



Aislamiento y caracterización de bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano

Palma Quillupangui, Blanca Lisseth y Villaprado Guerrero, Gema Daniela

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

PhD. Sungey Naynee, Sánchez Llaguno

23 de agosto del 2023

Reporte de verificación



TESIS FINAL Gema Villaprado y Blanc...

Scan details

Scan time:
August 21th, 2023 at 15:54 UTC

Total Pages:
97

Total Words:
24160

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	2.9%	692
● Minor Changes	1.5%	363
● Paraphrased	3.9%	948
● Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage
● AI text
● Human text

Firma:



Firmado electrónicamente por:

SUNGEY NAYNEE
SANCHEZ
LLAGUNO

Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD

CC: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento De Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano”** fue realizado por las señoritas **Palma Quillupangui, Blanca Lisseth y Villaprado Guerrero, Gema Daniela**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2023

Firma:



.....
Sánchez Llaguno Sungey Naynee, PhD

CC: 1205348673

Directora del Proyecto de Investigación



Departamento De Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Nosotras, **Palma Quillupangui, Blanca Lisseth y Villaprado Guerrero, Gema Daniela**, con cédula/cédulas de ciudadanía n° 172471813-3 y n° 1721311064, declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano”** es de nuestra 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.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2023

Firma

Palma Quillupangui Blanca Lisseth

C.C.: 172471813-3

Villaprado Guerrero Gema Daniela

C.C.: 172131106-4



Departamento De Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Nosotras, **Palma Quillupangui, Blanca Lisseth y Villaprado Guerrero, Gema Daniela**, con cédulas de ciudadanía n° 172471813-3 y n° 1721311064, autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Aislamiento y caracterización de bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 23 de agosto del 2023

Firma

Palma Quillupangui Blanca Lisseth

C.C.: 172471813-3

Villaprado Guerrero Gema Daniela

C.C.: 172131106-4

Dedicatoria

Dedico este trabajo primero a Dios quien me dio la salud, la sabiduría y la fortaleza para salir adelante cada día.

A mis padres Luis y Mercedes, que han sido mi apoyo incondicional durante esta etapa, que siempre me han dado la motivación y la fuerza para poder salir adelante.

A mi hija Danna Natasha, que es el pilar de mi vida, mi principal motivación de cada día por salir adelante.

A mi esposo Elías, quien nunca ha dejado de apoyarme para que cumpliera esta meta.

A mis hermanos Angel, Alex y Enrique que han sido mis ejemplos a seguir, quienes nunca han dudado en darme una mano cuando los he necesitado.

Gema

Dedico este logro a una persona fundamental en mi vida: a mí misma. A lo largo de este desafiante camino de investigación y aprendizaje, he descubierto mi capacidad para perseverar, superar obstáculos y alcanzar metas que alguna vez parecieron inalcanzables. Esta tesis es un testimonio de mi dedicación y determinación, y me enorgullece dedicármela a mí misma.

A mis amados padres, Doris y Vicente, les dedico un lugar especial en estas palabras. Su amor incondicional, apoyo constante y sacrificio han sido la base de todo lo que he logrado. A mi querido hermano Kevin, a quien he admirado y quien ha sido mi compañero de aventuras desde siempre. Tu aliento, consejos y complicidad han sido un faro en mi camino.

A mi familia, cuyo amor y apoyo incondicional han sido mi roca a lo largo de los años. Cada uno de ustedes ha contribuido a mi crecimiento y formación de maneras únicas.

A Jorge, quien ha sido mi compañero en cada paso de esta travesía. Tu paciencia, comprensión y aliento inquebrantable han sido mi mayor fortaleza. Tu presencia en mi vida ha hecho que los desafíos sean más ligeros y los triunfos más dulces.

Blanca

Agradecimiento

En primer lugar, agradezco a Dios por darme sabiduría y fuerzas para poder cumplir con esta meta, a pesar de las adversidades nunca me abandono durante este trayecto.

Agradezco a mis padres que nunca dudaron en apoyarme cuando quise continuar con mis estudios, gracias por creer en mí y en mi capacidad. A mi madre que ha sido mi principal soporte durante este trayecto, agradezco infinitamente cada apoyo que me ha dado.

A mi hija, que fue mi principal motivación para superarme como persona y su amor incondicional me ayudo a poder hacer realidad este sueño; agradezco los sacrificios que tuvo que pasar, por el tiempo que debía dedicarle a este trayecto.

A mi esposo Elías, por su apoyo y su amor que me ha dado, a pesar de las adversidades, ha sabido darme la motivación para culminar esta meta.

A mis sobrinas, cuñadas y demás familiares les agradezco porque han sido parte de esta trayectoria universitaria, que siempre me han dado fuerzas y palabras de aliento.

A mi Directora de Tesis Dra. Sungey, quien ha demostrado ser una persona admirable y muy ética profesionalmente, agradezco infinitamente su dedicación, paciencia, su guía y el tiempo dedicado a este trabajo de titulación.

A todos los ingenieros, laboratoristas y demás docentes que nos dieron su apoyo, nos brindaron sus conocimientos y nos hicieron más fácil este camino.

A mi compañera y amiga Blanca, agradezco la paciencia que me ha tenido y la amistad incondicional que me ha demostrado durante todos estos años. Gracias por tu esfuerzo y tu dedicación para poder finalizar con éxitos este trabajo de titulación.

Gema

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han sido parte fundamental en este viaje académico y personal. Sin su apoyo incondicional, este logro no habría sido posible.

En primer lugar, quiero extender mi gratitud a mis padres Doris y Vicente por su amor, sacrificio y constante aliento, han sido mi roca en cada etapa de mi vida.

A mi querido hermano, Kevin, agradezco por ser mi compañero y confidente. Tus palabras de aliento y apoyo han sido un motor impulsor en cada desafío que enfrenté.

Agradezco también a toda mi familia, quienes siempre estuvieron ahí para brindar su apoyo y alegría en cada paso del camino y también a Jorge, le agradezco por su amor incondicional, paciencia y comprensión. Tu constante aliento y apoyo emocional han sido un bálsamo en los momentos de presión.

Mi más sincero agradecimiento a la doctora Sungey, cuya guía experta y compromiso con mi crecimiento académico han sido invaluable. Sus conocimientos y dedicación han dejado una marca perdurable en mi desarrollo.

Y por último a mi compañera de tesis Gema, mi sincero agradecimiento a una persona muy especial que ha compartido conmigo este desafiante y enriquecedor viaje de investigación.

En conjunto, cada uno de ustedes ha contribuido de manera significativa en mi vida y en la realización de esta tesis. Este logro no solo es mío, sino también de aquellos que me han rodeado con su amor y respaldo.

Blanca

Índice de contenido

Carátula	1
Reporte de verificación	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimiento	8
Índice de tablas	17
Índice de figuras	21
Resumen	22
Abstract	23
Capítulo I	24
Introducción.....	24
Objetivos.....	1
Objetivo General.....	1
Objetivos específicos.....	1
Hipótesis.....	2
Diseño AXBXC	2
Hipótesis de Factor A (Fuentes de carbono y nitrógeno)	2
Hipótesis del Factor B (Concentración).....	2

Hipótesis del Factor C (Tiempo).....	2
Hipótesis de la interacción Factores AXBXC (Fuentes de carbono y nitrógeno, Concentración y Tiempo).....	2
Diseño AXB	3
Hipótesis de Factor A (Solución).....	3
Hipótesis de Factor B (Microorganismos patógenos).....	3
Hipótesis de Interacción de los Factor AXB (Solución y Microorganismos patógenos)	3
Capítulo II	4
Revisión de literatura	4
Suero de leche.....	4
Composición del lactosuero.....	4
Calidad nutricional del Suero.....	5
Clases de suero de leche	5
Suero ácido.	6
Suero dulce.	6
Suero Dulce Permeado.....	6
Microbiología del suero.....	7
Producción del lactosuero	8
Manejo ambiental del lactosuero.....	8
Uso del Suero	9
Ácido Láctico	9
Usos del ácido láctico	10

	12
Propiedades fisicoquímicas de ácido láctico.....	10
Bacterias del ácido láctico	12
Fermentación.....	14
Fermentación láctica.....	14
Bacteriocinas	14
Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas (LAB)	15
Clasificación de las bacteriocinas.....	16
Mecanismo de acción de las Bacteriocinas	18
Uso de bacteriocinas	19
Industria alimentaria.....	19
Bacteriocinas de Lactobacillus	20
Agente Antimicrobiano	20
Capítulo III	21
Metodología.....	21
Ubicación del área de investigación.....	21
Ubicación política.....	21
Ubicación ecológica.....	21
Ubicación geográfica	22
Materiales	23
Análisis fisicoquímicos del Suero de Leche bovino	23
Acidez.....	23

Ceniza.....	23
Densidad relativa.....	24
Grados Brix.....	24
Humedad	25
pH	25
Porcentaje de Grasa	26
Proteína	27
Análisis microbiológico del Suero de Leche bovino.....	27
Fermentación del Suero de Leche bovino.....	28
Caracterización microbiológica	29
Purificación de colonias	30
Identificación microbiana de bacterias ácido lácticas	30
Tinción Gram.....	30
Catalasa	31
Oxidasa	31
Conservación de las bacterias lactobacillus plantarum	32
Preparación del inóculo en caldo madre	33
Instalación del sistema de fermentación	33
Muestreo del parámetro cinético	34
Solución de bacteriocinas libres de células	35
Conservación de bacteriocinas	36

	14
Obtención de Microorganismos patógenos.....	37
Antibiograma	37
Métodos	38
Análisis fisicoquímicos del Suero de Leche bovino	38
Evaluación de la acidez	38
Determinación de la ceniza.....	39
Análisis de la densidad relativa.....	40
Determinación de los grados brix	40
Evaluación de la humedad.....	40
Análisis del pH.....	41
Evaluación del porcentaje de grasa.....	41
Determinación del porcentaje de proteína.....	42
Análisis microbiológico del suero de leche bovino.....	43
Proceso de fermentación del suero	44
Siembra de la muestra fermentada	44
Purificación de colonias	44
Identificación microbiana y molecular de bacterias ácido lácticas	45
Proceso de la Tinción gran	45
Proceso de la catalasa.....	45
Proceso de la oxidasa	45
Caracterización molecular.....	46

Conservación de las bacterias lactobacillus plantarum	46
Preparación del inóculo en el caldo madre	46
Instalación del sistema de fermentación	46
Muestreo de parámetros cinéticos ya establecidos	47
Preparación de la solución bacteriocina libre de células	47
Proceso para el antibiograma.....	47
Obtención de los microorganismos patógenos	47
Determinación de la actividad inhibitoria	48
Diseño experimental.....	49
Factores y niveles para el estudio de bacteriocinas	49
Factores y niveles para el antibiograma.....	50
Interacción de los tratamientos a estudiar.....	50
Modelo matemático del modelo experimental trifactorial (A*B*C)	52
Modelo matemático del modelo experimental bifactorial (A*B)	53
Repeticiones	53
Análisis estadístico	53
Tipo de diseño experimental.....	55
Análisis funcional	55
Variables a medir	55
Capítulo IV	56
Resultados.....	56

Observación fisicoquímicos y microbiológica del Suero de Leche bovino.....	56
Resultados de la caracterización e identificación de la bacteria ácido láctica (<i>Lactobacilos plantarum</i>).....	57
Resultados estadísticos.....	61
Análisis de varianza para las diferentes variables	61
Varianza de la variable pH.....	61
Varianza de la variable acidez	62
Varianza de la variable grados brix	63
Varianza de la variable Absorbancia	65
Resultados estadísticos de los tipos de sustrato a diferentes concentraciones en tres tiempos diferentes para la óptima obtención de bacteriocinas del suero de leche.....	66
Prueba de Tukey evaluado en el tipo de sustrato sobre las cuatro variables ya establecidas.....	66
Prueba de Tukey evaluado en las diferentes concentraciones de sustratos sobre las cuatro variables ya establecidas.....	68
Prueba de Tukey evaluado en los diferentes tiempos establecidos sobre las cuatro variables.	70
Prueba de Tukey evaluado en la interacción AXBXC sobre las cuatro variables ya establecidas.....	72
Análisis comparativo entre nuestras principales variables.....	75
Varianza del halo de inhibición de microorganismo patógenos.....	80
Prueba de Tukey evaluado los diferentes de halo de inhibición para las diferentes soluciones.....	81

Prueba de Tukey evaluado los diferentes de halo de inhibición para las diferentes Microorganismos	83
Prueba de Tukey evaluado los diferentes de halo de inhibición para la interacción AXB.	85
Capítulo V	87
Discusión	87
Observación fisicoquímicos y microbiológica del Suero de Leche bovino.....	87
Caracterización e identificación de la bacteria <i>Lactobacillus plantarum</i> obtenida del suero de leche.....	89
Tipos de Fuente de Carbono y nitrógeno (Factor A)	89
Factor B (tipos de concentración del sustrato)	92
Factor C (Tiempo de fermentación)	94
Interacción de los factores (AXBXC).....	96
Actividad antimicrobiana de los microorganismos obtenidos frente a distintos patógenos.....	99
Factor (A) tipo se solución	99
Factor (B) tipo de microorganismo	99
Capítulo VI.....	102
Conclusiones.....	102
Recomendaciones.....	102
Referencias	104

Índice de tablas

Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas	4
--	---

Tabla 2 Tipos de suero con sus características químicas	5
Tabla 3 Requerimiento microbiológico de la leche cruda	7
Tabla 4 Propiedades fisicoquímicas de ácido láctico.....	11
Tabla 5 Instrumentos y equipos necesario para determinar la acidez	23
Tabla 6 Instrumentos y equipos necesario para determinar la ceniza del suero de leche	23
Tabla 7 Instrumentos y equipos necesario para determinar la densidad relativa	24
Tabla 8 Equipo necesario para determinar los grados brix.....	24
Tabla 9 Instrumentos y equipos necesario para determinar la Humedad del suero de leche	25
Tabla 10 Equipos e insumos necesarios para determinar el pH del suero de leche	25
Tabla 11 Instrumentos y equipos necesario para determinar el porcentaje de grasa del suero de	26
Tabla 12 Instrumentos y equipos necesario para determinar el porcentaje de proteína del suero	27
Tabla 13 Instrumentos y equipos necesario para determinar microorganismos presentes	27
Tabla 14 Materiales para realizar la fermentación del suero	28
Tabla 15 Instrumentos y equipos necesario para caracterizar a los microorganismos.....	29
Tabla 16 Instrumentos y equipos necesario para purificar las colonias elegidas.....	30
Tabla 17 Materiales para realizar tinción Gram en las colonias purificadas	30
Tabla 18 Instrumentos y equipos necesario para realizar el proceso de catalasa	31

Tabla 19 Materiales necesarios para realizar la oxidasa en las colonias previamente purificadas	31
Tabla 20 Instrumentos y equipos necesario para conservar las <i>Lactobacillus plantarum</i>	32
Tabla 21 Instrumentos y equipos necesario para realizar la parte experimental del proyecto.....	33
Tabla 22 Materiales utilizados en los procesos de fermentación en diferentes soluciones.....	33
Tabla 23 Instrumentos y equipos necesario para tomar muestra de los fermentados.....	34
Tabla 24 Materiales usados para obtener una solución libre de células	35
Tabla 25 Instrumentos y equipos necesario para conservar la solución libre de células.....	36
Tabla 26 Materiales para la obtención y purificación de microorganismos patógenos	37
Tabla 27 Instrumentos y equipos necesario para realizar el antibiograma	37
Tabla 28 Factores y niveles del proyecto para probar los tipos de solución, la concentración y el tiempo de crecimiento de las bacteriocinas.....	49
Tabla 29 Factores y niveles del experimento para determinar el antibiograma con dos microorganismos patógenos.....	50
Tabla 30 Reacción de las diferentes interacciones con los tratamientos establecidos para observar cómo reacciona con diferente sustrato, concentraciones y tiempo.....	50
Tabla 31 Interacciones de las soluciones bacterianas con los microorganismos patógenos para realizar el antibiograma.....	51
Tabla 32 Tabla de análisis de varianza ($A*B^*$)	53
Tabla 33 Análisis de varianza (AxB).....	54
Tabla 34 Resultados fisicoquímico del suero de leche	56

Tabla 35 Resultado microbiológicos del suero de leche	57
Tabla 36 Cepas aisladas y purificadas de bacterias ácido lácticas	57
Tabla 37 Resultados del análisis microscópico y de los ensayos bioquímicos	59
Tabla 38 Datos obtenidos del análisis de varianza del Ph.....	61
Tabla 39 Datos obtenidos del análisis de varianza de la acidez	62
Tabla 40 Análisis de varianza de la variable grados brix	63
Tabla 41 Análisis de varianza de la variable Absorbancia.....	65
Tabla 42 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para el tipo de sustrato	67
Tabla 43 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para las diferentes concentraciones	69
Tabla 44 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para los diferentes tiempos	71
Tabla 45 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para la interacción AAX.....	74
Tabla 46 Matriz de correlación entre las variables.....	75
Tabla 47 Varianza total explicada.....	76
Tabla 48 Matriz de componente con una extracción de 2 componentes	78
Tabla 49 Comunalidades	78
Tabla 50 Análisis de varianza del halo de inhibición	80
Tabla 51 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para el tipo de solución	81
Tabla 52 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para los diferentes microorganismos patógenos.....	83
Tabla 53 Prueba de grupos homogéneos de Tukey para la interacción AXB.....	85

Índice de figuras

Figura 1 Fórmula Química del ácido láctico	10
Figura 2 Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación	22
Figura 3 Árbol filogenético del Lactobacilos plantarum a base de secuencia 16S ARN ribosomal	61
Figura 4 Parámetros cinéticos de la fermentación para el estudio del efecto de los diferentes sustratos	66
Figura 5 Parámetros cinéticos de la fermentación para el estudio del efecto en los diferentes tipos de concentraciones	68
Figura 6 Parámetros cinéticos de la fermentación para el estudio del efecto en los diferentes tiempos.....	70
Figura 7 Relación entre las variables establecidas sobre la interacción AXBXC.....	72
Figura 8 Sedimentación de los cuatro componentes en la producción de bacteriocinas	76
Figura 9 Componentes principales en espacio rotados de variables	79
Figura 10 Análisis del efecto en el desarrollo del halo de inhibición por las diferentes soluciones.....	82
Figura 11 Análisis del efecto en el desarrollo del halo de inhibición por los diferentes microorganismos patógenos.....	83
Figura 12 Gráfico 3D de Superficie de diámetro de inhibición contra solución y microorganismo	85

Resumen

El suero de leche es un subproducto de forma líquida obtenido de la coagulación de la caseína durante la elaboración del queso. Está compuesta por lactosa, proteínas, vitaminas y minerales. Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos o proteínas bacterianas bioactivas con peso molecular, mecanismo de acción, espectro de actividad, ubicación y secuencia de aminoácidos variables. Manifiestan actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos. El objetivo de esta investigación fue aislar y caracterizar bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano. Se caracterizaron los parámetros físicos, químicos y microbiológicos del suero de leche bovina. El aislamiento de las bacterias fue al tercer día después de terminada la fermentación del suero, se caracterizaron estas bacterias ácidas lácticas mediante análisis morfológicos y molecular (detección del gen 16s). Se realizó un proceso de fermentación para la obtención de bacteriocinas mediante la utilización de dos sustratos (Melaza-Aloe vera y Lactosa-peptona), en concentraciones de (2% y 5%) y en tiempos de fermentación de 0, 24 y 48 horas, evaluando las variables: pH, acidez, grados brix y absorbancia. Finalmente se evaluó la actividad antimicrobiana de la bacteriocina frente a microorganismos patógenos (*E. coli* y *Moniliophthora roreri*), mediante el método de difusión en Agar y el método de pozos. Se encontró que el suero de leche cumple con todos los parámetros físicos químicos y microbiológicos determinados por las normas INEN. Se identificó la bacteria *Lactobacillus plantarum*. Para determinar el mejor tratamiento de fermentación se realizó un análisis trifactorial y para la actividad antimicrobiana se realizó un diseño bifactorial. Se concluye que el mejor tratamiento para la obtención de bacteriocinas fue el de Melaza- Aloe Vera al 2% a las 48 horas. La bacteriocina presenta actividad antimicrobiana frente a *E. coli* con un halo de inhibición de (4,75mm).

Palabras clave: Suero de leche, bacteriocinas, melaza, aloe vera, *Lactobacillus plantarum*

Abstract

Whey is a by-product in liquid form obtained from the coagulation of casein during cheese making. It is composed of lactose, proteins, vitamins and minerals. Bacteriocins are a heterogeneous group of bioactive bacterial peptides or proteins with variable molecular weight, mechanism of action, spectrum of activity, location, and amino acid sequence. They show antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. The objective of this research was to isolate and characterize bacteria from bovine milk serum, to obtain bacteriocins and their application as an antimicrobial agent. The physical, chemical and microbiological parameters of bovine milk serum were characterized. The isolation of the bacteria was carried out on the third day after the end of the fermentation of the whey. These lactic acid bacteria were characterized by means of morphological and molecular analysis (detection of the 16s gene). A fermentation process was carried out to obtain bacteriocins through the use of two substrates (Melaza-Aloe vera and Lactose-peptone), in concentrations of (2% and 5%) and in fermentation times of 0, 24 and 48 hours. evaluating the variables: pH, acidity, brix degrees and absorbance. Finally, the antimicrobial activity of the bacteriocin against pathogenic microorganisms (*E. coli* and *Moniliophthora roreri*) was evaluated using the agar diffusion method and the well method. It was found that the whey complies with all the physical, chemical and microbiological parameters determined by the INEN standards. The bacterium *Lactobacillus plantarum* was identified. To determine the best fermentation treatment, a trifactorial analysis was performed and for antimicrobial activity a bifactorial design was performed. It is concluded that the best treatment for obtaining bacteriocins was Molasses-Aloe Vera at 2% at 48 hours. The bacteriocin has antimicrobial activity against *E. coli* with an inhibition halo of (4.75mm).

Keywords: Whey, bacteriocins, molasses, aloe vera, *Lactobacillus plantarum*.

Capítulo I

Introducción

El suero de leche que se obtiene a partir de la elaboración de los quesos es pieza clave para el crecimiento de la industria de alimentos y bebidas, ya que representa una innovación en la fabricación de productos de alto valor nutricional (Utpl, 2021).

De cada 100 litros de leche que se utilizan para realizar el queso, 90 litros corresponden al suero, este conserva alrededor de 55% de los nutrientes totales de la leche: 94% de agua, proteínas y grasas (El Universo, 2019).

En Ecuador, se destina 1,5 millones de litros de leche para producir 300.000 kilos de quesos diarios, esto produce 1,2 millones de litros de suero de leche diarios, y de estos solo el 10% se estaría usando para fabricar alguna bebida láctea, sin embargo, en febrero de 2019, el ministerio de Agricultura y Ganadería conjuntamente con el Ministerio de Producción e Industria declararon el Acuerdo Interministerial 032 que todas las industrias que no cuenten con certificado vigente de buenas prácticas de manufactura (BPM) registrado en la ARCSA, no podrán destinarse para elaboración y/o comercialización de productos, ingredientes o insumos de consumo humano, además de que el Ministerio de Salud pública estableció que se debía de etiquetar como bebida láctea o bebida de suero de leche a todos los productos que contenga suero de leche como ingrediente (El Universo, 2019).

Hace varias décadas países desarrollados como Estados Unidos y Europa implementaron en su mercado varios productos a base de suero de leche como son: bebidas, medicamentos, proteínas en polvo y quesos, con lo que solucionaron los problemas que existían como la contaminación al no ser aprovechado este lactosuero y ser desechado. Sin embargo, en América Latina este no es aprovechado de manera correcta. Este usualmente al no tener valor comercial se destina para la alimentación de cerdos y bovinos dentro de las mismas industrias queseras o

suele desecharse en afluentes hídricos, lo que podría causar una alta contaminación para el ecosistema, afectando directamente a la flora y fauna que se encuentra en cerca de estos.

Esto puede deberse en gran parte porque Ecuador es un país poco desarrollado, por lo que no se cuenta con la tecnología apropiada para aprovechar este producto y darle un valor comercial, tocaría invertir en infraestructura que muchos agricultores y productores de las industrias lácteas no cuenta con los recursos necesarios, además de la poca información que se tiene de cómo aprovechar este producto (Córtez, 2018).

Las bacterias ácidas lácticas (BAL) son microorganismos utilizados en un sin números de aplicaciones alimentarias, debido a que tienen muchas características probióticas, teniendo un gran potencial para tratar enfermedades gastrointestinales. En la industria alimentaria, las BAL se utilizan como cultivos iniciadores (acidificación de medios) y no iniciadores (compuestos aromáticos) que contribuyen al sabor, textura, valor nutricional, vida útil y seguridad de los productos alimenticios.

Debido a todo el valor nutricional del suero, estos pueden ser utilizados como medios de cultivo para el crecimiento de las BAL, siendo una alternativa comercial, reduciendo el costo de producción y el impacto ambiental que causa el no aprovechamiento del mismo (Beux, Rabaioli, Jachetti, & Volken de Souza, 2019).

El presente proyecto se realizó con la finalidad de investigar el rendimiento y capacidad del suero de leche industrial y artesanal para la obtención de bacteriocinas y aplicarlo como un agente antimicrobiano mediante el aislamiento y caracterización de bacterias ácido-lácticas que se encuentran presente en el suero de leche, se identificó la bacteria ácido láctica mediante un análisis molecular y se implementó un sistema de fermentación mediante la adición de diferentes sustratos para observar el mayor crecimiento de las bacterias ácido-lácticas. A su vez estas bacteriocinas se emplearon como agente antimicrobiano mediante un antibiograma frente a diferentes microorganismos patógenos.

Objetivos

Objetivo General

- Aislar y caracterizar bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano.

Objetivos específicos

- Caracterizar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del suero de leche bovina previo al proceso de obtención de bacteriocinas.
- Evaluar dos tipos de suero del proceso de elaboración de queso (Tradicional y artesanal) en la generación de bacterias productoras de bacteriocinas.
- Evaluar la cantidad de nitrógeno, minerales y fuentes de carbono para la producción de bacteriocinas, a partir del suero de leche bovina.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los microorganismos obtenidos frente a distintos patógenos.

Hipótesis

Diseño AXBXC

Hipótesis de Factor A (Fuentes de carbono y nitrógeno)

- H0: La complementación de diferentes sustratos no interviene en los parámetros establecidos en la fase de la fermentación para la obtención de bacteriocinas.
- H1: La complementación de los diferentes sustratos intervienen en los parámetros establecidos en la fase de la fermentación para la obtención de bacteriocinas.

Hipótesis del Factor B (Concentración)

- H0: La concentración de las diferentes fuentes de sustratos no intervienen en los parámetros cinéticos en la fase de la fermentación para la obtención de bacteriocinas.
- H1: La concentración de las diferentes fuentes de sustratos intervienen en los parámetros cinéticos en la fase de la fermentación para la obtención de bacteriocinas.

Hipótesis del Factor C (Tiempo)

- H0: El tiempo no interviene en los parámetros establecidos en la fase de la fermentación para la obtención de bacteriocinas.
- H1: El tiempo interviene en los parámetros establecidos en la fase de la fermentación para la obtención de bacteriocinas.

Hipótesis de la interacción Factores AXBXC (Fuentes de carbono y nitrógeno, Concentración y Tiempo)

- H0: Los efectos de las interacciones entre las fuentes de carbono y nitrógeno, la concentración de los sustratos y el tiempo no intervienen los parámetros cinéticos durante la fermentación para la producción de bacteriocinas.

- HI: Los efectos de las interacciones entre las fuentes de carbono y nitrógeno, la concentración de los sustratos y el tiempo intervienen los parámetros cinéticos durante la fermentación para la producción de bacteriocinas.

Diseño AXB

Hipótesis de Factor A (Solución)

- H0: El tipo de solución no interviene en la actividad antagónica provocado por las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación del suero.
- HI: El tipo de solución interviene en la actividad antagónica provocado por las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación del suero.

Hipótesis de Factor B (Microorganismos patógenos)

- H0: La actividad antagónica de las bacteriocinas no interviene en la inhibición de los microorganismos patógenos.
- HI: La actividad antagónica de las bacteriocinas interviene en la inhibición de los microorganismos patógenos.

Hipótesis de Interacción de los Factor AXB (Solución y Microorganismos patógenos)

- H0: Los efectos de la interacción entre el tipo de solución y microorganismos no interviene en la actividad antagonista provocado por las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación del suero.
- HI: Los efectos de la interacción entre el tipo de solución y microorganismos interviene en la actividad antagonista provocado por las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación del suero.

Capítulo II

Revisión de literatura

Suero de leche

El suero de leche o lactosuero es un líquido translúcido verde resultante de la coagulación de la proteína caseína de la leche durante la elaboración del queso. Representa 90% del volumen total de la leche, contiene componentes como: carbohidratos, minerales, vitaminas hidrosolubles y proteínas solubles. Las proteínas que contiene el lactosuero presentan propiedades únicas tanto funcionales como nutricionales, por lo que sus hidrolizados son altamente demandados (Chacón, Chávez, Rentería, & Rodríguez, 2017).

Composición del lactosuero

El suero de leche está compuesto por principalmente agua, proteínas, mínimamente contenido de grasa, sales minerales y vitaminas. La composición del suero depende de muchos factores tales como: el origen de la leche, tratamiento, tipo de queso, la técnica de elaboración y el ambiente donde se almacena (Calvopiña & Manotoa, 2020). A continuación, en la tabla 1 se detalla las propiedades fisicoquímicas del suero de leche.

Tabla 1

Propiedades fisicoquímicas

Parámetros	Valores
Lactosa	4,85
Proteína	0,80
Ph	6,47
Ceniza	0,80
Acidez titulable	0,05

Grasa

0,50

Nota: Valores promediados de las propiedades fisicoquímicas de diferentes tipos de sueros.

Recuperado de Obtención de ácido láctico a partir de lactosuero y almidón de papa mediante fermentación láctica por Calvopiña & Manotoa, 2020.

Calidad nutricional del Suero

Las proteínas del suero presentan un alto valor biológico de 104 en comparación con las proteínas del huevo 100 y son 14 veces mayor que la proteína de soya. Tiene alrededor del 92% de utilización de proteína neta y 1,0 máxima digestibilidad (PDCAAS: Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) (Hoffman & Falvo, 2004). Los derivados de la lactosa poseen propiedades prebióticas que son de gran beneficio para el crecimiento de microorganismos benéficos como son: bifidobacterias y lactobacilos, que son de gran importancia para la salud (Wang, 2009).

Contienen una fracción lipídica de la membrana de los glóbulos de grasa de la leche como son ácidos grasos poliinsaturados: ácido linoleico conjugado (C18:2 cis-9, trans-11-CLA) (Benjamin, Prakasan, Sreedharan, & Wright, 2015).

Clases de suero de leche

Dependiendo del proceso, el suero producido durante la elaboración del queso se divide en tres grupos: suero ácido, suero dulce y suero dulce permeado. Así mismo podemos observar en la tabla 2 como cambia tanto los nutrientes totales y el pH dependiendo de la clase de suero (Ayala Palacios, 2017).

Tabla 2

Tipos de suero con sus características químicas.

Suero ácido	Suero dulce	Dulce Permeado
-------------	-------------	----------------

% Materia seca	6	6,5	4,5
pH	4,6	6,7	6,4

Nota. El suero dulce permeado contiene una menor concentración de sólidos a comparación de los otros dos sueros y el suero ácido presenta un menor pH que los otros sueros. Recuperada de Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G. y Schuck, P. (2004). *Productos lácteos industriales*.

Suero ácido.

El pH de este suero suele ser inferior a 6, resultado del proceso de elaboración del queso donde se añaden fermentos lácticos o ácidos orgánicos para bajar el pH del producto final, independientemente de que la cuajada o cuajada sea enzimática o se caliente más por la acidez. Este suero también contiene suero dulce que se utilizó en el proceso de postproducción. La característica de este suero es que contiene menos sólidos porque parte de la proteína se precipita por la acidez (Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G. y Schuck, P., 2004).

Suero dulce.

El suero de leche dulce suele ser el que se obtiene mediante un proceso de elaboración de queso convencional, es decir, no se añade a la leche ácido láctico, saborizantes, colorantes ni potenciadores de la acidez durante la elaboración del queso. Puede haber variaciones en este tipo de suero, ya que en algunos casos se puede producir cierta cantidad de sal o sabor durante el proceso (Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G. y Schuck, P., 2004).

Suero Dulce Permeado.

Este suero se obtiene por ultrafiltración para obtener queso. Es baja en proteínas y otros componentes, debido a que el proceso de elaboración trata de utilizar todos los componentes de la leche excepto el agua (Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G. y Schuck, P., 2004).

Microbiología del suero

La microbiología del suero lácteo está influenciada por la microbiología original de la leche procesada. Su mayor o menor carga microbiológica incide directamente en el recuento microbiológico final realizado en el suero. La leche sin un proceso previo contiene un conteo total de microorganismos que se encuentran entre 10^4 y 10^6 UFC/mL. Una vez pasteurizada la leche, debe estar libre de microorganismos patógenos. Al final del proceso sobreviven bacterias termo resistentes y algunas esporas, que no dañan la salud del consumidor, pero permanecen en el producto y pueden provocar el deterioro de los alimentos en condiciones adversas. La pasteurización elimina 90-95 microorganismos. Las bacterias que sobreviven a este proceso pertenecen a los géneros *Alcaligenes*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Clostridium*. Las bacterias resistentes al calor prácticamente no se reproducen en condiciones de refrigeración, por lo que no dañan el producto en estas condiciones. Las esporas sobrevivientes pueden crecer a pesar de la congelación. Estas bacterias se denominan psicótrofas y pueden causar un rápido deterioro de un producto a estas temperaturas (Ellner, 2000).

La microbiología del lactosuero es inicialmente la misma que la de la leche pasteurizada porque procede de él y no existen procesos adicionales para reducir la carga microbiana antes de su obtención. En el proceso de elaboración del queso, la carga microbiológica se puede cambiar mediante la adición de enzimas de ácido láctico (Ayala Palacios, 2017). A continuación, en la tabla 3 se presenta los requisitos microbiológicos para la leche cruda en la norma vigente del Ecuador.

Tabla 3

Requerimiento microbiológico de la leche cruda.

Requisito	Límite máximo
-----------	---------------

Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	$1,5 \times 10^6 \text{ UFC/cm}^3$
Recuento de células somáticas	$7,0 \times 10^5 \text{ unidades/cm}^3$

Nota: Norma técnica vigente en el Ecuador. Recuperada de INEN. (2008). *Norma técnica ecuatoriana de leche cruda*. Requisitos, Instituto Nacional de Estandarización y Normalización (INEN), Quito.

Producción del lactosuero

El suero se forma durante la fabricación del queso al disolver la cuajada de leche mediante la acción de enzimas ácidas o de cuajo que descomponen el sistema coloidal de la leche.

- Una mezcla sólida de proteínas insolubles y lípidos arrastra y atrapa algunos componentes hidrosolubles durante su precipitación.
- La parte líquida es el lactosuero en el que se encuentran todos los otros componentes nutricionales que no se integraron a la coagulación de la caseína (Loachamin & Narváez, 2021).

Manejo ambiental del lactosuero

El lactosuero, que se considera un residuo de la industria láctea y por tener forma líquida, se elimina directamente en desagües que van a los ríos. Este elemento necesita entre 20000 y 50000 ppm de oxígeno. Cuando se descarta el suero de leche, se pierde una gran cantidad de nutrientes, incluyendo aproximadamente el 25% de las proteínas de la leche, el 8% de la grasa y el 95% de la lactosa. Se cree que cada litro de lactosuero contiene más de 9 kilogramos de proteína valiosa. Después de limpiar los equipos utilizados para fabricar productos lácteos, las sustancias agregadas se encuentran en el agua residual (Loachamin & Narváez, 2021).

Estos fluidos de desecho tienen distintos elementos y sustancias incluidas:

- Materia orgánica
- Aceites y grasas

- N y P
- Agua desperdiciada (Loachamin & Narváez, 2021)

Uso del Suero

El 50% del suero que es producido a nivel mundial es transformado en productos alimenticios. El 45% se utiliza de manera líquida, el 30% de forma sólida como pulverizados o deshidratados, 15% se industrializa para la extracción de lactosa y concentrado proteico en polvo (Baró, Jiménez, Martínez-Férez, & Bouza, 2001).

En países más industrializados como son Nueva Zelanda y Japón, a partir del suero se elaboran fórmulas lácteas, nutracéuticos, cremas antifúngicas, pastas dentífricas, etc. El uso más frecuente es para la producción de bebidas, estas proporcionan energía, controlan la temperatura, hidratan y sacian la sed (Elpidia, 2013). En la industria alimentaria se utiliza para la producción de requesón o queso ricota (Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko, 2007).

Ácido Láctico

El ácido láctico es un compuesto orgánico producido por fermentación por diferentes microorganismos que pueden utilizar diferentes fuentes de carbohidratos. Las bacterias del ácido láctico son las principales bacterias utilizadas para producir ácido láctico y, entre ellas, *Lactobacillus* spp. han estado mostrando interesantes capacidades de fermentación.

Para la producción de ácido láctico es necesario disponer de sustratos en el medio de fermentación. Se pueden utilizar diferentes fuentes de carbohidratos, desde desechos vegetales como melazas, materiales feculentos, lignocelulósicos como residuos agrícolas y forestales. Los desechos lácteos también se pueden utilizar mediante la adición de componentes complementarios con una fuente de nitrógeno (Abedi & Hashemi, 2020).

Usos del ácido láctico

Se utiliza en la industria alimentaria, incluida la industria de bebidas como: conservante de alimentos, agente de fermentación, acidulante, potenciador del sabor y descontaminante, antioxidante, actividad prebiótica, crioprotector, viscosificador.

ii) industria química, principalmente repelente de mosquitos, agentes desincrustantes, pH regulador, neutralizadores, solvente verde, agentes de limpieza, agentes complejantes de metales, sustitución de plásticos sintéticos derivados de compuestos petroquímicos y alternativa ecológica debido a la producción de ácido poliláctico como polímeros biodegradables para usos comerciales como fibras y películas, producción de propilenglicol, ésteres de lactato, ácido acrílico, óxido de propileno, acetaldehído del ácido propanoico, 2,3-pentanodiona y dilactida;

iii) industria cosmética como humectantes, agentes aclarantes de la piel, agentes rejuvenecedores de la piel, agentes antiacné, humectantes, agentes antisarro;

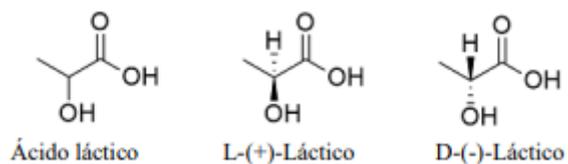
iv) la industria de la medicina y los productos farmacéuticos como molécula base, solución de diálisis, preparados minerales, comprimidos, prótesis, suturas quirúrgicas, sistema de administración controlada de fármacos, inmunoestimulante y fabricación de productos de higiene y estética (Upadhyaya, DeVeaux, & Christopher, 2014); (de Oliveira, Komesu, Rossell, & Maciel Filho, 2018).

Propiedades fisicoquímicas de ácido láctico

Es un ácido carboxílico siendo su fórmula $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, tiene dos isómeros ópticos: L (+) ácido láctico y D (-) ácido láctico. El isómero L (+) es el biológicamente más importante. (Cedeño, 2016). Podemos observar su fórmula en la figura 1.

Figura 1

Fórmula Química del ácido láctico.



Nota: El gráfico representa la fórmula desarrollada del ácido láctico. Recuperado de Ácidos Orgánicos: Ácido láctico, por Cedeño, 2016.

A continuación, en la tabla 4 se detallará algunas propiedades del ácido láctico.

Tabla 4

Propiedades fisicoquímicas de ácido láctico.

Parámetros	Características
Fórmula Química	C ₃ H ₆ O ₃
Masa molar	090,080 g/mol
Estado	Líquido
Color	incoloro, ligeramente amarillento
Punto de fusión	18 C
Punto de ebullición	122 C
Solubilidad	
Agua	miscible
Etanol	Miscible

Éter

Miscible

Nota: Recuperado de Ácidos Orgánicos: Ácido láctico, por Cedeño, 2016.

Bacterias del ácido láctico

Las BAL son bacterias gram positivas que producen ácido láctico en la industria. El ácido láctico se forma a través de la glucólisis sin oxígeno y se puede originar de las vías metabólicas de las BAL de hexosas y pentosas. El rendimiento y la productividad de la producción de ácido láctico dependen de varios factores, incluido el pH, que debe estar entre 3,5 y 9,6. También es importante tener en cuenta la temperatura, que debe estar en el rango de 5 a 45 grados Celsius. Además, la presencia de nutrientes como aminoácidos, péptidos, nucleótidos y vitaminas también influye en el proceso de producción. Por último, las cepas utilizadas para producir ácido láctico pertenecen a diferentes géneros como *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus* y *Weissella*. Sin embargo, las especies de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus* también se emplean en los procesos industriales de fermentación de alimentos (Souza, y otros, 2017).

Las cepas de *Lactobacillus* son muy importantes en la industria debido a su resistencia a los ácidos, alto rendimiento y capacidad de producir ácido L/D-láctico selectivamente. Sin embargo, hay desventajas al usar las BAL para producir AL comercialmente, como la necesidad de nutrientes complejos y baja temperatura de fermentación. Sin embargo, las bacterias que aman los ambientes alcalinos, como *Marinilactibacillus*, *Halolactibacillus* y *Alkalibacterium*, spp. y otras variedades de los tipos BAL, como *Microbacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Alkaliberium* spp., *Exiguobacterium* spp., *Oceanobacillus* spp. y *Bacillus* spp. puede generar ácido láctico en pH alto (7,0-11,5), lo cual reduce la contaminación en la fermentación.

Para fermentar glucosa, la BAL homofermentativa requiere de un pH que sea ácido o neutro. Sin embargo, un nivel de pH bajo afecta negativamente el metabolismo celular y, a su vez, la producción de ácido láctico. La gran cantidad de BAL no puede crecer por debajo de un pH de 4. Para asegurar la sobrevivencia de las células se emplean dos soluciones:

i) Se emplea regularmente cal en los fermentadores para mantener un nivel de pH equilibrado, lo cual genera lactato de calcio (más del 90% del ácido láctico). Después de la fermentación, el líquido que tiene lactato de calcio se vuelve ácido con ácido sulfúrico para producir ácido láctico. El exceso de ácido sulfúrico lleva a una mayor cantidad de yeso insoluble de sulfato de calcio en comparación con el ácido láctico producido, dificultades en la eliminación de desechos, mayor corrosión y un costo importante en el proceso de recuperación del producto en las operaciones comerciales. Lo ideal es que la fermentación microbiana ocurra en un medio con un pH igual o menor al pKa del ácido láctico (pKa 3,78), lo que permitiría purificar directamente la forma ácida.

ii) Se ha utilizado ingeniería metabólica para alterar diferentes tipos de *Lactobacillus sp.* con más tolerancia al medio ácido generado durante la fermentación. Tras ser tratadas con UV y nitrosoguanidina, se han obtenido cepas mejoradas que producen ácido láctico al mismo ritmo y eficacia que los métodos tradicionales de pH neutro. Con el objetivo de aumentar la resistencia a las condiciones ácidas creadas por la producción de ácido láctico, se ha logrado expresar las enzimas de la trehalosa 6-fosfato fosfatasa de la bacteria *Propionibacterium freudenreichii* en *Lactobacillus lactis*. Esto ha resultado en una capacidad de supervivencia de 5 a 10 veces mayor a un pH de 3.0. Del mismo modo, las enzimas de la vía de descarboxilación de histidina de *Streptococcus thermophilus* se expresaron en *Lactobacillus lactis* lo que le permite sobrevivir en pH bajos como 3, donde las células huésped mueren fácilmente (Abedi & Hashemi, 2020).

Fermentación

La fermentación es un proceso metabólico en el que los carbohidratos son convertidos por microorganismos en condiciones sin oxígeno, da como resultado una oxidación parcial. Las sustancias comunes que se producen durante la fermentación son ácidos orgánicos, alcoholes y otras sustancias pequeñas, incluyendo gases como el hidrógeno y dióxido de carbono. El patrón de fermentación de un microorganismo es valioso para la clasificación y está afectado por el sustrato, el pH y la temperatura (Rodríguez, Gamboa, Hernandez, & García, 2005).

Fermentación láctica

La fermentación láctica ocurre cuando algunos microorganismos metabolizan los alimentos. Estos microorganismos convierten los azúcares en dióxido de carbono y ácido láctico. Este último se forma cuando la glucosa se oxida a ácido pirúvico, generando NADH. El ácido pirúvico toma los electrones del NADH, produciendo ácido láctico y dos moléculas de ATP. Este proceso mejora la calidad nutricional de los alimentos ya que añade vitaminas durante el proceso (Calvopiña & Manotoa, 2020).

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos o proteínas bacterianas bioactivas, constan de 30 a 60 aminoácidos sintetizados por los ribosomas bacterianos, termoestable a 100 °C durante 10 min y excretado extracelularmente que muestran actividad antimicrobiana frente a otras bacterias. Las bacteriocinas involucran péptidos o proteínas de propiedades bioquímicas, peso molecular, mecanismo de acción, espectro de actividad, ubicación y secuencia de aminoácidos variables. Manifiestan actividad antimicrobiana dirigida contra las mismas cepas bacterianas que las produjeron o contra cepas de especies estrechamente relacionadas.

Las bacteriocinas son producidas tanto por bacterias Gram positivas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Propionibacterium*)

como por bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Shigella*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Pseudomonas*). Hasta el momento, en la base de datos de acceso abierto de BACTIBASE se han descrito más de 200 bacteriocinas (enero de 2014).

El interés en las bacteriocinas refleja la aplicación potencial de los metabolitos y microbios formadores de bacteriocinas en medicina y como agentes conservantes de alimentos naturales (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2016).

Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas (LAB)

Las BAL son bacterias no formadoras de esporas, bacilos o cocos gram positivos, anaerobios, pero aerotolerantes, bacterias catalasa negativas, con una alta tolerancia al pH bajo, fermentan carbohidratos para producir energía y ácido láctico como producto principal de la fermentación. Además, se producen sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, BLIS, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina y péptidos antifúngicos. Las LAB producen una gran cantidad de bacteriocinas a partir de cepas como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023)

Las bacteriocinas LAB a menudo son activas a varios valores de pH, resistentes a altas temperaturas y activas contra muchas bacterias patógenas y de deterioro de los alimentos. Además, las bacteriocinas producidas por las BAL son sensibles a las enzimas digestivas como el complejo de pancreatina, la tripsina y la quimotripsina y, por esta razón, no tienen un impacto negativo en el microbiota intestinal. *Lactobacillus* y sus bacteriocinas se han utilizado en la conservación de alimentos y para controlar patógenos humanos (Mokoena, Omatola, & Olaniran, 2021); (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023).

Las bacteriocinas secretadas por BAL son péptidos termoestables, sensibles a proteasas, sintetizados ribosómicamente y antimicrobianos, que se someten o no a un proceso de modificación enzimática postraducciona. Son muy diversos en términos de longitud, origen genético, características bioquímicas, peso molecular (MW), receptores celulares e interacción

con el sistema inmunitario. Hasta el momento, muchas bacteriocinas han sido ampliamente identificadas con varios modos de acción de la siguiente manera: induciendo la permeabilidad de la membrana citoplasmática (mediante la formación de poros), inhibiendo la biosíntesis de la pared celular e interfiriendo con las vías metabólicas. La formación de poros de membrana como un mecanismo inhibitorio común, la alta actividad inhibitoria con bajas concentraciones en el rango nanomolar y la actividad antimicrobiana de espectro relativamente estrecho son las características de muchas bacteriocinas derivadas de BAL. Durante la última década, las bacteriocinas BAL han recibido mucha atención debido a su alto potencial, especialmente como conservantes naturales de alimentos y nuevos antibióticos terapéuticos, lo que las ha hecho atractivas para diversas aplicaciones (Darbandi, y otros, 2022); (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023). En productos lácteos, las cepas de BAL más comunes incluyen *Lactococcus lactis* y *L. plantarum* en leche de camella y cabra, *L. plantarum* en queso, *L. kefirifaciens* en kéfir, y *S. thermophilus* y *L. brevis* en otros productos lácteos. En lácteos como la leche de diferentes orígenes, *L. brevis* produce bacteriocina con actividad antibacteriana. *Brevibacillus brevis* y *Bifidobacterium lactis* son las BAL más comunes en la leche cruda, mientras que *L. acidophilus* es el LAB más común en el yogur y los productos de soja fermentados. Generalmente, *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* son las bacterias probióticas predominantes en los productos lácteos (Darbandi, y otros, 2022); (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023).

Clasificación de las bacteriocinas

Hasta el momento, se han identificado cuatro clases de bacteriocinas BAL:

- Clase I, conocida como lantibióticos, está compuesta por bacteriocinas modificadas
- Clase II incluye bacteriocinas termoestables, mínimamente modificadas;
- Clase III incluye bacteriocinas termolábiles más grandes;

- Clase IV está compuesta de bacteriocinas complejas con fracciones de carbohidratos o lípidos.

Las bacteriocinas de clase I y II han sido el foco de la mayoría de las investigaciones sobre probióticos. Los lantibióticos se dividen en tres grupos según su estructura y modo de acción. Los lantibióticos de tipo A, como la nisina, son proteínas pequeñas (2 a 5 kDa) con moléculas cargadas positivamente, que matan bacterias a través de la formación de poros en la membrana, lo que provoca la disipación de la integridad de la membrana y la salida de pequeños metabolitos de las células sensibles. Mersacidin es un miembro de los lantibióticos tipo B que matan las bacterias al interferir con las reacciones enzimáticas celulares, como la síntesis de la pared celular. Otro subgrupo, como la lacticina 3147, son los lantibióticos de dos componentes que muestran sinérgicamente actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que las actividades duales podrían distribuirse entre dos péptidos: mientras que uno se asemeja a la mersacidina lantibiótica tipo B que despolariza la membrana, el otro es más similar a la nisina lantibiótica tipo A que actúa a través de la formación de poros. Las bacteriocinas BAL de clase II también son pequeños péptidos que no contienen lantionina que matan las bacterias al inducir la permeabilidad de la membrana y la posterior fuga de moléculas de las bacterias objetivo. Estas bacteriocinas se organizan en los siguientes subgrupos: La clase IIa es el grupo más grande e incluye pediocina (este grupo también se denomina bacteriocinas similares a pediocina), sakacina A y leucocina A. Al igual que los lantibióticos de tipo A, las bacteriocinas de clase IIa actúan mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática. Las bacteriocinas de clase IIa se distinguen por su actividad compartida contra *Listeria* y una secuencia amino-terminal conservada (YGNGVXaaC) que se cree que facilita la unión no específica a la superficie objetivo. Las bacteriocinas de clase IIb, como la lacticina F y la *lactococina G*, se componen de dos proteínas

diferentes; forman poros en la membrana celular para inhibir o matar a las bacterias diana. Las bacteriocinas de clase IIc son dependientes de sec, como la acidocina 1B. Las bacteriocinas de clase III son proteínas grandes termolábiles, como la helveticina J o la lactacina B. Las bacteriocinas de clase IV, como la leuconocina S y la lactocina 27, requieren fracciones de lípidos o carbohidratos para su actividad (Darbandi, y otros, 2022); (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023).

Mecanismo de acción de las Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias. Su acción se basa en diferentes mecanismos que les permiten destruir la membrana celular de las bacterias objetivo.

Las bacteriocinas detienen el desarrollo de los organismos objetivo usando diversos métodos. Hay un mecanismo que trabaja principalmente en la envoltura celular y otros que son activos en la célula al influir en la expresión de los genes y la creación de proteínas. Las bacteriocinas pueden tener efectos bactericidas con o sin destrucción de la célula. Creado por BAL, combate principalmente las bacterias grampositivas al atacar los mecanismos de la envoltura celular. Los lantibióticos y algunas bacteriocinas clase II inhiben la formación de peptidoglicano al dirigirse al lípido II.

Algunas bacteriocinas utilizan el lípido II como molécula de conexión para iniciar la formación de poros, causando así cambios en el potencial de la membrana del citoplasma y, en última instancia, la apoptosis. La nisina, una bacteriocina ampliamente investigada, puede llevar a cabo ambas acciones. La lactococcina A es una bacteriocina de clase II que se une a la célula al unirse al sistema de manosa fosfotransferasa del receptor formador de poros.

Hay bacteriocinas que tienen actividad antimicrobiana debido a sus enzimas. La clase II de péptidos puede insertarse en la membrana de la célula objetivo, causando despolarización y

fallecimiento. En contraste, las bacteriocinas III actúan en la pared de las bacterias grampositivas y provocan la muerte celular de manera similar a la lisostafina (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023).

Uso de bacteriocinas

Las bacteriocinas son prometedores péptidos antimicrobianos con potenciales aplicaciones en áreas como alimentos, salud clínica y otros (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023).

Industria alimentaria

Las bacteriocinas captaron interés como agentes naturales antimicrobianos para emplear en alimentos como preservantes en reemplazo de aditivos químicos. Normalmente, se utilizan bacterias productoras de bacteriocina para añadirlas a alimentos, ya sea como inoculación o como aditivo. También se puede utilizar un producto ya fermentado con estas bacterias durante el procesamiento de alimentos.

Las bacteriocinas nisina, pediocina PA-1 y micocina son aprobadas por la FDA para conservar alimentos, al detener el crecimiento de bacterias grampositivas y patógenos transmitidos por alimentos como *L. monocytogenes*. Principalmente se utiliza en productos lácteos y alimentos enlatados, especialmente en el queso procesado, para protegerlo de bacterias resistentes al calor como *Bacillus* y *Clostridium*.

Las bacteriocinas no tienen color, olor ni sabor, por lo que son ideales para alimentos sin modificar sus características. También son resistentes a altas temperaturas, pH bajo y diferentes concentraciones de sal.

Las bacteriocinas como conservantes alimenticios tienen ventajas como prolongar la vida útil de los alimentos, prevenir la transmisión de patógenos, proteger contra condiciones térmicas, reducir pérdidas económicas y mantener las propiedades nutricionales y características del producto sin alteraciones.

Aunque pueda haber beneficios, debemos considerar que el uso de bacteriocinas en alimentos puede estar restringido debido a su actividad limitada o a su naturaleza hidrófoba, lo

cual puede causar la separación de grasas en la comida. También, la forma en que se distribuyen o su poca capacidad de disolverse puede afectar la acción antibacteriana de estas sustancias. El empleo de bacteriocinas junto con otros métodos de conservación puede incrementar su efecto antibacteriano (Negash & Tsehai, 2020); (Aljohani, Al-Hejin, & Shori, 2023).

Bacteriocinas de Lactobacillus

La creciente aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en la industria alimentaria debe controlarse con antimicrobianos eficaces. La plantaricina es una de las bacteriocinas conocidas más importantes producidas por *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum* podría producir al menos seis bacteriocinas diferentes. Varias cepas productoras de bacteriocina de *L. plantarum* se utilizan en la producción de alimentos (Todorov, Franco, & Tagg, 2019).

Agente Antimicrobiano

Un agente antimicrobiano se define como una sustancia natural o sintética que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas (Burnett-Boothroyd & McCarthy, 2011).

Los agentes antimicrobianos pueden ser bactericidas, que eliminan bacterias; fungicidas, contra hongos; microbicidas, que destruyen microorganismos; o microbiostáticos, que bloquean el crecimiento de microbios. Usualmente se describe como desinfectante, antiséptico, antibiótico o agente que mata o detiene el crecimiento de bacterias (Mandal, 2016).

Capítulo III

Metodología

Ubicación del área de investigación

Ubicación política

País:	Ecuador
Provincia:	Santo Domingo de los Tsáchilas
Cantón:	Santo Domingo
Parroquia:	Luz de América
Sector:	Vía Quevedo, Km 24

Ubicación ecológica

Zona de vida:	Bosque húmedo tropical
Altitud:	224 msnm
Temperatura media:	24,6 °C
Precipitación:	2860 mm año
Humedad relativa:	85 %
Heliofanía:	680 horas luz año
Suelos:	Franco Arenoso

Fuente: Estación Agro Meteorológica “Puerto Ila”, Vía Quevedo km 34.

Ubicación geográfica

El presente proyecto de Integración Curricular se realizó en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas "ESPE" Extensión Santo Domingo, específicamente en los laboratorios de Bromatología y Microbiología de los Alimentos.

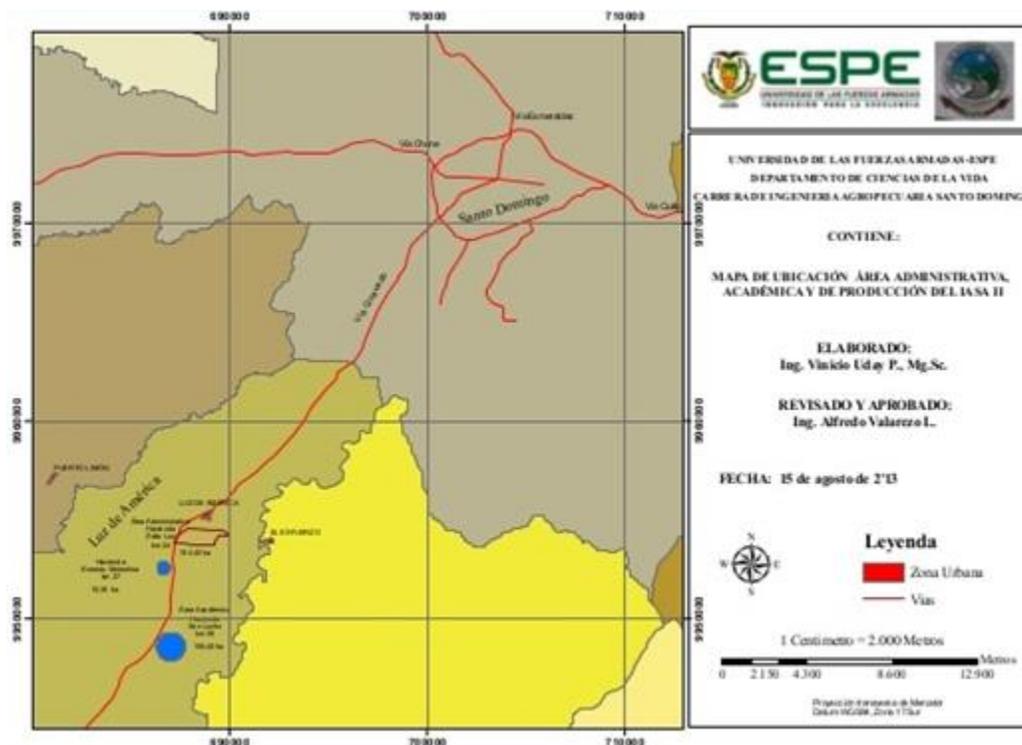
Latitud: 00° 24' 36"

Longitud: 79° 18' 43"

Altitud: 270 msnm

Figura 2

Mapa de la ubicación geográfica del lugar de investigación.



Materiales

Análisis fisicoquímicos del Suero de Leche bovino

Acidez

Tabla 5

Instrumentos y equipos necesario para determinar la acidez.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Probeta (25 mL)	Potenciómetro	Na(OH) 0,1N	Suero de Leche bovina
Balón de aforo (250 mL)	Plato agitador	Azul de bromotimol	
Vaso de precipitación (25 mL)			
Pipeta			
Magneto			
Soporte Universal			
Probeta (30 mL)			

Ceniza

Tabla 6

Instrumentos y equipos necesario para determinar la ceniza del suero de leche.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Pinza	Balanza analítica	Agua destilada	Suero de Leche
Vasos de precipitación (20 mL)	Mufla		bovina
Crisoles de porcelana	Estufa		
Espátula	Dsecador		

Densidad relativa

Tabla 7

Instrumentos y equipos necesario para determinar la densidad relativa.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Picnómetro	Balanza analítica	Agua destilada	Suero de Leche
			bovina

Grados Brix

Tabla 8

Equipo necesario para determinar los grados brix.

Equipos	Reactivos	Muestra

Refractómetro

Agua destilada

Suero de Leche bovina

Humedad

Tabla 9

Instrumentos y equipos necesario para determinar la Humedad del suero de leche.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Pinza	Balanza analítica	Agua destilada	Suero de Leche
Vasos de precipitación (20 mL)	Estufa		bovina
Crisoles de porcelana	Desecador		
Espátula			

pH

Tabla 10

Equipos e insumos necesarios para determinar el pH del suero de leche.

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Probeta (100 mL)	Potenciómetro	Agua destilada	Suero de Leche
Vaso de precipitación			bovina

(10 mL)

Porcentaje de Grasa

Tabla 11

Instrumentos y equipos necesario para determinar el porcentaje de grasa del suero de leche

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Probeta (100 mL)	Extractor de grasa	Éter de Petróleo	Suero de Leche
Vaso de precipitación (50 mL)	Balanza analítica	Agua destilada	bovina
Mortero	Estufa		
Piseta	Desecador		
Pipetas			
Papel filtro			
Algodón			

Proteína

Tabla 12

Instrumentos y equipos necesario para determinar el porcentaje de proteína del suero de leche

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Tubos de destilación	Balanza analítica	Ácido sulfúrico 96%	Suero de Leche bovina
Gotero	Unidad digestora	Hidróxido de sodio 35%	
Mortero	Sorbona	Ácido bórico 2%	
Matraz Erlenmeyer	Unidad de Destilación	Ácido clorhídrico 0,1 N	
Vaso de precipitación (50 mL)	Plancha de calentamiento	Tabletas catalizadoras	
Bureta		Indicador de Kjeldahl	
Soporte universal		Agua destilada	

Análisis microbiológico del Suero de Leche bovino

Tabla 13

Instrumentos y equipos necesario para determinar microorganismos presentes en el suero de la leche

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
----------------	----------------	------------------	----------------

Cajas petri	Autoclave	Agar MRS	Colonias obtenidas de la fermentación del suero
Tubos de ensayo	Balanza analítica	Agua de peptona	
Pipeta	Cámara de flujo laminar	Agua destilada	
Micropipeta	Plancha de agitación	Alcohol 96%	
Asa bacteriológica	Vortex	Petrifilm de mohos y levadura	
Mecheros	Incubadora	Petrifilm de aerobios	
Parafilm		Petrifilm de <i>e. coli</i>	
Frasco Boeco		Petrifilm de <i>salmonella</i>	
Magneto			

Fermentación del Suero de Leche bovino

Tabla 14

Materiales para realizar la fermentación del suero

Insumos	Reactivos	Muestra
Vasos de precipitación	Agua destilada	Suero de leche bovino
Probeta		

Botellas

Manguera

Parafilm

Caracterización microbiológica

Tabla 15

Instrumentos y equipos necesario para caracterizar a los microorganismos

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Cajas petri	Autoclave	Agar MRS	Colonias obtenidas de la fermentación del suero
Tubos de ensayo	Balanza	Agua de	
Pipeta	analítica	peptona	
Micropipeta	Cámara de flujo	Agua destilada	
Asa bacteriológica	laminar	Alcohol 96%	
Mecheros	Plancha de		
Parafilm	agitación		
Frasco Boeco	Vortex		
Magneto	Incubadora		

Purificación de colonias

Tabla 16

Instrumentos y equipos necesario para purificar las colonias elegidas

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Cajas Petri	Autoclave	Agar MRS	Colonias obtenidas de la fermentación del suero
Asa bacteriológica	Balanza analítica	Agua destilada	
Mecheros	Cámara de flujo laminar	Alcohol 96%	
Parafilm	Plancha de agitación		
Frasco Boeco	Incubadora		
Magneto			

Identificación microbiana de bacterias ácido lácticas

Tinción Gram

Tabla 17

Materiales para realizar tinción Gram en las colonias purificadas

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Portaobjetos	Cámara de flujo laminar	Agua destilada	Colonias obtenidas de la fermentación
Cubreobjetos	Microscopio óptico	Aceite de inmersión	

Asa bacteriológica	Cristal violeta	del suero
Mecheros	Lugol	
Parafilm	Safranina	

Catalasa

Tabla 18

Instrumentos y equipos necesario para realizar el proceso de catalasa

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Portaobjetos	Cámara de flujo laminar	Peróxido de hidrógeno 30%	Colonias obtenidas de la fermentación del suero
Asa bacteriológica			
Mecheros			
Pipeta Pasteur			

Oxidasa

Tabla 19

Materiales necesarios para realizar la oxidasa en las colonias previamente purificadas

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
---------	---------	-----------	---------

Portaobjetos	Cámara de flujo	Reactivo de Kovacs	Colonias obtenidas
Asa bacteriológica	laminar	Hidróxido de potasio 3%	de la fermentación
Mecheros			del suero
Papel filtro			
Cajas petri			
Pipetas Pasteur			

Conservación de las bacterias lactobacillus plantarum

Tabla 20

Instrumentos y equipos necesario para conservar las Lactobacillus plantarum

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Micropipeta	Cámara de flujo laminar	Glicerol	Colonias
Tubos eppendorf	Autoclave		obtenidas de la
Gotero			fermentación del
Asa bacteriológica			suero previamente
Mecheros			secuenciadas
Parafilm			

Preparación del inóculo en caldo madre

Tabla 21

Instrumentos y equipos necesario para realizar la parte experimental del proyecto

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Frasco boeco	Cámara de flujo laminar	Caldo MRS	Bacterias
Matraz	Incubadora	Agua destilada	<i>Lactobacillus</i>
Asa bacteriológica	Plato de calentamiento y agitación		<i>plantarum</i>
Mecheros	Autoclave		
Parafilm	Balanza Analítica		
Rotulador			
Magneto			
Probeta			
Algodón			

Instalación del sistema de fermentación

Tabla 22

Materiales utilizados en los procesos de fermentación en diferentes soluciones

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Frasco boeco	Cámara de flujo laminar	Caldo MRS	Bacterias
Matraz	Incubadora	Melaza	<i>lactobacillus</i>
Micropipeta	Plato de calentamiento y agitación	Aloe vera	<i>plantarum</i>
Puntas	Autoclave	Lactosa	
Asa bacteriológica	Balanza Analítica	Peptona	
Mecheros		Agua destilada	
Parafilm			
Rotulador			
Magneto			
Probeta			
Sistema de muestreo			
Algodón			

Muestreo del parámetro cinético

Tabla 23

Instrumentos y equipos necesario para tomar muestra de los fermentados

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
---------	---------	-----------	---------

Vaso de precipitación	Potenciómetro	Hidróxido de sodio	Fermentados de
Celdas de cuarzo	Incubadora	0,1N	<i>Lactobacillus</i>
Gotero	Plato de	Agua destilada	<i>Plantarum</i> con
Piseta	calentamiento y		diferente sustrato y
Balón de aforo	agitación		concentración.
Probeta	Espectrofotómetro		
Bureta	Refractómetro		
Soporte Universal			

Solución de bacteriocinas libres de células

Tabla 24

Materiales usados para obtener una solución libre de células

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Tubos de ensayos	Cámara de flujo	Hidróxido de sodio	Fermentados de
Frasco boeco	laminar	0,1N	<i>Lactobacillus</i>
Jeringa	Centrífuga	Agua destilada	<i>Plantarum</i> con
Embudo buchner	Plato de		diferente sustrato y
Parafilm	calentamiento y		concentración.
	agitación		

Rotulador	Autoclave
Magneto	Potenciómetro
Bureta	Bomba de vacío
Papel filtro	
Soporte universal	

Conservación de bacteriocinas

Tabla 25

Instrumentos y equipos necesario para conservar la solución libre de células

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Micropipeta	Cámara de flujo laminar	Glicerol	Bacteriocinas
Tubos eppendorf	Autoclave		obtenidas de la
Gotero			fermentación del
Asa bacteriológica			suero previamente
Mecheros			secuenciadas
Parafilm			

Obtención de Microorganismos patógenos

Tabla 26

Materiales para la obtención y purificación de microorganismos patógenos

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
Cajas petri	Autoclave	Agar PDA	E. coli y Monilla
Asa bacteriológica	Balanza analítica	Agar MacConkey	
Mecheros	Cámara de flujo laminar	Agua destilada	
Parafilm			
Frasco Boeco	Plancha de calentamiento y		
Magneto	agitación		
	Vortex		
	Incubadora		

Antibiograma

Tabla 27

Instrumentos y equipos necesario para realizar el antibiograma

Insumos	Equipos	Reactivos	Muestra
----------------	----------------	------------------	----------------

Cajas petri	Autoclave	Agar Mueller-Hinton	Bacteriocina libre
Asa bacteriológica	Balanza analítica	Agua destilada	de células
rectangular	Cámara de flujo		Microorganismos
Mecheros	laminar		patógenos
Parafilm	Plancha de		
Frasco Boeco	calentamiento y		
Magneto	agitación		
Sacabocados	Vortex		
Vasos de precipitación	Incubadora		
Micropipeta			
Puntas			

Métodos

Análisis físicoquímicos del Suero de Leche bovino

Evaluación de la acidez

Se empleó la norma (NTE INEN 0013, 1984) para evaluar el nivel de acidez. En el proceso inicial de preparación de la muestra, se incorporaron 25 ml de suero de leche en un matraz aforado de 250 ml y se completó con agua destilada. Luego, se transfirieron 25 ml de la solución obtenida a un recipiente de precipitación. Se configuró un equipo de titulación y se cargó una bureta con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N. Se procedió a agregar NaOH hasta alcanzar un pH

de 7, y posteriormente se agregó el reactivo goteando cuidadosamente hasta lograr un pH máximo de 8,3. Mediante interpolación, se determinó el volumen de NaOH necesario para alcanzar un pH de 8,1. Con este valor, se efectuó el cálculo de la acidez titulable empleando la siguiente fórmula:

$$A = \frac{(V_1 \times N_1 \times M) \times 10}{V_2}$$

Donde

A= gramos de ácido que se encuentran en 1 litro del producto.

$V_1 = \text{cm}^3$ de NaOH que son usados al momento de la titulación.

N_1 = la normalidad que tiene la solución del NaOH.

M= el peso molecular que tiene el ácido, siendo este como referencia 0,09 ácido láctico.

V_2 = el volumen que tiene la muestra diluida usada.

Determinación de la ceniza

Para determinar la cantidad de sólidos totales y cenizas en el suero de leche se siguió el protocolo descrito en la norma (NTE INEN 0014, 1984), con ligeras modificaciones. Se colocaron 2 gr del suero de leche en un crisol de porcelana y se lo colocaron en la cocineta hasta su total evaporación. Luego se introdujeron las muestras en la mufla a $600^\circ \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 horas aproximadamente. Se sacaron las muestras y se dejaron enfriar dentro del desecador. Una vez frías se pesaron.

El contenido de sólidos totales se calculó mediante la ecuación siguiente:

$$C = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$

Donde:

C: cantidad de cenizas

m: peso de la muestra

m_1 : Peso del crisol vacío.

M_2 : Peso del crisol más la muestra calcinada

Análisis de la densidad relativa

La evaluación de la densidad relativa se realizó siguiendo el protocolo delineado en la Norma (NTE INEN 0011, 1984). El procedimiento consistió en pesar el picnómetro tres veces en diferentes condiciones: picnómetro limpio y seco, el picnómetro lleno con el suero de leche y el picnómetro con agua destilada para su posterior cálculo mediante la siguiente fórmula:

$$d = \frac{p_2 - p_1}{p_3 - p_1}$$

Donde:

- d : densidad relativa de la muestra
- p_1 : gramos del picnómetro vacío
- p_2 : gramos del picnómetro con el suero de leche
- p_3 : gramos del picnómetro con agua destilada.

Determinación de los grados brix

Se empleó un refractómetro para determinar los solubles sólidos. Primero se llevó a cabo una calibración previa del dispositivo utilizando agua destilada para su posterior uso donde, se aplicó una gota de la muestra de suero de leche al refractómetro y se registró el valor resultante. (NTE INEN 0014, 1984)

Evaluación de la humedad

Para evaluar la humedad contenida en el suero de leche se empleó la norma (INEN 299, 1977) donde establece el método para determinar el contenido de humedad y otras materias volátiles, por calentamiento. Se pesaron 2 gr del suero de leche y se llevó a la estufa a 103°C por

12 horas. Pasado ese tiempo, se sacó de la estufa y se colocaron en el desecador por 30 min hasta que tomaran temperatura ambiente y luego se pesaron.

Para la determinación de Humedad se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{w_2 - w_1}{w_0} \times 100$$

w_0 = Peso de la Muestra (gr.)

w_1 = Peso del crisol más la muestra después del secado.

w_2 = Peso del crisol más la muestra antes del secado

Análisis del pH

Nos basamos en el procedimiento detallado en (AOAC 973.41, 1973) para obtener los resultados del pH. Para esto se tomó una cantidad de 25 mL del suero de leche, después se posicionó el electrodo del potenciómetro en el líquido y una vez que el equipo mostró estabilidad, se registraron los valores.

Evaluación del porcentaje de grasa

La determinación de grasa contenida en el suero se realizó por el método Soxhlet descrita por (AOAC International, 2005). Se tomaron 4 g de la muestra líquida, se empaparon en algodón y se dejaron en la estufa por 24 horas. Pasado este tiempo, se colocaron los algodones junto con la muestra seca en los dedales del equipo y se taparon con algodón la superficie, estos dedales se colocaron en el extractor de grasa. En el equipo se colocaron 50 mL de éter etílico en el vaso extractor de grasa. Se encendió el equipo y se sumergieron los dedales en el éter etílico, se establecieron los tiempos de cada proceso. Una vez terminado el proceso se colocaron los vasos que contenían la muestra en la estufa a 100 °C por 30 minutos. Luego se pesaron y se calculó el extracto etéreo por diferencia de pesos mediante la fórmula:

$$G = \frac{w_2 - w_1}{w_0} \times 100\%$$

Donde:

G : Porcentaje de grasa

w₂ : Peso de la muestra

w₁ : Peso del vaso vacío

w₀ : Peso del vaso más la grasa

Determinación del porcentaje de proteína

Para determinar el porcentaje de proteína en el suero se utilizó la (NTE INEN 0016, 2015) que describe el método para determinar el contenido de nitrógeno en la leche por método Kjeldahl. El método consiste en tres pasos: Digestión, Destilación y la Titulación. Para la digestión se tomaron 1 mL del suero de leche se colocó en el micro tubo junto con una tableta catalizadora y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocaron los tubos contenidos con muestra en el block digest a 420°C durante 30 minutos. Se dejaron enfriar las muestras.

Para la destilación, en cada microtubo se adicionaron 10 mL de agua destilada. En el matraz de recepción se colocó 50 mL de ácido Bórico al 2% en el sistema de destilación. Además, se adiciono 30 mL de hidróxido de sodio al 40%. Una vez terminado el proceso se recoge aproximadamente 200 mL de destilado.

Para la titulación, en el matraz donde se encontraba el recogido se colocaron tres gotas de indicador. Se tituló con ácido clorhídrico 0,1 N y se anotó los mL del ácido al viraje del color.

El contenido de proteínas bruta en los alimentos se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%PB = \frac{(VHCI - Vb) * 1.401 * NHCL * F}{g \text{ muestra}}$$

Donde:

1.401: Peso atómico del nitrógeno

NHCl: Normalidad de Ácido Clorhídrico 0.1 N

F: Factor de conversión (6.25)

VHCI: Volumen del ácido clorhídrico consumido en la titulación

Vb: Volumen del Blanco (0.3)

Análisis microbiológico del suero de leche bovino

Utilizando la Norma (NTE INEN 1529-5 , 2006) y la Norma (NTE INEN 1529-10, 1998), para detectar la presencia de aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *E coli* y *Salmonella* se emplearon placas Petrifilm. Como paso inicial, se realizó una serie de diluciones del suero de leche utilizando agua de peptona como agente diluyente hasta lograr la dilución 10^{-4} . Posteriormente con la asistencia de una micropipeta, se añadió 1 mL de la dilución 10^{-4} en el centro del film.

Este mismo proceso se aplicó para las pruebas de ácido láctico, mohos y levaduras, con la variación de que las placas para mohos y levaduras se incubaron a 25 °C durante 72 horas, las placas para ácido láctico y aerobios se incubaron a 37°C durante 48 horas. Para concluir, se efectuó la lectura de las placas Petrifilm utilizando un contador de colonias, y para calcular las unidades formadoras de colonias, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento}(UFC \text{ mL}) = \frac{C * f}{V}$$

Donde:

C: cantidad total de colonias presentes en el petrifilm

I: factor de dilución a la inversa

V: volumen que contiene el inóculo.

Proceso de fermentación del suero

Se tomaron alrededor de 500 mL de suero de leche y se colocaron en un recipiente plástico (botella de 1 L) y se le colocó una trampa de agua artesanal con ayuda de una manguera y una botella de agua pequeña. Las botellas contenidas con suero se envolvieron con papel aluminio con el fin de que no les diera la luz directa. Se dejó fermentar de forma anaerobia durante 72 horas en un lugar oscuro y sin agitación.

Siembra de la muestra fermentada

Pasada las 72 horas de fermentación, se tomó una pequeña muestra del suero fermentado, se realizaron diluciones seriadas con agua de peptona hasta llegar a una concentración de 10^{-4} . En cuatro tubos se colocaron 9 mL respectivamente y se tomó 1 mL del fermentado con ayuda de una micropipeta. Se tomó 1 mL de la dilución 10^{-4} para realizar la siembra en cajas Petri que contenían 20 mL de Agar MRS. Las cajas Petri se sellaron y se dejaron en la incubadora a 37°C por 48 h.

Purificación de colonias

Transcurridas las 48 horas, se tomaron las cajas y se purificaron las colonias que se observaban con mejor aspecto: mejor forma, color y consistencia. Y nuevamente estas colonias se sembraron en Agar MRS mediante estrías utilizando un asa bacteriológica y se dejaron incubando a 37°C por 48 h. Este proceso se repitió durante 4 veces seguidas hasta obtener una cepa pura con buenas características morfológicas.

Identificación microbiana y molecular de bacterias ácido lácticas

Proceso de la Tinción gran

Para crear la lámina, se dispuso una gota de agua en un portaobjetos. Luego, mediante un asa bacteriológica, se tomó una pequeña muestra del cultivo contenido en la caja de la bacteria a identificar. Esta muestra se esparció sobre el portaobjetos y se fijó mediante la aplicación de la llama de un mechero. Después de que el extendido bacteriano estuvo seco, se procedió con la tinción. Para esta etapa, se aplicó cristal violeta en la lámina durante 1 minuto, seguido de Lugol durante 1 minuto, y luego alcohol cetona durante 15 segundos. Finalmente, se utilizó safranina durante 1 minuto. Es relevante mencionar que en cada paso se realizó un lavado con agua destilada y la lámina fue secada con la ayuda del mechero. Para el análisis, se empleó un microscopio para la observación bajo el objetivo de 100x, utilizando aceite de inmersión (Silva Zuta, 2021).

Proceso de la catalasa

Fue introducida una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos, posteriormente se empleó un asa bacteriológica para adquirir una pequeña fracción de la muestra y se procedió a distribuirla de manera uniforme en toda la gota. Se procedió a la observación de la reacción durante un período de 20 segundos. En el caso de una reacción positiva, se originaron burbujas, en contraste, un resultado negativo se manifestó por la ausencia de burbujas (Rodríguez Arana, 2018).

Proceso de la oxidasa

En la evaluación, se emplearon secciones de papel filtro estéril, las cuales se dispusieron en una placa Petri con el propósito de prevenir cualquier derrame del reactivo. Fueron incorporadas 3 gotas del reactivo Kovacs, acto seguido, se tomó una porción de la muestra

bacteriana que fue depositada sobre el papel filtro impregnado con el reactivo. Los resultados se manifestaron después de transcurrir unos instantes, evidenciándose una coloración en tonalidades rosadas, púrpuras o negras como indicativo de un resultado positivo; en contraste, la ausencia de tal coloración implicó un resultado negativo (Macfarland, 1990).

Caracterización molecular

Después de obtener cepas puras de las bacterias ácido lácticas se enviaron a Seúl, Corea a la empresa MacroGen Inc. para la respectiva identificación molecular mediante la identificación del gen 16s del ARNr. Los resultados obtenidos fueron recibidos mediante la página de la empresa y fueron procesadas mediante programas bioinformáticos y se realizó un análisis filogenético.

Conservación de las bacterias lactobacillus plantarum

Para la conservación se llevó a cabo el procedimiento descrito por (Heredia & Suárez, 2023). En primer lugar, se tomaron 10mL de la bacteria y se le añadió glicerol en una proporción 30% (v/v). Se mezcló hasta homogenizar y se colocó un 1 mL en cada tubo eppendorf, finalmente se almacenaron en congelación a -20°C.

Preparación del inóculo en el caldo madre

Se prepararon 200mL de caldo MRS en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y con un asa bacteriológica se inoculó la bacteria dos veces consecutivas. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C por 48 horas.

Instalación del sistema de fermentación

Para el establecimiento del sistema de fermentación se replicó el procedimiento descrito por (Heredia & Suárez, 2023). La fermentación se realizó en matraces Erlenmeyer de 250mL se les añadieron 200mL de caldo MRS. Adicionalmente se le añadió una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono que la combinación de ambos consistió en un sustrato (Glucosa-peptona y

Melaza- Aloe Vera) a una concentración al 2% y al 5% p/v. Finalmente se le añadieron 2 mL del cultivo madre. Para la toma de muestra se le colocó un sistema de muestreo mediante la modificación de un equipo de Venocllisis. Se realizó una fermentación discontinúa, sin agitación a 37°C durante 48 horas.

Muestreo de parámetros cinéticos ya establecidos

Para la recolección de parámetros cinéticos, se tomaron muestras de los sistemas de fermentación con la ayuda de una jeringa estéril de 5 mL. La toma de muestras fue a las 0h, 24h y 48h. Se recolectaron los parámetros: % ácido láctico (acidez), la densidad óptica, los grados brix y el pH en los diferentes tiempos de recolección.

Preparación de la solución bacteriocina libre de células

Una vez terminada la fermentación, se realizó un proceso de centrifugación para eliminar las células. Se siguió la metodología de (Cardoso, 2012) en donde se tomaron tubos de ensayo y se le colocaron muestras de la fermentación del mejor tratamiento y se centrifugaron a 10000 rpm por 20 min. Se ajustó el pH a 6 con NaOH 1N y posteriormente se lo esterilizó por filtración en un equipo Milipore y una bomba al vacío, se utilizaron membranas con diámetro de 0,22 µm. Posteriormente se almacenó en refrigeración hasta su posterior uso.

Proceso para el antibiograma

Obtención de los microorganismos patógenos

Para la obtención de *Moniliophthora roreri* se siguió la metodología descrita por (Anchundia & Torres, 2022). Se realizaron cortes muy pequeños en la cáscara de cacao que presentaban síntomas de *Moniliophthora roreri*, se realizó un protocolo de desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto. Posteriormente se colocaron los cortes desinfectados en el medio PDA con un antibiótico (estreptomina). Las cajas se incubaron a 28°C por 20 días. Para la obtención de un cultivo puro de la cepa se realizaron purificaciones de la cepa mediante

resiembras. Para la identificación de la cepa se realizó mediante tinción con azul de lactofenol con ayuda de un microscopio.

Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* una cepa recombinante y con resistencia a antibiótico, estas fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas. Se aisló la colonia, ya que estaba en un estado de preservación. Se sembró en medio Luria-Bertani (LB) se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se replicó hasta obtener una cepa totalmente pura.

Determinación de la actividad inhibitoria

Para determinar la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se utilizó el método de Kirby Bauer (Prueba de difusión en agar) descrita por (Galván & García, 2017) y el método de pozos descrita por (Cardoso, 2012).

En el método de difusión en agar se utilizaron discos de pruebas de sensibilidad antimicrobiana resistentes a ampicilina de 5mm. Primero se realizó un inculo con solución salina y el microorganismo patógeno para ser ajustada a 0,5 escala de McFarland, se sembró el inculo en agar Mueller-Hinton mediante método de extensión. Posteriormente los discos se impregnaron de la bacteriocina y se colocaron separados en forma circular dentro de la caja contenidas con agar Mueller-Hinton y el microorganismo patógeno. Para el óptimo crecimiento de cada microorganismo se incubaron según las condiciones adecuadas de cada uno. Finalmente se midieron los halos de inhibición en (mm). (Galván & García, 2017)

Para el método pozos primeramente se preparó el inculo de las bacterias patógenas con solución salina para ser ajustada a 0,5 escala de McFarland y posteriormente se utilizó este inculó para realizar un frotis sobre el Agar Mueller-Hinton. Como siguiente paso se realizaron agujeros de 5mm de diámetro en el Agar Mueller-Hinton en donde se colocaron 15 µL de la bacteriocina. Para el óptimo crecimiento de cada microorganismo se incubaron según las

condiciones adecuadas de cada uno. Finalmente se midieron los halos de inhibición en (mm).
(Cardoso, 2012)

Diseño experimental

Factores y niveles para el estudio de bacteriocinas

Tabla 28

Factores y niveles del proyecto para probar los tipos de solución, la concentración y el tiempo de crecimiento de las bacteriocinas

Factores	Niveles
Tipo de sustrato(A)	A1: Melaza- Aloe Vera
	A2: Lactosa- Peptona
Concentración del sustrato(B)	B1: 2%
	B2: 5%
Tiempo(C)	C1: 0 horas
	C2: 24 hora
	C3:48 horas

Factores y niveles para el antibiograma

Tabla 29

Factores y niveles del experimento para determinar el antibiograma con dos microorganismos patógenos

Factores	Niveles
Tipo de solución (A)	A1: Bacteriocina de Lactosa-peptona 2% (Sol.Lac-pep)
	A2: Bacteriocina de Melaza-Aloe vera 2% (Sol.Mel-Alo)
Tipo de microorganismo patógeno (B)	B1: Monilla
	B2: E.coli

Interacción de los tratamientos a estudiar

Tabla 30

Reacción de las diferentes interacciones con los tratamientos establecidos para observar cómo reacciona con diferente sustrato, concentraciones y tiempo.

Tratamiento	Interacción	Combinación
--------------------	--------------------	--------------------

T1	A1B1C1	Melaza-Aloe vera + 2% + 0h
T2	A1B1C2	Melaza-Aloe vera + 2% + 24h
T3	A1B1C3	Melaza-Aloe vera + 2% + 48h
T4	A1B2C1	Melaza-Aloe vera + 5% + 0h
T5	A1B2C2	Melaza-Aloe vera + 5% + 24h
T6	A1B2C3	Melaza-Aloe vera + 5% + 48h
T7	A2B1C1	Lactosa-Peptona + 2% + 0h
T8	A2B1C2	Lactosa-Peptona + 2% + 24h
T9	A2B1C3	Lactosa-Peptona + 2% + 48h
T10	A2B2C1	Lactosa-Peptona + 5% + 0h
T11	A2B2C2	Lactosa-Peptona + 5% + 24h
T12	A2B2C3	Lactosa-Peptona + 5% + 48h

Tabla 31

Interacciones de las soluciones bacterianas con los microorganismos patógenos para realizar el antibiograma

Tratamiento	Interacción	Combinación
T1	A1B1	Sol.Lac-pep + Monilla
T2	A1B2	Sol.Lac-pep + E. coli
T3	A2B1	Sol.Mel-Alo + Monilla
T4	A2B2	Sol.Mel-Alo + E. coli

Modelo matemático del modelo experimental trifactorial (A*B*C)

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ij} + BC_{ij} + ABC_{ijk} + R_1 + E_{ijk1}$$

Donde:

Y: Variable respuesta de la unidad experimental

μ : efecto global

A_i : efecto de nivel i-ésimo del factor A

B_j : efecto de nivel j-ésimo del factor B

C_k : efecto de nivel k-ésimo del factor B

AB_{ij} : efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

AC_{ij} : efecto de la interacción doble del factor A por el factor C

BC_{ij} : efecto de la interacción doble del factor B por el factor C

ABC_{ijk} :efecto de la interacción triple de los factores A,B,C

R_1 :efecto de la replicación del experimento

E_{ijk1} :error aleatorio

Modelo matemático del modelo experimental bifactorial (A*B)

$$y_{ijk} = \mu + A_i + \beta_j + (A\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: μ = media global

A = efecto del nivel i-ésimo del factor A

β = efecto del nivel j-ésimo del factor B

$(A\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción doble del factor A por el factor B

ε_{ij} = error aleatorio

k = número de replicaciones del experimento

Repeticiones

Tanto en crecimiento microbiano como la actividad antimicrobiana se realizaron tres repeticiones

Análisis estadístico

Tabla 32

Tabla de análisis de varianza (A*B*C)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Tipo de sustrato (A)	1

Concentración del sustrato (B)	1
Tiempo (C)	2
Interacción A*B	1
Interacción A*C	2
Interacción B*C	2
Interacción A*B*C	2
Réplicas	2
Error experimental	22
Total	35

Tabla 33

Análisis de varianza (AxB)

Fuente de variación	Grados de libertad
Tipo de solución (A)	1
Microorganismos patógenos (B)	1
Tipo de solución x Microorganismos patógenos (A*B)	1

Réplicas	2
Error experimental	6
Total	11

Tipo de diseño experimental

En el presente estudio se aplicó un diseño trifactorial AxBxC (ANOVA DBCA) en los parámetros de crecimiento de las bacterias, obteniendo en total 12 tratamientos con tres repeticiones.

Análisis funcional

Se aplicará la prueba de Tukey al 5% para evaluar la prueba de significancia.

Variables a medir

- pH
- Acidez
- Densidad óptica a 550nm
- Grados brix

Capítulo IV

Resultados

Observación fisicoquímicos y microbiológica del Suero de Leche bovino

Los datos obtenidos en el proceso de la experimentación de las características tanto del suero industrial como el del suero artesanal se presentan en la tabla 34, a continuación:

Tabla 34

Resultados fisicoquímicos del suero de leche

	Suero Industrial	Suero Artesanal
Grados Brix	14	14
pH	4,53	4,55
Densidad	1,034	1,034
Acidez	0,41	0,9
Ceniza	0,71%	0,7%
% Grasa	0,3%	0,29%
% Humedad	91,975%	91,750%
% Proteína	1,182%	1,357%

Nota: Autoría propia.

Los resultados microbiológicos de los dos sueros son presentados en la tabla 35 en donde el petrifilm de bacterias ácido láctica del suero artesanal como el industrial presentan colonias incontables existiendo una gran afluencia de estas, caso contrario en el petrifilm de mohos y levaduras, y aerobios son contables.

Tabla 35

Resultados microbiológicos del suero de leche

	Suero Industrial	Suero Artesanal
Aerobios (UFC * ml⁻¹)	2,3 × 10 ⁴	3,24 × 10 ⁵
Mohos y levaduras (UFC * ml⁻¹)	1,6 × 10 ⁴	2,8 × 10 ⁵
Salmonella (UFC * ml⁻¹)	0	-20
E. coli (UFC * ml⁻¹)	0	-10

Nota: Autoría propia

Resultados de la caracterización e identificación de la bacteria ácido láctica**(Lactobacillus plantarum)**

Al finalizar la fermentación del suero de leche industrial y artesanal respectivamente, obtuvimos varias cepas con algunas características similares tanto en su forma, textura y en dos casos con el mismo tono, las cuales son más descritas a continuación en la tabla 36.

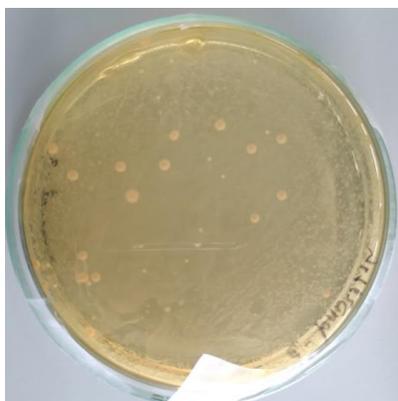
Tabla 36

Cepas aisladas y purificadas de bacterias ácido lácticas

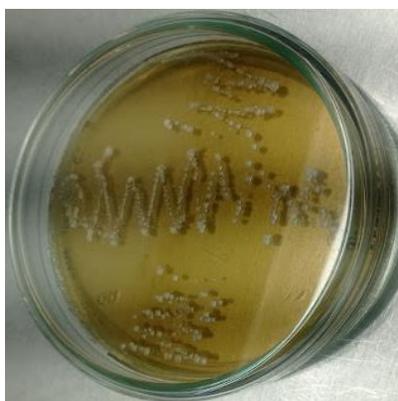
Tipo de suero de leche	Cepas	Descripción
Suero Artesanal	Cepa 1	En el caso de la cepa 1 del suero artesanal las colonias tienen forma circular con una tonalidad blanquecina, con bordes ondulados, además



de una elevación convexa y una textura espesa.

Cepa 2

Las colonias de la cepa 2 del suero artesanal presenta una forma circular con una tonalidad rosada, donde su borde es entero, tiene una elevación convexa y su textura es cremosa.

Cepa 1

Las colonias de la cepa 1 del suero industrial presenta una forma circular de color blanco con una textura cremosa y un borde entero presentando una elevación convexa.

Suero Industrial

Nota: Autoría propia

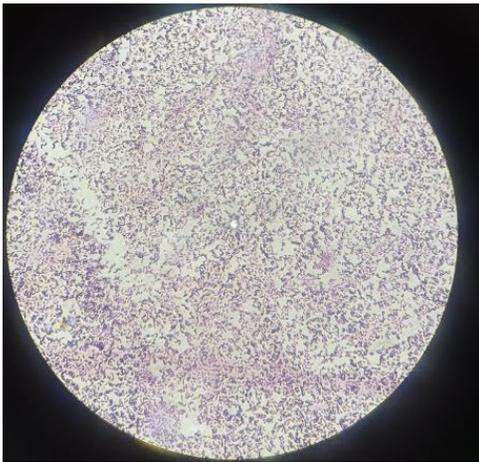
Nuestras tres cepas purificadas fueron analizadas mediante ensayos bioquímicos en donde al realizar el proceso de catalasa obtuvimos resultados negativos para todas nuestras

cepas al igual que las pruebas de oxidasa y además observamos microscópicamente la tinción gran de todas las cepas.

Tabla 37

Resultados del análisis microscópico y de los ensayos bioquímicos.

Tipo de suero de leche	Microscopia (100x)	Descripción
Suero Artesanal	Cepa 1	<p>Presentan una forma de bastones gruesos y cortos empalizados y con una tonalidad lila indicando que son Gram positivos.</p> <p>Esta cepa es negativa tanto en catalasa y oxidasa.</p>
	Cepa 2	<p>Son bacilos Gram positivos, los cuales presentan bastones alargados unidos formando cadenas, además son negativos tanto en las pruebas de catalasa y oxidasa.</p>

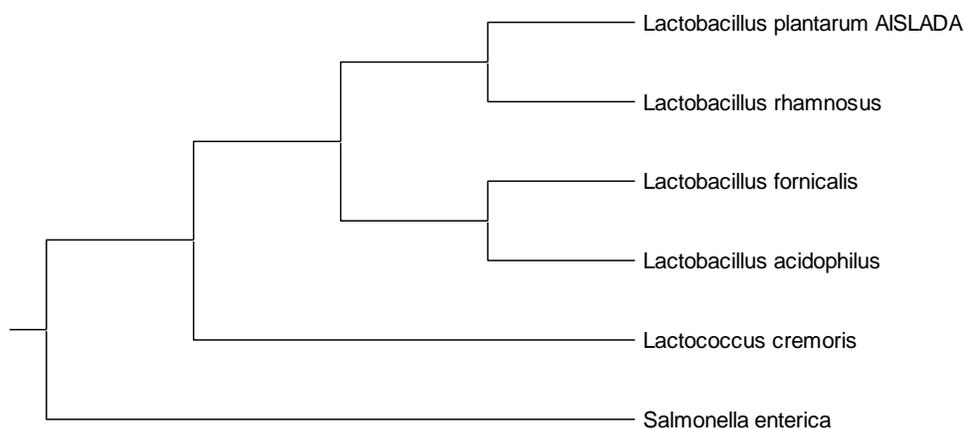
Suero Industrial	<p style="text-align: center;">Cepa 1</p> 	<p>En este caso la cepa 1 del suero industrial presenta bacilos Gram positivos, de tamaño corto y gruesos, además estos están en pares o solos. En el caso de las pruebas bioquímicas han dado negativo tanto en catalasa y oxidasa.</p>
-------------------------	--	--

Nota: Autoria propia.

Dando como resultado de la secuenciación que tanto del suero industrial como el artesanal se obtuvo una cepa de *Lactobacillus plantarum*, la cual fue comparada con 6 cepas relacionadas y un grupo externo para poder realizar el árbol filogenético en Mega-x, presentado en el Figura 3, donde podemos observar que existe un clado realzando la similitud entre el *lactobacillus rhamnosus* y además cabe mencionar que la secuencia obtenida fue corrida en el Blast dandonos que el cubrimiento de la secuencia fue del 100% con un valor de E del 0% indicandonos que se alinio por completo a la secuencia parcial de *Lactobacillus plantarum* cepa HM 16S gen de ARN ribosomal ya que practicamente son identicas.

Figura 3

Árbol filogenético del *Lactobacilos plantarum* a base de secuencia 16S ARN ribosomal



Nota: Autoría propia

Resultados al analizar nuestras hipótesis

Análisis de varianza para las diferentes variables

Varianza de la variable pH

Tabla 38

Datos obtenidos del análisis de varianza del pH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SUSTRATO	0,249167	1	0,249167	373,57	0,0000
B:CONCENTRACION	0,035784	1	0,035784	53,65	0,0000
C:TIEMPO	3,75308	2	1,87654	2813,48	0,0000

D:REPLICA	0,00094305	2	0,000471528	0,71	0,5040
	6				
INTERACCIONES					
AB	0,0237674	1	0,0237674	35,63	0,0000
AC	0,145385	2	0,0726924	108,99	0,0000
BC	0,0138431	2	0,00692153	10,38	0,0007
ABC	0,0229597	2	0,0114799	17,21	0,0000
RESIDUOS	0,0146736	22	0,000666982		
TOTAL (CORREGIDO)	4,25961	35			

Podemos observar los resultados de análisis de varianza de la variable pH en la tabla 38, donde existe una diferencia significativa tanto en todas las interacciones y los efectos principales: A (Tipos de sustratos), B (Concentración del sustrato) y C (Tiempo) debido a que los valores-p son menores de 0,005; excepto el efecto de réplica en donde no existe diferencia demostrando que existe una normalidad de datos.

Varianza de la variable acidez

Tabla 39

Datos obtenidos del análisis de varianza de la acidez

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					

A:SUSTRATO	0,0000466944	1	0,0000466944	35,02	0,0000
B:CONCENTRACION	0,0000466944	1	0,0000466944	35,02	0,0000
C:TIEMPO	0,000266167	2	0,000133083	99,81	0,0000
D:REPLICA	0,00000466667	2	0,00000233333	1,75	0,1971
INTERACCIONES					
AB	0,00000336111	1	0,00000336111	2,52	0,1266
AC	0,0000957222	2	0,0000478611	35,90	0,0000
BC	0,00000205556	2	0,00000102778	0,77	0,4747
ABC	0,0000160556	2	0,00000802778	6,02	0,0082
RESIDUOS	0,0000293333	22	0,00000133333		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00051075	35			

Los resultados del análisis de varianza de la variable acidez presentados en la tabla 39 indica que existe una diferencia significativa en tres de los efectos principales los cuales son: A (Tipos de sustratos), B (Concentración del sustrato) y C (Tiempo), al igual que en las interacciones AC y ABC. Por el contrario, no existe diferencia significativa en el efecto de réplica y en las interacciones AB y BC siendo estos datos superiores a 0,005.

Varianza de la variable grados brix

Tabla 40

Análisis de varianza de la variable grados brix

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SUSTRATO	88,36	1	88,36	886,29	0,0000
B:CONCENTRACION	139,24	1	139,24	1396,63	0,0000
C:TIEMPO	5,04125	2	2,52063	25,28	0,0000
D:REPLICA	0,0266667	2	0,0133333	0,13	0,8755
INTERACCIONES					
AB	25,5025	1	25,5025	255,80	0,0000
AC	0,86375	2	0,431875	4,33	0,0259
BC	0,19625	2	0,098125	0,98	0,3896
ABC	2,84375	2	1,42188	14,26	0,0001
RESIDUOS	2,19333	22	0,099697		
TOTAL (CORREGIDO)	264,267	35			

Podemos observar los resultados de análisis de varianza de la variable grados brix en la tabla 40, donde existe una diferencia significativa en los efectos principales: A (Tipos de sustratos), B (Concentración del sustrato) y C (Tiempo), además de las interacciones AB, AC y ABC debido a que los valores-p son menores de 0,005; caso contrario en la interacción BC y en el efecto de réplica en donde no existe diferencia demostrando que existe una normalidad de datos.

Varianza de la variable Absorbancia

Tabla 41

Análisis de varianza de la variable Absorbancia

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SUSTRATO	1,9656	1	1,9656	219,40	0,0000
B:CONCENTRACION	0,160267	1	0,160267	17,89	0,0003
C:TIEMPO	0,412061	2	0,206031	23,00	0,0000
D:REPLICA	0,116483	2	0,0582414	6,50	0,0060
INTERACCIONES					
AB	0,088209	1	0,088209	9,85	0,0048
AC	0,0543305	2	0,0271653	3,03	0,0687
BC	0,454286	2	0,227143	25,35	0,0000
ABC	0,295525	2	0,147763	16,49	0,0000
RESIDUOS	0,197095	22	0,00895885		
TOTAL (CORREGIDO)	3,74386	35			

Los resultados del análisis de varianza de la variable absorbancia presentados en la tabla 41 indica que existe una diferencia significativa en todos los efectos principales los cuales son: A (Tipos de sustratos), B (Concentración del sustrato), C (Tiempo) y D (Replica), al igual que las

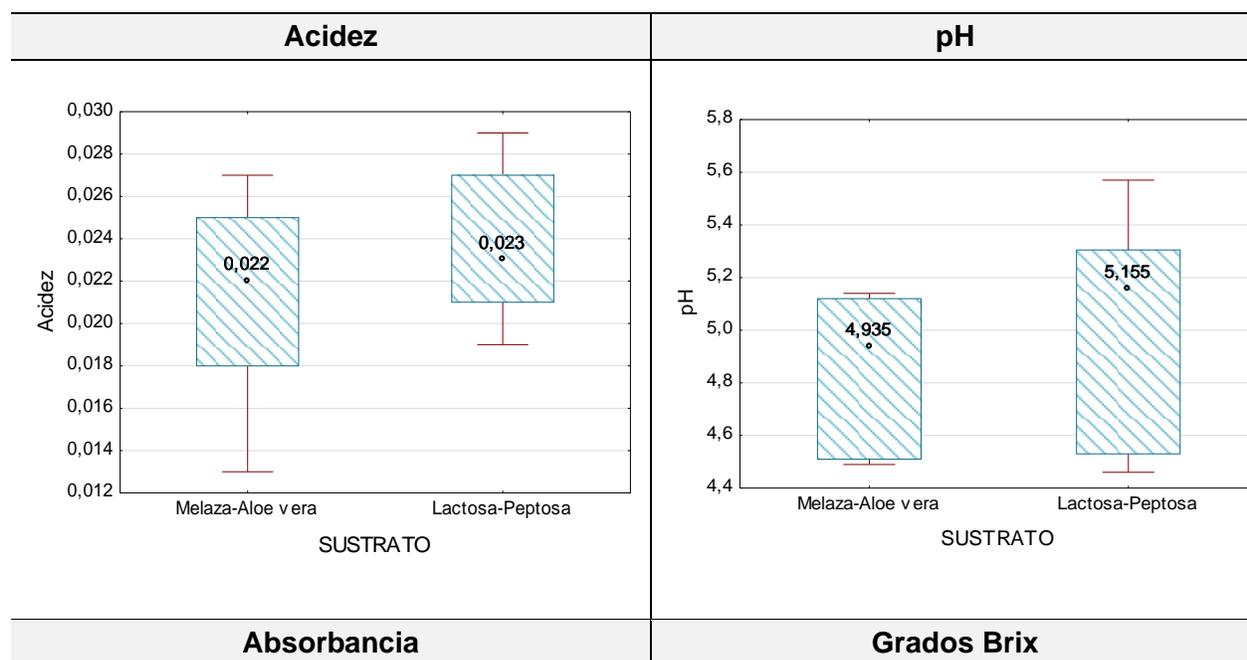
interacciones AB, BC y ABC. Por el contrario, no existe diferencia significativa en el efecto de réplica y en la interacción AC siendo estos datos superiores a 0,005.

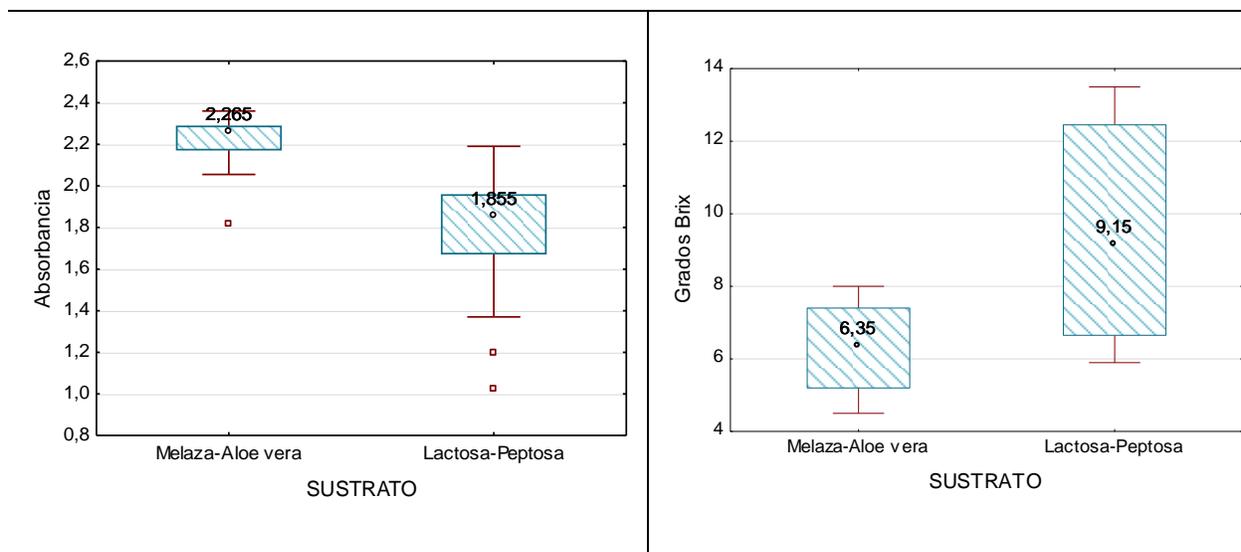
Resultados estadísticos de los tipos de sustrato a diferentes concentraciones en tres tiempos diferentes para la óptima obtención de bacteriocinas del suero de leche.

Prueba de Tukey evaluado en el tipo de sustrato sobre las cuatro variables ya establecidas.

Figura 4

Parámetros cinéticos de la fermentación para el estudio del efecto de los diferentes sustratos





Nota: Autoría propia

Tabla 42

Prueba de grupos homogéneos de Tukey para el tipo de sustrato

Tipo de sustrato	Absorbancia	Acidez	Grados Brix	pH
Melaza-Aloe vera	2,224444 ^B	0,021444 ^A	6,325000 ^A	4,852500 ^A
Lactosa-Peptona	1,757111 ^A	0,023722 ^B	9,458333 ^B	5,018889 ^B

Nota: Autoría propia.

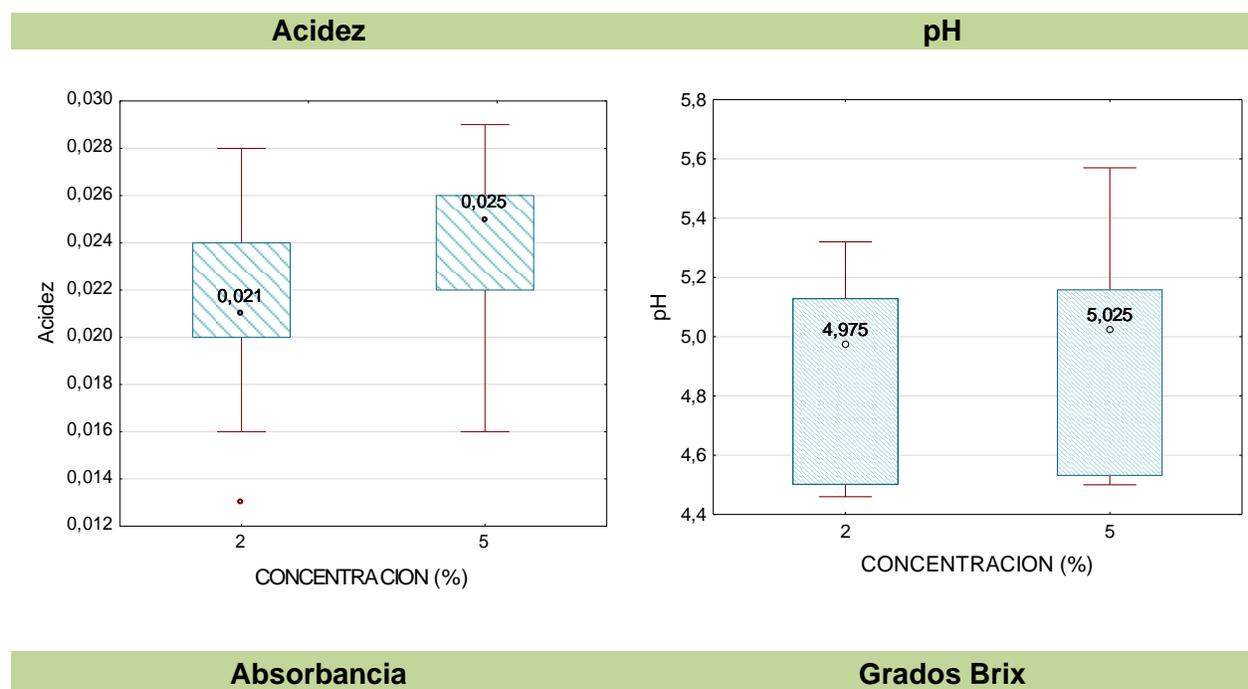
En el caso del tipo de sustrato, la prueba de tukey nos indica que existen dos grupos de acuerdo a las cuatro variables estudiadas presentado en la tabla 42, donde la variable pH presenta un grupo A (Melaza-Aloe vera) con un valor más ácido que el grupo B (Lactosa-Peptona), teniendo una media de 4,935 y de 5,155 respectivamente, como podemos apreciar en la figura 4. Los sólidos solubles también presentan dos grupos siendo el A (Melaza-Aloe vera) de 6,32 con una media de 6,35 un valor menor que el grupo B (Lactosa-Peptona) con 9,45 y una media de 9,15.

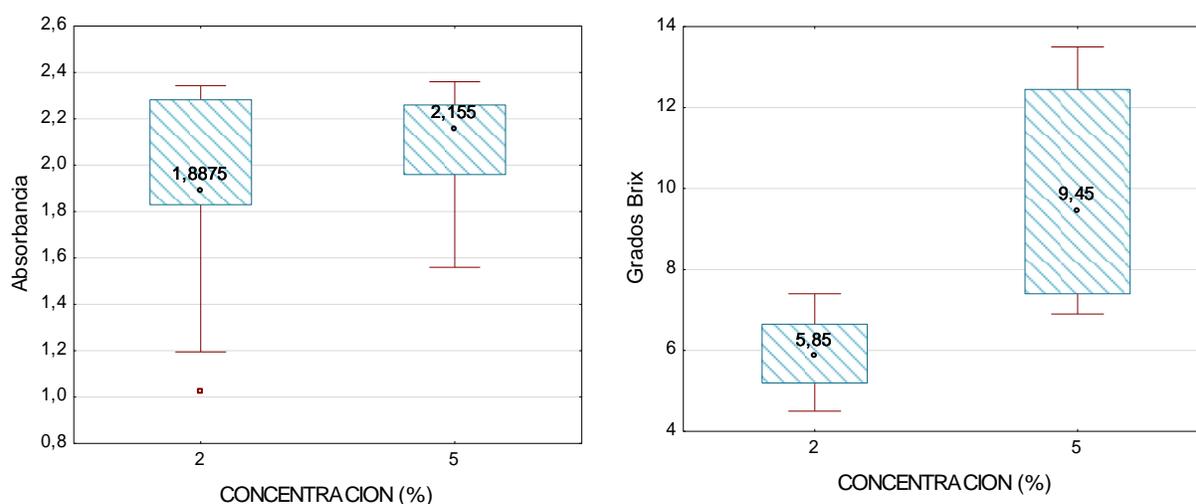
Para la variable acidez de igual forma presenta que el grupo A (Melaza-Aloe vera) es menor que el grupo B (Lactosa-Peptona), las cuales presentan una media de 0,022 y 0,023 correspondientemente. Por último, la variable absorbancia presenta diferentes a nuestros grupos, donde ahora el grupo A corresponde a Lactosa-Peptona con 1,75 siendo menor que el grupo B (Melaza-Aloe vera) con 2,22; además cabe mencionar que el grupo A tiene una media de 1,855 con dos puntos de datos únicos a diferencia al grupo B el cual solo cuenta con un punto atípico y este presenta una media de 2,205.

Prueba de Tukey evaluado en las diferentes concentraciones de sustratos sobre las cuatro variables ya establecidas.

Figura 5

Parámetros cinéticos de la fermentación para el estudio del efecto en los diferentes tipos de concentraciones.





Nota: Autoría propia.

Tabla 43

Prueba de grupos homogéneos de Tukey para las diferentes concentraciones

Concentraciones de los sustratos	Absorbancia	Acidez	Grados Brix	pH
2%	1,924056 ^A	0,021444 ^A	5,925000 ^A	4,904167 ^A
5%	2,057500 ^B	0,023722 ^B	9,858333 ^B	4,967222 ^B

Nota: Autoría propia.

En la tabla 43 observamos que en la variable absorbancia existen dos grupos, el grupo A corresponde a la concentración al 2% y el grupo B a el sustrato con la concentración al 5%, donde este último tiene un valor más alto de 2,05 y, además en la figura 5 nos indica que el grupo A (2%) tiene una media de 1,88 con un punto de dato único siendo este el único caso, ya que el grupo B (5%) no cuenta con presencia de puntos atípicos y este tiene una media de 2,155. En el

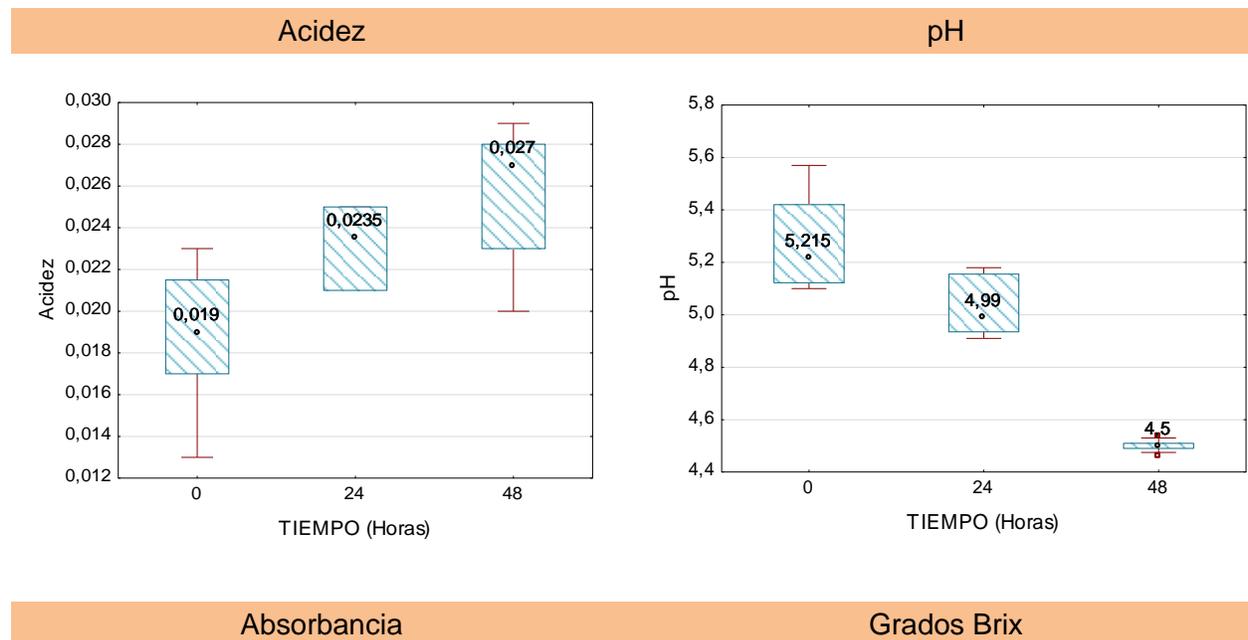
caso de la variable pH el grupo A (2%) presenta una media de 4,975 a diferencia de 5,025 la media del grupo B (5%), siendo este último el que presenta un menor grado de acidez.

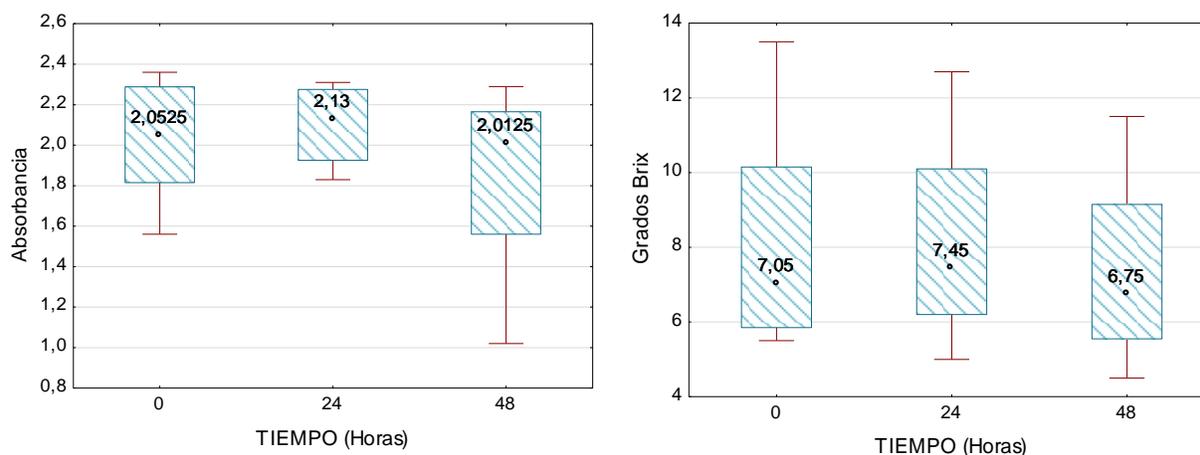
Para la variable Acidez se puede constatar de dos grupos donde el B (5%) cuenta con un valor superior que el A (2%), además cabe mencionar que en figura 5 el grupo B (5%) presenta una media de 0,025 y de 0,021 la media del grupo A (2%). Para culminar los grados brix tienen un grupo A (2%) con 5,92 y una media de 5,85; siendo mayor el grupo B (5%) con 9,85 y una media de 9,45.

Prueba de Tukey evaluado en los diferentes tiempos establecidos sobre las cuatro variables.

Figura 6

Parámetros cinéticos de la fermentación para el estudio del efecto en los diferentes tiempos.





Nota: Autoría propia.

Tabla 44

Prueba de grupos homogéneos de Tukey para los diferentes tiempos

Tiempo	Absorbancia	Acidez	Grados Brix	pH
0 Horas	2,028583 ^A	0,019000 ^A	8,162500 ^A	5,273750 ^C
24 Horas	2,098750 ^A	0,023167 ^B	8,150000 ^A	5,032500 ^B
48 Horas	1,845000 ^B	0,025583 ^C	7,362500 ^B	4,500833 ^A

Nota: Autoría propia.

La variable absorbancia en la tabla 44 nos presenta solo dos grupos, donde a las 0 y 24 horas pertenecen al grupo A con un rango de 2,02-2,09 contado así con valores superiores al grupo B con 1,84 perteneciente a las 48 horas, además vale destacar que en la figura 6 nos muestra tres cajas donde muestra valores de las medias de 2,05; 2,13 y 2,01 en los tiempos 0, 24 y 48 horas respectivamente. Para el caso de la variable acidez presenta tres grupos con valores de 0,019; 0,023 y 0,025 para los grupos A (0 horas), B (24 horas) y C (48 horas), donde en su representación podemos observar el valor de la media del grupo A que es de 0,019; el del

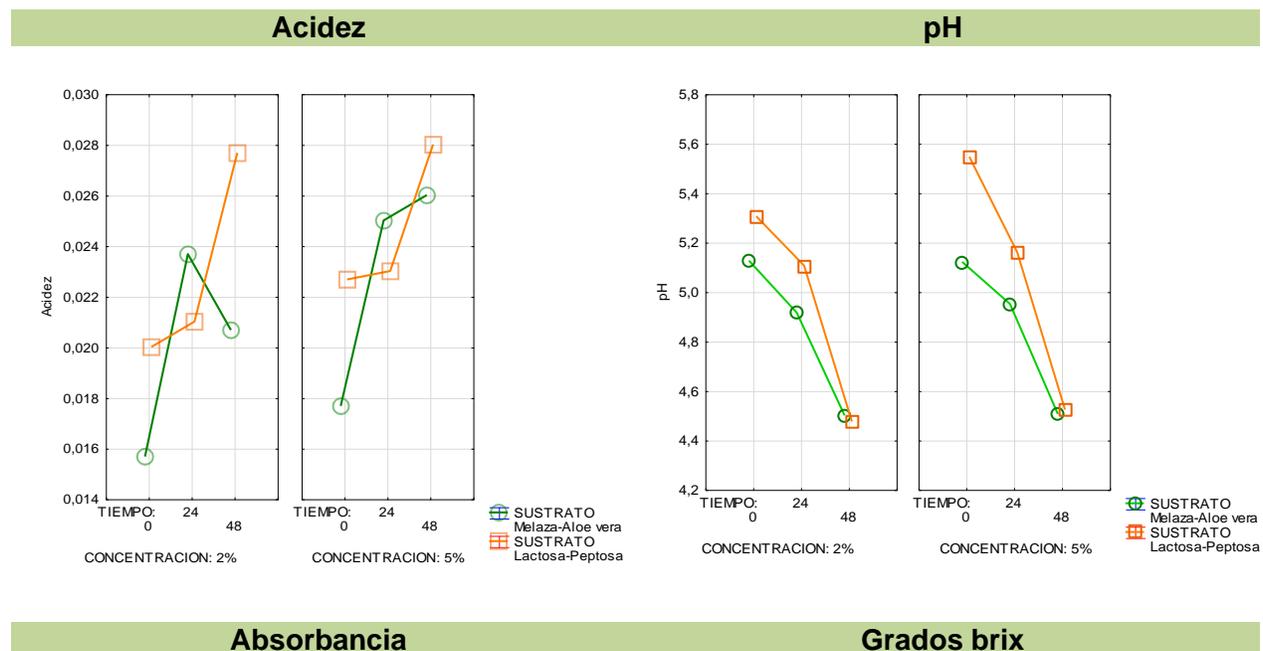
grupo C con 0,027 y por último el valor de la media del grupo B de 0,023, siendo solo en este dónde su grafica no presenta bigotes indicando su valor máximo y mínimo solo presenta los cuartiles superior e inferior.

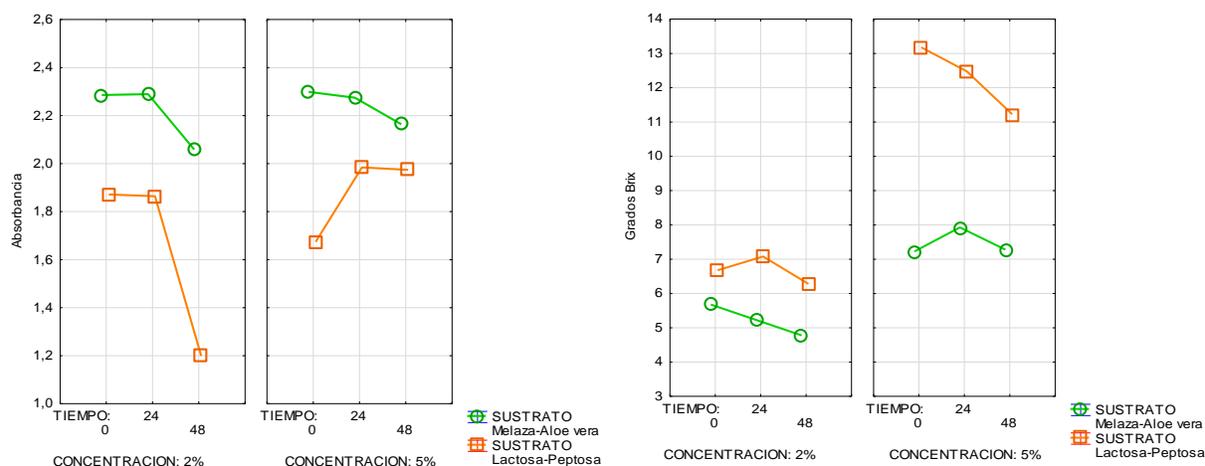
Los sólidos solubles en la figura 6 observamos tres graficas de cajas en donde en el tiempo 0 tiene una media de 7,05; a las 24 horas su media es de 7,45 y a las 48 horas esta es de 6,75. Presentando así en la tabla 42 solo dos grupos formados por las 0 y 24 horas el grupo A dejando a las 48 horas en el grupo B. Por último, la variable pH consta de tres grupos siendo el más ácido el grupo A (48 horas) con 4,500; seguido por el grupo B (24 horas) 5,03 para llegar al grupo C (0 horas) 5,2; los cuales constan de medias con valores que van desde 4,5; 4,99 y 5,21.

Prueba de Tukey evaluado en la interacción AXBXC sobre las cuatro variables ya establecidas.

Figura 7

Relación entre las variables establecidas sobre la interacción AXBXC





Nota: Autoría propia.

En la figura 16 podemos observar cómo interactúan el tipo de sustrato (A), la concentración del sustrato (B) y el tiempo (C) con las variables, como es el caso de la absorbancia en donde tanto como en el tipo de sustrato (Melaza-Aloe vera y Lactosa-Peptona), al igual que concentración al 2% y 5% disminuye sus valores con el paso del tiempo, esto igual ocurre con la variable pH donde al transcurrir el tiempo se vuelve más acida.

En el caso de la variable Grados brix en el sustrato Melaza-Aloe vera al 5% al inicio de las 24 tiene un aumento de valor, pero a las 48 horas regresa a su valor inicial sucediendo lo mismo en el sustrato Lactosa-Peptona al 2%, pero siendo diferente a los sustratos Melaza-Aloe vera al 2% y Lactosa-peptona al 5% las cuales desde el tiempo cero empieza su descenso de grados brix. Para la variable acidez el sustrato Melaza-Aloe aumenta hasta las 24 horas y a las 48 horas baja su acidez, pero en el sustrato Lactosa-Peptona con la misma concentración sigue aumentado su acidez hasta las 48 horas, solo en este caso vemos una variación ya que en la segunda concentración (5%) su acidez aumenta con el tiempo tanto en los dos tipos de sustrato.

Tabla 45

Prueba de grupos homogéneos de Tukey para la interacción

Interacción AXBXC	Absorbancia	Acidez	Grados Brix	pH
A1B1C1	2,281667 ^A	0,015667 ^F	5,65000 ^{CE}	5,125000 ^B
A1B1C2	2,285000 ^A	0,023667 ^{BC}	5,20000 ^C	4,915000 ^C
A1B1C3	2,055000 ^{ABC}	0,020667 ^{ABD}	4,75000 ^C	4,500000 ^A
A1B2C1	2,295000 ^A	0,017667 ^{DF}	7,20000 ^{AB}	5,120000 ^B
A1B2C2	2,270000 ^A	0,025000 ^{CE}	7,90000 ^B	4,950000 ^C
A1B2C3	2,160000 ^{AC}	0,026000 ^{CE}	7,25000 ^{AB}	4,505000 ^A
A2B1C1	1,867667 ^{BD}	0,02000 ^{AD}	6,65000 ^{AD}	5,305000 ^D
A2B1C2	1,860000 ^{BD}	0,021000 ^{ABD}	7,05000 ^{ABD}	5,105000 ^B
A2B1C3	1,195000 ^E	0,027667 ^E	6,25000 ^{DE}	4,475000 ^A
A2B2C1	1,670000 ^D	0,022667 ^{ABC}	13,15000 ^F	5,545000 ^E
A2B2C2	1,980000 ^{BC}	0,023000 ^{ABC}	12,45000 ^F	5,160000 ^B
A2B2C3	1,970000 ^{BC}	0,028000 ^E	11,20000 ^G	4,523333 ^A

Nota: autoría propia

La tabla 45 nos presenta los grupos homogéneos de todas las interacciones con cada variable estudiada, como es el caso de la variable absorbancia encontrando cinco grupos, donde

el grupo con valores más altos se encuentra el A: (A1B1C1, A1B1C2, A1B1C3, A1B2C1, A1B2C2, A1B2C3), caso contrario al grupo E (A2B2C2), el cual presenta los valores más bajos. En el caso de la variable pH que muestra cinco grupos, los cuales son: A (A1B1C3, A1B2C3, A2B1C3), B (A1B1C1, A1B2C1, A2B1C2, A2B2C2), C (A1B1C2, A1B2C2), D (A2B1C1) y E (A2B2C1), donde este último grupo es valor más ácido.

Para la acidez tiene seis grupos siendo el F: (A1B1C1, A1B2C1) el menos ácido, siendo todo lo contrario, por lo que el grupo A: (A1B1C3, A2B1C2, A2B1C2, A2B2C1, A1B2C2), es el más ácido. Y, por último, la variable grados brix consta de siete grupos siendo esta variable la que cuenta con una mayor cantidad de grupos, los cuales el grupo A: (A1B2C1, A1B1C3, A2B1C3, A2B1C1) presenta valores inferiores que el grupo F (A2B2C1 y A2B2C2).

Análisis comparativo entre nuestras principales variables

Tabla 46

Matriz de correlación entre las variables

	Acidez	pH	Absorbancia	Grados Brix
Acidez	1,000000	-0,547766	-0,406631	0,304514
pH	-0,547766	1,000000	0,092635	0,371663
Absorbancia	-0,406631	0,092635	1,000000	-0,211591
Grados Brix	0,304514	0,371663	-0,211591	1,000000

Nota: Autoría propia

En la tabla 46 podemos observar que la correlación más fuerte es pH-acidez, aunque esta sea una correlación inversa, pero debido a que su coeficiente se encuentra cerca del 1 que el resto, en cambio la correlación más débil es absorbancia-pH siendo el valor más cercano a cero

por lo que podríamos quitar este valor ya que no afectan con nuestros resultados y por último los coeficientes negativos se encuentran relacionados negativamente o inversamente siendo estos pH-acidez, absorbancia-acidez y grados brix-absorbancia.

Tabla 47

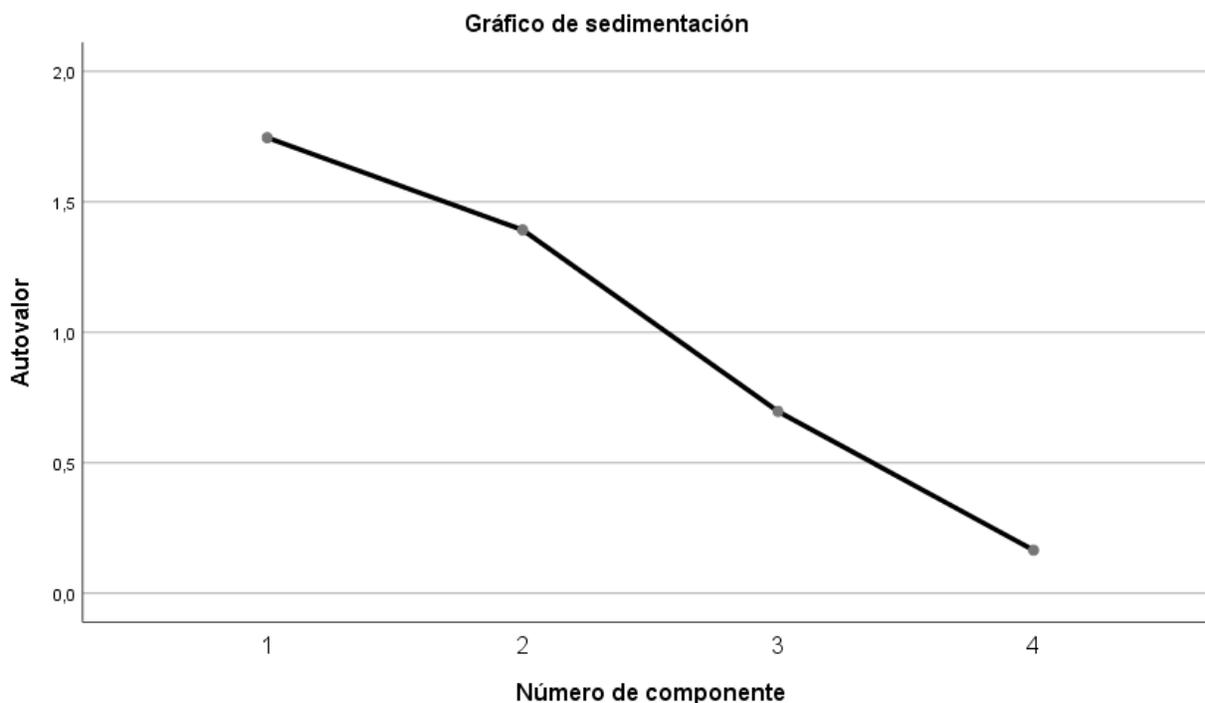
Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de cargas al cuadrado de la extracción		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
1	1,746	43,645	43,645	1,746	43,645	43,645
2	1,392	34,809	78,454	1,392	34,809	78,454
3	0,697	17,419	95,873			
4	0,165	4,127	100,000			

Nota: Autoría propia.

Figura 8

Sedimentación de los cuatro componentes en la producción de bacteriocinas



Nota: Autoría propia

Los resultados de la tabla 47 nos indica que solo con dos componentes (Acidez y pH) son productivos para nuestra investigación ya que estos muestran un valor total superior al resto ya que estos componentes logra explicar más que una variante por sí sola, también se puede visualizar en la figura 8 la sedimentación que existe en el proceso de fermentación indicada por los número de componentes donde basados con el criterio de codos podemos determinar cuántos componentes son útiles para nuestra investigación omitiendo los componentes que no muestre una pendiente o simplemente estos sean lineales. El componente 1 (Acidez) en la tabla 47 muestra un porcentaje de varianza de 43,64% siendo este el más alto y seguido del componente 2 (pH) en donde muestra un porcentaje de varianza de 34,80% como se puede observar en la figura 8 siendo el componente 1 y 2 (acidez y pH) son los que muestran valores más altos en comparación de los otros dos componentes.

Tabla 48

Matriz de componente con una extracción de 2 componentes (acidez y pH)

	Componentes	
	1	2
Acidez	-0,924	0,027
pH	0,638	0,715
Absorbancia	0,652	-0,332
Grados brix	-0,244	0,877

Nota: Autoría propia

Tabla 49

Comunalidades

	Inicial	Extracción
Acides	1,000	0,854
pH	1,000	0,918
Absorbancia	1,000	0,536
Grados Brix	1,000	0,830

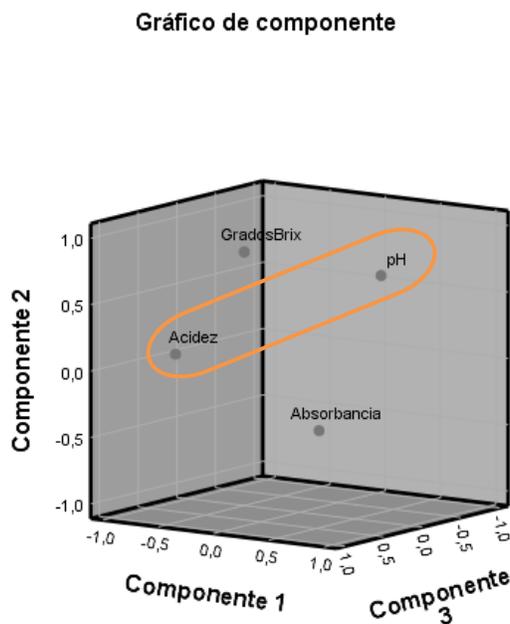
Nota: Autoría propia

La tabla 48 muestra solo dos componentes principales (acidez y pH), que son útiles para la investigación y nos describe que el componente uno (acidez) cuenta con coeficientes altos en las variables de pH y absorbancia, y en el caso del componente dos (pH), la acidez, pH y los

grados brix, indicándonos así un mejor desarrollo de nuestras bacteriocinas en cambio existe una problemática en la acidez y los grados brix ya que estos se encuentran en el eje de la izquierda al ser negativos al igual que el componente 2 en el caso de la absorción. En cambio, la tabla 49 nos indica que al extraer y solo tener esos dos componentes (acidez y pH) podemos obtener la información de la acidez en un 85%, el del pH en un 91%, la absorbancia en 53% y los grados brix en un 83%.

Figura 9

Componentes principales en espacio rotados de variables.



Nota: Autoría propia.

Nos indica la figura 9 que necesitamos de tres componentes (acidez, pH y absorbancia), ya que nuestras variables no se encuentran en un solo lugar, mostrándonos la forma en la que se encuentran agrupadas las correlaciones las cuales se encuentran compartiendo nuestras variables estudiadas presentando que existe una relación inversa entre el pH y la acidez, al igual que con

la absorbancia y además presenta una relación baja entre la acidez y los grados brix al igual que la absorbancia con el pH.

Varianza del halo de inhibición de microorganismo patógenos.

Tabla 50

Análisis de varianza del halo de inhibición

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SOLUCIÓN	0,0117188	1	0,0117188	0,82	0,4006
B:MICROORGANISMO	65,918	1	65,918	4602,27	0,0000
C:REPLICA	0,0703125	2	0,0351563	2,45	0,1664
INTERACCIONES					
AB	0,0117188	1	0,0117188	0,82	0,4006
RESIDUOS	0,0859375	6	0,0143229		
TOTAL (CORREGIDO)	66,0977	11			

Nota: Autoría propia.

Podemos observar en la tabla 50 los resultados de análisis de varianza de la variable diámetro de inhibición, donde existe una diferencia significativa en el factor B (Tipo de microorganismo patógeno) debido a que su valores-p es 0,0000 siendo este menor a 0,005; excepto en el factor A (Tipo de solución), en la interacción AXB y en la réplica en donde no existe diferencia demostrando que existe una normalidad de datos.

Prueba de Tukey evaluado los diferentes de halo de inhibición para las diferentes soluciones

Tabla 51

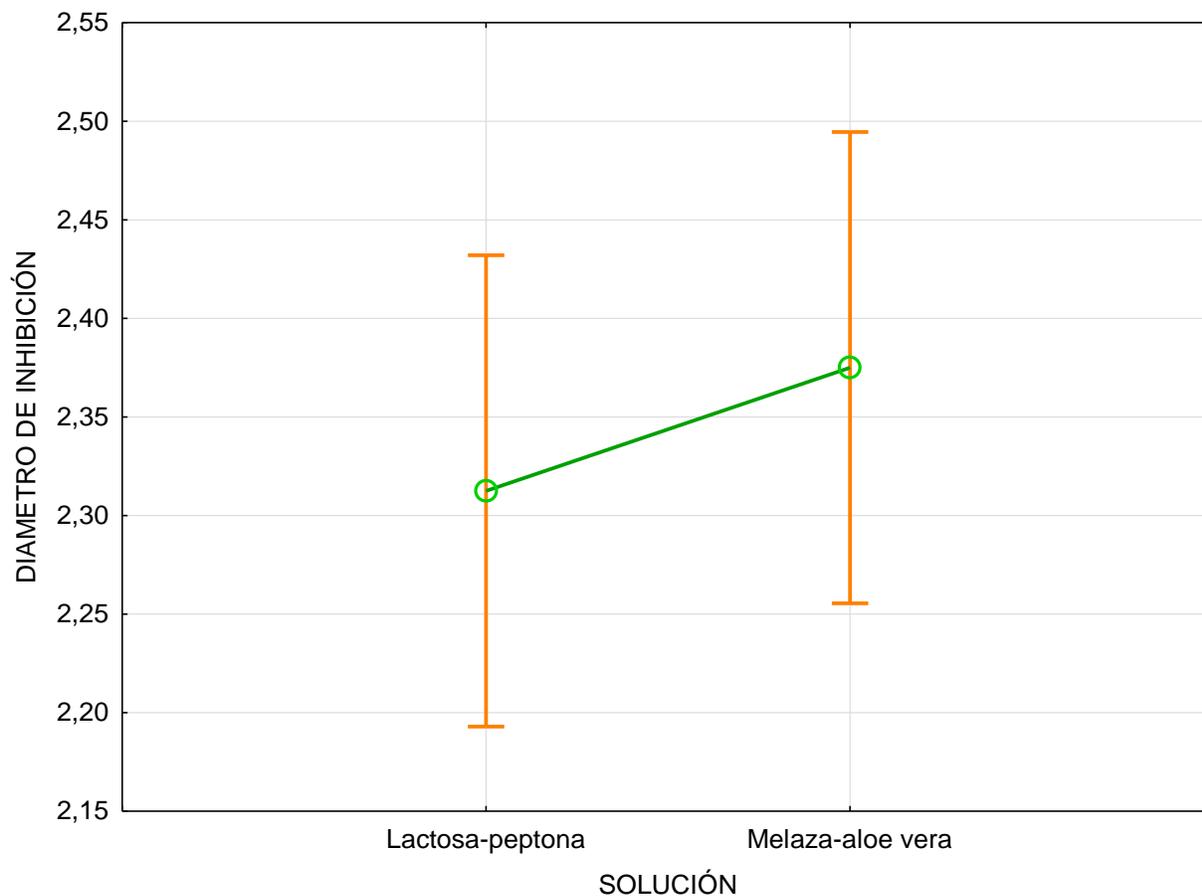
Prueba de grupos homogéneos de Tukey para el tipo de solución

Tipos de solución	Diámetro de inhibición
Sol. Lac-pep	2,312500 ^A
Sol. Mel-alo	2,375000 ^A

Nota: Autoría propia.

Figura 10

Análisis del efecto en el desarrollo del halo de inhibición por las diferentes soluciones.



Nota: Autoría propia.

Los resultados de la prueba de tukey se presentan en la tabla 51, indicándonos que solo existe un grupo homogéneo A (Lactosa-peptona y Melaza-aloe vera) ya que sus valores se diferencian solo por décimas. Además, en la figura 10 nos indica que la solución melaza-aloe vera presenta un valor de su media de 2,375 siendo esta superior a la solución lactosa-peptona por lo que no existe una diferencia significativa.

**Prueba de Tukey evaluado los diferentes de halo de inhibición para las diferentes
Microorganismos**

Tabla 52

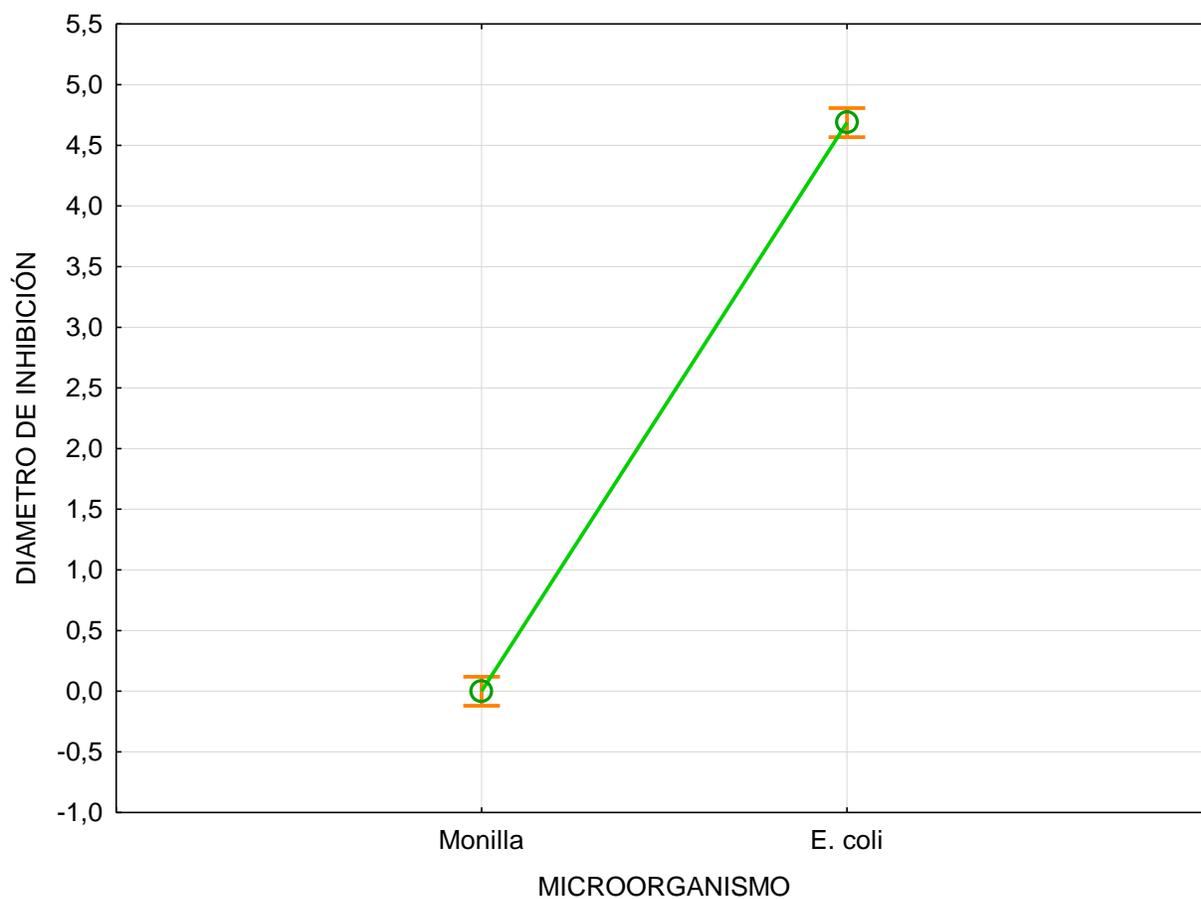
Prueba de grupos homogéneos de Tukey para los diferentes microorganismos patógenos

Tipos de solución	Diámetro de inhibición
<i>Monilla</i>	0,000000 ^A
<i>E. coli</i>	4,687500 ^B

Nota: Autoría propia.

Figura 11

*Análisis del efecto en el desarrollo del halo de inhibición por los diferentes microorganismos
patógenos*



Nota: Autoría propia.

En la tabla 52 observamos que los tipos de solución con el diámetro de inhibición la prueba de tukey otorga dos grupos independientes A (*Monilla*) y B (*E. coli*), las cuales constan con valores de medias las cuales son 0,00 y 4,68 respectivamente. Indicándonos que la *Monilla* no presento una inhibición ya que no se desarrolló un diámetro en la placa siendo todo lo contrario con el *E. coli* como vemos en la figura 11, donde vemos como el valor de la media es alta por lo crece la pendiente que une las medias.

**Prueba de Tukey evaluado los diferentes de halo de inhibición para la interacción
AXB**

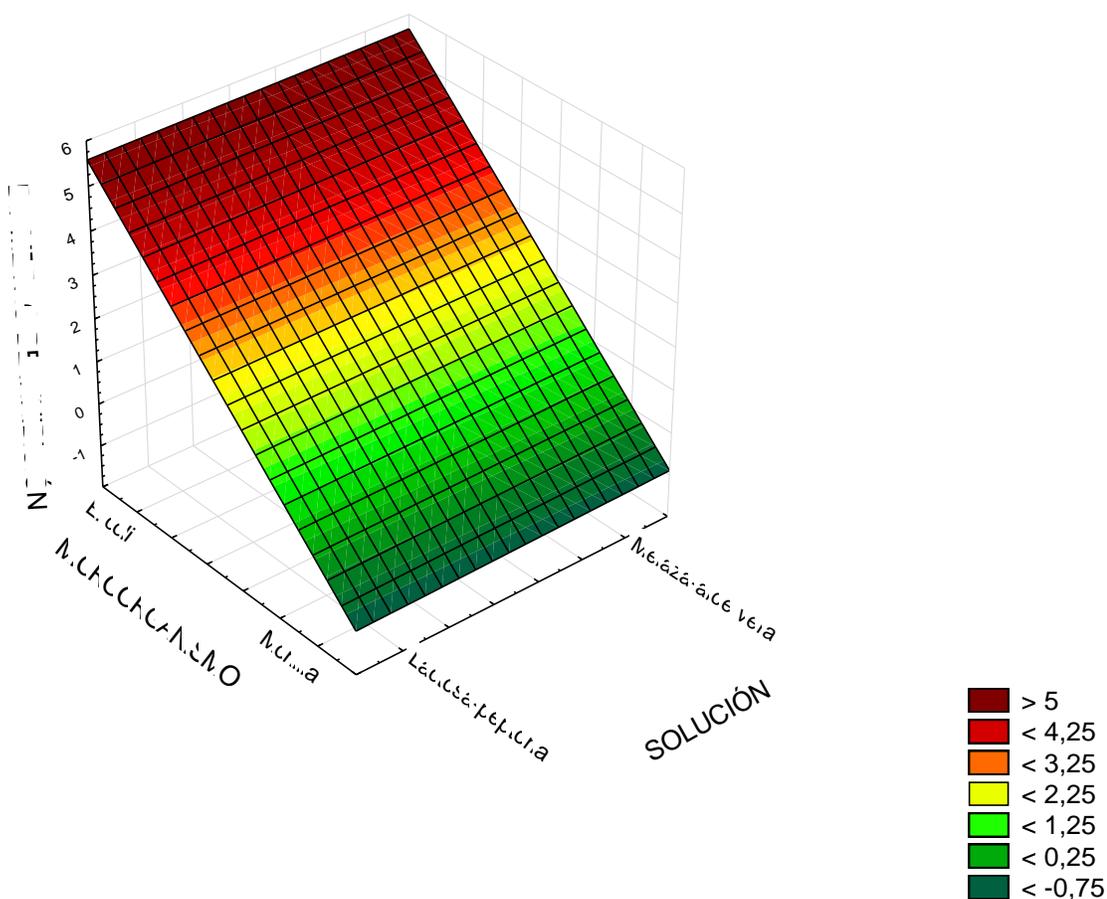
Tabla 53

Prueba de grupos homogéneos de Tukey para la interacción AXB

Interacción	Diámetro de inhibición
Sol. Lac-pep + <i>Monilla</i>	0,000000 ^A
Sol. Lac-pep + <i>E. coli</i>	4,625000 ^B
Sol. Mel-alo + <i>Monilla</i>	0,000000 ^A
Sol. Mel-alo + <i>E. coli</i>	4,750000 ^B

Figura 12

Gráfico 3D de Superficie de diámetro de inhibición contra solución y microorganismo



Nota: Autoría propia.

Para la tabla 53 los resultados en el caso de la interacción presentan dos grupos homogéneos en donde el grupo A pertenece Sol. Lac-pep + *Monilla* y Sol. Mel-alo + *Monilla* con una media de 0,00 para ambos casos y en el grupo B Sol. Lac-pep + *E. coli* (media 4,625) y Sol. Mel-alo + *E. coli* (media 4,75).

Siendo que la interacción AXB muestra diferencia significativa por lo que en la figura 12 observamos como interactúa la variable (diámetro de inhibición) con sus factores (tipos de solución y tipos de microorganismos), en donde tanto para las dos soluciones no existe una inhibición en su diámetro ya que en esa altura se encuentra una tonalidad verde oscuro indicándonos que esta tiene valores inferiores a 0,25 y en el caso del microorganismo *E. coli* tanto

en las dos soluciones (lactosa-peptona y melaza- aloe vera) en el eje del diámetro de inhibición se encuentra un color conchevino por lo que se encuentra valores menores de 5.

Capítulo V

Discusión

Observación fisicoquímicos y microbiológica del Suero de Leche bovino

Los sueros de leche, tanto el artesanal como el industrial, caen en la categoría de suero ácido debido a que su pH se encuentra en el rango de 5,5-4,8, como se observa en la Tabla 34. En relación a otros resultados fisicoquímicos, cabe destacar que los valores se mantienen dentro de los rangos establecidos. La humedad, por ejemplo, se alinea con estudios previos como Paredes Montoya (2014), variando en aproximadamente un 1%. En cuanto a la densidad del suero, nuestros valores son de 1,034g/cm³, superiores a los 1,028g/cm³ mencionados por Planells (2020) y otros autores que también informan de una densidad similar.

Además, tanto el porcentaje de proteína láctea (mínimo 8%), grasa láctea (máximo 0,3%), ceniza (máximo 0,7%) y la acidez titulable (mínimo 0,35%) cumplen con los requisitos del Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN 2594:2011. La evaluación de estas propiedades fisicoquímicas del suero añade relevancia para su uso como insumo o materia prima. Esto permite comprender sus características físicas y químicas, ajustándose a estándares predefinidos para lograr uniformidad y consistencia.

De acuerdo con la INEN (2011) la cantidad de aerobios mesófilos se encuentra dentro del rango de hasta 1×10^5 UFC/mL por lo que, el suero de leche industrial (aerobios $2,3 \times 10^4$ UFC/mL) se encuentra dentro del rango establecido pero el artesanal tiene un valor superior $3,24 \times 10^5$ UFC/mL esto debido a que se tienen problemas de aseo e higiene ya sea durante el proceso o los utensilios de ordeño y también por el mal cuidado de las ubres y pezones como lo menciona Jayarao (2004), además Calderón (2012) explica que el crecimiento de estos

microorganismos suele ocurrir en el traslado de la leche a una temperatura adecuada para inhibir este crecimiento por lo que el tiempo es un factor que aporta a esto.

En el caso de mohos y levaduras la norma mexicana establece que el límite máximo es de 2×10^2 UFC/mL (NOM-234-SSAI, 2010) siendo este un valor pequeño a comparación del suero industrial ($1,6 \times 10^4$ UFC/mL) y suero artesanal ($2,8 \times 10^5$ UFC/mL) demostrando que los sueros estudiados pudieron ser afectados tanto por el entorno o simplemente por el lugar donde se realizan este proceso de obtención del lactosuero, ya que de acuerdo con Delana (1997) esto puede otorgarle sabores o características anormales dependiendo del tipo de cepa.

Los análisis realizados en el suero industrial no han revelado la presencia de *E. coli* ni Salmonela. Sin embargo, en el caso del suero artesanal, hemos identificado la presencia de 2 colonias de *E. coli* y 4 colonias de *Salmonella* respectivamente. Al convertir estos valores a unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), se obtienen valores negativos, indicando que estas bacterias están presentes en el suero de leche, pero en cantidades mínimas. Estos resultados cumplen con los requisitos establecidos por el Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN 2594:2011. Según lo señalado por Calderón (2006), la presencia de *E. coli* suele indicar una contaminación significativa de origen fecal, lo que podría relacionarse con prácticas inadecuadas de higiene por parte de los manipuladores. La presencia de *Salmonella*, por otro lado, podría estar vinculada a la contaminación del agua o a la falta de desinfección adecuada de las ubres de las vacas después del ordeño, como menciona Novoa (2005). Es importante destacar que las cantidades mínimas de estas bacterias en el suero artesanal no representan un riesgo alto para la salud, pero es recomendable tomar medidas para mejorar los protocolos de higiene y sanidad en la manipulación de la materia prima y durante el proceso de obtención del suero de leche artesanal.

Caracterización e identificación de la bacteria *Lactobacillus plantarum* obtenida del suero de leche

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* obtenidas del suero de leche, demuestran un uso valioso de este subproducto, donde Chakraborty (1999) destaca que en muchas ocasiones estos sueros son considerados residuos por la industria láctea, a pesar de contener hasta el 55% de los nutrientes totales de la leche, incluyendo lactosa, proteínas y lípidos, esenciales para el crecimiento microbiano, especialmente de bacterias ácido lácticas (BAL), como señala Sabrina Sabo (2019).

Tanto la cepa 1 como la 2 del suero artesanal y la cepa 1 del suero industrial fueron positivas en cuanto a su forma de bastones. Además, las pruebas de catalasa y oxidasa dieron negativo, coincidiendo con las características de las BAL según Savadogo (2006), Ekinci (2008) y Rojas (2020).

Siendo la cepa 1 del suero artesanal e industrial de donde obtuvimos la bacteria *Lactobacillus plantarum* confirmando nuestra sospecha la secuenciación realizada con el gen 16S ribosomal, la cual presenta una configuración morfológica de bacilos con medidas aproximadas de 0.9-1.2 x 1.0-8.0 μm , estas pueden hallarse de manera individual o formando cadenas diminutas. Manifiesta un perfil de metabolismo heterofermentativo y exhibe la capacidad de funcionar como anaerobio facultativo. Muestra una preferencia por condiciones mesófilas, lo que le permite prosperar en un rango de temperaturas comprendido entre 15 °C y 45 °C. Su estado de crecimiento óptimo se logra en un entorno caracterizado por la presencia de 4 a 6% de cloruro de sodio, y en un rango de pH que oscila entre 4 y 9 (Kandler, 1986).

Tipos de Fuente de Carbono y nitrógeno (Factor A)

Destaca García (2013) que la incorporación de una fuente adicional de carbono resulta propicia cuando se persigue un incremento sustancial en la tasa de proliferación bacteriana. Sin embargo, esta estrategia no es aconsejable si el propósito es la generación de ácido láctico por

lo que se hace hincapié en la relevancia de emplear fuentes nitrogenadas con el fin de fomentar la síntesis de ácido láctico. Debido a lo anterior se optó por equilibrar nuestro sustrato combinando fuentes de carbono (Lactosa y Melaza) y de nitrógeno (Peptona y Aloe vera), utilizando recursos de fácil acceso e innovadores para así poder obtener un óptimo desarrollo de bacteriocinas.

Los parámetros cinéticos se obtuvieron mediante cuatro variables las cuales no presentaron diferencia significativa en los datos obtenidos para nuestro factor A (Tipo de sustrato), donde el primer sustrato de Melaza- Aloe vera tuvo un valor mayor de 4,85 pH, siendo más ácida que el sustrato Lactosa-Peptona la cual tuvo un valor inferior de 5,0 pH ejecutándose dentro de su intervalo de crecimiento ideal, con valores de pH que se sitúan en el margen comprendido entre 4 y 9 según las observaciones de Kandler en 1986. Sin embargo, Jurado & Jarrín (2015) resalta que los entornos de cultivo presentan una ligera acidez, abarcando un rango de pH de 4.5 a 6.4, en condiciones de temperatura que fluctúan entre 30 y 40 °C, por lo que las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen la capacidad de prosperar en un extenso espectro de valores de pH, aunque exceder los límites de su tolerancia puede inducir perturbaciones en el microorganismo, incluyendo disfunciones en su membrana plasmática que restringen su disponibilidad y viabilidad (Willey, Sherwood, & Woolvertonn, 2009).

La acidez fue otra de las variables a estudiar donde, mencionan Heredia Kimberly y Suárez Elian (2023) que es de suma importancia considerar que la acidez guarda una correlación intrínseca con el pH. Por consiguiente, un incremento en la acidez titulable puede denotar una acidificación más pronunciada del entorno durante el proceso de fermentación, cuyos efectos pueden ser favorables o adversos según las predilecciones microbianas y la naturaleza deseada del producto final que se persigue alcanzar. Por lo que los resultados no se cumplen, ya que estos no son inversamente proporcional ya que la Melaza-Aloe vera obtuvo una acidez de 0,21 y 0,23 fueron de la Lactosa-peptona siendo esta el mayor valor, esto pudo ocurrir debido a un proceso de síntesis reducida de ácido láctico en el matraz Erlenmeyer, posiblemente debido a una

declinación en el pH con el transcurso del tiempo, un fenómeno intrínseco a la fermentación que no pudo ser regulado adecuadamente en este sistema, además Castellano, Garcia, Astrudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011) sugiere que es de gran importancia tener en consideración el valor de pH y sus repercusiones en el curso de la fermentación al seleccionar una fuente de carbono para las bacterias.

La mejor absorbancia alcanzada fue de la Melaza-aloe vera con 2,22 y 1,75 de la Lactosa-peptona siendo la primera la que contiene un mayor crecimiento de bacterias como lo podemos constatar tanto con Briggith (2021) donde considera que el mejor valor de absorbancia son los resultados más alto ya que presenta un mejor crecimiento.

La última variable son los grados brix los cuales nos permiten conocer los azúcares disueltos en nuestros medios de fermentación para la obtención de *L. plantarum* (Briggith, 2021), por lo que el sustrato Melaza-aloe vera presenta una menor capacidad de consumo de las azúcares presentes en la fermentación que el sustrato Lactosa-peptona. Adicionalmente Benavides (2019) menciona que el desarrollo de las bacterias introducidas ocasionaría una disminución en los sólidos solubles, particularmente cuando se considera esta reducción como una evaluación indirecta de los carbohidratos solubles, los cuales representan los constituyentes que tienen un impacto más considerable en esta medición.

La combinación de melaza y aloe vera se determina como el sustrato más favorable, dado que ofrece una mayor absorbancia y un pH propicio para el cultivo de *L. plantarum*, tal y como Hernández-Monzón (2015) expone en su estudio, llegando a la conclusión de que la solución de melaza y aloe vera demuestra una viabilidad sobresaliente, además de una capacidad para reducir el pH y asimilación de glucosa y sacarosa en comparación con otros medios, en paralelo a la eficacia del medio MRS.

En el estudio realizado por Heidy Pérez-Leonard y Aldo Hernández-Monzón en 2015, se hace mención al Aloe vera como un sustrato de naturaleza no convencional para la utilización de estos microorganismos. Esta elección resulta intrigante debido a la presencia de vitaminas en su composición, y la mayor proporción de sus carbohidratos en forma de manosa polimérica, pero gracias a su composición nutricional y características químicas, el Aloe vera exhibe un alto potencial para estimular el desarrollo de bacterias probióticas. Además se constató que tanto el jugo como la pulpa del Aloe vera se configuran como sustratos idóneos que promueven el crecimiento de bacterias lácticas y, como consecuencia, la producción de ácido láctico.

De manera paralela, la melaza de caña también se emplea como sustrato para el cultivo de *L. plantarum*. Los resultados evidencian que las condiciones óptimas para el florecimiento de este microorganismo incluyen una concentración de melaza del 20%, una temperatura de 30 ± 1 °C durante 24 horas, un pH de $5,2 \pm 0,1$, agitación a una velocidad de 100 min^{-1} y una viabilidad de $4,3 * 10^{10}$ UFC/mL, tal como ha sido documentado por Ossa en 2010.

Factor B (tipos de concentración del sustrato)

Las cepas bacterianas pertenecientes al género *Lactobacillus* se cultivan de manera habitual en el medio conocido como MRS, el cual ha sido diseñado con el propósito de satisfacer sus demandas nutricionales y proporcionar un entorno altamente propicio para su desarrollo. No obstante, ha sido señalado que enriquecer la composición de este medio a través de la incorporación de sales y carbohidratos resulta en un aumento en la biomasa celular y conlleva a una mejora en la producción de compuestos bioactivos, tal como se ha documentado en el trabajo de León de la O y colaboradores (2013).

Realizamos una variación de concentraciones en nuestros sustratos tratados, siendo estas al 2% y 5% debido a que el estudio llevado a cabo por Hernández-Rosas (2021) sostiene que, más allá de las fuentes de carbono y nitrógeno, es esencial considerar la concentración y la

proporción de estos elementos en diversas circunstancias. Donde obtuvimos que la concentración al 2% tiene un valor más ácido de 4,90 pH que 4,96 pH siendo este el valor de la concentración al 5%, demostrándonos que aunque exista una variación de concentraciones los valores de la variable pH se encuentra dentro del rango establecido los cuales son de 4,5 a 6,4 mencionados por Jurado & Jarrín (2015), además este recalca que las cepas de bacterias ácido lácticas experimentan un crecimiento satisfactorio en ambientes microaeróbicos, caracterizados por niveles de oxígeno oscilantes entre el 2% y el 10%. Además, es relevante destacar que los medios en los que se cultivan mantienen un pH ligeramente ácido, como se ha mencionado previamente.

Los grados brix en la concentración al 2% muestra un valor inferior de 5,92 en comparación con la concentración al 5% con 9,85 esto debido a que las bacterias consumen los carbohidratos presentes en la fermentación por lo que esto permite el desarrollo de las BAL (Briggith, 2021). En el caso de la absorvancia, Castellano, Garcia, Astrudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011) afirma que, el factor preeminente que incide en la densidad óptica se sustenta en la concentración de la fuente de carbono empleada, dado que su influencia puede tener un efecto tanto positivo como negativo. Siendo nuestros resultados mayor de 2,05 en la concentración 5% y presenta una menor absorvancia la concentración al 2% con 1,92.

Para la variable acides la concentración al 2% obtuvo un valor de 0,021 y en cambio la concentración al 5% indico una mayor acidez con 0,023, siendo el primer valor la menor acidez debido a la limitada concentración del sustrato en cuestión, la cual no aporta una cantidad adecuada de nutrientes al entorno para posibilitar el metabolismo del ácido láctico por parte de las bacterias (Viteri y Serpa, 2023).

El mejor tratamiento el cual mejora la cinética de desarrollo siendo la concentración al 2% ya que esta presenta valores bajos de pH, acidez y grados brix debido a que la implicación del exceso o la insuficiencia del sustrato en la expansión celular, dado que la carestía de la fuente

de carbono condujo a un rápido ingreso de las bacterias ácido lácticas (BAL) en una fase de latencia y declive, lo que a su vez decreció la generación de biomasa. En el proceso de fermentación, los microorganismos compiten por los recursos energéticos y nutrientes. En la etapa inicial, esta competición se centra en los aminoácidos libres y péptidos pequeños presentes, mientras que en las fases finales de la fermentación, la contienda se centra en los péptidos liberados por la actividad de las enzimas proteolíticas (Ossa, 2010).

Contreras-Pinzón, María Elizabeth; Domínguez-Espinosa, Rosa María; González-Burgos, Araceli (2007) discute la viabilidad de emplear concentraciones de 50% y 75% (v/v) de jugo de Aloe vera, combinadas con un 5% (p/v) de cualquiera de los dos suplementos (miel o glucosa), con el propósito de promover un mayor crecimiento de cualquiera de las dos cepas lácticas analizadas. Debido a la capacidad de adaptación de *L. plantarum* y su resistencia en entornos desfavorables, se decidió investigar si las tendencias observadas en esta cepa se podrían aplicar a otras culturas de microorganismos lácticos, lo cual contradice con nuestros resultados pero desde otro enfoque nuestro resultado usa el caldo MRS como base por lo que nosotros le estamos añadiendo más valor tanto de carbono como nitrógeno a los nutrientes que otorga este medio demostrando que solo al añadir una concentración del 2% o del 5% esta permite ser un ambiente óptimo para nuestras bacteriocinas.

Factor C (Tiempo de fermentación)

Brando (2023) señala que, más allá de los constituyentes del medio de cultivo, diversos factores, como el tiempo, desempeñan un papel en la generación de bacteriocinas. Por ende, se exploró el tiempo como una variable influyente para la definición de los parámetros cinéticos relativos tanto a la bacteria como a la producción de bacteriocinas.

Teniendo como resultado diferencia significativa entre cada uno de sus variables a estudiar, donde se observa que la variable pH presenta tres diferentes valores en el tiempo siendo las primeras 0 horas con 5,27; 24 horas con 5,03 y 48 horas 4,5 por lo que determinamos que el

mejor dato es a las 48 horas ya que este es el más ácido, aunque todos los pH se encuentran dentro del rango de valor que está entre 4 y 9 establecido por Kandler (1986). De acuerdo con el estudio llevado a cabo por Torres (2017), se demostró que a medida que el microorganismo crece a lo largo del tiempo, se produce una reducción en el pH. Este fenómeno se atribuye al aprovechamiento de los carbohidratos adicionados al medio de cultivo por parte de los microorganismos, los cuales actúan como fuente de energía y pueden llegar a generar ácidos orgánicos como subproducto.

Para la absorbancia presenta valores superiores el tiempo 0 y 24 horas con valores de 2,02 y 2,09 respectivamente siendo las 48 horas el mínimo valor de 1,84. Siendo similar con la variable grados brix donde el valor inferior es de las 48 horas con 7,36 siendo los valores más altos a 0 y 24 horas con 8,16 y 8,15. Por lo que estas dos variables presentan diferencias significativas, por lo que influye directamente al desarrollo de la bacteriocina. Briggith (2021) menciona que una disminución de los grados brix nos indica las particularidades observadas en el proceso metabólico de los azúcares solubles durante el metabolismo de las bacterias ácido lácticas.

Por último, la variable acidez presenta diferente significativa por lo que presenta tres valores siendo el valor inferior el de las 0 horas con 0,019, seguido por las 24 horas con 0,023 terminando con el valor más ácido de 0,025; siendo este el seleccionado como el mejor tiempo. En el trabajo de investigación llevado a cabo por Fajardo-Argoti Catalina (2021), se hace referencia a que durante las primeras 24 horas de fermentación, la bacteria experimenta una reproducción sin restricciones derivadas de la disponibilidad de nutrientes, operando a su máxima velocidad. Además, es de destacar que tanto la velocidad como el período de duplicación están intrínsecamente relacionados con la concentración de nutrientes; en este sentido, a concentraciones elevadas, la velocidad específica de crecimiento alcanza valores máximos.

Interacción de los factores (AXBXC)

Conforme a las investigaciones de Alquicira (2006), la formulación del medio de cultivo, incluyendo la naturaleza del sustrato y las proporciones de las fuentes de nitrógeno y carbono, ejerce una influencia de importancia primordial en la generación de bacteriocinas.

Los resultados de la interacción indican que existe diferencia significativa en cada uno de las variables de estudio, también se muestra que la evolución del pH durante las fermentaciones de *L. plantarum* en los diversos sustratos examinados constituyó un indicador relevante, reflejando la producción de ácidos orgánicos y el crecimiento microbiano. En todas las variantes de sustratos, con sus distintas concentraciones y a lo largo del tiempo, los valores de pH al finalizar la fermentación se situaron en niveles bajos, fluctuando entre 4.47 y 5.54. Estos valores resultan compatibles con los rangos propicios para el crecimiento óptimo según lo definido por Kandler (1986).

Entre los medios que concuerdan con estos valores se encuentran Melaza-Aloe vera+5%+48h (4.505), Melaza-Aloe vera+2%+24h (4.500), Lactosa-Peptona+5%+48h (4.523) y Lactosa-Peptona+2%+48h (4.470). Sin embargo, conforme a las directrices de Jurado & Jarrín (2015), se advierte que estos valores no deben descender por debajo de 4.5 ni superar 6.4. Por lo tanto, es pertinente descartar el valor de pH obtenido de 4.47, que corresponde a Lactosa-Peptona+2%+48h. Este resultado podría sugerir un cultivo técnico de calidad subóptima, ya que la drástica reducción en el pH podría inducir una acidez excesiva, llevando incluso al deceso de los microorganismos, tal como señala Mesa-Mariño y colaboradores (2016).

La acidez presenta a el grupo E exhibiendo los valores más elevados, correspondientes a Melaza-Aloe vera+5%+24h (0.026), Melaza-Aloe vera+5%+48h (0.025), Lactosa-Peptona+5%+48h (0.028) y Lactosa-Peptona+2%+48h (0.027). Esto resalta una relación inversamente proporcional entre la acidez y el pH. De esta forma, un aumento en la acidez titulable puede indicar una acidificación más pronunciada del medio durante la fermentación. Esta

circunstancia puede ser beneficiosa o no, según las preferencias de la bacteria involucrada y el objetivo del producto final buscado. Es válido corroborar estos resultados con el estudio de Pérez & Hernández (2015), quienes observaron una tendencia similar. La disminución del pH y el aumento en la acidez total durante la fermentación se atribuyen exclusivamente a la producción de ácido láctico como el principal metabolito de las bacterias ácido lácticas. Además, se plantea que estos valores podrían resultar inhibidores para bacterias no deseables. Además, se evidenció que a medida que la acidez aumentaba, la viabilidad del microorganismo experimentaba un incremento.

Dentro del conjunto F, se identifican los valores más elevados de la variable grados Brix en los casos de Lactosa-Peptona+5%+0h (13,12) y Lactosa-Peptona+5%+24h (12,45). Estos resultados presentan una mayor concentración de carbohidratos, principalmente porque se encuentran en las fases iniciales de la fermentación, donde aún no se ha completado el consumo de los nutrientes necesarios para la producción de bacteriocinas. Este panorama contrasta con el grupo C, donde los valores de Melaza-Aloe vera+2%+0h (5.65), Melaza-Aloe vera+2%+24h (5.20) y Melaza-Aloe vera+2%+48h (4.75) exhiben una disminución en la magnitud. Esta disminución se debe a que en este grupo se evidencia un aumento en el crecimiento de las bacterias inoculadas. El descenso en esta propiedad después de las primeras 24 horas es predecible, especialmente porque los grados Brix actúan como una medida indirecta de las fuentes de carbono, las cuales son los componentes que han sido más influyentes y consumidos durante el proceso de fermentación, de acuerdo con lo señalado por Benavides (2019). Por último, podemos observar que no se tiene una correlación fuerte entre la acidez y los grados brix ya que estos son inversamente proporcionales.

Los resultados demuestran que los valores más elevados de Absorbancia se encuentran en el grupo A, conformado por Melaza-Aloe vera+2%+0h, Melaza-Aloe vera+2%+24h, Melaza-Aloe vera+5%+0h, Melaza-Aloe vera+5%+48h, Melaza-Aloe vera+5%+48h y Melaza-Aloe

vera+2%+48h. Dentro del grupo A, los valores corresponden a las etapas iniciales de la fermentación, y para un análisis más detallado, se centra en los sustratos con una duración de 48 horas. Esto se justifica debido a que, en este período, ya se ha logrado un desarrollo significativo en la producción de biomasa y, además, se ha observado un incremento en el crecimiento de las bacterias involucradas en el proceso (Castellano, Garcia, Astrudillo, López Galán, & Florez Pardo, 2011).

Identificada la configuración óptima como Melaza-Aloe vera+2%+48h, se logra un pH ácido de 4,47, evidenciando una correlación robusta de 0,37 con la variable grados Brix, presentando un valor inferior de 4,75. Es relevante señalar que esta variable muestra una relación inversa con la acidez, manifestando un valor de 0,025. Por otro lado, la absorbancia registra valores superiores en contraposición a la acidez. Estos vanguardistas sustratos poseen ventajas notables: la melaza, líquido viscoso de tonalidad oscura que alberga sales y otros compuestos solubles en álcali, constituye el subproducto final de la extracción o refinación de sacarosa, glucosa y fructosa a partir de la caña de azúcar. Adicionalmente, incluye sustancias no fermentables y melanoidinas derivadas de la condensación de azúcares y aminocompuestos (Ossa, 2010). Asimismo, la Aloe vera, con su potencial para fomentar el desarrollo de bacterias probióticas, aporta componentes nutricionales que la convierten en una valiosa materia prima para alimentos funcionales y, en perspectiva, alimentos del porvenir. De hecho, el Aloe vera podría establecerse como fuente de compuestos químicos nutricionales para la innovación y comercialización de productos alimentarios, en consonancia con la afirmación de Pérez y Hernández (2015). En este contexto, la combinación de sábila y melaza surge como una alternativa económicamente ventajosa y nutritiva al empleo del costoso medio de cultivo comercial MRS en el fomento de lactobacilos, con su elevado contenido de carbohidratos solubles, como sugiere esta dupla de investigadores.

Actividad antimicrobiana de los microorganismos obtenidos frente a distintos patógenos.

Factor (A) tipo de solución

En relación al tipo de solución, no se han observado diferencias significativas entre las soluciones Melaza-Aloe vera+2% y Lactosa-peptona+2%, lo que sugiere que ambas funcionan como inhibidores. Es importante recordar que estas soluciones contienen bacteriocinas, como señala Ragazzo-Sánchez JA (2009), quien indica que la aplicación de bacteriocinas puede tener un efecto positivo al reducir la presencia de patógenos en diversos productos alimentarios. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la aplicación directa de bacteriocinas puede generar una disminución o pérdida de su actividad antimicrobiana debido a las interacciones con los componentes de los alimentos.

Además, en un estudio realizado por Kelly Johana Fernández Villa (2014), se destaca que ciertas cepas de *Lactobacillus*, especialmente *Lactobacillus plantarum*, exhiben una notable capacidad bacteriocinogénica. Esto convierte a *Lactobacillus plantarum* en un microorganismo con potencial aplicación, especialmente contra bacterias Gram negativas. Se ha evidenciado que esta cepa muestra efectos inhibitorios frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* En particular, una de las bacteriocinas producidas por *L. plantarum*, denominada plantaricina C, actúa sobre las células sensibles a nivel de la membrana citoplasmática.

Estos hallazgos sugieren que la inclusión de soluciones con bacteriocinas, como las mencionadas, podría tener un efecto positivo en la inhibición de patógenos y microorganismos no deseados en diversos contextos alimentarios, además no olvidemos que la solución Melaza-Aloe vera también pueden aportar a que suceda esta inhibición, ya que la aloe vera exhibe tanto capacidad bacteriostática como bactericida frente a patógenos causantes de infecciones. Además, presenta niveles elevados de enzimas que actúan como catalizadores en procesos celulares vivos. Contiene un conjunto de 19 aminoácidos esenciales, fundamentales para la síntesis y estructuración de proteínas, junto con la presencia de minerales esenciales como

calcio, fósforo, cobre, hierro, magnesio, potasio y sodio. Además de estas propiedades, muestra actividad fungicida y antibiótica, y también exhibe cualidades regenerativas. Todos estos componentes son de vital importancia para el metabolismo y la funcionalidad celular, contribuyendo de manera significativa a mantener la salud y el funcionamiento adecuado de los sistemas biológicos (Pérez & Hernández, 2015).

Factor (B) tipo de microorganismo

El microorganismo que presentó mayor inhibición fue *E. coli*. De acuerdo con (Muhammad et al., 2019) probaron las bacteriocinas obtenidas de *L. Plantarum* frente a diferentes patógenos, presentando un halo de inhibición mayor a 10 mm para *E. coli*, el valor mucho mayor en comparación al de nuestra investigación puede haber sido a que *L. plantarum* fue tratada con diferentes temperaturas, pH y enzimas, dentro del ensayo. (Gutierrez, Montoya, & Ruíz, 2005) observaron que la bacteriocina obtenida de *L. plantarum* presentó efecto antimicrobiano frente a *E. coli* presentando altos halos de inhibición entre (5- 11 mm), valores más altos en comparación con nuestros resultados, esto puede deberse a que se utilizó el extracto puro de la bacteriocina. Además, se demostró que la acción bactericida de *L. plantarum* se debe a la acción de los péptidos (bacteriocinas).

Caso contrario a *M. roreri* (Monilla) que no presentó ningún halo de inhibición y creció por completo en toda la caja. De acuerdo con Ramírez (2010), en su investigación aisló cepas de *Lactobacillus sp.* a partir de productos lácteos artesanales, al evaluar la capacidad antimicrobiana, ninguna de ellas mostró efecto inhibitorio frente a hongos fitopatógenos, nos menciona que esto pudo ser debido a que las condiciones no fueron las óptimas para que la bacteriocina mostrara el efecto antimicrobiano, debido a que los hongos y los probióticos requieren de factores ambientales diferentes y condiciones nutricionales, por lo que se pudo dar ventaja al hongo. Además, podemos mencionar que no hay muchos reportes de actividad antifúngicas producidos por las BAL.

Interacción de los factores AXB (tipo de solución por microorganismo)

Respecto al tipo de solución por microorganismo, se determinó que si hay diferencias significativas entre ambas bacteriocinas con los dos diferentes sustratos (melaza-aloe vera 2% y lactosa-peptona 2%), por lo que se consideró que el mejor tratamiento fue el de melaza-Aloe Vera 2% que contenía la bacteriocina, debido a que mostró un mayor diámetro de inhibición (4,75mm). (Contreras, Domínguez, & González, 2007) realizaron pruebas de inhibición in vitro de *L. plantarum* suplementado en jugo de Aloe Vera 50% y con 5% de glucosa frente a *E coli* donde se obtuvieron halos de inhibición de 4 a 4.5 mm, valores similares a los obtenidos en nuestra investigación. Esto debido a que el Aloe Vera tiene capacidad bactericida y bacteriostática y elimina bacterias inhibiendo su acción dañina. Además, Pérez & Hernández (2015) demostraron en su estudio que utilizando la melaza en comparación con la glucosa para el crecimiento de *L. plantarum*, no existen diferencias significativas entre estos dos azúcares, por lo que el microorganismo asimila a ambas de la misma forma.

Capítulo VI

Conclusiones

El suero industrial y artesanal cumplen con todos los parámetros físicos químicos y microbiológicos descritos por el Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN 2594: 2011, por lo tanto, ambos tipos de sueros presentan características óptimas para la producción de bacteriocinas, ya que no presentan ningún tipo de daño a la salud humana.

Los dos tipos de suero no presentan diferencias, ya que se identificó a la misma bacteria productora que fue *Lactobacillus Plantarum*, por lo que se concluye que ambos sueros son óptimos para la generación de bacterias productoras de bacteriocinas.

Se determinó que el mejor tratamiento para el crecimiento óptimo de *Lactobacillus plantarum* para la obtención de bacteriocinas fue melaza-Aloe Vera al 2% durante 48 horas de fermentación, esto debido a que los tres factores (sustrato-concentración-tiempo) presentaron parámetros como un pH bajo, una alta densidad óptica y un alto contenido de ácido láctico que son indicativos de buen crecimiento celular.

Se determinó el mejor tratamiento que demostró mejor actividad antimicrobiana fue el de melaza-aloe vera. El microorganismo que presentó mayor inhibición fue *E. coli*, por lo contrario, no se observó actividad antimicrobiana frente al Hongo *Moniliophthora roreri*. La bacteriocina obtenida de *L. plantarum* presenta efecto antagónico frente a *E coli*.

Recomendaciones

Para el óptimo crecimiento de bacteriocinas de *L. plantarum* se recomienda usar el tratamiento melaza-Aloe Vera al 2% durante 48 horas de fermentación.

Si se desea probar el efecto antimicrobiano de las bacteriocinas en bacterias, se recomienda usar *E coli*, ya que la bacteriocina obtenida de *L. plantarum* presenta efecto antagónico frente a *E coli*.

Usar cualquier tipo de suero: industrial o artesanal, ya que ambos presentan similares características y son óptimos para la producción de bacteriocinas.

Si en investigaciones futuras se considera usar la melaza como sustrato para la obtención de bacteriocinas considerar usar una concentración mucho más baja o ser diluida su concentración, ya que al ser viscosa al momento de obtener la solución libre de bacterias presenta dificultad en el proceso de obtención.

Se sugiere emplear concentraciones más pequeñas del sustrato melaza-aloe vera para evaluar si existe mayor influencia en el crecimiento de las bacterias ácido lácticas.

Estudiar más la actividad antimicrobiana de la bacteriocina obtenida de *Lactobacillus plantarum* frente a otros tipos de hongos y bacterias, con el fin de observar si existe inhibición del crecimiento de algún otro microorganismo.

Controlar el pH durante el proceso de fermentación es de vital importancia, debido a que las bacterias ácido lácticas crecen en un rango óptimo de pH de 4,0 a 6,0.

Utilizar otro medio para las pruebas antimicrobianas cuando se usa un hongo como agente patógeno, debido a que el medio Mueller Hinton se usa comúnmente para bacterias.

Estudiar más la actividad antimicrobiana de la bacteriocina obtenida de *Lactobacillus plantarum* frente a hongos, debido a que existe poca investigación, especialmente hongos presentes en alimentos.

Referencias

- Abedi, E., & Hashemi, S. M. (2020). Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 6(10). doi:doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04974
- Aljohani, A., Al-Hejin, A., & Shori, A. (2023). Bacteriocins as promising antimicrobial peptides, definition, classification, and their potential applications in cheeses. *Food Science and Technology*, 43. doi:https://doi.org/10.1590/fst.118021
- Alquicira. (2006). *Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por Pediococcus parvulus MXVK 133*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Anchundia, A., & Torres, V. (2022). *Aislamiento e identificación de microorganismos probióticos en distintos tipos de cacao (mucílago), CCN-51, Trinitario y Forastero para su aplicación como agente antimicrobiano*. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Santo Domingo de los Tsáchilas: Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- AOAC International. (2005). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, (20 ed.).
- Ayala Palacios, M. A. (2017). *Diseño de un método de manejo de suero de leche adaptado a las empresas queseras como alternativa para su posterior industrialización*. Tesis de Licenciatura, Universidad de las Américas, Quito. Obtenido de <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/7453/1/UDLA-EC-TIAG-2017-09.pdf>
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., & Bouza, Y. (2001). Bioactive milk peptids and proteins. *Ars Pharm*, 42, 135-145.
- Benavides, M. (2019). *Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional de Colombia]*. Repositorio institucional.
- Benjamin, S., Prakasan, P., Sreedharan, S., & Wright, A. (2015). Pros and cons of CLA consumption: An insight from clinical evidences. *Nutrition & Metabolism*, 12(1), 4.
- Beux, S., Rabaioli, G., Jachetti, M., & Volken de Souza, C. (2019). Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25-37. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.012

- Briggith, U. A. (2021). *Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas a partir de una bebida fermentada tradicional de la nacionalidad Tsáchila (malá)*. Santo Domingo: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. ESPESD. Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- Burnett-Boothroyd, S., & McCarthy, B. (2011). Antimicrobial treatments of textiles for hygiene and infection control applications: an industrial perspective. *Textiles for Hygiene and Infection Control*, 196–209. doi:10.1533/9780857093707.3.196
- Calderón. (2012). Calidad fisicoquímica y microbiológica de leches crudas en empresas ganaderas del sistema doble propósito en Montería (Córdoba). *Scielo*.
- Calvopiña, C., & Manotoa, J. (2020). *Obtención de ácido láctico a partir de lactosuero y almidón de papa mediante fermentación láctica*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA. Quito: CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA.
- Cardoso, M. d. (2012). *Caracterización y purificación parcial de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de Enterococcus*. Tesis magister, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ingeniería Química, Santa Fé. Obtenido de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/414/tesis.pdf?sequence=3>
- Castellano, A., Garcia, L. M., Astrudillo, M., López Galán, J. E., & Florez Pardo, L. M. (2011). Parámetros fisicoquímicos para la síntesis de ácido láctico o etanol de la bacteria. *Acta biol. Colomb*, 16(2), 15-32.
- Chacón, L., Chávez, A., Rentería, A., & Rodríguez, J. (2017). PROTEÍNAS DEL LACTOSUERO: USOS, RELACIÓN CON LA SALUD Y BIOACTIVIDADES. *Interciencia*, 42(11).
- Chakraborty. (1999). Kinetics of lactic acid production by lactobacillus delbrueckii and lactobacillus bulgaricus in Glucose and Whey Media. *Journal Food Sci*, 36(3), 210-216.
- Contreras, M. E., Domínguez, R. M., & González, A. (2007). Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 22(1), 35-42. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/482/48222105.pdf>
- Contreras-Pinzón, María Elizabeth; Domínguez-Espinosa, Rosa María; González-Burgos, Araceli. (2007). Proceso de biotransformación láctica del jugo de Aloe vera. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 22(1), 35-42. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/482/48222105.pdf>
- Córtez, J. (2018). *LECHERÍA E INDUSTRIA QUESERA EN LA REPÚBLICA DEL ECUADOR*. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL, FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA. SANTA FE: FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS. Obtenido de <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1162/TFI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Darbandi, A., Asadi, A., Ari, M. M., Ohadi, E., Talebi, M., Zadeh, M. H., . . . Kakanj, M. (2022). Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(1). doi:http://dx.doi.org/10.1002/jcla.24093 PMID:34851542.

- de Oliveira, R., Komesu, A., Rossell, C., & Maciel Filho, R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219-239.
- Deiana. (1997). Lieviti e miffe nei prodotti lattiero-caseari. *Sci. Tec. Latt*, 411-37.
- Ekinci, F. Y. (2008). Effect of using propionic acid bacteria as an adjunct culture in yogurt production. *Journal of Dairy Science*, 892-899.
- El Universo. (8 de septiembre de 2019). Uso del suero de leche divide al sector lácteo. *El Universo*, págs. 8-9.
- Ellner, R. (2000). *Microbiología de la leche y de los productos lácteos*. Madrid: Diaz de santo.
- Elpidia, E. (2013). Whey generalities and potential use as source of calcium from high bioavailability. *Rev. Chil. Nutr*, 397-403.
- Fajardo-Argoti Catalina, H. J.-G.-S. (2021). Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición sobre *Escherichia coli* O157:H7. *Scielo*, 24(1).
doi:<https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733>
- Galván, V., & García, A. (2017). Determinación de bacteriocinas en muestras de consorcios microbianos nativos de ecosistemas de manglar en el departamento del Atlántico, como fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Biociencias*, 12(1), 37-51.
- García Carlos, A. G. (Junio de 2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *Scielo*, 11(1), 136-143. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612013000100017&lng=en&tlng=es
- Gutierrez, L., Montoya, O., & Ruíz, O. (2005). *Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de E. coli, Salmonella sp. y Listeria monocytogenes*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba.
- Heredia, K., & Suárez, E. (2023). *Obtención de bacteriocinas a partir de la bebida fermentada tradicional de la sierra ecuatoriana (Yamor) considerando distintas fuentes de carbono, para su aplicación como agente antimicrobiano*. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Departamento de ciencias de la Vida y la Agricultura. Santo Domingo de los Tsáchilas: Carrera de Ingeniería en Biotecnología.
- Hernandez Rosa, C. M. (2021). The importance of carbon and nitrogen sources on exopolysaccharide synthesis by lactic acid bacteria and their industrial importance. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. doi:<https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2429>
- Hernández-Monzón, H. P.-L. (2015). Evaluación de sustratos con jugo de aloe vera para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Scielo*, 35(2), 156-166. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000200003#:~:text=El%20Aloe%20es%20un%20sustrato%20no%20radicional%20para%20el,forma%20de%20pol%C3%ADmeros%20de%20manosa

- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). Protein-Which is best. *Journal of Sports Science and Medicine*, 3(3), 118-130.
- INEN 299. (1977). *LECHE EN POLVO: DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD*. Quito.
- INEN 1529-5. (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos*. Obtenido de <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1529-5.pdf>
- INEN. (2008). *Norma técnica ecuatoriana de leche cruda*. Requisitos , Instituto Nacional de Estandarización y Normalización (INEN), Quito.
- INEN, I. E. (2011). *Suero de Leche Líquido. Requisitos*. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2594:2011, Quito. Obtenido de <https://ia801900.us.archive.org/17/items/ec.nte.2594.2011/ec.nte.2594.2011.pdf>
- Jayarao. (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Datry Sci*.
- Jurado, H., & Jarrín, V. (2015). CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus lactis* Y DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO EN CEPAS PATÓGENAS. *Revista Biosalud*, 49-62.
- Kandler, O. &. (1986). *Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL.. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. (M. N. Sneath PHA, Ed.) 2, 1209—1234.
- Karpiński, T., & Szkaradkiewicz, A. (2016). Bacteriocins. *Encyclopedia of Food and Health*, 312–319. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00053-2
- Kelly Johana Fernández Villa, I. C. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas. *Revista Biosalud*, 45-61.
- Loachamin, B., & Narvárez, F. (2021). *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUERO DE LECHE EN POLVO A PARTIR DE LACTOSUERO DE LA EMPRESA (PROLAD'S) MEDIANTE EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN (Spray Dryer)*". UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI, FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES. LATACUNGA: CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIA.
- Macfarland, J. (1990). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana.
- Mahaut, M., Jeantet, R., Brulé, G. y Schuck, P. (2004). *Productos lácteos industriales*.
- Mandal, B. (2016). Scopes of green synthesized metal and metal oxide nanomaterials in antimicrobial therapy. *Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy*, 313–341. doi:10.1016/b978-0-323-42864-4.00009-9
- Mesa-Mariño, Yarindra, Mas-Diego, Siannah María, Anaya-Villalpanda, Matilde, Cobo-Almaguer, Hilda, & Díaz-Velázquez, Manuel. (2016). Estudio del comportamiento de Bacterias Acidolácticas (BAL) del cultivo Bioyogur a diferentes dosis de tratamiento magnético. *Scielo*, 36(3), 370-383. Obtenido de

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852016000300010&lng=es&tlng=es.

- Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules*, 26(22). doi:<http://dx.doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Muhammad, Z., Ramzan, R., Abdelazez, A., Amjad, A., Afzaal, M., Zhang, S., & Pan, S. (2019). Assessment of the Antimicrobial Potentiality and Functionality of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from the Conventional Inner Mongolian Fermented Cheese Against Foodborne Pathogens. *Pathogens*, 8(2), 71. doi:<https://doi.org/10.3390/pathogens8020071>
- Negash, A., & Tsehai, B. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020. doi:doi.org/10.1155/2020/4374891
- NOM-243-SSA1. (2010). Norma oficial Mexicana. Productos y servicios. Obtenido de leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. .
- Novoa, R. (2005). *Factores de Riesgo asociados a la prevalencia de mastitis clínica y subclínica*. Salud Anim.
- NTE INEN 0011. (1984). *Leche: Determinación de la densidad relativa*. Quito.
- NTE INEN 0013. (1984). *Leche: Determinación de la acidez titulable*. Quito.
- NTE INEN 0014. (1984). *Leche: Determinación de sólidos totales y cenizas*. Quito.
- NTE INEN 0016. (2015). *LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS. DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE NITRÓGENO. MÉTODO KJELDAHL*. Quito: Norma Técnica Ecuatoriana.
- NTE INEN 1529-10. (1998). *Control Microbiológico de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad*. Quito.
- NTE INEN 1529-5 . (2006). *Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesofilos*. Quito.
- Ossa, V. y. (2010). Evaluación de melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Scielo*, 97-104.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid. *Food Chem*, 105, 1-14.
- Paredes Montoya, Pedro; Chávez Martínez, América; Rodríguez Figueroa, José Carlos; Aguilar Palma, Nelson; Rentería Monterrubio, Ana Luisa; Rodríguez Hernández, Gabriela. (Mayo-agosto de 2014). Características fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua. *Investigación y Ciencia*, VVII(62), 11-16. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/674/67432507002.pdf>
- Pérez, H., & Hernández, A. (2015). Evaluación de sustratos con jugo de aloe vera para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Tecnología Química*, 35(2), 156-166. Obtenido

de de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000200003&lng=es&tlng=es.

- Planells, D. (2020). *Desarrollo de nuevos productos a base de suero de quesería*. Tesis de grado, Universidad Politecnica de Valencia, Valencia.
- Ragazzo-Sánchez JA, S.-P. L.-M.-S.-G. (2009). Inhibition of Salmonella spp. isolated from mango using bacteriocin-like produced by lactobacilli. *CyTA Journal of Food*, 181-7.
- Ramírez, F. (2010). *AISLAMIENTO DE BACTERIAS Lactobacillus s.p y LEVADURAS A PARTIR DE PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA IN VITRO*. TRABAJO DE GRADO, PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA, MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL, Bogota.
- Rodriguez Arana, N. K. (2018). *Identificación taxonómica de microorganismos responsables de la fermentación espontánea del ají charapita "Capsicum frutescens" [Tesis de licenciatura, Universidad del Perú decana de América]*. Repositorio institucional. Obtenido de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/9777/Rodriguez_an.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernandez, F., & García, J. (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rojas, J. M. (2020). *Producción de exopolisacáridos a partir de bacterias ácido lácticas utilizando tusa de maíz como fuente de carbono*. Tesis de postgrado, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo.
- Sabrina Sabo, A. C. (January de 2019). Bacteriocin production by Lactobacillus plantarum ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *Journal of Dairy science*, 102(1), 87-99. doi:10.3168/jds.2018-14881
- Savadogo, A. O. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 678–684.
- Silva Zuta, M. Z. (2021). *Identificación y cuantificación de microorganismos de la fermentación espontánea del cacao fino de aroma (Theobroma cacao L.) en Amazonas [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas]*. Repositorio institucional. Obtenido de <https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2444/Silva%20Zuta%20Miguelina%20Zayda.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Souza, J., Grossmann, E., Perissinotti, D., Oliveira, J., Fonseca, P., & Posso, I. (2017). Prevalence of Chronic Pain, Treatments, Perception, and Interference on Life Activities: Brazilian Population-Based Survey. *Pain Research and Management*, 2017, 1-9. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/4643830>
- Todorov, S., Franco, B., & Tagg, J. (2019). Bacteriocins of Gram-positive bacteria having activity spectra extending beyond closely-related species. *Beneficial Microbes*, 10(3), 315-328. doi:<http://dx.doi.org/10.3920/BM2018.0126>

- Torres, A. (2017). *Producción de un exopolisacárido por la cepa de Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides BL-UV04 en un medio de cultivo enriquecido con piloncillo mediante un sistema en lote y lote alimentado [Tesis de Maestro, Universidad Veracruzana]*. Repositorio institucional.
- Trujillo. (1997). Fermentación láctica en continuo con *Lactobacillus bulgaricus*. *Alimentación, Equipos y Tecnología*.
- Upadhyaya, B., DeVeaux, L., & Christopher, L. (2014). Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends in biotechnology*, 32(12), 637-644. doi:doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.10.005
- Utpl. (13 de Diciembre de 2021). *Suero de leche, un aliado para la innovación alimenticia*. Obtenido de Blog Utpl.
- Viteri y Serpa. (2023). *Aislamiento y caracterización de bacterias productoras de bacteriocinas en la bebida fermentada tradicional de la región amazónica ecuatoriana (Chicha de chontaduro) considerando distintos tipos de sustratos, para su aplicación como agente antimicrobiano*. Santo Domingo: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Wang, Y. (2009). Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International.*, 42(1), 8-12.
- Willey, J., Sherwood, L., & Woolvertonn, C. (2009). *Microbiología: Prescott, Harley y Klein* (7ma ed.). España: McGraw Hill.