



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**EFICIENCIA DE LA COMBINACIÓN DE BACTERIOCINA CON EDTA
SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DESTINADA A
LA PRODUCCIÓN DE LÁCTEOS EN CAJAMARCA – PERÚ**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

PRESENTADO POR:

BACH. OSMAR HARRIS CALDERÓN CACHI

ASESOR:

DR. BLGA. CONSUELO PLASENCIA ALVARADO

CO-ASESOR:

M.Cs. LUIS CARLOS ALCALDE VARGAS

CAJAMARCA – PERÚ

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria -1Q -115- Av. Atahualpa N° 1050-Cajamarca -

☎ 076-599227 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

CONSTANCIA

Que, la tesis titulada **EFICIENCIA DE LA COMBINACIÓN DE BACTERIOCINA CON EDTA SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DESTINADA A LA PRODUCCIÓN DE LÁCTEOS EN CAJAMARCA - PERÚ**, presentada por el Bachiller en Ciencias Biológicas **OSMAR HARRIS CALDERÓN CACHI**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca, obteniendo un puntaje de 24% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos. Teniendo como Asesor a la Docente **Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado**, Co- Asesor **M.Cs. Luis Carlos Alcalde Vargas**.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 28 de febrero del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

Dr. Martha Vicenta Abanto Villar
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN (U)

COPYRIGHT©

OSMAR HARRIS CALDERÓN CACHI

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Calderón, O. 2023. **Eficiencia de la combinación de bacteriocina con EDTA sobre la calidad microbiológica de la leche destinada a la producción de lácteos en Cajamarca – Perú/ Osmar Harris Calderón Cachi.**

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dr. Consuelo Plasencia Alvarado

Co-Asesor: M.Cs. Luis Carlos Alcalde Vargas

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –
UNC 2024

**EFICIENCIA DE LA COMBINACIÓN DE BACTERIOCINA CON EDTA
SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DESTINADA A
LA PRODUCCIÓN DE LÁCTEOS EN CAJAMARCA – PERÚ**

AUTOR: Bach. Osmar Harris Calderón Cachi

ASESORA: Dr. Consuelo Plasencia Alvarado

CO – ASESOR: M.Cs. Luis Carlos Alcalde Vargas

Tesis evaluada y aprobada para la obtención de Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR

Presidente

Dr. Luis Gilberto García Izquierdo

Secretario

Dr. José Armando Padilla Sobrados

Vocal

Dr. Demetrio Cieza Yrigoín

Cajamarca, 2024 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 4:20 pm del 23 de Febrero del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente I.I-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Eficacia de la combinación de bacteriocinas con EDTA sobre la calidad microbiológica de la leche destinada a la producción de lácteos en Cajamarca - Perú"

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Osmer Harris Calderón Cachi

Siendo las 5:30 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos:

Muy Bueno con el calificativo de 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTO para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Luis Garcia Izquierdo), Secretario(a) (Jose Armando Padilla Soriano), Vocal (Demetrio Cieza Yunicon), Accesitaria (blank), Asesor (a) (Consuelo Pradencia Avanao), and Co-Asesor (a) (Luis Carlos Alcalde Vargas).

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)

REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)

DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Dios, a mis padres, Luz Elena Cachi Asencio y Elías Calderón Limay, por darme la vida, por todo su cariño, cuidados y la ayuda que me brindaron en mi formación personal y profesional. A mis hermanas Lupita Calderón Cachi y Tirza Calderón Cachi por alentarme en mis sueños, por siempre estar conmigo.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por darme un día mas de vida; a mis familiares, en especial a mis tíos Alberto Cachi y Margarita Julcamoro por toda la ayuda en mi formación profesional y los consejos para ser una mejor persona.

A mis asesores, la Dra. Blga. Consuelo Plasencia Alvarado y MBlgo. Luis Carlos Alcalde, por aceptar ser mis asesores y contribuir con sus conocimientos, la guía durante este trabajo de investigación.

A la empresa BIOMIC S.R.L. por recibirme gratamente en sus instalaciones y brindarme los materiales y equipos necesarios para desarrollar las primeras etapas de mi trabajo de investigación, además de las orientaciones necesarias.

Al Dr. Mblgo. Marco Antonio Rivera Jacinto, por la ayuda del uso de las instalaciones, equipos del laboratorio y materiales los cuales me permitieron llevar a cabo las etapas finales de mi trabajo de investigación.

A mis amigos Carlos, Christian y Evelyn por su incondicional motivación, risas y anécdotas durante toda nuestra vida universitaria.

Para finalizar un agradecimiento especial al Blgo. Biotecnólogo Juan Manuel Montoya Salazar, por el apoyo brindado, la orientación y por gestionar el acceso al Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Universidad Nacional de Trujillo.

Tabla de contenido

TÍTULO	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de la investigación	3
2.2. Fundamentos teóricos de la investigación.	5
2.2.1. Leche como materia prima para productos lácteos.	5
2.2.1.1. Bacterias mesófilas.....	6
2.2.1.2. Coliformes	7
2.2.2. Conservantes en los alimentos	8
2.2.2.1. Conservantes químicos en los alimentos	8
2.2.2.2. La biotecnología para obtener nuevos conservantes.	10
2.2.2.3. Las “BAL” productoras de bioconservantes	11
2.2.2.4. Mecanismo de acción.....	15
CAPÍTULO III	17
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS	17
3.1. Tipo de investigación	17
3.2. Diseño de investigación	17
3.3. Área de investigación	17
3.4. Dimensión temporal y espacial	17
3.5. Unidad de análisis, universo y muestra	18
3.6. Métodos	18
3.6.1. Toma de muestra	18
3.6.2. Aislamiento de BAL.	18
3.6.3. Coloración de esporas de BAL.....	19
3.6.4. Identificación Bioquímica de BAL.....	19
3.6.5. Evaluación de producción de proteínas mediante la reacción de Biuret	20
3.6.6. Producción del extracto crudo de bacteriocinas (ECB) a partir de BAL.....	20
3.6.7. Evaluación de la actividad inhibitoria del “ECB” frente a <i>E. coli</i> spp	21
3.6.8. Evaluación de la actividad inhibitoria de las bacteriocinas más EDTA en diferentes tratamientos frente a <i>E. coli</i>	22
3.6.9. Evaluación de los distintos tratamientos de bacteriocina más EDTA en leche	23
3.7. Análisis estadístico:	24
3.7.1. Estadísticos descriptivos:	24
3.7.1.1. Prueba de normalidad:.....	24
3.7.1.2. Modelo lineal univariable de bloques aleatorios:.....	25
3.8. Instrumentos	25
CAPÍTULO IV	26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1. Resultados	26
4.1.1. Descripción general de la muestra y las condiciones de transporte	26
4.1.2. Aislamiento y caracterización bioquímica de BAL de yogures suplementados con microorganismos probióticos.....	26
4.1.3. Producción del extracto crudo de bacteriocinas	28
4.1.4. Evaluación de la actividad inhibitoria de bacteriocinas <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> spp.....	28
4.1.5. Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto crudo de bacteriocina con EDTA <i>in vitro</i> contra <i>E. coli</i> spp	29
4.1.6. Identificación mediante el gen 16S ARNr	30
4.1.7. Evaluación inhibitoria de los distintos tratamientos en leche destinada a procesos lácticos: 30	
4.1.7.1. Recuento de aerobios mesófilos	30
4.1.7.2. Coliformes totales	32
4.1.7.3. Análisis estadístico	33
4.2. Discusión.....	34
CAPÍTULO V.....	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
5.1. Conclusiones	38
5.2. Recomendaciones.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
APÉNDICES	47
Apéndice N°1: Toma de muestra	47
Apéndice N°2: Aislamiento de BAL	47
Apéndice N°3: Tinción Gram, Tención de esporas y pruebas confirmativas para BAL.....	48
Apéndice N°4: Determinación cualitativa de proteínas	49
Apéndice N° 5: Producción de bacteriocinas	50
Apéndice N° 6: Actividad inhibitoria de bacteriocina frente a <i>E coli</i>	51
Apéndice N° 7: Actividad inhibitoria en diferentes concentraciones de bacteriocina más EDTA frente a <i>E coli</i>	51
Apéndice N° 8: Tratamientos en leche cruda	52
ANEXOS.....	53
Anexo N° 1: Identificación molecular de Macrogen	53
Anexo N°2: Escala de Duraffourd.....	54
Anexo N°3: Conteo de aerobios mesófilos a través del tiempo (Log UFC/mL).....	55
Anexo N°4: Conteo de coliformes totales a través de tiempo (Log UFC/mL).	56
Anexo N°5: Descripción estadística de los tratamientos para aerobios mesófilos y coliformes totales.....	57
Anexo N°6. Diseño de bloques aleatorios.	58

Lista de abreviaciones:

ATP: adenosín trifosfato

BAL: Bacterias ácido lácticas

CS: Células somáticas

RPM: Revoluciones por minuto

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

MRS: Agar Man, Rogosa y Sharpe

MRS broth: Caldo Man, Rogosa y Sharpe

PMF: Fuerza protón-motriz

BTC: Bacteriocinas

ECB: Extracto crudo de bacteriocina

TC: Tratamiento control

T1: Tratamiento 1

T2: Tratamiento 2

T3: Tratamiento 3

GLOSARIO

Bioconservante: Son sustancias que provienen de microorganismos o sus metabolitos, utilizados para extender la vida útil del alimento.

Conservantes químicos: Son sustancias químicas utilizadas para detener o minimizar el deterioro a los alimentos causado por distintos tipos de microorganismos.

Calidad microbiológica del alimento: Es la determinación o medición de microorganismos contaminadores o patógenos que están presentes en ellos.

Probiótico: Son alimentos que contienen microorganismos vivos destinados a mantener o mejorar la microbiota del cuerpo.

Vida útil del alimento: Es el periodo de tiempo durante el cual mantiene una calidad adecuada.

Bacteriocina: Son proteínas con actividad antimicrobiana, que son producidas por algunas cepas bacterianas.

**EFICIENCIA DE LA COMBINACIÓN DE BACTERIOCINA CON EDTA
SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE DESTINADA A
LA PRODUCCIÓN DE LÁCTEOS EN CAJAMARCA – PERÚ**

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de la combinación de bacteriocina obtenidas de yogurt con probiótico más EDTA en diferentes concentraciones sobre la calidad microbiológica de la leche que está destinada a la elaboración de productos lácticos. La investigación realizada fue de tipo básico, de nivel experimental, que incluyó 10 muestras de yogures suplementados con microorganismos probióticos de marcas comerciales, de los cuales se obtuvieron 20 aislamientos en las instalaciones del Laboratorio BIOMIC de Cajamarca. Para el aislamiento de bacterias ácido lácticas se utilizó el medio MRS y fueron seleccionadas 9 cepas ya que cumplieron con el perfil de BAL, también se realizó la prueba cualitativa Biuret para identificar proteínas en donde todas las cepas confirmaron la presencia de proteínas extracelulares. Las 9 cepas fueron transportadas al Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, para dar inicio a la producción de bacteriocinas, luego se realizaron pruebas de inhibición para determinar y seleccionar los extractos crudos de bacteriocina con mayor capacidad de inhibición, siendo los extractos crudos de las cepas aisladas O1 y O4, ya que presentaron halos mayores a 8 mm. Posteriormente de ambos extractos se evaluó su capacidad de inhibición donde se combinó bacteriocinas más EDTA en diferentes concentraciones (T1: 100 ppm BTC + 25 ppm EDTA, T2: 75 ppm BTC + 50 ppm EDTA y T3: 50 ppm BTC + 75 ppm EDTA) en donde presentó la cepa O4 más EDTA mayor capacidad inhibitoria frente al principal indicador de contaminación en alimentos: *Escherichia coli*, con halos mayores a 18 mm. Para finalizar, se inoculó los distintos tratamientos (T1, T2 y T3) combinando bacteriocina más EDTA en leche para medir los parámetros de calidad microbiológica en aerobios mesófilos y coliformes, teniendo en cuenta los límites permisibles descritos en el Decreto Supremo que aprueba el reglamento de la leche y productos lácteos en el Perú. Se determinó que, de los 3 tratamientos evaluados, solo el T3 presentó mayor capacidad inhibitoria en los primeros 3 días de inoculación.

Palabras clave: Bacteriocina, EDTA, bacterias ácido lácticas, calidad microbiológica, inhibición

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the efficiency of the combination of bacteriocin obtained from yogurt with probiotic plus EDTA in different concentrations on the microbiological quality of milk intended for the production of dairy products. The research carried out was of a basic type, at an experimental level, which included 10 samples of yogurt supplemented with probiotic microorganisms of commercial brands, from which 20 isolates were obtained in the facilities of the BIOMIC Laboratory of Cajamarca. For the isolation of lactic acid bacteria, MRS medium was used and 9 strains were selected since they complied with the LAB profile. The qualitative Biuret test was also performed to identify proteins in which all strains confirmed the presence of extracellular proteins. The 9 strains were transported to the Laboratory of Clean and/or Emerging Technologies of the Faculty of Chemical Engineering of the National University of Trujillo, to start the production of bacteriocins, then inhibition tests were performed to determine and select the crude bacteriocin extracts with the highest inhibition capacity, being the crude extracts of the isolated strains O1 and O4, since they presented halos greater than 8 mm. Subsequently, both extracts were evaluated for their inhibition capacity where bacteriocins plus EDTA were combined at different concentrations (T1: 100 ppm BTC + 25 ppm EDTA, T2: 75 ppm BTC + 50 ppm EDTA and T3: 50 ppm BTC + 75 ppm EDTA), where the O4 strain plus EDTA presented the highest inhibitory capacity against the main indicator of contamination in food: *Escherichia coli*, with halos greater than 18 mm. Finally, the different treatments (T1, T2 and T3) combining bacteriocin plus EDTA were inoculated in milk to measure the microbiological quality parameters in mesophilic aerobes and coliforms, taking into account the permissible limits described in the Supreme Decree that approves the regulation of milk and dairy products in Peru. It was determined that, of the 3 treatments evaluated, only T3 presented a greater inhibitory capacity in the first 3 days of inoculation.

Keywords: Bacteriocin, EDTA, lactic acid bacteria, microbiological quality, inhibition

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En los productos lácteos y sus derivados, el uso de conservantes es de suma importancia para mantener un producto de calidad. Los conservantes químicos son uno de los más utilizados y su aplicación corresponde a una práctica muy antigua realizada por empresas como método de conservación (Villeda, 2010). Sin embargo, los consumidores cada vez tienen más conciencia sobre el consumo de productos libres de sustancias químicas, por ello se desarrollan nuevas alternativas de conservación natural como las bacteriocinas, que, unidas o combinadas a las ya existentes, permitan la obtención de un mejor producto.

La combinación de conservantes naturales y químicos, nos permitiría conocer el grado en la mejora de las características microbiológicas permitiendo así potenciar a los conservantes, así mismo el uso de los conservantes químicos a largo plazo, pueden aumentar los riesgos de intoxicación, alergias y enfermedades. Por ello es que se han desarrollado conservantes naturales que son degradados fácilmente en el organismo y que hasta el momento no se han registrado ningún problema de salud en el consumidor (Agudelo y col., 2015; Sánchez y col., 2019).

En Cajamarca, la elaboración y comercialización de productos lácteos está ampliamente distribuida, por ser un producto característico de esta región; en la cual hay poca información sobre los conservantes de origen natural que usan para la conservación de productos lácteos, permitiendo trabajar sinérgicamente conservantes naturales y conservantes químicos para obtener un producto menos procesados, que además garantice la inocuidad y mayor vida útil de los alimentos sin alterar sus características.

Por todo lo expresado anteriormente, la presente investigación se enfocó en evaluar la eficiencia de las distintas combinaciones de bacteriocina con EDTA sobre la calidad microbiológica de la leche cruda destinada a la producción de lácteos en el departamento de Cajamarca. Para ello se aislaron bacterias ácido lácticas (BAL) proveniente de 10 yogures con probiótico de marcas comerciales, además de ello se realizaron pruebas confirmativas para determinar su presencia, posteriormente con estas BAL se logró producir bacteriocinas las cuales fueron sometidas a pruebas para determinar su grado de inhibición. Posteriormente se seleccionaron las BAL que presentaron mayor halo de inhibición y estas combinarlas con EDTA en diferentes concentraciones y poder determinar su efecto sobre la calidad microbiológica de la leche cruda, teniendo en cuenta los límites permisibles descritos en el Decreto Supremo que aprueba el reglamento de la leche y productos lácteos en el Perú.

Finalmente, la investigación se centro en determinar la eficiencia de la combinación de bacteriocina con EDTA, como una posible nueva alternativa para mejorar la calidad microbiológica de la leche destinada a la producción de lácteos en el departamento de Cajamarca – Perú, ya que permitirá generar nuevos productos con menor porcentaje de conservantes sintéticos.

CAPÍTULO II

MARCO TÉORICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Aguado y *col.* (2014) en su trabajo “Evaluación de efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica” tuvieron como objetivo determinar la efectividad de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* MXVK29 en combinación con conservantes químicos (benzonato de sodio, el sorbato de potasio y nitritos) para inhibir microorganismos de deterioro y patógenos. El resultado de su trabajo fue más favorable al combinar las bacteriocinas (125 ppm) con benzonato de sodio (100 ppm), sobre las demás combinaciones para inhibir el crecimiento de microorganismos de deterioro (*Escherichia coli*) con halos de inhibición mayores a 6 mm. Además, evidenciaron que, al usar solo bacteriocinas para inhibir a microorganismos, los resultados fueron desfavorables para inhibir *E. coli* con halos de inhibición menores a 2 mm. Sin embargo, solo evaluaron el efecto antimicrobiano en *E. coli*.

Ormaza (2018) en su tesis “Evaluación del efecto conservante de Nisina y EDTA sobre *E. coli* en queso fresco” tuvo como objetivo evaluar los efectos en distintas concentraciones de estos dos conservantes, trabajando sinérgicamente y determinar si hay un resultado óptimo para inhibir a *E. coli*. Trabajó con las siguientes concentraciones de EDTA y nisina, tratamiento 1(100 mg/ de EDTA y 25 mg/kg de nisina), tratamiento 2(75 mg/kg de EDTA y 50 mg/kg de nisina), tratamiento 3(50 mg/kg de EDTA y 75 mg/kg de nisina), tratamiento 4(sin conservantes). El cual fue inoculado con $4,0 \times 10^4$ UFC/mL de *E.coli*. Para evaluar el efecto sinérgico de estos

conservantes, realizó un recuento microbiano en placas de Neoflim en diferentes días. El principal resultado fue el tratamiento 1 (100 mg/kg de EDTA y 25 mg/kg de nisina), que logró inhibir el 50% de la población microbiana. Sin embargo, evalúa el efecto bajo una bacteriocina purificado en *E.coli*.

Colugna (2019) en su tesis “Efecto de la nisina en la vida útil de yogurt frutado con probióticos” evaluó el efecto de la nisina como bioconservante en la vida útil del yogurt, mediante análisis microbiológico, fisicoquímico y sensorial. En su trabajo preparó 6 tratamientos: yogurt sin pasta ni conservante, yogurt frutado sin conservante, yogurt frutado con sorbato de potasio y los experimentales con nisina en distintas concentraciones de 100, 250 y 400 mg/kg. Para determinar la vida útil realizó un análisis de acidez cada 2 días durante 90 días, recuento de coliformes totales cada 6 días durante 84 días y, pruebas sensoriales de aceptabilidad. Concluyó que el yogurt frutado con nisina a una concentración de 250 mg/kg posee una mejor vida útil microbiológica, fisicoquímica y una mayor aceptabilidad. Sin embargo, evalúan el efecto de la nisina, una bacteriocina pura en concentraciones muy elevadas.

Valencia (2020) en su tesis “Determinación de la capacidad conservante de bacterias ácido lácticas y mesófitas aplicadas en salami para evitar el uso de conservantes artificiales” tuvo como objetivo establecer las causas y efectos que conlleva usar bacterias ácido lácticas y mesófitas como alternativas para su uso como conservantes en la elaboración de salami. Los análisis microbiológicos que sirvieron para inhibir a *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella* spp, presentaron valores dentro del rango establecido que garantizaron su inocuidad al usar 0,8 g de bacterias ácido lácticas, por otro lado, los análisis fisicoquímicos determinaron la estabilidad

del salami. Se concluyó que, el uso de estos microorganismos como conservante es válido según la norma técnica de alimentos, además de ser una alternativa para minimizar el uso de conservantes químicos. Sin embargo, presenta un resultado favorable con elevada concentración de bacterias ácido lácticas.

2.2. Fundamentos teóricos de la investigación.

2.2.1. Leche como materia prima para productos lácteos.

Se define a la leche como una secreción láctea, sin calostro, que es obtenida por el ordeño higiénico del líquido segregado por glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos; tiende a tener un color blanco, sabor dulce y un pH cercano a 7. Además, esta compuesta por agua, grasa y sólidos no grasos (Revilla, 1982).

La calidad de la leche cruda es importante para la Industria Láctea, para poder tener un producto de calidad. La presencia de células somáticas (CS) en la leche cruda es un indicador de salud en la ubre de la vaca, los valores normales en un animal sano oscilan en 200 000 CS/mL y valores mayores a 400 000 CS/mL nos indica problemas de mastitis en las vacas (Celis y col., 2009); cuando estos números son elevados, existe un mayor riesgo de contaminación en la leche.

La leche cruda al tener un contenido alto de agua, gran variedad de nutrientes y su pH, es considerado un buen medio para el crecimiento de microorganismos. Al pasar por la ubre, contacto por el pezón, la piel del animal y por todo el proceso del ordeño, también por el proceso de almacenamiento y transporte, va generando una microbiota muy amplia que incluyen microorganismos beneficiosos y patógenos para la salud humana (Arqués, 2003). Las funciones de algunos

microorganismos en la leche son: facilitar las fermentaciones de los productos lácteos (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Propionibacterium*), los que causan deterioro (*Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*) o son que aportan beneficios a la salud (lactobacilos, bifidobacterias) (Quigley y col., 2013). Además, existen microorganismos deterioradores y potencialmente patógenos, por ejemplo: *Escherichia coli*, *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter* y hongos productores de micotoxinas (Arroyo y col., 2018).

En el Perú, la leche debe cumplir la normativa sanitaria nacional vigente, referido en el Decreto Supremo N° 007-2017(Artículo 9), tal como se muestra en la Tabla 1; en la cual decreta que la leche debe provenir de animales libres de enfermedades y cumplir con especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad que esta establecido por el Ministerio de Salud, con lo siguiente:

Tabla 1. Aspectos microbiológicos (MINAGRI, Decreto Supremo N° 007-2017. Artículo 9)

Agente Microbiano	Unidad	Categoría	Clase	N	c	Límites por mL	
						m	M
Aerobios mesófilos	UFC/mL	3	3	5	1	5×10^5	10^6
Coliformes	UFC/mL	4	3	5	3	10^2	10^3

2.2.1.1. Bacterias mesófilas

La mayor parte de bacterias presentes en la leche, son microorganismos mesófilos, por eso es que se emplea el proceso de refrigeración a temperaturas de 4°C a 5°C para asegurar la calidad de la leche, aunque este proceso no debe pasar de las 24 horas, ya que favorecería al aumento en número de flora psicótrofa (Arroyo y col., 2018). Los mesófilos son indicadores de control de la temperatura, procesos de transporte y almacenamiento (Spencer y col., 2001). Una alta carga microbiana

refleja: Materia prima (leche) excesivamente contaminada, excesiva manipulación en la elaboración del producto, posible presencia de patógenos y tasas superiores de $10^6 - 10^7$ por gramo un inicio de descomposición (Arroyo y col., 2018).

Los mesófilos tienen una temperatura óptima a 37°C, entre ellos se encuentran patógenos transmitidos por alimentos como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium* (Adams y col., 2015). También, los mesófilos incluyen a bacterias resistentes en el cuerpo humano como: *E. coli* (Geeta y col., 2009).

2.2.1.2. Coliformes

Los coliformes son microorganismos de origen fecal, que en la industria láctea refleja la falta de higiene. Estos pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*, cuyo hábitat normalmente es el intestino de mamíferos. Los coliformes no son patógenos, con la excepción de ciertas cepas enteropatógenas como *Escherichia coli* 0157:H7 (Villegas, 2004). Las bacterias coliformes pueden ser aerobias o anaerobias facultativas, Gram- negativas, no son formadoras de esporas, forma bacilar, fermentadoras de lactosa para producir gas y ácido (principalmente láctico) entre las 48h a 35°C (Yousef y col., 2003). En este grupo están las siguientes bacterias: *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii* (Erkmen y col.,2016). Estos microorganismos indican una mala o deficiente elaboración de los alimentos (Pascual y col., 1999).

2.2.2. Conservantes en los alimentos

Los alimentos de origen vegetal o animal se llegan a deteriorar con facilidad, perdiendo calidad y disminuyendo la vida útil del producto. Por ello es que se usan aditivos que mantengan seguros al consumidor. Dentro de estos aditivos empleados, los conservantes son usados para evitar deterioro en el alimento; principalmente inhibe el crecimiento microbiano y evitan alterar la composición físico-químico del alimento. La principal forma de deterioro es por microorganismos contaminadores y patógenos, los cuales pueden alterar las propiedades del producto, afectar la salud humana y reducir la vida útil del producto (Ramos y col., 2005).

En la leche al ser manejada inadecuadamente llega a presentar riesgos de contaminación, aumentando la carga bacteriana. Motta y col. (2019) afirman que los microorganismos integrados son principalmente por bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, *E.coli*, *S.aureus*, enterobacterias, mohos y levaduras. Su deterioro también ocurre en la composición físico-química, que es afectada por causas de los microorganismos.

2.2.2.1. Conservantes químicos en los alimentos

Los conservantes han sido usados desde hace miles de años, uno de los conservantes más usados son los conservantes químicos que permiten mantener al producto en óptimas condiciones para su consumo. Cubero y col. (2002)

afirman que los conservantes químicos no han variado desde hace tiempo, presentando inconvenientes como toxicidad, un elevado costo y baja efectividad.

El uso de conservantes químicos es una práctica muy antigua, sin embargo, los alimentos con estos conservantes artificiales no son imperecederos, se mantienen inalterados por un tiempo limitado, impidiendo inhibir de forma total a los microorganismos, permitiendo así descomponer al alimento y alterar a sus características. Otro de los inconvenientes de los conservantes químicos son las intoxicaciones y alergias que causan a largo plazo permitiendo cuestionarnos si es de uso adecuado estos en los productos (Villeda, 2010). El ácido salicílico hasta hace unos años era un conservante muy usado, principalmente para la elaboración de conservas caseras donde se demostró los riesgos de intoxicación que producía (Infante, 2015).

Dentro de estos diversos conservantes químicos encontramos al Etilen Diamino Tetra Acetatos, más conocido como EDTA, es un conservante químico que actúa como antioxidante y secuestrador de iones que estabiliza la capa lipopolisacáridos de ciertos microorganismos (Ramos, 2005). Considerado como un conservante con baja toxicidad y apropiado para inhibir diversos microorganismos. La dosis máxima de EDTA es de 125 mg/kg (Ormaza, 2018). Se han realizado estudios usando EDTA para mejorar el color en leche, y combinaciones de EDTA con ácido cítrico o ascórbico como inhibidor (Denoya y col., 2012)

Bajo el problema de los conservantes químicos se ha buscado posibles soluciones para evitar estos usos excesivos. Dentro de la mejora de los productos

alimenticios, la industria alimentaria recurre a la búsqueda de aditivos más saludables, con menos efectos secundarios y más económicos, de ahí que se haya fomentado la investigación en aditivos naturales, que provengan de plantas, animales o microorganismos (Soares.,2017).

2.2.2.2. La biotecnología para obtener nuevos conservantes.

Muchos países han propuesto nuevas alternativas de conservación en alimentos, esto debido a que los consumidores prefieren alimentos más naturales, nutricionales, frescos, menos procesados y con menor cantidad de conservantes químicos (Gould, 1996). Es por ello que se han buscado nuevas formas de obtener nuevos conservantes. La biotecnología nos ha traído nuevas formas de buscar soluciones con ayuda de la tecnología y con organismos vivos o parte de ellos, nos ha permitido poder mejorar los usos específicos en los que se emplea. Al usar aun conservantes químicos, la biotecnología ha buscado nuevos métodos para poder remplazarlos o modificarlos. En la industria alimentaria muchos estudios buscan obtener un producto más natural y que mantenga sus características. Esto nos lleva a nombrarlos bioconservantes, el cual tiene como objetivo extender la vida útil de los productos alimentarios y garantizar su seguridad. Estos bioconservantes deben mostrar actividad antimicrobiana contra patógenos o microorganismos contaminadores, y no alterar el microbioma intestinal del consumidor (Pisoschi y col., 2017).

El deterioro en los alimentos es causa de algunos grupos de bacterias que amenazan la seguridad alimentaria y son agentes etiológicos de alguna patología

en la industria alimentaria, como las originadas por *Clostridium botulinum*, *E. coli* o *Listeria monocytogenes*, las cuales pueden ser causantes de muerte al consumidor (Kumariya y col., 2019). Por otro lado, existen otro grupo de bacterias que tienen un efecto positivo para poder contrarrestar al grupo de bacterias antes mencionada, además de tener un efecto deseado y beneficiosos en los alimentos. Un ejemplo, son las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son parte del microbiota natural que están presentes en los alimentos que consumimos diariamente, además de estar en nuestra microbiota intestinal. Dentro de este grupo podemos encontrar a los siguientes géneros de bacterias ácido lácticas: *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.* y algunos *Streptococcus spp* (EFSA, 2019). Un alimento para obtener BAL es la caña de azúcar y jugos extraídos de esta caña, productos fermentados y productos lácteos son fáciles de obtener *L. lactis* con medios de cultivos selectivos y bajo condiciones de temperatura (Cock y col.,2007).

2.2.2.3. Las “BAL” productoras de bioconservantes

Las bacteriocinas han llamado la atención como conservantes naturales en los últimos años, dentro de los conservantes obtenidos por microorganismos se han encontrado a las bacteriocinas que representan un sustituto potencial de conservantes químicos, debido a que son producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales son consideradas por su seguridad según lo redacta Mondragón (2013).

Las bacteriocinas han atraído la atención como sustituto potencial de compuestos preservantes porque son producidas por bacterias consideradas benéficas para la salud y en la producción de alimentos, estos compuestos purificados o semipurificados pueden ser utilizados como bioconservantes en alimentos para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos según lo redacta Joerger (2003).

Estos bioconservantes pueden ser encontrados en leche y productos lácteos, pescado, carne, vegetales fermentados, pan y vino, entre otros, los cuales se pueden usar como cultivos iniciadores, además, también hay bacteriocinas producidas por bacterias coliformes o sintetizadas por bacilos formadores de esporas, aunque su aplicación en productos alimentarios no se ha obtenidos resultados esperados (Grande y col., 2011).

Distintos investigadores han logrado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a características genéticas y bioquímicas, en la Tabla 2 muestra la clasificación de Nes en 1996 (Klenhammer, 1993 y Nes y col., 1996):

A. Clase I.- Lantibióticos. - Son pequeños péptidos activos a nivel de membrana y que poseen aminoácidos poco comunes como es la lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman por una modificación posterior a la traducción. Un ejemplo es la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, que se unen con los átomos de azufre de la cisteína forman bacteriocinas como es la nisina.

B. Clase II.- No lantibióticos. - Su peso molecular es variable, contienen aminoácidos regulares. Se agrupan en tres subclases:

- **Clase IIa.-** Presentan péptidos activos contra *Listeria*, su secuencia consenso en la región N termina en TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
- **Clase IIb.-** Presentan dos péptidos diferentes, ambos son necesarios para mejorar la actividad antimicrobiana. Los mas representativos de este grupo son la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.
- **Clase IIc.-** Presentan péptidos pequeños, termoestables, sin modificaciones y es transportado por péptidos líder. Solo son transportados las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.
- **Clase III.-** Sus péptidos son mayores de 30 kDa, ejemplos de ellos tenemos a las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B.

Tabla 2. Clasificación de microorganismos productores de bacteriocinas (Nes, 1996).

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>
		<i>Pediococcus acidilactici</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactobacillus lactis subsp cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactobacillus lactis subsp cremoris</i> 9B4
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Dentro de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* que es la especie bacteriana responsable de la producción de Nisina la cual está permitida por la FAO para ciertos productos incluyendo los productos lácteos (Thomas y col., 2000 y Mess y col., 2003).

Por otro lado, distintos autores indican que estos conservantes o bioconservantes tienen una aplicación limitada por una insuficiente efectividad en contra de ciertos

microorganismos patógenos. Además, se ha descrito que la mayoría de estas bacteriocinas actúan con mayor efectividad en bacterias Gram-positivas (Yildirim y col., 2018). Conociendo estos hechos, se han realizado numerosos estudios para compensar esta limitación. Bajo estas limitaciones se busca soluciones, las nuevas tecnológicas buscan combinar diferentes métodos de conservación para inhibir crecimiento microbiano. Los estudios demuestran que las bacteriocinas tienen un efecto sinérgico cuando se usan en combinación con otros tratamientos (Ormaza., 2018).

2.2.2.4. Mecanismo de acción

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se debe a la desestabilización funcional de la membrana citoplasmática de las células sensibles, son desarrolladas en 3 fases: unión a la membrana, inserción en la misma y formación de poros (Abee y col., 1995) (Moll y col., 1999). Esta unión se debe a las interacciones electrostáticas entre residuos de la bacteriocina cargados positivamente la carga negativa de los fosfolípidos de la membrana, la formación de poros se debe a la naturaleza hidrófoba-hidrófila de las bacteriocinas, facilitando su distribución a lo largo de la membrana. La formación de poros permite un flujo pasivo de pequeñas moléculas (iones, ATP y aminoácidos) permitiendo la disipación fuerza protón motriz.

En la figura 1 que se presenta a continuación se indica el mecanismo de acción de las bacteriocinas obtenidas de *Lactococcus lactis*.

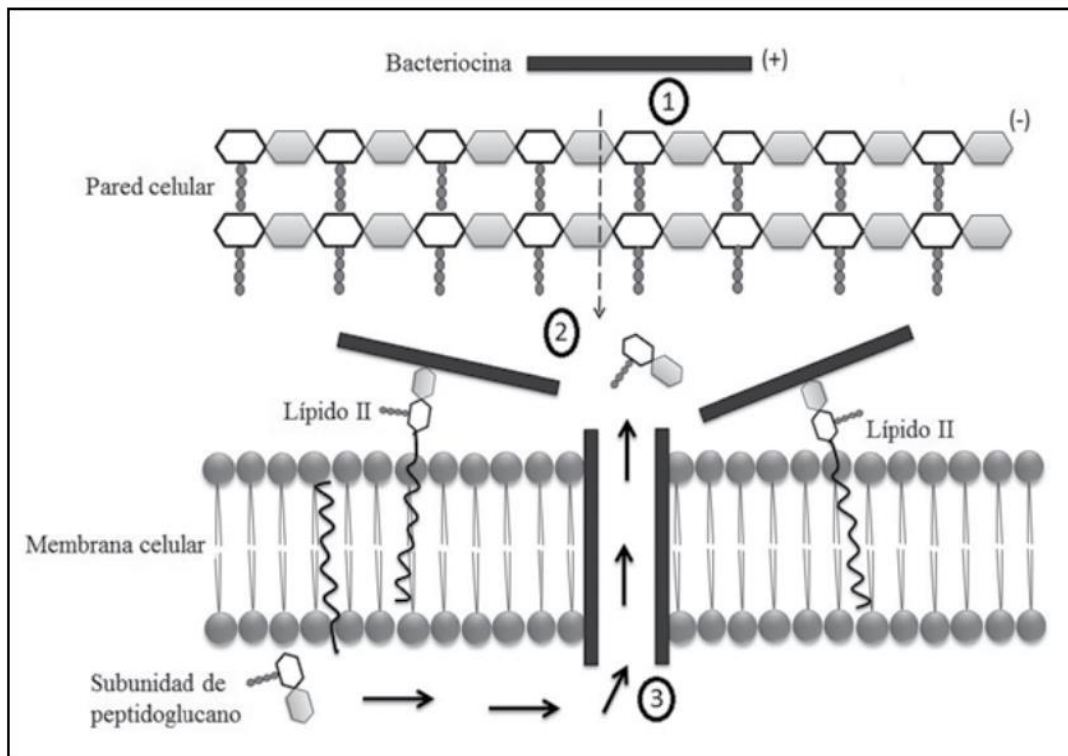


Figura 1. Mecanismo de acción de las bacteriocinas (López y col. 2008).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPOTESIS

3.1. Tipo de investigación

Esta investigación por su finalidad es de tipo básica.

3.2. Diseño de investigación

La investigación es de diseño experimental

3.3. Área de investigación

La investigación es el área de Biotecnología Alimentaria.

3.4. Dimensión temporal y espacial

La investigación se realizó en los meses de marzo del 2022 – febrero del 2023 en el departamento de Cajamarca.

3.5.Unidad de análisis, universo y muestra

La unidad de análisis es los diferentes tratamientos de extracto crudo de bacteriocinas más EDTA, la muestra son yogurts suplementado con microorganismos probióticos para la obtención de BAL.

3.6. Métodos

3.6.1. Toma de muestra

Se obtuvo 10 muestras de yogurt suplementado con microorganismos probióticos comercializados en supermercados de la ciudad de Cajamarca. Las muestras fueron transportadas en un cooler con hielo a 4 °C hasta las instalaciones del laboratorio de la empresa BIOMIC S.R.L, ubicado en la ciudad de Cajamarca, el tiempo aproximado para el transporte de muestras fue de 1 hora.

3.6.2. Aislamiento de BAL.

Para el aislamiento se utilizó el medio MRS (DeMan y col., 1972 y Rogosa y col., 1951). Con cada muestra obtenida se realizó una solución inicial que contenía 10 mL de la muestra y 90 mL de solución diluyente, homogenizadas durante 5 min, luego se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-6} , de las dos últimas diluciones se tomó 1 mL el cual fue sembrado por estría en una placa con medio MRS, se llevó a incubación a 35 °C por 24 a 48 horas en ambiente microaerófilo. Posteriormente, se realizó una tinción Gram para comprobar cuáles aislamientos poseían características de Gram positivas (Ramírez, C y Vélez, J., 2016).

3.6.3. Coloración de esporas de BAL

A los aislamientos Gram positivos de 24 horas se les sometió a coloración de esporas, la cual consistió en colocar una colonia en una lámina portaobjetos y extenderla con un asa de siembra, se le agregó verde de malaquita y con ayuda del mechero se calentó por 5 minutos (se evito hervir la muestra o secar la muestra), pasado el tiempo se lavó el exceso de colorante con abundante agua, luego se añadió safranina durante 1 minuto, el exceso de colorante se lavó con abundante agua, finalmente se dejó secar para poder observarlo en el microscopio y determinar la presencia o ausencia de esporas (Vázquez, C y col., 2011).

3.6.4. Identificación Bioquímica de BAL

A los aislamientos Gram positivos encontrados, se les sometió a las pruebas Bioquímicas (Kandler,O y col., 1992):

- Para la prueba de catalasa se utilizó una colonia del aislamiento sobre una lámina portaobjetos, luego se le agregó una gota de peróxido de hidrógeno, se hizo la lectura durante los 10-20 segundos observando si hubo presencia o ausencia de burbujas.
- Para la prueba de oxidasa se agregó de 2 a 3 gotas de reactivo de Kovacs en el centro del papel, luego se extendió con una asa de siembra una colonia del aislamiento previamente seleccionado sobre el papel impregnado. La reacción de color positivas se produjeron en los 5 a 10 segundos

- Para la prueba de movilidad se utilizó el medio SIM, con ayuda de un asa de siembra en punta se sembró por puntura la colonia del aislamiento seleccionado, se incubó por 24 horas a 37 °C. Finalmente se hizo la lectura de la prueba para determinar la presencia de movilidad.

3.6.5. Evaluación de producción de proteínas mediante la reacción de Biuret

Se realizó la prueba cualitativa de Biuret para cada aislamiento de BAL, para esto se procedió a cultivar cada aislamiento en tubos que contenían 10 mL de caldo MRS, los tubos se llevaron a incubación a 30 °C por 48 horas, pasado el tiempo se llevó a centrifugar cada tubo a 5000 rpm por 10 minutos, luego el sobrenadante se pasó a tubos nuevos con ayuda de jeringas estériles, el volumen transportado fue de 5 mL. Para cada tubo con sobrenadante se agregó 500 µL de NaOH al 10% y consecuentemente se le agregó 500 µL de CuSO₄ al 1% se agitó levemente los tubos para determinar si existió (color violeta) o no (cambio a cualquier color) la presencia de proteínas extracelulares producidas por BAL, además se utilizó como blanco un tubo que solo contenía caldo MRS para descartar que la coloración haya sido producida por los componentes del medio ya mencionado (Cuellar,F., 2015).

3.6.6. Producción del extracto crudo de bacteriocinas (ECB) a partir de BAL

Este procedimiento fue realizado en el Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo.

Para la producción de bacteriocinas se necesitaron cultivos jóvenes de BAL de 24 horas, para lo cual se reactivó los aislamientos obtenidos en agar MRS contenidos en viales. Una vez desarrollada la BAL se calculó el inóculo mediante el espectrofotómetro ajustado a una onda de longitud de 540 nm esperando que este sea de 0,5 densidad óptica; luego el inóculo calculado fue adicionado en matraces Erlenmeyer que contenían caldo MRS a un pH de 6. Se incubaron a 30 °C a 48 horas en agitación constante a 150 rpm, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana estéril de 0,22 µm de porosidad, se sometió a una temperatura de 80 °C en baño maría y finalmente se ajustó el pH con NaOH, además fue refrigerada a 4 °C hasta su posterior uso (Estrada, A.,2005).

3.6.7. Evaluación de la actividad inhibitoria del “ECB” frente a *E. coli* spp

Para determinar la actividad inhibitoria se utilizó una cepa de *E. coli* spp, el cual fue obtenido a partir de muestras de queso artesanal del departamento de Cajamarca.

Este aislamiento fue sembrado en placas que contenían agar Müeller Hinton mediante la técnica de agotamiento, inmediatamente fueron colocados discos de papel de filtro impregnados con 20 µl de ECB obtenida anteriormente. Finalmente fueron incubadas a 37 °C durante 18- 24 horas (Andrews, J., 2001).

Para finalizar, se seleccionó el aislamiento con mayor capacidad inhibitoria.

3.6.8. Evaluación de la actividad inhibitoria de las bacteriocinas más EDTA en diferentes tratamientos frente a *E. coli* spp

Para determinar la actividad inhibitoria de ambos conservantes se utilizó un aislamiento *E. coli* spp, el cual fue sembrado en placas con agar Müeller Hinton mediante la técnica de agotamiento, inmediatamente fueron colocados discos de papel de filtro impregnados con EDTA y bacteriocinas en distintas concentraciones de (i) 100 ppm de bacteriocina más 25 ppm de EDTA, (ii) 75 ppm de bacteriocina más 50 ppm de EDTA y (iii) 50 ppm de bacteriocina más 75 ppm de EDTA. Finalmente fueron incubadas a 37°C durante 18- 24 horas (Andrews, J., 2001).

El aislamiento que obtuvo mejor resultado fue enviado a Macrogen (Korea) para su secuenciamiento, teniendo como base el método de electroforesis capilar planteado por Sanger. Se realizó una reactivación de la cepa O4 con características de bacteria ácido láctica, la reactivación se dio en vial con medio MRS el cual fue incubado por 24 a 48 horas a 30 °C, pasado el tiempo se realizó la suspensión de la colonia en crioviales que contenían 1,2 mL glicerol (80 %) y 0,3 mL de caldo BHI (20 %), posteriormente se codificó el criovial y se selló con Parafilm, finalmente se envió a Macrogen y se utilizó la herramienta BLAST de NCIB para la identificación (Sanger, F. y Nicklen, S.,1977).

3.6.9. Evaluación de los distintos tratamientos de bacteriocina más EDTA en leche

Se recolectó 5 litros de leche cruda de vaca en diferentes puntos de Cajamarca al azar, posteriormente se dividió en cuatro partes iguales. Se inoculó los 4 tratamientos; Tratamiento 1 (100 ppm de bacteriocina más 25 ppm de EDTA en 1L de leche), Tratamiento 2 (75 ppm de bacteriocina más ppm de EDTA en 1L de leche), Tratamiento 3 (50 ppm de bacteriocina más 75 ppm de EDTA en 1L de leche), además se tuvo en cuenta el Tratamiento control (125 ppm EDTA en 1L de leche) y Testigo (leche sin ningún conservante). Finalmente se homogenizó y mantuvo en refrigeración durante 24 horas. El efecto inhibitorio se evaluó en distintos tiempos (del día 0 al día 6).

Para el recuento de aerobios mesófilos, se tomó 10 mL de leche de cada tratamiento. Los 10 mL de leche tomada se mezclaron con 90 mL de agua peptonada estéril; esta constituyó la primera dilución de la muestra. Luego se realizaron diluciones de la muestra hasta la dilución 10^{-1} o 10^{-4} . A partir de las 3 últimas diluciones se tomó 1 mL y se colocó en las cajas Petri estériles y vacías. Se vertió aproximadamente 20 mL del agar PCA, fundido y atemperado 45° - 50° C. Se sometió a las placas a una homogenización manual mediante una agitación, se dejó solidificar. Por último, se incubó las placas a 24-48 horas a 37° C, pasado el tiempo se hizo un contaje y se expresó en UFC/mL (Vanderzant, C y Splittstoesser, D., 1992).

Para el recuento de coliformes totales se tomó 10 mL de leche de cada tratamiento. Se realizó diluciones seguidas en Caldo Lauril Sulfato hasta llegar a la dilución 10^{-3} , se incubó a 24 horas a 37°C. De los tubos positivos se tomó 1 mL de cada dilución a cada uno de los tres tubos, conteniendo 10 mL de caldo BRILA con tubo de Durham invertido para determinar la presencia de gas. Los tubos se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se revisaron los tubos que presentaron formación de gas, es decir, en los que se observó la presencia de burbujas en los tubos de Durham y aquellos que fueron negativos a la presencia de gas, se incubaron 24 horas más. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de los resultados. Por último, se recolectó los datos y se expresó en NMP/mL (Morales y col., 2012). Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

3.7. Análisis estadístico:

3.7.1. Estadísticos descriptivos:

Se evaluó los principales estadísticos descriptivos para determinar las características poblacionales de la muestra, se consideró media, mediana, varianza y desviación estándar.

3.7.1.1. Prueba de normalidad:

Para evaluar si los datos obtenidos poseen una distribución normal se aplicó la prueba de Kolmogorov- Smirnov (K-S), puesto que se tienen un total de 60 datos. Se consideró un nivel de confianza de 95% y un p valor significativo ≤ 0.05 .

3.7.1.2. Modelo lineal univariable de bloques aleatorios:

Se aplicó el modelo lineal univariable de bloques aleatorios para evaluar el comportamiento de los tratamientos en relación al testigo y grupo control, además se aplicó la prueba pos hoc de HDS Tukey con el objetivo de establecer los subconjuntos homogéneos y determinar semejanzas o diferencias significativas entre los mismos. Se consideró un nivel de confianza de 95% y un p valor significativo ≤ 0.05 .

3.8. Instrumentos

Como instrumento de recopilación de datos se utilizó fichas de datos para el aislamiento de BAL, fichas de BAL productoras de bacteriocinas y fichas de evaluación de la inhibición usando la combinación de ambos conservantes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Descripción general de la muestra y las condiciones de transporte

De las 10 muestras de yogurt suplementado con microorganismos probióticos, se obtuvieron 20 aislamientos de BAL Gram positivas, las cuales fueron codificadas del: O1 al O20.

4.1.2. Aislamiento y caracterización bioquímica de BAL de yogures suplementados con microorganismos probióticos.

De los 20 aislamientos Gram positivos, se confirmó la presencia de 9 cepas de BAL con el perfil de caracterización, tal como se muestra en la Tabla 3 indicando sus características morfológicas microscópicas, fisiológicas (catalasa, oxidasa y motilidad) y tinción de esporas (Apéndice N° 3).

Los 9 aislamientos de BAL se sometieron a la prueba de Biuret, en la cual se determinó que todos eran productores de proteínas tal como se puede observar en la Tabla 3, ya que se observó una coloración violeta después de agregar el reactivo de Biuret (NaOH al 10% y del CuSO_4) lo que indicó una reacción positiva, al tubo que contenía caldo MRS se coloreó violeta por un corto tiempo, degradándose a un color anaranjado (ver Apéndice 4)

Tabla 3. Características microscópicas y fisiológicas a las cepas aisladas de yogures suplementados con microorganismos probióticos.
+ = positivo, - = negativos

Código	Morfología	Tinción esporas	Catalasa	Oxidasa	Motilidad	Producción de proteínas
O1	Cocos	-	-	-	-	+
O2	Cocos	-	-	-	-	+
O3	Bacilos	-	+	-	+	-
O4	Bacilos	-	-	-	-	+
O5	Bacilos	-	+	-	+	-
O6	Bacilos	-	-	-	-	+
O7	Cocos	-	-	-	-	+
O8	Bacilos	-	+	+	+	-
O9	Bacilos	-	+	-	+	-
O10	Bacilos	-	+	-	+	-
O11	Bacilos	-	-	-	-	+
O12	Bacilos	-	+	-	-	-
O13	Bacilos	-	-	-	-	+
O14	Cocos	-	-	-	-	+
O15	Bacilos	-	+	-	+	-
O16	Cocos	-	-	-	-	+
O17	Bacilos	-	+	-	+	-
O18	Cocos	-	+	-	-	-
O19	Bacilos	-	+	-	+	-
O20	Bacilos	-	+	-	+	-

4.1.3. Producción del extracto crudo de bacteriocinas

Se produjo 50 mL del extracto crudo de bacteriocinas de los 9 aislamientos seleccionados, los cuales fueron almacenados en tubos de 50 mL estériles que se mantuvieron a 4 °C hasta su traslado al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca. Como se observa en la Figura 2.



Figura 2. Tubos de 50 mL con extracto crudo de bacteriocina.

4.1.4. Evaluación de la actividad inhibitoria de bacteriocinas *in vitro* contra *E. coli* spp.

La cepa de *E. coli* spp mostró sensibilidad a los ECB (20 μ l) de las cepas O1 y O4 formando un diámetro en el halo de inhibición de 8,5 mm y 9,5 mm respectivamente (Anexo 2), además se observó que los demás ECB (20 μ l) de las cepas O2, O6, O7, O11, O13, O14 y O16 no presentaron sensibilidad frente a las cepas de *E. coli* spp con diámetros en el halo menores a 6 mm, (Apéndice 6). Los resultados de sensibilidad contra *E. coli* spp se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Capacidad inhibitoria del extracto crudo de bacteriocinas frente a los aislamientos de *E. coli* spp.

Extracto crudo de bacteriocina	Halo de inhibición en mm		
	E. coli spp 1	E. coli spp 2	E. coli spp 3
	Media (mm)	Media (mm)	Media (mm)
O1	8,5(+)	8(+)	9(+)
O2	5,5(-)	5,5(-)	6(-)
O4	9(+)	10(+)	9,5(+)
O6	5,5(-)	5,5(-)	6(-)
O7	6(-)	5,5(-)	6(-)
O11	5,5(-)	6(-)	5,5(-)
O13	6(-)	5,5(-)	5,5(-)
O14	6(-)	5(-)	5,5(-)
O16	6(-)	6(-)	5,5(-)

- = nula, + = sensible, ++ (muy sensible). +++ (sumamente sensible)

4.1.5. Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto crudo de bacteriocina con EDTA *in vitro* contra *E. coli* spp

Se seleccionaron los dos extractos que presentaron mayor capacidad de inhibición y se adicionó EDTA para medir su capacidad inhibitoria de ambos conservantes combinados. La cepa de *E. coli* spp mostro mayor sensibilidad al ECB producida por la cepa O4 ya que presentó un diámetro en los halos de inhibición de 19 mm y 18 mm, además se observo que el ECB producido por la cepa O1 presentó sensibilidad frente a los aislamientos de *E. coli* spp con diámetros en los halos de 17 mm y 14 mm, (Apéndice 7). Los resultados de sensibilidad contra *E.coli* spp se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Capacidad inhibitoria del extracto crudo de bacteriocinas más EDTA frente a los aislamientos de *E. coli* spp.

Extracto crudo de bacteriocina más EDTA	Halo de inhibición en milímetros		
	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
	Media (milímetros)	Media (milímetros)	Media (milímetros)
O1 más EDTA	14	17	17
O4 más EDTA	18	19	19

4.1.6. Identificación mediante el gen 16S ARNr

El aislamiento O4 mostró mayor capacidad de inhibición y se identificó mediante el secuenciamiento con los primers universales 785F-907R y 27F-1492R, el cual obtuvo un porcentaje de similitud al 99% a *Lactobacillus rhamnosus*, indicado en el reporte de MacroGen y el alineamiento realizado con la herramienta BLAST de NCBI (Anexo 1).

4.1.7. Evaluación inhibitoria de los distintos tratamientos en leche destinada a procesos lácticos:

4.1.7.1. Recuento de aerobios mesófilos

La Figura 3 muestra la curva de crecimiento de aerobios mesófilos durante los 6 días de experimento, el control positivo (TC), los tratamientos y la leche cruda (testigo). Donde se observó que los 3 tratamientos lograron disminuir el logaritmo UFC/ml en el primer día, posteriormente en el tercer día el T3 presentó una inhibición óptima según los límites permisibles en el Decreto Supremo N° 007-2017(Artículo 9), en diferencia del T1 y T2 donde su capacidad de inhibición no

cumplió con los límites permisibles en Decreto Supremo N° 007-2017(Artículo 9).

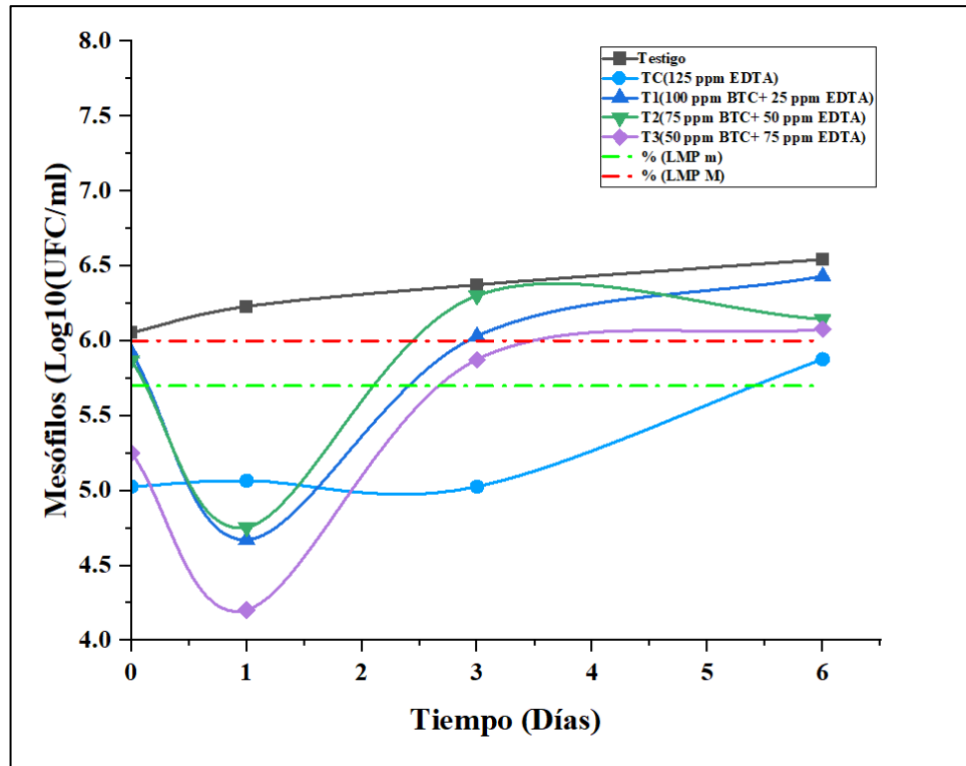


Figura 3. Curvas de crecimiento bacteriano para aerobios mesófilos

El Anexo 3 muestra el conteo de aerobios mesófilos en los distintos tratamientos y testigo a través del tiempo (0, 1, 3, 6 días).

4.1.7.2. Coliformes totales

La Figura 4 muestra la curva de crecimiento de coliformes totales durante los 6 días de experimento, el control, los tratamientos y la leche cruda. Donde se observa que los T2 y T3 lograron disminuir el logaritmo UFC/ml en el primer día, en diferencia al T1 el cual no presentó actividad inhibitoria. En el día 3 y 6 ningún Tratamiento presentó una inhibición óptima según los límites permisibles.

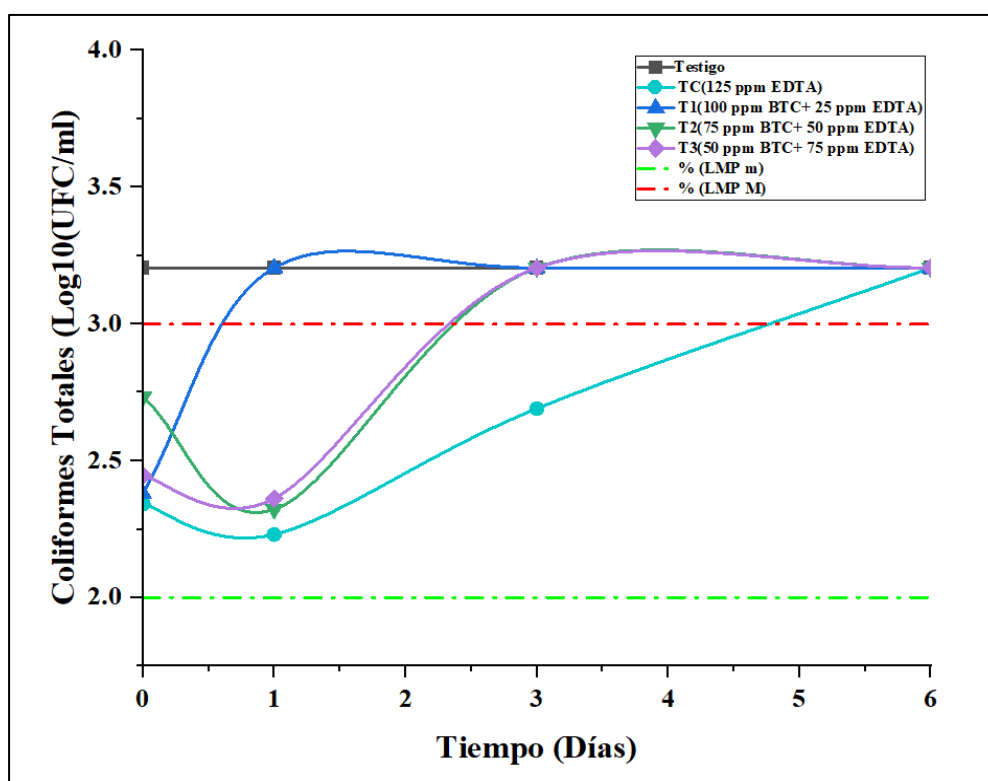


Figura 4. Curvas de crecimiento bacteriano para coliformes totales.

El Anexo 4 muestra el conteo de coliformes totales en los distintos tratamientos y testigos a través del tiempo (0, 1, 3, 6 días).

4.1.7.3. Análisis estadístico

El Anexo 5 muestra los análisis estadísticos (media, mediana, varianza, desviación estándar) de los tratamientos medidos para aerobios mesófilos y coliformes totales. En la Tabla 6 muestra la prueba de normalidad de aerobios mesófilos

Tabla 6. Prueba de normalidad

Pruebas de normalidad			
Kolmogorov-Smirnov ^a			
	Estadístico	gl	Sig.
Mesófilos	0,041	60	,200*

El Anexo 6 muestra el diseño de bloques aleatorios, lo que determinó una relación del Tratamiento 3 con el control en aerobios mesófilos, en coliformes totales no se realizó el diseño de bloques aleatorios.

4.2. Discusión.

Para el aislamiento de BAL es muy importante considerar sus requerimientos nutricionales, por lo que se usó el medio selectivo MRS el cual presenta una composición adecuada para estos microorganismos (peptona, extracto de levadura, glucosa y extracto de carne), además de tener componentes que inhiben el crecimiento de bacterias Gram negativas (citrato de amonio), tal y como lo describe Ramos, B y *col.* (2009), los que lograron aislar 20 cepas de bacterias ácido lácticas empleando el uso de este medio selectivo. La Tabla 3 muestra los resultados de la caracterización bioquímica y morfológicas, se logró aislar 20 aislamientos presuntivos, de los cuales solo 9 aislamientos cumplieron con todos los requisitos ya establecidos para bacterias ácido lácticas, tal como lo describe Rivera, J y *col.* (2017), debido a que de sus 55 aislamientos presuntivos solo 31 fueron consideradas BAL.

Para determinar la presencia de proteínas extracelulares se realizó la prueba cualitativa de Biuret, la cual es un primer indicativo de la producción de bacteriocinas. En donde todos los aislamientos dieron positivo a la reacción de Biuret, tal como lo describe Cuellar, F. (2015) quien usó cepas de *Lactobacillus*, que presentaron una coloración morada en los dializados de los extractos de bacteriocinas producidas, demostrando así la presencia cualitativa de proteínas en estos extractos.

La obtención de bacteriocinas se realizó controlando los parámetros de crecimiento, a una temperatura de incubación de 30 °C, pH final del medio MRS de 6,5 y 150 rpm de agitación en un shaker orbital por 48 horas; parámetros similares a los utilizados por Agudelo, N y *col.* (2015), indicando que los valores adecuados de pH para la

producción de bacteriocinas se encuentran entre 5 y 7, la agitación constante es importante porque permite mayor intercambio de gases al impedir la precipitación de la biomasa, lo que favoreció el incremento en la producción de las bacteriocinas. Posterior a la filtración se aplicó un tratamiento térmico para inactivar enzimas proteolíticas y finalmente neutralizar los ácidos orgánicos del sobrenadante con NaOH, como lo describe Ramírez, G y col. (2013).

Durante la prueba de difusión en disco frente a *E. coli* spp se observó que los ECB de las cepas aisladas O1 y O4 presentaron mayor capacidad inhibitoria con halos de 8 mm y 9,5 mm, tal como lo describen Ruiz, M y col (2017), en su investigación titulada “Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. sobre bacterias implicadas en enfermedades transmitidas por alimentos.” en donde se evaluó la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp frente a *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*, en esta investigación se consideró como prueba positiva halos de inhibición mayores a 1mm³; sin embargo, Pino, A (2023) en su investigación titulada “Evaluación de la Sinergia de la Actividad Antimicrobiana de Cepas de Bacterias Lácticas Contra Patógenos.” evaluó la capacidad inhibitoria de 7 cepas de bacterias lácticas contra patógenos bacterianos, entre ellas *E. coli* ATCC 25922, en dicha investigación se consideró como prueba positiva halos de inhibición mayores a 7 mm, y a los halos menores a 7 mm los consideró halos sin inhibición.

Durante la prueba de difusión en disco frente a *E. coli* spp se observó que el ECB seleccionado previamente de la cepa O4 más EDTA presentó mayor capacidad inhibitoria con halos de 18 mm, estos resultados son similares a los obtenidos por Wenping, L y col (2022), en su investigación titulada “Purificación parcial y aplicación de una bacteriocina producida por el probiótico *Lactococcus lactis* C15

aislado de leche cruda.” en donde el extracto de bacteriocina tuvo una inhibición en halos menores a 13 mm, sin embargo los resultados tuvieron un aumento significativo en su capacidad inhibitoria al adicionar Urea o como agente EDTA, lo que permitió obtener halos mayores a 16 mm.

Para la identificación molecular de la cepa aislada O4, que presentó mayor capacidad de inhibición, se uso el análisis del gen 16S ARNr con la finalidad de conocer con certeza que especie de BAL se aisló del yogurt con probiótico, la especie encontrada fue *Lactobacillus rhamnosus*, esto concuerda con la descripción brindada en los yogures con probiótico que fueron usados en esta investigación, tal como lo describe Ramírez, C (2016), donde logró aislar y caracterizar 5 cepas de BAL entre ellas *Lactobacillus rhamnosus*, en muestras lácticas que poseen potencial probiótico.

Para determinar la capacidad inhibitoria de los distintos tratamientos en leche cruda se empleó la técnica de conteo en placas para aerobios mesófilos y NMP para coliformes totales, la leche debe cumplir los siguientes parámetros: Límites máximos/mL de 10^6 aerobios mesófilos y 10^3 coliformes según el Decreto Supremo N° 007-2017(Artículo 9), presentando capacidad inhibitoria, tal como los describe Svetoslav, D y col (2018) en su trabajo titulado “ Efecto combinado de la bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* S8SH y vancomicina, el própolis o el EDTA para controlar el desarrollo del biofilm producido por *Listeria monocytogene.*”, en esta investigación se sometió individualmente y en combinaciones, permitiendo así describir que las bactericonas más EDTA presenta mayor grado inhibitorio, si bien no fue inoculado en un alimento, permitió tener indicios de efectividad combinando ambos conservantes, además Ormaza, E (2018) en su investigación titulada “Evaluación del efecto conservante de nisina y EDTA sobre *E. coli* en quesos fresco” evaluó distintos

tratamientos para determinar su capacidad inhibitoria, donde describió que ambos conservantes combinados tienen mayor efecto contra *E. coli*.

En el recuento de aerobios mesófilos la prueba de normalidad demostró que los datos poseen una distribución normal por lo que se aplicó la prueba de modelo lineal univariado por bloques aleatorios seguido de una prueba pos hoc de HDS Tukey. Se observó que el T3 pertenece al mismo subconjunto homogéneo del TC por lo que se asume que tienen la misma efectividad, esto se observa claramente en la Figura 2, en el día 1 presenta mayor inhibición, en el día 3 esta dentro de los parámetros aceptados por la normativa sanitaria nacional vigente, sin embargo en el día 6 excede de los parámetros permisibles, en el NMP de coliformes totales los datos no poseen una distribución normal, es por ello que no se aplica el modelo lineal univariable de bloques aleatorios, esto concuerda con los resultados obtenidos por Arroyo, O y Vázquez, D(2018) en su investigación “Efecto de nitrato/nitrito sobre la supervivencia de la flora microbiana en leche cruda”, el cual evaluó el efecto de la adición de nitrato/nitrito en leche cruda en dos concentraciones sobre el crecimiento de coliformes totales, mesófilos, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* en distintos tiempos (0, 1, 3 y 5 horas) , determinó que hubo una reducción poblacional de microorganismos ya mencionados en las primeras 3 horas, además la técnica que se usó en esta investigación fue adicionar en el medio selectivo las cantidades de nitratos para determinar su capacidad de inhibición.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se determinó la eficiencia de la combinación de bacteriocina con EDTA mejorando la calidad microbiológica en la leche que esta destinada a la elaboración de productos lácteos en Cajamarca – Perú.

Se logró producir extracto crudo de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas provenientes de yogures con probióticos de marcas comerciales.

De los 3 tratamientos se determinó que el Tratamiento 3 (50 ppm BTC + 75 ppm EDTA) tuvo mayor capacidad inhibitoria en la leche cruda en los primeros 3 días de inoculación.

5.2. Recomendaciones

Para próximas investigaciones se recomienda cuantificar y purificar las bacteriocinas con el fin de seleccionar potentes inhibidores contra otros microorganismos indicadores de contaminación en alimentos como *E.coli*.

Buscar otras alternativas de combinación con conservantes sintéticos para mejorar su potencial inhibitorio en diferentes alimentos y no solamente en leche, que puedan ser aprovechados por la población de la región.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abee, T., L. Krockel y C. Hill. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.

Adams, M. R., O, M. M. & McClure, P. J., (2015). *Food Microbiology*. Cuarta ed. Great Britain: Royal Society of Chemistry

Aguado, A., Álvarez, Y., Ponce, E. (2014). “Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica”. *NACAMEH* Vol. 4, No. 2, pp. 69-84.

Agudelo, N., Mabel, M., Torres, T., Alvarez, C. (2015) ‘Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas’, *ContactoS*, 73(36), pp. 63–72.\

Andrews, J., (2001). “Determination of minimum inhibitory concentrations” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48: Pag: 5-16.

Arquéz, J., (2003) “Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos”. Universidad Complutense de Madrid.

Arroyo, O y Vázquez, D., (2018) “Efectos de nitrato/nitrito sobre la supervivencia de la flora microbiana en leche cruda”. Universidad Autónoma del Estado de México.

Celis, M. y Juárez, D., (2009). Microbiología de la Leche. Bahía Blanca, Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional

Cock, L., y Stouvenel, A. (2007). Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultura Técnica (Chile)*, 67(1), 29-38

Colugna, Z. (2019) Efecto de la nisina en la vida útil de yogurt frutado con probióticos. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Trujillo.

Cubero, N., Monferrer, A., y Villalta, J. (2002). Aditivos alimentarios. Ediciones mundiprensa. Colección tecnología de alimentos.

Cuellar, F.(2015) “Actividad biológica de bacteriocinas sobre el enquistamiento de *Entamoeba histolytica* HM1 IMSS y características nanomecánicas de la superficie celular al microscopio de fuerza atómica”. Universidad Autónoma de Nuevo León.

DeMan, J y col., (1972). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135.

Denoya, G y col., (2012). “Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas”. *Revista de investigaciones agropecuarias* 38 (3): 263-267.

EFSA. (2019). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 10: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2019. EFSAJ. 17.

Erkmen, O. & Bozoglu, T. F., (2016). Food Microbiology: Principles Into Practice, 2 Volume Set. Noida, India: John Wiley & Sons

Estrada,A., Gutiérrez, L. y Montoya, O. (2005). “Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de Lactobacillus sp. contra Salmonella sp y Escherichia coli” Rev Fac Nal Agr Medellín 58: 2601-9.

Geeta, S. y Mehrotra, R. S., (2009). Principles of microbiology. s.l.:McGraw-Hill.

Gould, G.W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. J. Food Protect. Supplement: 82-86.)

Grande, M., Lucas, R., López, M., Pérez, R., y Gálvez, A. (2011). Bioconservación de alimentos cárnicos. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Orinetal. 24, 111–123.

Infantes, Z. (2015). Últimas investigaciones utilizando tratamientos químicos para conservación de frutas mínimamente procesadas. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Trujillo.

Joerger, R. (2003) 'Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages', in Poultry Science. Poultry Science Association, pp. 640–647.

Journal of Medicinal Chemistry. 143, 922- 935.

Kandler, O. y Weiss, N. (1992) Bergey's Manual of systematic bacteriology. Decima ed, Baltimore, USA.

Klenhamer, T (1993). Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria FEMS Microbiol Rev. 12: 39-86.

Kumariya, R., Garsa, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., y Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. Microbial Pathogenesis.

López, M. J.; Ochoa, Z. A.; Santoyo, P. G.; Anaya, L. J.; Medina, M. E.; Martínez, T. M.; Loeza, L. P. (2008), Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 39(3): 49-57.

Mess, P., Guerrieri, E., Bondi, M., (2003) Bacteriocinlike substance (BLS) production in *Aeromonas hydrophila* water isolates. FEMS Microbiology Letters, 220, 121-125.

Moll, G. N., W. N. Konings y A. J. M. Driessen. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 76, 185-198.

Mondragón, P., Escalante, M., Osuna, C., Ibarra, J., y Morlett, C. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*; 21(59): 64- 70.

Morales, R y col., (2012). “Calidad bacteriológica de leche cruda de cabra producida en Miravalles, Puebla. *Rev. Mexicana de Química.* Vol. 11.

Motta, L., Bustamante, A., Medina, B. (2019) Análisis del recuento de la población bacteriana de muestras de leche no pasteurizada. *Sanid Milit Mex*, 72(3), pp 366-367.

Nes, I y col., (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70 (2) 113-128)

Ormaza, E (2018). “Evaluación del efecto conservante de nisina y EDTA sobre *Escherichia coli* en queso fresco”. Tesis de pregrado. Universidad de las Américas, Quito.

Pascual, A. y Calderón, V., (1999). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas.* 2a ed. Madrid: Diaz de Santos.

Pino, A. (2023). “Evaluación de la sinergia de la actividad antimicrobiana de cepas de Bacterias Lácticas contra patógenos”. *Revista Vet. Unlpam* vol. 25(1).

Pisoschi, A. y col., (2017). An overview of natural antimicrobials role in food. *European*

Ramírez, C y Vélez, J., (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Universidad de las Américas Puebla*. Vol.27(6), pp 115-128.

Ramírez, G y col., (2013). “Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas”. *Revista mexicana de ingeniería química*, vol.12(3), pp 463-471.

Ramos, B. y col., (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y ciencias* vol. 25.

Ramos, N., De Fátima, N., y Soares, F. (2005). Nisina: Um conservante natural para alimentos. *Revista Ceres (Brasil)*, 52(304), pp 921-938.

Revilla, A., (1982). *Tecnología de la leche. Procesamiento, manufactura y análisis*. Segunda ed. San. José, Costa Rica : IICA.

Rivera, J y col., (2017) Identificación de bacterias acidolácticas antagónicas de *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* aisladas de queso artesanal. *Rev Mex Ciencias Agrícolas* vol. 8(4), pp 785-797.

Rogosa, M. y col., (1951). A selective medium for the isolation of oral and faecal *Lactobacilli*. *Journal of Bacteriology*, 62, 132–133.

Ruiz, M y col., (2017) “Inhibitory capacity of *Lactobacillus* spp. against pathogens involved in foodborne diseases”. *Revista Argentina de Microbiología* vol. 49(2) pp 174-177.

Sánchez, M., y col. (2019) Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos, *Gaceta Médica de Bilbao*.

Sanger, F y Nicklen, S., (1977). Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*;74(12): 5463-7.

Soares, M. (2017). Desarrollo de nuevos productos alimenticios: incorporación de extractos de plantas como ingrediente funcional y conservantes naturales. Tesis doctoral. España: Universidad Complutense de Madrid.

Spencer, J. y Ragout, S. , (2001). *Food Microbiology Protocols*. s.l.: Human Press

Thomas, L., Clarkson, M., y Delves, J. (2000). Nisin; in Naidu AS (ed): *Natural Food Antimicrobial Systems*. Boca Raton, CRC Press, Pag. 463–524.

Valencia, V. (2020). “Determinación de la capacidad conservante de Bacterias ácido lácticas y mesófilas aplicadas en salami para evitar el uso de conservantes químicos”. Tesis de pregrado. Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.

Vanderzant, C. y Splittstoesser, D. (1992). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*. 3 ed. Washington, D. C. American Public Health Association Inc. (APHA). 1219 p.

Vázquez, C y col., (2011). *Técnicas básicas de Microbiología. Observacion de bacterias. Reduca Bilogía*, 3(5).

Villeda, J. (2010). “Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria”, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, p. 67. doi: 10.1007/s40415-014-0059-0.

Villegas, A., (2004). *Tecnología Quesera*. 1a ed. México: Trilladas.

Wenping, L. y col., (2022). “Parcial purification and application of a bacteriocin produced by probiotic *Lactococcus lactis* C15 isolated from raw milk”. *LWT* vol.169(1).

Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., y Coma, V. (2018). *Active packaging applications for food. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

Yousef, A. y Carlstrom, C. (2003). *Food microbiology: a laboratory manual*. United States of America: Hoboken, NJ: Wiley.

APÉNDICES

Apéndice N°1: Toma de muestra



Figura 5. Toma de muestra de yogurt con probiótico. Uso de cooler para su transporte hasta los laboratorios BIOMIC (A), selección de muestras (B).

Apéndice N°2: Aislamiento de BAL

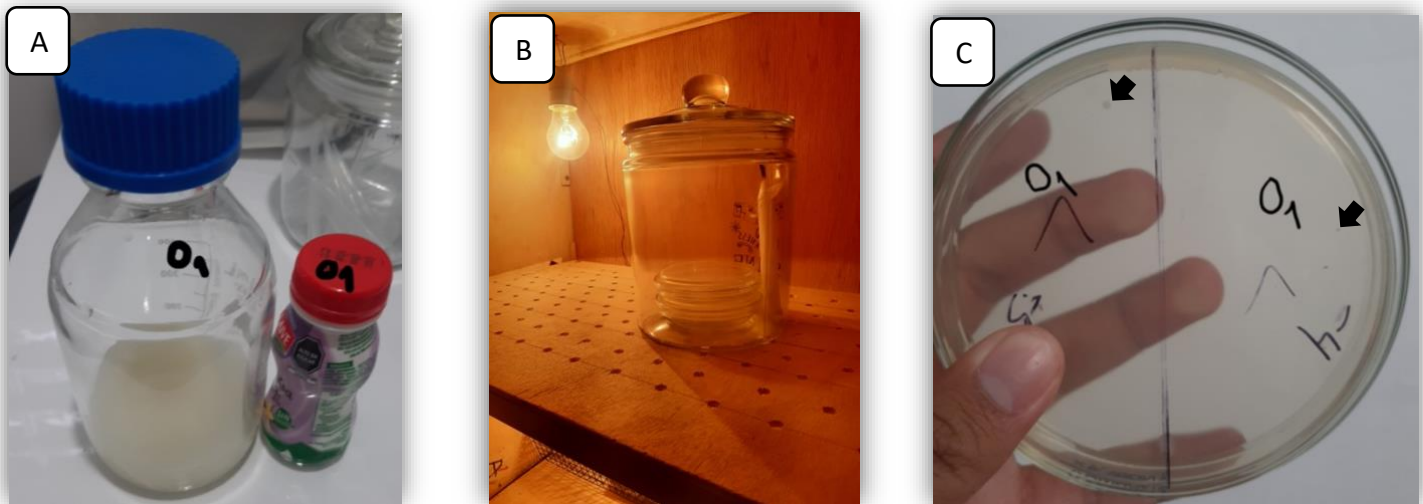


Figura 6. Aislamiento de bacterias ácido lácticas. Codificación de muestra (A), incubación de muestras (B), selección de las colonias de bacterias ácido lácticas (C).

**Apéndice N°3: Tinción Gram, Tinción de esporas y pruebas confirmativas para
BAL**

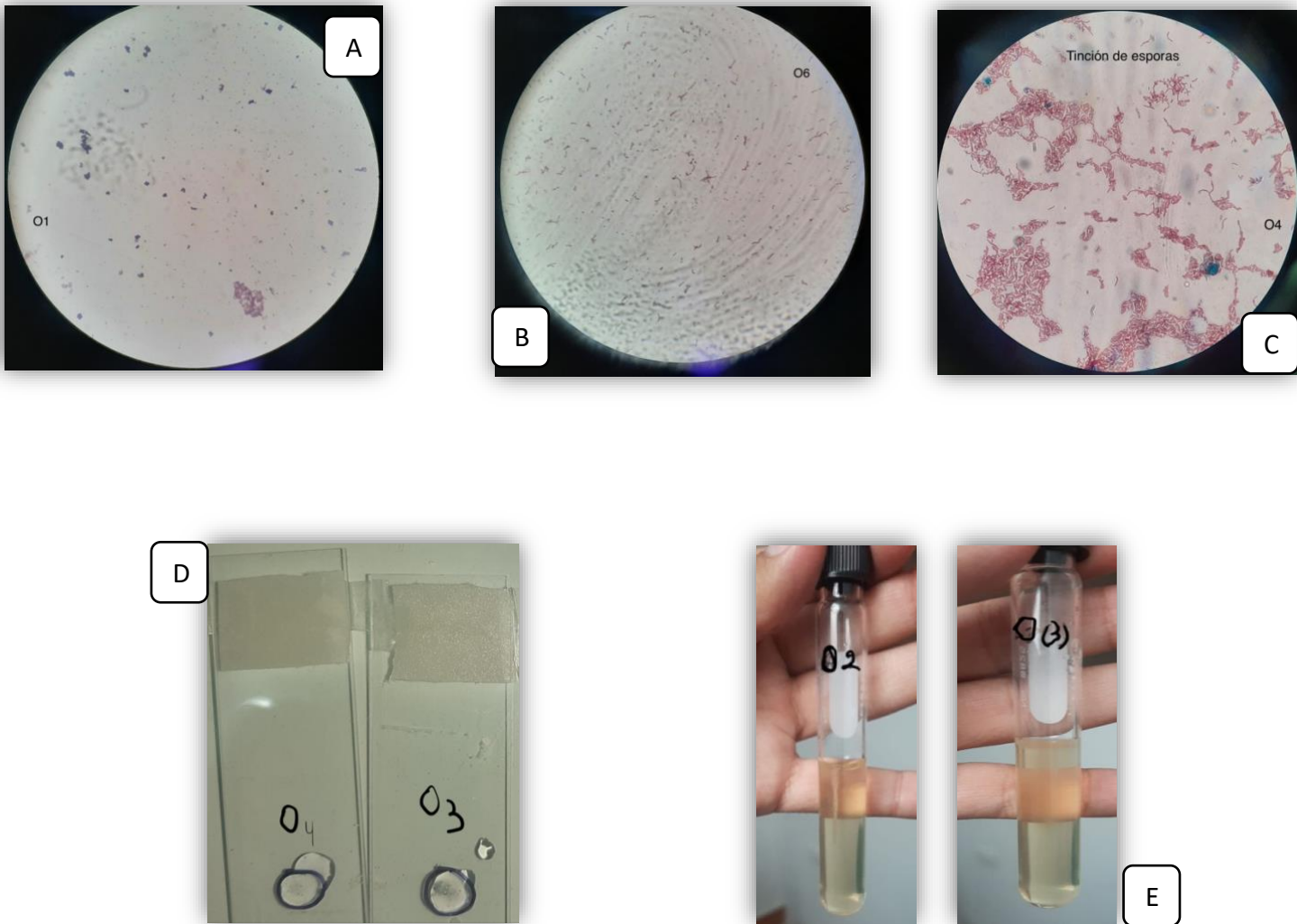


Figura 7. Pruebas para BAL. Tinción Gram de aislamiento O1(A), Tinción Gram de aislamiento O6 (B), Tinción de esporas de aislamiento O4 (C), prueba de catalasa y oxidasa de los aislamientos O3 y O4 (D), Prueba de motilidad en medio SIM del aislamiento O2 y O3 (E).

Apéndice N°4: Determinación cualitativa de proteínas

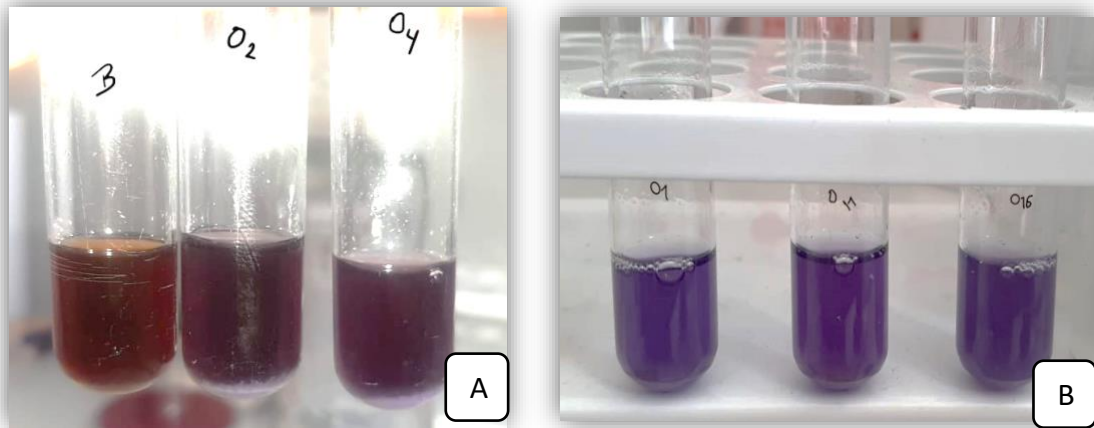


Figura 8. Prueba de Biuret para determinar cualitativamente proteínas. Tubo B usado como blanco conteniendo únicamente medio MRS, aislamientos en los tubos O2 y O4 (A). Aislamientos en los tubos O1, O11 y O16

Apéndice N° 5: Producción de bacteriocinas

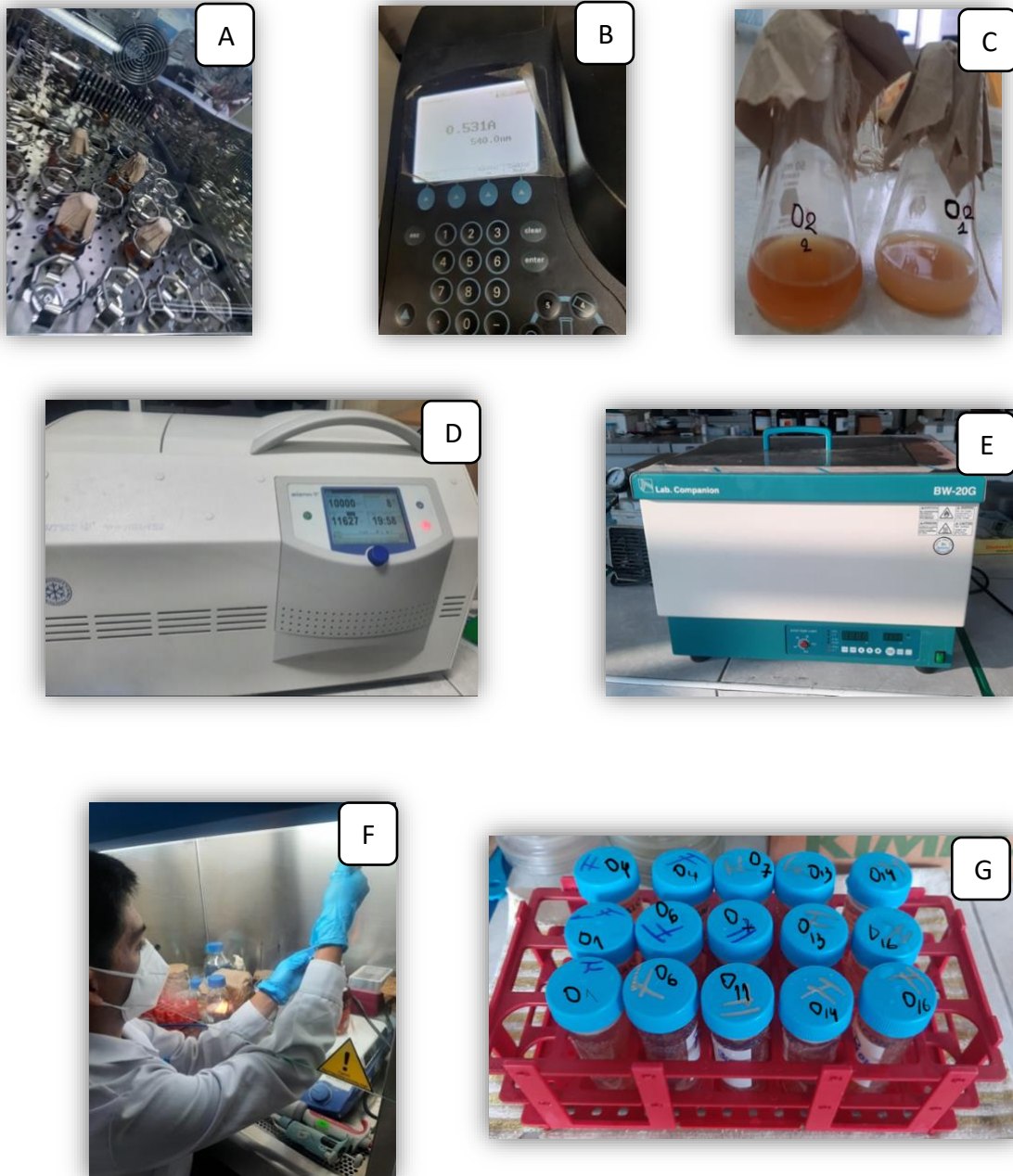


Figura 9. Producción de bacteriocinas. Reactivación de colonias en medio MRS en incubadora con agitación(A), calculo de inculo en el espectrofotómetro con resultado de 0,5 (B), inculo adicionado en matraces Erlenmeyer conteniendo medio MRS (C), centrifugación a 10 000 rpm durante 20 min (D), baño maría a 80 °C (E), regulación de pH (F), tubos de 50 mL con bacteriocinas producidas (G)

Apéndice N° 6: Actividad inhibitoria de bacteriocina frente a *E coli*.

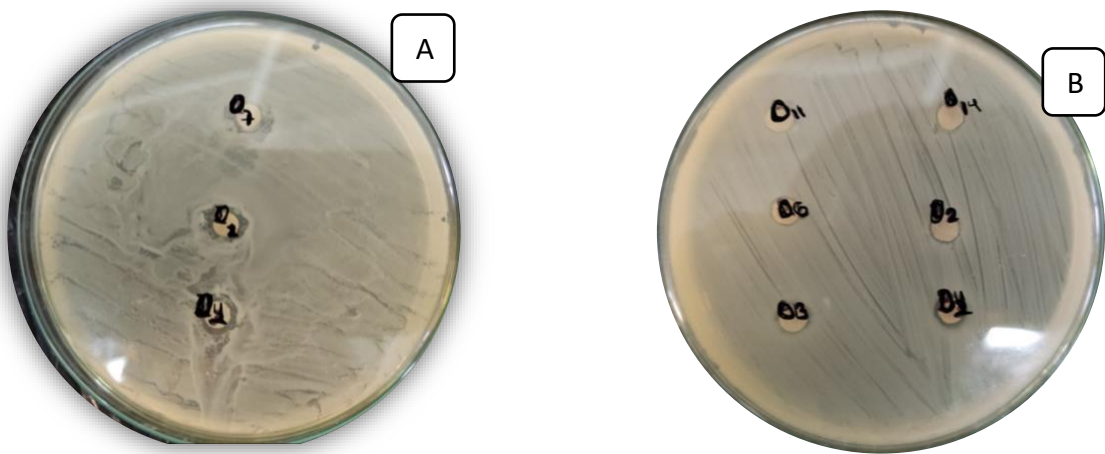


Figura 10. Actividad inhibitoria frente a *E coli*. Halos de inhibición O1, O4 y O7 contra el aislamiento de *E. coli* spp (A). Halos de inhibición O11, O14, O6, O2, O3, O4 contra el aislamiento de *E. coli* spp (A).

Apéndice N° 7: Actividad inhibitoria en diferentes concentraciones de bacteriocina más EDTA frente a *E coli*

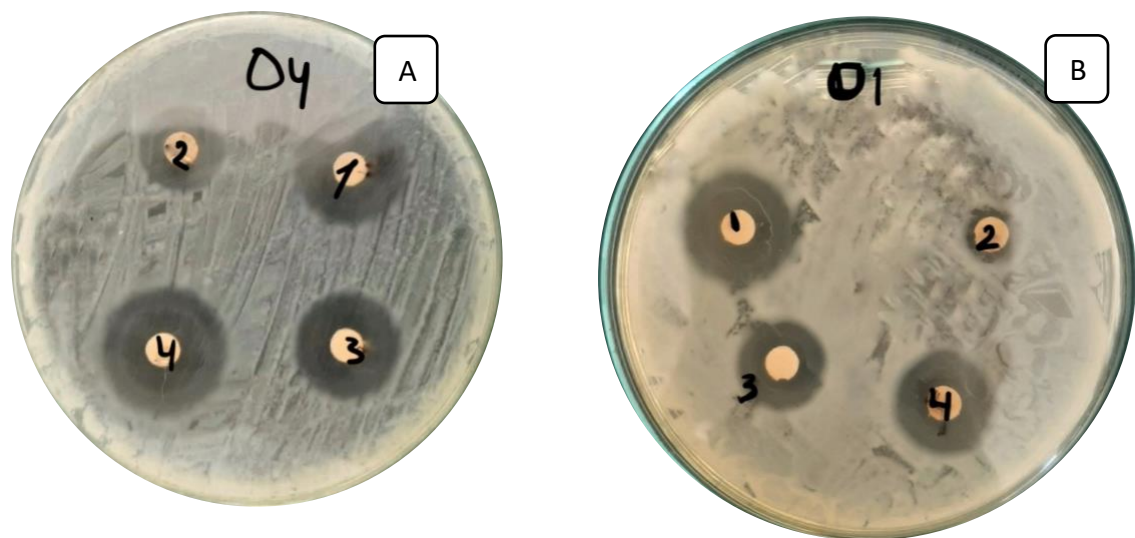


Figura 11. Actividad inhibitoria frente a *E coli*. Halos de inhibición del ECB de la cepa O4 contra el aislamiento de *E. coli* spp (A). Halos de inhibición del ECB de la cepa O1 contra el aislamiento de *E. coli* spp (B).

Apéndice N° 8: Tratamientos en leche cruda

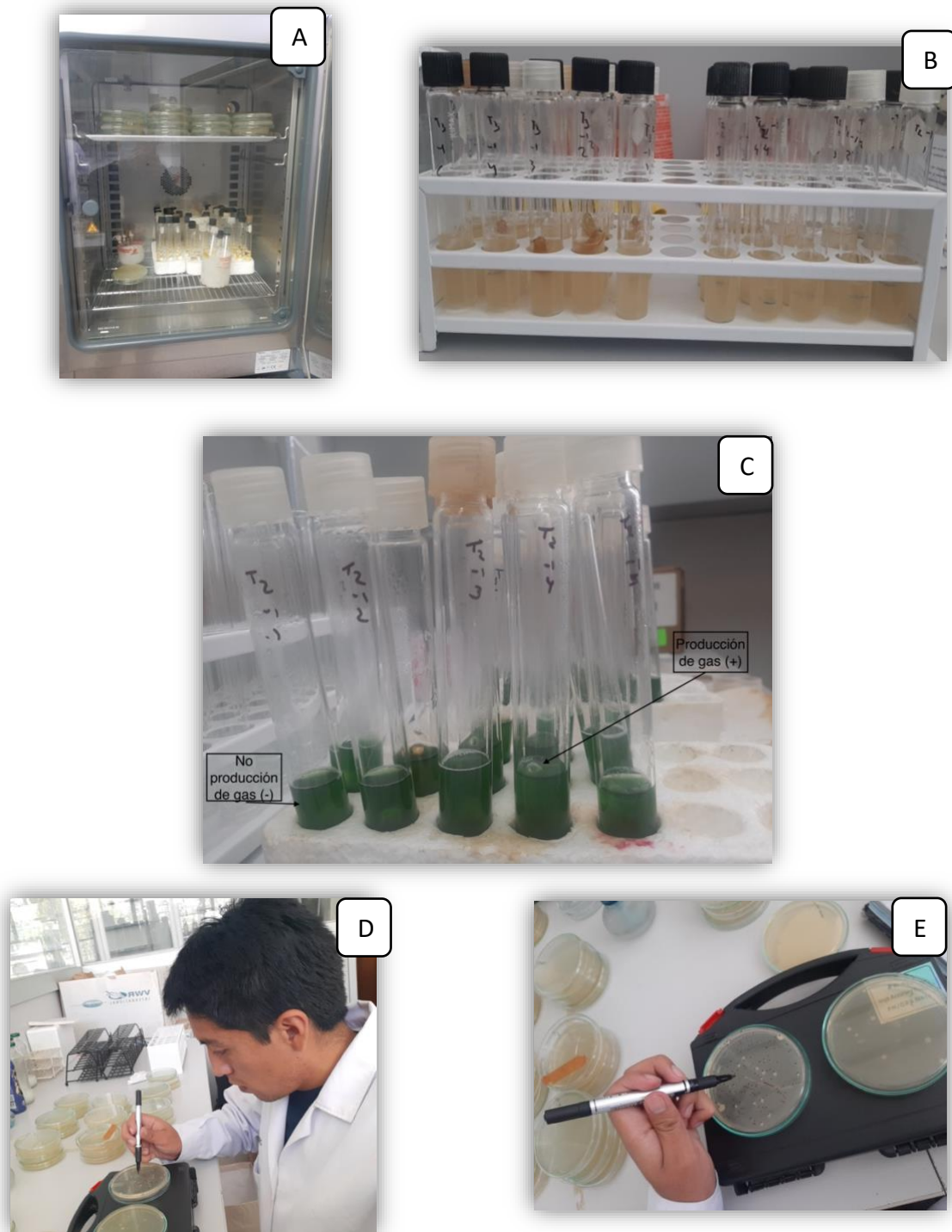


Figura 12. Incubación (A), prueba presuntiva para coliformes en caldo Lauril sulfato (B), prueba confirmativa para coliformes en caldo Brila (C), conteo de aerobios mesófilos en placa con medio PCA (D Y E).

ANEXOS

Anexo N° 1: Identificación molecular de Macrogen

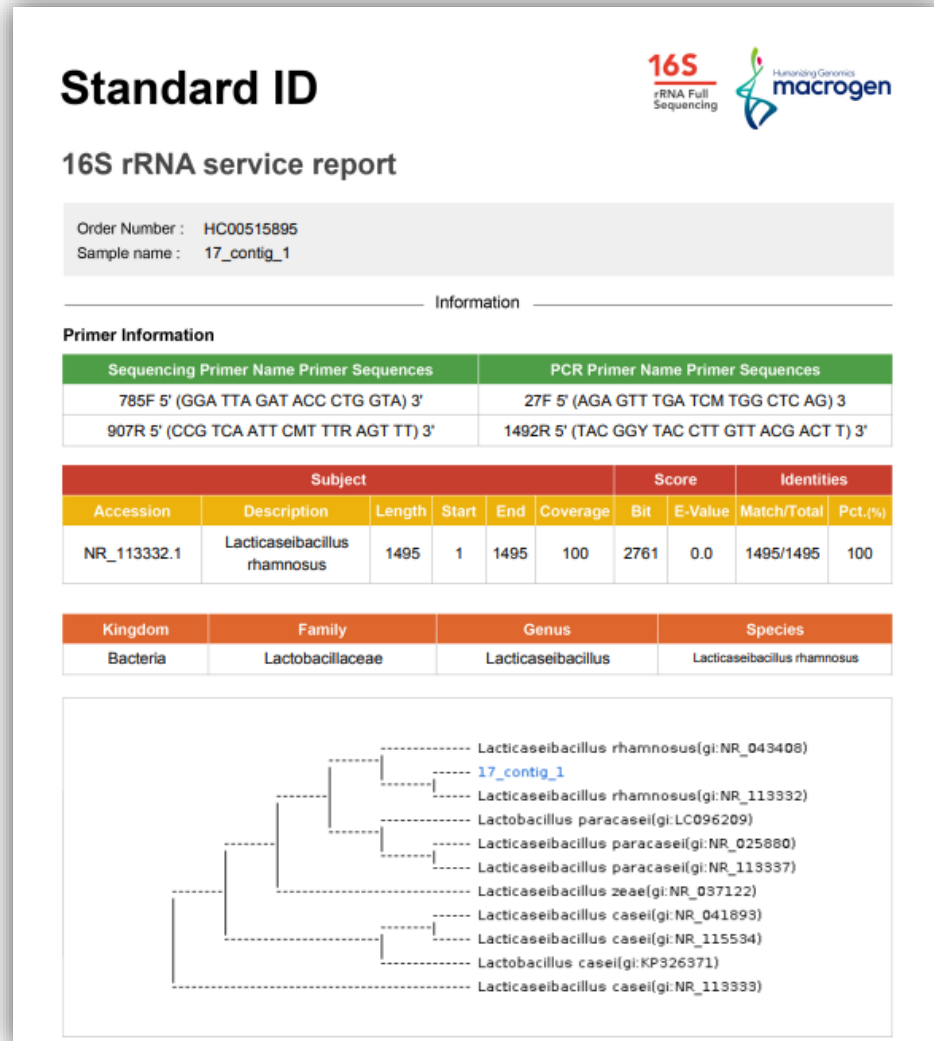


Figura 12. Reporte del aislamiento O4 – *Lactobacillus rhamnosus*

Anexo N°2: Escala de Duraffourd

ESCALA DE DURAFFOURD	
CATEGORIA	PUNTAJE (milímetros)
Nula (-)	≤ 8 mm
Sensible (+)	> 8 y ≤ 14 mm
Muy sensible (++)	> 14 y ≤ 20 mm
Sumamente sensible (+++)	> 20 mm

Anexo N°3: Conteo de aerobios mesófilos a través del tiempo (Log UFC/mL)

Tratamiento	Log UFC/mL											
	Día 0			Día 1			Día 3			Día 6		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Testigo	6,041	6,041	6,079	6,278	6,204	6,204	6,477	6,301	6,342	6,602	6,505	6,518
Control	5,079	5,000	5,000	4,900	4,954	4,800	5,200	5,041	5,041	5,845	5,903	5,875
Tratamiento 1	5,929	5,903	5,924	4,653	4,653	4,681	6,041	5,903	6,146	6,431	6,462	6,397
Tratamiento 2	5,886	5,857	5,863	4,778	4,763	4,724	6,000	6,954	5,949	6,176	6,079	6,176
Tratamiento 3	5,176	5,278	5,301	4,176	4,204	4,230	5,903	5,845	5,875	6,041	6,079	6,113

Anexo N°4: Conteo de coliformes totales a través de tiempo (Log UFC/mL).

Tratamiento	Log UFC/mL											
	Día 0			Día 1			Día 3			Día 6		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Testigo	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204
Control	2,342	2,342	2,342	2,230	2,230	2,230	2,690	2,690	2,690	3,204	3,204	3,204
Tratamiento 1	2,380	2,380	2,380	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204
Tratamiento 2	2,732	2,732	2,732	2,322	2,322	2,322	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204
Tratamiento 3	2,447	2,447	2,447	2,361	2,361	2,361	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204	3,204

Anexo N°5: Descripción estadística de los tratamientos para aerobios mesófilos y coliformes totales.

		Tratamiento	Estadístico			Tratamiento	Estadístico	
UFCmeso	Testigo		Media	6,2992	UFCcoli	Testigo	Media	3,2000
			Mediana	6,2900			Mediana	3,2000
			Varianza	0,0382			Varianza	0,0000
			Desviación estándar	0,1955			Desviación estándar	0,0000
	Tratamiento Control		Media	5,2200	Tratamiento Control		Media	2,6150
			Mediana	5,0400		Mediana	2,5150	
			Varianza	0,1662		Varianza	0,1559	
			Desviación estándar	0,4077		Desviación estándar	0,3949	
	Tratamiento 1		Media	5,7617	Tratamiento 1		Media	2,9950
			Mediana	5,9250		Mediana	3,2000	
			Varianza	0,4761		Varianza	0,1375	
			Desviación estándar	0,6900		Desviación estándar	0,3709	
Tratamiento 2		Media	5,7675	Tratamiento 2		Media	2,8625	
		Mediana	5,9200		Mediana	2,9650		
		Varianza	0,4585		Varianza	0,1472		
		Desviación estándar	0,6771		Desviación estándar	0,3836		
Tratamiento 3		Media	5,3525	Tratamiento 3		Media	2,8025	
		Mediana	5,5750		Mediana	2,8250		
		Varianza	0,5820		Varianza	0,1735		
		Desviación estándar	0,7629		Desviación estándar	0,4165		

Anexo N°6. Diseño de bloques aleatorios.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
Tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Testigo	Tratamiento Control	1,1516*	0,04236	0,000	1,0306	1,2726
	Tratamiento 1	,6916*	0,04236	0,000	0,5706	0,8126
	Tratamiento 2	,8213*	0,04236	0,000	0,7003	0,9423
	Tratamiento 3	1,0871*	0,04236	0,000	0,9661	1,2081
Tratamiento Control	Testigo	-1,1516*	0,04236	0,000	-1,2726	-1,0306
	Tratamiento 1	-,4600*	0,04236	0,000	-0,5810	-0,3390
	Tratamiento 2	-,3303*	0,04236	0,000	-0,4513	-0,2093
	Tratamiento 3	-0,0645	0,04236	0,555	-0,1855	0,0565
Tratamiento 1	Testigo	-,6916*	0,04236	0,000	-0,8126	-0,5706
	Tratamiento Control	,4600*	0,04236	0,000	0,3390	0,5810
	Tratamiento 2	,1297*	0,04236	0,030	0,0087	0,2507
	Tratamiento 3	,3955*	0,04236	0,000	0,2745	0,5165
Tratamiento 2	Testigo	-,8213*	0,04236	0,000	-0,9423	-0,7003
	Tratamiento Control	,3303*	0,04236	0,000	0,2093	0,4513
	Tratamiento 1	-,1297*	0,04236	0,030	-0,2507	-0,0087
	Tratamiento 3	,2658*	0,04236	0,000	0,1448	0,3868
Tratamiento 3	Testigo	-1,0871*	0,04236	0,000	-1,2081	-0,9661
	Tratamiento Control	0,0645	0,04236	0,555	-0,0565	0,1855
	Tratamiento 1	-,3955*	0,04236	0,000	-0,5165	-0,2745
	Tratamiento 2	-,2658*	0,04236	0,000	-0,3868	-0,1448