



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS (ESPE)
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
EXTENSIÓN SANTO DOMINGO

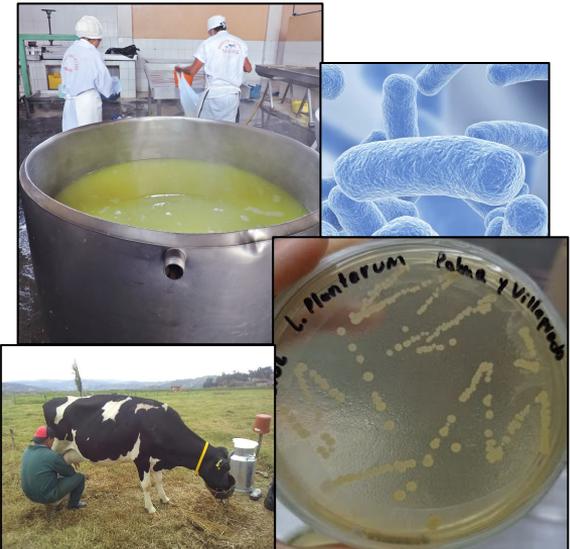


“Aislamiento y caracterización de bacterias a partir del suero de leche bovina, para la obtención de bacteriocinas y su aplicación como agente antimicrobiano”

Autores: Palma Quillupangui, Blanca Lisseth
Villaprado Guerrero, Gema Daniela

Tutora: PhD. Sungey Naynee, Sánchez Llaguno

Santo Domingo, Ecuador
2023



Introducción

Suero de leche



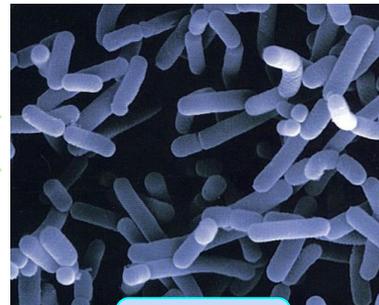
Industria de alimentos y bebidas



Suero de leche en el Ecuador



Alimentación de animales



BAL

Características probióticas



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

1

Caracterizar los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del suero de leche bovina previo al proceso de obtención de bacteriocinas.

2

Evaluar dos tipos de suero del proceso de elaboración de queso (Tradicional y artesanal) en la generación de bacterias productoras de bacteriocinas.

3

Evaluar la cantidad de nitrógeno, minerales y fuentes de carbono para la producción de bacteriocinas, a partir del suero de leche bovina.

4

Determinar la actividad antimicrobiana de los microorganismos obtenidos frente a distintos patógenos.

Hipótesis

Diseño AxBxC

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.

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.

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 Factor A
(Fuentes de carbono y nitrógeno)

Hipótesis Factor B
(Concentración)

Hipótesis Factor C
(Tiempo)

Hipótesis

Diseño AxB

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

H1: El tipo de solución interviene en la actividad antagónica provocado por las bacteriocinas obtenidas del proceso de fermentación del suero.

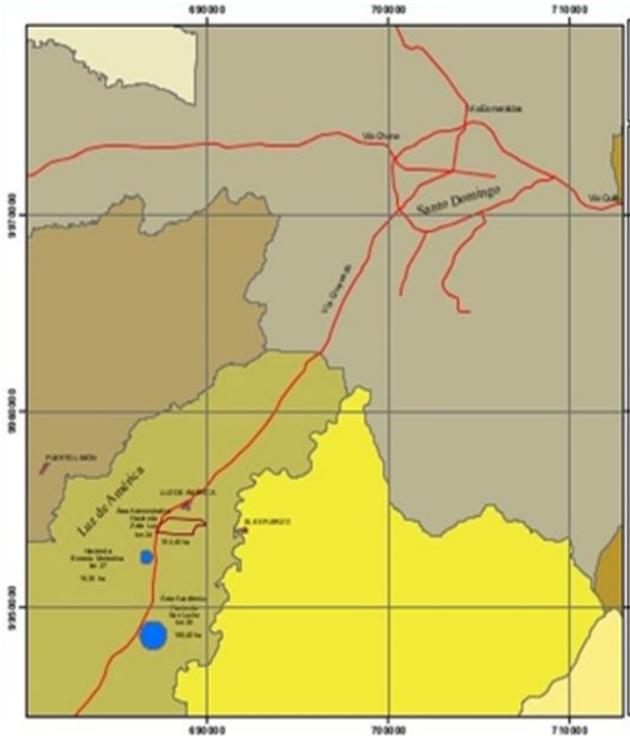
**Hipótesis Factor A
(Solución)**

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

H1: La actividad antagónica de las bacteriocinas interviene en la inhibición de los microorganismos patógenos.

**Hipótesis Factor B
(microorganismo patógeno)**

Ubicación



Ubicación política

País: Ecuador
Provincia: Sto. Dgo. 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

Ubicación geográfica

Latitud: 00° 24' 36"
Longitud: 79° 18' 43"
Altitud: 270 msnm



Diseño Experimental



AxBxC

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

Tipo de diseño

ANOVA con arreglo factorial AxBxC
(2x2x3) con 12 tratamientos

Repeticiones

3 repeticiones, generando 36
unidades experimentales.

Análisis funcional

Prueba de significancia Tukey ($p < 0,05$)

Variables a medir

pH, acidez, sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) y
densidad óptica (Absorbancia)



Diseño Experimental



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

AxB

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

Tipo de diseño

ANOVA con arreglo factorial AxB (2x2) con 4 tratamientos

Repeticiones

3 repeticiones, generando 12 unidades experimentales.

Análisis funcional

Prueba de significancia Tukey ($p < 0,05$)

Variables a medir

Diámetro del halo de inhibición



Diseño Experimental



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

Métodos

Suero Industrial

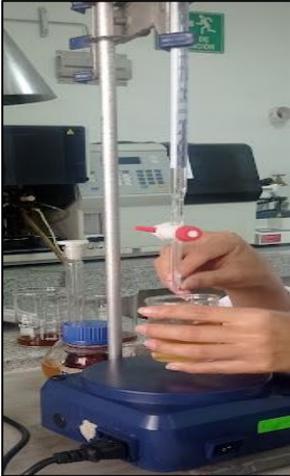


Suero Artesanal



Parámetros físico químicos

Acidez



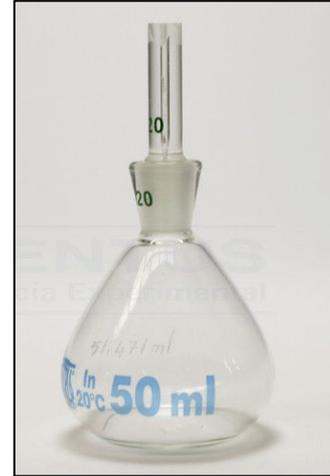
INEN 0013

Ceniza



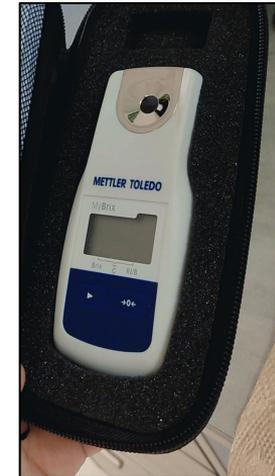
INEN 0014

Densidad relativa



INEN 0011

Grados brix



INEN 0014

Parámetros físico químicos

pH



AOAC 973.41

Humedad



INEN 299

% grasa



Soxhlet

AOAC 973.41

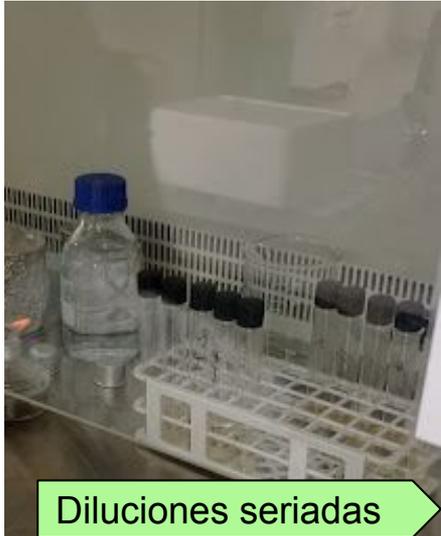
% proteína



Kjeldahl.

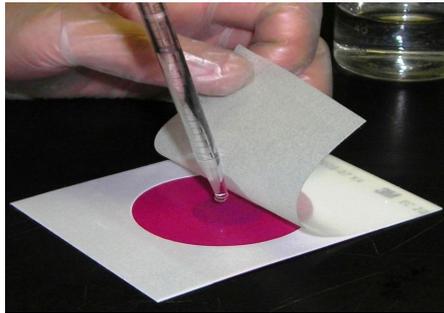
INEN 0016

Parámetros microbiológicos



INEN 1529-5

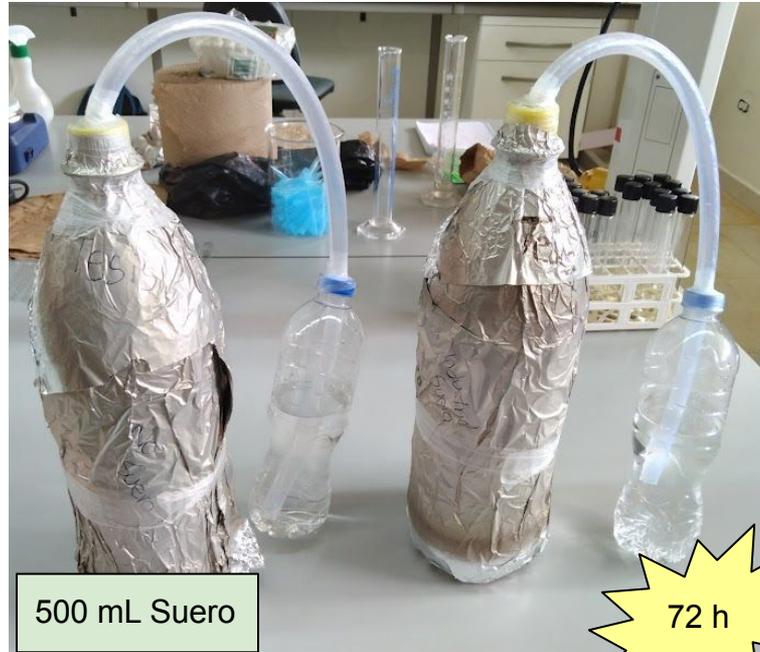
Siembra 1 mL



NEN 1529-10

Mohos y levaduras: 21 °C por 72 h
Aerobios, BAL: 37 °C por 48 h
Salmonella y E. coli: 37 °C por 48 h

Fermentación

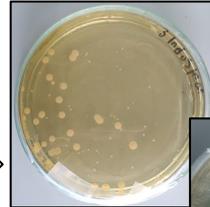


Aislamiento y caracterización

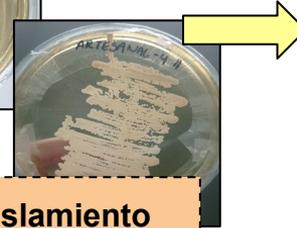
diluciones seriadas



10^{-4}



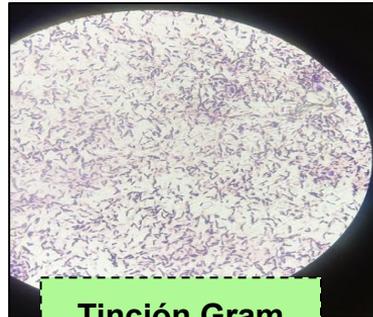
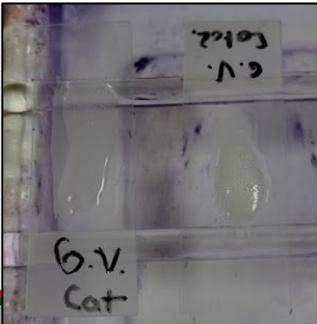
Aislamiento



Colonias puras



Catalasa y oxidasa



Tinción Gram

16S
rRNA Full
Sequencing



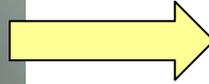
Análisis Molecular

programas bioinformáticos

Establecimiento de la fermentación



Preparación del inóculo en el caldo madre



tratamientos con sistema de muestreo

- pH
- acidez
- sólidos solubles (°Brix)
- densidad óptica (Absorbancia)

0 h

24 h

48 h

Solución bacteriocina libre de células

A1B1C3



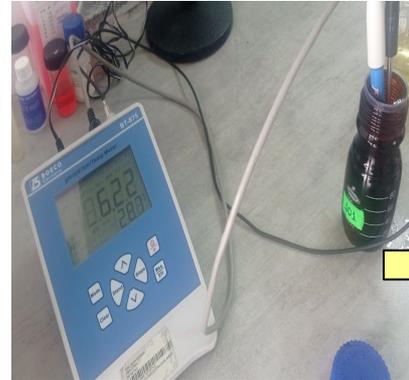
A2B1C3



A1B1C3

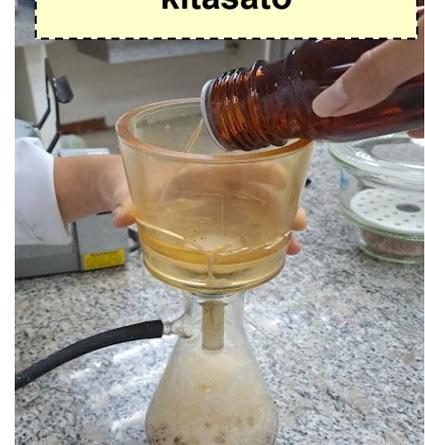


10000 rpm x 20 min



pH 6 - NaOH 1N

bomba al vacío
kitasato



membranas de 0,22 µm

Obtención de los microorganismos patógenos

Moniliophthora roreri (Monilla)



protocolo de desinfección

PDA con (estreptomicina)

28°C por 20 días

purificación



Escherichia coli

recombinante y con
resistencia a antibiótico

Laboratorio de Biología
Molecular (ESPE-SD)

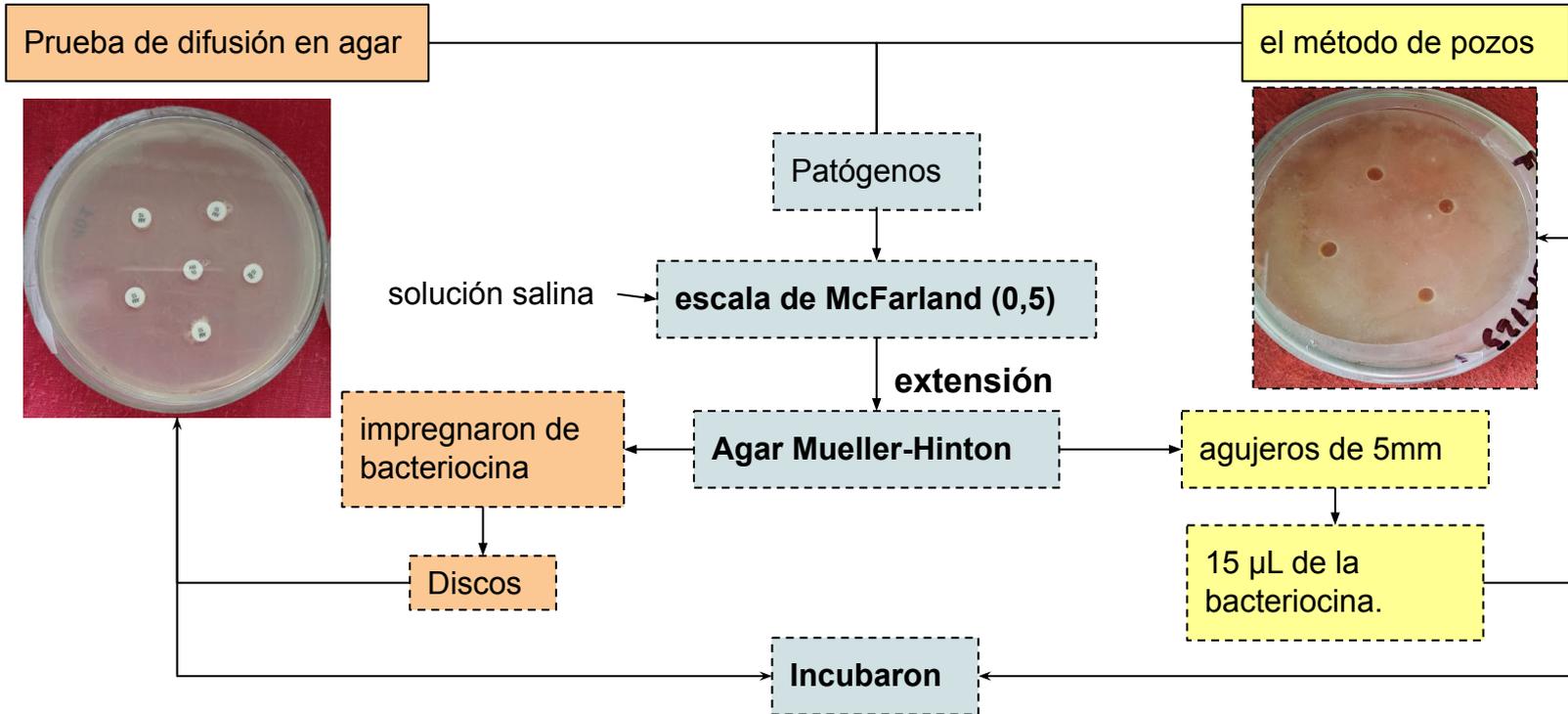
Luria-Bertani (LB)

37°C por 24 horas.

purificación



Determinación de la actividad antimicrobiana



Observación fisicoquímicos del Suero de Leche bovino

	Suero Industrial	Suero Artesanal
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%

Son suero ácido debido a que su pH se encuentra en el rango de 5,5-4,8

Paredes Montoya (2014) y Planells (2020) informan datos similares en densidad y humedad.

INEN 2594:2011 determina el porcentaje de proteína láctea (mínimo 0,8%), grasa láctea (máximo 0,3%), ceniza (máximo 0,7%) y la acidez titulable (mínimo 0,35%)

Observación microbiológica del Suero de Leche bovino

Salmonella

E. coli

Aerobios

Mohos y levaduras

De acuerdo con la INEN (2011) la cantidad de aerobios mesófilos se encuentra dentro del rango de hasta 1×10^5 UFC.mL⁻¹, no de tener presencia de *Salmonella* y *E. coli*

Suero Artesanal

Suero Industrial

$3,24 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹

$2,8 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹

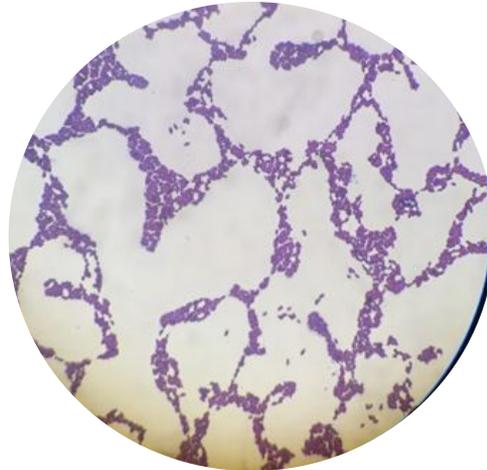
$2,3 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹

$1,6 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹

La norma mexicana establece que el límite máximo es de 2×10^2 UFC.mL⁻¹, en mohos y levaduras.

Deiana (1997) menciona que el entorno o el lugar donde se realizan este proceso de obtención del lactosuero puede aumentar el crecimiento.

Caracterización e identificación de la bacteria ácido láctica



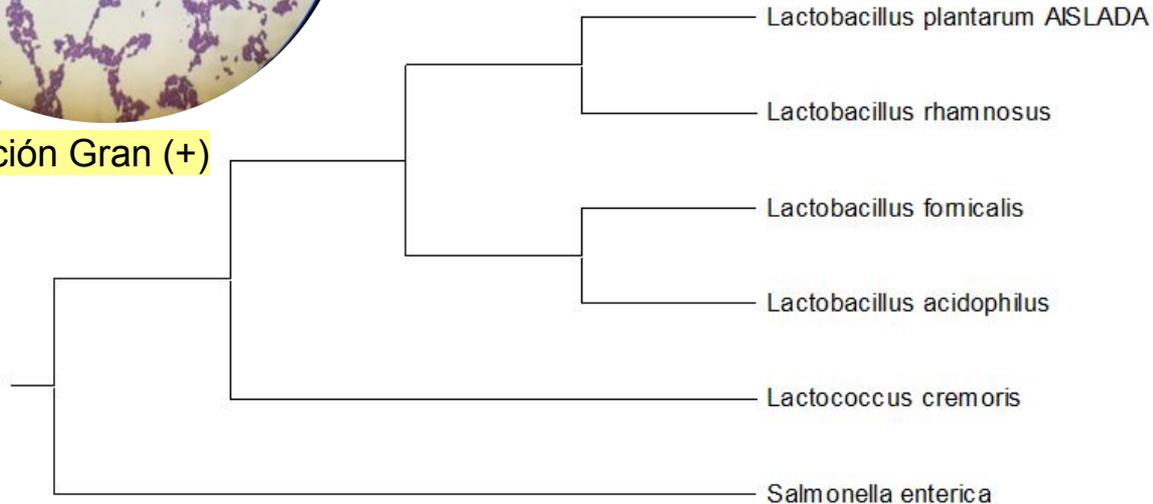
Tinción Gran (+)



Catalasa (-)
Oxidasa (-)

La secuenciación realizada con el gen 16S ribosomal determina que nuestra bacteria es *Lactobacillus plantarum*

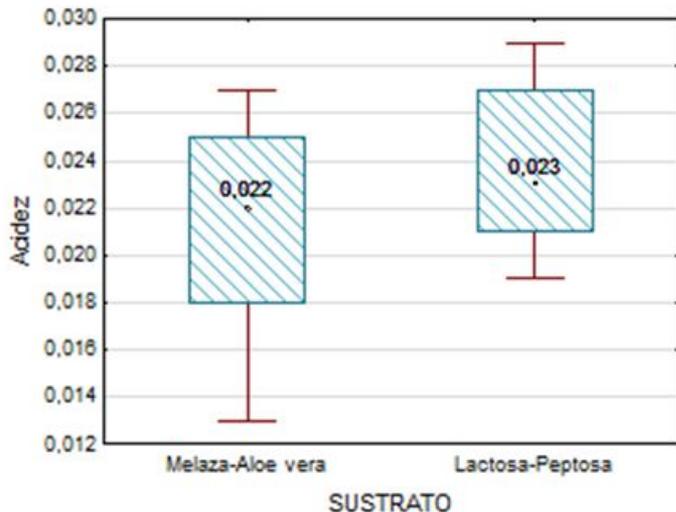
A pesar de contener hasta el 55% de los nutrientes totales de la leche, incluyendo lactosa, proteínas y lípidos, esenciales de las BAL (Sabrina Sabo, 2019)



Cinética de crecimiento

Tipos de Fuente de Carbono y nitrógeno (Factor A)

Acidez



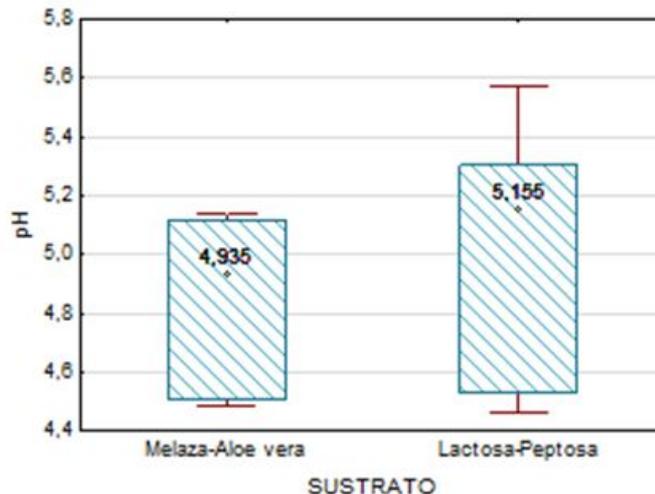
Un incremento en la acidez titulable puede denotar una acidificación más pronunciada del entorno durante el proceso de fermentación (Castellano, 2011)

Es de suma importancia considerar que la acidez guarda una correlación intrínseca con el pH (Heredia y Suárez, 2023)

Proceso de síntesis reducida de ácido láctico en el matraz Erlenmeyer o por no existir regulación en el sistema (Castellano, 2011)

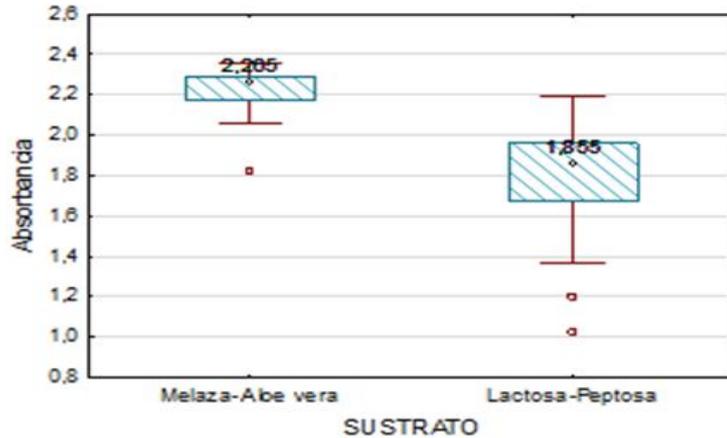
Jurado & Jarrín (2015) resalta que los entornos de cultivo presentan una ligera acidez, abarcando un rango de pH de 4.5 a 6.4

pH

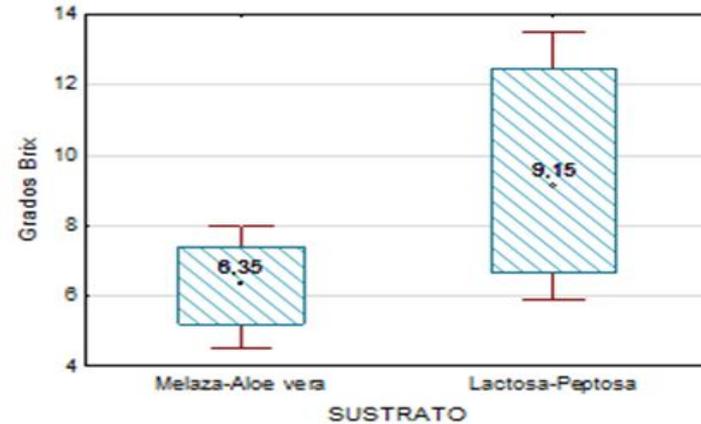


Tipos de Fuente de Carbono y nitrógeno (Factor A)

Absorbancia



Grados Brix



Briggith (2021) donde considera que el mejor valor de absorbancia son los resultados más alto ya que presenta un mejor crecimiento.

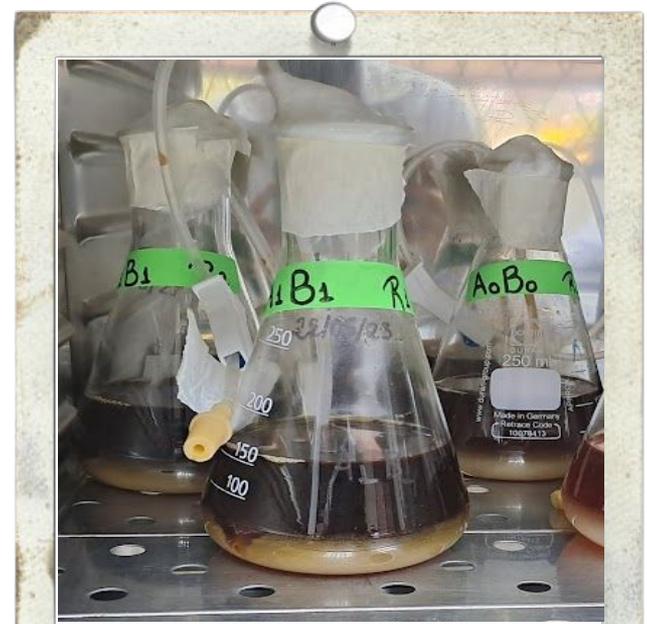
Benavides (2019) menciona que el desarrollo de las bacterias introducidas ocasiona una disminución en los sólidos solubles, ya que se consume los azúcares disueltos.

Tipos de Fuente de Carbono y nitrógeno (Factor A)

Hernández-Monzón (2015) determina que la solución de melaza y aloe vera demuestra una fiabilidad sobresaliente

La Aloe vera tiene un potencial para fomentar el desarrollo de bacterias probióticas, aportando componentes nutricionales y vitaminas al igual que la melaza (Pérez y Hernández, 2015)

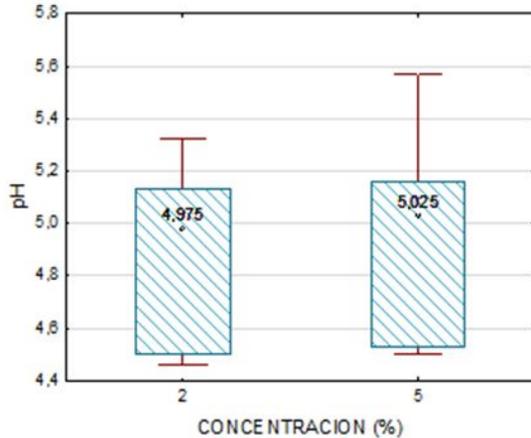
La combinación de sábila y melaza es una alternativa nutritiva al empleo en el fomento de lactobacilos, con su elevado contenido de carbohidratos solubles,



Melaza - Aloe vera

Factor B (Diferentes concentraciones)

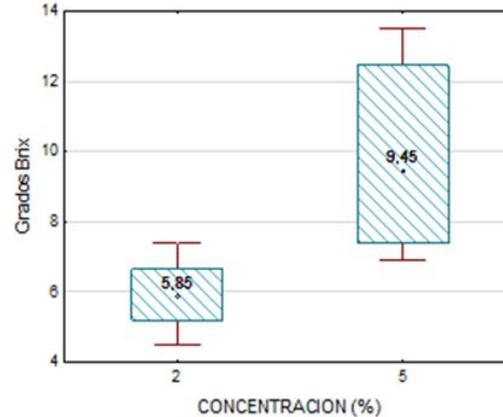
pH



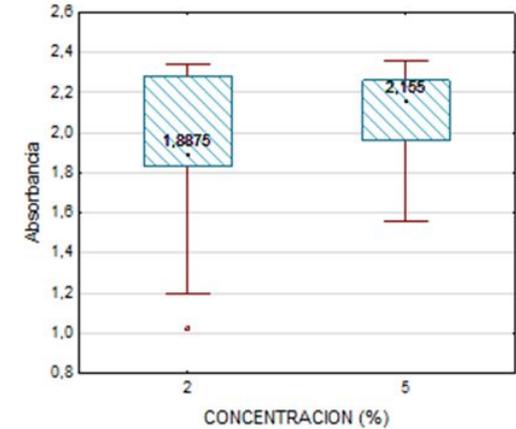
Aunque exista una variación de concentraciones los medios en los que se cultivan mantienen un pH ligeramente ácido (Jurado & Jarrín, 2015)

Las bacterias consumen los carbohidratos presentes en la fermentación por lo que esto permite el desarrollo de las BAL (Briggith, 2021)

Grados Brix



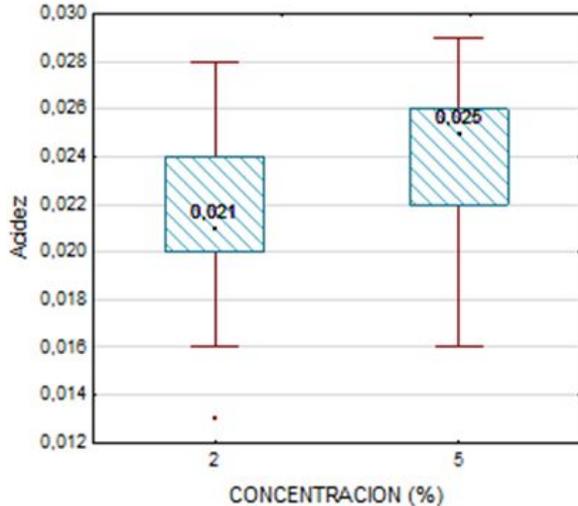
Absorbancia



Castellano, Garcia, Astrudillo, López Galán, & Florez Pardo (2011) afirma que la densidad óptica se sustenta en la concentración de la fuente de carbono empleada

Factor B (Diferentes concentraciones)

Acidez



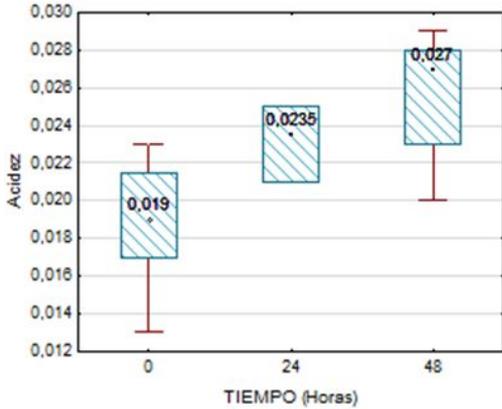
Contreras y colaboradores (2007) discute la viabilidad de emplear concentraciones de 50% y 75% (v/v) de jugo de Aloe vera, combinadas con un 5% (p/v) de cualquiera de los dos suplementos



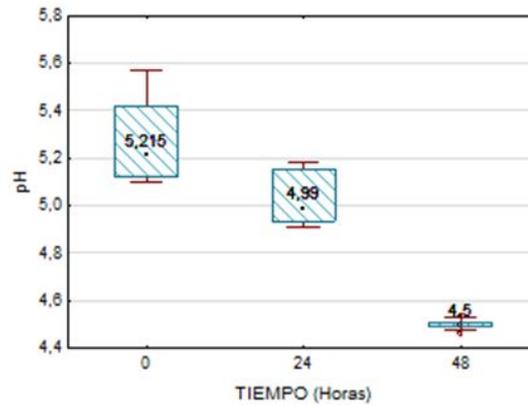
La limitada concentración del sustrato no aporta una cantidad adecuada de nutrientes al entorno para posibilitar el metabolismo del ácido láctico por parte de las bacterias (Viteri y Serpa, 2023).

Usamos el caldo MRS como base, añadiendo más nutrientes que le otorga este medio

Acidez

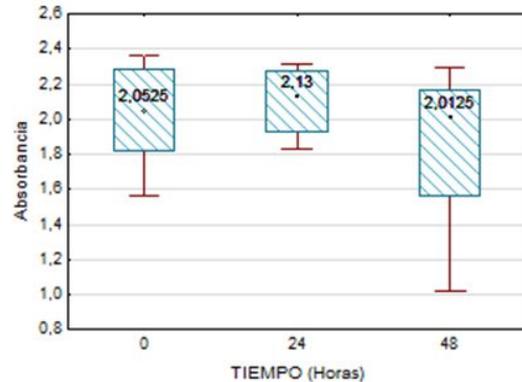


pH

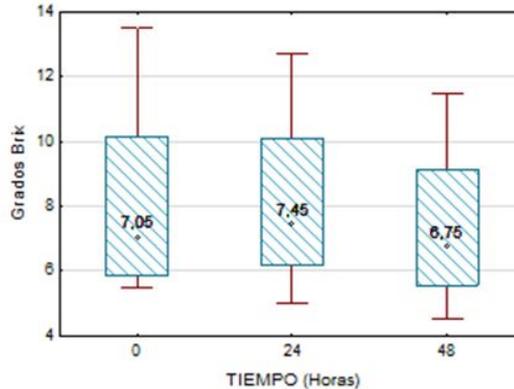


Torres (2017), se demostró que a medida que el microorganismo crece a lo largo del tiempo, se produce una reducción en el pH

Absorbancia



Grados Brix

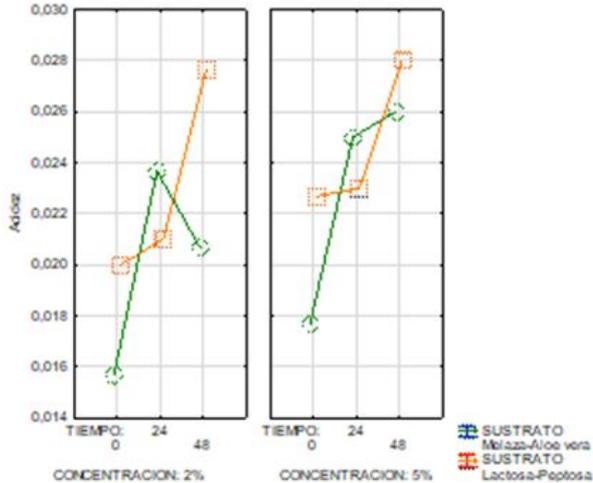


Briggith (2021) menciona que una disminución de los grados brix nos indica las particularidades observadas en el proceso metabólico de los azúcares solubles durante el metabolismo de las bacterias ácido lácticas.

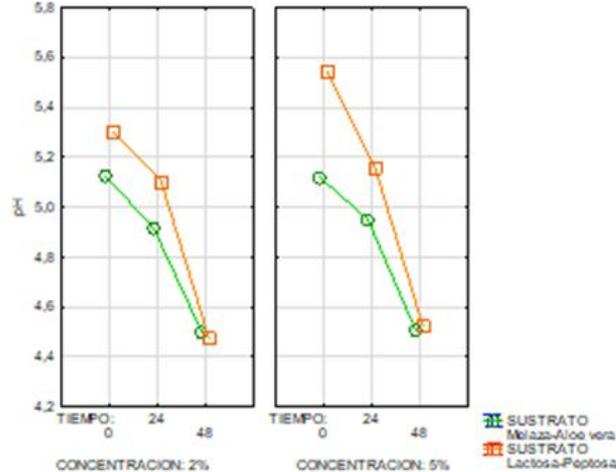
Fajardo-Argoti Catalina (2021), menciona que durante las primeras 24 horas de fermentación, la bacteria experimenta una reproducción sin restricciones derivadas de la disponibilidad de nutrientes.

Interacción AXBXC (Tipo de sustrato, concentración y tiempo)

Acidez



pH



Jurado & Jarrín, (2015), se advierte que estos valores no deben descender por debajo de 4.5 ni superar 6.4

Melaza-Aloe vera+2%+24h (4.500)
 Melaza-Aloe vera+5%+48h (4.505)
 Lactosa-Peptona+5%+48h (4.523)
 Lactosa-Peptona+2%+48h (4.470)

Grupo E:

Melaza-Aloe vera+5%+24h (0.026)
 Melaza-Aloe vera+5%+48h (0.025)
 Lactosa-Peptona+5%+48h (0.028)
 Lactosa-Peptona+2%+48h (0.027)

Pérez & Hernández (2015) evidenció que a medida que la acidez aumentaba, la viabilidad del microorganismo experimentaba un incremento.

La disminución del pH y el aumento en la acidez total durante la fermentación se atribuyen exclusivamente a la producción de ácido láctico (Pérez & Hernández, 2015)

Grupo C:

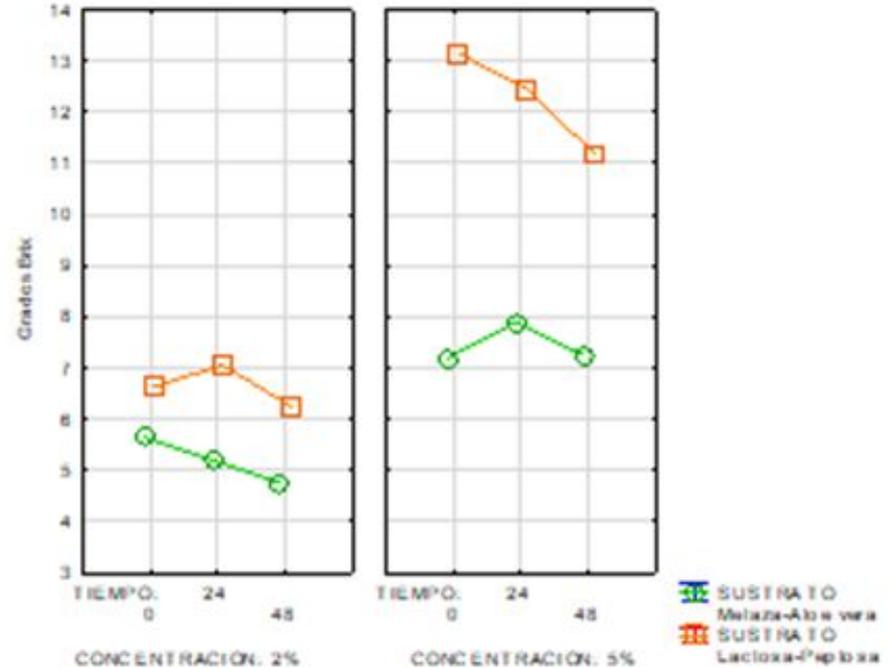
Melaza-Aloe vera+2%+24h (5.20)

Melaza-Aloe vera+2%+48h (4.75)



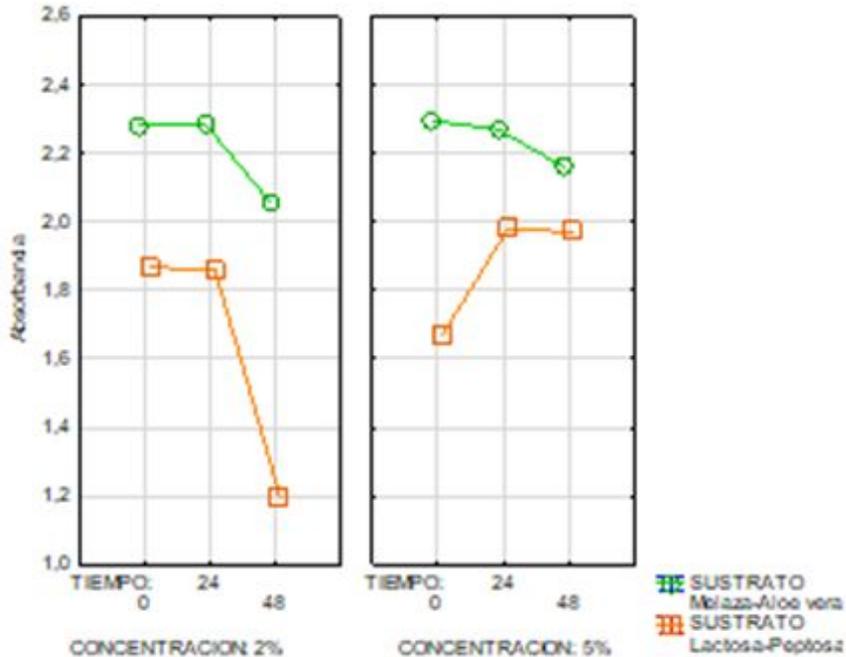
El descenso en esta propiedad después de las primeras 24 horas es predecible, especialmente porque los grados Brix actúan como una medida indirecta de las fuentes de carbono siendo los más consumidos en la fermentación (Benavides, 2019)

Grados brix



Interacción AXBXC (Tipo de sustrato, concentración y tiempo)

Absorbancia



Grupo A:

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

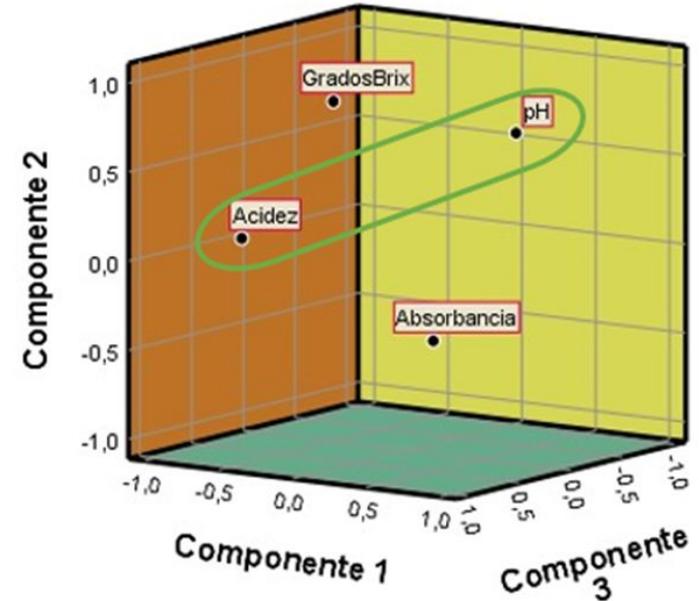
Melaza-Aloe vera+2%+48h

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, Astudillo, López Galán, & Florez Pardo, 2011).

Interacción AXBXC (Tipo de sustrato, concentración y tiempo)

Análisis comparativo entre nuestras principales variables

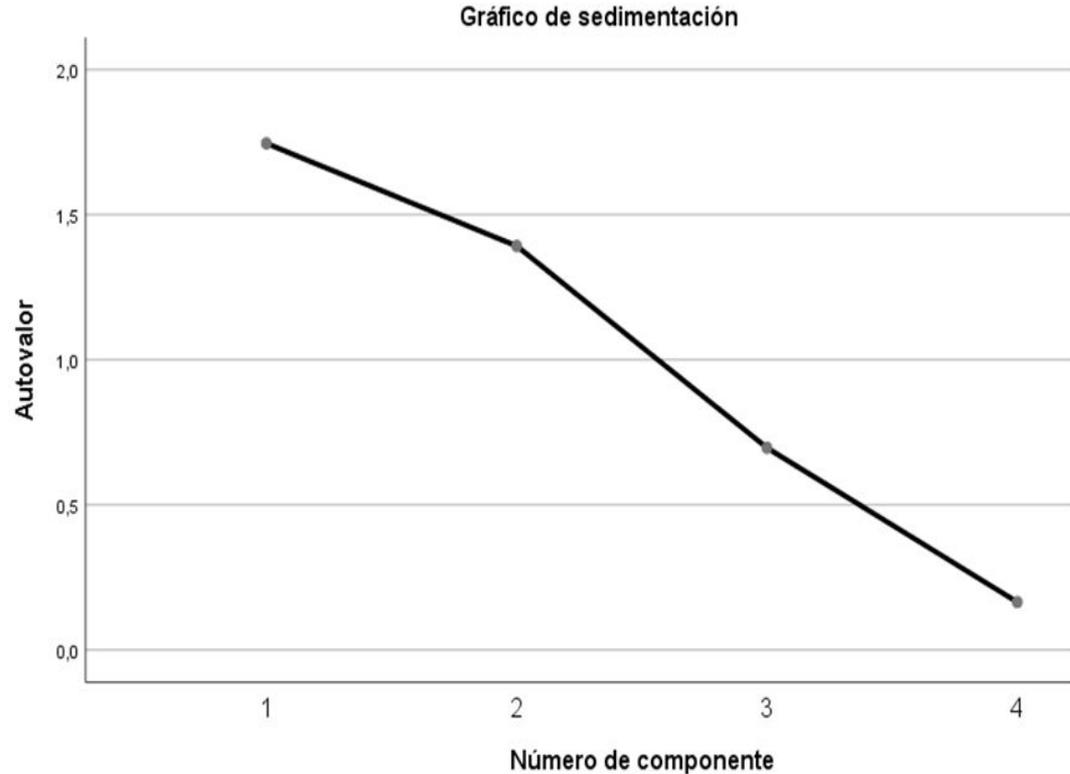
	Acidez	pH	Absorbancia	Grados Brix
Acidez	1,000000	-0,547766	-0,406631	0,304514
pH	-0,547766	1,000000	0,092635	0,371663
Absorbancia	-0,406631	0,092635	1,000000	-0,211591
Grados Brix	0,304514	0,371663	-0,211591	1,000000

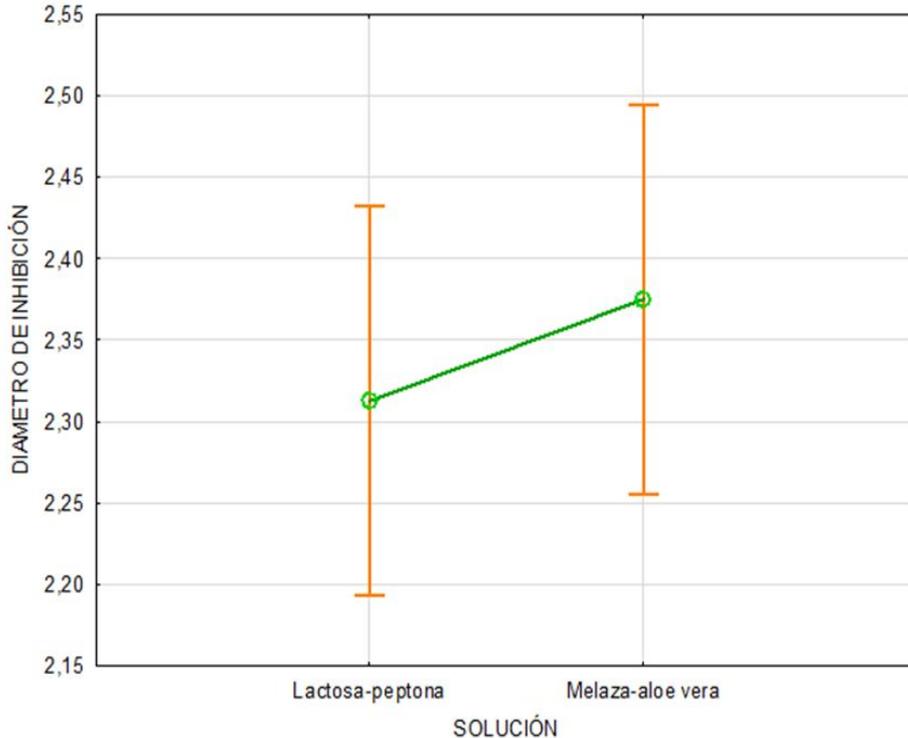


Interacción AXBXC (Tipo de sustrato, concentración y tiempo)

Varianza total

Componente	Autovalores iniciales	
	Total	% de varianza
1. Acidez	1,746	43,645
2. pH	1,392	34,809
3. Absorbancia	0,697	17,419
4. Grados Brix	0,165	4,127



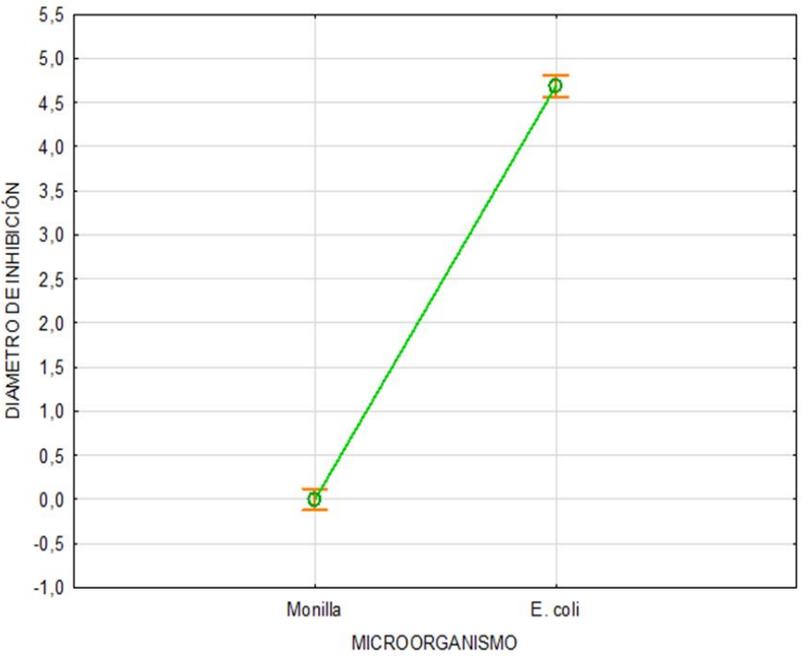


No se han observado diferencias significativas, debido a que *Lactobacillus plantarum*, exhiben una notable capacidad bacteriocinogénica (Kelly Johana Fernández Villa, 2014).

Muestra efectos inhibitorios frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella spp*

Ragazzo-Sánchez JA (2009), indica que la aplicación de bacteriocinas puede tener un efecto positivo al reducir la presencia de patógenos en diversos productos alimentarios.

Tipo de Microorganismo (Factor B)

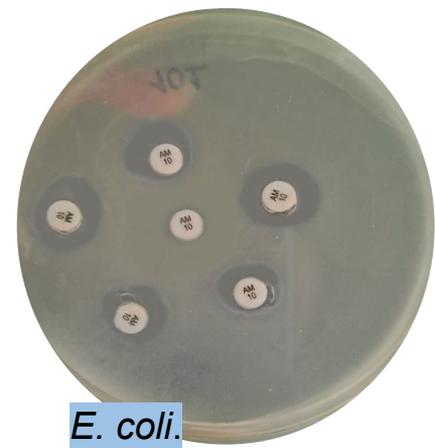


Los hongos y los probióticos requieren de factores ambientales diferentes y condiciones nutricionales (Ramírez, 2010)

La acción bactericida de *L. plantarum* se debe a la acción de los péptidos (bacteriocinas) (Gutierrez, Montoya, & Ruíz, 2005).



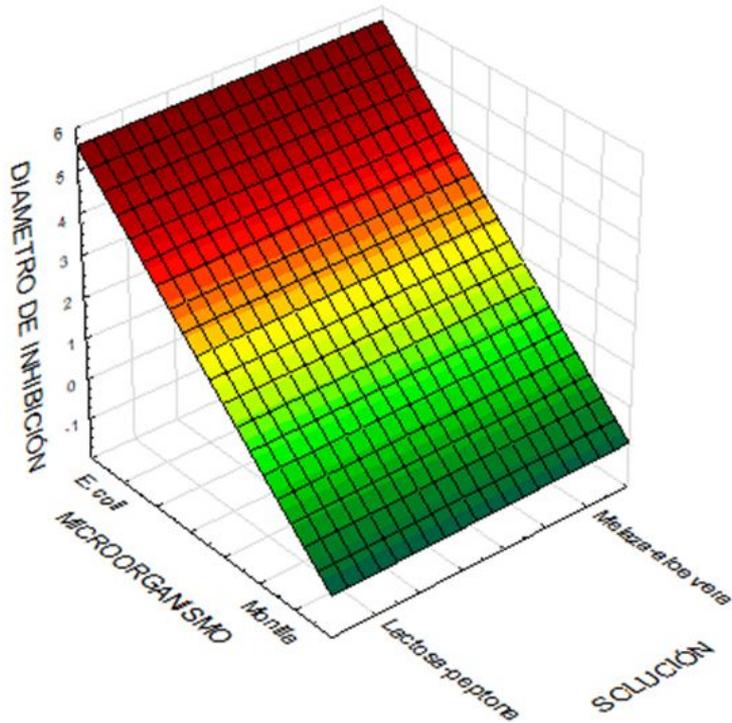
M. roreri (Monilla)



E. coli.

L. plantarum tratada con diferentes temperaturas, pH y enzimas, presenta un halo de inhibición mayor (Gutierrez, Montoya, & Ruíz, 2005).

Interacción AXBXC (Tipo de solución y microorganismo)



Si hay diferencias significativas entre ambas bacteriocinas con los dos diferentes sustratos.

Contreras, Domínguez, & González, (2007) obtuvieron halos de inhibición de 4 a 4.5 mm debido a que el Aloe Vera tiene capacidad bactericida y bacteriostática y elimina bacterias inhibiendo su acción dañina, además de que la melaza reemplaza a la glucosa.



Aloe Vera 50% y con 5% de glucosa frente a *E coli*



Conclusiones

Respecto a los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del suero de leche

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.

Respecto los dos tipos de suero del proceso de elaboración de queso (industrial y artesanal)

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..



Conclusiones

Respecto a la cantidad de nitrógeno, minerales y fuentes de carbono para la producción 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.

Respecto la actividad antimicrobiana de los microorganismos obtenidos frente a distintos patógenos.

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



- Usar cualquier tipo de suero: industrial o artesanal, ya que ambos presentan similares características y son óptimos para la producción de bacteriocinas.
- 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 la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en bacterias, se recomienda usar *E coli*, ya que la bacteriocina obtenida de *L. plantarum* presentó efecto antagónico frente a *E coli*.

Gracias!

