Ambientales del Desecho de Lactosuero .....	33
Crecimiento Bacteriano Tipo Batch o Por Lotes .....	34
Cinética de Crecimiento en Cultivo Tipo Batch.....	34
Modelos Matemáticos para la Descripción del Crecimiento de Microorganismo.....	36
Modelo de Gompertz Modificado.....	37
Capítulo 3.....	39
Metodología .....	39
Recolección de Leche Cruda de Vaca.....	39
Caracterización de las Muestras de Leche Cruda de Vaca.....	39
Requisitos Organolépticos de Leche Cruda de Vaca .....	40
Requisitos Físico Químicos de Leche Cruda de Vaca.....	40
Densidad Relativa.....	40
Sólidos Totales .....	41
Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).....	41
Reacción de Estabilidad Proteíca.....	41
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas Nativas de Leche Cruda de Vaca.....	42

	10
Caracterización de Aislados Bacterianos de Leche Cruda de Vaca .....	42
Identificación Morfológica (Macroscópica y Microscópica) .....	42
Identificación por Pruebas Bioquímicas .....	42
Prueba de Catalasa .....	43
Prueba de Oxidasa .....	43
Prueba de Carácter de Fermentación .....	43
Prueba de Capacidad Proteolítica y Acidificante .....	44
Prueba de Capacidad Lipolítica.....	45
Prueba de Capacidad de Producción de Gas.....	45
Pruebas de Compatibilidad de Crecimiento entre los Aislados Seleccionados de BAL .....	46
Selección de Cepas para Inóculo Inicial .....	46
Preparación del Inóculo Inicial de BAL.....	47
Recolección de Lactosuero .....	47
Caracterización Físicoquímica del Lactosuero.....	47
Determinación de Azúcares Reductores.....	48
Acidez Titulable.....	49
Cenizas .....	49
pH.....	50
Acondicionamiento del Lactosuero .....	50
Filtración y Desproteínización.....	50
Suplementación del Lactosuero .....	50
Medios de Cultivo para BAL Nativas de Leche Cruda de Vaca .....	51
Cinética de Crecimiento de BAL Aisladas.....	52
Determinación de la Concentración de Biomasa.....	53
Evaluación de la Variación de pH.....	53

	11
Consumo de Azúcares Reductores.....	54
Curvas de Acidificación .....	54
Determinación de Parámetros Cinéticos.....	54
Análisis Estadístico.....	55
Capítulo 4.....	56
Resultados .....	56
Caracterización Físico Química de Muestras de Leche Cruda de Vaca.....	56
Requisitos Organolépticos.....	56
Requisitos Fisicoquímicos .....	57
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas Nativas de Leche Cruda de Vaca.....	58
Caracterización de Colonias Bacterianas de BAL .....	59
Prueba de Carácter de Fermentación .....	61
Prueba de Capacidad Proteolítica y Acidificante .....	62
Prueba de Capacidad Lipolítica.....	63
Prueba de Capacidad de Producción de Gas.....	64
Pruebas de Compatibilidad de Crecimiento entre los Aislados Seleccionados de BAL.....	64
Selección de Cepas y Preparación de Inóculo Inicial de BAL.....	65
Caracterización Fisicoquímica del Lactosuero.....	66
Cinética de Crecimiento de BAL Aisladas.....	67
Determinación de la Concentración de Biomasa.....	67
Evaluación de la Variación de pH.....	70
Curvas de Acidez.....	72
Consumo de Azúcares Reductores.....	74
Determinación de Parámetros Cinéticos.....	76
Análisis Estadístico.....	76

	12
Capítulo 5.....	82
Discusión.....	82
Caracterización de Muestras de Leche Cruda de Vaca .....	82
Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas desde Muestras de Leche Cruda de Vaca .....	82
Caracterización de Lactosuero.....	89
Cinética de Crecimiento de BAL en Lactosuero .....	90
Capítulo 6.....	97
Conclusiones.....	97
Recomendaciones .....	98
Capítulo 7 .....	99
Bibliografía .....	99

### Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Composición química de caldo MRS</i> .....	27
Tabla 2. <i>Composición química de caldo M17</i> .....	27
Tabla 3. <i>Composición típica del lactosuero dulce y ácido</i> .....	33
Tabla 4. <i>Cantidad de sales suplementadas en medio MRS original y en lactosuero</i> .....	51
Tabla 5. <i>Formulación del medio de cultivo caldo MRS</i> .....	52
Tabla 6. <i>Valores promedio de la biomasa neta de BAL producida en medio MRS, L50 y L</i> .....	55
Tabla 7. <i>Caracterización organoléptica de las muestras de leche de vaca</i> .....	56
Tabla 8. <i>Caracterización fisicoquímica de las muestras de leche de vaca</i> .....	57
Tabla 9. <i>Características morfológicas de colonias bacterianas aisladas en medio MRS a partir de leche cruda de vaca</i> .....	58
Tabla 10. <i>Caracterización de los aislados bacterianos de leche cruda de vaca</i> .....	59
Tabla 11. <i>Características funcionales de los aislados seleccionados de BAL</i> .....	64
Tabla 12. <i>Compatibilidad de crecimiento entre los aislados L2, L5, L12 y L14 de BAL</i> .....	65
Tabla 13. <i>Composición del inóculo mixto iniciador a utilizar en los ensayos de producción de biomasa de BAL</i> .....	66
Tabla 14. <i>Análisis de lactosuero entero y desproteínizado</i> .....	67
Tabla 15. <i>Valores de concentración de la biomasa de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca producidas al cabo de 48 h de cultivo en medio líquido MRS, L50 y L</i> .....	68
Tabla 16. <i>Valores de pH de los medios de cultivo MRS, L50 y L durante las 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca</i> .....	70
Tabla 17. <i>Porcentaje de acidez en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca</i> .....	72

Tabla 18. <i>Valores de concentración de azúcares reductores en los medios cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca.....</i>	74
Tabla 19. <i>Parámetros de la cinética de crecimiento en medio MRS, L50 y L de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca.....</i>	77
Tabla 20. <i>Valores promedio de la biomasa neta de BAL producida en medio MRS, L50 y L ....</i>	79
Tabla 21. <i>Análisis de varianza entre los medios de cultivo (MRS, L50, L) y el orden de ensayo referente a la biomasa neta de BAL.....</i>	80
Tabla 22. <i>Análisis de la prueba t de Dunnett basada en las medias de biomasa neta de bacterias ácido lácticas producidas en medio MRS, L50 y L .....</i>	80
Tabla 23. <i>Biomasa neta producida en los medios MRS, L50 y L al cabo de 48 h de cultivo ....</i>	81

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>Curva con las fases de crecimiento microbiano</i> .....	36
Figura 2. <i>Morfología microscópica de los aislados L2, L5, L12 y L14 de BAL a 100X</i> .....	60
Figura 3. <i>Determinación del tipo de fermentación de los aislados seleccionados de BAL</i> .....	62
Figura 4. <i>Reacción de los aislados seleccionados en medio Litmus Milk</i> .....	63
Figura 5. <i>Pruebas de antagonismo entre los aislados L2, L5, L12 y L14</i> .....	65
Figura 6. <i>Curvas de la concentración de biomasa de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca producidas a las 48 h de cultivo en medio líquido MRS, L50 y L</i> .....	69
Figura 7. <i>Variación de pH en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca</i> .....	71
Figura 8. <i>Variación del porcentaje de acidez en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca</i> .....	73
Figura 9. <i>Variación de la concentración de azúcares reductores en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca</i> .....	75
Figura 10. <i>Perfil cinético de BAL nativas de leche cruda de vaca en medio MRS, L50 y L</i> .....	76
Figura 11. <i>Curvas de la cinética de crecimiento de BAL en medio MRS, L50 ajustadas al modelo modificado de Gompertz</i> .....	78
Figura 12. <i>Biomasa neta producida en los medios MRS, L50 y L al cabo de 48 h de cultivo</i> ... 81	81

### Abreviaturas

ADNr	ADN ribosómico
BAL	Bacterias ácido lácticas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g/L	Gramo sobre Litro
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización
L	Medio de lactosuero desproteinizado sin suplementar (puro)
L50	Medio de lactosuero desproteinizado suplementado con sales MRS
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MRS	Medio Man, Rogosa y Sharpe
NTE	Norma Técnica Ecuatoriana
pH	Potencial de hidrógeno
Tg	Tiempo generacional
TRAM	Tiempo de reducción del azul de metileno
UFC	Unidades formadoras de colonias
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidad máxima específica de crecimiento
% p/v	Porcentaje peso-volumen

## Resumen

El lactosuero es un subproducto de la industria láctea ecuatoriana que ha llegado a convertirse en un contaminante ambiental por la nula aplicación tecnológica. En las últimas décadas, se ha expandido el interés de aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas (BAL) autóctonas, debido a sus capacidades tecnológicas como cultivos iniciadores o probióticos. Con el propósito de aprovechar el valor nutricional del lactosuero, reducir el impacto ambiental y aislar BAL autóctonas, el objetivo de esta investigación fue evaluar al lactosuero en calidad de medio de cultivo para la producción de biomasa de BAL nativas de leche cruda de vaca.

De un total de nueve muestras de leche, se aislaron cuatro cepas de BAL (L2, L5, L12, L14) en agar MRS a temperatura ambiente (21- 23 °C), se determinó el tipo de fermentación, capacidad acidificante y proteolítica de leche, capacidad de formación de gas y compatibilidad de crecimiento. Con los aislados L2 y L14 se formó un cultivo mixto iniciador (1:1). En 200 mL de medios líquidos MRS, L50 (lactosuero desproteinizado suplementado con 50 % p/v de sales minerales del medio comercial MRS) y L (lactosuero desproteinizado), se inoculó 1 % v/v de cultivo iniciador para realizar un estudio cinético de producción de biomasa, variabilidad de pH del medio, acidez titulable y consumo de azúcares reductores, a temperatura ambiente (21- 23 °C), 110 rpm durante 48 h. Los parámetros cinéticos de cada cultivo se obtuvieron ajustando las concentraciones de biomasa al modelo no lineal modificado de Gompertz, obteniendo las velocidades máximas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de 0.19 h<sup>-1</sup> en MRS, 0.19 h<sup>-1</sup> en L50 y 0.20 h<sup>-1</sup> en L. La biomasa producida en L50 y L fue equivalentes a la de MRS, por ello se sugiere que el lactosuero puede ser empleado como medio de cultivo en la producción de biomasa de BAL.

### Palabras claves:

- **BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVA**
- **BIOMASA**
- **LACTOSUERO**

### **Abstract**

Whey is a byproduct of the Ecuadorian dairy industry that has become an environmental pollutant due to the lack of technological application. In recent decades, interest in isolating and characterizing native lactic acid bacteria (LAB) has expanded, due to their technological capabilities as starter cultures or probiotics. To take advantage of the nutritional value of whey, reduce the environmental impact and isolate native BAL, the objective of this research was to evaluate whey as a culture medium to produce biomass of native BAL from raw cow's milk. From a total of nine milk samples, four BAL strains (L2, L5, L12, L14) were isolated on MRS agar at room temperature (21-23 °C), the type of fermentation, acidifying and proteolytic capacity of milk, gas formation capacity and growth compatibility were identified. A mixed starter culture (1:1) was formed with isolates L2 and L14. In 200 mL of liquid media MRS, L50 (deproteinized whey supplemented with 50% w/v of mineral salts from the commercial MRS medium) and L (deproteinized whey), 1% v/v of starter culture was inoculated to analyze a kinetic study of biomass production, pH variability of the medium, titratable acidity and consumption of reducing sugars, at room temperature (21-23 °C), 110 rpm for 48 h. The kinetic parameters of each culture were obtained by adjusting the biomass concentrations to the Gompertz modified nonlinear model, with maximum growth rates ( $\mu_{max}$ ) of 0.19 h<sup>-1</sup> in MRS, 0.19 h<sup>-1</sup> in L50 and 0.20 h<sup>-1</sup> in L. The biomass produced in L50 and L was equivalent to that of MRS, this suggests that whey can be used as a culture medium in the production of BAL biomass.

#### **Keywords:**

- **NATIVE LACTIC ACID BACTERIA**
- **BIOMASS**
- **WHEY**

## Capítulo 1

### Introducción

#### Formulación del Problema

El lactosuero o suero de leche es una sustancia líquida translúcida verdosa que se obtiene tras la precipitación de la caseína en el proceso de elaboración del queso (Panesar et al., 2007). En su composición retiene hasta un 55 % de los componentes de la leche, entre ellos la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Dragone et al., 2011; Panesar et al., 2007; Vázquez et al., 2009).

El principal problema vinculado al lactosuero es ser un potencial contaminante ambiental (Ryan & Walsh, 2016). Las altas cargas orgánicas del lactosuero, con DBO de 30-50 g/L y DQO de 60-80 g/L (Sansone et al., 2009), llegan a ser equivalente a la carga de 100 a 175 veces el volumen de las aguas residuales domésticas (Smithers, 2008); haciendo con ello costosa y difícil su eliminación (Ryan & Walsh, 2016).

En el Ecuador, la industria láctea anualmente genera un aproximado de 1.20 millones de litros de suero de leche tras el proceso de elaboración del queso y otros derivados (Granda, 2018). Lamentablemente por la falta de industrias nacionales que procesen este subproducto, apenas un 10 % del volumen total es empleado formalmente en la elaboración de productos de consumo humano o directamente como alimento para animales. El 90 % restante queda sin uso y es vertido a fuentes naturales de agua como ríos, arroyos, acequias y quebradas (Chanfrau et al., 2017). Bebidas lácteas, bebidas de yogurt, quesos de suero (tipo ricota), bebidas energizantes y algunas galletas, son productos de fabricación ecuatoriana que antes de las regulaciones incluían lactosuero líquido en su formulación (González, 2019b).

Al día de hoy en el país, por cumplimiento del acuerdo interministerial 032 del año 2019, se prohíbe el fin comercial del lactosuero para su uso como materia prima dentro de la cadena de productos lácteos (González, 2019a). El acuerdo restringe la comercialización de lactosuero

líquido procedente de plantas procesadoras de lácteos que cuenten con certificación en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM); únicamente se permite el uso y comercialización de lactosuero cuando previamente es procesado por pulverización o se concentre sus proteínas (Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria, 2019). Con respecto a las productoras artesanales, se enunció que deberán optar con un plan especial para el manejo final de dicho subproducto (Metro Ecuador, 2019).

El acuerdo de normar el uso del lactosuero aconteció ante el malestar de las asociaciones ganaderas y productoras de leche en el país (El Telégrafo, 2019). Estos gremios consideraban injusto competir con la venta de leche pura (\$ 0.42 centavos/L) ante el valor del lactosuero (\$ 0.02 centavos/L), por el desplazamiento de leche hasta en un 35 % a nivel nacional (Zambrano & Pinto, 2019).

Conjunto a lo mencionado, la preocupante contaminación por lactosuero a nivel mundial y su referente composición rica en nutrientes, ha hecho que las investigaciones para reutilizarlo incrementen. Tal es el alcance, que varios autores han propuesto el uso de lactosuero como sustrato alternativo para diversos procesos biotecnológicos, por ejemplo: la producción de ácido láctico en suero suplementado con sales minerales, extracto de levadura y vitaminas (Panesar et al., 2007; Robalino & Mosquera, 2017; Rojas et al., 2015; Soriano-Perez et al., 2012), para producción de etanol (Dragone et al., 2011; Liu et al., 2016; Zafar & Owais, 2006), obtención de ácido cítrico (J. Sánchez et al., 2004) y finalmente para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (Burns et al., 2008; Kareb et al., 2018; Mondragón et al., 2006; Pescuma et al., 2012).

Por otro lado, la aplicación de procesos biotecnológicos para obtener una variedad de compuestos genera gran interés para las industrias farmacéuticas, químicas y alimenticias como lo mencionan Ryan & Walsh (2016). La producción de tales compuestos se focaliza a disminuir los costos de producción al emplear nuevos sustratos, nuevas técnicas y tecnologías

que garanticen altas productividades y rendimientos de productos de interés biotecnológico e industrial (Panesso et al., 2015). Como lo es, el cultivo de bacterias ácido lácticas (BAL), cuya finalidad es obtener biomasa destinada al uso como cultivos iniciadores o probióticos empleando sustratos más económicos (Hayek et al., 2019; Mondragón et al., 2006).

Es de mención que, el uso de medios de cultivo estándar para el crecimiento de las BAL, como el medio MRS (De Man et al., 1960) para el crecimiento de lactobacilos y el medio M17 (Terzaghi & Sandine, 1975) para el crecimiento de estreptococos, se ve principalmente limitado solo a actividades de control de calidad, análisis de laboratorio, estudios de investigación y propósitos académicos, a causa de los altos costos al emplearlos a escala industrial (Hayek et al., 2019). En consecuencia, en los últimos años varias investigaciones se han centrado en buscar nuevos sustratos económicos para reemplazar los componentes costosos de los medios de cultivo, desarrollar medios a granel que garanticen rentabilidad y accesible preparación enfocada hacia una producción de alta densidad celular a nivel industrial. Según Rama *et al.* (2019), en los procesos de producción a escala industrial, la elección de un medio de cultivo adecuado para el proceso de cultivo es extremadamente importante a causa de ser uno de los principales costos de la operación pues debe satisfacer los exigentes requisitos nutricionales de los microorganismos.

### **Justificación del Problema**

Actualmente en las industrias lácteas ecuatorianas el manejo final del lactosuero se presenta como problemática debido a las regulaciones del acuerdo interministerial 032 del año 2019, con el cual se restringe la comercialización de dicho subproducto en estado líquido a fin de no ser empleado como materia prima dentro de la cadena de productos lácteos (Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria, 2019).

Ante dicha restricción, el sector de pequeños y medianos productores de queso se ven afectados debido a que el 30 % de sus ingresos provenían de la venta de lactosuero (El

Telégrafo, 2019). Además, frente a mayor conciencia ambiental y la presión por las normativas y leyes ambientales, a este gremio se le dificulta competir en el mercado al tener que invertir en plantas de tratamiento de aguas residuales para tratar todo el volumen de sus efluentes de lactosuero (Chanfrau *et al.*, 2017).

Sabiendo que los procesos biotecnológicos siempre apuntan a obtener rendimientos máximos, ya sea como biomasa o productividad de compuestos, y que uno de los factores para obtenerlo es el empleo de medios de cultivo óptimos y económicos para los microorganismos (Soydemír, 2008); la reutilización de lactosuero en procesos de bioconversión figura como una propuesta a favor de la producción de microorganismos de interés industrial. En este caso las bacterias ácido lácticas (BAL) que podrán ser empleadas como aditivos biológicos.

La industria biotecnológica en el Ecuador está dando sus primeros pasos, no existen compañías que usen los recursos naturales o subproductos industriales eficientemente para valorizarlos económicamente. En este contexto, cabe resaltar la importancia de aislar e identificar microorganismos autóctonos, establecer consorcios y determinar su cinética, para proyectar una producción nacional de inóculos bacterianos con altos estándares de calidad que garanticen la adaptación a sustratos también nativos y, a su vez, incrementen el rendimiento según la actividad destinada (Sánchez, 2018).

Por lo mencionado, el presente proyecto plantea emplear el lactosuero como medio de cultivo en el proceso de producción de bacterias ácido lácticas (BAL), a fin de proponer un medio económico que reduzca los costos de escalamiento industrial y así ofrecer un producto fácilmente disponible para su aplicación en varios campos de producción industrial. Además, se generará una fuente alternativa de ingreso económico a las pequeñas y medianas procesadoras lácteas por la venta del lactosuero, contribuyendo también a la reducción del impacto ambiental que genera este subproducto (Rama *et al.*, 2019).

## **Objetivos de la Investigación**

### ***Objetivo General***

Evaluar el lactosuero como medio de cultivo para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de leche bovina cruda proveniente de haciendas ganaderas de Pasochoa, Pichincha- Ecuador.

### ***Objetivos Específicos***

- Aislar e identificar bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de muestras de leche cruda mediante cultivos en medio selectivo diferencial Man, Rogosa y Sharpe (MRS), tinción Gram y pruebas bioquímicas.
- Seleccionar dos cepas BAL para inocularlas en medios de cultivo de lactosuero puro, lactosuero suplementado con sales y medio líquido MRS.
- Determinar los parámetros de la cinética de crecimiento de los microorganismos ácido lácticos en condiciones establecidas de temperatura y pH.
- Comparar la producción de biomasa de BAL obtenida en los medios de cultivo, mediante recuento bacteriano en agar MRS.

## Capítulo 2

### Marco Teórico

#### **Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, con morfología de cocos o bacilos, con longitud variable y un grosor entre 0.5 y 0.8  $\mu\text{m}$ , catalasa negativa, oxidasas negativa, microaerófilicos, no esporulantes, que producen ácido láctico como principal producto final durante la fermentación de carbohidratos (Axelsson, 2004; Motta & Gomes, 2015; Parra, 2010).

Según lo citan Rama et al. (2019), los principales géneros de las BAL son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*. Se han descrito taxonómicamente alrededor de 20 géneros de BAL basándose en relaciones filogenéticas; Axelsson (2004) describe que los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* se destacan por su importancia práctica en la industria tecnológica de alimentos.

La clasificación de los diferentes géneros de BAL se basa principalmente en su morfología celular, constitución de la pared celular, el modo de fermentación de los azúcares, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad para desarrollarse en altas concentraciones de sal y tolerancia a medios ácidos o alcalinos (Axelsson, 2004).

#### **Crecimiento a Diferentes Temperaturas**

Según las temperaturas óptimas de crecimiento se distinguen dos grupos de BAL, el primero clasificado como microorganismos mesofílicos, si crecen en ambientes con rangos de temperatura de 20 a 25 °C (Ejemplo: *Lactobacillus casei*) y el segundo, microorganismos termofílicos que crecen entre 40 y 44 °C (Ejemplo: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) (Panesso et al., 2015; Parra, 2010).

### **Metabolismo de Azúcares**

En referencia al tipo de productos metabólicos producidos tras la fermentación de azúcares se ha clasificado a las BAL como organismos homofermentativos cuando el 85 % del producto de fermentación es el ácido láctico producido en el proceso de glucólisis (vía metabólica Embden-Meyerhof-Parnas). Por otro lado, las BAL que forman ácido láctico y también compuestos como acetato, etanol y dióxido de carbono siguen la vía metabólica 6-fosfogluconato / fosfocetolasa (6-PG/PK) y se las denomina heterofermentativas (Axelsson, 2004; Rama et al., 2019).

Las BAL homofermentativas son empleadas comúnmente como cultivos iniciadores en la acidificación de productos alimenticios (Rama *et al.*, 2019). Por otro lado, las BAL heterofermentativas no son cultivos iniciadores, en su lugar, son empleados para brindar mayor calidad sensorial a los productos alimenticios como sabor, textura, valor nutricional y vida útil, debido a la producción de sustancias derivadas de las actividades glucolíticas, proteolíticas y lipolíticas de estos microorganismos (Motta & Gomes, 2015; Rama *et al.*, 2019).

Como lo menciona Axelsson (2004), las condiciones en las que se desarrollen las BAL pueden influir significativamente en el tipo e incluso en la cantidad de los productos finales formados tras la fermentación, ya que tales procesos pueden afectarse por un metabolismo alterado del piruvato y/o el empleo de oxígeno como aceptor de electrones en los procesos de respiración o no respiración de estas bacterias.

### **Requerimientos Nutricionales**

Además de la importancia a nivel industrial las bacterias ácido lácticas son también conocidas porque exigen medios de cultivo ricos y complejos para su desarrollo (Axelsson, 2004; Hayek et al., 2019).

Como lo mencionan Axelsson & Von Wright (2012) y Hébert et al. (2004), usualmente los medios de cultivos para BAL contienen carbohidratos como dextrosa, sacarosa, maltosa o

lactosa; fuentes de nitrógeno como peptona, extracto de levadura o extracto de carne; minerales, principalmente  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ; y agentes tampón.

Los carbohidratos son las principales fuentes de carbono y energía para el crecimiento de las bacterias, aunque el carbono también puede ser obtenido de las fuentes de nitrógeno (Axelsson, 2004). Las fuentes de nitrógeno proveen de aminoácidos, péptidos, minerales y vitaminas (Hébert et al., 2004; Soydemir, 2008). Sales minerales como el sulfato de manganeso ( $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ ) y el sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) son típicamente agregadas a los medios de BAL en cantidades traza. El  $Mn^{2+}$  en general es esencial para el crecimiento y los procesos metabólicos de la mayoría de los microorganismos; también ha sido señalado como elemento determinante en el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis*. El  $Mn^{2+}$  actúa contra los radicales de oxígeno endógeno, siendo el responsable de la captación catalítica de  $O_2$  necesaria para el crecimiento anaeróbico (Axelsson, 2004; Hayek et al., 2019).

Debido a la producción de ácidos durante el crecimiento de las BAL, es necesario que los medios de cultivo contengan agentes tampón para mantener el pH en niveles óptimos. Ejemplo de tampones de uso común son el citrato trisódico ( $Na_3C_6H_5O_7$ ), el acetato de sodio ( $CH_3COONa$ ), fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ ), citrato de amonio ( $NH_4C_6H_5O_7$ ), fosfato trisódico ( $Na_3PO_4$ ), bifosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ), fosfato de magnesio tribásico  $Mg_3(PO_4)_2$ , carbonato de calcio ( $CaCO_3$ ) y fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) (Hayek et al., 2019).

### **Medios de Cultivo para BAL**

La caracterización y aislamiento de BAL a nivel de laboratorio se realiza en medio sintético (MRS), para el crecimiento de los lactobacilos (De Man *et al.*, 1960), y medio M17 para el crecimiento de estreptococos (Terzaghi & Sandine, 1975). En las Tablas 2 y 3, se detallan los componentes originales de la formulación del caldo MRS y caldo M17.

**Tabla 1***Composición química de caldo MRS*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa (glucosa)	20
Acetato de sodio (CH <sub>3</sub> COONa)	5
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2
Citrato de Amonio (NH <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	2
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.2
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	0.05
pH a 25 °C	6.2-6.6

*Nota:* (De Man et al., 1960)**Tabla 2***Composición química de caldo M17*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Peptona triptona	5
Polipeptona	5
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	2.5
Ácido ascórbico	0.5
Sulfato de magnesio	1
Glicerol fosfato de di-sodio	19
Lactosa	5
pH a 25 °C	7.15 ±0.05

*Nota:* (Terzaghi & Sandine, 1975).***Importancia Tecnológica de las BAL***

La importancia tecnológica de las BAL radica en la variedad de aplicaciones de estos microorganismos, ya que algunas pueden ser probióticos potenciales o simplemente cultivos de fermentación para ser usados en la industria alimenticia (Mulaw et al., 2019).

**Probióticos.** La FAO/OMS (2001), han definido a los probiótico como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud”. En este sentido, las BAL otorgan un carácter probiótico funcional al ser añadidas en alimentos, como lo reportan varios estudios donde se ha determinado la capacidad de estas bacterias para mejorar el sistema inmunológico en la prevención del cáncer (Riaz Rajoka *et al.*, 2017) y en enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal (Greifová *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

**Cultivos Iniciadores y No Iniciadores.** En la industria de alimentos, las BAL son empleadas como cultivos iniciadores o no iniciadores, según sea su propósito. En el primer caso promueven la rápida acidificación del medio inoculado, mientras que las segundas sintetizan compuestos aromáticos que otorgan a los alimentos características como sabor, textura, valor nutricional y vida útil (Rama *et al.*, 2019). Las BAL tienen la capacidad de adaptarse a diferentes entornos, ello explica su amplio uso en la fermentación de diversos productos alimenticios, especialmente en productos lácteos (Hayek *et al.*, 2019).

Además, los consorcios de BAL también han sido empleados como inoculantes para procesos de bioaumentación en el ensilaje y como alternativa para la producción de ácidos orgánicos que ayudan a disminuir rápidamente el pH del sustrato para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y levaduras. El suministro de este ensilaje inoculado como fuente de alimento en épocas de escasez de pasto mejora la productividad general de los animales entre un 3 y 5 % según lo reportan Bedón & Quintana (2018).

**Producción de Exopolisacáridos.** Las BAL pueden producir varios tipos de polisacáridos que luego se clasifican según su ubicación en la célula (Degeest et al., 2001). Los exopolisacáridos bacterianos (EPS) son polisacáridos de cadena larga que consisten en unidades repetidas ramificadas de derivados de azúcar que son principalmente glucosa (D-glucosa), galactosa (D-galactosa), ramnosa (L-ramnosa), manosa, N-acetilglucosamina, D-ácido glucurónico en diferentes proporciones (Vanningelgem *et al.*, 2004). Las EPS bacterianas se pueden clasificar en dos grupos en función de su composición; homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS). Básicamente los HoPS pueden definirse como polímeros compuestos de un tipo de monosacáridos, mientras que los HePS son los polímeros de unidades repetitivas que se componen de dos o más tipos de monosacáridos. El EPS es económicamente importante porque puede impartir efectos funcionales en los alimentos y puede conferir efectos beneficiosos para la salud. Por ejemplo las BAL que producen EPS juegan un papel importante en la industria láctea, puesto que mejoran características como viscosidad y la textura de los productos fermentados (Aslim et al., 2005; Welman & Maddox, 2003).

Existen muchos factores que afectan el rendimiento de EPS de las bacterias ácido lácticas, como el medio de cultivo, temperatura de incubación, pH, tensión de oxígeno, velocidad de agitación y tiempo de incubación (De Vuyst *et al.*, 2003).

### **Bacterias Ácido Lácticas Nativas de Leche Cruda de Vaca**

La leche cruda de vaca es la secreción normal de las glándulas mamarias, obtenida a partir del ordeño íntegro e higiénico de vacas sanas, sin adición ni sustracción alguna, exento de calostro y libre de materias extrañas a su naturaleza, destinada al consumo humano en su forma natural o a la elaboración de subproductos (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario del Ecuador [AGROCALIDAD], 2020). Esta denominación se aplica para la leche que no ha sufrido tratamiento térmico, salvo el de enfriamiento para su conservación, ni ha

tenido modificación alguna en su composición natural (Centro de la Industria Láctea del Ecuador, 2018).

La leche cruda contiene una amplia gama de microbiota nativa, constituida por bacterias, levaduras y mohos (Asfour et al., 2016; Gemelas et al., 2013; Karakas-Sen & Karakas, 2018; Tulini et al., 2016). Gemelas et al. (2013) menciona que según su efecto sobre la calidad de la leche se agruparía a la microbiota en tres categorías: microbiota positiva, microbiota negativa y microbiota neutral. La microbiota considerada como positiva es aquella con propiedades tecnológicas, en la cual destacan las bacterias ácido lácticas (BAL) con los géneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacilli* y *Pediococcus*; también bacterias como *Micrococcus*, *Staphylococcus* no patógeno, levaduras y mohos de la superficie de queso, se incluyen en esta categoría. La microbiota negativa es descrita como bacterias dañinas, usualmente los géneros *Pseudomonas* y *Escherichia* que malogran la calidad de la leche. Y bacterias neutrales que no tienen acción sobre la leche como varias *Archaeobacteria*.

Tradicionalmente se consideró que la leche sintetizada en células sanas de la ubre era estéril (Tolle, 1980). Actuales estudios metagenómicos indican que las secreciones mamarias (calostro y leche) de cuartos clínicamente sanos alojan marcadores genómicos de diversos grupos bacterianos que no están asociados a infecciones como la mastitis (Addis et al., 2016). Con ello se da lugar al concepto de “microbiota mamaria comensal” la cual co-existe en un ecosistema formado por nichos microbianos del ápice del pezón, del canal del pezón y de las secreciones mamarias (Derakhshani et al., 2018). La invasión y colonización de la ubre por parte de estos microorganismos provienen de diversas fuentes extramamarias como aire, alimento, suelo, heces, pasto y equipo de ordeño (Khaton et al., 2014). Con ello se concluye que la diversidad microbiana de la leche proviene principalmente: de la ubre, del exterior de la ubre, manejo de la leche y el equipo de almacenamiento (Quigley et al., 2013).

De la microbiota descrita, sólo las BAL tienen la capacidad de producir ácido láctico a partir de azúcares de la leche, constituyéndose como la microbiota predominante en este medio (Asfour et al., 2016). Ogier et al. (2002) menciona que dichas bacterias son responsables de la mayor parte de transformaciones fisicoquímicas y aromáticas en los procesos de lácteos fermentados; por ejemplo, en procesos de elaboración de quesos artesanales con leche cruda participan específicamente en etapas de acidificación y maduración alcanzando concentraciones equiparables a la de bacterias iniciadoras comerciales en tales fases (7-8 Log<sub>10</sub> (UFC)/g).

Varios autores (Alvarado et al., 2007; Chowdhury et al., 2012; Gemelas et al., 2013; Khaton et al., 2014; Kumar & Kumar, 2014; C. Ramírez & Vélez, 2016) han centrado su interés en el aislamiento de BAL nativas de leche, con el fin de seleccionar cepas con potencial tecnológico que puedan ser utilizadas como fuente de probióticos o cultivos iniciadores. Tulini et al. (2016) a partir de 156 muestras de leche y queso de vaca, búfalo y cabra, obtuvieron 815 aislamientos en agares selectivos para BAL, encontrando cepas de *Streptococcus uberis* (cepas FT86, FT126 y FT190), *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* FT723, *Leuconostoc citreum* FT671. Karakas-Sen & Karakas (2018), en su estudio de muestras de leche cruda de vaca encontraron un total de 90 aislamientos de BAL, correspondientes a *Lactobacillus* (37.78 %), *Lactococcus* (36.67 %), *Enterococcus* (20.00 %), *Streptococcus* (4.44 %) y *Leuconostoc* (1.11 %); tras aplicar un sistema de identificación API 50 CH, los autores identificaron cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ssp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* y *Lactobacillus rhamnosus*.

### **Industria Láctea en Ecuador**

Según el Centro de la Industria Láctea del Ecuador, para el año 2018 en el país se producía un aproximado de 5.022.056 litros de leche por día. De este total, un 53 % de litros son

destinados para la industria formal, la cual genera productos lácteos, como: leche en funda (19 %), quesos (37 %), leche en cartón (16 %), yogurt (15 %), leche en polvo (9 %) y otros (3 %) (Centro de la Industria Láctea del Ecuador, 2018).

La región sierra es el sector de mayor producción de leche en el Ecuador, colectando cerca del 75 % del volumen; secundado por la región costa con un 18 % y el resto de regiones con el 7 % (Rocha, 2017). De ello, el 37 % de la leche es empleada para la fabricación de quesos, especialmente elaboración de queso fresco, con procesos que generan anualmente un aproximado de 1.20 millones de litros de suero de leche (Granda, 2018).

### **Lactosuero o Suero de Leche**

El suero de leche o lactosuero es el líquido separado en la coagulación de la caseína durante la obtención del queso. Con una apariencia verde-amarillenta, contiene un alto contenido nutricional, a pesar de ello, solo un bajo porcentaje de este subproducto es empleado formalmente en la industria o como alimento para animales de granja, mientras que el resto es desechado al ambiente (Ryan & Walsh, 2016).

Dentro de la cadena láctea, hay varios procesos generadores de lactosuero, por ejemplo la centrifugación para concentrar las proteínas en yogurt griego, aunque la elaboración de queso es la actividad que genera el mayor porcentaje de este subproducto (Chanfrau *et al.*, 2017).

Dependiendo de la técnica de coagulación o eliminación de caseína de la leche se ha identificado que se pueden obtener dos tipos: lactosuero dulce o lactosuero ácido (Rama *et al.*, 2019).

### **Lactosuero Dulce**

El lactosuero dulce tiene un pH aproximado de 5.6 y resulta de la coagulación de la caseína mediante la adición de cuajo (una mezcla enzimática que contiene la proteasa quimosina) a la leche. Este tipo de lacto suero dulce es típico obtenerlo en la elaboración de la mayoría de los quesos, ya que cuando el cuajo coagula la proteína caseína de la leche a pH 6.5

se forma la cuajada. Luego, la cuajada es filtrada y el líquido restante es el denominado lactosuero dulce (Rama *et al.*, 2019).

### **Lactosuero Ácido**

El lactosuero ácido tiene un pH aproximado de 4.5, es obtenido tras la actividad de BAL o la adición de ácidos orgánicos (ácido láctico) o ácidos minerales (ácido clorhídrico o sulfúrico) (Ryan & Walsh, 2016).

### **Composición Nutricional del Lactosuero**

El lactosuero representa cerca del 85 al 90 % del volumen de la leche, y conserva disueltos en él aproximadamente un 55 % de sus nutrientes solubles (Kotoupas *et al.*, 2007). En la Tabla 3 se muestra la composición nutricional del lactosuero.

**Tabla 3**

*Composición típica del lactosuero dulce y ácido*

<b>Componentes</b>	<b>Lactosuero dulce (g/L)</b>	<b>Lactosuero ácido (g/L)</b>
Sólidos totales	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-88
Calcio	0.4-0.6	1.2-1.6
Fosfatos	1-3	2-4.5
Lactato	2	6.4
Cloruro	1.1	1.1

*Nota:* Panesar *et al.* (2007)

### **Problemas Ambientales del Desecho de Lactosuero**

Cuando el suero es desechado al ambiente genera un impacto ambiental considerable en suelos y en ríos debido a las altas cargas de materia orgánica que contiene, alcanzando una demanda biológica de oxígeno (DBO) entre 30-50 g/L y una demanda química de oxígeno (DQO) de 60-80 g/L (Sansone *et al.*, 2009).

La lactosa es el principal componente causante de los altos valores de DBO y DQO, a causa de promover la reproducción de microorganismos y la producción de ácido láctico, alterando así significativamente los procesos biológicos de los ecosistemas (Ryan & Walsh, 2016).

### **Crecimiento Bacteriano Tipo Batch o Por Lotes**

El crecimiento bacteriano tipo batch hace referencia a un cultivo de células en un recipiente que contiene un sustrato con carga inicial y no se ve alterado por la adición o eliminación adicional de nutrientes. Es una forma de cultivo simple utilizada tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial (Shuler & Kargi, 2002).

El cultivo tipo batch permite determinar los modelos cinéticos de los microorganismos analizando la generación de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de compuestos secundarios como etanol, ácido láctico etc. Se obtiene datos como la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), sin embargo, no es posible determinar los parámetros del rendimiento real del proceso debido a que experimentalmente son difíciles de obtener porque no se consideran todas las rutas metabólicas de los microorganismos en estudio (Doran, 1995).

### ***Cinética de Crecimiento en Cultivo Tipo Batch***

Shuler & Kargi (2002) describen que el crecimiento celular inicia tras inocular un microorganismo en un medio líquido con nutrientes necesarios para su desarrollo. Como lo menciona, el microorganismo consume los nutrientes del medio para convertirlos en biomasa hasta que las fuentes de nutrientes se agoten o haya acumulación de productos de inhibición, dando fin al crecimiento celular. Además, indica que las fases de crecimiento de un cultivo tipo batch, son:

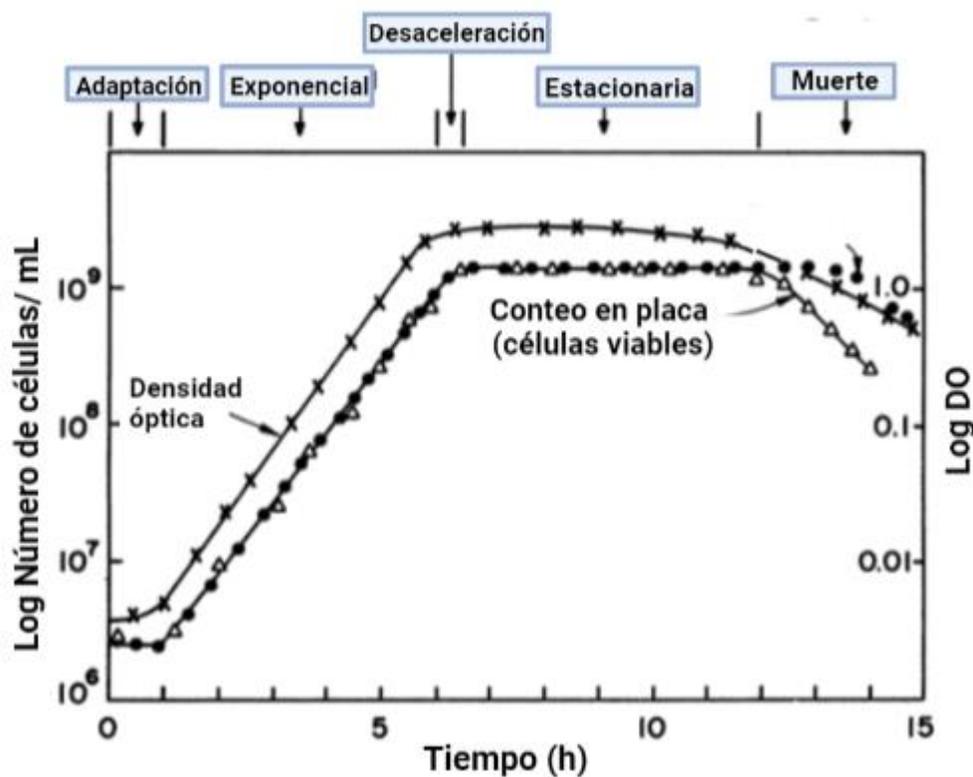
1. Fase de latencia o adaptación (lag), inicia cuando el medio es inoculado con el microorganismo. Es el período donde las células adaptan su maquinaria interna a las nuevas condiciones ambientales.

2. Fase logarítmica o de crecimiento exponencial, también conocida como fase de crecimiento logarítmico. Tras la adaptación de las células al nuevo entorno inicia este período de multiplicación donde la masa celular aumenta exponencialmente con el tiempo. En esta etapa todos los componentes celulares crecen a la misma velocidad manteniendo un crecimiento equilibrado.
3. Fase de desaceleración, es aquella donde el crecimiento desacelera debido al agotamiento de uno o más nutrientes esenciales o por la acumulación de subproductos tóxicos del crecimiento. El rápido cambio del ambiente genera un crecimiento desequilibrado donde la composición y el tamaño de las células cambia para adaptarse al entorno hostil.
4. Fase estacionaria, se evidencia cuando la tasa de crecimiento es cero (no hay división celular) o cuando la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte. A pesar de esto, las células se mantienen metabólicamente activas y generan metabolitos secundarios.
5. Fase de muerte celular, inicia al final de la fase estacionaria motivo del agotamiento de los nutrientes o de la acumulación de productos tóxicos.

En la Figura 1 se observa una curva típica del crecimiento de microorganismos por cultivo tipo batch o lotes, que incluye las fases de crecimiento celular.

Figura 1

Curva con las fases de crecimiento microbiano



Nota. Adaptado de *Curva de crecimiento típico de una población bacteriana* (p. 161), por Shuler & Kargi, 2002, Prentice Hall PTR.

### Modelos Matemáticos para la Descripción del Crecimiento de Microorganismo

Dentro de la microbiología predictiva encontramos los modelos matemáticos. Los cuales son usados para estimar el crecimiento de microorganismos utilizando la correlación de datos experimentales (Huang, 2013). Con los modelos matemáticos podemos obtener una predicción cuantitativa del proceso, reducir costos en el diseño experimental, considerar variables que afectan el proceso y utilizar los resultados obtenidos para escalar los procesos (Calderón, 2017; Huang, 2013).

Para describir el crecimiento microbiano, en los modelos matemáticos, se utilizan variables macroscópicas como temperatura, pH o densidad celular (Baranyi & Roberts, 1994). Entre los modelos más usados se encuentran modelos empíricos como el de Gompertz modificado, modelo de Barany (Baranyi & Roberts, 1994) y modelos Logísticos (Gibson et al., 1988a; Huang, 2013).

Existen tres tipos de modelos, primario, secundario y terciario. Cada uno varía dependiendo de su complejidad (Huang, 2013). 1) El modelo primario es el más básico, ya que utiliza condiciones constantes para calcular el cambio del número de células microbianas. Un ejemplo de modelo primario son los modelos de Gompertz modificado y el Logístico, los cuales fueron desarrollados para describir curvas de crecimiento en condiciones isotérmicas (G. Ramírez, 2011; Velugoti et al., 2011). 2) El modelo secundario caracteriza los parámetros que aparecen en los enfoques del modelado primario en función de las condiciones ambientales como la temperatura, el pH, la actividad del agua, etc., (Geeraerd et al., 2004). Los modelos secundarios más utilizados son los de tipo "Raíz cuadrada" denominados Ratkowsky y Bêlerádek (Tillotson, 2004). 3) A nivel industrial el modelo de tipo terciario es el más empleado, en dichos modelos se integran uno o más modelos primarios o secundarios (G. Ramírez, 2011); incluso se utilizan bases de datos como la desarrollada por el Instituto de Investigación en Alimentos de Reino Unido y el Centro de Seguridad Alimentaria de Australia, denominada ComBase (<http://www.combase.cc>) (Tillotson, 2004).

### ***Modelo de Gompertz Modificado***

Las funciones sigmoideas han sido las más utilizadas para ajustar los datos de crecimiento microbiano por su similitud a las curvas de crecimiento bacteriano, ya que constan de cuatro fases (Tillotson, 2004). Por ello, en la presente investigación se analizaron los resultados del crecimiento bacteriano con el modelo de Gompertz modificado (Ecuación 1) introducido por Gibson (Gibson et al., 1988b). Tal modelo ha sido utilizado para ajustar una

amplia variedad de curvas de crecimiento de diferentes microorganismos, incluyendo *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus curvatus* (Tillotson, 2004).

Como lo cita Valbuena et al. (2008), la ecuación modificada de Gompertz en su forma sigmoideal representa un modelo de regresión no lineal de cuatro parámetros, dado por la Ecuación (1).

$$\text{Log}_{10}(N) = A + D * \exp(-\exp(-B * (t - M))) \quad (1)$$

Donde:

Log<sub>10</sub>(N): logaritmo en base 10 de las UFC/mL al tiempo t (Log<sub>10</sub> UFC/mL).

t: tiempo transcurrido (variable dependiente del modelo).

A: logaritmo en base 10 de la concentración inicial de microorganismos (Log<sub>10</sub> UFC/mL).

D: logaritmo en base 10 de la diferencia entre concentración inicial de los microorganismos y la concentración final de los mismos en fase estacionaria (número de ciclos de crecimiento) (Log<sub>10</sub> UFC/mL).

B: Describe la velocidad de crecimiento máxima relativa al tiempo M (es la pendiente de la curva) (Log<sub>10</sub> UFC/mL/h).

M: Es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h).

Tras el ajuste y determinación de los parámetros mencionados es posible calcular la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) en términos de Log<sub>10</sub> UFC/mL/h (Ecuación 2), la fase de latencia o adaptación ( $\lambda$ ) en horas (Ecuación 3) y el tiempo de generación ( $T_g$ ) en horas (Ecuación 4).

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{B \cdot D}{e} \quad (2)$$

$$\lambda = M - \frac{1}{B} \quad (3)$$

$$T_g = \text{Log}_2 \left( \frac{e}{B \cdot D} \right) \quad (4)$$

## Capítulo 3

### Metodología

#### Recolección de Leche Cruda de Vaca

El muestreo de leche cruda se realizó durante el proceso de ordeño manual en tres haciendas ganaderas de Paschocha, Pichincha, Ecuador (coordenadas 0°24'07.7" Sur, 78°31'13.1" Oeste). La toma de muestras fue manejada bajo el protocolo establecido por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario del Ecuador (AGROCALIDAD, 2020) en su Instructivo INT/CL/010 "Toma de muestras de leche cruda y suero de leche".

Se recolectó un total de 9 muestras (tres de cada hacienda) con un volumen aproximado de 100 mL de leche cruda, cada una por duplicado, y se las conservó a temperatura ambiente por un lapso de 2 h hasta su procesamiento en los laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, localizada en Sangolquí, cantón Rumiñahui, Pichincha, Ecuador (coordenadas 0°18'51.8" Sur, 78°26'42.1" Oeste).

El primer duplicado de muestra se empleó para el aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas, mientras que el segundo se utilizó en la caracterización de los requisitos organolépticos y fisicoquímicos de la leche.

#### Caracterización de las Muestras de Leche Cruda de Vaca

Para todas las muestras de leche se evaluó los requisitos organolépticos (color, olor y aspecto) y varios requisitos fisicoquímicos (pH, densidad relativa a 20 °C, sólidos totales, ensayo de reductasa, reacción de estabilidad proteica) que exige la normativa INEN 9:2008. "Leche cruda. Requisitos" (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2008). A continuación, se describen los métodos de ensayo ejecutados para cada parámetro conforme a la Norma Técnica Ecuatoriana NTE y la Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

### **Requisitos Organolépticos de Leche Cruda de Vaca**

Se evaluaron características sensoriales de la leche como color, olor y aspecto basándose en los parámetros citados en INEN (2008).

### **Requisitos Físico Químicos de Leche Cruda de Vaca**

**pH.** Se empleó el método AOAC 973.41 (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1973). De cada muestra se tomó el volumen de 20 mL de leche cruda en un vaso de precipitados, y se insertó el electrodo del potenciómetro marca Mettler Toledo modelo Seven Easy S20 para determinar los diferentes valores del potencial de hidrógeno.

**Densidad Relativa.** Se empleó el método del picnómetro que describe la NTE INEN 11. Leche. Determinación de la densidad relativa (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 1983). Un picnómetro de capacidad de 50 mL, limpio, seco y vacío se pesó al mg. Luego se lo llenó con agua destilada evitando la formación de burbujas de aire, se tapó y se sumergió a baño de agua a 20 °C durante 30 min. Cuidadosamente se lo extrajo del baño de agua, se secó y dejó reposar 30 min a temperatura ambiente para finalmente pesarlo al mg.

Secando cuidadosamente el mismo picnómetro se lo llenó con la muestra de leche a evaluar, y tras colocar la tapa se introdujo nuevamente en baño de agua a 20 °C por 30 min. Al extraerlo, se dejó reposar 30 min y se pesó al mg. Con la Ecuación (5) se calculó la densidad relativa a 20/20 °C de las muestras de leche.

$$d_{20} = \frac{m_3 - m_2}{m_1 - m_2} \quad (5)$$

Donde:

$d_{20}$  : Densidad relativa 20/20 °C

$m_1$  : masa del picnómetro con agua, en g

$m_2$  : masa del picnómetro vacío, en g

$m_3$  : masa del picnómetro con la muestra de leche, en g.

**Sólidos Totales.** La determinación de sólidos totales se realizó por triplicado para cada muestra. Se empleó cápsulas de porcelana con capacidad de 30 mL, las cuales se colocaron vacías a secar en un horno Muffla (MF-05- HYSC) a 103 °C durante 4 h. Posteriormente, se dejaron durante 30 min en el desecador y se pesaron individualmente en una balanza analítica.

En cada cápsula se agregó 5 g de leche y se llevó a ebullición en una estufa a 100 °C hasta su evaporación. Finalmente, las cápsulas se colocaron en el horno Muffla a 103 °C durante 5 h, reposaron 30 min en el desecador y fueron pesadas (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 1982).

**Tiempo de Reducción del Azul de Metileno (TRAM).** Para determinar de forma indirecta el grado de crecimiento bacteriano en la leche cruda se aplicó el ensayo de Reductasa según la NTE INEN 18. Leche. Ensayo de reductasas (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 1973).

Se colocó 10 mL de leche cruda en un tubo de ensayo (cada muestra por duplicado) y se agregó 1 mL de azul de metileno de concentración 0.001 g/mL, sin agitar se cerró el tubo y fue colocado en baño maría a 37 °C durante 5 min. Inmediatamente, se taparon los tubos y se homogeneizó el contenido para incubar a 37 °C en baño maría protegiendo las muestras de exposición a la luz. Cada 30 min se homogeneizó la muestra para determinar el intervalo de tiempo desde el inicio de incubación hasta que el azul de metileno se decolorara totalmente.

**Reacción de Estabilidad Proteica.** Se aplicó el método de prueba de la leche con alcohol mencionada en la NTE INEN 1500. “Leche. Métodos de ensayos cualitativos para la determinación de calidad” (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2011a).

En tubos de ensayo se colocó independientemente 5 mL de cada muestra de leche (por duplicado) y se agregó una alícuota de 5 mL de etanol al 75 % v/v. Tapando el tubo se invirtió dos o tres veces para homogeneizar el contenido y se observó si existía o no la formación de coágulos de leche para declarar la prueba como positiva o negativa, respectivamente.

### **Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas Nativas de Leche Cruda de Vaca**

En condiciones de asepsia se sumergió un hisopo estéril en la muestra de leche sin diluir y se realizó un cultivo primario en la superficie de medio agar MRS (Lactobacilli MRS agar, Acumedia-Neogen) en caja Petri. Con mondadientes estériles se procedió con el método de siembra en superficie por estrías. Los cultivos se incubaron por 72 h a temperatura ambiente entre 21-25 °C (Tulini et al., 2016).

### **Caracterización de Aislados Bacterianos de Leche Cruda de Vaca**

Las colonias aisladas de las diferentes muestras de leche cruda de vaca se seleccionaron por sus características macroscópicas (color, forma, borde, elevación y textura). Cada una fue repicada en cajas Petri con agar MRS e incubadas a temperatura ambiente para ser empleadas en pruebas posteriores: identificación microscópica (reacción a tinción de Gram, forma celular) y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, carácter de fermentación, capacidad proteolítica y acidificante, capacidad lipolítica y producción de gas).

#### ***Identificación Morfológica (Macroscópica y Microscópica)***

Macroscópicamente se distinguió el color, forma, borde, elevación, textura de las colonias aisladas en cada siembra primaria. Tras 24 h del repique, se realizó una tinción Gram para determinar la forma celular (cocos, bacilos o cocos ovoides), disposición celular (solitario, cadena, racimo) y reacción positiva o negativa a la tinción.

#### ***Identificación por Pruebas Bioquímicas***

A cada cepa se realizó pruebas de catalasa y oxidasa como método de identificación de BAL, puesto que según lo mencionado en (Axelsson, 2004), este tipo de bacterias se caracterizan por presentar reacciones negativas a dichos ensayos.

### ***Prueba de Catalasa***

Sobre un portaobjetos se colocó una gota de solución de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 3 % v/v (marca LIRA), para cada aislado a analizar. Tal concentración de la solución de  $H_2O_2$  es ideal para pruebas catalasa de BAL según lo mencionado en Bou et al. (2011).

Con un mondadientes estéril se tomó una porción bacteriana desde el cepario de colonias repicadas, y fue puesta en contacto y homogenizada con la gota de  $H_2O_2$ . Tras 5-10 s, se observó si existía o no la formación de burbujas, interpretando con ello, prueba catalasa positiva o prueba catalasa negativa, respectivamente (Bou et al., 2011).

### ***Prueba de Oxidasa***

Se empleó el kit de diagnóstico de oxidasa OxiStrips™ (Hardy Diagnostics). Sobre un portaobjetos se colocó una tira de OxiStrips™ y se añadió unas gotas de agua destilada estéril para humedecer ligeramente un área de la tira. Con un mondadientes estéril se tomó una porción de la colonia a evaluar y se inoculó en el área húmeda. Transcurridos 30 s, se determinó si la prueba era positiva (presencia de color azul / púrpura) o negativa (ausencia de color) (Hardy Diagnostics, 2008).

Tras las evaluaciones microscópicas, prueba catalasa y prueba oxidasa se realizó una selección de aislados para escoger aquellas cepas bacterianas que cumplían con los requisitos de BAL (Gram positivas, catalasa negativa y oxidasa negativa) (Axelsson, 2004).

Se determinaron cuatro aislados que cumplían con los requisitos: L2, L5, L12 y L14. Los mismos fueron sometidos a pruebas de capacidad de fermentación, capacidad proteolítica y acidificante, capacidad lipolítica, capacidad de producción de gas y pruebas de compatibilidad. Todas las pruebas fueron realizadas por duplicado.

### ***Prueba de Carácter de Fermentación***

El carácter de fermentación homofermentativo y heterofermentativo se evaluó inoculando por estrías cada aislado en cajas Petri con medio sólido M5.

El medio M5 fue elaborado bajo la formulación (2.5 g/L de fructuosa, 2.5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 1 mL de Tween 80, 20 mL de solución de 0.1 g de verde de bromocresol en 30 mL de NaOH 0.01 N, 0.2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.01 de ácido pantoténico y 20 g/L de agar; no se añadió L-cisteína) que propuso Zúñiga et al. (1993). Los medios inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h para evaluar las características de las colonias bacterianas y el posible viraje de color en el medio de cultivo. Al crecer en medio M5, las colonias de BAL homofermentativas se desarrollan de color azul-verdoso y el medio sólido vira ligeramente su color de azul a verde amarillento; por otro lado, las colonias BAL heterofermentativas conservan su color blanco y el medio a su alrededor permanece de color azul (McDonald et al., 1987).

### ***Prueba de Capacidad Proteolítica y Acidificante***

La evaluación de la capacidad proteolítica y acidificante de las cepas seleccionadas se determinó al cultivarlas en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido “BBLTM Litmus Milk” (Becton Dickinson and Company, Le Pont de Claix, Francia), a temperatura ambiente por siete días.

El medio BBLTM Litmus Milk se emplea para diferenciar cualitativamente a bacterias que tras su metabolismo en la leche producen distintos compuestos en procesos de fermentación de lactosa, hidrólisis y coagulación de caseína, producción de gas, y óxido-reducción de Litmus-tornasol (Beckett, 2013). Según Beckett (2013), al emplear este medio de cultivo las pruebas resultantes son: (a) reacción ácida, presencia de ácidos de fermentación y el medio vira a color rojo-rosado; (b) reacción alcalina, no hay fermentación de azúcares y el medio torna a color azul; (c) coagulación de proteínas de la leche, hay formación de coágulo; (d) digestión de proteínas de la leche-proteólisis, se genera un aclaramiento acuoso del medio; (e) producción de gas  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$ , se evidencian burbujas en el medio o el coágulo roto; (f) sin

fermentación, el medio conserva su color azul-violáceo; (g) producción de enzima reductasa, reducción de tornasol y el medio torna a un color blanco; (h) fermentación tormentosa, el coágulo formado se rompe por abundante producción de gas.

Según lo citado por Beckett (2013) la interpretación del test de cada una de las reacciones mencionadas se declara como (A): medio de color rosa a rojo, reacción ácida por fermentación de lactosa y formación de ácidos; (ALK): medio de color azul, reacción alcalina por acción de enzimas proteolíticas sobre lactoalbúmina con producción de amoníaco o aminas básicas; (C): formación de coágulo o cuajada, por coagulación de la caseína; (D): proteólisis, digestión de la caseína de la leche que se ve evidenciada por la aclaración del medio y disolución del coágulo; (G): burbujas en el medio o coágulo roto, producción de gas; (NF): medio color azul-púrpura, no existe fermentación; (RED): medio color blanco, reducción del indicador litmus a compuesto leucolitmo descolorido por acción de enzimas reductasas; (SF): fermentación tormentosa, coágulo ácido roto por el abundante gas producido.

### ***Prueba de Capacidad Lipolítica***

Para evaluar la capacidad lipolítica de los aislados bacterianos se inoculó cada uno de estos en cajas Petri con medio Agar Nata para conservarlos a temperatura ambiente durante 48 h. Tras dicho tiempo, se observaron las cajas cultivadas a contraluz para determinar la existencia o no de un halo translúcido alrededor de la colonia, que de existir indicaba lipólisis positiva o degradación de grasa.

El medio de cultivo Agar Nata fue formulado con Agar nutriente (Acumedia-Neogen, USA) y un 1 % v/v de nata de leche según la formulación de Morais (2004).

### ***Prueba de Capacidad de Producción de Gas***

La capacidad de los aislados para producir gas fue evaluada tras inocular cada uno en un tubo de ensayo que contenía una campana de Durham y 10 mL de caldo nutriente suplementado con 5 % de lactosa (Sigma, USA) (Morais, 2004). Se conservaron los cultivos a

temperatura ambiente durante 48 h para observar si existía o no la producción de gas durante el crecimiento bacteriano (Ramírez & Vélez, 2016).

### ***Pruebas de Compatibilidad de Crecimiento entre los Aislados Seleccionados de BAL***

Con el principio de la técnica de difusión por disco se determinó la compatibilidad y antagonismo entre los aislados bacterianos, a fin de formular un cultivo mixto entre las cepas de BAL (Cavalieri et al., 2005).

Se tomó una porción de colonias de cada aislado para suspenderlas individualmente en 5 mL de agua destilada estéril y se corrigió hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland, correspondiente a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL según citan Cavalieri et al., (2005). Con un hisopo estéril, cada suspensión bacteriana de los aislados L2, L12 y L14 se inocularon como cepas indicadoras en diferentes placas de agar MRS procurando cubrir totalmente la superficie al frotar de ida y vuelta desde un borde al otro.

En el volumen restante de suspensión bacteriana se introdujeron cinco discos de papel filtro estéril con diámetro 6 mm, a fin de que las células bacterianas se impregnen a tal superficie y actúen como disco de antimicrobianos; se incubó a temperatura ambiente por 2 h.

Cada disco impregnado de la solución bacteriana fue colocado sobre la superficie húmeda del agar según las combinaciones: placa con aislado L2 en superficie (papel filtro con aislados L5, L12 y L14), placa con aislado L14 en superficie (papel filtro con aislados L2, L5 y L12) y placa con aislado L12 en superficie (papel filtro con aislados L2, L5 y L14). Tras 96 h de incubación de las placas a temperatura ambiente se determinó si existía la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los discos.

### **Selección de Cepas para Inóculo Inicial**

Al concluir la caracterización, capacidades tecnológicas (tipo de fermentación, proteólisis, acidificación, lipólisis, producción de gas) y compatibilidad de los cuatro aislados seleccionados de BAL, se formuló un cultivo mixto constituido por el aislado L2 y L14.

### **Preparación del Inóculo Inicial de BAL**

Del cepario primario se tomó una porción de colonias de los aislados L2 y L14 para suspenderlas independientemente en 5 mL de agua destilada estéril. Se corrigieron las suspensiones bacterianas hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) según Cavalieri et al. (2005). La preparación de las suspensiones bacterianas se efectuó 15 min antes de su inoculación en los medios líquidos de fermentación a fin de garantizar la viabilidad celular (Cavalieri et al., 2005).

### **Recolección de Lactosuero**

El lactosuero fue recolectado en una empresa procesadora de queso fresco artesanal de la ciudad de Quito. Para el muestreo se manejó los lineamientos de la norma NTE INEN-ISO 707, correspondiente a la toma de muestras de leche y productos lácteos (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2014). Se tomaron dos submuestras provenientes de la mesa de desuerado, destinando la primera para el análisis de parámetros fisicoquímicos del lactosuero y la segunda para su acondicionamiento como medio de cultivo de BAL. Las muestras se transportaron en un termo a 4 °C hasta los laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, donde se las mantuvo en refrigeración de 3 a 5 °C hasta los correspondientes análisis y acondicionamiento.

### **Caracterización Fisicoquímica del Lactosuero**

Para determinar si el lactosuero cumplía con las características para reutilización que exige la normativa NTE INEN 2594:2011, se caracterizó tanto el lactosuero entero recién salido de la producción de queso fresco y el suero acondicionado o desproteínizado. Los parámetros evaluados fueron porcentaje de azúcares reductores (lactosa), acidez titulable, porcentaje de cenizas, densidad relativa y pH (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 2011b).

### ***Determinación de Azúcares Reductores***

El contenido de azúcares reductores en los dos tipos de lactosuero se evaluó mediante el método de azúcares reductores DNS desarrollado por Miller (1959). La técnica determina la concentración de azúcares reductores basándose en una reacción de óxido-reducción entre este tipo de azúcares y el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El azúcar reduce al DNS produciendo una coloración desde amarilla a marrón, la cual tiende a ser más intensa conforme aumenta la concentración de azúcares reductores. La cuantificación es determinada por la lectura de absorbancias de la solución coloreada tras la reacción (Miller, 1959).

El reactivo DNS se preparó según el protocolo de Ávila Núñez et al. (2012), para ello se disolvió 0.8 g de NaOH en 10 mL de agua destilada, luego se agregó 15 g de tartrato de sodio y potasio, y finalmente, 0.5 g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico); la mezcla se aforó a 50 mL.

Para obtener una curva de calibración absorbancia vs. concentración se preparó una solución de lactosa al 0.2 % p/v (2 g/L), diluyendo 0.5 g de lactosa monohidratada (Sigma, Aldrich) en 250 mL de agua destilada, y a partir de esta se prepararon soluciones estándar a concentraciones de 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 y 1.6 g/L.

A las soluciones estándar se les aplicó el método de DNS, añadiendo 0.5 mL del estándar, 0.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo DNS. La muestra "blanco" fue preparada añadiendo 0.5 de lactosuero, 0.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo DNS. Se agitó todos los tubos en vórtex, se sometió a ebullición en baño de maría durante 5 min y se los llevó a baño frío con hielo para detener la reacción hasta llegar a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió 5 mL de agua destilada en cada muestra, se agitó y leyó en un espectrofotómetro SPECORD S 600 (Analytik Jena, Alemania) a longitud de onda de 540 nm.

Tras realizar la curva patrón se aplicó el método DNS a cada muestra de lactosuero, para ello se añadió 0.5 mL del tipo de lactosuero, igual cantidad de agua destilada y de reactivo DNS, seguido del mismo tratamiento de las muestras en la preparación de los estándares por

DNS. Concluido el método DNS se realizó diluciones de 1:10 de las muestras de lactosuero para su lectura en espectrofotómetro (Bohórquez, 2016).

### **Acidez Titulable**

La acidez de la leche y productos lácteos puede ser expresada como contenido de ácido láctico según NTE INEN 13:1984 (Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN], 1984).

Se empleó el método A.O.A.C 16.023 (Association of Official Analytical Chemists [AOAC], 1984) que se basa en titulación con NaOH 0.1N. En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se colocó aproximadamente 5 g de muestra de lactosuero, se agregaron tres gotas de fenolftaleína al 1 % y agitó vigorosamente. Se tituló con la solución de NaOH 0.1N hasta obtener un viraje de color a rosa pálido. Se expresó la acidez como porcentaje de ácido láctico según la Ecuación 6.

$$A = \frac{V \times N \times 0.090}{m_1 - m} \times 100 \quad (6)$$

Donde:

A: acidez titulable, en porcentaje en masa de ácido láctico.

V: Volumen de NaOH gastado en la titulación, en mL.

N: Normalidad de la solución de NaOH.

m: masa del matraz Erlenmeyer vacío, en g.

m<sub>1</sub>: masa del matraz Erlenmeyer con la muestra, en g.

0.090: relación 1mL de NaOH 0.1N corresponde a 0.09 g de ácido láctico.

### **Cenizas**

Las mismas cápsulas con sólidos totales resultado del proceso anterior se mantuvieron a 530 °C en el horno Mufla durante 6 h para obtener cenizas libres de carbón (INEN, 1982).

## ***pH***

El pH del lactosuero se determinó con un potenciómetro marca Mettler Toledo modelo Seven Easy S20 bajo los lineamientos del método AOAC 973.41 (AOAC, 1973).

## **Acondicionamiento del Lactosuero**

### ***Filtración y Desproteínización***

En este proceso inicialmente se empleó un colador de malla plástica para filtrar los sólidos gruesos como queso o cuajo que suelen quedar suspendidos en el lactosuero.

El lactosuero se desproteínizó mediante tratamiento térmico en autoclave a 121 °C durante 15 min. Se dejó enfriar y decantar durante 24 h a 4 °C para separar y remover las proteínas precipitadas de la fase líquida del lactosuero. Se retiraron los sólidos de mayor tamaño, y con papel filtro Whatman 40 se realizó un filtrado final para retirar los sólidos de menor tamaño de la fase líquida y obtener finalmente el suero desproteínizado, denominado en adelante como lactosuero puro (Serna-Cock & Rodríguez, 2009).

Un volumen de 200 mL de lactosuero puro se ajustó a pH 6.3 basándose en el correspondiente de la formulación original de medio líquido MRS (De Man et al., 1960). Se autoclavó a 121°C por 15 min para emplearlo como medio de cultivo de las BAL nativas aisladas.

### ***Suplementación del Lactosuero***

El lactosuero fue suplementado con 50 % p/v de la cantidad de cada sal del medio MRS considerando la formulación original de los autores De Man et al. (1960). Todos los reactivos empleados para la suplementación fueron de grado analítico y sus cantidades se indican en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Cantidad de sales suplementadas en medio MRS original y en lactosuero*

<b>Sal componente</b>	<b>Formulación original (g/L) <sup>a</sup></b>	<b>Cantidad suplementada a lactosuero (g/L)</b>
Fosfato di potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2	1
Citrato de Amonio (NH <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	2	1
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.2	0.1
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	0.05	0.025

*Nota:* <sup>a</sup> De Man *et al.*(1960).

Luego de la suplementación de sales, se ajustó el lactosuero a pH 6.3 y se autoclavó a 121 °C durante 15 min para ser utilizado como medio de cultivo de la BAL nativas aisladas.

#### **Medios de Cultivo para BAL Nativas de Leche Cruda de Vaca**

Se planteó un diseño experimental de bloques completos al azar (DBCA). Se emplearon cuatro medios de cultivo como tratamientos para evaluar la producción de biomasa de BAL nativas procedentes de leche cruda de vaca (variable de respuesta). Estos tratamientos fueron: (a) lactosuero puro, "L"; (b) lactosuero suplementado con 50 % p/v de sales MRS, "L50"; (c) Caldo MRS como control positivo, "MRS"; y (d) agua destilada estéril como control negativo, "CN". Se determinaron tres bloques (ensayos), donde cada uno de ellos correspondía a las 48 h de la toma de muestras. En cada ensayo se establecieron cinco réplicas de cada tratamiento.

El caldo MRS fue elaborado con reactivos de grado analítico y bajo la formulación de De Man *et al.* (1960) que se detalla en la Tabla 5. Todos los medios fueron ajustados a un pH de 6.3.

**Tabla 5**

*Formulación del medio de cultivo caldo MRS*

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Peptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa (glucosa)	20
Acetato de sodio (CH <sub>3</sub> COONa)	5
Tween 80	1 ml
Fosfato dipotasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2
Citrato de Amonio (NH <sub>4</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	2
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	0.2
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O)	0.05
pH a 25 °C	6.2-6.6

*Nota:* De Man *et al.* (1960).

### **Cinética de Crecimiento de BAL Aisladas**

Las pruebas cinéticas de cultivo se realizaron en frascos de vidrio esterilizados de 500 mL con 200 mL de cada medio de cultivo (lactosuero puro, lactosuero suplementado, caldo MRS y agua destilada estéril). A cada medio se añadió 1 % v/v del inóculo bacteriano inicial (2 mL en proporción 1:1 del aislado L2 y aislado L4, cada uno con concentración próxima de  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL en referencia a la escala de McFarland (Cury et al., 2014). Durante las 48 h de ensayo, los tratamientos se mantuvieron en agitación a 120 rpm sobre un agitador orbital OrbiCult™ modelo AS1-NC-19 (ESCO, Singapur) a temperatura ambiente (Cury et al., 2014; Lee, 2005; Serna-Cock & Rodríguez, 2009).

A los tiempos 0, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 44 y 48 h, bajo condiciones de esterilidad, se tomaron 2 alícuotas de cada medio de fermentación. La primera de 10 mL empleada para la determinación de biomasa bacteriana, y la segunda de 5 mL empleada para la medición de pH, pruebas de acidez titulable (contenido de ácido láctico) y determinación del consumo de azúcares reductores.

### ***Determinación de la Concentración de Biomasa***

Se determinó la concentración de biomasa por recuento de células viables empleando la técnica de recuento de colonias mediante siembra en superficie de agar MRS. El procedimiento se realizó bajo las directrices de la norma ISO 4833-2:2013 con ciertas modificaciones (Díaz et al., 2017).

Con la alícuota de 10 mL que se tomó de los caldos de fermentación se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril hasta  $10^{-7}$ . Inicialmente, los 10 mL de muestra fueron diluidos en 90 mL de agua destilada estéril (dilución  $10^{-1}$ ). Se tomó 1 mL de esta última dilución para agregarla en 9 mL de agua destilada (dilución  $10^{-2}$ ) y se procedió del mismo modo sucesivamente hasta la dilución  $10^{-7}$ .

Las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  fueron empleadas para inocular placas de agar MRS correspondientes a los muestreos de 0, 4 y 8 h. Para la siembra de los muestreos de 16 h a 48 h se emplearon las diluciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  (Cury et al., 2014). Se depositó 100  $\mu$ L de la dilución correspondiente sobre el medio y con un asa de Drigalski se extendió la muestra uniformemente por la superficie (Díaz et al., 2017). Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 72 h. Empleando los valores medios de concentración de biomasa de cada tratamiento, a cada tiempo y de las cinco réplicas, se construyeron curvas de concentración de biomasa con respecto al tiempo.

### ***Evaluación de la Variación de pH***

El pH de las muestras a diferentes intervalos de tiempo de los caldos de fermentación se determinó con un potenciómetro marca Mettler Toledo modelo Seven Easy S20 bajo los lineamientos del método AOAC 973.41 (AOAC, 1973). Empleando los valores medios de pH de cada tratamiento, a cada tiempo y de las cinco réplicas, se construyeron curvas de valores de pH con respecto al tiempo.

### ***Consumo de Azúcares Reductores***

El comportamiento del inóculo bacteriano respecto al consumo de lactosa como sustrato, fue evaluado mediante el método colorimétrico DNS de Miller (1959) ya descrito anteriormente en la metodología de caracterización fisicoquímica del lactosuero.

La segunda alícuota (5 mL) tomada de los caldos de fermentación en los diferentes intervalos de tiempo fue centrifugada a 6000 rpm durante 6 min y el sobrenadante fue empleado para la determinación de lactosa y acidez expresada como contenido de ácido láctico (Soriano-Perez et al., 2012). Empleando los valores medios de concentración de azúcares reductores de cada tratamiento, a cada tiempo y de las cinco réplicas, se construyeron curvas de concentración de sustrato con respecto al tiempo.

### ***Curvas de Acidificación***

El porcentaje de acidez de los caldos de fermentación a las diferentes horas fue determinado por titulación con NaOH 0.1 N mediante el método A.O.A.C 16.023 (AOAC, 1984) ya detallado en la metodología de caracterización de lactosuero. Empleando los valores medios de porcentaje de acidificación de cada tratamiento, a cada tiempo y de las cinco réplicas, se construyeron curvas de porcentaje de acidez respecto al tiempo.

### ***Determinación de Parámetros Cinéticos***

Con el objetivo de predecir el comportamiento de crecimiento de las BAL seleccionadas y cultivadas en medio MRS, L50 y L, en las condiciones de esta investigación, los datos obtenidos de la concentración de biomasa a los diferentes intervalos de tiempo fueron ajustados a la ecuación del modelo primario de crecimiento de Gompertz modificado (Ecuación 1) (Gibson et al., 1988a) mediante el programa OriginPro 2021. Varios autores (Castro et al., 2008; Sacho, 2015; Valbuena et al., 2008) han empleado este modelo para ajustar los parámetros de cinética de bacterias ácido lácticas y predecir el comportamiento bacteriano en las fases de crecimiento en condiciones determinadas.

## Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se empleó los datos promedio correspondientes a la biomasa neta producida en cada uno de los medios de cultivo durante las 48 h de los tres ensayos (Log10 UFC/mL). Dichos valores fueron clasificados según el tipo de medio (Tratamientos: MRS, L50 y L) y el número de ensayos realizados (bloques) como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Valores promedio de la biomasa neta de BAL producida en medio MRS, L50 y L*

BLOQUES		TRATAMIENTOS	VARIABLE RESPUESTA	
Ensayo		Medio Cultivo		
E1		MRS		
E1		L50		
E1		L		
E2		MRS	Biomasa neta (UFC/mL)	Biomasa neta (Log10 UFC/mL)
E2		L50		
E2		L		
E3		MRS		
E3		L50		
E3		L		

*Nota:* E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo 3.

Se aplicó un análisis de varianza ANOVA y posteriormente una prueba t de Dunnett con un nivel de significancia del 95 % para verificar la existencia de diferencias significativas de los medios L50 y L con respecto al control MRS. Fue necesario hacer esta prueba de comparación de medias debido a que en el análisis de supuestos mediante la Shapiro-Wilks se comprobó el supuesto de normalidad ( $p$ -valor > 0.05), pero mediante la prueba de Levene se identificó varianzas no homogéneas. Para el análisis se empleó el software estadístico SPSS.

## Capítulo 4

### Resultados

#### Caracterización Físicoquímica de Muestras de Leche Cruda de Vaca

##### **Requisitos Organolépticos**

Las características organolépticas de las muestras de leche cruda recolectadas en las haciendas ganaderas de Pasochoa, se indican en la Tabla 7. El color de las muestras varió desde blanco, blanco-grisáceo a blanco-amarillento; la muestra M3 tuvo un olor ligeramente ácido y un aspecto acuoso, mientras que las ocho restantes denotaron un olor suave y aspecto homogéneo.

Por información recolectada a los propietarios de los bovinos se conoció que en las tres haciendas los ejemplares se alimentaban en pastoreo libre con kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). A los ejemplares de las muestras M7, M8 y M9, también se les suministraba cáscaras de plátano verde (Cáscara de *Musa* spp.) como alimento.

**Tabla 7**

*Caracterización organoléptica de las muestras de leche de vaca*

Cod. M	Color	Olor	Aspecto	Alimentación usual del ejemplar bovino
M1	Blanco	Suave	Homogéneo	kikuyo ( <i>Pennisetum clandestinum</i> )
M2	Blanco	Suave	Homogéneo	
M3	Amarillento	Ligeramente ácido	Ligeramente acuosa	
M4	Blanco	Suave	Homogéneo	kikuyo ( <i>Pennisetum clandestinum</i> )
M5	Amarillento	Suave	Homogéneo	
M6	Blanco grisáceo	Suave	Homogéneo	
M7	Amarillento	Suave	Homogéneo	kikuyo ( <i>Pennisetum clandestinum</i> ) Cáscara de plátano verde (Cáscara de <i>Musa</i> spp.)
M8	Blanco	Suave	Homogéneo	
M9	Blanco	Suave	Homogéneo	

Nota: Cod. M: código de muestra.

### Requisitos Fisicoquímicos

En la Tabla 8 se indican las características fisicoquímicas de las muestras de leche. Los valores de pH obtenidos se encuentran entre 6.48 a 6.74. El valor de densidad relativa para todas las muestras tiene un valor de 1.03. El porcentaje de sólidos totales se determinaron en rangos desde 11 % a 13.9 %. En términos de calidad de la leche los tiempos del ensayo de reductasa de las muestras M1, M3, M7, M8 corresponden a una leche de calidad regular (categoría B); mientras que las muestras M2, M4, M5, M6 y M9 se catalogaron como leche de buena calidad según la NTE INEN 9:2008. La prueba del alcohol resultó negativa para todas las muestras, constatando estabilidad proteica de la leche.

**Tabla 8**

*Caracterización fisicoquímica de las muestras de leche de vaca*

Parámetro	Muestras de leche									Método de ensayo
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	
pH	6.48	6.81	6.6	6.62	6.74	6.74	6.52	6.71	6.69	AOAC 973.41
Densidad Relativa	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	NTE INEN 11
Sólidos totales, % (m/m)	12.3	11.57	11.3	11.96	13.8	12.2	14.2	13.9	12.6	NTE INEN 14
Ensayo de reductasa, (h)	3 (B)	12 (A)	4.5 (B)	12 (A)	12 (A)	12 (A)	2 (B)	4 (B)	12 (A)	NTE INEN 18
Reacción de estabilidad proteica*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NTE INEN 1500

*Nota:* Cod. M: código de muestra; \*Prueba del alcohol; -: Negativo. (A): Categoría A, calidad buena de leche. (B): Categoría B, calidad regular de leche.

### Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas Nativas de Leche Cruda de Vaca

Un total de veinte colonias bacterianas fueron aisladas a partir de las nueve muestras de leche cruda de vaca. Los aislados fueron diferenciados macroscópicamente por forma, color, borde, elevación, textura y opacidad. En la Tabla 9 se detallan las características de cada aislado bacteriano, diferenciándose colonias de color blanco brillante, blanco hueso y crema; de bordes enteros y ondulares; de formas convexas, planas y con elevación; con opacidad de naturaleza translúcida y opaca.

**Tabla 9**

*Características morfológicas de colonias bacterianas aisladas en medio MRS a partir de leche cruda de vaca*

Cod. A	Cod. M	Aspecto colonia					
		Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	Opacidad
L1	M1	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Opaca
L2	M1	Crema	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Translúcida
L3	M2	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Translúcida
L4	M2	Crema	Circular	Entero	Elevada	Plana	Translúcida
L5	M3	Blanco brillante	Circular	Ondular	Plana	Rugosa	Translúcida
L6	M3	Amarillo brillante	Circular	Entero	Plana	Lisa	Translúcida
L7	M3	Crema	Circular	Ondular	Plana	Rugosa	Translúcida
L8	M3	Incolora	Irregular	Ondular	Plana	Lisa	Translúcida
L9	M3	Blanco brillante	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Opaca
L10	M4	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Translúcida
L11	M4	Café crema	Circular	Entero	Plana	Lisa	Translúcida
L12	M4	Blanco brillante	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Opaca
L13	M5	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Translúcida
L14	M5	Amarillo crema	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Opaca
L15	M6	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Opaca
L16	M6	Blanco hueso	Circular	Entero	Plana	Lisa	Translúcida
L17	M7	Café crema	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Translúcida
L18	M7	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Opaca
L19	M8	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Translúcida
L20	M9	Blanco hueso	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Opaca

*Nota.* Características a las 72 h de incubación en temperatura ambiente; Cod A. Codificación del aislado; Cod M. Codificación de muestra de leche

### Caracterización de Colonias Bacterianas de BAL

Se realizó pruebas de identificación microscópica a todos los aislados bacterianos para determinar la forma celular, disposición celular y reacción a tinción de Gram. Se determinaron formas celulares de bacilos, cocos solitarios y cocos en cadenas, todos con pruebas positivas a tinción Gram y pruebas negativas para oxidasa. De los veinte aislados, sólo cuatro de estos tuvieron carácter negativo a la prueba de catalasa. La caracterización de cada aislado se resume en la Tabla 10.

**Tabla 10**

*Caracterización de los aislados bacterianos de leche cruda de vaca*

<b>Cod. A</b>	<b>Catalasa</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Reacción Gram</b>	<b>Morfología celular</b>	<b>Disposición celular</b>
L1	+	-	+	Bacilo	Solitario
L2*	-	-	+	Cocos	Cadena
L3	+	-	+	Bacilos	Solitario
L4	-	-	+	Cocos	Pares
L5*	-	-	+	Cocos	Cadena
L6	+	-	+	Cocos	Solitario
L7	+	-	+	Bacilos	Solitario
L8	+	-	+	Bacilos	Solitario
L9	+	-	+	Cocos	Racimo
L10	+	-	+	Cocos	Pares
L11	+	-	+	Cocos	Racimo
L12*	-	-	+	Cocos	Cadena
L13	+	-	+	Cocos	Solitario
L14*	-	-	+	Cocos	Cadena
L15	+	-	+	Bacilos	Solitario
L16	+	-	+	Cocos	Solitario
L17	+	-	+	Bacilos	Solitario
L18	+	-	+	Cocos	Solitario
L19	+	-	+	Cocos	Solitario
L20	+	-	+	Cocos	Solitario

*Nota.* Cod A, Codificación del aislado. -: Negativo; +: Positivo; \*Aislados que cumplen con características de BAL

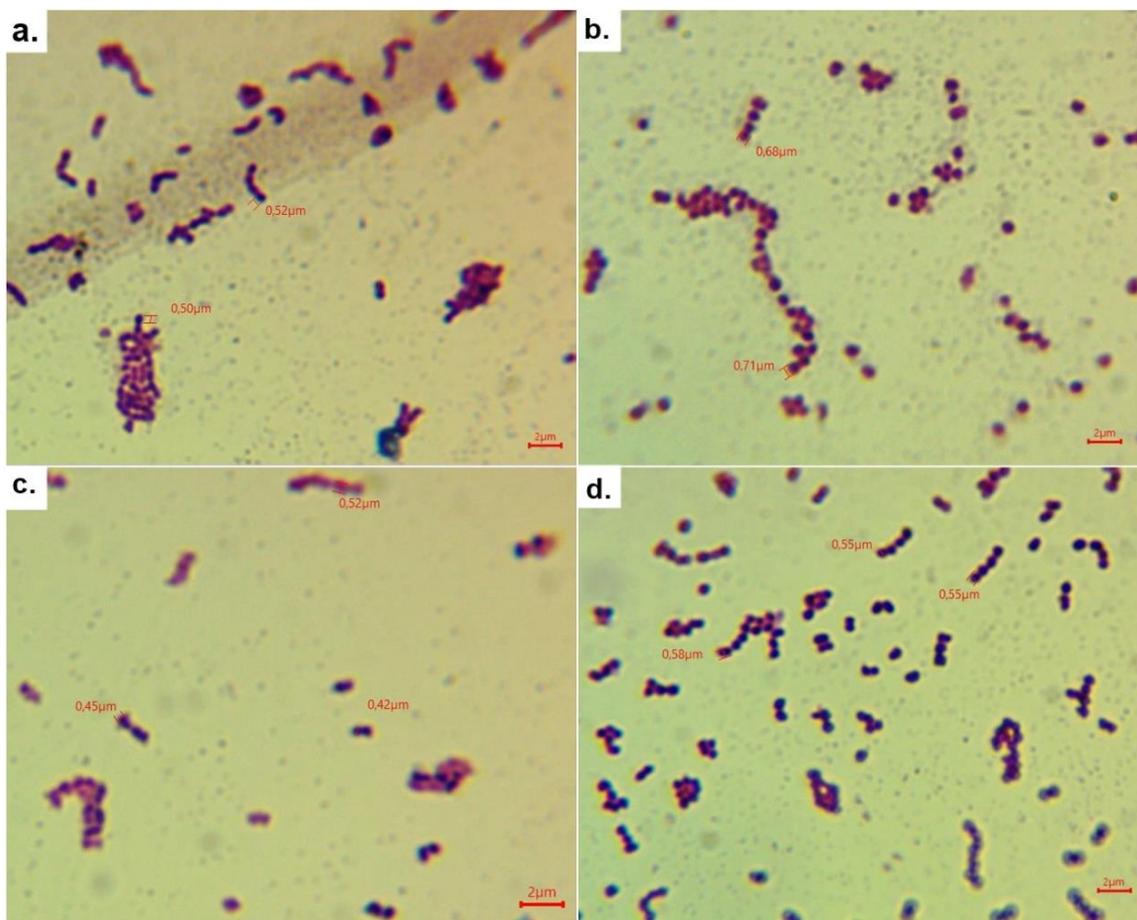
Tras evaluar los resultados de la Tabla 10, los aislados L2, L5, L12 y L14 se consideraron como BAL, ya que cumplían con los rasgos distintivos de este grupo bacteriano al ser bacterias Gram positivas, catalasa y oxidasa negativas.

En la Figura 2 se muestra la morfología de cocos en cadena y el tamaño celular de los cuatro aislados de BAL. El tamaño promedio correspondió a: 0.5  $\mu\text{m}$  para L2, 0.7  $\mu\text{m}$  para L5, 0.46  $\mu\text{m}$  para L12 y 0.55  $\mu\text{m}$  para L14.

La fotografía microscópica y la medición de las células bacterianas se realizó con un microscopio marca OMAX y el software ToupView.

## Figura 2

*Morfología microscópica de los aislados L2, L5, L12 y L14 de BAL a 100X*



*Nota.* a: L2; b: L5; c: L12; d:14

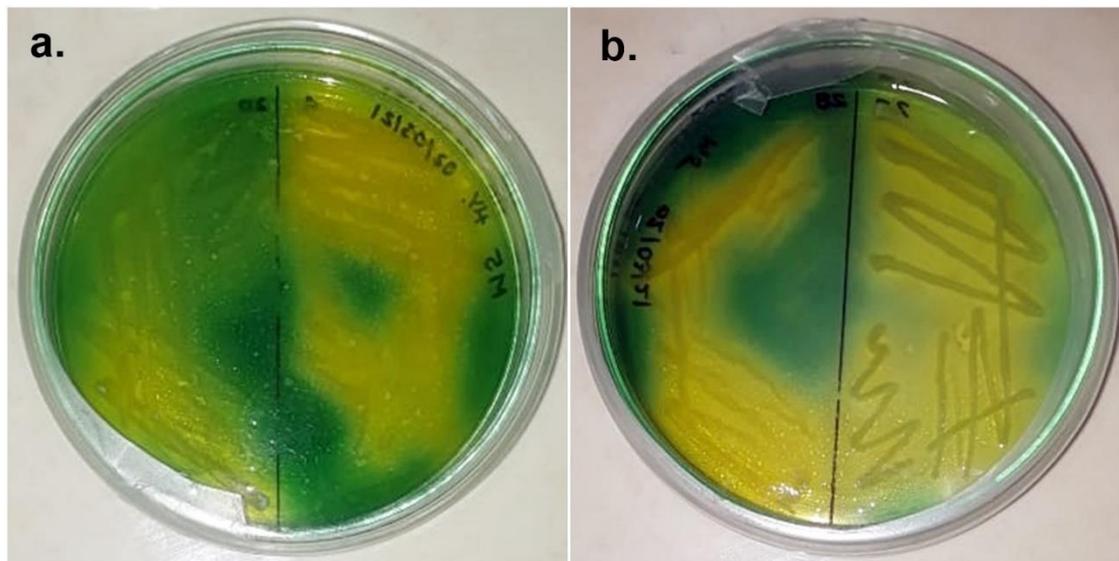
Los aislados seleccionados se sometieron a pruebas de capacidad de fermentación, capacidad proteolítica y acidificante, capacidad lipolítica, capacidad de producción de gas y pruebas de antagonismo.

### ***Prueba de Carácter de Fermentación***

Se evaluó el carácter de fermentación de cada aislado bacteriano tras 24 h de incubación en medio sólido M5. Como se aprecia en la Figura 3, los aislados L12 (a., izquierda de placa), L5 (a., derecha de placa) y L2 (b., izquierda de placa) presentaron colonias de color blanco translúcido con un medio sólido a su alrededor que viró ligeramente de color azul a verde-amarillento; son declaradas como BAL heterofermentativas. El aislado L14 (b., derecha de placa) desarrolló colonias de color azul-verdoso, y el medio sólido a su alrededor viró de color azul a color amarillo; es declarada como BAL homofermentativa. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

### Figura 3

*Determinación del tipo de fermentación de los aislados seleccionados de BAL*



*Nota.* a) Fermentación heterofermentativa de los aislados L12 (izquierda de placa) y L5 (derecha de placa). b) Fermentación heterofermentativa del aislado L2 (izquierda de placa) y Fermentación homofermentativa del aislado L14 (derecha de placa).

### **Prueba de Capacidad Proteolítica y Acidificante**

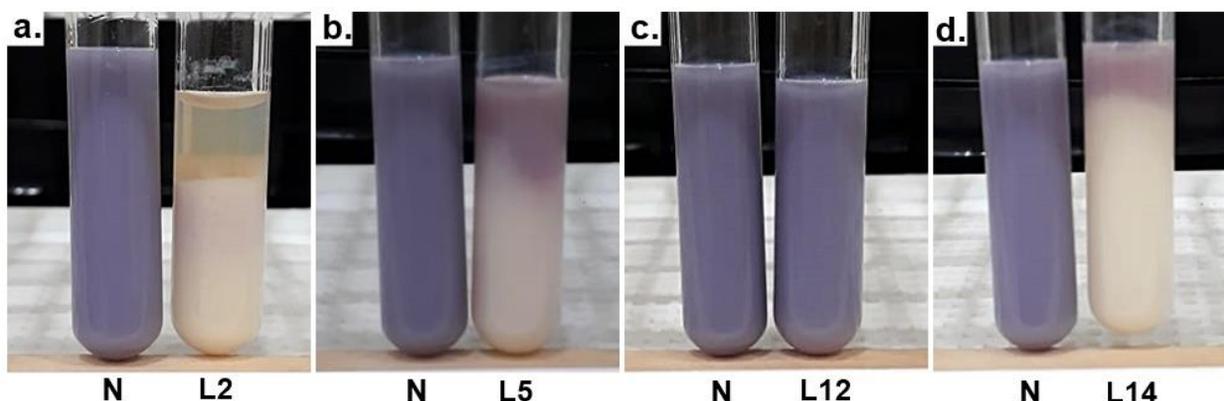
Las reacciones de los ensayos en medio Litmus Milk fueron revisadas y registradas cada día hasta el día 7. Al día 3, el medio líquido de los aislados L2, L5 y L14 cambio de color azul-púrpura a rosa-pálido; en el día 5, el medio adquirió un color rosa-rojizo. Al día 7, en el aislado L2 (Figura 4.a) se formó un coágulo sólido de color rosa-blanquecino cuyo extremo superior contenía suero líquido transparente, denotando así una reacción de coagulación de la caseína y reducción del Litmus (A/C/RED); por otro lado, las inoculaciones L5 y L14 mantuvieron la consistencia líquida del medio pero con una decoloración del mismo en la parte inferior del tubo y un color rosa-rojizo en el extremo superior, refiriendo con ello a una reacción ácida por la producción de ácido láctico formado en la fermentación de lactosa (A/RED); la

inoculación con L12 no generó cambio alguno en el medio Litmus Milk (NF) (Beckett, 2013).

Los resultados se resumen en la Tabla 11.

#### Figura 4

*Reacción de los aislados seleccionados en medio Litmus Milk*



*Nota.* N: Medio control sin inocular; a, L2: Reacción ácida/ coagulación de caseína/ reducción (A/C/RED); b, L5: Reacción ácida/ reducción (A/RED); c, L12: Sin reacción (NF); d, L14: Reacción ácida/ reducción (A/RED).

Transcurridos siete días de incubación a temperatura ambiente, los cultivos fueron incubados nuevamente durante 72 h a 30 °C para determinar el desempeño de los aislados a mayor temperatura. Después del período de incubación, se evidenció la formación de coágulo sólido color blanco en la parte inferior del tubo de los aislados L5 y L14; no hubo formación de suero líquido en la parte superior, pero sí la formación de coágulo color rosa. Los aislados L2 y L12 no tuvieron cambio alguno con relación a los resultados del día 7 a temperatura ambiente.

#### ***Prueba de Capacidad Lipolítica***

A las 48 h de incubación se evidenció crecimiento bacteriano de los cuatro aislados, pero ninguno de ellos generó halos translúcidos alrededor de sus colonias para manifestar que poseen capacidad de degradar grasas, como lo declara Ramírez & Vélez (2016); con esto se

concluyó que los aislados tuvieron lipólisis negativa. Tales resultados se resumen en la Tabla 11.

### **Prueba de Capacidad de Producción de Gas**

Al cabo de 48 h se evidenció el crecimiento de los aislados en el caldo nutritivo con 5 % de lactosa, pero en ninguno de ellos hubo producción de gas.

La incapacidad de los aislados para producir gas también fue corroborada por las pruebas en Litmus Milk puesto que en el coágulo formado por L2 no se identificó desplazamiento, fisuras o rompimiento de este como suele ser usual al existir ascenso de gases hacia la superficie del medio.

En la Tabla 11 se resume el resultado de las pruebas de caracterización de los cuatro aislados seleccionados de BAL.

**Tabla 11**

*Características funcionales de los aislados seleccionados de BAL*

<b>Cod. A</b>	<b>Tamaño célula</b>	<b>Tipo fermentación</b>	<b>Prueba Litmus Milk</b>	<b>Capacidad lipolítica</b>	<b>Producción de gas</b>	<b>Género Hipotético</b>
L2	0.5 $\mu\text{m}$	HT	A/C/RED	-	-	<i>Enterococcus</i>
L5	0.7 $\mu\text{m}$	HT	A/RED	-	-	<i>Leuconostoc</i>
L12	0.46 $\mu\text{m}$	HT	NF	-	-	<i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i>
L14	0.55 $\mu\text{m}$	HM	A/RED	-	-	<i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Streptococcus</i>

*Nota.* Cod A, Codificación del aislado; -: negativo; +: positivo; (HM): Homofermentativa; (HT): Heterofermentativa; (A): Reacción ácida; (C): Formación de coágulo; (RED): Reducción de litmus.

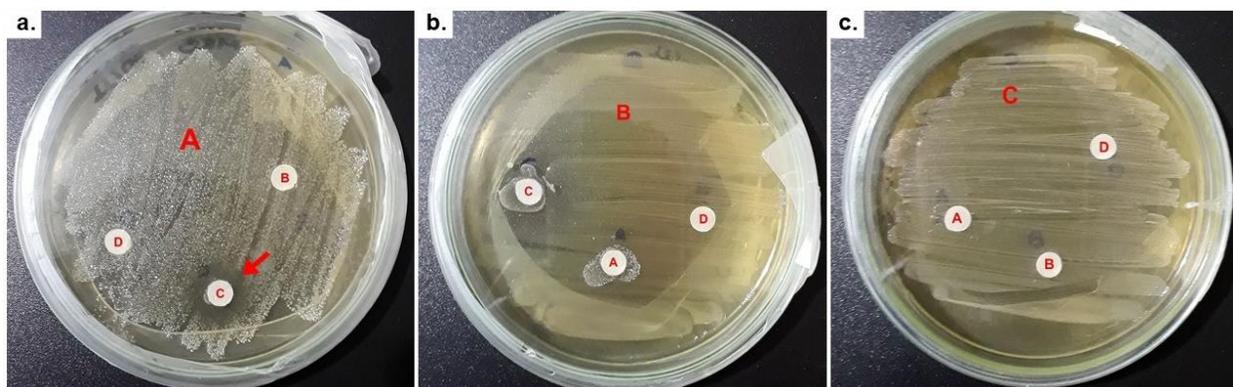
### **Pruebas de Compatibilidad de Crecimiento entre los Aislados Seleccionados de BAL**

Al evaluar las pruebas de antagonismo en agar MRS, tras 96 h de incubación, la placa con el aislado L2 inoculado como indicador evidenció la formación de un halo translúcido con

diámetro de 14 mm alrededor del aislado L12 (Figura 5.a). En las placas con los aislados L12 y L14 como indicadores, no existió la formación de halo de inhibición.

### Figura 5

*Pruebas de antagonismo entre los aislados L2, L5, L12 y L14*



*Nota.* (A): aislado L2; (B): aislado L14; (C): aislado L12; (D): aislado L5.

En la Tabla 12, se resumen los resultados de compatibilidad de los aislados de BAL según el diámetro del halo de inhibición de crecimiento.

### Tabla 12

*Compatibilidad de crecimiento entre los aislados L2, L5, L12 y L14 de BAL*

Cod. A	BAL indicador		
	L2 (A)	L14 (B)	L12 (C)
L2 (A)	NA	+	+
L5 (D)	+	+	+
L12 (C)	--	+	NA
L14 (B)	+	NA	+

*Nota.* Cod A, Codificación del aislado; +: Crecimiento normal; -: 10mm diámetro de halo de inhibición; --: 14mm diámetro de halo de inhibición; NA: No aplica

### Selección de Cepas y Preparación de Inóculo Inicial de BAL

Con las pruebas de compatibilidad de crecimiento se determinó que el aislado L5 no es compatible con L2 (Figura 5.a) por ello no se consideró pertinente emplearlo para el inóculo

mixto iniciador. El aislado L12, no mostró ningún tipo de reacción al ser cultivado en medio Litmus Milk (Tabla 11), por ello fue descartado. Los aislados L2 y L14 mostraron ser cepas acidificantes (Tabla 11) y compatibles (Tabla 12), en consecuencia, fueron seleccionados para integrar el inóculo iniciador que se emplearía en los ensayos de producción de biomasa de BAL en lactosuero. El inóculo fue preparado con la metodología descrita anteriormente y basándose en la composición que muestra la Tabla 13.

### Tabla 13

*Composición del inóculo mixto iniciador a utilizar en los ensayos de producción de biomasa de BAL*

Inóculo mixto iniciador	Proporción de los aislados
L2+L14	1:1

### Caracterización Físicoquímica del Lactosuero

En la Tabla 14, se exponen los resultados de caracterización del lactosuero entero y desproteinizado. Los resultados se compararon con los parámetros de referencia de la NTE INEN 2594 y los de autores que han empleado el lactosuero en procesos biotecnológicos con bacterias ácido lácticas. Tras la desproteinización del lactosuero, el valor del parámetro de sólidos totales descendió de 7.3 % a 6.72 %. El parámetro de porcentaje de cenizas se cumplió para los dos tipos de lactosuero (<0,7). La densidad relativa del lactosuero entero fue de 1.030 mientras que para el lactosuero desproteinizado fue de 1.029. El pH descendió de 5.62 a 5.46 entre lactosuero entero a lactosuero desproteinizado, mientras que el porcentaje de acidez fue de 0.40 % y 0.13 %, respectivamente.

**Tabla 14***Análisis de lactosuero entero y desproteínizado*

Parámetros	Caracterización		Parámetros Referencia			
	LE	LD	Otros autores		NTE INEN 2594 <sup>b</sup>	
			Suero dulce	Suero ácido	Suero dulce <sup>b</sup>	Suero ácido <sup>b</sup>
Acidez titulable (%)	0.40	0.13	0.07-0.19 <sup>c</sup>	0.28-0.44 <sup>c</sup>	<0.16	>0.35
Sólidos totales (%)	7.3	6.72	6.3-7.0 <sup>a</sup>	6.3-7.0 <sup>a</sup>	---	---
Ceniza (%)	0.52	0.29	0.37-0.58 <sup>a</sup>	0.57- 1.88 <sup>a</sup>	<0.7	<0.7
Densidad relativa a 20/20 °C	1.030	1.029	1.028 - 1.029 <sup>d</sup>		---	---
pH	5.62	5.46	6.02 – 6.58 <sup>a</sup>	3.57 -4.34 <sup>a</sup>	6.4-6.8	4.8-5.5

*Nota:* LE: Lactosuero entero; LD: Lactosuero desproteínizado; <sup>a</sup> (Alsaed et al., 2013; Panesar et al., 2007; Ryan & Walsh, 2016); <sup>b</sup> (INEN, 2011b); <sup>c</sup> (Glass & Hedrick, 1976); <sup>d</sup> (Pasmay, 2015).

Los valores de caracterización corresponden al promedio de 3 mediciones.

### **Cinética de Crecimiento de BAL Aisladas**

Las pruebas cinéticas se realizaron con cultivos tipo batch. En frascos de vidrio de 500 mL se colocó 200 mL de cada medio de cultivo (lactosuero puro, lactosuero suplementado, caldo MRS y agua destilada estéril). A cada medio se añadió 1 % v/v del inóculo bacteriano inicial (2 mL en proporción 1:1 del aislado L2 y aislado L14, cada uno con concentración próxima de  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL o 0.5 en escala de McFarland). Durante las 48 h de ensayo, los tratamientos se mantuvieron en agitación a 110 rpm a temperatura ambiente.

### **Determinación de la Concentración de Biomasa**

En la Tabla 15, se presentan las concentraciones promedio de la biomasa de BAL producida al cabo de 48 h en cada tratamiento de cultivo.

**Tabla 15**

*Valores de concentración de la biomasa de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca producidas al cabo de 48 h de cultivo en medio líquido MRS, L50 y L*

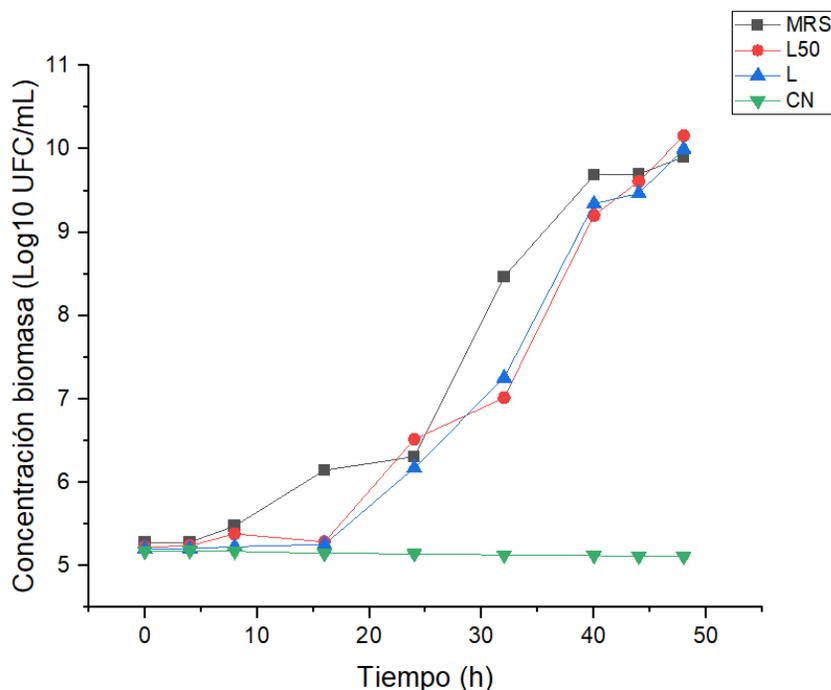
Tiempo (h)	Concentración de biomasa (Log10 UFC/mL)			
	MRS	L50	L	CN
0	5.28	5.23	5.21	5.18
4	5.28	5.24	5.21	5.19
8	5.48	5.38	5.23	5.19
16	6.15	5.29	5.26	5.15
24	6.31	6.52	6.18	5.13
32	8.47	7.02	7.26	5.13
40	9.69	9.21	9.34	5.12
44	9.78	9.61	9.47	5.11
48	10.01	10.16	9.64	5.11

*Nota:* MRS: caldo MRS; L50: medio de lactosuero desproteinizado y suplementado; L: medio de lactosuero desproteinizado sin suplemento; CN: control negativo. Los datos corresponden a valores promedio de las cinco réplicas de tratamiento y de los tres ensayos efectuados.

A partir de los datos de la Tabla 15 se construyeron las curvas de concentración de biomasa de cada tratamiento en términos de Log10 UFC/mL con respecto al tiempo (Figura 6).

**Figura 6**

Curvas de la concentración de biomasa de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca producidas a las 48 h de cultivo en medio líquido MRS, L50 y L



En la Figura 6 se observa que la fase de adaptación de las BAL en el caldo MRS fue corta, puesto que al cabo de 8 h se inició la fase exponencial de crecimiento, que se mantuvo en tendencia lineal hasta las 38 h iniciada la incubación. A partir de este tiempo, las concentraciones de biomasa tienden a mantenerse aproximadamente constantes, evidenciándose un posible inicio de la fase estacionaria en el crecimiento de las BAL. Por otro lado, en el lactosuero suplementado (L50) y del lactosuero puro no suplementado (L) se observa un periodo de adaptación bacteriana más largo y apenas el inicio de una fase exponencial se evidencia a partir de las 16 h y 24 h, respectivamente. Para el medio L50 no es considerable el inicio de fase estacionaria debido a que al término de las 48 h se mantuvo en fase exponencial; por otro lado, en el medio MRS a partir de las 38 h la concentración de

biomasa existente tendió a mantenerse constante. Al término de las 48 h de fermentación en ninguno de los medios de cultivo se evidenció depreciación en la concentración bacteriana, por lo que no es apreciable una fase de muerte celular.

### ***Evaluación de la Variación de pH***

En la Tabla 16 se presentan los valores promedio de pH obtenidos al cabo de 48 h de cultivo de las BAL en medios de cultivo MRS, L50 y L.

**Tabla 16**

*Valores de pH de los medios de cultivo MRS, L50 y L durante las 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca*

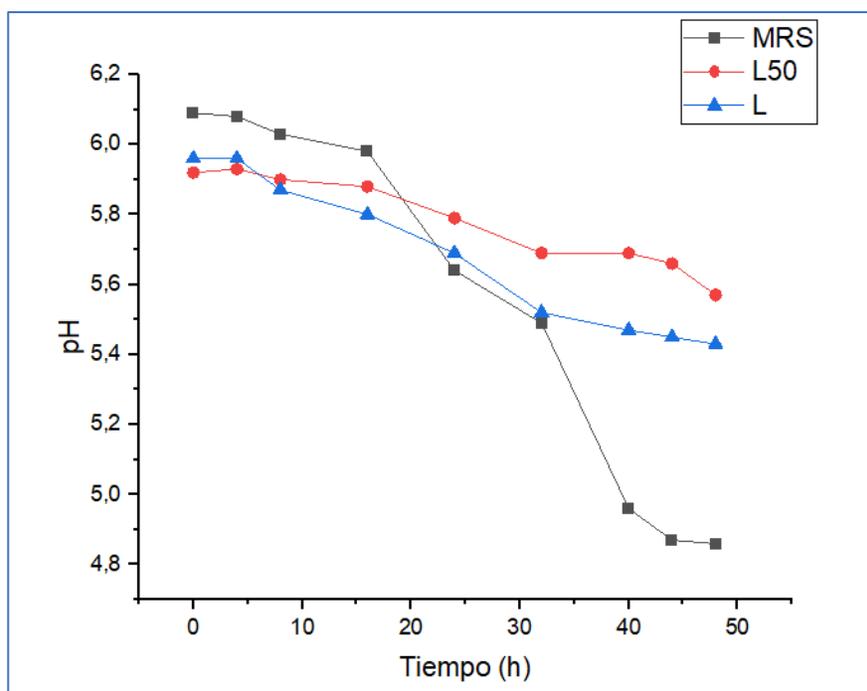
Tiempo (h)	pH		
	MRS	L50	L
0	6.09	5.92	5.96
4	6.08	5.93	5.96
8	6.03	5.90	5.87
16	5.98	5.88	5.80
24	5.66	5.79	5.69
32	4.96	5.69	5.52
40	4.96	5.69	5.47
44	4.87	5.66	5.45
48	4.78	5.57	5.35

*Nota:* MRS: caldo MRS; L50: medio de lactosuero desproteinizado y suplementado; L: medio de lactosuero desproteinizado sin suplemento. Los datos corresponden a valores promedio de las cinco réplicas de tratamiento y de los tres ensayos efectuados.

A partir de los datos de la Tabla 16 se construyeron las curvas de variación de pH de cada medio de cultivo con respecto al tiempo (Figura 7).

### Figura 7

Variación de pH en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca



Según la Figura 7, a lo largo de las 48 h de estudio cinético hubo un descenso progresivo del valor de pH en los medios de cultivo empleados. En el medio MRS se identifica un descenso de pH de 5,98 a 4,96 entre las 16 h y 40 h de iniciada de incubación; a partir de la hora 44, el pH tiende a mantenerse constante, y alcanza un valor de 4,78 al cabo de las 48 h de crecimiento. El medio MRS presenta la mayor variación de pH ( $\Delta pH = 1,31$ ).

A partir de las 4 h de incubación, el pH del medio L50 y L descienden linealmente pero no alcanzan valores próximos a los obtenidos en el medio MRS; L50 exhibe continuidad en el descenso del pH y a partir de las 40 h tiende a ser constante. La variación de pH en el medio L50 y medio L, fue de 0,35 y 0,61, respectivamente, determinando así que la menor variación de este parámetro se obtuvo en el medio L50.

### **Curvas de Acidez**

En la Tabla 17 se presentan los valores promedio de acidez titulable expresada en porcentaje de ácido láctico que se generó al cabo de 48 h de cultivo de las BAL en medio MRS, L50 y L.

**Tabla 17**

*Porcentaje de acidez en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante las 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca*

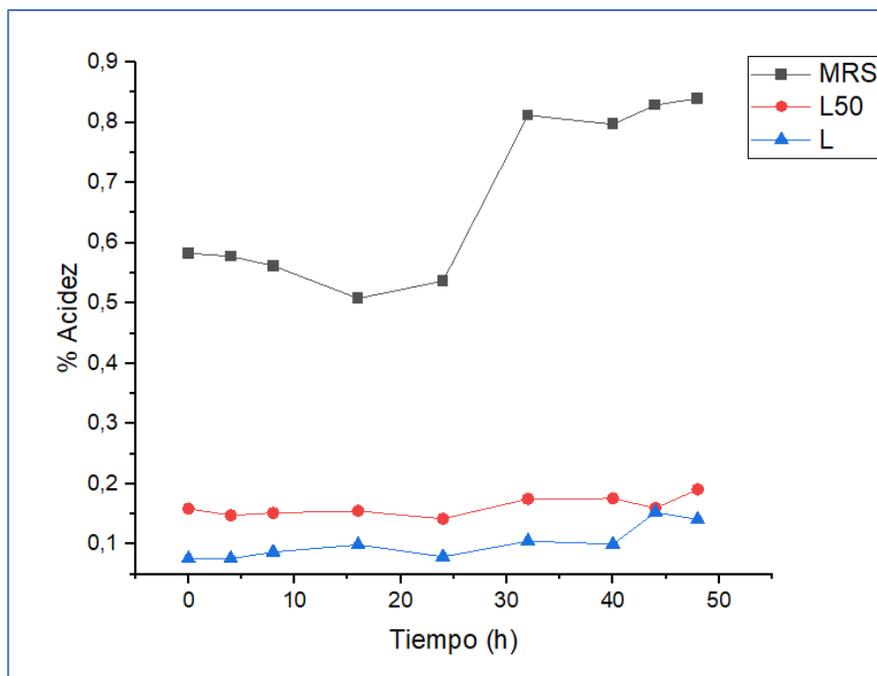
Tiempo (h)	% Acidez		
	MRS	L50	L
0	0.583	0.159	0.076
4	0.578	0.148	0.076
8	0.562	0.152	0.087
16	0.508	0.155	0.099
24	0.537	0.161	0.079
32	0.812	0.175	0.105
40	0.797	0.176	0.100
44	0.829	0.160	0.242
48	0.996	0.191	0.141

*Nota:* MRS: caldo MRS; L50: medio de lactosuero desproteinizado y suplementado; L: medio de lactosuero desproteinizado sin suplemento. Los datos corresponden a valores promedio de las cinco réplicas de tratamiento y de los tres ensayos efectuados.

A partir de los datos de la Tabla 17 se construyeron las curvas de variación del porcentaje de acidez de cada medio de cultivo con respecto al tiempo (Figura 8).

### Figura 8

Variación del porcentaje de acidez en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca



En la Figura 8 se observa que el porcentaje de acidez aumenta en los tres medios de cultivo (MRS, L50 y L) conforme transcurre el tiempo tras el inicio de la incubación. El porcentaje de acidez generado en el medio MRS es mayor en relación con el producido en L50 y L, puesto que, a partir de las 24 h de cultivo, en este tratamiento, el parámetro de acidez se incrementa generando así un porcentaje neto de 0.413 % de acidez a las 48 h. En los medios L50 y L, la variación de pH alcanzó valores de 0.032 y 0.065, respectivamente, con ello se determinó que la menor producción de ácido láctico se generó en el medio L50.

### **Consumo de Azúcares Reductores**

En la Tabla 18 se presentan los valores promedio de la concentración de azúcares reductores al cabo de 48 h de cultivo de las BAL en medio MRS, L50 y L.

**Tabla 18**

*Valores de concentración de azúcares reductores en los medios cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca*

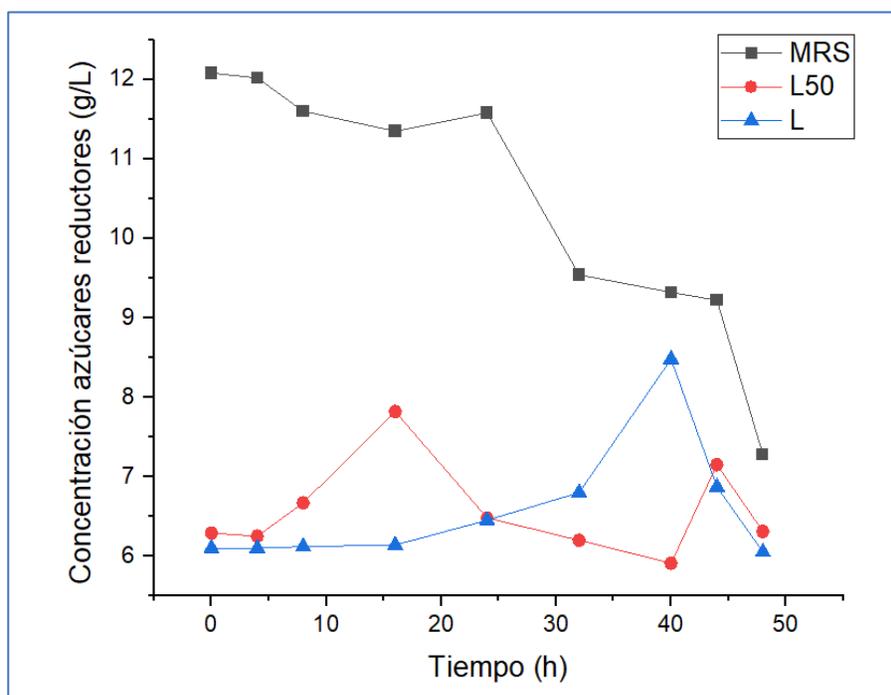
Tiempo (h)	Concentración de azúcares reductores (g/L)		
	MRS	L50	L
0	12.08	6.29	6.1
4	12.02	6.25	6.1
8	11.60	6.67	6.12
16	11.35	7.82	6.14
24	11.58	6.48	6.45
32	9.54	6.20	6.80
40	9.32	5.91	8.48
44	9.22	7.15	6.87
48	7.28	6.31	6.05

*Nota:* MRS: caldo MRS; L50: medio de lactosuero desproteinizado y suplementado; L: medio de lactosuero desproteinizado sin suplemento. Los datos corresponden a valores promedio de las cinco réplicas de tratamiento y de los tres ensayos efectuados.

A partir de los datos de la Tabla 18 se construyeron curvas de variación de la concentración de azúcares reductores con respecto al tiempo (Figura 9).

**Figura 9**

Variación de la concentración de azúcares reductores en los medios de cultivo MRS, L50 y L durante 48 h de cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca

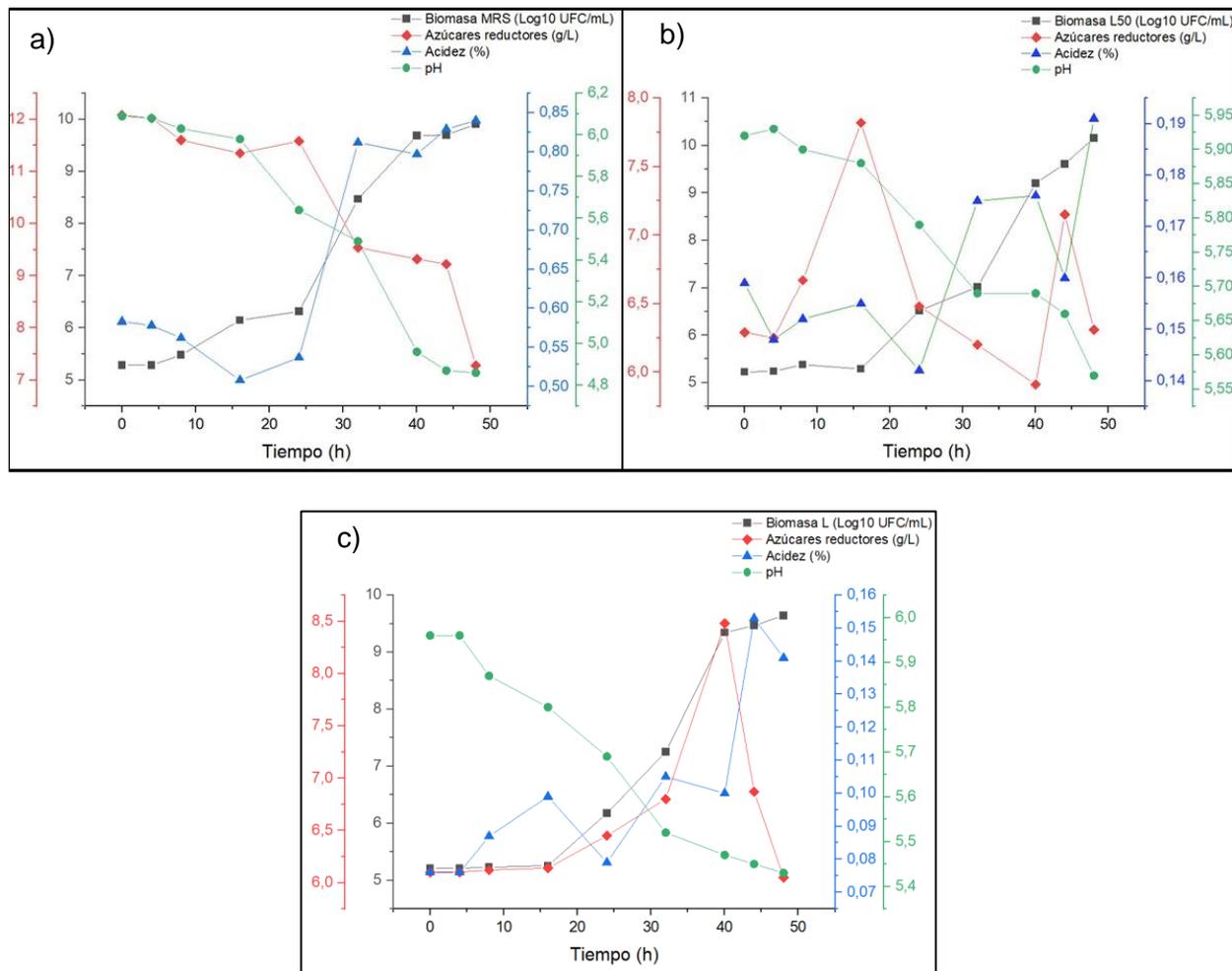


La Figura 9 muestra que la concentración de azúcares reductores (sustrato) del medio MRS tiende a disminuir al cabo de 48 h desde 12.08 g/L a 7.28 g/L; se consumió el 40 % (4.8 g/L) del sustrato inicial. En las curvas de concentración de azúcares reductores correspondientes a los medios L50 y L se observa fluctuación en las líneas de tendencia debido a que existe un aumento de concentración proseguido del descenso de esta, específicamente a los tiempos de 16 h y 44 h para L50, y a las 42 h en medio L.

En la Figura 10 se muestran las gráficas resumen de la concentración de biomasa de BAL, variación de pH, porcentaje de acidez y concentración de azúcares reductores en cada medio de cultivo.

Figura 10

Perfil cinético de BAL nativas de leche cruda de vaca en medio MRS, L50 y L



Nota: a) Cinética de crecimiento de BAL en medio MRS; b) Cinética de crecimiento de BAL en medio L50; c) Cinética de crecimiento de BAL en medio L.

### Determinación de Parámetros Cinéticos

Los datos de concentración de biomasa producida en los medios MRS, L50 y L (Tabla 15), fueron ajustados al modelo no lineal de Gompertz modificado (Ecuación 1). En la Tabla 19 se resumen la concentración de biomasa de BAL producidas en los diferentes medios de

cultivo junto a los parámetros cinéticos estimados por el ajuste de regresión con el modelo mencionado. Para el ajuste no lineal se empleó el software estadístico Origin PRO 2021.

**Tabla 19**

Parámetros de la cinética de crecimiento en medio MRS, L50 y L de bacterias ácido lácticas nativas de leche cruda de vaca

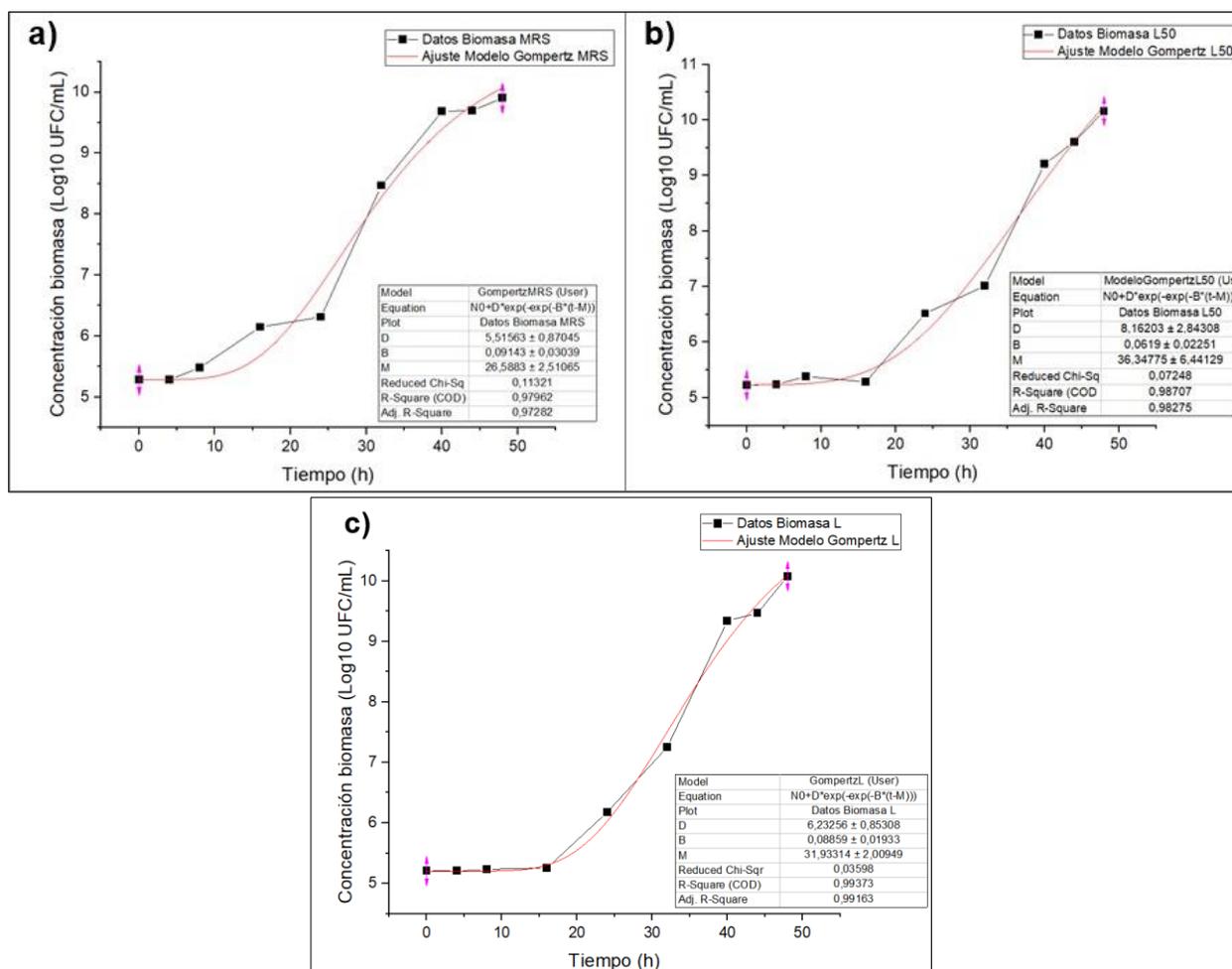
<b>Parámetros cinéticos</b>	<b>MRS</b>	<b>L50</b>	<b>L</b>
Máxima concentración de biomasa (Log10 UFC/mL)	10.01	10.16	9.64
N <sub>0</sub> : Concentración inicial de biomasa (Log10 UFC/mL)	5.28	5.23	5.21
Producción neta de biomasa (Log10 UFC/mL)	4.73	4.93	4.44
D: Diferencia entre concentración inicial del microorganismo y la concentración final de los mismos en fase estacionaria (Log10 UFC/mL)	5.51±0.87	8.16±2.84	6.23±0.85
B: Velocidad máxima de crecimiento relativo (Log10 UFC mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0.091±0.03	0.06±0.02	0.09±0.02
M: Tiempo para alcanzar velocidad máxima de crecimiento (h)	26.59±2.51	36.35±6.44	31.93±2.00
μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )	0.19±0.04	0.19±0.02	0.20±0.02
Tiempo de generación T <sub>g</sub> (h)	2.45	2.47	2.27
λ: Fase de latencia	15.65±2.45	20.19±1.88	20.6±1.23
Coeficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.979	0.987	0.990

*Nota:* Los valores expuestos están redondeados a 2 cifras

En la Figura 11 se muestra las gráficas del ajuste al modelo no lineal de Gompertz modificado con los parámetros de crecimiento de cada uno de los medios de cultivo (Figura 11, a: MRS; Figura 11, b: L50; Figura 11, c: L). Se evidencia que las curvas de crecimiento convergen al modelo.

**Figura 11**

*Curvas de la cinética de crecimiento de BAL en medio MRS, L50 ajustadas al modelo modificado de Gompertz*



*Nota:* a) Cinética de crecimiento de BAL en medio MRS; b) Cinética de crecimiento de BAL en medio L50; c) Cinética de crecimiento de BAL en medio L.

## Análisis Estadístico

Los datos empleados para el análisis estadístico corresponden a los valores promedio de la biomasa neta producida al cabo de 48 h en los cultivos de BAL en los diferentes medios de cultivo (Tabla 20).

**Tabla 20**

*Valores promedio de la biomasa neta de BAL producida en medio MRS, L50 y L*

BLOQUES		TRATAMIENTOS	VARIABLE RESPUESTA	
Ensayo		Medio Cultivo	Biomasa neta (UFC/mL)	Biomasa neta (Log10 UFC/mL)
E1		MRS	8.02E+09	9.90
E1		L50	1.44E+10	10.16
E1		L	1.20E+10	10.08
E2		MRS	1.01E+10	10.00
E2		L50	5.20E+09	9.72
E2		L	1.01E+10	10.01
E3		MRS	5.62E+09	9.75
E3		L50	1.54E+10	10.19
E3		L	7.94E+09	9.90

*Nota:* E1: Ensayo 1; E2: Ensayo 2; E3: Ensayo 3.

El análisis de varianza ANOVA resalta que no existen diferencias significativas entre los medios de cultivo MRS, L50 y L en la producción de biomasa de BAL ( $p$ -valor > 0.05). A su vez, el orden del ensayo realizado tampoco demuestra diferencias estadísticas ( $p$ -valor > 0.05) (Tabla 21).

**Tabla 21**

*Análisis de varianza entre los medios de cultivo (MRS, L50, L) y el orden de ensayo referente a la biomasa neta de BAL*

Variable dependiente:		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p-valor
Biomasa neta (Log10 UFC/mL)	Medio de cultivo	0.033	2	0.017	0.424	0.681
	Ensayo	0.030	2	0.015	0.383	0.704

En la prueba de Dunnett, la biomasa neta producida en los medios L50 y L fue comparada con la biomasa neta producida en medio MRS tratado como grupo control. Tanto para L50 y L la significancia fue mayor a 0.05 (p-valor >0.05), indicando que no hay diferencias estadísticas entre los medios con respecto a la concentración neta de biomasa producida en ellos (Tabla 22).

**Tabla 22**

*Análisis de la prueba t de Dunnett basada en las medias de biomasa neta de bacterias ácido lácticas producidas en medio MRS, L50 y L*

t de Dunnett (> control)	Medio cultivo	Medio cultivo (Control)	SEM	p-valor
	L50	MRS	0.16	0.332
	L	MRS	0.16	0.390

La Tabla 23 y Figura 12, resumen los valores promedio de la biomasa neta de BAL producida al cabo de 48 h en los medios de cultivo MRS, L50 y L.

El análisis de varianza y la prueba t de Dunnett mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas (p>0.05) entre la concentración de biomasa neta de BAL producida en el medio MRS, L50 y L.

**Tabla 23**

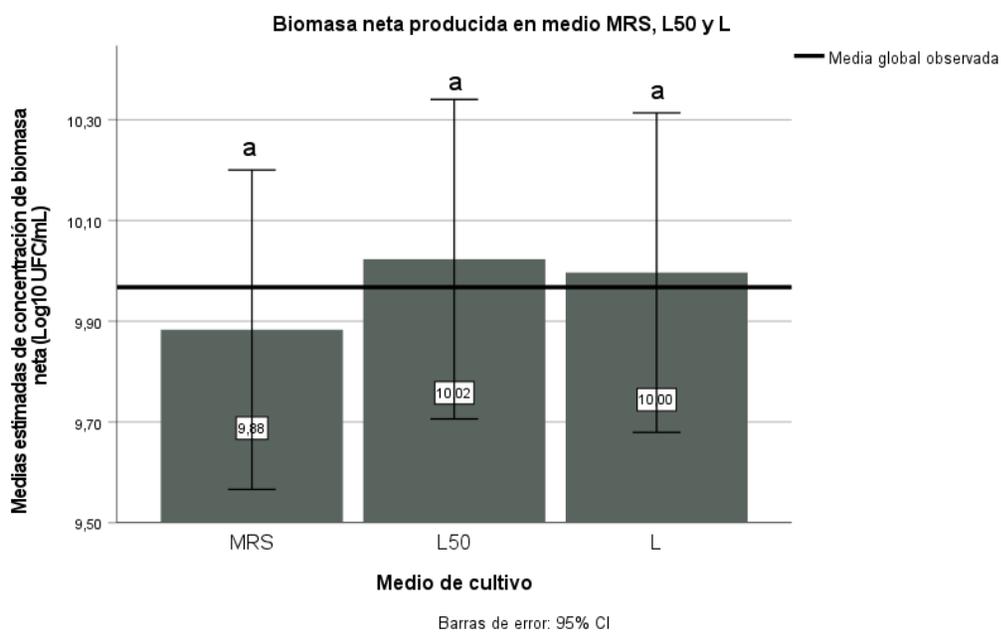
*Biomasa neta producida en los medios MRS, L50 y L al cabo de 48 h de cultivo*

Medio de cultivo	Media de biomasa neta (Log10 UFC/mL)
MRS	9.88 <sup>a</sup>
L50	10.02 <sup>a</sup>
L	10.00 <sup>a</sup>

*Nota: Medias con una letra común no son significativamente diferentes*

**Figura 12**

*Biomasa neta producida en los medios MRS, L50 y L al cabo de 48 h de cultivo*



## Capítulo 5

### Discusión

#### Caracterización de Muestras de Leche Cruda de Vaca

La caracterización de las muestras de leche cruda de vaca se realizó a fin de determinar la relación entre la flora nativa, los parámetros organolépticos y físico químicos de la leche. Se encontró que en las muestras recolectadas de leche el color varió desde blanco, blanco-grisáceo a blanco-amarillento; el olor fue suave y ligeramente ácido; de aspecto acuoso y homogéneos, coincidiendo así con las características que según la NTE INEN 9:2008. “Leche cruda. Requisitos”, corresponden usualmente a leche cruda de bovino (INEN, 2008). Los valores de pH, ensayo de la reductasa, prueba de estabilidad proteica, sólidos totales, cenizas y densidad relativa de las muestras (Tabla 8), se encontraron dentro de los rangos que la NTE INEN 9:2008 establece para considerar una leche de calidad buena y calidad regular (INEN, 2008).

Al comparar las características organolépticas (Tabla 7), características físico químicas (Tabla 8) y el número de aislados bacterianos desarrollados en medio MRS (Tabla 9), se puede destacar que las muestras con pH más ácidos (M1, M2, M3 y M4) coincidieron en ser las fuentes del mayor número de aislados bacterianos. Con esto se coincide con lo mencionado por Giangiacomo (2000), quien señala que valores bajos de pH en la leche son indicativo de la presencia de bacterias acidificantes de azúcares de la leche, mientras que valores más altos se pueden encontrar en animales con problemas de mastitis.

#### Aislamiento de Bacterias Ácido Lácticas desde Muestras de Leche Cruda de Vaca

Se obtuvo un total de veinte aislados bacterianos a partir de muestras de leche cruda de vaca (Tabla 10). Como lo cita Karimi et al. (2012), el éxito para el aislamiento de BAL puede atribuirse a diversos factores, entre los que destacan las condiciones higiénicas del ordeño, el manejo y almacenamiento higiénico de las muestras de leche y las condiciones de esterilidad

en el manejo de técnicas de aislamiento microbiológico. Se identificó la presencia de colonias bacterianas de diversos colores (blanco brillante, blanco hueso y crema); de bordes enteros y ondulares; con formas convexas, planas y con elevación; y opacidad de naturaleza translúcida y opaca., que denotan la existencia de una amplia flora autóctona que no necesariamente es causa de la pérdida de calidad de la leche (Tabla 8), puesto que como lo menciona Addis et al. (2016), varios estudios metagenómicos han determinado que en las secreciones mamarias (calostro y leche) de cuartos clínicamente sanos de vaca se alojan marcadores genómicos de diversos grupos bacterianos no asociados a infecciones como la mastitis. Según Khaton et al., (2014) estos microorganismos invasores provienen de diversas fuentes extramamarias como el aire, alimento, suelo, plantas, heces, pasto y equipo de ordeño; luego se alojan en varias zonas de la ubre como el ápice, el canal del pezón y secreciones (Derakhshani et al., 2018; Khaton et al., 2014). En base a lo mencionado podemos atribuir que el contacto directo que tienen los bovinos de las haciendas de Pasochoa con el kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) en el momento del pastoreo, constituye una fuente de bacterias para la colonización de la glándula mamaria, coincidiendo así con Mera (2013), que al evaluar la calidad de leche de bovinos provenientes de la parroquia Machachi en Pichincha, Ecuador, determinó que en leche proveniente de bovinos con alimentación natural se presenta una alta concentración bacteriana a comparación de la leche de bovinos alimentados con balanceado.

Tras varios criterios de selección como la morfología de colonias (Tabla 9), morfología celular y pruebas de catalasa y oxidasa (Tabla 10), se determinó que cuatro de los veinte aislados cumplían con las características para ser considerados bacterias ácido lácticas (L2, L5, L12 y L14). Autores como Terzaghi & Sandine (1975), Elliker et al. (1956) y Ramírez & Vélez (2016) reportan que las colonias de BAL sobre agar MRS tienen forma circular con tamaño entre 1-2 mm, de aspecto liso y de tonalidad translúcida a blanquecina. Estas

características concuerdan con las descritas para los cuatro aislados seleccionados como BAL (Tabla 9).

Axelsson (2004), Parra (2010) y Teuber (2005) describen que las bacterias ácido lácticas de los géneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Streptococcus* son microorganismos Gram positivos, con forma de cocos esféricos organizados en pares o cadenas, de tamaños entre 0.5  $\mu\text{m}$  y 1.5  $\mu\text{m}$  y con resultados negativos a pruebas de catalasa y oxidasa. Tales características son similares a las de los 4 aislados seleccionados, debido a que estos tuvieron forma de cocos dispuestos en cadena, de carácter Gram positivo, con tamaños de 0.05  $\mu\text{m}$  a 0.07  $\mu\text{m}$  (Figura 2), y, con pruebas negativas para catalasa y oxidasa (Tabla 10). En base a esto, se puede señalar que los aislados L2, L5, L12 y L14 pertenecen al grupo de BAL, y que posiblemente pertenecen a los géneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Streptococcus*; que ya han sido aislados de muestras de leche cruda de vaca y cabra por varios autores (Alvarado et al., 2007; Karakas-Sen & Karakas, 2018; Kumar & Kumar, 2014; C. Ramírez & Vélez, 2016; Tulini et al., 2016).

Con los datos de morfología (Tabla 9) y pruebas de selección (Tabla 10) no fue posible declarar a que género pertenece cada aislado de BAL, puesto que *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Streptococcus* tienen la forma celular de cocos Gram positivos dispuestos en cadena según lo han reportado autores como Gemelas et al., (2013), Karakas-Sen & Karakas (2018) y Ramírez & Vélez (2016). En este contexto, Gemelas et al. (2013) con el propósito de diferenciar aislados de *Lactococcus* y *Streptococcus* provenientes de muestras de leche cruda de vacas y cabras, empleó medios de cultivo como M17, Elliker, Elliker modificado, PCA + 1 % leche (Agar para recuento en placa), KCA (Nickels & Leesment, 1964), Chalmers modificado, Turner y FSDA (Agar diferencial rápido-lento) (Terzaghi & Sandine, 1975); concluyendo que no fue posible distinguir los lactococos de los estreptococos porque son fenotípicamente similares

y que tal diferenciación sería posible únicamente si las cepas fueran secuenciadas genéticamente.

El medio de cultivo empleado para el aislamiento de las BAL nativas de leche fue el MRS, ya que se declara como medio selectivo para el aislamiento y diferenciación de lactobacilos (De Man et al., 1960). A pesar de ello, los cuatro aislados de BAL obtenidos tuvieron forma celular de cocos. Tal hallazgo fue similar al encontrado por Centeno et al. (1996), que al emplear agar MRS a pH 5.5 e inocular muestras de leche cruda de vaca, cuajada y queso aisló 118 cepas de BAL, de las cuales el 42 % eran lactobacilos y el 40 % restante fueron lactococos. Con esto se evidencia la falta de selectividad del medio MRS para el desarrollo único de lactobacilos, suceso también reportado por Gemelas et al. (2013).

La ausencia de lactobacilos nativos de leche cruda de vaca en esta investigación puede atribuirse a las condiciones empleadas en el cultivo, como: incubación a temperatura ambiente entre 21-23 °C, la ausencia de atmósferas de CO<sub>2</sub> y falta de anaerobiosis en las placas Petri. Estas condiciones contrastan con las utilizadas por Kumar & Kumar (2014) y Ramírez & Vélez (2016), quienes emplearon placas de agar MRS con suministro de 5–10 % de CO<sub>2</sub> y temperaturas de incubación entre 35 – 37 °C por 48 h para aislar lactobacilos autóctonos de leche cruda de vaca, ovejas y cabras.

Axelsson (2004), Motta & Gomes (2015) y Tulini et al. (2016) destacan que la importancia de las BAL radica en su papel como probióticos y potenciales cultivos iniciadores en la industria de alimentos. En esta investigación no se evaluó el carácter probiótico de los aislados, en su lugar, las pruebas se direccionaron a determinar las capacidades tecnológicas para posible aplicación en la industria de alimentos lácteos fermentados.

Se realizaron pruebas en medio Litmus Milk y se determinó que los aislados L2, L5 y L14 tenían capacidad acidificante sobre la leche, debido a que en el medio se identificó el viraje de color de azul-púrpura a rosa (Figura 4; Tabla 11). Según Beckett (2013), este viraje de color

se genera por un descenso de pH en el medio ante la presencia de ácidos orgánicos que se produjeron en la fermentación de lactosa ejecutada por las BAL. Se identificó que L2, L5 y L14, tienen la capacidad de reducir el Litmus Milk puesto que el medio se tornó de color blanco en la parte inferior del tubo. Con esto se corrobora que al existir la formación de ácidos orgánicos en Litmus Milk también se genera la reducción del oxígeno por acción de las reductasas de los microorganismos, mismas que eliminan los electrones del tornasol del medio y lo decoloran (Portland Community College, 2015).

El aislado L2 tuvo la capacidad de formar un coágulo sólido con suero líquido en la parte superior; estas características son las mismas de un coágulo formado en medio Litmus Milk por la conversión de caseína en paracaseína ante la acción de la enzima renina según Portland Community College (2015). No existen muchos estudios con respecto a microorganismos nativos de leche que produzcan renina, pero autores como Conn (1892) y Frazier (1924) declaran que existen dos clases de microorganismo capaces de formar coágulos en la leche: el primero, provoca el coágulo por medio de ácidos; y el segundo que produce una enzima similar a la renina para llevar a cabo la coagulación. Frazier (1924) señala que algunas bacterias cocáceas de la ubre producen renina para la formación de una cuajada dulce en la ausencia de microorganismos formadores de ácido.

Las características de los coágulos formados por L5 y L14 en el período de incubación a 30 °C, concuerdan con las mencionadas por Beckett (2013) cuando describe un coagulo sólido ácido formado por la coagulación de la caseína de leche en presencia de ácidos. Este proceso de coagulación de caseína mediante ácidos es característico de BAL iniciadoras (Soydemir, 2008). Con esto, se deduce que los aislados tienen mayor capacidad para fermentar lactosa a temperatura mayor que la temperatura ambiente (20-25 °C).

Axelsson (2004) indica que el tipo de fermentación de las BAL es considerado un criterio taxonómico importante. Al identificar el tipo de fermentación de las BAL en medio M5

(Tabla 11), se determinó que los aislados L2, L5 y L12 son microorganismos heterofermentadores, mientras que el aislado L14 es homofermentadores. En este contexto, los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, y *Weissella* son heterofermentadores obligados, porque carecen de la enzima aldolasa y no pueden realizar glucólisis, en su lugar fermentan la glucosa y pentosas mediante la vía de la enzima fosfocetolasa para producir ácido láctico junto a cantidades significativas de CO<sub>2</sub> y etanol o acetato (Axelsson & Von Wright, 2012). Por otra parte, los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, además de ser homofermentadores no obligados (fermentan la glucosa vía glucólisis), tienen la capacidad de ser heterofermentadores facultativos, es decir que fermentan la glucosa a ácido láctico solamente por la vía de la glucólisis y las pentosas u compuestos similares mediante la vía de la fosfocetolasa (Axelsson & Von Wright, 2012). Con base en esto y a los datos del tipo de fermentación de los aislados (Tabla 11), se puede señalar que los aislados L2, L5 y L12 pertenecen hipotéticamente a los géneros *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* o *Streptococcus*. Mientras que, L14 podría pertenecer a los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* o *Streptococcus*.

Con las pruebas de caracterización realizadas fue posible clasificar a los 4 aislados de BAL en nivel taxonómico de género, pero no se pudo distinguir a cuál corresponden. Es necesario aplicar otras técnicas para la identificación específica de género y especie, ya que como lo menciona Asfour et al. (2016), las pruebas bioquímicas y fisiológicas no son satisfactorias para identificar nuevos taxones de BAL, por lo que es necesario un enfoque polifásico en la identificación que combine métodos fenotípicos y genotípicos. Para la identificación de los 4 aislados de BAL, se puede emplear pruebas de fermentación de carbohidratos del sistema API 50 CH o API 20 Strep, que ha sido ampliamente empleado por varios autores (Bedón & Quintana, 2018; Centeno et al., 1996; Karakas-Sen & Karakas, 2018; Manero & Blanch, 1999; Mondragón et al., 2006; C. Ramírez & Vélez, 2016) en la

caracterización de BAL. Aplicar técnicas moleculares de secuenciación del gen 16s rRNA o PCR con primers específicos de especie sería otra opción para la identificación de los aislados, similar a lo realizado por Bin Masalam et al. (2018), Kumar & Kumar (2014), Mondragón et al. (2006), Mulaw et al. (2019) y Tulini et al. (2016).

Entre las posibles especies a las que pertenecerían los cuatro aislados de BAL se encuentran: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus uberis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp.; especies que corresponden a los géneros determinados en esta investigación y que ya han sido aisladas desde muestras de leche cruda de vaca por varios autores (Ali, 2011; Aziz et al., 2009; Bin Masalam et al., 2018; C. Ramírez & Vélez, 2016; Tulini et al., 2016).

Los aislados L2 y L14, empleados en el cultivo mixto, son candidatos a posibles aplicaciones en productos lácteos fermentados debido a su compatibilidad, sus capacidades tecnológicas de homofermentación y heterofermentación, y su capacidad de acidificar la leche (Tabla 11). De acuerdo a autores como Alvarado et al. (2007) y Ramírez & Vélez (2016) estos criterios iniciales de selección son esenciales para determinar la formulación de cultivos iniciadores con BAL. Como lo mencionan Karakas-Sen & Karakas (2018), es importante desarrollar y ampliar el aislamiento de cepas de BAL autóctonas de diferentes hábitats naturales, incluida la microflora autóctona de la leche cruda, ya que pueden ser una fuente de cepas nuevas de BAL con capacidades deseables para diferentes aplicaciones. En la producción de alimentos fermentados Alvarado et al. (2007) sugiere que la búsqueda y producción de cepas de BAL autóctonas con potencial tecnológico podría dar paso a que el sector industrial mejore y optimice sus procesos de fermentación para obtener alimentos industrializados que conserven las peculiaridades sensoriales de su contraparte tradicional.

### **Caracterización de Lactosuero**

En Tabla 14 se muestran los resultados de caracterización del lactosuero entero y desproteínizado. Tras el proceso de desproteínización térmica, los parámetros del lactosuero entero y del lactosuero desproteínizado variaron entre sí, en especial parámetros como el porcentaje de acidez y el pH. Con referencia a la acidez, el lactosuero entero presentó carácter de suero ácido (0.40 %), mientras que el lactosuero desproteínizado se encontró dentro del rango de suero dulce (0,13 %), valores similares a los reportados por Rojas et al. (2015). Analizando el valor de pH, 5.62 y 5.46 para el lactosuero entero y lactosuero desproteínizado, respectivamente, podemos clasificar a los dos tipos de suero como ligeramente ácidos según la NTE INEN 2594 (INEN, 2011b), puesto que para considerarlos lactosuero dulce deberían presentar un pH mayor a 6.4.

Los bajos valores de pH que se encontraron en el lactosuero desproteínizado pudo ser resultado del proceso de desproteínización térmica ya que según lo reportado por Martínez-Castro et al. (1986), cuando el lactosuero es sometido a temperaturas mayores a 100 °C se tienden a formar ácidos orgánicos debido a la degradación de la lactosa y la insolubilización de sales de fosfato de calcio.

De acuerdo a características físico químicas de lactosuero reportadas por otros autores (Alsaed et al., 2013; Glass & Hedrick, 1976; Panesar et al., 2007; Ryan & Walsh, 2016) y a los requisitos de la NTE INEN 2594, el lactosuero desproteínizado que se empleó en esta investigación cumplió con los requisitos para ser considerado suero dulce, confirmando así que procede del proceso de elaboración de queso fresco. Como lo mencionan Ryan & Walsh (2016), es usual que este tipo de lactosuero dulce sea obtenido tras procesos de coagulación de la caseína mediante acción enzimática por renina o cuajo. Por otro lado, los sólidos totales correspondieron a valores de 7.3 % y 6.72 %, para lactosuero entero y desproteínizado, respectivamente; estos datos son corroborados con lo reportado por Alsaed et al. (2013),

Panesar et al. (2007) y Ryan & Walsh (2016), quienes señalan un rango entre 6.3 % y 7 % de sólidos totales en lactosuero de bovino. El valor de los parámetros de caracterización del lactosuero determinados en esta investigación concuerda con los citados por los autores mencionados, sin embargo, Ryan & Walsh (2016) plantea que la calidad composicional del lactosuero dependerá del tipo de leche y de los procesos tecnológicos de los cuales resulte. En base a la NTE INEN 2594, el lactosuero desproteínizado cumplió con los requisitos para ser empleado como materia de reutilización.

### **Cinética de Crecimiento de BAL en Lactosuero**

Con referencia a la etapa inicial de adaptación de las BAL, en la Figura 6 y en la Tabla 19, se observa que en el medio MRS el tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) es menor al compararlo con el de L50 y L (15.65 h, 20.19 h y 20.6 h, respectivamente). La duración de esta etapa se puede atribuir a la disposición de la fuente de carbono en cada medio y a la capacidad de los microorganismos en adaptarse al nuevo entorno (Shuler & Kargi, 2002). En el medio MRS, la dextrosa o glucosa como principal fuente de carbono se encuentra disponible de inmediato para ser consumidas por las BAL; mientras que en los medios L50 y L, constituidos por lactosuero, la lactosa es el azúcar principal y requiere de una hidrólisis para estar disponible en forma de glucosa y galactosa para ser consumida (Axelsson & Von Wright, 2012). Esto es corroborado por Srinivas et al. (1990), quien señala que la glucosa (dextrosa) es el azúcar más común utilizado en los medios de cultivo bacteriano debido a su rápida asimilación, mientras que la lactosa se hidroliza relativamente lento por lo que suele ser muy poco utilizada para las cepas de BAL.

Shuler & Kargi (2002) señala que los principales factores que influyen sobre el tiempo de la fase de latencia son: la adaptación del microorganismo al medio de cultivo antes de la inoculación, el tamaño de inóculo y la edad del cultivo. Para disminuir el tiempo de esta fase, el autor recomienda emplear inóculos grandes (5 % a 10 % v/v) y que las células sean jóvenes o

estén en fase exponencial. En esta investigación se empleó una concentración de inóculo del 1 % v/v y no se consideró realizar una previa adaptación de las BAL a los medios de cultivo MRS, L50 y L. Estos pudieron ser causales de que los tiempos adaptación sean largos en los tres medios (Tabla 19). Lo mencionado concuerda con el estudio de Urribarrí et al. (2004), quien describe una fase de latencia rápida gracias a la previa adecuación de *Lactobacillus helveticus* en lactosuero, antes de la fermentación sobre el mismo sustrato a pH 5.9 y pH 6.8 a 40 °C - 42 °C. A su vez, León et al. (2013) reportó que al incrementar un inóculo de lactobacilos del 2 % al 5 % p/v en medio a base de leche entera y lactosuero logró reducir en 2 h el tiempo de latencia.

Las fermentaciones con bacterias ácido lácticas dan como resultado la acidificación del medio de cultivo debido a la producción de ácido láctico a partir de una fuente de carbono (Axelsson & Von Wright, 2012). Esto explica la relación directamente proporcional entre la concentración de azúcares reductores y el descenso de pH que se observa en las curvas de la Figura 10. Mientras la concentración de azúcares y pH se reducen, la biomasa y el porcentaje de acidez (ácido láctico) van incrementado.

La mayor producción de ácido láctico (expresado en % de acidez) se determinó en el medio MRS con un valor de 0.996 %, mientras que en los medios formulados a base de lactosuero desproteinizado, L50 y L, se alcanzó un 0.191 % y 0.141 %, respectivamente. Estas diferencias en los porcentajes de acidez los podemos atribuir a lo reportado por García (2012), quien al suplementar el lactosuero con una fuente de nitrógeno incrementó la velocidad de bioconversión de lactosa a ácido láctico. Considerando que el caldo MRS en su composición tiene peptona, extracto de levadura y extracto de carne como fuente de nitrógeno (Tabla 5), se puede deducir que fueron estos compuestos los que permitieron que en el medio MRS se forme la mayor cantidad de ácido láctico. Zhang et al. (2007), reporta que la adición de extracto de levadura a lactosuero desproteinizado aumenta tanto la velocidad de acidificación y la

actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en el cultivo de *Lactobacillus bulgaricus* 11842. En sus estudios Benaissa et al. (2017), también encontró que al suplementar lactosuero con jugo de tomate al 30 % y extracto de levadura al 1 %, las concentraciones de biomasa de lactobacilos era comparable a la observada en MRS. Jakymec et al. (2001), también menciona que cuando la concentración de sustrato es mayor, la velocidad de consumo es mayor y por ende se genera mayor producción de ácido láctico, ocasionando rápidamente la disminución del pH en el medio. Esto concuerda con lo reportado por Cury et al. (2014), quien al utilizar *Lactobacillus casei* para evaluar la fermentación de lactosuero entero y desproteínizado, identificó que en los tratamientos con lactosuero entero e inóculos al 5 %, 10 % y 15 %, obtenía mayor conversión de lactosa a ácido láctico, mientras que en lactosuero desproteínizado inoculado con 5 % de *L. casei* había menor conversión a este ácido. De acuerdo con los resultados de esta investigación, se coincide que, la producción de ácido láctico en el medio MRS también se vio influenciada por una alta concentración de sustrato disponible, ya que, a tiempo de 0 h, la concentración de azúcares reductores en MRS fue de 12.08 g/L mientras que en L50 y L, fue de 6.29 g/L y 6.1 g/L, respectivamente.

Los medios L50 y L, denotan menor conversión a ácido láctico (Figura 8), pero la concentración neta de biomasa producida es similar a la del medio MRS (Figura 12; Tabla 19; Tabla 23). Esto se atribuye a que, por parte de las BAL, la fermentación de lactosa en el lactosuero desproteínizado se direccionó al desarrollo de biomasa y más no a la producción de ácido láctico como en el caso del MRS. Tal comportamiento puede ser relacionado al tamaño de inóculo que se empleó en esta investigación, ya que según menciona Cury et al. (2014) al emplear altas concentraciones de inóculo de *Lactobacillus casei* (entre 10 % y 15 %) se favoreció la síntesis de ácido láctico en lactosuero desproteínizado mientras que, el uso de bajas concentraciones iniciales de inóculo (5 %) favoreció al crecimiento de la biomasa.

La concentración de azúcares reductores en cada medio fue medida por la reacción del DNS (Miller, 1959), cuyo principio determina la presencia de grupos carbónicos libres (C=O, aldehídos o cetonas) o grupo reductor de azúcares como la glucosa, maltosa, celobiosa y lactosa. En el medio MRS, la concentración de estos azúcares desciende gradualmente con el tiempo, siendo evidente que la dextrosa (glucosa), un azúcar reductor, está siendo consumida continuamente por las BAL (Figura 9). Tal hecho no se presenta para los otros sustratos, debido a que en el medio L50 al tiempo de 16 h y 44 h; y en medio L, a las 42 h (Figura 9), se observa un aumento en la concentración de azúcares, suceso similar a lo reportado por Bohórquez (2016). Esto pudo ser causado, porque en los tiempos de incubación mencionados el método DNS detectó el carbón reductor (C1) de la glucosa y galactosa, que han resultado del proceso de hidrólisis de lactosa mediante las  $\beta$ -galactosidasas o fosfo- $\beta$ -d-galactosidasas producidas por las BAL (Axelsson & Von Wright, 2012). Posteriormente, estos dos monosacáridos ya disponibles en el medio son consumidos en las principales vías de fermentación de las BAL (Axelsson & Von Wright, 2012), suceso evidente en la Figura 9, donde las curvas de concentración de azúcares de L50 y L, decaen tras alcanzar altas concentraciones. La concentración inicial de azúcares reductores en L50 y L, es menor a la observada a lo largo del periodo de fermentación, debido a que en el tiempo inicial de 0 h, el método del DNS detectó únicamente el carbono reductor libre de la glucosa que formaba el disacárido de lactosa (Miller, 1959).

En la cinética del medio MRS (Figura 10a), entre las 38 h y 48 h, el crecimiento de la biomasa tiende a ser constante al igual que los valores de pH y el porcentaje de acidez, aún existe un ligero consumo de azúcares en este período. Este comportamiento coincide con el inicio de la fase estacionaria, donde los microorganismos ya no crecen pero se mantienen metabólicamente activos generando metabolitos secundarios según varios autores (Cury et al., 2014; León et al., 2013; Mondragón et al., 2006; Torres, 2014). Según la Figura 10b., y la

Figura 10c., al cabo de las 48 h de cultivo aún no es considerable el inicio de la fase estacionaria en los medios L50 y L, respectivamente, ya que todavía se evidencia crecimiento bacteriano en fase exponencial. Tal suceso puede atribuirse a que en los últimos tiempos de muestreo (38 h y 48 h) los azúcares de estos medios se mantenían disponibles en mayor cantidad debido a la hidrólisis de lactosa, como se mencionó anteriormente; es por ello que, en las curvas de concentración de azúcares del medio L50 (color rojo) de la Figura 10b., a las 44 h, hay un pico con concentración de azúcar de 7.15 g/L; al igual que la concentración de azúcares de 8.48 g/L a las 38 h de cultivo en medio L (Figura 10c.).

En el medio L50 se generó la mayor concentración neta de biomasa con un valor de 4.93 Log<sub>10</sub> UFC/mL, seguida por la obtenida en el medio MRS (4.73 Log<sub>10</sub> UFC/mL) y el medio L (4.44 Log<sub>10</sub> UFC/mL). Estos resultados coinciden con los determinados por el análisis de varianza y la prueba de Dunnet que se realizó para la biomasa neta de los tres ensayos realizados, puesto que se determinó que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la concentración neta de biomasa producida en los medios estudiados (Tabla 21; Tabla 22). La similitud de concentración de biomasa producida en los medios MRS, L50 y L, puede atribuirse a la semejanza de composición nutricional de los mismos, como se había mencionado precedentemente. Por otro lado, los parámetros cinéticos estimados por el modelo no lineal de Gompertz si resultaron diferentes entre los medios (Tabla 19), posiblemente a causa de la disponibilidad inmediata de ciertos nutrientes, como la fuente de carbono y nitrógeno que ya se discutió anteriormente.

Los tiempos de generación en los tres medios oscilan entre 2.27 h y 2.45 h, valores relativamente altos en comparación a tiempos de generación encontrados en otras investigaciones de cultivos de BAL. Varios autores (León et al., 2013; Rojas et al., 2015; Torres, 2014), han obtenido tiempos de generación entre 0.6 h a 1.04 h a condiciones de temperatura entre 35 °C a 40 °C. Por ello, se debe mencionar que los valores de tiempo de generación y

velocidad máxima de crecimiento varía considerablemente según la especie del microorganismo, el tipo de sustrato y las condiciones ambientales como la temperatura (Axelsson & Von Wright, 2012).

La producción de biomasa neta de BAL en el medio L a pesar de ser la más baja en comparación a MRS y L50, presenta valores favorables de velocidad máxima de crecimiento  $\mu = 0.20 \text{ h}^{-1}$  y tiempo de generación  $T_g = 2.27 \text{ h}$ , por lo que se puede concluir que las condiciones de este medio y las del cultivo pueden seguir siendo ajustadas para optimizar el crecimiento de las BAL, ya que según la investigación de Torres (2014) el lactosuero sin suplementar puede constituir un medio alternativo de bajo costo gracias a su calidad nutricional, ya que en su estudio del comportamiento de *Lactobacillus rhamnosus* en diferentes formulaciones a base de lactosuero, encontró que la biomasa resultante en lactosuero sin suplementar alcanzó una concentración de 11.23 LOG UFC/mL frente a 13.43 LOG UFC/mL obtenida en medio MRS.

Los parámetros cinéticos determinados en MRS y L50 son muy similares (Tabla 19), esto se podría atribuir a que el lactosuero al ser suplementado con las sales minerales del medio MRS se acerca a la composición nutricional de este medio. Como lo menciona Hayek et al., (2019), el lactosuero en su composición tiene una alta carga de lactosa, vitaminas aminoácidos, factores de crecimiento, ácidos grasos y minerales, que lo convierten en un sustrato ideal para las bacterias ácido lácticas.

Uno de los principales objetivos de la biotecnología es mejorar los procesos de fermentación, al reducir los costos de producción y aumentando la productividad de estos. En esta investigación se logró determinar, que no existe diferencia significativa en la concentración de biomasa de BAL producida en el medio MRS y los medios a base de lactosuero, L50 y L. Por lo tanto, el lactosuero podría emplearse como sustrato alternativo de bajo costoso para

este tipo de procesos biotecnológicos, pero es necesario ir ajustando las condiciones de cultivo a fin de obtener las cantidades de biomasa deseada en tiempos de producción adecuados.

## Capítulo 6

### Conclusiones

- Mediante la observación de morfología celular de los aislados bacterianos y por pruebas de catalasa, oxidasa y capacidades tecnológicas se identificó cuatro bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., y *Leuconostoc* spp.
- Considerando la capacidad de acidificación de la leche, compatibilidad de crecimiento y el tipo de fermentación de los aislados L2 y L14 de las BAL, se formó un cultivo iniciador mixto de posible aplicación en la fermentación de alimentos lácteos.
- El lactosuero suplementado con sales de Man, Rogosa, Sharpe (MRS), lactosuero puro y medio líquido MRS no evidenciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la producción de biomasa de BAL, debido a que alcanzaron concentraciones de 4.93 Log<sub>10</sub> UFC/mL, 4.44 Log<sub>10</sub> UFC/mL y 4.73 Log<sub>10</sub> UFC/mL, respectivamente.
- A condiciones de temperatura ambiente y pH 6.3 se determinó que las velocidades específicas máximas de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de las BAL en los medios de cultivo MRS, L50 y L, no presentan una diferencia apreciable para distinguir el mejor medio de cultivo, ya que sus valores fueron  $0.19 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ ,  $0.19 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$  y  $0.20 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.
- Por la composición nutricional y bajo costo de adquisición, el lactosuero fue un sustrato favorable para la producción de biomasa de BAL nativas de leche, facilitando aplicaciones potenciales en el cultivo de cepas iniciadoras y probióticos de la industria alimenticia y farmacéutica.

### **Recomendaciones**

- Ensayar pruebas de capacidad tecnológica de los aislados de BAL a diferentes temperaturas de incubación para determinar los rangos de mayor funcionalidad.
- Ejecutar pruebas de posibles propiedades probióticas y de cultivos iniciadores de los aislados de BAL, analizando: capacidad antimicrobiana, tolerancia a sales, resistencia a antibióticos y crecimiento a diferentes valores pH y temperaturas.
- Aplicar pruebas bioquímicas (API 50CHL) o moleculares (ADNr 16s) para identificar el género y especie de los cuatro aislados de BAL.
- Evaluar la cinética de crecimiento de las BAL con varias formulaciones de lactosuero, diferentes tamaños de inóculo, otros rangos de temperatura y diferentes tiempos de fermentación.

## Capítulo 7

### Bibliografía

- Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. ., & Moroni, P. (2016). he bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies (Review). *Molecular BioSystems*, 12(8), 2359–2372.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario del Ecuador [AGROCALIDAD]. (2020). *INSTRUCTIVO INT/CL/010 “TOMA DE MUESTRAS DE LECHE CRUDA Y SUERO DE LECHE.”* <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/calech3.pdf>
- Agencia Nacional de Regulación Control y Vigilancia Sanitaria. (2019). *Industria láctea nacional se potencia con el apoyo técnico de Arcsa – Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria.* <https://www.controlsanitario.gob.ec/industria-lactea-nacional-se-potencia-con-el-apoyo-tecnico-de-arcsa/>
- Ali, A. A. (2011). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk in Khartoum state, Sudan. *International Journal of Dairy Science*, 6(1), 66–71. <https://doi.org/10.3923/ijds.2011.66.71>
- Alsaed, A. K., Ahmad, R., Aldoomy, H., El-Qader, S. A., Saleh, D., Sakejha, H., & Mustafa, L. (2013). Characterization, concentration and utilization of sweet and acid whey. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(2), 172–177. <https://doi.org/10.3923/pjn.2013.172.177>
- Alvarado, C., Chacón, Z., Otoniel, J., Guerrero, G., & López, C. (2007). AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DE UN QUESO VENEZOLANO AHUMADO ANDINO ARTESANAL. SU USO COMO CULTIVO INICIADOR. Isolation, Identification and Characterization of Lactic Acid Bacterias from Venezuelan Artisanal And. *Revista Científica Universidad Del Zulia*, XVII, 301–308.
- Asfour, H., Gamal, I., & Darwish, S. (2016). Phenotypic Characterization and Molecular Identification of Some Lactic Acid Producing Bacteria in Raw Milk of Different Animal

Species. *Assiut Veterinary Medical Journal Assiut Vet. Med. J*, 62(149), 47–59.

[www.aun.edu.eg](http://www.aun.edu.eg)

Aslim, B., Yüksekdag, Z. N., Beyatli, Y., & Mercan, N. (2005). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 673–677. <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3613-2>

Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1973). AOAC 973.41. PH of water. In *AOAC Official Methods of Analysis*.

Association of Official Analytical Chemists [AOAC]. (1984). Section 16.023. Titratable acidity. In *AOAC Official Methods of Analysis* (14th ed.).

Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Motzezak, R. H., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease Content of total, Reducing and Non-Reducing Sugars in Agave cocui Trelease. *MULTICIENCIAS*, 12, 129–135.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In S. Salminen, A. Von Wright, & A. C. Ouwehand (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1998.33201914.x>

Axelsson, L., & Von Wright, A. (2012). Current Taxonomic Position of LAB. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (4th ed.). CRC Press.

Aziz, T., Khan, H., Bakhtair, S. M., & Naurin, M. (2009). Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of buffalo, cow and sheep. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 19(4), 168–173.

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294.

[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)

- Beckett, T. (2013). *Litmus Milk Medium*. www.remel.com
- Bedón, L., & Quintana, M. (2018). *Aislamiento, producción y comercialización de un consorcio de bacterias ácido-lácticas para fermentación y conservación de forrajes*. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.
- Benaissa, M., Zadi-Karam, H., & Karam, N.-E. (2017). Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*. *African Journal of Biotechnology*, 16(30), 1630–1637. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16088>
- Bin Masalam, M. S., Bahieldin, A., Alharbi, M. G., Al-Masaudi, S., Al-Jaouni, S. K., Harakeh, S. M., & Al-Hindi, R. R. (2018). Isolation, Molecular Characterization and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria in Saudi Raw and Fermented Milk. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7970463>
- Bohórquez, D. (2016). *Evaluación de la producción de galacto-oligosacáridos (GOS) utilizando una  $\beta$ -galactosidasa a partir de la lactosa del lactosuero* [Universidad de Sucre]. [https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/581/1/T637.358 B677.pdf](https://repositorio.unisucre.edu.co/bitstream/001/581/1/T637.358%20B677.pdf)
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Burns, P., Vinderola, G., Molinari, F., & Reinheimer, J. (2008). Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, 61(2), 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2008.00393.x>
- Calderón, J. (2017). Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de sustrato complejo. Fundación Universidad de América. <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6598>
- Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H., & Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp: *Lactis*. *Revista*

*Científica*, 18(5), 582–588.

Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., & Spiegel, C. (2005). Prueba de difusión por disco. In M. Coyle (Ed.), *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*.

<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

Centeno, J. A., Cepeda, A., & Rodriguez-Otero, J. L. (1996). Lactic acid bacteria isolated from Arzuva cows' milk cheese. *International Dairy Journal*, 6(1), 65–78.

[https://doi.org/10.1016/0958-6946\(96\)80001-X](https://doi.org/10.1016/0958-6946(96)80001-X)

Centro de la Industria Láctea del Ecuador. (2018). *Datos Sector Lácteo-Ecuador*.

[https://e152f73b-81b4-4206-a6ee-](https://e152f73b-81b4-4206-a6ee-8b984b6a13b0.filesusr.com/ugd/6cc8de_513a9bb8db76451a9a74586d7902bb3b.pdf)

[8b984b6a13b0.filesusr.com/ugd/6cc8de\\_513a9bb8db76451a9a74586d7902bb3b.pdf](https://e152f73b-81b4-4206-a6ee-8b984b6a13b0.filesusr.com/ugd/6cc8de_513a9bb8db76451a9a74586d7902bb3b.pdf)

Chanfrau, J. M., Núñez, J., Lara, M. V., Rivera, L. M., Trujillo, L. E., & Cuaran, M. J. (2017).

Valorización del suero de leche: Una visión desde la biotecnología Milk whey valorization: An overview from Biotechnology. *Bionatura*, 468–476.

<https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.11>

Chowdhury, A., Hossain<sup>1</sup>, M. N., Nure, J., Fakruddin, M., Billah, M., & Morshed, M. (2012).

Screening of *Lactobacillus* spp. from Buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial Activity. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 03(08). <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000156>

Conn, H. W. (1892). The isolation of rennet from bacteria cultures. *Science*, 20(509), 253–254.

<https://doi.org/10.1126/science.ns-20.509.253>

Cury, K., Arteaga, M., Martínez, G., Lujan, D., & Durango, A. (2014). Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Revista Colombiana Biotecnología*, 1(1), 137–145.

De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF

LACTOBACILLI. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V., Degeest, B., & Vanningelgem, F. (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, 13(8), 707–717. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00105-5)

Degeest, B., Vanningelgem, F., & De Vuyst, L. (2001). Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 747–757.

Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., Plaizier, J. C., & Khafipour, E. (2018). Invited review: Microbiota of the bovine udder: Contributing factors and potential implications for udder health and mastitis susceptibility. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10605–10625. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>

Díaz, A., Barrio, M. del P., Darré, M., López, M., Cofre, M., Condorí, M., Lazarte, D., Trevisán, V., Peirano, C., Del Bó, C., Cañate, A., & Alcaide, C. (2017). Análisis Microbiológico de los alimentos Microorganismos Indicadores. In F. Trinks (Ed.), *Anmat* (Vol. 3). [http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_vol\\_iii.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_iii.pdf)

Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press.

Dragone, G., Mussatto, S. I., Almeida e Silva, J. B., & Teixeira, J. A. (2011). Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1977–1982. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.045>

El Telégrafo. (2019). Ganaderos se oponen a industrias que mezclan la leche con lactosuero. *El Telégrafo*. <https://www.eltelgrafo.com.ec/noticias/economia/4/ganaderos-leche-suero>

- Elliker, P., Hannesson, G., & Anderson, A. (1956). An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *Journal of Dairy Science*, 39, 1611– 1612.
- FAO;OMS. (2001). Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. *Probióticos En Los Alimentos*, 1–46. <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>
- Frazier, W. (1924). THE INFLUENCE OF SOME BACTERIAL ENZYMES ON THE, WEAT COAG'ULATION OF MILK. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 8).  
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(25\)93970-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(25)93970-7)
- García, C. (2012). Producción de ácido láctico l(+) a partir de lactosuero utilizando *Lactobacillus casei* en un cultivo batch. Universidad de Córdoba.
- Geeraerd, A. H., Valdramidis, V. P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., & Van Impe, J. F. (2004). Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: Incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 229–244.  
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00388-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00388-X)
- Gemelas, L., Rigobello, V., Ly-Chatain, M. H., & Demarigny, Y. (2013). Selective Lactococcus Enumeration in Raw Milk. *Food and Nutrition Sciences*, 04(09), 49–58.  
<https://doi.org/10.4236/fns.2013.49a2008>
- Giangiaco, R. (2000). *Milk Testing, Quality Control, Hygiene and Safety*.
- Gibson, A. M., Bratchell, N., & Roberts, T. A. (1988a). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 6(2), 155–178.  
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90051-7)
- Gibson, A. M., Bratchell, N., & Roberts, T. A. (1988b). Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and

storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 6(2), 155–178.

[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90051-7)

Glass, L., & Hedrick, T. I. (1976). Nutritional Composition of Sweet-and Acid-Type Dry Wheys. I. Major Factors Including Amino Acids . In *Journal of Dairy Science* (Vol. 60).

[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83852-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83852-6)

González, P. (2019a). Gobierno prohíbe comercializar suero de leche 'líquido'; Agricultura no está de acuerdo con la penalización en el COIP. *El Comercio*.

<https://www.elcomercio.com/actualidad/prohibicion-suero-leche-liquido-coip.html>

González, P. (2019b, September 25). Conozca los tipos de productos que contienen suero de leche. *El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/elaboracion-productos-suero-leche-arcsa.html>

Granda, A. (2018). *Cinco de 67 industrias lecheras procesan el lactosuero*. El Telégrafo.

<https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/industrias-lecheras-procesan-lactosuero>

Greifová, G., Májeková, H., Greif, G., Body, P., Greifová, M., & Dubničková, M. (2017). Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*. *Folia Microbiologica*, 62(6), 515–524. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0524-9>

Hardy Diagnostics. (2008). *Tiras de oxidación OxiStrips™ y hisopos de oxidación OxiSticks™: prueba rápida de microbiología*.

[https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/content/hugo/oxistripsoxisticks.htm](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/oxistripsoxisticks.htm)

Hayek, S., Gyawali, R., Aljaloud, S., Krastanov, A., & Ibrahim, S. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*.

<https://doi.org/10.1017/S002202991900075X>

Hébert, E., Raya, R., & De Giori, G. (2004). Evaluation of minimal nutritional requirements of

- lactic acid bacteria used in functional food. In *Environmental Microbiology* (pp. 139–148). Springer.
- Huang, L. (2013). Optimization of a new mathematical model for bacterial growth. *Food Control*, 32(1), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.019>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (1973). *Norma Técnica Ecuatoriana INEN 18. Leche. Ensayo de reductasas* (Vol. 3). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/18.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (1982). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 14:1983. Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas*.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (1983). *NTE INEN 11. Leche. Determinación de la densidad relativa. 3, 1,2*. <https://archive.org/details/ec.nte.0011.1984/mode/2up>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (1984). Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 13. Leche. Determinación de la acidez titulable. In *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. (Vol. 3). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/13.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2008). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 9: 2008. Leche cruda. Requisitos*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/9.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2011a). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1500. “Leche. Métodos de ensayos cualitativos para la determinación de calidad.”* <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1500.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2011b). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2594:2011. Suero de leche líquido. Requisitos*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/2594.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización [INEN]. (2014). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN-ISO 707. Leche y productos lácteos. Directrices para la toma de muestras (ISO 707:2008, IDT)*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-iso-707-ext.pdf>

- Jakymec, M., Morán, H., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Ramones, E. (2001). Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista Científica FCV-Universidad De2001. Zulia.*, 11(1), 53–59.
- Karakas-Sen, A., & Karakas, E. (2018). Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Bioscience Journal*, 985–999.  
<https://doi.org/10.14393/bj-v34n2a2018-34517>
- Kareb, O., Champagne, C. P., Jean, J., Gomaa, A., & Aïder, M. (2018). Effect of electro-activated sweet whey on growth of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus* strains under model growth conditions. *Food Research International*, 103, 316–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.060>
- Khaton, R., Hasnat, M. A., Rahman, S., & Rahman, M. M. (2014). Public Health Safety in Relation To Microbiological Quality of. *Bangl. j. Vet. Med.*, 12(2), 231–236.
- Kotoupas, A., Rigas, F., & Chalaris, M. (2007). Computer-aided process design, economic evaluation and environmental impact assessment for treatment of cheese whey wastewater. *Desalination*, 213(1–3), 238–252. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.03.611>
- Kumar, A., & Kumar, D. (2014). Isolation and characterization of bacteria from dairy samples of Solan in Himachal Pradesh for identification of *Lactobacillus* spp. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(2), 110–114.
- Lee, K. (2005). Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochemistry*, 40(5), 1559–1564.
- León, D., Calderón, B., Martínez, A., Sanchez, E., Zulato, A., Camacho, I., Arreondo, A., & Salgado, R. (2013). Formulación y Optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 12, 133–144.  
<https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=>

8&ved=0ahUKEwicouzo6o7SAhXI7YMKHfn-

DGgQFggbMAA&url=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4745491.pdf&usg=AFQjCNHx0TaliTPzrA5NjUo8qwqAc9BELA&sig2=kEHhXiYtC

Liu, J., Dantoft, S. H., Würtz, A., Jensen, P. R., & Solem, C. (2016). A novel cell factory for efficient production of ethanol from dairy waste. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 33.

<https://doi.org/10.1186/s13068-016-0448-7>

Manero, A., & Blanch, A. R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key.

*Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4425–4430.

<https://doi.org/10.1128/aem.65.10.4425-4430.1999>

Martinez-Castro, I., Olano, A., & Corzo, N. (1986). Modifications and interactions of lactose with mineral components of milk during heating processes. *Food Chemistry*, 21(3), 211–221.

[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(86\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(86)90019-1)

McDonald, L. C., McFeeters, R. F., Daeschel, M. A., & Fleming, H. P. (1987). A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(6), 1382–1384.

<https://doi.org/10.1128/aem.53.6.1382-1384.1987>

Metro Ecuador. (2019). *Gobierno prohíbe comercializar el suero líquido de leche | Metro Ecuador*. Metro Ecuador.

<https://www.metroecuador.com.ec/ec/noticias/2019/09/21/gobierno-prohibe-comercializar-suero-leche-liquido.html>

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar.

*Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Mondragón, M. ; Nájera, M., Juárez, C., Galíndez, J., Ruiz, N., & Cristiani, E. (2006). Lactic acid bacteria production from whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134(3), 223–232.

<https://doi.org/10.1385/ABAB:134:3:223>

- Morais, J. (2004). *Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Motta, A. D. S., & Gomes, M. D. S. M. (2015). TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA: THE IMPORTANCE OF THESE MICROORGANISMS FOR FOOD. *Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(3), 172. <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v70i3.403>
- Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D., & Tesfaye, A. (2019). In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented ethiopian food products. *International Journal of Microbiology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7179514>
- Nickels, C., & Leesment, H. (1964). Method for differentiation and quantitative determination of starter bacteria. *Milchwissenschaft*, 19, 374–378.
- Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., & Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3691–3701. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3691-3701.2002>
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 150, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>
- Panesso, G. M., Pardo, M. F., & Sepúlveda, L. E. (2015). *PRODUCCIÓN DE ACIDO LACTICO A PARTIR DEL SUERO DE LECHE*. [https://www.researchgate.net/publication/278414362\\_Produccion\\_de\\_Acido\\_lactico\\_lactobacillus\\_casei](https://www.researchgate.net/publication/278414362_Produccion_de_Acido_lactico_lactobacillus_casei)
- Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.

- Pasmay, H. (2015). "Caracterización del Suero Lácteo de una Quesería Artesanal, localizada en la Zona 5 del Ecuador" [Escuela Superior Politécnica del Litoral]. <https://bit.ly/2zQ89QI>
- Pérez, G., Larrosa, E., & Escámez, F. (2016). Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. In *Anuario de Jóvenes Investigadores* (Vol. 9).
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Bru, E., De Valdez, G. F., & Mozzi, F. (2012). Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. *Journal of Dairy Research*, 79(2), 201–208. <https://doi.org/10.1017/S0022029912000040>
- Portland Community College. (2015). *Litmus Milk*. John Volpe's Microbiology Site. [http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lab/differentialMedia/litmus\\_milk.htm](http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lab/differentialMedia/litmus_milk.htm)
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Rama, G. R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M. J., & Volken de Souza, C. F. (2019). Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012>
- Ramírez, C., & Vélez, J. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Informacion Tecnologica*, 27(6), 115–128. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>
- Ramírez, G. (2011). *DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MODELOS PREDICTIVOS DINÁMICOS DEL CRECIMIENTO DE Staphylococcus aureus EN PRODUCTOS CÁRNICOS PREVIO AL PROCESO DE COCCIÓN.*
- Riaz Rajoka, M. S., Shi, J., Zhu, J., Shao, D., Huang, Q., Yang, H., & Jin, M. (2017). Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 35–45. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8005-7>

- Robalino, J., & Mosquera, M. (2017). *Obtención de ácido láctico a partir de suero de leche mediante un proceso biofermentativo utilizando un cultivo mesófilo homofermentativo*.
- Rocha, A. (2017). *Caracterización fisicoquímica y microbiológica del lactosuero de queso fresco pasteurizado de pequeños y medianos productores del cantón Cayambe*. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Rojas, A. M., Montaña, L. P., & Bastidas, M. J. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5–10.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604>
- Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(3), 479–498.  
<https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>
- Sacho, R. (2015). *Ajuste de modelos matemático de crecimiento de bacterias lácticas en queso tipo Paria en condiciones isotérmicas y no isotérmicas*. Universidad Nacional del Altiplano .
- Sánchez, A. (2018). *La biotecnología, el nexo entre empresarios y académicos*. Cultura Científica - UTPL. <https://culturacientifica.utpl.edu.ec/2018/05/la-biotecnologia-el-nexo-entre-empresarios-y-academicos/>
- Sánchez, J., Ortiz, M. C., & Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp. Citric acid production from whey by fermentation using *Aspergillus* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 43–54.
- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and Bioenergy*, 33(12), 1687–1692.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.002>
- Serna-Cock, L., & Rodríguez, A. (2009). PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE ACIDO

LÁCTICO: ESTADO DEL ARTE. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 54–65.

<https://doi.org/10.1080/11358120509487672>

Shuler, M., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering: Basic concepts* (2nd (ed.)). Prentice Hall PTR.

Smithers, G. W. (2008). Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold.” *International Dairy Journal*, 18(7), 695–704. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>

Soriano-Perez, S., Flores-Velez, L., Alonso-Davila, P., Cervantes-Cruz, G., & Arriaga, S. (2012). Production of lactic acid from cheese whey by batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Annals of Microbiology*, 62(1), 313–317. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0264-z>

Soydemir, E. (2008). *Determination of Whey-Based Medium Requirements and Growth Characteristics for the Production of Yoghurt Starter Cultures* (Issue December) [İzmir Institute of Technology].  
<https://openaccess.iyte.edu.tr/bitstream/handle/11147/3561/T000772.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Srinivas, D., Mital, B., & Garg, S. (1990). Utilization of sugars by *Lactobacillus acidophilus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 51–57.

Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6), 807–813.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16350018>

Teuber, M. (2005). *Lactococcus*. In P. De Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K.-H. Schleifer, & W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 711–722). Springer.

Tillotson, J. E. (2004). *Modeling Microbial Responses in Food* (R. McKellar & X. Lu (eds.)). CRC.

Tolle, A. (1980). The Microflora of the Udder. In: *Factors Influencing the Bacteriological Quality*

of Raw Milk. *International Dairy Federation Bulletin*, 12.

- Torres, M. (2014). *EVALUACIÓN TECNOLÓGICA DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE BIOMASA DE MICROORGANISMO PROBIÓTICOS EN MEDIO DE CULTIVOS FORMULADOS CON SUERO LÁCTEO Y PREBIÓTICOS*. Universidad Nacional de Colombia.
- Tulini, F. L., Hymery, N., Haertlé, T., Le Blay, G., & De Martinis, E. C. P. (2016). Screening for antimicrobial and proteolytic activities of lactic acid bacteria isolated from cow, buffalo and goat milk and cheeses marketed in the southeast region of Brazil. *Journal of Dairy Research*, 83(1), 115–124. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000606>
- Urribarrí, L., Vielma, A., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Ramones, E. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica Universidad Del Zulia*, 14.  
[http://redalyc.uaemex.mx/http://148.215.1.128/redalyc\\_captura/src/registro/Portadilla.jsp?cv=erevit=95914403&CveEntRev=95919/01/20098:28:03](http://redalyc.uaemex.mx/http://148.215.1.128/redalyc_captura/src/registro/Portadilla.jsp?cv=erevit=95914403&CveEntRev=95919/01/20098:28:03)
- Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Kutchinskaya, V., & Briñez, W. (2008). *Growth Prediction of Lactococcus lactis subsp. lactis in Sterile Skimmed Milk as a Function of Temperature: Vol. XVIII*.
- Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & De Vuyst, L. (2004). Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains Is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 900–912.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.900-912.2004>
- Vázquez, S., Crosa, M., Rey, F., & Lopretti, M. (2009). Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2. *Innotec*, 4, 10–14.

- Velugoti, P. R., Bohra, L. K., Juneja, V. K., Huang, L., Wesseling, A. L., Subbiah, J., & Thippareddi, H. (2011). Dynamic model for predicting growth of *Salmonella* spp. in ground sterile pork. *Food Microbiology*, *28*(4), 796–803. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.007>
- Wang, Y., Xie, J., Li, Y., Dong, S., Liu, H., Chen, J., Wang, Y., Zhao, S., Zhang, Y., & Zhang, H. (2016). Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang reduces pro-inflammatory cytokine production and hepatic inflammation in a rat model of acute liver failure. *European Journal of Nutrition*, *55*(2), 821–831. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0904-3>
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, *21*(6), 269–274. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Zafar, S., & Owais, M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, *27*(3), 295–298. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.05.009>
- Zambrano, R., & Pinto, W. (2019). ¿Bebida láctea o leche pura?, dilema del sector productivo en Ecuador. *El Universo*. <https://www.eluniverso.com/noticias/2019/09/07/nota/7506160/uso-suero-leche-divide-sector-lacteo>
- Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *18*(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90005-2)