



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y PROBIÓTICAS DE
Lactobacillus spp. **AISLADOS DE LECHE DE CABRA (*Capra hircus*)**

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Br. María Trinidad Cerrada Contreras

C.I: 21181371

Tutor Académico:

MSc. José Manuel Jiménez

Mérida, Enero 2024



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y PROBIOTICAS DE
Lactobacillus spp. **AISLADOS DE LECHE DE CABRA (*Capra hircus*)**
(Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciada en
Bioanálisis)

Autor:

Br. María Trinidad Cerrada Contreras
C.I: 21181371

Tutor Académico:

MSc. José Manuel Jiménez

Mérida, Enero 2024

DEDICATORIA

Dedicar este trabajo y todo el recorrido en primer lugar a Dios, por bendecirme la vida, por ser mi guía a lo largo de este proceso y por ser mi apoyo y mi fortaleza en los momentos de debilidad.

A mis padres Gilberto Cerrada y Balbina Contreras, por su amor, su apoyo, su sacrificio, su entrega y su confianza sin juicio alguno para conmigo, este logro es de los tres y para mí es un orgullo y un privilegio ser su hija.

A mis hermanos Rensito y Gollito por siempre estar presente para mí, dedicarles este logro es poco comparado con todo el amor y el orgullo que siento de ser su hermana, pero es una alegría tan grande que quiero compartir con ustedes y hacerlos merecedores de este logro, celebrarlo juntos los tres como siempre hemos estado.

A mis sobrinos Juan Andresito, Juan Pablito y mi Viki hermosa, dios me los bendiga mis niños, quiero dedicarles también a ustedes esta dicha y que sean testigos que todo sacrificio por muy duro, difícil o el tiempo que se lleve, mientras seamos perseverante y con la mente fija en la meta valdrá la pena luchar para llegar al final, los amo con mi vida.

Por último, pero no por ello menos importante dedicar este logro a todas las personas que de una u otra manera me han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito; familia, amigos, profesores este logro también es de ustedes.

AGRADECIMIENTO

Al finalizar este trabajo investigativo quiero agradecer principalmente a Dios y a la Virgen del Carmen, por ser ese motor en mi vida, por darme las fuerzas necesarias para continuar y concluir este proceso el cual fue de sacrificios, de lucha, que en tiempos difíciles donde para nadie es un secreto el esfuerzo fue aún mayor, pero hoy en día y haciendo una retrospectiva ha valido completamente la pena obtener uno de los anhelos más deseados; ¡Gracias Diosito y Virgencita del Carmen!

Agradecer a mis padres Gilberto y Balbina los dos seres más importantes en mi vida, a los cuales les debo tanto que la vida no me alcanzará para retribuirles todo; amor, valores, paciencia, consejos, apoyo incondicional, es más mis palabras se quedan cortas, simplemente Gracias papitos los amo con todo mi corazón.

Quiero hacer un paréntesis muy especial y agradecer también a las personas que hoy ya no están en mi vida, pero que fueron parte fundamental durante todo el trayecto de mi carrera y el paso por esta ilustre casa de estudio, años de amor, de entrega, de apoyo que, aunque hoy lamentablemente no los tenga para celebrar juntos este logro sepan donde quiera que se encuentre que en mi corazón guardan un lugar muy especial y solo existe agradecimiento.

Mil gracias...

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.	4
EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcance y Limitaciones de la Investigación	8
CAPÍTULO II.	9
MARCO TEÓRICO.	9
Trabajos previos	9
Antecedentes históricos	20

Bases teóricas	21
Los Mamíferos.	21
Animales Lecheros.	21
Las cabras.	22
La leche.	25
La leche de cabra.	29
La microbiota de leche de cabra	31
Las Bacterias Ácido Lácticas	33
El género <i>Lactobacillus</i>	36
Hipótesis	38
CAPÍTULO III.	39
MARCO METODOLÓGICO.	39
Tipo de Investigación	39
Diseño de Investigación	39
Población y Muestra	40
Sistema de Variables	40
Materiales y Métodos	40
Procedimientos de la investigación	40
Diseño de Análisis.	50
CAPÍTULO IV.	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51

RESULTADOS	51
DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO V.	78
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	80

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Datos analíticos y fisiológicos sobre las diferentes clases de leches.....	28
Tabla 3.	Pruebas fisiológicas y bioquímicas desarrolladas para evaluar la capacidad tecnológica de los aislados obtenidos de leche de cabra.....	52
Tabla 4.	Actividad antagónica de los aislados en estudio frente a bacterias patógenas.....	68
Tabla 5.	Actividad antagónica de los aislados en estudio frente a bacterias patógenas según el número de monitores biológicos implicados en un tipo de inhibición.....	69
Tabla 6.	Compendio de pruebas tecnológicas y probióticas de los tres aislados seleccionados para la identificación bioquímica.....	70
Tabla 7.	Identificación bioquímica de los aislados seleccionados.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución original o histórica de <i>C. hircus</i> (doméstica)...	25
Figura 2.	Composición general de la leche de diferentes especies animales.....	27
Figura 3.	Árbol filogenético de los géneros de bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16S	35
Figura 4.	a) Proceso de acondicionamiento de material, preparación de medios y esterilización. b) Aislamiento y selección de los posibles aislados de <i>Lactobacillus</i> para para las pruebas.....	42
Figura 5.	Tipo de fermentación en agar M5 mejorado presentado por los aislados.	44
Figura 6.	Actividad proteolítica de los aislados en agar Plate Count suplementado con leche descremada al 1%.....	45
Figura 7.	Actividad enzimática de la celulasa producida por los aislados en un medio rico agarizado suplementado con Carboximetilcelulosa (CMC)	46

	Procedimiento para la identificación bioquímica de los	
Figura 8.	aislados	
	seleccionados.....	50
Figura 9.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 2 en caldo MRS pH 6,5.....	53
Figura 10.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 3 en caldo MRS pH 6,5.....	54
Figura 11.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 5 en caldo MRS pH 6,5.....	54
Figura 12.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 6 en caldo MRS pH 6,5.....	55
Figura 13.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 8 en caldo MRS pH 6,5.....	55
Figura 14.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 10 en caldo MRS pH 6,5.....	56
Figura 15.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 11 en caldo MRS pH 6,5.....	56
Figura 16.	Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas	
	para el aislado 15 en caldo MRS pH 6,5.....	57
Figura 17.	Curva de crecimiento del aislado 2 en caldo MRS	
	ajustados a pH 2, 3 y 4.	58

Figura 18.	Curva de crecimiento del aislado 3 n caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	59
Figura 19.	Curva de crecimiento del aislado 5 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	59
Figura 20.	Curva de crecimiento del aislado 6 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	60
Figura 21.	Curva de crecimiento del aislado 8 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	60
Figura 22.	Curva de crecimiento del aislado 10 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	61
Figura 23.	Curva de crecimiento del aislado 11 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	61
Figura 24.	Curva de crecimiento del aislado 15 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.	62
Figura 25.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 2 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	63
Figura 26.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 3 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	64

Figura 27.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 8 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	64
Figura 28.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 6 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	65
Figura 29.	: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 8 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	65
Figura 30.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 10 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	66
Figura 31.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 11 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	66
Figura 32.	Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 15 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0.1%, 0,15% y 0,30%.....	67



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE
FARMACIA Y BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA
MÉRIDA-VENEZUELA



**PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y PROBIÓTICAS DE *Lactobacillus* spp.
AISLADOS DE LECHE DE CABRA (*Capra hircus*)**

Autor: Br. María Trinidad Cerrada Contreras

Tutor: MSc. José Manuel Jiménez

RESUMEN

La leche es el alimento de los mamíferos recién nacidos durante la etapa temprana de desarrollo rápido y contiene los nutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo. Uno de los géneros más abundantes en la leche es *Lactobacillus*, bacterias fermentadoras ampliamente reconocidas por contribuir con la digestión, así como el fortalecimiento del sistema inmune y la protección contra posibles patógenos. En nuestro país no se encuentran disponibles publicaciones acerca de la presencia de Lactobacilos en leche de cabra, de allí que el objetivo de esta investigación fue demostrar la presencia de *Lactobacillus* spp. con interés tecnológico y probiótico en leche de cabra obtenidas de un expendio de la ciudad de Mérida. Se analizaron cinco muestras de leche, de las cuales se aislaron 89 colonias, morfológicamente 23 (25%) correspondieron a cocos Gram positivos y 66 (75%) fueron bacilos y cocobacilos Gram positivos; de estas se seleccionaron al azar 16 aislados, siendo 50% bacilos y 50% cocobacilos. Del estudio de fermentación y producción de metabolitos de interés el 25% resultaron productoras de gas, 25% presentaron fermentación heteroláctica, 62,5% mostraron actividad proteolítica y 50% actividad celulolítica. Se determinó la capacidad probiótica de 8 aislados, realizando curvas de crecimiento en medio MRS ajustado a diferentes pH y suplementado con diferentes concentraciones de sales biliares; así como, la actividad antagónica sobre bacterias patógenas de interés. Se identificaron bioquímicamente 3 de las cepas con mejor potencial tecnológico y probiótico, resultando en: cepa 5 *Lactobacillus plantarum* 2, cepa 6 *Lactobacillus paracasei* ssp y cepa 8 *Lactobacillus acidophilus*. Se concluye que la leche de cabra posee bacterias del género *Lactobacillus* con potencial tecnológico y probiótico.

Palabras clave: Cabra, Leche, Lactobacilos, probiótico, fermentación.

INTRODUCCIÓN

La leche es el alimento de los mamíferos recién nacidos, es el único alimento durante la etapa temprana de desarrollo rápido y como tal contiene los nutrientes, requeridos para el crecimiento y desarrollo, siendo considerado una fuente nutritiva, no superada por ningún otro alimento conocido por el ser humano (Clark y Mora, 2017). Además del componente nutricional, la leche confiere otros beneficios a la cría, contiene moléculas antimicrobianas y anticuerpos capaces de erradicar microorganismos y generar inmunidad contra posibles patógenos (Heredia-Castro, 2017). Por otra parte, la presencia de microorganismos en la leche contribuye a la colonización de bacterias benéficas, fundamentales para el metabolismo durante todas las fases de la vida (Hernández, 2021).

A lo largo de la historia evolutiva, microorganismos y organismos multicelulares han convivido y desarrollado relaciones tan estrechas como es el caso de la microbiota en mamíferos. Estos holobiontes con dietas tan variadas que van desde peces a insectos, de frutas a otros mamíferos, han logrado diversificarse y colonizar la gran mayoría de nichos disponibles en este planeta y esto se debe, en parte a la relación simbiótica que tienen con microorganismos (Smith, McCoy y Macpherson, 2007).

Años atrás, se pensaba que la leche era estéril o carente totalmente de microorganismos, hoy en día se reconoce que posee un gran espectro de bacterias comensales, mutualistas y probióticos que se alojan en los tejidos de

la cría, especialmente el intestino (Fernández, Martín, Maldonado, Jiménez, Martín y Rodríguez, 2013). Desde que apareció el interés por conocer cómo las bacterias llegan a la leche y su lugar de origen, se estableció que la microbiota asociada del intestino guarda una estrecha relación con la microbiota de la leche, ya que las bacterias presentes en la leche coinciden con las que se encuentran habitualmente en el epitelio intestinal de la madre (Fernández *et al.*, 2013) y esta podría verse influenciada por el tipo de alimentos que consume, la dieta, el entorno y los hábitos que tiene el animal (Muletz-Wolz, Kurata, Himschoot, Wenker, Quinn, Hinde, *et al.*, 2019).

Así pues, al intestino de la hembra gestante llegan células dendríticas y macrófagos que atraviesan el epitelio intestinal hasta el lumen. Allí fagocitan los microorganismos que serán transportados a través del torrente sanguíneo hasta los diferentes nódulos linfáticos (Fernández *et al.*, 2013). De estos centros de alta actividad inmunológica, estas células transportan las bacterias a diferentes tejidos del cuerpo como el tracto respiratorio, glándulas salivares y por supuesto, a las glándulas mamarias (Greer, 2019). Este mecanismo estudiado en mamíferos ha demostrado su importancia en el establecimiento de la microbiota, especialmente la intestinal desde edad temprana y en el desarrollo del sistema inmune (Muletz-Wolz *et al.*, 2019).

En los humanos jóvenes después del destete, la leche de vaca, juega un papel importante en la dieta proporcionando grasa para energía, proteínas para desarrollo muscular y minerales para el desarrollo óseo. Mientras que, en

el adulto son los productos derivados de la leche los que adquieren mayor importancia como constituyentes de una dieta nutricionalmente equilibrada (Robinson, 2016). La leche comercial procede habitualmente de vacas, ovejas, cabras y búfalas. No obstante, la denominación genérica de leche se aplica única y exclusivamente a la leche natural de vaca. La leche producida por otras hembras de animales domésticos se designa indicando además el nombre de la especie correspondiente: leche de cabra, leche de oveja, de búfala, entre otros (Muletz-Wolz *et al.*, 2019).

Uno de los géneros más abundantes en la leche de vaca es *Lactobacillus*, es ampliamente reconocido que estas bacterias fermentadoras contribuyen a la digestión de algunos de los componentes presentes en la leche, así como en el fortalecimiento del sistema inmune y la protección contra posibles patógenos, características que les han permitido ser reconocidos como microorganismos probióticos (Petrullo, Jorgensen, Snyder-Mackler, y Lu, 2019; Kambe, Sasaki, Inoue, Tomonaga, Kinjo, Watanabe, *et al.*, 2020).

Numerosos trabajos se han desarrollado para la búsqueda y caracterización de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y particularmente lactobacilos en diversos nichos ecológicos, sin embargo, en nuestro país no se encuentran disponibles publicaciones acerca de lactobacilos en leche de cabra.

CAPÍTULO I

El Problema

Planteamiento del problema

Desde la antigüedad, la leche de diferentes especies de rumiantes, directamente o en forma de productos derivados, han constituido un alimento de singular importancia para el ser humano durante toda su vida, siendo el ganado vacuno el principal proveedor (Muletz-Wolz *et al.*, 2019). Para suplir la alta demanda de tan preciado alimento, la industria del ganado vacuno ha incurrido en la sobre explotación, que genera una alta emisión de gases, los cuales son liberados a la atmosfera provocando apremiantes repercusiones sobre el calentamiento global y por ende en la salud del planeta (FAO 2019; Gerber *et al.*, 2013).

Por otro lado, desde el punto de vista de la salud humana, actualmente toma más fuerza el reconocimiento de los efectos nocivos del consumo de leche de vaca, observándose el incremento de casos de pacientes con intolerancia a la lactosa, alergias a las proteínas de la leche, inflamación intestinal y la permeabilidad intestinal asociada al consumo de lácteos y gluten, así como su relación con enfermedades neurodegenerativas y con el cáncer. (Mittu y Girdhar, 2015; Park y Haenlein, 2017).

Distintos estudios plantean el uso de leches de mamíferos para contribuir con la demanda nutricional mundial. De allí que otras especies de rumiantes,

como los caprinos se conviertan en opciones de producción alternativa para mitigar el impacto ambiental (Arora, Bhojak y Joshi, 2013), así como fuente de nuevas especies de bacterias con potenciales probióticas y tecnológicos que contribuyan a fortalecer la industria de los alimentos y la salud.

Justificación

La ganadería caprina es una industria de rentabilidad e importancia creciente. Tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados se presenta un continuo crecimiento de la demanda de sus productos, por razones medicinales (Kumar, Yadav, Kumar, Seth y Kumar, 2016; Park y Haenlein, 2017), nutricionales (Arora *et al.*, 2013), ambientales (Csapóné y Csapó, 2019) y culinarias (Ribeiro y Ribeiro, 2010). Se espera que para 2030 haya un incremento entre el 30% y 50% en la producción lechera, continuando la tendencia que se presenta desde 1960 (Pulina Milán, Lavín, Theodoridis, Morin, Capote, *et al.*, 2018; FDA, 2021). En términos de animales rumiantes, las cabras presentan mejores niveles de producción en ambientes adversos con altas temperaturas y poca cantidad de agua (Kumar *et al.* 2016, FAO 2016; Csapóné y Csapó, 2019). Además, emiten una menor cantidad de metano frente a otros animales de producción (Koluman y Silanikove, 2018) y su leche posee valor nutricional comparable a la del ganado vacuno (Arora, Bhojak y Joshi, 2013). En comparación con otros animales de producción, el sector caprino recibe menor inversión económica e interés académico (Dubeuf, Morand-Fehr, y Rubino, 2004).

En los últimos años ha ganado un gran interés el estudio de los microorganismos que coexisten con el ser humano y las funciones que cumplen dentro del holobionte, llegando a demostrar que un gran número de ellos producen efectos benéficos y protectores y que su desequilibrio genera susceptibilidad frente a los microorganismos patógenos externos y a los patógenos oportunistas que se encuentran biorregulados en las biopelículas dispuestas en las diferentes áreas anatómicas del individuo. Se reconoce que el proceso de colonización del holobionte comienza dentro del seno materno, continua en el parto y se complementa con la lactancia; en el caso de la leche de cabra que es reconocida como un alimento con numerosos beneficios, en comparación con la leche de vaca, muchos de los beneficios, se encuentran en un nivel de evidencia anecdótica sin suficientes estudios y publicaciones que los respalden y faciliten su divulgación, aunado a esto, el mercado de los productos derivados de la leche de cabra se encuentra en ascenso en muchas partes del país, esto se puede evidenciar en las ferias ganaderas realizadas en el país (FAO 2022). Numerosos trabajos se han desarrollado para la búsqueda y caracterización de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) y particularmente lactobacilos en diversos nichos ecológicos, sin embargo, en nuestro país no se encuentran disponibles publicaciones acerca de lactobacilos en leche de cabra, de allí que surge la interrogante ¿La leche de cabra comercializada por fincas de la ciudad de Mérida poseen bacterias del género *Lactobacillus* con características probióticas y tecnológicas de interés?

Objetivos de la Investigación.

Objetivo General

Demostrar la presencia de bacterias ácido-lácticas con capacidad tecnológica y potencial probiótico en leche de cabra que se expenden en la ciudad de Mérida.

Objetivos Específicos

- Seleccionar aislamientos de bacterias ácido-lácticas a partir de leche de cabra.
- Caracterizar bioquímicamente mediante pruebas de fermentación de azúcares las bacterias ácido-lácticas seleccionadas.
- Probar el potencial tecnológico de las bacterias ácido-lácticas seleccionadas a través de pruebas de fermentación y producción de metabolitos de interés, como proteasas y celulasas.
- Comprobar el potencial probiótico de las bacterias ácido-lácticas seleccionadas mediante pruebas de sobrevivencia a ácidos y sales biliares, así como el antagonismo sobre bacterias de referencia internacional.

Alcance y Limitaciones de la Investigación.

Alcance de la investigación.

El hallazgo de nuevas especies de BAL con potencial tecnológico y probiótico contribuirá al fortalecimiento de la industria lechera caprina en el mercado nacional, disminuyendo la dependencia en la importación de cultivos iniciadores.

Limitaciones de la investigación

Los costos de análisis de las muestras y la disponibilidad de medios de cultivos, aunado a las fallas en los servicios de agua y electricidad, influyeron en el desarrollo de esta investigación en el lapso programado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Gantner, Mijić, Baban, Škrtić y Turalija (2015). En su trabajo “La composición general y grasa de la leche de varias especies” brindan una descripción general de la composición general de la leche y la grasa de diferentes especies en comparación con la leche de las mujeres, encontrando diferencias notables en el contenido de energía, grasa, lactosa, proteínas y cenizas de las distintas leches, y detectaron algunas similitudes entre la leche de rumiantes y no rumiantes. Las estructuras de las membranas de los glóbulos de grasa fueron similares entre los no rumiantes y las leches de mujeres, mientras que la estructura de los glóbulos de grasa de la leche en los rumiantes difería significativamente. Esta revisión indica que la leche de no rumiantes podría ser más adecuada para la alimentación humana que la leche de rumiantes.

Khattab, Guirguis, Tawfik, y Farag (2019), revisaron los recientes avances biotecnológicos para acelerar el proceso de maduración y la producción de compuestos de sabor asociados, describiendo las diferentes metodologías de evaluación, tanto sensoriales como modernas plataformas analíticas de perfiles, sus respectivas aplicaciones. Encontrando que la evaluación de la

maduración del queso es un proceso tan desafiante, que justifica el uso de métodos para estudiar la multitud de cambios bioquímicos que ocurren durante este proceso. Planteando la exploración de cócteles de enzimas encapsuladas y cultivos adjuntos atenuados mixtos, como el principal desafío tecnológico en estos procesos destinados a la mejora del sabor y la aceleración de la maduración en la industria del queso.

Haenlein, (2004). Realizó una revisión de la literatura donde expone las bondades de la leche de cabra en alimentación humana; afirmando que la leche de cabra y sus productos de yogur, queso y polvo tienen una gran importancia en la nutrición humana: alimentar a más personas hambrientas y desnutridas especialmente en los países en desarrollo; el tratamiento de personas afectadas por alergias a la leche de vaca y trastornos gastrointestinales, corroborar las experiencias anecdóticas sobre los beneficios médicos sobre el consumo de leche de cabra y satisfacer las necesidades gastronómicas de los consumidores conocedores, que es una cuota de mercado creciente en muchos países desarrollados. Aunado a esto, los hechos fisiológicos y bioquímicos de las cualidades únicas de la leche de cabra apenas se conocen y se explotan poco, especialmente los altos niveles de ácidos grasos de cadena corta y media, que tienen valores médicos reconocidos para muchos trastornos y enfermedades en humanos.

Sanz, (2007). Analiza el valor nutritivo y capacidad inmunógena de la leche de cabra y de vaca, mediante distintos ensayos de alimentación, balance y sacrificio, así como de la realización de pruebas tanto *in vivo* como *in vitro*, en

modelos experimentales. De los resultados obtenidos dedujo que leche de cabra es más nutritiva, tanto a nivel digestivo como metabólico e inmunológicamente hipoalergénica frente a la leche de vaca.

Quigley, O'Sullivan, Stanton, Beresford, Ross, Fitzgerald y Cotter (2013), realizaron una revisión acerca de los microorganismos presentes en la leche cruda de vaca, oveja, cabra y humanos. Afirman que la leche, por su alto contenido nutricional, puede sustentar una rica microbiota, que los microorganismos ingresan a la leche desde una variedad de fuentes y, una vez en la leche, pueden desempeñar una serie de funciones, como facilitar la fermentación láctea (especies de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y poblaciones fúngicas), causar deterioro (especies de *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* y otros microorganismos formadores de esporas o termodúricos), que promueven la salud (lactobacilos y bifidobacterias) o causan enfermedades (especies de *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* y hongos productores de micotoxinas).

Cho, Cappello, Schrader, Fagbemigun, Oguntinyinbo, Csócsics *et al.* (2018), aislaron lactobacilos de leche de cabra para caracterizar sus propiedades tecnológicas y resistencia a los antibióticos, como posibles cultivos iniciadores. Se identificaron veintitrés cepas de *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* y *L. paracasei* mediante secuenciación de ARNr 16S. Estas cepas fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos probados, además mostraron diferencias en su comportamiento de

crecimiento y capacidad para reducir el pH *in vitro* logrando la selección de cepas iniciadoras seguras.

García-Cano, Rocha-Mendoza, Ortega-Anaya, Wang, Kosmerl, & Jiménez-Flores (2019). Indican en su estudio titulado “Bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos como potenciales productores de proteínas lipolíticas, proteolíticas y antibacterianas”, que el consumo regular de productos lácteos fermentados ayuda a mantener una microbiota saludable y a prevenir enfermedades relacionadas con la disbiosis intestinal. El primer objetivo fue aislar e identificar BAL de diversos productos lácteos y seleccionar aquellos con actividades enzimáticas y el segundo investigar la organización subcelular y la identidad de estas enzimas después de la semipurificación. De un total de 137 cepas de BAL aisladas y seleccionadas, el 50,3 % y el 61,3 % exhibieron actividades lipolíticas y proteolíticas, respectivamente. Se seleccionaron siete cepas con actividades enzimáticas elevadas y se caracterizaron de acuerdo a la organización celular de sus lipasas, proteasas y proteínas antibacterianas. Las actividades lipolítica y proteolítica se exhibieron predominantemente en la fracción extracelular; mientras que las actividades antibacterianas se encontraron en varias fracciones celulares y fueron capaces de inhibir microorganismos indeseables comunes en los alimentos. En total, se identificaron dos lipasas, siete proteasas y tres proteínas antibacterianas mediante LC-MS/MS. Concluyendo que la caracterización de cepas de BAL con alta actividad enzimática tiene un significado biotecnológico potencial en los procesos fermentativos y en la salud humana, ya que pueden mejorar las

características fisicoquímicas de los alimentos y desplazar a las cepas con actividades enzimáticas más débiles en la microbiota intestinal humana.

Morais, Guamis y Buffa (2004), caracterizaron tecnológicamente 169 cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra, con el objetivo de seleccionar las cepas con buena capacidad quesera para utilizarlas como fermento iniciador en la elaboración de queso; utilizaron métodos cualitativos y cuantitativos para determinar las actividades lipolítica, proteolítica, acidificante y producción de gas de las cepas. Aproximadamente el 30% de las cepas presentó buena capacidad acidificante bajando el pH a valores inferiores a 5. Cuatro cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, una de *Lactobacillus plantarum* y una de *Lactobacillus pentosus*, presentaron buena capacidad proteolítica. Solamente una cepa de *Lactobacillus curvatus* presentó los halos característicos de lipólisis alrededor de las colonias y otra de *Lactobacillus salivarius* produjo gas. Se seleccionaron diez cepas para la preparación mezclas de fermentos (una cepa acidificante; una cepa proteolítica y una cepa lipolítica); se elaboraron tres series de producciones de quesos, dos en planta piloto y una en industria y se realizaron análisis físico-químicos, proteólisis secundaria y organolépticos. No se observaron diferencias importantes en la composición general de los quesos de todas las producciones. Sin embargo, la concentración de aminoácidos libres totales de los quesos elaborados con lactobacilo proteolítico presentaron los mayores valores, resaltando la importante contribución de los lactobacilos en la liberación de aminoácidos libres totales. Por lo que concluyen que la selección

de cepas lácticas autóctonas y su utilización para la elaboración de quesos, permiten la obtención de productos al menos similares, en cuanto a características organolépticas, a los obtenidos con fermentos industriales, por lo que se abre una vía para futuros estudios que permitan avanzar en la línea de obtención de quesos más personalizados.

Ramírez-López y Vélez-Ruiz (2016) aislaron y caracterizaron 18 cepas autóctonas para seleccionar características funcionales definidas en cultivos iniciadores para la producción de queso fresco. Evaluaron las características funcionales (actividad proteolítica, actividad lipolítica, capacidad acidificante y producción de gas); seleccionaron e identificaron fenotípicamente de las cepas y luego validaron su aplicación como cultivos iniciadores a nivel de laboratorio (pruebas de antagonismo y cinética de crecimiento en leche). Los géneros identificados fueron *Lactobacillus* (56%), *Lactococcus* (22%) y *Leuconostoc* (22%), con bajo poder acidificante, sin producción de gas y sólo 3 de las 18 cepas presentaron actividad lipolítica, mientras que la mayoría desarrolló actividad proteolítica. A partir de los parámetros cinéticos, fue posible inferir el desempeño de las cepas lácticas, y mejorar el control sobre los procesos, la vida útil y la calidad microbiológica del producto lácteo terminado.

Olivera, 2011 caracterizó las propiedades de interés tecnológico en cepas de BAL autóctonas aisladas de cadenas lácteas de diferentes establecimientos bovinos, ovinos y caprinos. Se seleccionaron 17 cepas BAL autóctonas, en la primera etapa se evaluó la actividad acidificante, bajo condiciones controladas; se determinó la variación de pH en leche UHT descremada, se desarrollaron

las cinéticas de crecimiento en leche UHT descremada y la actividad proteolítica mediante electroforesis (SDS-PAGE). De las diecisiete cepas estudiadas seis mostraron importante capacidad acidificante; para la capacidad proteolítica, cinco cepas desarrollaron mayor proteólisis. Las curvas de cinética de crecimiento permitieron identificar ocho cepas con fases de crecimiento exponencial prolongadas en el tiempo, entre cuatro a ocho horas. Estas características estudiadas en las cepas BAL aisladas son de importancia en el momento de seleccionar "starters" con diferentes usos en la elaboración de productos lácteos.

Moulay, Benlahcen, Aggad, and Kihal (2013), realizaron la caracterización microbiológica y tecnológica de bacterias ácido lácticas aisladas de leche de cabra argelina crudas y/o fermentadas, realizaron pruebas microbiológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los aislamientos se caracterizaron por tres fenotipos esenciales: alta actividad acidificante, presencia de proteasa y capacidad para metabolizar el citrato. Se caracterizaron 39 aislamientos y 13 cepas pertenecían a BAL, incluidas las especies de *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Los autores concluyen que las bacterias lácticas aisladas tienen características tecnológicas de acidificación y sabor de interés industrial pueden explotarse para proporcionar un arranque específico para la industria láctea local.

Nikolic, Terzic-Vidojevic, Jovcic, Begovic, Golic, y Ljubisa, 2008 realizaron la caracterización de BAL aisladas un queso de leche de cabra casero llamado Bukuljac, a través de un enfoque polifásico que incluyó métodos

microbiológicos y moleculares como rep-PCR con cebador (GTG)⁵. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* representó la cepa dominante en la microbiota del queso analizado. De 55 aislamientos Gram-positivos y catalasa-negativos, 48 pertenecían a *L. paracasei* subsp. *paracasei*, cinco *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y dos *Enterococcus faecalis*. Los resultados de la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante por PCR (DGGE) del ADN extraído directamente del queso fresco revelaron la presencia de *Leuconostoc mesenteroides*. Sólo los lactobacilos mostraron una alta actividad proteolítica y alfa (s1)- y beta-caseínas hidrolizadas. También son productores de diacetilo. Además, 34 de 55 aislamientos, todos determinados como lactobacilos, mostraron la capacidad de autoagregación. Entre 55 aislamientos, 50 también exhibieron actividad antimicrobiana.

Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005) evaluaron *in vitro* el efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*, aisladas de productos fermentados contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. Los ensayos se realizaron con el extracto crudo y centrifugado provenientes de las cepas. Concluyendo que los extractos tienen un alto potencial bactericida contra los dos patógenos evaluados.

Heredia-Castro en 2017, expone en su revisión de la literatura las características más resaltantes de las bacteriocinas de BAL, haciendo énfasis en los mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos. Concluye que las BAL tienen la capacidad de conservar a los productos lácteos debido a diferentes metabolitos, entre los cuales se encuentran las

bacteriocinas, péptidos de origen ribosomal que actúan principalmente formando poros en la membrana celular de las bacterias, causándoles la apoptosis a diferentes patógenos, además de ser estables a diferentes pH y temperaturas, características que las hacen compuestos con potencial aplicación para la industria alimentaria, ya que la evidencia indica que su aplicación puede evitar la contaminación por patógenos. Además, se han propuesto estrategias para mejorar su actividad, como lo son el tratamiento térmico y la aplicación en forma de liposomas y películas. Es por ello que la utilización de bacteriocinas o BAL productoras de bacteriocinas en quesos podría ser viable para su utilización en el control sanitario para la industria quesera.

Mondragón, Escalante, Osuna, Ibarra, Morlett, Aguilar & Rodríguez 2013 en su revisión titulada Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos describen la importancia de las bacteriocinas como un sustituto potencial de conservantes químicos, debido a que son producidas por BAL, las cuales son consideradas GRAS (generalmente reconocidas como seguras, por sus siglas en inglés), que tienen un papel importante en la preservación y fermentación de alimentos. Afirmando que el uso de las bacteriocinas como bioconservantes se atribuye a sus características como inhibir numerosos microorganismos patógenos, su acción en amplios rangos de pH y termoestabilidad, proponiendo diferentes aplicaciones de las bacteriocinas en alimentos, ya sea en forma concentrada, en algún sustrato de grado alimentario o agregando la

bacteriocina a un soporte, actuando éste como reservorio y difusor del péptido antimicrobiano concentrado a la comida.

Chaves de Lima, de Moura y Cardarelli 2017 en su trabajo titulado “Fermentación optimizada de suero de queso de cabra con *Lactococcus lactis* para la producción de sustancias similares a las bacteriocinas antilisterias” cuyo objetivo fue determinar las mejores condiciones para la producción de sustancias con actividad antilisteria por *Lactococcus lactis* cultivadas en suero de queso de cabra mediante la optimización de la temperatura y el ingrediente prebiótico inulina. Concluyeron que el suero de queso de cabra fermentado puede usarse para la producción de sustancias con actividad similar a la bacteriocina con propiedades antilisterias y también como ingrediente funcional para aplicaciones futuras para mejorar la seguridad alimentaria, pero se requieren estudios para probar la eficacia de este compuesto fermentado como bioconservante en modelos alimentarios frente a *L. monocytogenes*.

Yazdi, Davoodabadi, Zarin, Ebrahimi y Dallal, (2017) investigaron el potencial probiótico de BAL aisladas de varios yogures tradicionales iraníes. Recolectaron 96 muestras de yogures tradicionales producidos con leche de cabra, oveja y vaca en Irán. Las muestras se transfirieron a caldo MRS para su enriquecimiento y luego se subcultivaron en agar MRS. Se estudiaron las características morfológicas y bioquímicas mediante tinción de Gram y prueba de catalasa. La capacidad de tolerar el pH ácido y la resistencia a las sales biliares se utilizaron como criterios restrictivos del potencial probiótico. Las BAL seleccionadas se identificaron mediante el análisis de secuencias de

ARNr 16S. Seis aislados probióticos pertenecieron a *Pediococcus acidilacticii* y otros seis aislados a *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. kefir*. Consideraron que las cepas de BAL aisladas de los yogures tradicionales iraníes como potenciales probióticos.

Yelnetty, Purwadi, y Tallei, (2020) evaluaron e identificaron las BAL aisladas de leche de cabra fermentada espontáneamente como posibles probióticos. La leche de cabra fresca fermentada durante 4 días se diluyó en serie, se sembró en agar MRS suplementado con 1 % de CaCO_3 como medio selectivo y luego se purificó en consecuencia. Las BAL aisladas se analizaron por su potencial para inhibir bacterias patógenas entéricas mediante el método de difusión de pozos. Así mismo, sus capacidades para resistir el ambiente ácido y de sales biliares y la producción de ácidos orgánicos. Los probióticos potenciales se identificaron molecularmente utilizando rRNA 16S. Confirmando la presencia de *Lactobacillus plantarum*. Esta bacteria mostró actividad antimicrobiana contra bacterias indicadoras, capacidad de vivir a la exposición en solución de sales biliares y resistencia a ambientes poco ácidos. Los ácidos orgánicos producidos por esta bacteria fueron los ácidos láctico, acético, propiónico y butírico. Se concluyó que *Lactobacillus plantarum* puede considerarse como probiótico potencial.

Yurliasni, Muliawan, y Kardima, (2020) evaluaron la calidad de la leche de cabra fermentada utilizando *Lactobacillus plantarum* y determinar su capacidad antibacteriana contra enterobacterias. La calidad de la leche fermentada se evaluó mediante la medición de pH, niveles de ácido láctico,

contenido de proteína y bacterias totales. La capacidad antibacteriana se midió mediante pruebas inhibitorias en enterobacterias. El experimento se aplicó en un diseño factorial completamente al azar con dos factores, a saber, factor A, tipo de leche (leche de cabra y leche en polvo), factor B, nivel de *Lactobacillus plantarum* (2.5, 5 y 7.5%) y 3 repeticiones iguales. Los datos se sometieron a análisis de varianza y se continuó con la prueba de rangos múltiples de Duncan para determinar la diferencia entre medias al 1 % de probabilidad. Los resultados indicaron que el tipo de leche y los niveles de *L. plantarum* tuvieron un efecto muy significativo sobre el pH, los niveles de ácido láctico y el ancho de la zona inhibitoria. Hay una interacción entre los factores. Por su parte el tipo de leche tuvo efectos muy significativos ($P < 0.01$) sobre el contenido de proteína y bacterias ácido lácticas totales. En conclusión, la leche de cabra fermentada tiene mejor calidad y capacidad antimicrobiana contra las enterobacterias que la leche en polvo.

Antecedentes históricos

Haciendo un poco de historia de los lactobacilos, para 1919, O. Jensen realizó la primera clasificación en dos grandes grupos: homofermentativos y heterofermentativos, según los productos resultantes de la fermentación (Olivera, 2011). En 1930, Shirota seleccionó una nueva cepa de *Lactobacillus casei* capaz de alojarse en el intestino y beneficiar a la salud del individuo al colaborar con su microbiota intestinal, esta cepa la llamó *Lactobacillus casei*

cepa shirota, y con ella en 1935 elaboró la bebida láctea fermentada denominada Yakult. (Díaz 2020; Campos, Gonzabay y Mejia, 2009). Entre 1930 y 1940 se desarrolló el concepto de cultivos iniciadores de una única cepa pura y se descubrió que cultivos de bacterias lácticas infectados con bacteriófagos pueden desarrollar una fermentación lenta en quesos. (Saccaro, 2008; Köning y Frohlich, 2009). Es por ello que, a partir de 1970, se empezó a estudiar el efecto probiótico de las BAL, ya que las investigaciones realizadas generaron interés en la industria para la elaboración de productos lácteos con efecto probiótico siendo en la actualidad, una tendencia mundial en crecimiento. (Campos, Gonzabay y Mejia 2009; Ballesta Velasco, Borobio, Argüelles y Perea 2008).

www.bdigital.ula.ve

Bases teóricas

Los Mamíferos

Se conoce como mamíferos a los animales vertebrados y de sangre caliente pertenecientes a la clase *Mammalia*. Los mamíferos datan de aproximadamente 200 millones de años, a partir de un ancestro común derivado de los reptiles sinápsidos o mamiferoides, surgidos durante el Período Triásico. Pero a diferencia de los reptiles, poseen la capacidad de regular la temperatura corporal, característica clave para su supervivencia del

Evento de Extinción Masiva K-Pg (Cretácico-Paleógeno) que extinguió a los dinosaurios no aviares (Nowak, 1991; Robinson, 2016).

La característica esencial que predomina en los mamíferos es que las hembras poseen glándulas mamarias que sirven para generar la leche para alimentar a sus crías. Actualmente se conocen cerca de 5.486 especies de mamíferos, entre ellas ser humano, en su mayoría son todas vivíparas, con excepción de los monotremas, como el ornitorrinco (Arora, Bhojak & Joshi 2013).

Animales Lecheros

La producción mundial de leche procede casi en su totalidad de ganado vacuno, búfalos, cabras, ovejas y camellos. Otros animales lecheros menos comunes son los yaks, los caballos, los renos y los burros (Nowak, 1991; Álvarez-Romero y Medellín, 2005). La presencia e importancia de cada especie varía considerablemente entre regiones y países. Los elementos claves que determinan el mantenimiento de las especies lecheras son los alimentos, el agua y el clima. Otros factores que pueden influir en la presencia de las especies lecheras son la demanda de mercado, las tradiciones alimentarias y las características socioeconómicas de los distintos hogares (por ejemplo, las familias de escasos recursos tienden a depender más de los pequeños rumiantes). Aunque el ganado vacuno se cría en una amplia

variedad de sitios, otras especies hacen posible la producción de leche en ambientes adversos que a menudo no pueden sostener ningún otro tipo de producción agrícola. Las ovejas posibilitan la producción de leche en las regiones semiáridas del Mediterráneo, las cabras en las regiones de suelos no aptos para la agricultura de África, los caballos en las estepas de Asia central, los camellos en las tierras áridas, los búfalos en las regiones tropicales húmedas, y los yaks en las zonas de alta montaña, como la meseta tibetana. (FAO, 2016)

Las Cabras

Las cabras domésticas (*Capra hircus*) han sido los mamíferos exóticos que más atención han suscitado en el medio científico, derivado de sus impactos negativos sobre los ecosistemas naturales donde han sido introducidas y sobre las especies autóctonas ya que, la introducción de fauna exótica puede traer como consecuencia la modificación de los hábitats en que se encuentre, ya que estos evolucionaron sin su presencia (Mellink, 1991; Pulina *et al.*, 2018).

Las cabras pueden ejercer una presión negativa sobre las comunidades de hierbas y arbustos (Jaksic, 1998) y modificar así la dinámica poblacional de algunas especies de plantas, llevando en el último caso a la modificación de su abundancia y de la composición de las comunidades vegetales y animales. Las manadas de cabras han sido muy destructivas, especialmente en la región mediterránea y medio oriente, contribuyendo a la erosión de los suelos, la

expansión de los desiertos y la desaparición de especies nativas de flora y fauna, siendo un factor fundamental en la declinación de sus parientes cercanos por competencia alimenticia. Las altas densidades registradas han sido en parte responsables de la amenaza y extinción de numerosas especies de aves de hábitats boscosos (Beever y Brussard, 2000).

Esta especie es originaria de medio oriente, actualmente se encuentra como animal de granja en cercana asociación con las poblaciones humanas. Es de tamaño mediano (entre 0,915 a 152,4 cm de largo), aunque su tamaño y su coloración varían de acuerdo con la raza. Suele habitar en sitios de clima árido, con suelos rocosos y en áreas montañosas, siendo especies generalistas en cuanto a su tipo de alimentación ya que pueden comer desde plantas herbáceas y pastos, hasta ramas y hojas de árboles pequeños y arbustos. Son animales que viven en manadas, característica que aunada al manejo tradicional de la especie (sobrepastoreo de las zonas en que se encuentra), le confiere un gran potencial de deforestar y degradar grandes áreas. Alcanzan su madurez sexual entre los 5 y 7 meses (hembras) y 4 y 6 meses (machos), se reproducen generalmente en el otoño y dan a luz entre 1 y 2 crías con un tiempo de gestación promedio de 149 días, en cautiverio pueden vivir hasta 18 años (Jainudeen y Hafez, 1996). Es portador y transmisor de enfermedades a fauna nativa. Puede ser a su vez una presa alternativa para depredadores nativos como coyotes, pumas y jaguares (Beever y Brussard, 2000; Álvarez-Romero y Medellín. 2005).

Desde el punto de vista taxonómico, las cabras pertenecen al Reino Animalia, Phylum Chordata, Clase Mammalia, Orden Artiodactyla, Familia Bovidae; siendo su nombre científico *Capra hircus* Linnaeus, (1758). Existen numerosas razas de esta especie, pueden ser muy variables en tamaño y color. En general se caracterizan por tener un cuerpo y patas relativamente robustas, pelaje abundante y largo, una barba debajo de la mandíbula hocico alargado y cola pequeña. Pueden tener o no cuernos y estos pueden ser en forma de cimitarra o espiralizados. Sus cuernos son largos y están dirigidos primero hacia arriba, y luego hacia atrás. Las hembras poseen un par de mamas. Las principales diferencias con el género *Ovis* (Ovejas) son que los machos son olorosos, poseen barba, las patas carecen de glándulas olorosas y la cabeza es convexa y no cóncava (Nowak, 1991). Se cree que la especie *C. hircus* se originó directamente de *C. aegagrus* o que más bien son co-específicas, por lo que podría considerarse su misma distribución original, es decir como si *C. aegagrus* en su distribución original fuese de esta región (Figura 1)



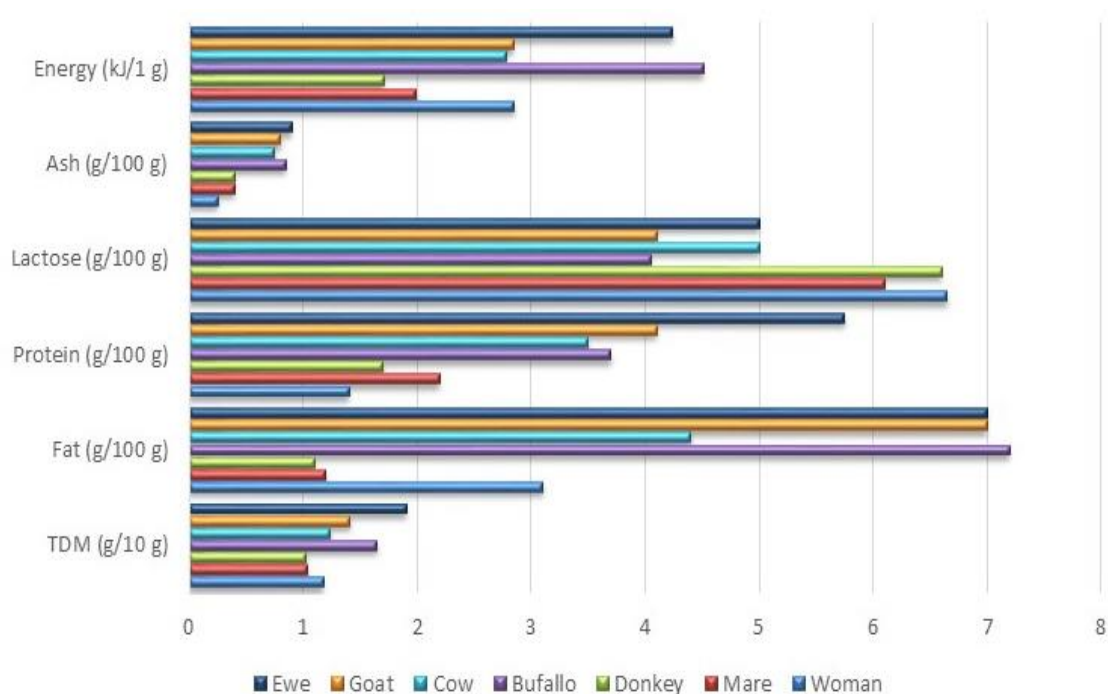
Figura 1. Distribución original o histórica de *C. hircus* (doméstica) Fuente Álvarez-Romero y Medellín (2005).

La Leche

La leche cruda o “leche” sin otro calificativo es un líquido blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad secretado por las glándulas mamarias de las hembras de la especie, tras el nacimiento de las crías (Arora, Bhojak & Joshi 2013). Contiene los nutrientes esenciales en las proporciones adecuadas para brindar sustento a los mamíferos jóvenes en las primeras etapas de su vida y constituye una buena fuente de carbohidratos (lactosa), grasas (triglicéridos) y proteínas (caseína, albúmina y globulina), así como vitaminas, minerales (sales), nucleótidos, lecitinas y enzimas (Sanz, 2007;

Arora, Bhojak & Joshi 2013). Esta mezcla es semejante en las diferentes especies, pero con diferentes proporciones (Figura 2; Tabla 1). Desde el punto de vista físico, en la leche cruda existen varias fases en las que se encuentran dispersos sus componentes: Emulsión de glóbulos grasos, suspensión de caseína ligada a sales minerales y solución acuosa (lactosuero) formada por lactosa, sales minerales solubles y proteínas solubles (Muletz-Wolz *et al.*, 2019).

La Leche es el producto íntegro, normal y fresco, no alterado, ni adulterado y sin calostro, obtenido del ordeño higiénico, completo e interrumpido de las hembras mamíferas, domésticas, sanas y bien alimentadas, que no ha sido calentada a una temperatura superior a 40 °C, ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente. Cuando nos referimos a la leche de otros animales distintos de la vaca se indica el nombre de la especie correspondiente. Por otra parte, la “leche fría” es la leche cruda que inmediatamente después de su ordeño sea refrigerada a una temperatura inferior a 5°C y mantenida a una temperatura no mayor de 10°C, durante su almacenamiento y transporte (Meneses, 2017). Toda la leche cruda debe estar limpia, libre de calostro y de materias o sustancias ajenas a su naturaleza, deberá presentar olor, color, sabor y aspecto característico del producto (COVENIN, 1993). La leche se altera fácilmente por el calor y microorganismos que pueden proliferar en ella como las bacterias ácido lácticas (Arora, Bhojak & Joshi, 2013).



ASH= Cenizas; TDM sólidos totales

Figura 2.- Composición general de la leche de diferentes especies animales - valores medios informados en la literatura. Fuente Álvarez-Romero y Medellín (2005).

La historia de la leche como alimento para el hombre probablemente se remonta a la prehistoria. Los dibujos rupestres estimados en 15000 años muestran que el ganado era conocido en tiempos prehistóricos y hay evidencia de que, la domesticación de ganado ocurrió antes del 4000 AC. Ilustraciones encontradas en artefactos descubiertos en el Medio Oriente, en Egipto y Mesopotamia, muestran que diferentes tipos de ganado y varios aspectos de la ganadería lechera existían alrededor 3000 AC. La ganadería lechera se estableció bien en el Antiguo Egipto, con registros y pinturas, fechadas por los egiptólogos que muestran vacas siendo ordeñadas alrededor de 2500 a.C. (Robinson, 2016). En Europa, la domesticación y el desarrollo de la ganadería

lechera se produjo mucho más tarde. El ganado se mantuvo en tierras comunes, y un número fueron sacrificados en el invierno debido a la escasez de pastos y la necesidad de carne. La leche se consumía tibia inmediatamente después del ordeño. La leche excedente era convertida en productos, como mantequilla y queso, como medio de conservación y vendida localmente.

Tabla 1. Datos analíticos y fisiológicos sobre las diferentes clases de leches

	Composición por 100 g							Tiempo para doblar el peso de nacimiento Días (8)	Duración hab. de gestación Días (9)	Peso del cerebro (10)
	Extracto seco (total) (1)	M.G. (2)	Lactosa (3)	Sales (4)	Materias nitrogenadas					
					Totales (5)	Proporción de				
						Caseína % (6)	N.P.N. (*) % (7)			
Leche humana	11,7	3,5	6,5	0,2	1,5	28	17	170	270	1200 g
Equidos										
Yegua	10	1,5	5,9	0,4	2,2	50	—	40	340	650
Burra	10	1,5	6,2	0,5	1,8	45	—		360	360
Rumiantes										
Vaca	12,5	3,5	4,7	0,8	3,5	78	5	35	285	500
Cabra	13,6	4,3	4,5	0,8	4	75	7	22	155	130
Oveja	19,1	7,5	4,5	1,1	6	77	5	20	150	
Búfala	17,8	7,5	4,7	0,8	4,8	80	—			
Reno	31,9	17,5	2,5	1,5	10,4	80	—		230	
Suidos										
Cerdo	18,3	6	5,4	0,9	6	50	8	13	115	160
Carnívoros y Roedores										
Gata	20	5	5	1	9	33	—		60	25
Perra	24,2	10	3	1,2	10	50	—	9	63	
Coneja	29,3	12	1,8	2	13,5	70	—	6	35	10
Cetáceos										
Marsopa	59,9	46	1,3	0,6	12	55	—			
Ballena	46,3	35	0,8	0,5	10	—	—			

(*) N.P.N: materiales nitrogenados no proteicos. Fuente Gantner, (2015).

No fue hasta los siglos XVIII y XIX que se produjo el desarrollo de una distribución más amplia de la leche como alimento de la población (Robinson,

2016). A medida que aumentaba la población de las ciudades y se extendía la Revolución Industrial, también aumentaba la necesidad de abastecer de leche a la población urbana (Quigley *et al.* 2013). Sin embargo, fue a principios del siglo XX con la aceptación y desarrollo generalizado de la pasteurización comercial de leche, junto con mejoras en las prácticas de producción de leche, que la leche se estableció como un alimento saludable y seguro (Robinson, 2016). Desde el punto de vista económico, Gantner, (2015) reportó que la producción láctea mundial fue 85 % vacas; 11%; búfalas; 2,3 % cabras; 1,4 % ovejas; 0,2% camellas y menos del 0,1 % para yeguas y burras. Actualmente se acepta que la leche materna es la vía de transmisión vertical de microbiota y elementos de la respuesta inmune de la madre al hijo (Moreno *et al.* 2011).

La Leche de Cabra

Desde tiempos remotos de la humanidad, la leche de cabra aparece como alimento. Registros muy antiguos como la biblia o murales egipcios hablan de su consumo, algo más del 50% de la población mundial consume leche de cabra (Gantner, 2015). Aunque la leche de cabra solo supone un 3% de toda la leche que se consume en Venezuela, en algunos países de Asia como Turquía, Irán, India, China, entre otros, se consume tanto o más que la de vaca. Tradicionalmente se ha administrado a bebés y niños que no podían recibir leche materna o eran intolerantes a la leche de vaca y hoy en día se emplea principalmente en la elaboración de derivados lácteos (Meneses, 2017).

La leche de cabra es un alimento con muchos beneficios nutricionales y potencial culinario único. En comparación con la leche de vaca, presenta niveles similares de proteína y minerales, menor cantidad de lactosa, una mayor concentración de ácidos grasos de cadena corta, y glóbulos grasos de menor tamaño que contribuyen a una mejor digestibilidad (Arora, Bhojak & Joshi, 2013; Kumar *et al.* 2016; Clark y Mora, 2017; Park y Haenlein, 2017), es muy similar a la humana, aunque contiene una mayor cantidad de calcio, magnesio y fósforo que la de vaca y humana, con contenidos de vitamina D y folatos menores; sustancias esenciales para la formación de huesos que ayudan a prevenir la osteoporosis. También contiene un aporte destacado de vitamina B₂ o riboflavina, si bien el contenido de vitaminas B₆ y B₁₂ es más bajo que la leche de vaca; comparado con la leche humana es similar, por lo que es adecuada para la nutrición de infantes (Arora, Bhojak & Joshi 2013). En el caso de la energía, se han encontrado valores similares en la leche de cabras, vacas y mujeres (Gantner, 2015).

La composición de la leche de cabra puede variar según la raza, la zona de producción, la estación del año, la etapa de lactancia, la alimentación, el manejo, la sanidad, entre otros. Está compuesta fundamentalmente por agua, aporta grasa y proteínas de muy buena calidad. Contiene tres ácidos grasos, caproico, caprílico y cáprico. Una particularidad de la leche de cabra es la ausencia de caroteno, a diferencia de la vaca que el caroteno le confiere color a su grasa. El caroteno es el promotor de la vitamina A, que debe ser convertido por el organismo en la glándula tiroides. En la leche de cabra

encontramos vitamina A completamente disponible para su asimilación, sin intervención de dicha glándula. Esto es muy importante para los bebés, porque su actividad tiroidea está apenas desarrollada (Gantner, 2015).

La leche de cabra se recomienda para lactantes, niños menores de tres años con problemas de mala absorción, bajos de peso, por lo tanto, las características de la leche de cabra actualmente son objeto de un mayor interés en la investigación. La cabra es uno de los principales contribuyentes de productos lácteos y cárnicos, las diferencias de composición, son importantes para indicar la idoneidad tecnológica para el procesamiento de leche de cabra y sus productos (Clark y Mora, 2017).

Su nicho de mercado se enfoca en consumidores con alergia a la leche de vaca, y países desarrollados donde sus productos derivados son codiciados por su sabores y texturas particulares. Debido a una producción estacional, menores volúmenes de leche en comparación con vacas y negativa percepción de su aroma característico, la tecnificación de la industria y el desarrollo de productos derivados es un enfoque prometedor para maximizar su valor y aceptabilidad (Clark y Mora, 2017; Csapóné y Csapó, 2019).

Los productos derivados de leche de cabra poseen buena perspectiva de mercado como alimentos funcionales, delicias gastronómicas y cosméticos (Ribeiro y Ribeiro, 2010). Adicionalmente, se ha reportado que consumidores en países desarrollados están dispuestos a pagar un mayor precio por

productos de especialidad si estos poseen beneficios para la salud (Mowlem, 2005).

La Microbiota de la Leche de cabra.

La microbiota de leche de cabra consta, entre otros grupos microbianos, de BAL que despiertan un interés investigativo enfocado en su aplicación en la industria de los alimentos. Dentro de las BAL, los géneros predominantes en leche de cabra son *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc* con cierta variación según propiedades físicoquímicas de la leche de cada raza (Moulay *et al.* 2013; Quigley *et al.* 2013; Choet *et al.* 2018). Reportes de la presencia de cepas de BAL con actividad antimicrobiana, resistencia a condiciones gastrointestinales, producción de péptidos bioactivos y ácidos orgánicos en la microbiota de leche de cabra, marcan a esta matriz como una prometedora fuente de microorganismos probióticos y alimentos funcionales, lo que genera un creciente interés en la ganadería caprina ya que demanda el desarrollo de nuevos productos con beneficio añadido (Mittu y Girdhar, 2015; da Silva, Lopes y Cardarelli, 2019; Yelnetty, Purwadi y Tallei., 2020). Desde el punto de vista tecnológico, las características deseadas en las BAL se buscan de acuerdo a los productos elaborados. La selección de bacterias ácido lácticas para formular cultivos iniciadores se hace en base a que presenten ciertas propiedades: capacidad de acidificación que no sea lenta, correcta producción de aroma y sabor, habilidad para obtener la textura adecuada, ausencia de patogenicidad, fácil preservación y propagación; así como la

capacidad de prevalecer sobre la microbiota competitiva, pues se busca obtener un cultivo iniciador con una tasa de viabilidad adecuada, que esté libre de contaminación y que sea altamente activo en las condiciones de producción (Morais, 2004; Brennan y Reginensi, 2001).

Por otra parte, existe un incremento de la aceptación y venta, para productos de leche de cabra en el mercado, tanto de países en vías de desarrollo, como en países desarrollados, debido a la adaptabilidad y bajo costo del animal, por su sabor único, propiedades hipoalergénicas y beneficios nutricionales. Sin embargo, pese al reconocido valor de la leche de cabra, existe todavía oportunidad de mejora y crecimiento en la explotación del animal (Park y Haenlein, 2017; Pulina *et al.* 2018; Csapóné y Csapó, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Bacterias Acido Lácticas

El uso de microorganismos en la industria láctea es una buena estrategia para generar alimentos con valor agregado. Además de participar en la fermentación de varios productos lácteos, las bacterias ácido lácticas (BAL) son capaces de actuar como “biopreservantes” extendiendo la vida útil de los alimentos y ofreciendo protección contra microorganismos degradadores de alimentos (Chaves de Lima, de Moura y Cardarelli, 2017). Se han reportado, también, cepas de distintas especies de BAL con potencial probiótico, cuyos efectos benéficos en la salud han sido documentados (Sharifi *et al.* 2017). Debido a su versatilidad metabólica, y a las propiedades organolépticas que

confieren a los alimentos que fermentan, las BAL son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y la mayoría de sus especies poseen un estatus “GRAS” (Generally Regarded as Safe) y “QPS” (Qualified Presumption of Safety) que garantizan su inocuidad para el consumo humano (EFSA, 2007; FDA, 2010; Sadiq *et al.* 2019).

Son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa negativa, mayoritariamente nitrato reductoras negativa, capaces de crecer en el rango de pH entre 4,0 y 4,5; anaerobias facultativas o microaerófilas, con un amplio rango de temperatura pudiendo ser mesófilos (25-30°C) y termófilos (40-44°C). Su metabolismo es fermentador y dependiendo del producto de fermentación se distinguen en bacterias homolácticas que solo producen ácido láctico o heterolácticas, las cuales generan de otros compuestos como dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico y etanol. Dentro de bacterias homofermentativas se encuentran los miembros del género *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunas especies de *Lactobacillus* y en las heterolácticas los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Wessels *et al.* 2004; Jay, Loessner and Golden, 2005; Teuber y Geis, 2006).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos, es decir, requieren una serie de componentes (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas, vitamina B, ácido pantoténico, biotina y ácido fólico) que no pueden ser sintetizados por estos microorganismos. El elevado requerimiento

nutritivo y la cantidad de energía que pueden obtener por fermentación, condicionan los hábitats naturales que son propicios para su desarrollo, siendo ideales, la leche y sus productos derivados, el intestino y las mucosas de humanos y animales; así como plantas intactas y en descomposición (Serna, Vallejo y García, 2012). Están asociadas a la fermentación de muchos alimentos ya sea al encontrarse naturalmente en estos o al ser añadidos como cultivos iniciadores (García-Cano *et al.* 2019). Su presencia en alimentos de origen vegetal, leche de mamíferos y superficies mucosas de animales señala una amplia distribución y adaptación especializada (Makarova *et al.* 2006).

Desde el punto de vista filogenético, las BAL comprenden doce géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Alloicoccus* y *Weissella*. (Morais, 2004). Dichos géneros se ubican taxonómicamente dentro del filo *Firmicutes* (Figura 3), en la clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*. (Hammes y Hertel, 2006; Makarova *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2020)

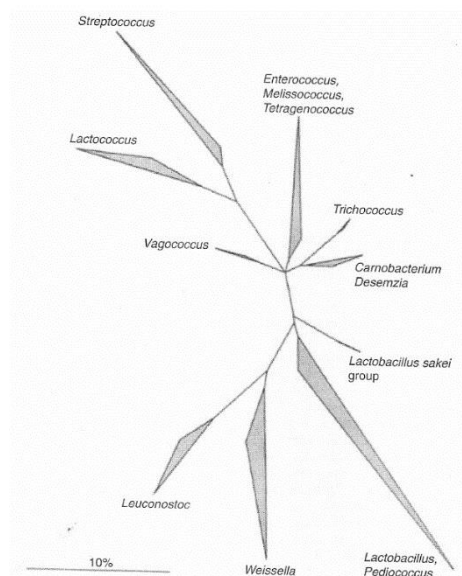


Figura 3: Árbol filogenético de los géneros de bacterias ácido lácticas, basado en la secuencia del gen del ARNr 16S. Fuente Hammes y Hertel, (2006)

www.bdigital.ula.ve

Aunque el grupo puede llegar a abarcar hasta 25 diferentes géneros, el término suele hacer referencia principalmente a *Lactobacillus* (Zheng *et al.* 2020).

Actualmente la investigación en BAL se enfoca en identificar cepas con características beneficiosas y desarrollar cultivos iniciadores útiles para la industria. La producción de compuestos bioactivos por cepas específicas sugiere su posible aplicación como bioprotectores de alimentos frente a hongos y bacterias patógenas o deteriorantes (García-Cano *et al.* 2019; Sadiq *et al.* 2019; Siedler, Balti y Neves, 2019). La presencia de BAL en la leche cabra aporta propiedades aromatizantes, texturizantes, inhibitorias de

microorganismos patógenos y promotoras de salud (Cho *et al.* 2018; Yurliasni *et al.* 2019); aspectos beneficiosos de ciertas cepas como reducción de niveles de colesterol (Verruck, Dantas y Prudencio, 2019), alivio de síntomas de colon irritable (Rodríguez *et al.* 2018), potencial antioxidante (Haskito, Mahdi, y Noviatry, 2020) e inhibición de microorganismos patógenos (Yazdi *et al.* 2017), lo que motiva su investigación en el desarrollo de nuevos probióticos. De allí que el uso de BAL en productos derivados y la promoción de sus beneficios para la salud y calidad del alimento constituyen una excelente opción para incrementar su valor.

Género *Lactobacillus*.

Los lactobacilos pertenecen al grupo de las BAL, agrupan varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas comunes. La familia *Lactobacillaceae* actualmente está constituida por 25 géneros diferentes con cerca de 261 especies, siendo el género *Lactobacillus* el más estudiado. Son cocos o bacilos Gram positivos, y producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación de los hidratos de carbono (Hammes y Hertel, 2006).

Los miembros del género *Lactobacillus*, morfológicamente presentan forma de bacilo o bastón Gram positivos, con un tamaño que varía entre: 0,5 a 1,2 μm por 1,0 a 10,0 μm ; también pueden encontrarse como cocobacilos, bastones curvados o coriniformes, con una disposición en cadenas o

individual. No producen esporas, pueden ser anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; son oxidasa, catalasa y bencidinas negativa, carecen de citocromos (Robinson, 2016). Existen algunas especies móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, ciertos miembros pueden ser nitrato reductores. Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento pueden ser mesófilos o termófilos. Existe variación a nivel de especie con respecto a la capacidad de crecer a 10 y 45 °C. En cuanto a la fermentación, pueden generar L-ácido láctico, D-ácido láctico o una mezcla de ambos isómeros, y se los distinguen entre categorías: homofermentativos estrictos, heterofermentativos estrictos y heterofermentativos facultativos. En referencia al pH óptimo de crecimiento este oscila entre 4,5 y 6,2. Algunas especies pueden crecer a pH 3,2 y otras a pH 9,6 (Zheng et al. 2020).

Actualmente los lactobacilos no sólo tienen importancia por su papel en la producción de alimentos fermentados sino también por la capacidad antimicrobiana de las bacteriocinas que producen y que ha sido objeto de investigación (Strahinić et al. 2007). En las últimas décadas, los lactobacilos han recibido gran atención, particularmente las especies utilizadas como cultivos iniciadores, debido a su importancia comercial. La ciencia y la tecnología se han enfocado en aislar nuevas cepas con el fin de estudiar sus potencialidades como cultivos iniciadores o como ingredientes para alimentos con potencial funcional. Se ha reportado que los lactobacilos usados en bebidas fermentadas influyen notablemente en los cambios químicos,

bioquímicos y sensoriales de los productos en los cuales se encuentran o se adicionan (Hayaloglu, Guven, Fox y McSweeney 2005). Los lactobacilos tienen diferentes beneficios como actividad proteolítica, lipolítica, amilolítica, conservadora y antimicrobiana que se considera probiótica por los efectos beneficiosos que le dan al hospedero. Los péptidos producto de la excreción bacterial han sido aislados y caracterizados, observando un potencial biológico debido a sus propiedades inmnomoduladoras, conservadoras y bioreguladoras muy útiles para ciencia y tecnología de alimentos y la industria alimentaria.

Hipótesis.

www.bdigital.ula.ve

La leche de cabra posee bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* con potencial uso tecnológico y probiótico.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describe el tipo, diseño y enfoque de la investigación seleccionada, los participantes del estudio, el lugar de la investigación y los instrumentos que se emplearán para recolectar los datos. Igualmente, se indica el procedimiento que se seguirá para el análisis e interpretación de los datos.

www.bdigital.ula.ve

Tipo de investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. En tal sentido, esta investigación es de tipo exploratorio y descriptivo porque constata cómo es y cómo se manifiesta un fenómeno y sus componentes a través de la medición de uno o más de sus atributos.

Diseño de la investigación

La misma sigue un diseño experimental bajo un enfoque cualitativo, el cual consistirá de un número determinado de pruebas bajo condiciones controladas en el laboratorio, dónde se recopilará la información necesaria, para demostrar

la presencia de lactobacilos con interés tecnológico y probiótico a partir de leche de cabra adquirida en un expendio de productos lácteos de la ciudad de Mérida.

Población y Muestra

La población está comprendida por la leche obtenida en las diferentes unidades de producción caprina existentes en la ciudad de Mérida. La muestra estará representada por 5 muestras de 500 mL adquiridas en un expendio de productos lácteos ubicadas en la Avenida Las Américas sector la Humboldt del estado Mérida entre los meses de febrero a junio de 2022.

Sistema de Variables.

Variable dependiente

Las propiedades tecnológicas y probióticas presentes en los aislados obtenidos

Variable independiente

La presencia de Bacterias del género *Lactobacillus* en la leche de cabra expendida en la ciudad de Mérida.

Materiales y Métodos.

Recolección y transporte de las muestras.

Se contactó a los distribuidores y se consultó la posibilidad de adquirir muestras de leche de cabra sin pasteurizar. Se estableció el día viernes para la búsqueda de las muestras, las cuales fueron recolectadas en frascos de vidrio estériles de 500mL. Las muestras fueron adquiridas a primera hora de la mañana y trasladadas bajo refrigeración en cavas de anime hasta Laboratorios ProBioVital C.A. ubicado en el sector Chamita de la Ciudad de Mérida, Municipio Libertador del estado Mérida, lugar donde se desarrolló la investigación.

Procesamiento microbiológico de las muestras.

Los frascos de vidrio fueron desinfectados externamente con alcohol. Para el aislamiento preliminar los frascos fueron agitados con la finalidad de homogeneizar el producto y garantizar la distribución uniforme de sus componentes, se abrió asépticamente bajo la protección del mechero, se recolectó 1 mL de leche de cabra y se inoculó en tubos de 10 mL caldo MRS por triplicado (Moreno *et al.* 2011), los cuales fueron incubados en microaerobiosis a 35 ± 2 °C durante 48 horas.

Con los cultivos obtenidos, se realizaron diluciones seriadas y se inoculó 100 μ L en placas de agar Man Rogosa Sharpe (MRS) para luego incubarlas a 37° C por 48 horas en microaerobiosis (Figura 4). Paralelamente se inocularon

placas de agar MRS utilizando la técnica de agotamiento en cuatro cuadrantes (Moreno *et al.* 2011).



Figura 4.- a) Proceso de acondicionamiento de material, preparación de medios y esterilización. b) Aislamiento y selección de los posibles aislados de *Lactobacillus* para las pruebas.

Identificación preliminar de los aislados.

A partir de las placas de agar MRS, se seleccionaron aleatoriamente colonias con características macroscópicas sugestivas de las bacterias ácido lácticas, tales como: colonias pequeñas, convexas, lisas, con bordes definidos,

opacas y sin pigmentos (Kandler y Weiss, 1986; Settanni y Moschetti, 2010), a las cuales se les realizaron la tinción de Gram y la prueba de catalasa

Las cepas identificadas como bacilos o cocobacilos, Gram positivos, catalasa negativa, fueron inoculadas en placas de agar MRS e incubadas a 37°C en microaerobiosis durante 48 horas para su conservación (Kandler y Weiss, 1986).

Evaluación de la capacidad tecnológica *in vitro* de las cepas de bacterias ácido lácticas

Producción de gas

Para detectar la capacidad de producción de gas de los aislados, se usaron tubos de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo suplementado con lactosa al 5% con campana de Durham y se adicionaron 100 µL de cultivo de la cepa correspondiente ajustado a la turbidez del tubo 3 Mc Farland (9.0×10^8 UFC/mL), se mezcló con ayuda de un vortex. Los tubos se incubaron durante 4 días a 30°C. La producción de gas en el medio líquido fue registrada de acuerdo al grado en el que la campana Durham se llenó de gas, según la siguiente escala: 0 = ausencia de gas en la campana Durham; 1 = presencia de burbuja en la punta de la campana; 2 = 1/3 de la campana llena con gas; 3 = 2/3 de la campana con gas; 4 = campana Durham completamente llena de gas.

Tipo de fermentación.

A partir de un cultivo puro, cada aislado fue inoculado mediante la técnica de cuatro cuadrantes sobre medio M5 mejorado propuesto por Zúñiga, Pardo y Ferrer (1993), posteriormente se incubaron a 35°C en condiciones microaerófilas. Se consideran homolácticas aquellas colonias azul-verdoso con vire del medio de azul a amarillo, mientras que los lactobacilos heterolácticos son aquellas colonias de color blanco que no provocan cambio de color en el medio, es decir el medio permanece azul (Figura 5).

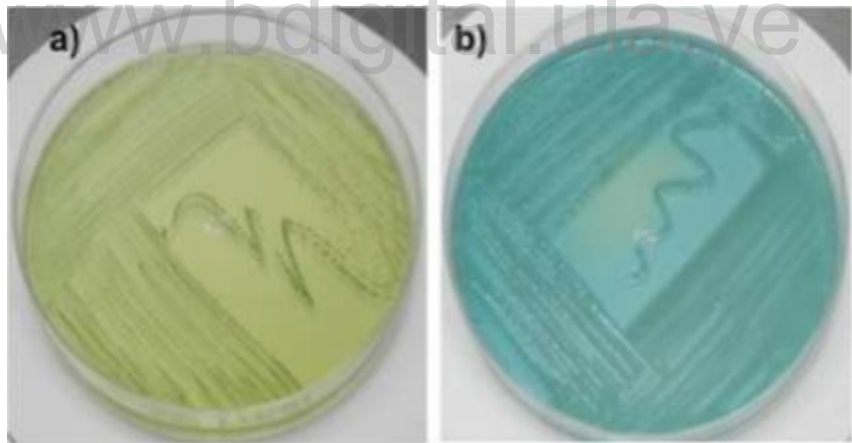


Figura 5: Tipo de fermentación en medio M5 mejorado. a) Colonias homolácticas, b) Colonias heterolácticas. Fuente Ramírez y Vélez (2016).

Actividad proteolítica.

Para evaluar la actividad proteolítica, los aislados bacterianos se sembraron en agar Plate Count suplementado con leche descremada al 1% (Beerens y Luquet, 1990). Las placas se incubaron a 7 °C durante 10 días y a 37 °C por 48 horas, la presencia de halo transparente (Figura 6) alrededor de las colonias es indicativo de actividad proteolítica (Inat y Montes 2016).



Figura 6: Actividad proteolítica de los aislados en agar Plate Count suplementado con leche descremada al 1%. Fuente Inat y Montes (2016).

Actividad celulolítica.

Para evaluar la capacidad celulolítica de las bacterias se utilizó el método reportado por Ortiz y Uribe-Vélez (2011), la técnica se basa en la propiedad de evidenciar la actividad enzimática de la celulasa, al actuar sobre la integridad del sustrato carboximetilcelulosa (CMC) y modificar la estructura del polímero y por este motivo no reacciona con el colorante rojo congo que tiñe la celulosa del medio de cultivo, formando halos de reacción alrededor de donde se inocularon las cepas seleccionadas. El procedimiento fue el

siguiente: Con un asa bacteriológica se inoculo por triplicado cada uno de los aislados a investigar sobre un medio rico agarizado suplementado con CMC. Las placas obtenidas se incubaron a 37°C y se realizó el revelado a las 24, 48 y 72 horas con una solución de rojo congo al 3%, durante 20 min, y posteriormente se decoloró con una solución de NaCl 1N. Los aislados que mostraron un halo de decoloración son las que poseen la enzima (Figura 7).



Figura 7: Actividad enzimática de la celulasa en un medio rico agarizado suplementado con Carboximetilcelulosa (CMC) celulolítica. Se evidencia un halo translucido alrededor del crecimiento bacteriano. Fuente: Cerrada y Jiménez, 2023.

Evaluación de la capacidad probiótica *in vitro* de las cepas de bacterias ácido lácticas.

Curvas de Crecimiento bacteriano de los aislados obtenidos en condiciones normales.

Con la finalidad de obtener un patrón de comparación para las pruebas de crecimiento con medios suplementados, se determinó la curva de crecimiento

en condiciones normales de cada uno de los aislados. Se inocularon 20 µL de un cultivo de 48 horas en caldo MRS en tubos de ensayo con 5 mL de caldo MRS y se incubaron en baño de agua a 35 +/- 2°C. Se realizaron medidas de densidad óptica a 560 nm, a tiempo cero, posteriormente cada hora durante las primeras 6 horas, luego a las 9, 12 y por último a las 24 horas, con los resultados obtenidos se obtuvieron las gráficas correspondientes a la curva de crecimiento control para cada cepa (Salas, 2013).

Estandarización de los inóculos bacteriano.

Según Alvarado y Díaz (2009), un inóculo de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL, se considera adecuado para realizar la evaluación de los potenciales de las cepas *in vitro*, por ser la cantidad promedio de bacterias recomendable que debe consumirse para lograr los efectos benéficos buscados. El inóculo estandarizado se obtuvo a partir de crecimiento de las cepas en agar MRS a 37 °C por 48 horas, tomando pequeñas porciones de colonias y resuspendiéndolas en solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón de Mc Farland n° 1 (3.0×10^8 UFC/mL).

Resistencia a lá acidez gástrica.

Se tomó 20 µL del inóculo estandarizado de cada aislado y se vertió en tubos de 3 mL con caldo MRS ajustado con HCL a diferentes pH 2,0; 3,0 y 4,0 respectivamente. Los tubos se incubaron en baño de agua a 37 ± 2 °C, realizando medidas de densidad óptica (DO) a una absorbancia de 560 nm a

los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 y 24 horas para obtener las curvas de crecimiento respectivas (Cueto, Acuña y Valenzuela, 2010). Las cepas capaces de aumentar su medida de absorbancia, se consideraron posibles bacterias elegibles.

Tolerancia a las sales biliares.

Para esta prueba, se inocularon 20 µL del inóculo estandarizado de cada aislado en 3 mL de caldo MRS (pH: 6,4) suplementado con sales biliares al 0,1 %; 0,15%; 0,3 % y 0,5 % respectivamente. Los tubos obtenidos se incubaron en baño de agua a 37 ± 2 °C, realizando medidas de densidad óptica (DO) a una absorbancia de 560 nm a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12 y 24 horas, para obtener las curvas de crecimiento respectivas (Cueto, Acuña y Valenzuela, 2010). Las cepas que fueron capaces de aumentar su número celular, se consideraron como posibles bacterias elegibles.

Actividad antagónica sobre bacterias de referencia internacional.

Para el desarrollo de esta prueba se utilizaron las siguientes cepas de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 610, *Streptococcus mutans* ATCC 656 y un aislado clínico se muestra identificado como *Salmonella* sp.

Se inocularon tubos con 9 mL de agar MRS fundido y temperado a 45°C con 20 µL del inóculo estandarizado de cada aislado, se mezcló hasta homogenizar y se sirvieron en placas de Petri. Se dejó solidificar el agar y se incubó durante 48 horas a 37°C en microaerobiosis, posteriormente se colocaron 9 µL de una suspensión celular equivalente al patrón 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) obtenida a partir de cada cepa de referencia a evaluar, se permitió que se absorbiera y las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en aerobiosis. Se realizó la lectura de los resultados, observando la presencia o ausencia de crecimiento de la cepa ensayada (Aparicio, 2016).

Pruebas bioquímicas de identificación

La identificación fenotípica de las cepas aisladas, se realizó mediante el sistema de galerías miniaturizado API 50 CH (BioMérieux, Inc., Hazelwood Missouri, E.U.), destinado al estudio del metabolismo de hidratos de carbono para la identificación del género *Lactobacillus* y otros microorganismos próximos (De Roissart y Luquet, 1994). Las galerías están formadas por 50 microtubos distribuidos en 5 columnas, el primer microtubo es el control negativo y los siguientes contienen diferentes azúcares; las cuales son hidratadas con una suspensión estandarizada de la bacteria a identificar (Figura 8). La Lectura e interpretación de las pruebas se realizó por la observación de un viraje del púrpura de bromocresol de morado a amarillo, indicando acidificación del medio, así como, el cambio de color a negro en el microtubo de la prueba esculina. Estos cambios constituyen el perfil bioquímico que es introducido en el programa informático APIWEB® 3,2

(BioMerieux SA, Marcy) para obtener las posibles identificaciones de acuerdo a la similitud con un banco de datos almacenado (Moreno *et al.*, 2011).

Conservación de las cepas aisladas.

Luego de la caracterización de los aislados, se recolectaron, colonias y se inocularon en tubos de caldo MRS y se incubaron en microaerobiosis a 37°C por 48 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante, se conservó el sedimento bacteriano en porciones de 100 µL en tubos Eppendorf con 100 µL de glicerina líquida estéril y se congelaron a -18°C (Salas, 2013).

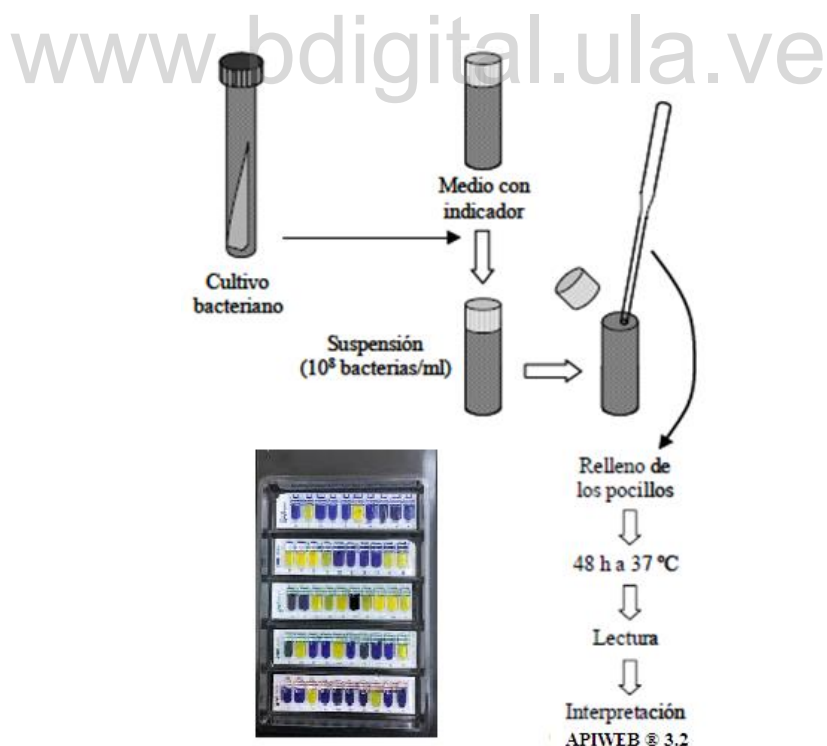


Figura 8: Procedimiento para la identificación bioquímica de los aislados seleccionados.

Diseño de análisis

Los datos que se recolectaron del procesamiento microbiológico y evaluación de la capacidad probiótica *in vitro* de los aislados fueron procesados mediante técnicas de estadística descriptiva y representadas en tablas y gráficos

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Aislamiento e identificación preliminar de los aislados.

En líneas generales, se observó crecimiento abundante en todos los tubos de caldo MRS utilizados para el pre enriquecimiento. A partir de las 5 muestras analizadas se obtuvo un total de 89 aislamientos bacterianos, morfológicamente compatibles con cocos Gram positivos (n=23) y forma bacilar o cocobacilos Gram positivos (n=66). De estos se seleccionaron al azar, 16 colonias a razón de 8 bacilos y 8 cocobacilos, Gram positivos, catalasa negativa.

www.bdigital.ula.ve

Evaluación de la capacidad tecnológica *in vitro* de las cepas de bacterias ácido lácticas.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la evaluación de la capacidad tecnológica de las cepas presuntivamente BAL aisladas a partir de leche de cabra. Se puede observar un predominio de bacterias homofermentativas 12 (75%) respecto a las heterofermentativas 4 (25%). De cuatro aislados heterofermentativos 3 produjeron (6, 11 y 15) gas completamente y uno fue levemente productor de gas (10). Al analizar la actividad proteolítica solo 5 (31,25%) aislados resultaron negativos a la prueba y 8 (50%) presentaron

actividad celulolítica, donde se incluyen los cuatro aislados heterofermentativos (6, 10, 11 y 15).

Tabla 2. Pruebas fisiológicas y bioquímicas para evaluar la capacidad tecnológica de los aislados obtenidos de leche de cabra.

Aislado	Tipo de Fermentación	Actividad proteolítica	Producción de Gas	Actividad celulolítica
1	Homoláctica	+	0	+
2	Homoláctica	+	0	-
3	Homoláctica	-	0	+
4	Homoláctica	-	0	-
5	Homoláctica	-	0	-
6	Heteroláctica	-	4	+
7	Homoláctica	-	0	+
8	Homoláctica	+	0	-
9	Homoláctica	+	0	-
10	Heteroláctica	+	2	+
11	Heteroláctica	+	4	+
12	Homoláctica	+	0	-
13	Homoláctica	+	0	-
14	Homoláctica	+	0	-
15	Heteroláctica	+	4	+
16	Homoláctica	+	0	+

Evaluación de la capacidad probiótica *in vitro* de las cepas de bacterias ácido lácticas.

Para la evaluación de las propiedades probióticas se seleccionaron 8 cepas; cuatro homolácticas y cuatro heterolácticas, tomando en cuenta los resultados de las pruebas tecnológicas. Una vez desarrolladas las curvas de crecimiento y obtenidos los valores de absorbancia en el tiempo, se construyeron las gráficas para cada aislado, como se muestra en las figuras 9 hasta la 16. Todas las cepas presentaron una fase de adaptación prolongada promedio de 4,5 horas, característica del género *Lactobacilos* para luego comenzar la fase de crecimiento exponencial hasta alcanzar una densidad óptica promedio de 1,644 a las 24 horas, correspondiente a un conteo aproximado de 4×10^{11} UFC/mL. Solo el aislado 15 presentó las medidas de absorbancia más bajas alcanzando una D.O. de 1,088 a las 24 horas.

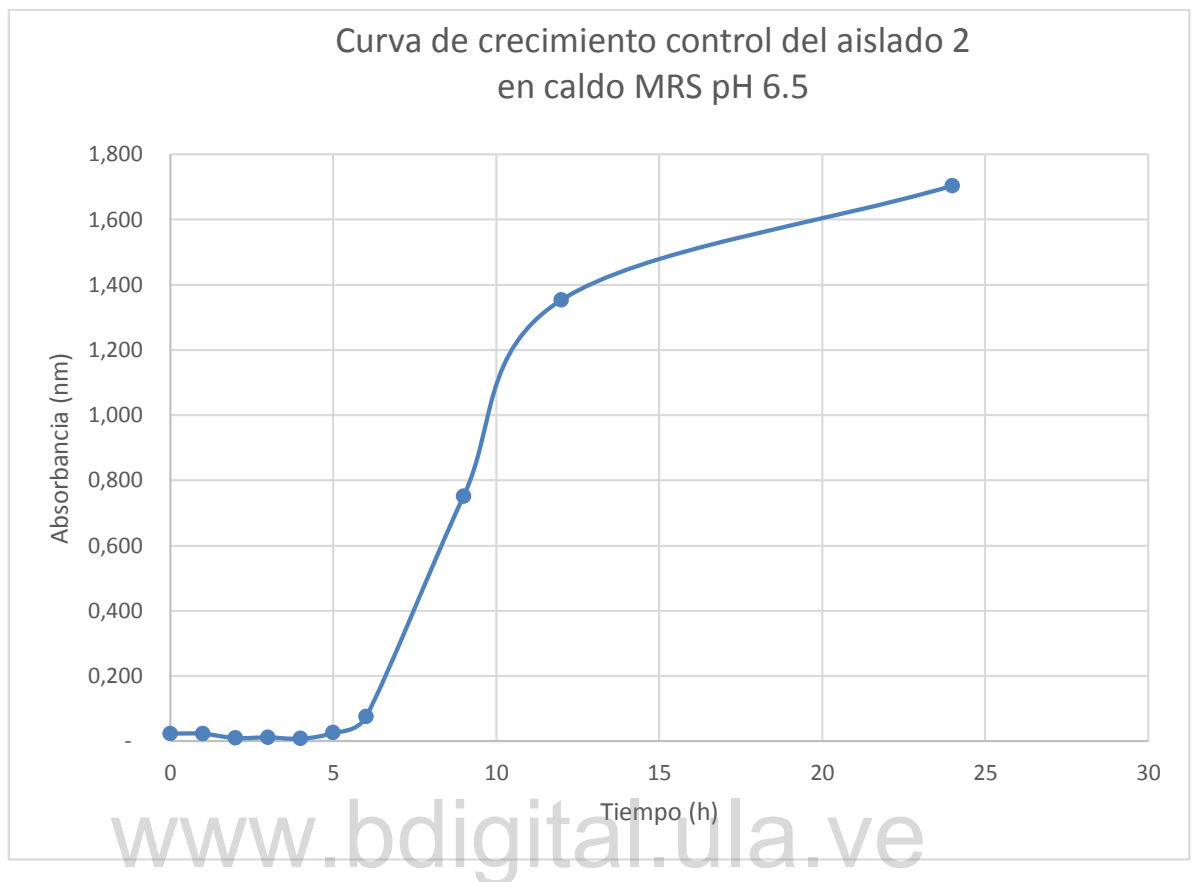


Figura 9: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 2 en caldo MRS pH 6,5

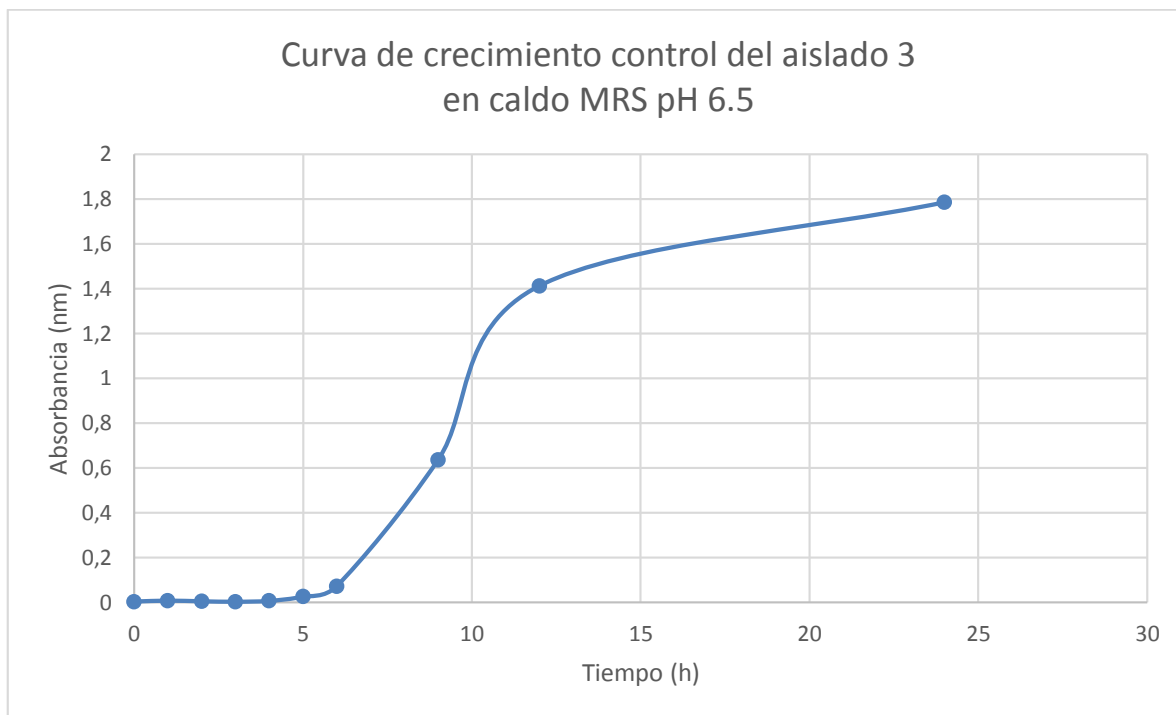


Figura 10: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 3 en caldo MRS pH 6,5

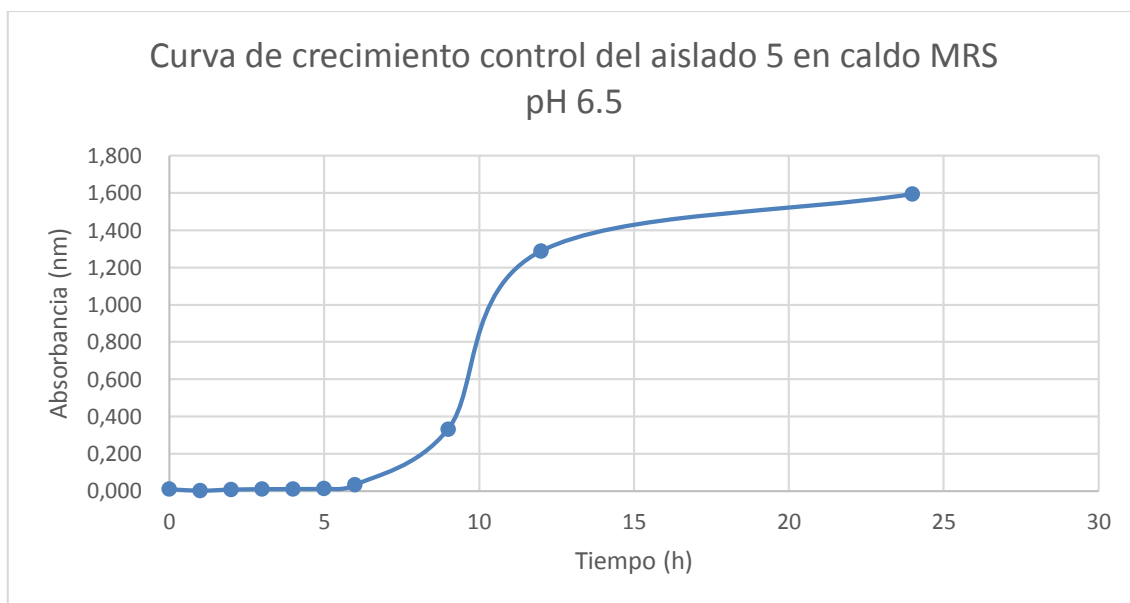


Figura 11: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 5 en caldo MRS pH 6,5

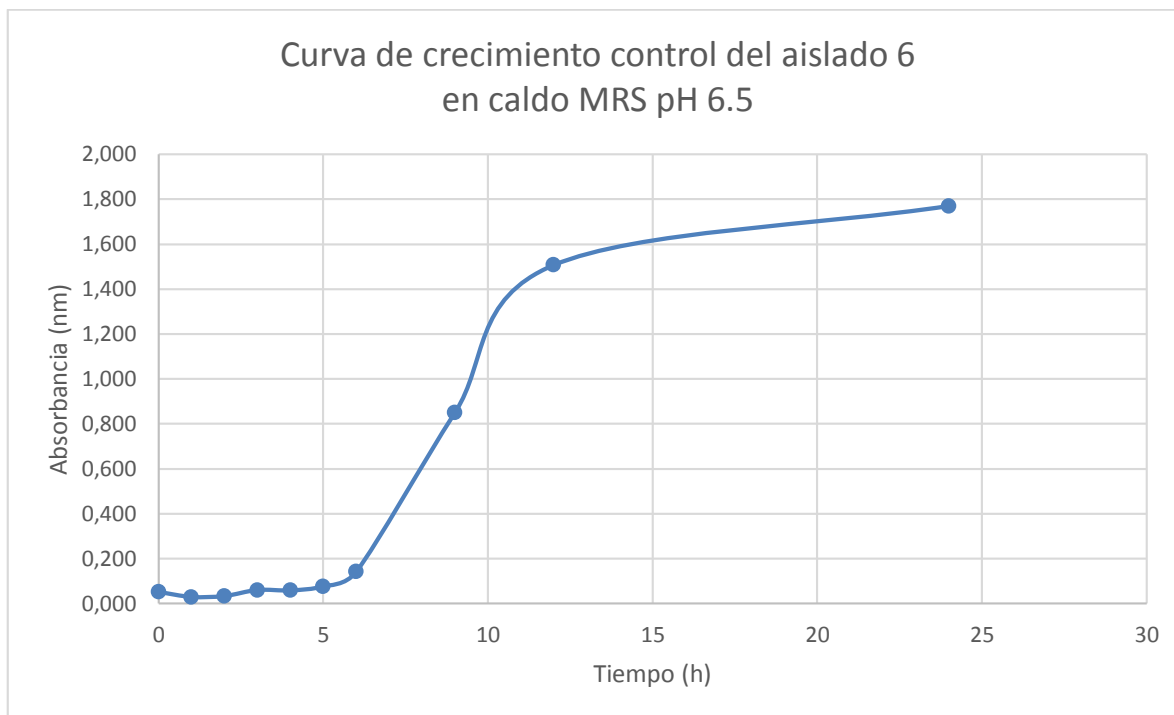


Figura 12: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 6 en caldo MRS pH 6,5

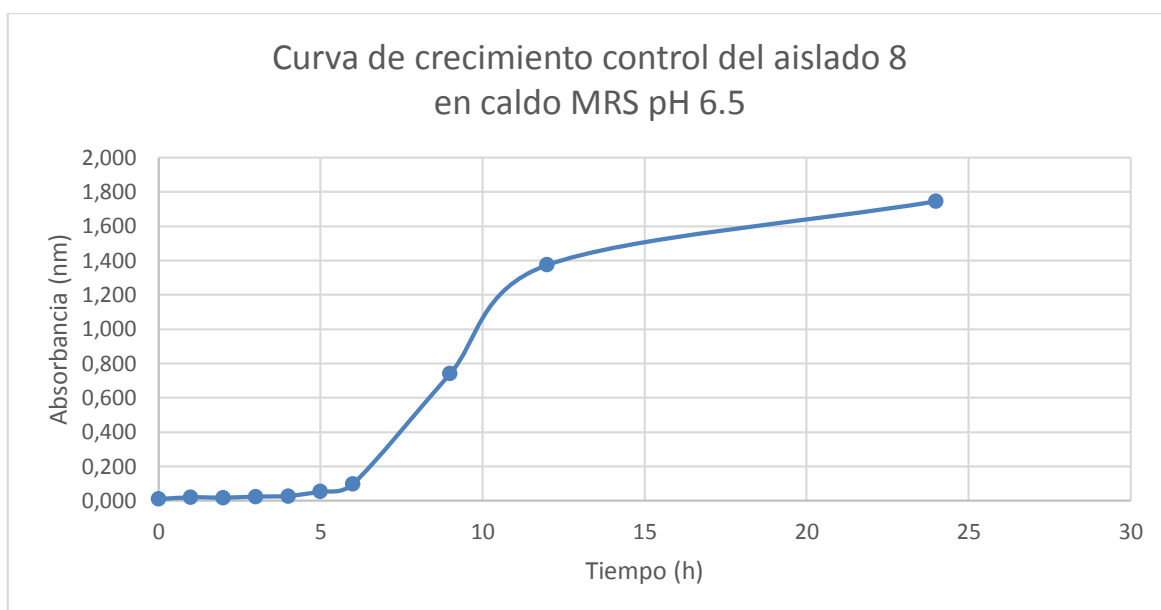


Figura 13: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 8 en caldo MRS pH 6,5

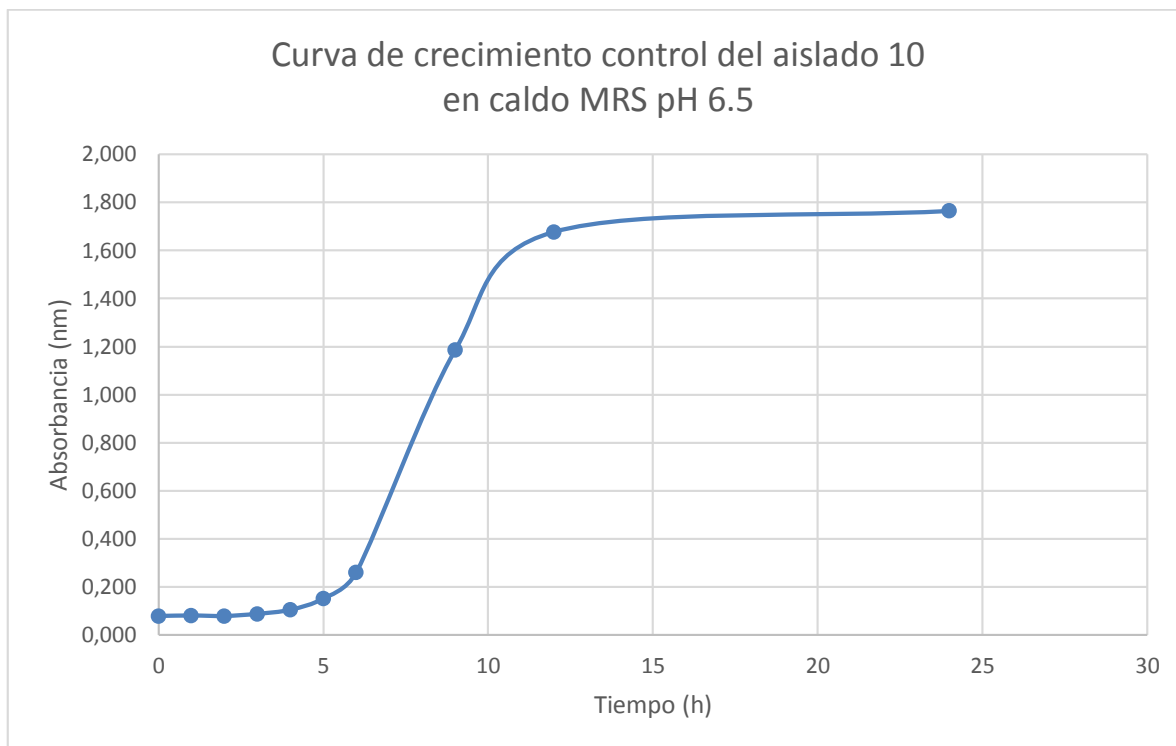


Figura 14: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 10 en caldo MRS pH 6,5

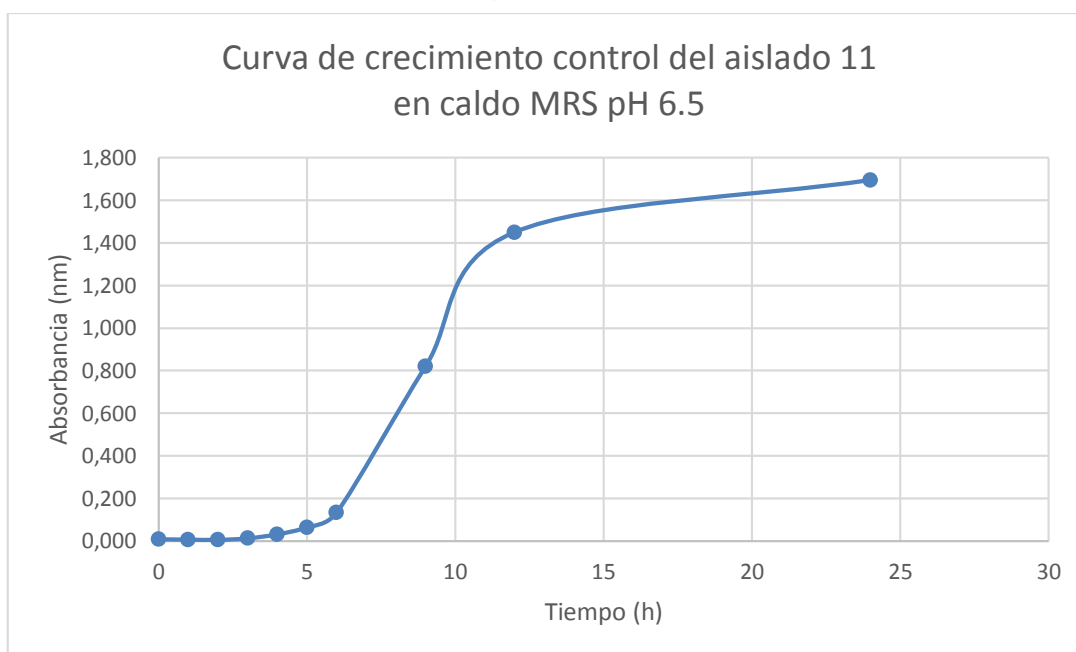


Figura 15: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 11 en caldo MRS pH 6,5

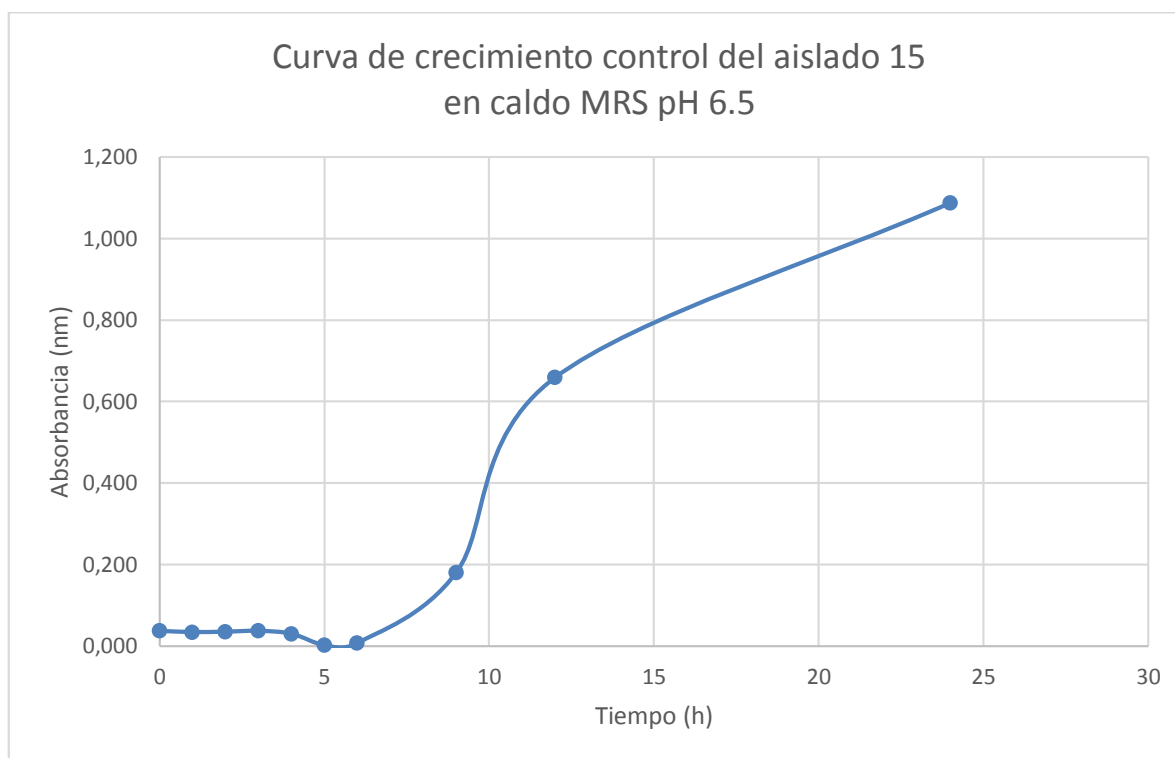


Figura 16: Curva de crecimiento en caldo MRS pH 6,5 obtenidas para el aislado 15 en caldo MRS pH 6,5

Determinación de la Resistencia a lá acidez gástrica.

Una de las pruebas que deben superar los microorganismos para ser considerados probióticos, es lograr mantenerse viables durante su paso por el estómago y la presencia de los ácidos gástricos. Las figuras 17 a la 24, muestran el comportamiento de las cepas en estudio, al ser cultivadas en caldo MRS ajustado a los cuatro pH evaluados. Se obtuvo una DO promedio a las 24 horas de 0,354 para pH2; 0,450 para pH3 y 0,567 para pH4, frente a una DO de 1,644 en condiciones normales es decir a pH 6,5. Puede observarse que los aislados lograron desarrollar una curva de crecimiento similar a la obtenida en condiciones normales, pero con medidas de absorbancia mucho

más bajas, lo que indica que su crecimiento es afectado por las variaciones de pH, evidenciándose los menores contajes a pH 2. Solo se observó un comportamiento diferente en el aislado 15 donde se obtuvieron valores de DO superiores a la curva control en los cultivos de MRS ajustado a pH4. Sin embargo, es importante destacar que a pesar de que no alcanzan contajes cercanos al crecimiento de la curva control, estos se mantienen viables en el tiempo, mostrando la capacidad a resistir la acidez durante tiempos prolongados. Parámetro esperado para ser consideradas potencialmente probióticas.

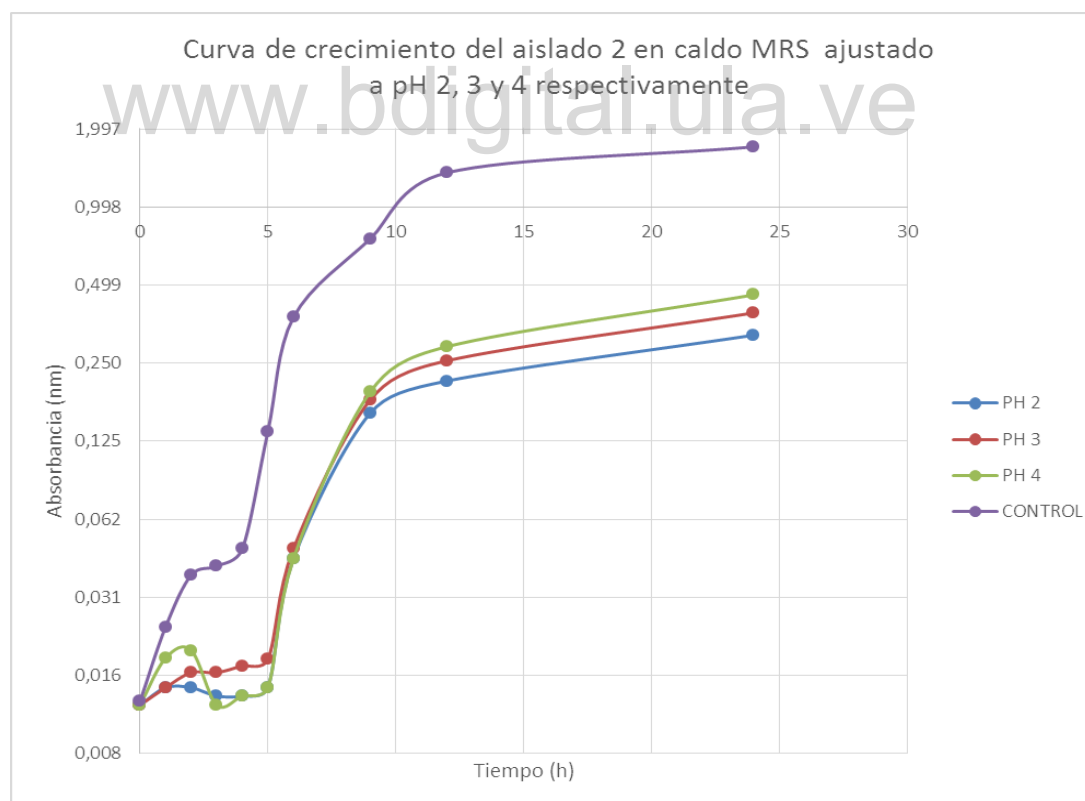


Figura 17: Curva de crecimiento del aislado 2 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

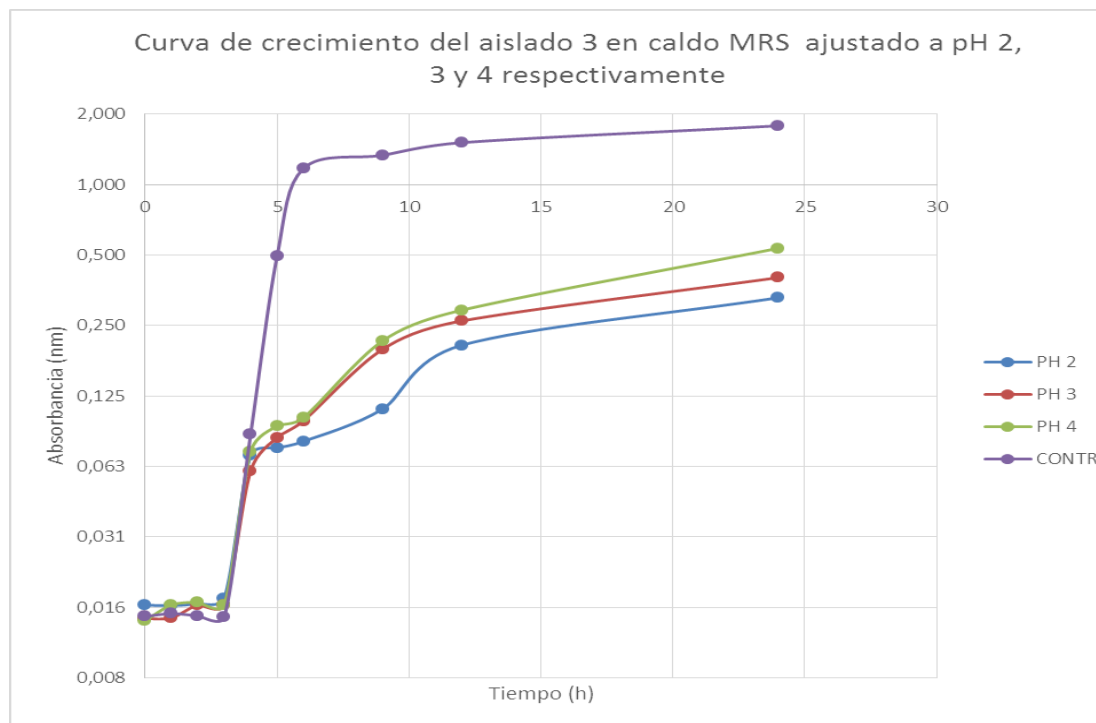


Figura 18: Curva de crecimiento del aislado 3 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

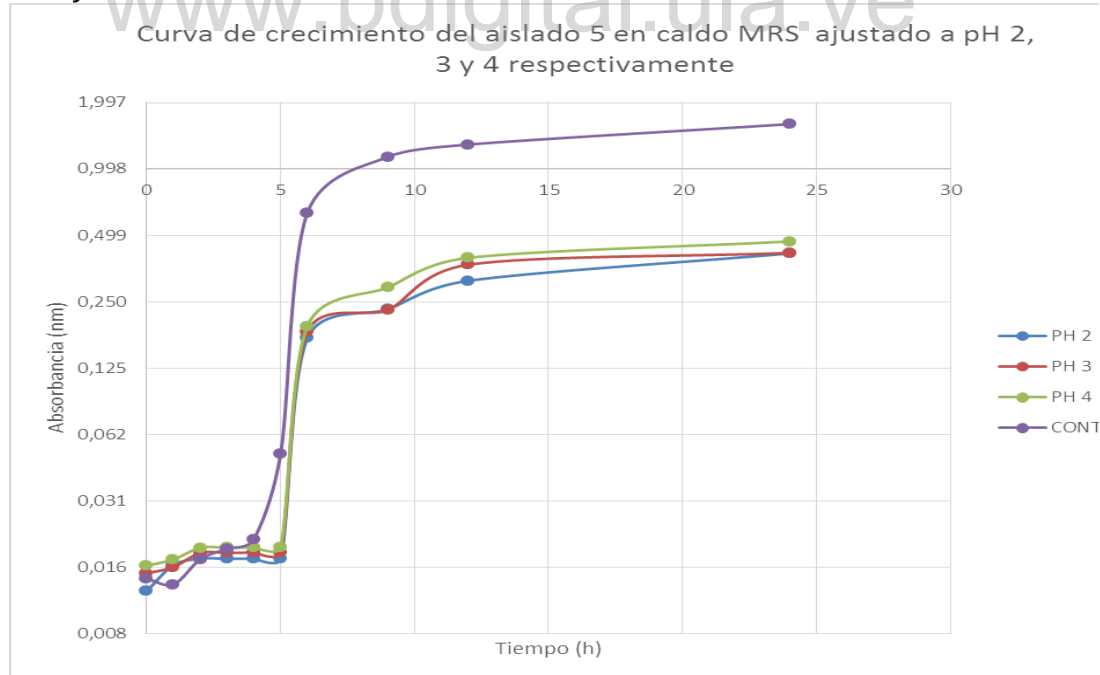


Figura 19: Curva de crecimiento del aislado 5 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

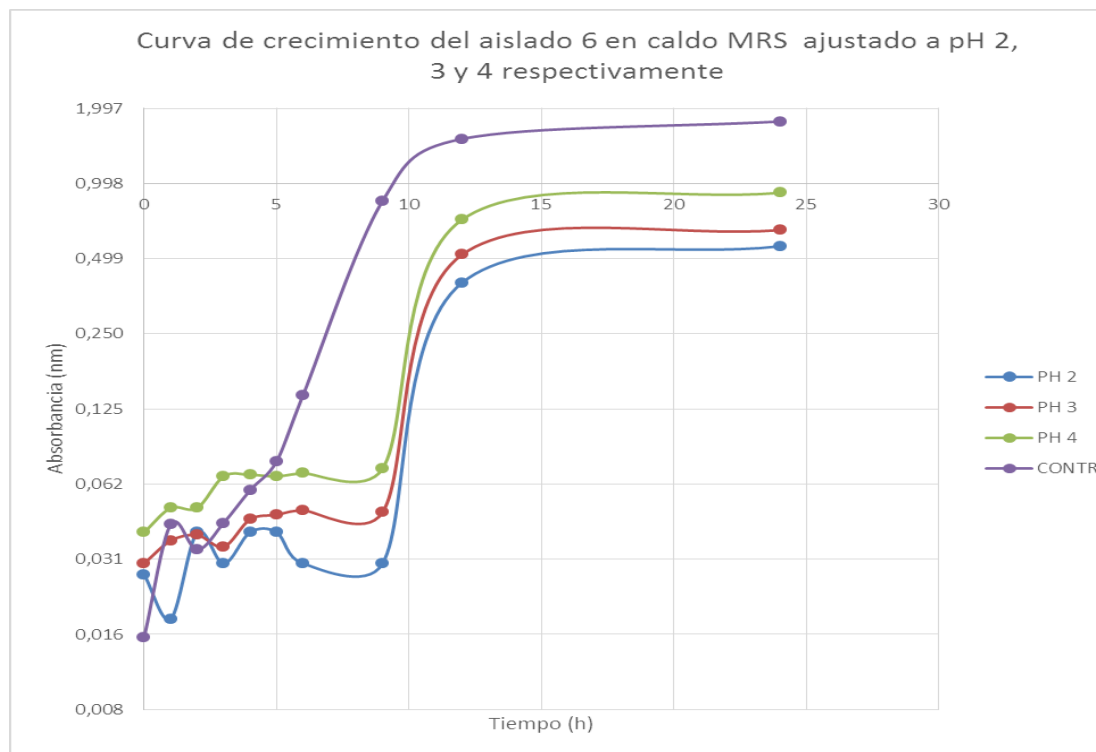


Figura 20: Curva de crecimiento del aislado 6 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

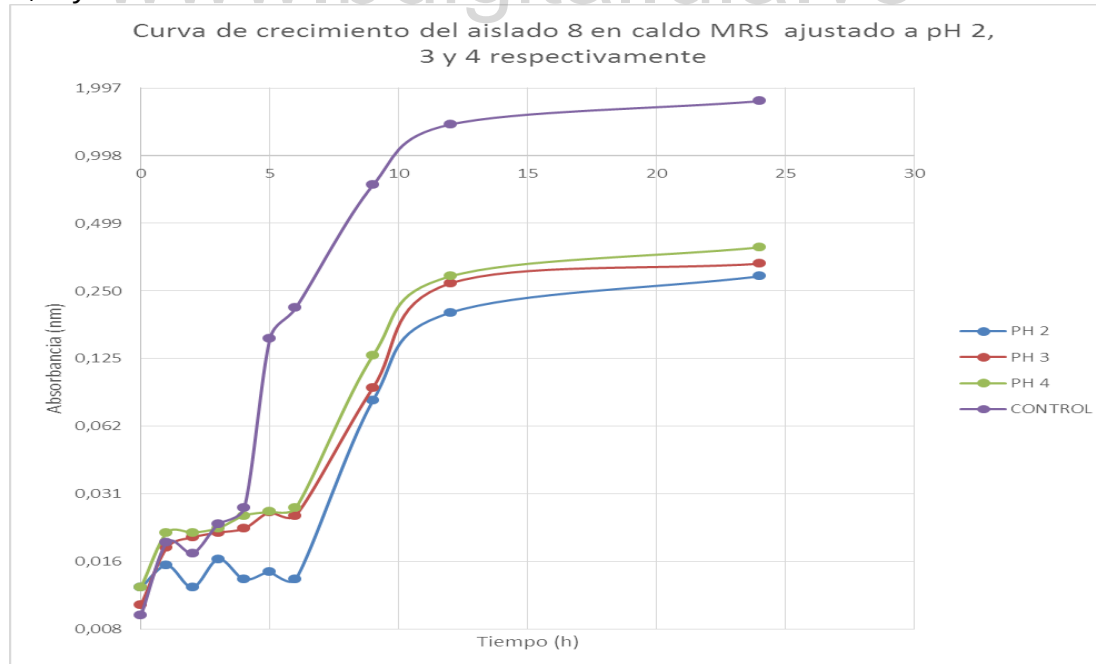


Figura 21: Curva de crecimiento del aislado 8 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

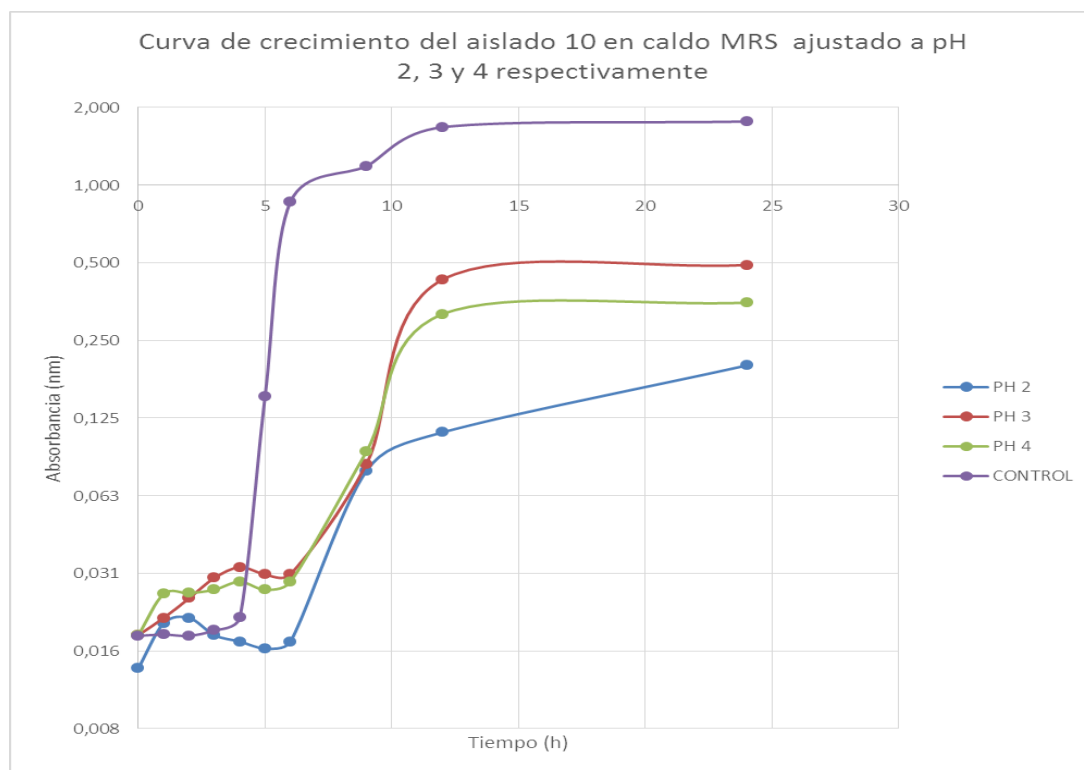


Figura 22: Curva de crecimiento del aislado 10 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

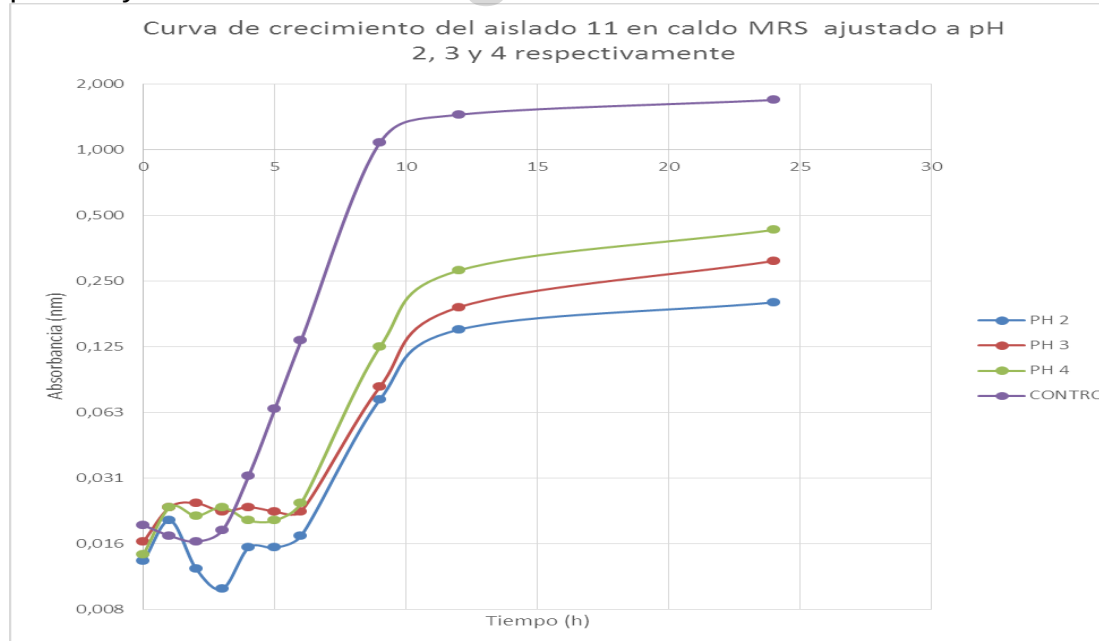


Figura 23: Curva de crecimiento del aislado 11 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

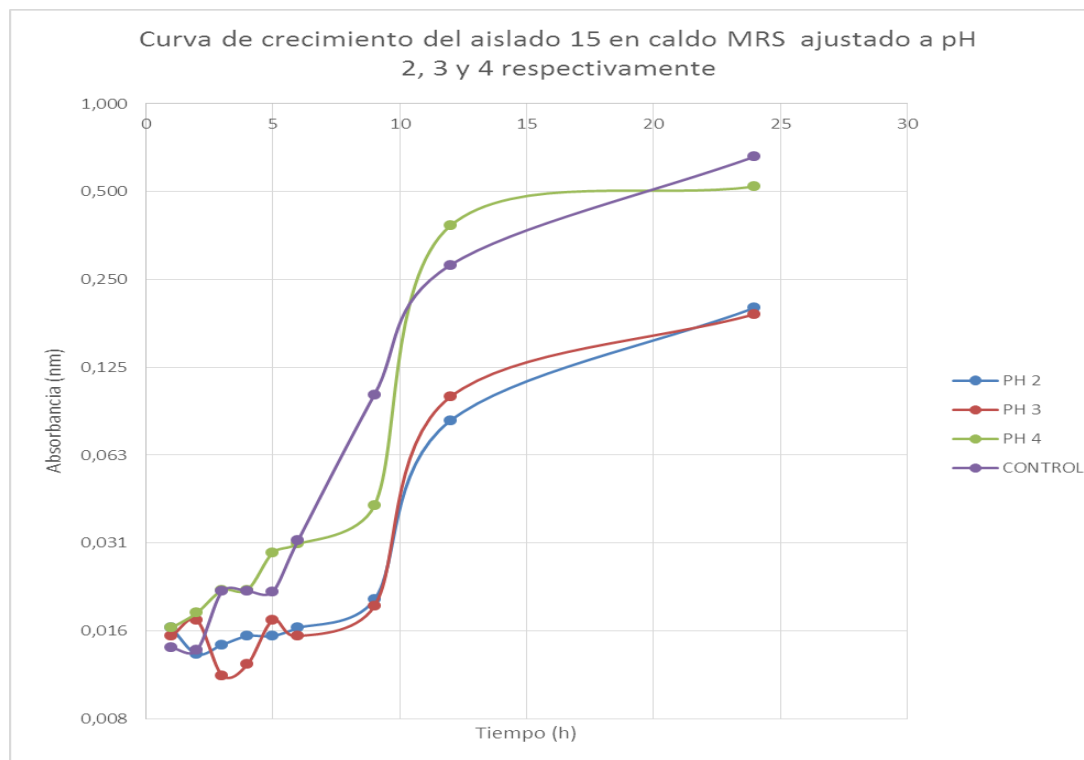


Figura 24: Curva de crecimiento del aislado 15 en caldo MRS ajustados a pH 2, 3 y 4.

Determinación de la Tolerancia a las sales biliares.

Una vez que el microorganismo logra superar la barrera gástrica, se encuentra con otros agentes inhibidores representados por las sales biliares. Los resultados obtenidos en el laboratorio fueron transformados a gráficas, las cuales se muestran en las figuras 25 a 32. Gráficamente, puede observarse que todas las cepas conservan la fase de adaptación característica del género *Lactobacillus* para luego comenzar la fase de crecimiento exponencial, con valores de absorbancia cercanos a la curva control, conservando una pequeña distancia a medida que aumenta la concentración de sales biliares.

Con respecto a los valores de DO alcanzado a las 24 horas, puede observarse una relación inversamente proporcional, ya que a medida que aumenta la concentración de sales biliares disminuye el valor de absorbancia, es así que los valores promedio obtenidos fueron 1,553 para 0,05%; 1,475 0,10%; 1,305 0,15% y 1,173 0,30% de sales biliares con respecto a un control de 1,644, siendo el aislado 15 el cual mostró D.O. más bajas.

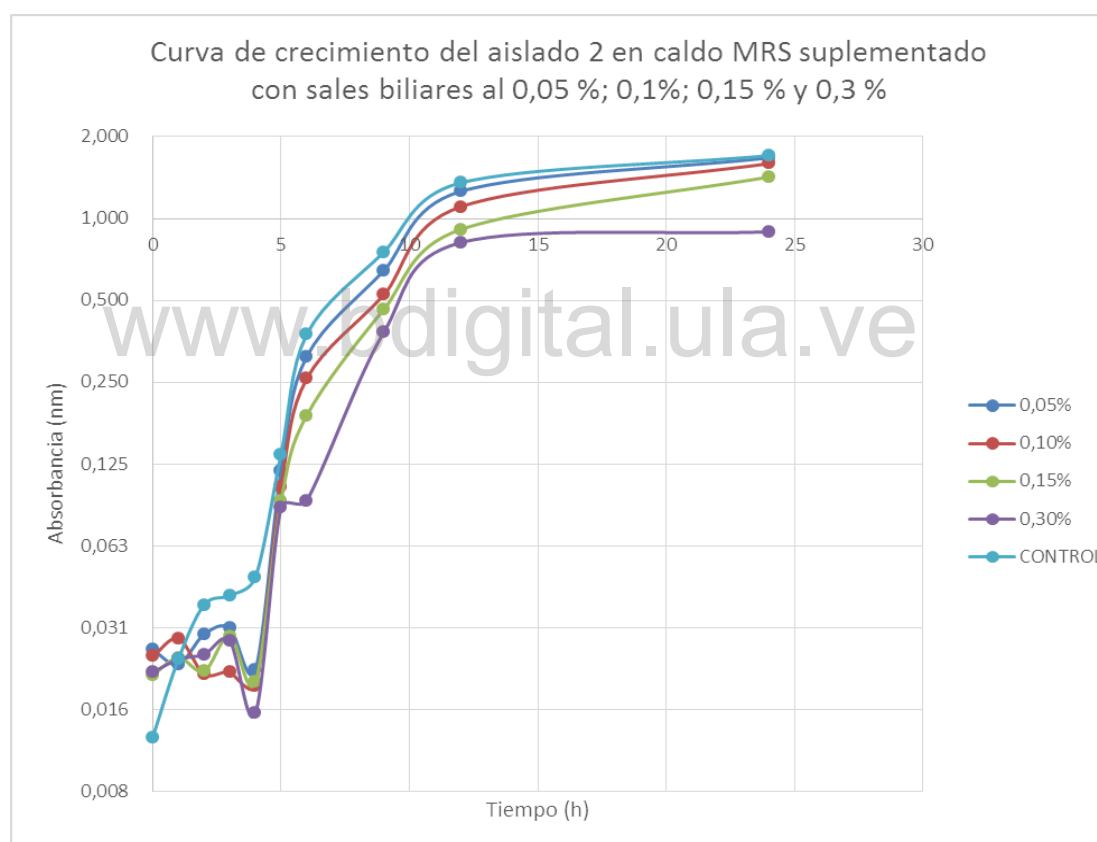


Figura 25: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 2 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

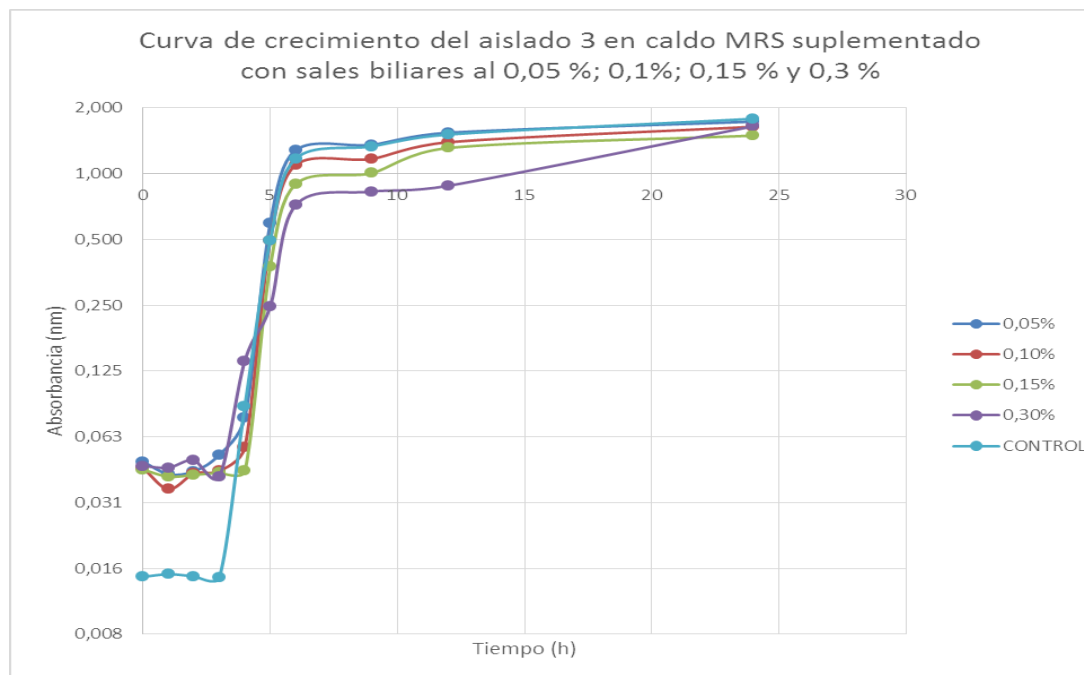


Figura 26: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 3 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

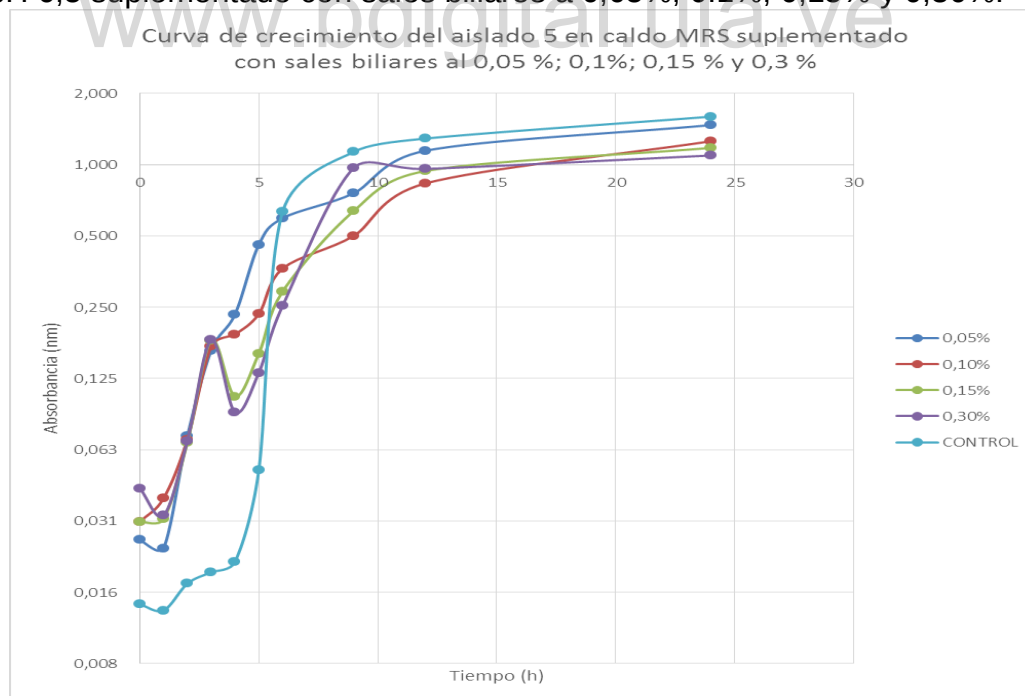


Figura 27: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 8 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

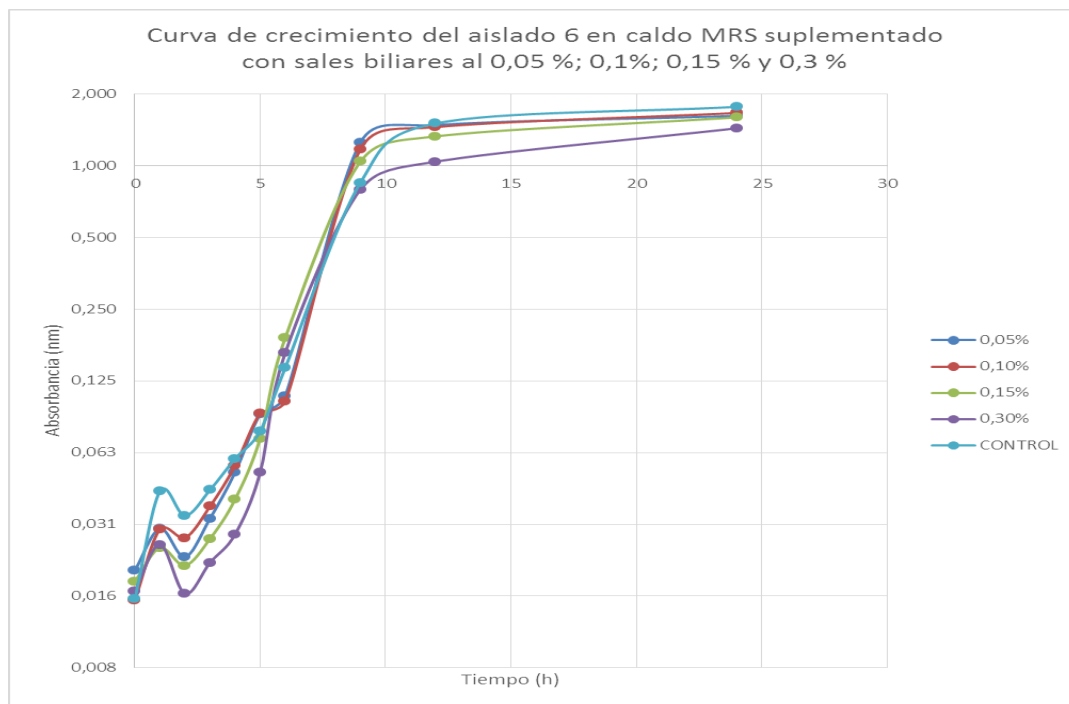


Figura 28: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 6 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

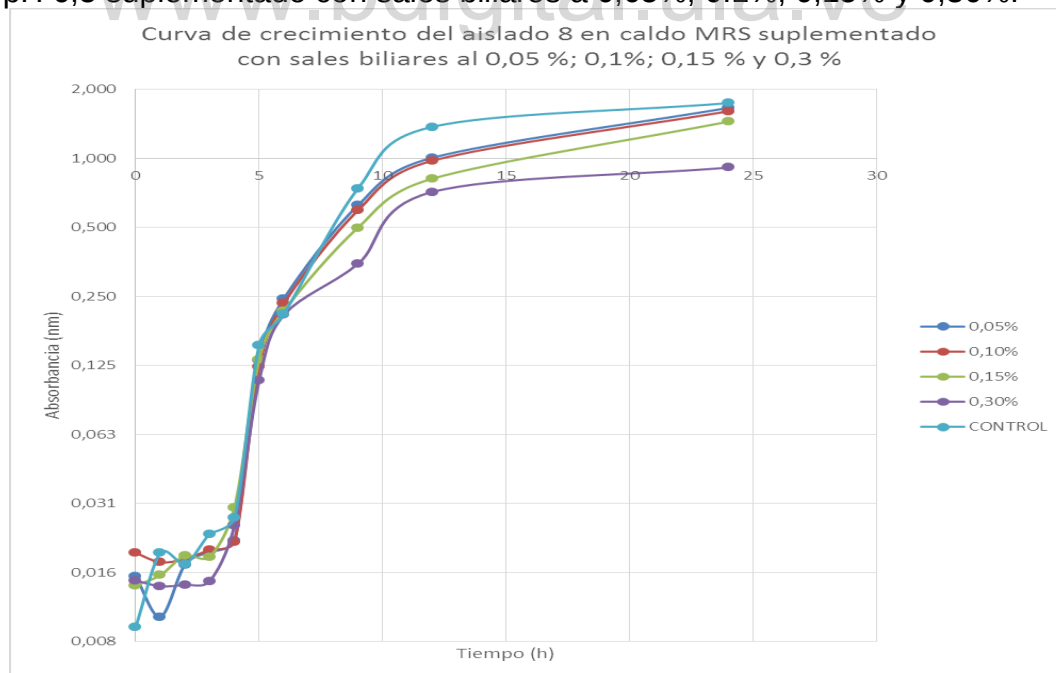


Figura 29: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 8 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

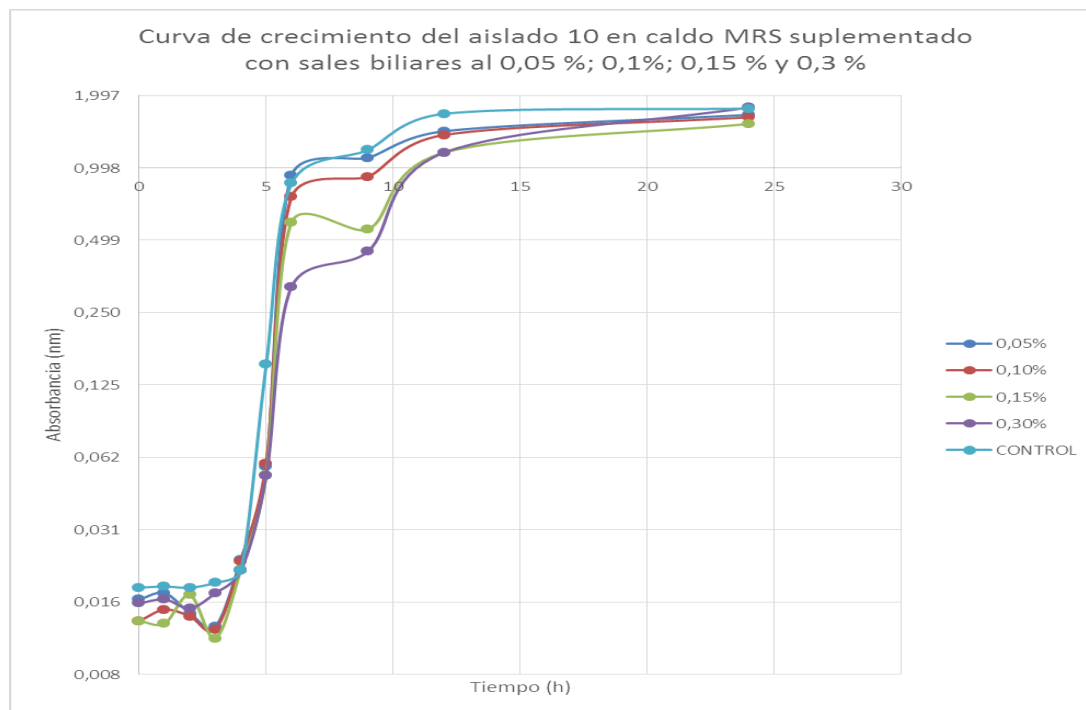


Figura 30: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 10 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

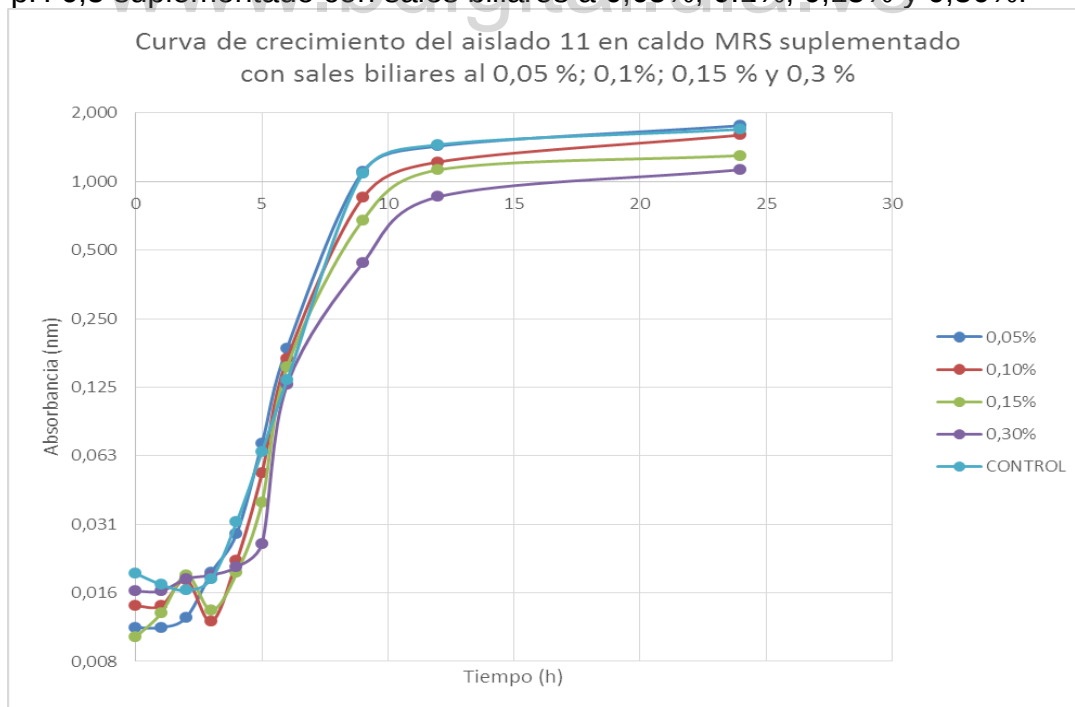


Figura 31: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 11 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

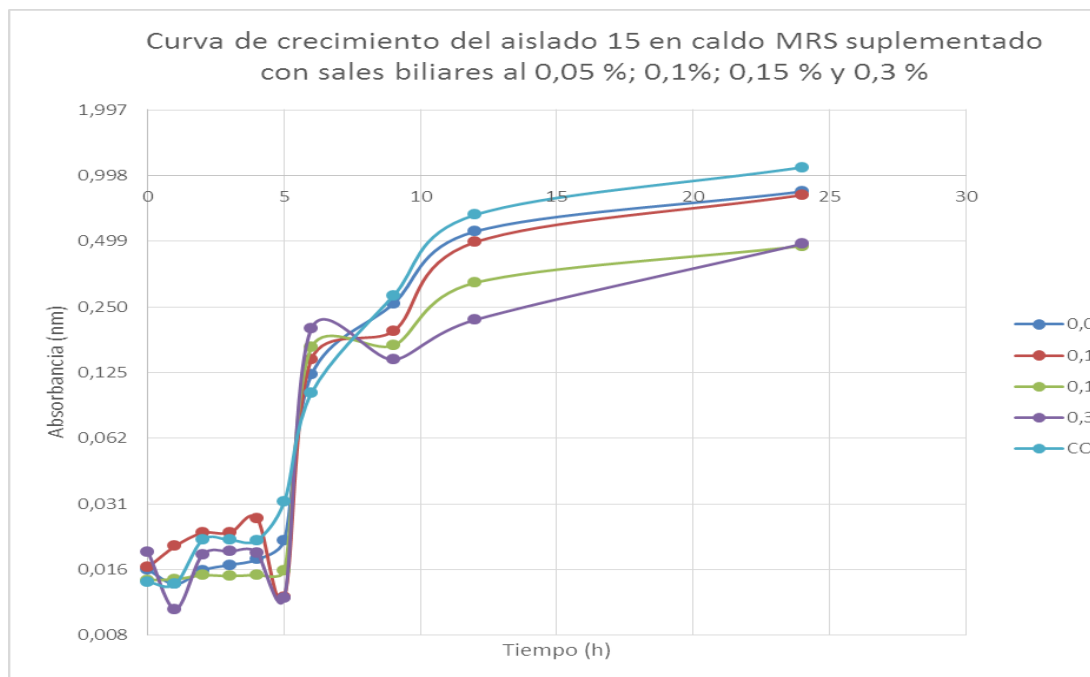


Figura 32: Curva de crecimiento obtenidas para el aislado 15 en caldo MRS pH 6,5 suplementado con sales biliares a 0,05%, 0,1%, 0,15% y 0,30%.

Actividad antagónica de las BAL sobre bacterias de referencia internacional.

El antagonismo microbiano se refiere a la competencia entre los microorganismos, esta competencia resulta beneficiosa para el individuo, pues su microbiota evita el crecimiento de patógenos mediante procesos como producción de sustancias que afectan la colonización de estos, cambios de pH y disponibilidad de oxígeno y nutrientes (Salas 2013).

Luego de realizar el procedimiento experimental y esperar los tiempos de resolución, los resultados se plasmaron en la tabla 3. Los aislados 10 y 11 no presentaron actividad antagónica contra ninguno de los monitores biológicos utilizados, mientras que los aislados 5, 6 y 8 mostraron actividad antagónica

contra el 75%. El resto de aislados presentaron actividades intermedias, siendo del 50% para el aislado 1; los aislados 2, 3 y 15 presentaron tanto actividad total como parcial ante tres bacterias de referencia (tabla 4).

Tabla 3. Actividad antagónica de los aislados en estudio frente a bacterias de referencia internacional.

Aislados	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)		<i>Salmonella</i> sp Aislado clínico		<i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 610),		<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 656)	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
2	-	+	-	**	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	*
3	-	+	-	*	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	*
5	+	+	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	-	-	-	**	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+

+ Crecimiento, - Inhibición, * Crecimiento disminuido, ** Colonias pequeñas

Los aislados 5, 6 y 8 expresaron mayor actividad antagónica contra las bacterias Gram positivas: *S. aureus* (ATCC 25923), *S. mutans* (ATCC 656), *L. acidophilus* (ATCC 610) y las Gram negativas *E.coli* (ATCC 35218) y *P.*

aeruginosa (ATCC 27853), *Salmonella* sp. (Aislado clínico), aunque no presentaron inhibición en *E. coli* (ATCC 25922) y en *E. fecalis* (ATCC 29212).

Tabla 4. Actividad antagónica de los aislados en estudio frente a bacterias patógenas según el número de monitores biológicos implicados en un tipo de inhibición.

Aislado	Actividad Antagónica					
	Inhibición total		Inhibición parcial		Ausencia de Inhibición	
	n	%	n	%	n	%
2	1	12,5	2	25,0	5	62,5
3	1	12,5	2	25,0	5	62,5
5	6	75,0	1	12,5	1	12,5
6	6	75,0	1	12,5	1	12,5
8	6	75,0	1	12,5	1	12,5
10	0	0,0	0	0,0	8	100,0
11	0	0,0	0	0,0	8	100,0
15	1	12,5	1	12,5	6	75,0

n= monitores biológicos implicados en el tipo de inhibición.

Pruebas bioquímicas de identificación

Por último, concluidas las pruebas tecnológicas y probiótica se procedió a realizar la selección de los tres mejores aislados en función los resultados mostrados en la tabla 6 y a la cantidad de galerías API disponibles. La tabla 5

muestra el resultado de la identificación bioquímica mediante el sistema de galerías API 50CH y el programa computarizado ApiWeb de los aislados 5, 6 y 8.. Se obtuvieron tres especies diferentes *Lactobacillus plantarum* actualmente reconocido como *Lactiplantibacillus plantarum* es una bacteria de la familia *Lactobacillaceae*. Por su parte, *L. acidophilus* forma parte de la microbiota humana natural y por último, *Lactobacillus casei*, es una bacteria que posee el estatus GRAS.

Tabla 5. Identificación bioquímica de los aislados seleccionados.

Cepa	Identificación bioquímica	Porcentaje de confiabilidad
Control		
ATCC 8014	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9%
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	96.0%
6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 2	97.0%
8	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	97.9%

Tabla 6. Compendio de pruebas tecnológicas y probiótica de los tres aislados seleccionados para la identificación bioquímica.

Aislado	Prueba		DO 24 h	Actividad proteolítica	Actividad celulolítica	Tipo de Fermentación	Producción de Gas	Antagonismo sobre Gram positivos	Antagonismo sobre Gram negativos	Bacterias resistentes
5	acidez	pH2	0,414	Negativa	Negativa	Homoláctica	0	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella sp</i>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Enterococcus faecalis</i>
		pH 3	0,416							
		pH 4	0,469							
	Sales biliares	0,05%	1,470							
		0,10%	1,256							
		0,15%	1,178							
		0,30%	1,093							
	Curva de crecimiento control		1,596							
6	acidez	pH2	0,560	Negativa	Positiva	Heteroláctica	4	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella sp</i>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Enterococcus faecalis</i>
		pH 3	0,650							
		pH 4	0,917							
	Sales biliares	0,05%	1,622							
		0,10%	1,669							
		0,15%	1,599							
		0,30%	1,439							

		Curva de crecimiento control	1,771							
8	acidez	pH2	0,290	Positiva	Negativa	Homoláctica	Negativa	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Salmonella</i> sp	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 25922)
		pH 3	0,330							
		pH 4	0,390							
	Salas biliares	0,05%	1,664							
		0,10%	1,608							
		0,15%	1,449							
		0,30%	0,913							
	Curva de crecimiento control		1,745							

CAPITULO V

DISCUSIÓN

El hombre requiere ingerir frecuentemente alimentos para garantizar su subsistencia y por ende la perpetuidad de su especie, tal necesidad le ha llevado a descubrir innumerables tipos de alimentos y a transformarlos para hacerlos más duraderos. Como mamífero desde antes de su nacimiento, la madre sabe que cuenta con el alimento principal que garantizara su nutrición, sin embargo, en muchos casos la demanda supera la disponibilidad, por lo que hace necesario recurrir a leche de otros orígenes, particularmente leche vacuna para asegurar la alimentación de la cría (Salas 2013, Saxena, 2015). La incorporación de la leche vacuna y sus derivados a la dieta de los humanos data de tiempos inmemoriales, pese a esto, actualmente se reconocen efectos nocivos tanto ambientales como en la salud del consumidor, lo que ha derivado en el estudio de leche de otros mamíferos como la cabra como una posible alternativa nutricional y de microorganismos que no solo participan en la transformación de la materia prima a través de la excreción de metabolitos, sino que también contribuyen al restablecimiento del equilibrio de la microbiota del ser vivo que lo consume favoreciendo su estado de salud tales afirmaciones son avaladas por autores como Halein 2004, Sanz 2007 y Kumar, 2016, en un todo con la revisión exhaustiva de numerosos artículos de investigación que lo soportan.

En la caracterización preliminar de los aislados los resultados obtenidos en esta investigación mostraron comportamientos fisiológicos muy heterogéneos. Para el tipo de fermentación se obtuvo un 75% de bacterias homofermentativas, resultados que se corresponden con los hallazgos realizados por Salas 2004, Moreno *et al.* 2011; Zapata 2017 y Hernández *et al.* 2018 quienes observaron prevalencia de bacterias homolacticas al investigar la presencia de lactobacilos en diferentes muestras de alimentos o fluidos biológicos sanos. Por otra parte, solo los aislados 6,10, 11 y 15 fueron heterofermentativos con pruebas positivas para la producción de gas, cualidades muy útiles cuando se busca un queso madurado como Gruyère,

Emmental y Gouda y en quesos azules donde la presencia de cavidades aireadas son necesaria para permitir el desarrollo de los hongos (Chamba y Perréard, 2002), en contraposición a los posibles efectos en quesos frescos donde producción de gas no es deseable ya que suele asociarse con condiciones de higiene deficientes durante el proceso (Fox *et al.*, 2017).

La presencia de actividad proteolítica es comúnmente reportada para cepas obtenidas de fuentes naturales (González *et al.*, 2010); aunque el género *Lactobacillus* no se considera fuertemente proteolítica, su sistema proteolítico es esencial para el óptimo crecimiento en la leche y contribuye significativamente en el desarrollo del sabor en productos lácteos fermentados, por otra parte, la proteólisis contribuye a prevenir las alergias producidas por la mala digestión de las proteínas de la leche y muy frecuente en niños menores de 3 años. (Lopez-Kleine y Monnet, 2011; García-Cano *et al.*, 2019). En las pruebas de actividad proteolítica, el 68,75% de los aislamientos fueron positivos; resultados que se asemejan a los obtenidos por Morais 2004; Olivera 2011; Moulay, Benlahcen y Kihal, 2013 quienes reportan aislamientos de especies de *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* con capacidad proteolítica superiores al 50%.

Las BAL forman parte de la microbiota habitual del tracto gastrointestinal de los rumiantes, y se comportan como una gran maquina digestora de los forrajes que consumen para transformarlos en energía; una característica tecnológica de interés en el área de la alimentación animal es la actividad celulolítica, los inoculantes microbiales para ensilaje son seleccionados por sus propiedades biotecnológicas a partir de BAL que se aplican para dominar la fermentación natural del cultivo que está ocurriendo en el silo o sustrato, logrando controlar su entorno producen ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (Contreras y Marsalis y Leonard, 2009). La capacidad de producir enzimas celulolíticas por parte de los lactobacilos, otorga un valor agregado y los posiciona como posibles ingredientes en los inoculantes utilizados para controlar el proceso de conservación de los silajes; en este trabajo, el 50% de los aislados mostraron poseer la capacidad de degradar la celulosa, y por ende transformarla en un producto con mayor biodisponibilidad para

el metabolismo de los rumiantes (Contreras, Marsalis y Leonard, 2009; Quiñones, Cardona y Castro, 2020).

En otro orden de ideas, cuando se busca un microorganismo con potencial uso biotecnológico, se plantea la determinación de parámetros que satisfagan ciertas necesidades, que garanticen producciones apropiadas en los menores tiempos, y permitan evaluar las variaciones cinéticas al cambiar las condiciones de cultivo (Neubeck *et al.*, 2015; Arana, Orruño y Barcina, 2012). Sin embargo, desde el punto de vista probiótico, para que un microorganismo ejerza su función probiótica es necesario que sea capaz de colonizar el intestino delgado, pero antes de llegar a ese destino, el microorganismo debe superar el estrés generado por el bajo pH del estómago y luego por el contacto con las sales biliares. Existen numerosas metodologías para demostrar *in vitro* la resistencia de los microorganismos a la acidez gástrica y a las sales biliares; sin embargo, es ampliamente reconocido que sus resultados solo son un acercamiento a la realidad gastrointestinal, ya que los microorganismos probióticos por lo general ingresan al tracto intestinal inmersos en una matriz alimentaria o un producto farmacéutico que les protege de la adversidad gastrointestinal (Salas, 2013). A partir de las curvas de crecimiento obtenidas tanto en condiciones normales como bajo condiciones selectivas de pH y presencia de sales biliares evaluados en este trabajo, es posible observar que cada aislado posee comportamientos propios y únicos, lo que permite inferir que pudieran pertenecer a diferentes especies. Una investigación realizada por Ramírez y Vélez, 2016 destacó que la selección de microorganismos, es muy importante obtener las curvas de crecimiento, ya que estas nos permiten evaluar el comportamiento del aislado en el tiempo y determinar variaciones importantes como por ejemplo, la extensión de la fase de adaptación y los contajes microbianos; parámetros útiles a la hora del diseño de un cultivo iniciador o un alimento funcional; así como su selección mediante las propiedades biotecnológicas que garanticen su implantación y colonización del sitio de acción y lograr el restablecimiento de la eubiosis a través de la excreción de metabolitos útiles (Contreras, Marsalis y Leonard, 2009).

Entre las funciones que se le atribuyen a las BAL destacan la producción de sustancias inhibidoras contra posibles competidores o patógenos; tales sustancias no deben ser tóxicas, ni producir metabolitos secundarios en células eucariotas (Parra Huertas, 2010; Saxena, 2015; Heredia-Castro, 2017). Numerosos estudios evalúan la actividad antagónica de las BAL aisladas de diversas fuentes, en esta investigación la mayor capacidad antagónica se evidenció en los aislados 5, 6 y 8; Un estudio realizado por Estrada, Gutiérrez y Montoya (2005), en Colombia, determinó que los extractos crudos y centrifugados de *L. plantarum* poseen actividad antibacteriana sobre cepas de *Salmonella* sp. y *E. coli*; presentando *L. plantarum* una mayor inhibición del crecimiento bacteriano respecto a *L. brevis*, dicho comportamiento se corresponde con lo observado en los aislados 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 16, que presentaron menor actividad antagónica y los aislados 1, 2, 3, 4 y 15 los cuales presentaron mediana actividad contra las bacterias de referencia evaluadas; lo que ratifica la coexistencia de BAL con alta y baja actividad antagónica que potencia la acción bactericida frente a patógenos bacterianos (Serna y Cock, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Se obtuvieron tres especies diferentes de *Lactobacillus*. *L. plantarum* actualmente *Lactiplantibacillus plantarum* comúnmente encontrado en productos fermentados (Marakova *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2020), y reconocido como un excelente antagonista de numerosas bacterias (Lim *et al.* 2020) formando parte los lactobacilos más utilizadas en el área de la salud por sus reconocidas propiedades probióticas (Bosch 2011). Por su parte, *L. acidophilus* forma parte de la microbiota humana natural, ha sido aislado de cavidad bucal, aparato digestivo y vagina; es una de las principales especies comerciales de BAL disponible en productos que incluyen leche, yogur, fórmulas infantiles y suplementos dietéticos con efectos probióticos. (Bull, Plummer, Marchesi y Mahenthiralingam 2013). Y por último, *Lactobacillus casei*, es una bacteria que posee el estatus GRAS, además de catalogarse como probiótico, actúan directa o indirectamente sobre bacterias patógenas Gram-negativas en el tubo digestivo, actuando por competición física o

de nutrientes, por secreción de bacteriocinas, producción de ácidos o por inmunidad cruzada (Jurado-Gámez *et al.*, 2014)

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 89 aislados de las cinco muestras de leche de cabra no pasteurizada, donde morfológicamente 23 (25%) fueron cocos Gram positivos y 66 (75%) fueron bacilos y cocobacilos Gram positivos.
- De los 16 aislados seleccionados al azar, el 75% fue homofermentativo y el 25% heterofermentativas, algunas presentaron actividad celulolítica o proteolítica.
- Al evaluar la tolerancia a la acidez, los 8 aislados seleccionados lograron desarrollar una curva de crecimiento similar a la obtenida en condiciones normales, pero con medidas de absorbancia más bajas, lo que indica que su crecimiento es afectado por las variaciones de pH, pero logran conservar la viabilidad en el tiempo evaluado.
- Con respecto a las sales biliares, se observaron medidas de D.O. más cercanas a la curva patrón, mostrando una relación inversamente proporcional ya que a medida que aumentó la concentración de sales biliares disminuyeron las medidas de absorbancia, lo que indica que los aislados seleccionados son levemente afectados por la presencia de las sales biliares.
- Los aislados 5, 6 y 8 expresaron la mayor actividad antagónica, tanto contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* (ATCC 25923), *S. mutans* (ATCC 656), *L. acidophilus* (ATCC 610) como Gram negativas como *E.coli* (ATCC 35218), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) y el aislado clínico *Salmonella sp.*

- Se logró la identificación bioquímica de tres cepas de *Lactobacillus* sp. siendo el aislado 5 *Lactobacillus plantarum*, el aislado 6 *Lactobacillus paracasei* sp. y el aislado 8 *Lactobacillus acidophilus*.
- La leche de cabra posee bacterias del género *Lactobacillus* con un gran potencial tecnológico y probiótico.

RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Alvarado C. y Díaz C. (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico de lactobacilos aislados de pastizal de una finca lechera. *Revista Facultad de Farmacia*, 51 (1), 8-14.
- Álvarez-Romero, J. y R. A. Medellín. 2005. *Capra hircus* (doméstica). Vertebrados superiores exóticos en México: diversidad, distribución y efectos potenciales. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto U020. México. D.F.58p http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Caprahircus%20domestica_00.pdf.
- Aparicio, G. (2016). Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos: Producción de bacteriocinas. (Trabajo de Grado), Universidad de Jaén, Facultad de Ciencias Experimentales, Jaén - España. https://tauja.ujaen.es/bitstream/10953.1/3951/1/TFG_Mateos_Aparicio_Romero_de_%C3%81vila_Gabriel.pdf
- Arana, B., I., Orruño, B., M. y Barcina, L., I. (2012) Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano, Tema 4, en: Como resolver aspectos prácticos de Microbiología [2012/05] Curso, Proyecto Open Course Ware (OCW) de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea, País Vasco, España.30p
- Arora, R.C., Bhojak, N., & Joshi, R.R. (2013). Comparative Aspects of Goat and Cow Milk. *International Journal of Engineering Science Invention*. 2(1), 7–10.
- Ballesta, S., Velasco, C., Borobio, M.V., Argüelles, F. y Perea E.J. (2008). Yogures frescos frente a pasteurizados: estudio comparativo de sus efectos sobre los parámetros microbiológicos, inmunológicos y el bienestar gastrointestinal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(9), 552-557.
- Beerens, H., y Luquet, F. M. (1990). Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos (1th ed.). Zaragoza: Acríbia. 300p
- Beever, E. A. y Brussard, P. F. (2000). Examining ecological consequences of feral horse grazing using exclosures. *Western North American Naturalist*. 60(3):236-254
- Bosch Gallego, M. B. (2011). El consumo del probiótico *Lactobacillus plantarum* CECT 7315/7316 mejora el estado de salud general en personas de edad avanzada. *Nutrición Hospitalaria*, 26(3), pp. 642-645. doi: 10.3305/nh.2011.26.3.5230.
- Brennan Saibene, E. (2001). Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de bacterias ácido lácticas nativas de leche pertenecientes a la familia *Streptococcaceae* (No. 577.11 BRE).
- Bull Matthew, Plummer Sue, Marchesi Julian, Mahenthiralingam Eshwar (2013), The life history of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic: a tale of revisionary taxonomy, misidentification and commercial success, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 349, Issue 2, December, Pages 77–87, <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12293>
- Campos, L. y Gonzabay, L y Mejia, M. (2009). Proyecto de producción y comercialización del kumis, como un nuevo producto lácteo y una alternativa

- para la nutrición. Escuela Superior Politécnica del Litoral - Facultad de Ciencias Humanísticas y Económicas, Guayaquil, Ecuador. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/1544>.
- Chaves de Lima, E., de Moura Fernandes, J., y Cardarelli, H. (2017). Optimized fermentation of goat cheese whey with *Lactococcus lactis* for production of antilisterial bacteriocin-like substances. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 710–716. doi: [10.1016/j.lwt.2017.06.040](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.040).
- Chamba JF, Perreard É. (2002). Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental cheese. *Lait*, 82 1 33-44 DOI: <https://doi.org/10.1051/lait:2001003>.
- Cho, G. S., Cappello, C., Schrader, K., Fagbemigum, O., Oguntoyinbo, F. A., Csovcics, C., Rösch, N., Kabisch, J., Neve, H., Bockelmann, W., Briviba, K., Modesto, M., Cilli, E., Mattarelli, P., & Franz, C. M. A. P. (2018). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Goat Milk in Tajikistan. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(11), 1834–1845. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.08011>
- Clark, S., & Mora García, M. B. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of dairy science*, 100(12), 10026–10044. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287>.
- Contreras-Govea, F. E, Marsalis, M. A., Leonard, M. (2009). Inoculantes microbiales para ensilaje: Su uso en condiciones de clima cálido. Circular 642 Servicio de Extensión Cooperativa. Facultad de Ciencias Agrícolas, Ambientales y del Consumidor, New México State University.
- COVENIN 903-93. Leche Cruda (1993). Comisión Venezolana de Normas Industriales. Caracas –Venezuela.
- Csapóné Riskó, T. ., & Csapó, Z. . (2019). Goat Keeping and Goat Milk Products in Human Nutrition - Review. *Applied Studies in Agribusiness and Commerce*, 13(1-2), 24–36. <https://doi.org/10.19041/APSTRACT/2019/1-2/3>
- Cueto, M., Acuña, Y. y Valenzuela, J. (2010). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias Ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Revista Actual Biology*, 32 (93): 129-138.
- da Silva, L.A., Lopes Neto, J.H.P. & Cardarelli, H.R. (2019). Safety and probiotic functionality of isolated goat milk lactic acid bacteria. *Annals of Microbiology*, 69(13), 1497–1505. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01533-z>.
- De Roissart, H. y Luquet, F.M. (1994). Bacteries lactiques Aspects Fondamentaux et Technologiques. 2a edición, Loriga Uriage, Francia
- Díaz, M (2020). Innovación y desarrollo en Yakult. (Trabajo de Grado). Universidad del Rosario. Bogotá D.C – Colombia.
- Dubeuf, J. P., Morand-Fehr, P., y Rubino, R. (2004). Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research*, 51(2), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.007>.
- EFSA.(2007). QPS-Qualified presumption of safety of microorganisms in food and feed.<https://zenodo.org/badge/DOI/10.5281/zenodo.6854364.svg>
- Estrada Maldonado, A. C., Gutiérrez Ramírez, L. A. y Montoya Campuzano, O. I. (2005). Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de

- Lactobacillus* sp .contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*, *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín.*, 58, pp. 2601-2609.
- FAO Food Agriculture Organization of the United Nations. (2016). Environmental Performance of Large Ruminant Supply Chains: Guidelines for Assessment. Livestock Environmental Assessment and Performance Partnership, FAO, Rome (Italy). <https://www.fao.org/3/i6494e/i6494e.pdf>.
- FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations and GDP Global Dairy Platform Inc. (2019). Climate change and the global dairy cattle sector: The role of the dairy sector in a low-carbon future, p. 36, Rome.
- FAO Food Agriculture Organization of the United Nations.(2021). FAOSTAT. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>. Revisado el 29-04-22.
- FDA Food Agriculture Organization of the United Nations. (2010). Generally Recognized as Safe (GRAS). <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. Revisada el 10-02-2022.
- FAO Food Agriculture Organization of the United Nations.(2022). Portal lácteo. Animales lecheros. Disponible en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/es/>. Revisada el 10-02-2022.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R., y Rodríguez, J. M. (2013). The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research*, 69(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.001>
- Fox, P., Guinee, T., Cogan, T. y McSweeney, P (2017). Fundamentals of Cheese Science. Boston, MA: Springer US.
- Gantner, V., Mijić, P., Baban, M., Škrtić, Z. i Turalija, A. (2015).The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo*, 65 (4), 223-231. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0401>
- García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos como potenciales productoras de proteínas lipolíticas, proteolíticas y antibacterianas. *Microbiología aplicada y biotecnología*, 103 (13), 5243–5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. y Tempio, G. (2013). Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Disponible en <https://www.fao.org/publications/card/es/c/9add29f2-bd94-57f4-8ca8-a63c863ce1f5/>
- González, L., Sacristán, N., Arenas, R., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E., (2010). Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional spanish cheese. *Food Microbiology.*, Vol.27, Nº5. 592-597.
- Greer F. R. (2019). Origins of the Human Milk Microbiome: A Complex Issue. *The Journal of nutrition*, 149(6), 887–889. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz004>
- Haenlein, G. F. W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2003.08.010>.
- Hammes, W.P., Hertel, C. (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E.

- (eds) The Prokaryotes. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_10.
- Haskito, A. E. P., Mahdi, C., y Noviatrì, A. (2020). Comparison of Antioxidant Activity and Total Lactic Acid Bacteria (LAB) of Goat Milk Yoghurt, Goat Milk Yoghurt Fortified by Red and Black Rice Bran Flour. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science*, 465(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/465/1/012010>.
- Hayaloglu, A.A., Guven, M. Fox, P.F and McSweeney, P. L. H. (2005). Influence of starters on chemical, biochemical, and sensory changes in turkish White-Brined cheese during ripening. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2353. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73030-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73030-7).
- Heredia-Castro, P. Y. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), pp. 340-346.
- Hernández Manrique, P. (2021). Protección postnatal que confiere la lactancia a una cría de mamífero. (Trabajo de grado). Universidad de los Andes. Colombia.
- Hernández Daylet, Cabezas Génesis, Jiménez José Manuel, Varela Yasmin Yinec, Salas Osorio Elaysa J., Martínez Amaya Carlos A. Especies de lactobacilos potencialmente probióticos aisladas de cavidad bucal de niños nacidos por parto natural. *Revista Odontológica de los Andes*. Volumen 14 N° 1 pág. 24-33. Enero/Diciembre 2019. <http://erevistas.saber.ula.ve/index.php/odontoula/article/view/14905>.
- Hurtado, J. (2010). El "para qué" o los objetivos de la Investigación. En: El proyecto de investigación: comprensión holística de la metodología y la investigación. (Sexta Edición). Caracas: Quirón Ediciones.
- Inat Trigueros, Carlos y Montes Estellés, Rosa María. (2016). Estudio sobre el crecimiento de bacterias proteolíticas y lipolíticas en leche y quesos obtenidos a partir de cabras tratadas con enrofloxacin. (Trabajo de máster) Universitat Politècnica de València. Valencia, España. <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/66266/INAT%20-%20Estudio%20sobre%20el%20crecimiento%20de%20bacterias%20proteol%C3%ADticas%20y%20lipol%C3%ADticas%20en%20leche%20y%20quesos%20ob....pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jainudeen, M. R. y Hafez S. E. (1996). Ovejas y cabras. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. E. S. E. Hafez (Ed.), McGraw-Hill Interamericana, México, D. F. pp. 311-322.
- Jaksic, F.M. 1998. Vertebrate invaders and their ecological impacts in Chile. *Biodiversity and Conservation*. 7(11), 1427-1445. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008825802448>.
- Jay. J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. Milk, fermentation. fermented and nonfermented dairy products. *Modern food microbiology*. 7th Ed., Ed. Springer, 149-173. <https://doi.org/10.1007/b100840>.
- Jurado Gámez, H., Calpa Yamá, F., y Chaspuengal Tulcán, A. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Revista Veterinaria Y Zootecnia*, 8(2), 15–35. Recuperado a partir de <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/4163>

- Kambe, J., Sasaki, Y., Inoue, R., Tomonaga, S., Kinjo, T., Watanabe, G., Jin, W., & Nagaoka, K. (2020). Analysis of infant microbiota composition and the relationship with breast milk components in the Asian elephant (*Elephas maximus*) at the zoo. *The Journal of veterinary medical science*, 82(7), 983–989. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0190>
- Kandler, O. y N. Weiss, (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2), Baltimore: Williams and Wilkins, 1209-1234.
- Khattab, A., Guirguis, H., Tawfik, S. y Farag, M., (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science y Technology*, 88, pp.343-360.
- Koluman Darcan, N., y Silanikove, N. (2018). The advantages of goats for future adaptation to Climate Change: A conceptual overview. *Small Ruminant Research*, 163, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.04.013>
- Konig, H., Uden, G. y Frohlich, J. (2009) *Biología de los microorganismos en la uva, en el mosto y en el vino. Lactic acid bacteria*, Heidelberg. 3-30
- Kumar, H., Yadav, D., y Kumar, N. Seth R. and Kumar A.(2016). Nutritional and Nutraceutical Properties of goat milk.A Review.*Indian Journal of Dairy Science*. VOL. 69 No. 5 (Sept.-Oct. 2016)
- Lim, S.-M., Lee, N.-K.and Paik, H.-D. (2020). Actividad antibacteriana y anticaries del probiótico *Lactobacillus plantarum* 200661 aislado de alimentos fermentados contra *Streptococcus mutans*, LWT. *Food Science and Technology*, V 118, enero, p1-6
- Lopez-Kleine, L. y Monnet, V. (2011). *Lactic acid bacteria, J. Proteolytic Systems* (2^a ed.). France: Academic Press Published.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), 15611–15616. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607117103>
- Mellink E. (1991). Exotic herbivores for the utilization of arid and semiarid rangelands of Mexico. In: *Wildlife production: Conservation and sustainable development*. Renecker L.A. y Hudson R. J. (Eds.) pp. 261–266. Agricultural and Forestry Experiment Station, University of Alaska Fairbanks.
- Meneses R., Raúl (2017) *Manual de producción caprina* [en línea]. La Serena, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 370. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6672>.
- Mittu B, Girdhar Y (2015). Role of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk in Cancer Prevention. *Autoimmune and Infectious Diseases*, 1(2). doi <http://dx.doi.org/10.16966/2470-1025.108>
- Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J. A., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C. N., & Rodríguez

- Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59),64-70. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67430113008>
- Morais, Joaquim; Guamis López, Buenaventura, dir.; Buffa, Martín Nicolás, dir. (2004). Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso. (Tesis Doctoral) Universitat Autònoma de Barcelona. ISBN 8468878278. 2004 <<https://ddd.uab.cat/record/37761>> [Consulta: 1 abril 2022].
- Moreno, R., Salas, E., Pérez, C. y Jiménez, J. (2011). Evaluación del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna. *MedULA, Revista de Facultad de Medicina*, Universidad de Los Andes. 20 (2). <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35037>.
- Moulay, M., Benlahcen, K., Aggad, H. and Kihal, M (2013). Diversity and technological properties of Predominant lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk. *Advances in Environmental Biology* 7(6):999-1007.
- Mowlem, A. (2005). Marketing goat dairy produce in the UK. *Small Ruminant Research*, 60(1-2), 207–213. DOI:10.1016/j.smallrumres.2005.06.036.
- Muletz-Wolz, C. R., Kurata, N. P., Himschoot, E. A., Wenker, E. S., Quinn, E. A., Hinde, K., Power, M. L., & Fleischer, R. C. (2019). Diversity and temporal dynamics of primate milk microbiomes. *American journal of primatology*, 81(10-11), e22994. <https://doi.org/10.1002/ajp.22994>
- Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Marina Stoeckel c, Bertolt Kranz, B., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., Scherer, S., (2015) Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Journal of Food Microbiology*. 211, pag.57–65.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N. y Ljubisa, T. (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122 (1-2),162–170
- Nowak, R.M. 1991. Walker's mammals of the world.The Johns Hopkins University Press.Baltimore, Maryland, 5th ed. ISBN 0-8018-3970-X.
- Olivera J. (2011) Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. (Tesis de grado) Universidad de la República Uruguay.
- Ortiz M., M. L. y Uribe – Vélez, D.; (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo Congo. Vol. 15(1) p. 7-15.
- Park, Y. W., y Haenlein, G. F. W. (2017). Therapeutic, hypo-allergenic and bioactive potentials of goat milk, and manifestations of food allergy Chapter 2.4. *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals: Second Edition*, 151–179. <https://doi.org/10.1002/9781119110316.ch2.4>.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), pp. 93-105 <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>.
- Petrullo, L., Jorgensen, M. J., Snyder-Mackler, N., & Lu, A. (2019). Composition and stability of the vervet monkey milk microbiome. *American journal of primatology*, 81(10-11), e22982. <https://doi.org/10.1002/ajp.22982>

- Pulina, G., Milán, M. J., Lavín, M. P., Theodoridis, A., Morin, E., Capote, J., Thomas, D. L., Francesconi, A. H. D., & Caja, G. (2018). Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of dairy science*, 101(8), 6715–6729. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14015>
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>
- Quiñones Chillambo, Juan David, Cardona Iglesias, Juan Leonardo, & Castro Rincón, Edwin. (2020). Fodder shrub silage for livestock feeding systems in the high Andean tropics. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 285-301. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.662>
- Ramírez-López, C y Vélez-Ruiz, J. F., (2016) Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información Tecnológica* Vol. 27(6), 115-128
- Ribeiro, A. C., y Ribeiro, S. D. A. (2010). Specialty products made from goat milk. *Small Ruminant Research*, 89(2–3), 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.12.048>.
- Robinson, R. K. (2016). Therapeutic properties of fermented milks, Elsevier science publishers. INC, 655 Avenue of the Americas, New York, NY 10010, USA, 185 p.
- Rodríguez, R., Guerra, G., Soares, J., Santos, K., Rolim, F., Assis, P., Araújo, D., de Araújo Júnior, R. F., Garcia, V. B., de Araújo, A. A., y Queiroga, R. (2018). *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in goat milk matrix modulates intestinal inflammation involving NF- κ B p65 and SOCs-1 in an acid-induced colitis model. *Journal of Functional Foods*, 50(12), 78–92. DOI: 10.1016/j.jff.2018.09.013.
- Saccaro, DM (2008). Efecto de la asociación de cultivos iniciadores y probióticos sobre la acidificación, textura y viabilidad en leches fermentadas. (Tesis de Maestría), Universidad de São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/D.9.2008.tde-01102008-161512. www.teses.usp.br
- Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., y Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18(5), 1403–1436). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>.
- Salas E, Jiménez JM, Moreno R, Sánchez K, Martínez C, Medina G. (2013) Evaluación preliminar del potencial probiótico de Lactobacilos aislados de fluido vaginal de mujeres sanas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 1.;33 (suplemento 1). X Congreso Venezolano de Microbiología “Ada Martínez de Gallardo”.
- Salas, E. (2004). Lactobacilos con potencial actividad probiótica a partir de queso fresco no pasteurizado elaborado en forma artesanal. (Tesis de Maestría) Universidad de los Andes, Mérida Venezuela.
- Sanz C., L (2007) Caracterización de la leche de cabra frente a la de vaca. Estudio de su valor nutritivo e inmunológico. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada. España. 186p URL: <http://hdl.handle.net/10481/1610>

- Saxena, S., (2015). Strategies of Strain Improvement of Industrial Microbes. *Applied Microbiology*. New Delhi: Springer. pp. 155–171
- Serna-Cock, L., Vallejo-Castillo, V., & García-González, E. (2012). Gel de *Aloe vera* (*Aloe barbadensis miller*) en la encapsulación de una bacteria ácido láctica. *Vitae*, 19(1), 168–S170. ISSN: 0121-4004. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914047>
- Settanni, L. y Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27, 691–697
- Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., & Sheikhi, A. (2017). Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Medical oncology* (Northwood, London, England), 34(11), 183. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1044-9>
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current opinion in biotechnology*, 56, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>.
- Smith, K., McCoy, K. D., & Macpherson, A. J. (2007). Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Seminars in immunology*, 19(2), 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.10.002>
- Strahinić, I., Cvetanović, D., Kojić, M., Fira, D.J., Tolinački, M. and Topisirović, L.J. (2007). Characterization and antimicrobial activity of natural isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGSM1-19. *Acta Veterinaria Servia*, 57(5-6), 509-521. DOI:10.2298/AVB0706509S
- Teuber, M., Geis, A. (2006). El Género *Lactococcus*. En: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Nueva York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_7
- Verruck, S., Dantas, A., y Prudencio, E. S. (2019). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods*, 52, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017>.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, EB, De Vuyst, L., Laulund, S., Lähdenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. y von Wright, A (2004). Las bacterias del ácido láctico, la cadena alimentaria y su regulación. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos* 15 (10), 498 - 505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>.
- Yazdi, M. K. S., Davoodabadi, A., Zarin, H. R. K., Ebrahimi, M. T., y Dallal, M. M. S. (2017). Characterisation and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. *Italian Journal of Animal Science*, 2(14), 185–188.
- Yelnetty, A., Purwadi, y Tallei, T. E. (2020). Indigenous lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented goat milk as potential probiotics. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 23(7), 883–890. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.883.890>.
- Yurliasni, Hanum, Z., Muliawan, F., y Kardima, A. (2019). Quality of fermented goat milk and powder milk using *Lactobacillus plantarum* and optimizing their antibacterial ability against enterobacteriaceae. IOP Conference Series: *Earth*

and Environmental Science, 387(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/387/1/012020>.

- Zapata Q., M. A., (2017). Identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas probióticas en leche y heces de *Canis lupus familiaris* lactantes. (Teis de grado), Universidad de los Andes. Mérida - Venezuela.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zúñiga, M., Pardo I. y Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 18 (1), 37- 42

www.bdigital.ula.ve