

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

ESCUELA DE POSGRADO

**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS:

**Aislamiento e identificación molecular de bacterias ácido
lácticas (BAL) de quesos artesanales de la localidad de
Vizcapalca - Ayacucho 2024**

Para optar el grado académico de:
MAESTRA EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Roxana Karen CARHUAZ CONDORI

ASESORA:

Dra. Roberta Brita ANAYA GONZÁLEZ

AYACUCHO - PERÚ

2025

A mis padres,
Feliciano y Víctor.

AGRADECIMIIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entrañable *Alma Mater*, por brindarme cobijo en sus aulas a lo largo de mi formación profesional y haber sido un pilar fundamental en el desarrollo académico, fomentando el deseo de superación.

A los distinguidos catedráticos de la Escuela de Posgrado, por haber compartido sus conocimientos y transmitirme la confianza y optimismo en el transcurso de mi formación como Maestra.

A la Dra. Brita Anaya González, por su asesoramiento, apoyo y brindarme las herramientas necesarias para la elaboración, desarrollo y finalización de la presente tesis.

Al MSc. Reynán Cóndor Alarcón, por su importante apoyo, aporte y participación en el análisis estadístico para la culminación de este trabajo de investigación.

A los productores de queso artesanal del Anexo de Vizcapalca, por brindarme las muestras para el desarrollo y culminación de la presente investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS i	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	11
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1. Enunciado del problema	12
1.2. Delimitación del problema	13
1.3. Formulación del problema	13
1.4. Formulación de objetivos	14
II. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Antecedentes	15
2.2. Marco conceptual	20
2.2.1. Leche cruda entera	20
2.2.2. El queso	21
2.2.3. Clasificación del queso según su consistencia	22
2.2.4. Agentes que participan en la maduración del queso	22
2.2.5. Las bacterias ácido lácticas	23
2.2.6. Enzimas lácticas	30
2.2.7. Técnicas moleculares en la identificación de bacterias ácido lácticas	32
III. METODOLOGÍA	37
3.1. Ubicación	37
3.2. Muestreo y transporte de las muestras al laboratorio	37
3.3. Aislamiento de bacterias ácido lácticas del queso	37
3.4. Identificación molecular de las bacterias aisladas	38
3.5. Caracterización de las bacterias ácido lácticas	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
V. CONCLUSIONES	55
VI. RECOMENDACIONES	56

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
LISTA DE ABREVIATURAS	62
GLOSARIO	63
ANEXOS	64

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características físico químicas de la leche de vaca	20
Tabla 2. Composición de la leche de vaca por cada 100 g.	21
Tabla 3. Capacidad acidificante de las cepas de bacterias ácido lácticas, aisladas de quesos artesanales elaborados en la Localidad de Vizcapalca, durante un periodo de incubación de 8 h. Ayacucho 2024	41
Tabla 4. Diámetro de halo de inhibición producido por antibióticos en bacterias ácido lácticas con capacidad acidificante, aisladas de quesos artesanales de Vizcapalca. Ayacucho 2024.	43
Tabla 5. Capacidad acidificante en presencia de amikacina de bacterias ácido lácticas, aisladas de quesos artesanales elaborados en la Localidad de Vizcapalca, durante un periodo de incubación de 8 h. Ayacucho 2024	45
Tabla 6. Morfología microscópica de las muestras de bacterias ácido lácticas, aisladas de quesos artesanales elaborados en la Localidad de Vizcapalca, durante un periodo de incubación de 8 h. Ayacucho 2024	47
Tabla 7. Determinación de la identidad de la cepa 1, 2, 3 y 4, obtenida mediante la secuenciación de ADN como herramienta molecular para el análisis de distancia entre especies	49

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Fermentación homoláctica de azúcares en las bacterias ácido lácticas. Vía Glicolítica o Embden Meyerhof Parnas.	27
Figura 2. Fermentación heteroláctica de azúcares en bacterias ácido lácticas. Vía de la pentosa fosfato.	28
Figura 3. Porcentaje de coincidencia con especies de bacterias ácido lácticas presentes en las cepas 1, 2, 3, y 4, aisladas de quesos artesanales de Vizcapalca, a través de una aproximación taxonómica de distancia basada en la secuenciación de ADN.	51
Figura 4. Dendrograma de especies generado por el método de método de la máxima verosimilitud a través del algoritmo Neighbor-Joining (NJ), utilizado para representar la proximidad genética entre especies de bacterias ácido lácticas identificadas a partir de cepas aisladas de quesos artesanales de Vizcapalca.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Queso artesanal procedente de la Localidad de Vizcapalca.	65
Anexo 2. Ordeño de leche para la elaboración de quesos de Vizcapalca.	66
Anexo 3. Productora de quesos, en el procedimiento de corte para obtención de uniformidad en el producto final.	67
Anexo 4. Proceso para la elaboración de quesos en Vizcapalca	68
Anexo 5. Procesamiento de muestras para el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de quesos artesanales.	69
Anexo 6. Capacidad acidificadora de las bacterias ácido lácticas de la leche UHT.	70
Anexo 7. Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos.	71
Anexo 8. Procedimiento de resistencia a antibióticos de las bacterias ácido lácticas.	72
Anexo 9. Incubación en condiciones anaeróbicas de placas por diseminación de muestras del caldo MRS.	73
Anexo 10. Placas que muestran el crecimiento de las bacterias ácido lácticas aisladas.	74
Anexo 11. Procedimiento de la coloración de Gram.	75
Anexo 12. Cepas seleccionadas para la identificación por el método de Secuenciación de ADN para el análisis de distancia entre especies.	76
Anexo 13. Resultados de la secuenciación de ADN para el análisis de distancia entre especies.	77
Anexo 14. Dendrograma de especies generado por el método de la máxima verosimilitud y Tamura-Nei, a través del algoritmo Neighbor-Joining (NJ), mostrando la distancia presente entre especies.	80
Anexo 15. Fotografía en la localidad de Vizcapalca.	81
Anexo 16. Decreto Supremo N° 007-2017-MINAGRI.	82
Anexo 17. Matriz de consistencia.	85

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue caracterizar bacterias ácido lácticas (BAL) a partir de quesos elaborados en forma artesanal. Para ello se recolectaron muestras de quesos de la localidad de Vizcapalca, que está ubicado en el distrito de Pilpichaca, provincia de Huaytará, en la región de Huancavelica. Una vez recolectadas las muestras de quesos fueron transportadas al Laboratorio de Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) para su procesamiento respectivo. Para el aislamiento de los microorganismos lácticos se sembraron 25 g de muestra, homogenizados con 225 mL de caldo MRS incubado a 37 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación se sembraron inóculos con una dilución de 10^{-4} con 90 mL de caldo MRS, se tomó 0,1mL sembrados en placas de Petri conteniendo agar Man Rogosa y Sharpe (MRS), por la técnica de diseminación, las mencionadas placas fueron incubadas a 37°C por 24 h; luego del crecimiento de las colonias, éstas fueron transferidas a viales conteniendo agar MRS; las colonias aisladas fueron agrupadas de acuerdo a su procedencia (estancias), con las que se realizó la capacidad acidificadora con la leche procesada a ultra alta temperatura (UHT), para la observación del descenso del pH, resistencia a antibióticos. Los resultados obtenidos, mediante el análisis molecular basado en la amplificación y Secuenciación del Gen RNAr 16S, fueron la identificación de especies como *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis*, dichos resultados se muestran en el dendrograma con el uso del método de máxima verosimilitud y Tamura-Nei, a través del algoritmo Neighbor-Joining (NJ). Conclusiones, las bacterias aisladas presentaron características morfológicas típicas de las BAL, tales como su forma de coco agrupadas en diplococos y estreptococos, el reconocimiento logrado con el uso de la coloración de Gram, en la relación filogenética se muestra un 38 % *Lactococcus lactis*, 37 % *Lactococcus cremoris*, 19 % *Enterococcus faecium* y 6 % *Enterococcus durans*, dichas cepas mostraron propiedades relevantes como la capacidad acidificante y actividad antimicrobiana. Los resultados obtenidos respaldan su uso posterior como cultivos iniciadores autóctonos y mejorar la calidad e inocuidad del queso elaborado artesanalmente.

Palabras clave: bacterias lácticas, MRS, inóculos, cultivo iniciador, Gen RNAr 16S.

ABSTRACT

The primary aim of this research was to characterize lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditionally produced cheeses. Samples were collected from artisanal cheeses originating in the locality of Vizcapalca, located within the Pilpichaca district, Huaytará province, in the Huancavelica region. After collection, the cheese samples were transported under proper conditions to the Biochemistry Laboratory at the Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) for further analysis. To isolate lactic microorganisms, 25 grams of each cheese sample were homogenized in 225 mL of MRS broth and incubated at 37°C for 24 hours. Following incubation, a 10⁻⁴ dilution was prepared using 90 mL of MRS broth, and 0.1 mL of this was plated onto Petri dishes containing Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar using the spread plate technique. These plates were then incubated at 37°C for another 24 hours. Upon visible colony formation, isolates were subcultured into MRS agar vials and grouped based on their origin (by farm or collection site).

Further assessments included evaluating the acidifying potential of each isolate using ultra-high temperature (UHT) processed milk, monitoring pH reduction, and testing antibiotic resistance. Molecular analysis, through amplification and sequencing of the 16S rRNA gene, enabled the identification of species such as *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus cremoris*, and *Lactococcus lactis*. These identifications were supported by phylogenetic analysis using the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model, represented in a dendrogram generated with the Neighbor-Joining (NJ) algorithm.

The isolates exhibited typical morphological characteristics of LAB, including coccus-shaped cells arranged in diplococci and streptococcal chains, confirmed by Gram staining. Phylogenetic relationships revealed that *Lactococcus lactis* accounted for 38%, *Lactococcus cremoris* 37%, *Enterococcus faecium* 19%, and *Enterococcus durans* 6% of the total isolates. Notably, these strains demonstrated significant acidification capacity and antimicrobial activity.

In conclusion, the findings support the potential application of these native isolates as starter cultures to enhance the safety and quality of artisanal cheese production

Keywords: lactic acid bacteria, MRS, inocula, starter culture, 16S rRNA gene.

INTRODUCCIÓN

El queso artesanal andino, es un producto principalmente elaborado con leche cruda de vaca, con el uso de cuajo animal obtenido de crías de alpaca, bovino, ovino y caprino, el cual actúa sobre las proteínas de la leche. Sin embargo se conoce muy poco de las enzimas y bacterias presentes en el queso artesanal andino los que confieren un aroma, sabor y color característico, aumentando la intensidad durante la maduración, obteniéndose productos no estandarizados con una calidad higiénica inadecuada, lo que podría representar un riesgo potencial para la salud.

Para la producción de quesos artesanales se requiere la implementación de prácticas de manufactura estandarizadas, así como el conocimiento de las propiedades finales del producto que se desea lograr, esto será posible mediante una caracterización completa de sus perfiles químicos, microbiológicos y sensoriales.

En ese contexto, en el presente estudio se aislaron bacterias ácido lácticas presentes en los quesos elaborados de forma artesanal de la zona de Vizcapalca, con el objetivo de identificar especies nativas presentes en el queso artesanal que contribuyan a la elaboración de productos con calidad estandarizada. Del mismo modo permita que el conocimiento ancestral sobre la elaboración del queso de Vizcapalca se preserve a lo largo del tiempo y muchas generaciones.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Enunciado del problema

El queso andino artesanal, se caracteriza por ser elaborado con leche de vaca, la elaboración a nivel artesanal se produce de leche cruda sin incorporación de cultivos iniciadores y la fermentación ocurre por proceso natural, en esta práctica tradicional valorada culturalmente, conlleva riesgos microbiológicos y una variedad en la calidad sensorial, nutricional y sanitaria del producto final. La falta de conocimiento sobre la microbiota láctica nativa impide el desarrollo de cultivos iniciadores que mejoren la estandarización, seguridad y valor agregado del queso artesanal. Además, sin una identificación molecular precisa, no se puede determinar el potencial probiótico ni las propiedades tecnológicas de estas cepas, alcanzable a través de una caracterización multidimensional que integre perfiles microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales de forma rigurosa y sistemática. Por ello, para fortalecer la producción de quesos artesanales requiere la estandarización de las prácticas de manufactura y una comprensión profunda de las características finales del producto.

Es así, que las bacterias ácido lácticas (BAL), al ser unos de los componentes importantes del queso, también tienen la capacidad de acidificación, producción de compuestos antimicrobianos y generación de características sensoriales deseables, cumpliendo un rol crucial en la fermentación y maduración del queso. Sin embargo, en Vizcapalca no se cuenta con estudios que identifiquen y caractericen molecularmente las cepas autóctonas de las BAL presentes en estos quesos, lo que limita el aprovechamiento tecnológico y sanitario de estas bacterias. Por ello, es importante su aislamiento e identificación molecularmente de bacterias ácido lácticas presentes en los quesos artesanales, con el propósito de determinar su potencial con miras tecnológicas en la industria láctea local. Otro factor capaz de afectar la actividad de los cultivos iniciadores es la presencia en la leche de pequeñas cantidades de antibióticos, una posible solución a este problema podría ser la utilización de cepas iniciadoras, menos sensibles a estos antibióticos.

Este trabajo constituye el primer paso para obtener cepas de Bacterias ácido lácticas que para la identificación de las especies autóctonas de los quesos artesanales andinos que lo permitirá la fabricación de este producto con características uniformes para su comercialización.

1.2. Delimitación del problema

Debido a que las cepas de BAL tienen un gran impacto en los cambios químicos, bioquímicos y sensoriales que se producen durante la maduración de los quesos y que al uso de diferentes bacterias iniciadoras conduce a diferencias sustanciales en la calidad entre los quesos.

En la industria de productos lácteos, las bacterias ácido lácticas desempeñan un rol fundamental, especialmente en la producción de yogur, mantequilla y quesos, tanto frescos como madurados, estas bacterias conforman la principal microbiota utilizadas como cultivos iniciadores, debido a su capacidad de producir ácido láctico, induciendo la formación de la cuajada y ejercer efectos antimicrobianos, debido a su acción proteolítica y lipolítica. En el caso de los quesos artesanales, el estudio y aislamiento de cepas de BAL nativas conlleva especial importancia, ya que su caracterización permite optimizar procesos, para asegurar la inocuidad y estandarizar las propiedades sensoriales del producto final, promoviendo así su calidad y valorización en el mercado local. Las bacterias ácido lácticas al poseer importantes aptitudes, en este trabajo se aisló e identificó mediante el Gen 16S ARNr a las Bacterias ácido lácticas del queso artesanal, para identificar que especies predominan en los quesos artesanales de la Localidad de Vizcapalca del Departamento de Huancavelica durante el año 2024.

1.3. Formulación del problema

1.3.1. Problema general

¿Cuáles serán las bacterias ácido lácticas presentes en los quesos artesanales en la localidad de Vizcapalca, Ayacucho 2024?

1.3.2. Problemas específicos

1. ¿Qué características morfológicas presentan las cepas aisladas de los quesos?
2. ¿Qué técnicas moleculares permiten identificar con precisión las especies de bacterias ácido lácticas en quesos?
3. ¿Qué géneros y especies predominan entre las bacterias ácido lácticas aisladas de quesos?

1.4. Formulación de objetivos

1.4.1 Objetivo general:

Caracterizar bacterias ácido lácticas a partir del queso en el Anexo de Vizcapalca de la Región de Huancavelica.

1.4.2. Objetivos específicos:

1. Aislar bacterias ácido lácticas a partir de queso artesanal, producido en Vizcapalca.
2. Identificar las características morfológicas de las bacterias ácido lácticas.
3. Identificar las bacterias ácido lácticas, mediante la amplificación y secuenciación del Gen RNAr 16S.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Cuevas et al. (2024), estudiaron la microbiota de quesos artesanales en México, teniendo en cuenta el enfoque en la calidad e inocuidad, así como la diversidad de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas. En su investigación obtuvieron datos sobre poblaciones de microorganismos indicadores, presencia de patógenos y BAL nativas. Los resultados evidenciaron que varios quesos artesanales mexicanos superaron el límite permisible establecido en la norma mexicana para microorganismos indicadores, y en algunos tipos de queso se confirmó la presencia de patógenos. Sin embargo, cabe resaltar que los quesos artesanales mexicanos poseen características fisicoquímicas únicas, ya que durante su elaboración se utilizan pasos particulares que contribuyen a garantizar su calidad e inocuidad. Además, se encontraron cepas capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias que pueden ser patógenas, formando así parte de la microbiota de algunos quesos artesanales mexicanos. En cuanto a la diversidad de las BAL nativas, se compone de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium* y *Tetragenococcus*, entre otros.

Silva et al. (2023), mencionan en su estudio realizado en Portugal, evaluaron un total de 232 cepas aisladas de BAL, obtenidos de quesos artesanales producidos con leche cruda de cabra, con el objetivo de caracterizar sus propiedades antimicrobianas, acidificantes y proteolíticas. Reconocieron que el uso de cultivos iniciadores compuestos por bacterias ácido lácticas (BAL) adecuadamente seleccionadas resultan fundamental para garantizar la acidificación de la leche, mejorando las propiedades sensoriales y texturales del producto final, así como para eliminar el crecimiento de microorganismos patógenos. Sus resultados revelaron que aproximadamente el 98 % de las BAL aisladas en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) demostraron actividad antagonista frente a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, mientras que menos del 28,1 % de los aislados en medio M17 presentaron dicho efecto. No obstante, las BAL aisladas en M17 evidenciaron una mayor capacidad acidificante en comparación con aquellas obtenidas en MRS. Posteriormente, se aplicaron análisis de componentes

principales y caracterización molecular sobre un subconjunto de cepas seleccionadas, lo cual permitió identificar especies con propiedades prometedoras y establecer asociaciones entre los géneros bacterianos y sus funciones tecnológicas. Dentro de ella se encontraron cepas del género *Lactococcus* se correlacionaron con una alta capacidad acidificante, mientras que *Leuconostoc* y *Lacticaseibacillus* destacaron por su potencial antimicrobiano, siendo especies predominantes *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus paracasei*.

Coelho et al. (2022), aportan que los quesos tradicionales elaborados con leche cruda presentan una microbiota compleja, la cual está caracterizada por una secuencia de diferentes microorganismos presentes desde la coagulación de la proteína de la leche hasta su maduración. Las bacterias ácido lácticas (BAL), desempeñan un papel importante en la elaboración tradicional de quesos, ya sea como cultivos iniciadores que aceleran la acidificación de la leche o como microbiota secundaria, que desempeña un papel importante durante la maduración del queso. Las enzimas producidas por las BAL en la leche cruda son importantes, ya que favorecen la proteólisis y la lipólisis, factores clave como el sabor y textura del queso. El presente estudio resalta tendencias por acción de las BAL en quesos tradicionales provenientes de leche cruda (vaca, oveja y cabra) y por su potencial probiótico y como productores de compuestos bioactivos con efectos beneficiosos para la salud. Hanchi et al. (2018), realizaron el estudio del género *Enterococcus*: entre el potencial probiótico y preocupaciones de seguridad. Concluyen que los quesos elaborados de forma artesanal con el uso de leche cruda, presentan cepas nativas de *Enterococcus faecium*, los que producen bacteriocinas y metabolitos que ayudan a controlar el desarrollo de bacterias Gram positivas patógenas y contaminantes de los alimentos, particularmente de *Listeria monocytogenes*, especie frecuente en quesos. Actualmente, las bacteriocinas obtenidas por algunas cepas son usadas por su cualidad conservadora de amplio espectro para productos alimenticios y son consideradas como gran opción con los beneficios para luchar contra la resistencia antimicrobiana.

Campagnollo et al. (2018), aportaron en el aislamiento y la caracterización de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) con actividad antilisterial, y los efectos sobre *Listeria monocytogenes*, durante la vida útil refrigerada del queso Minas blando y la maduración del queso Minas semiduro. Evaluaron la actividad antilisterial de cepas de BAL aisladas de quesos artesanales de Minas mediante un ensayo de antagonismo diferido a 37 °C y 7 °C. Los tratamientos comprendieron la producción de quesos blandos o semiduros, con el uso de leche cruda o pasteurizada, e

incluyendo la adición de bacterias ácido lácticas. Las cepas seleccionadas mostraron un efecto bacteriostático sobre *Listeria monocytogenes* en queso blando. *L. monocytogenes* se inactivó durante la maduración de quesos semiduros mediante la por la adición de cepas de BAL. Los tiempos para alcanzar una reducción de *L. monocytogenes* fue de 15 días para quesos semiduros con leche cruda y 21 días para quesos semiduros con leche pasteurizada. Concluyendo, que las bacterias ácido lácticas con actividad antilisterial aisladas de quesos artesanales pueden constituir una barrera adicional al crecimiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento del queso blando, ayudando a acortar el período de maduración de quesos semiduros madurados a temperatura ambiente.

Ruiz (2017), en el estudio sobre situación actual del sector quesero convencional en Andaluz, caracterizó sensorial, física y químicamente los quesos artesanales pertenecientes a ocho provincias de Andaluz, obteniendo como resultado, que las queserías son industrias familiares, éstas se encuentran generalmente en las zonas de montañas empleando leche de su propia ganadería, elaborando quesos de leche pasteurizada, produciendo quesos frescos y madurados, empleando cuajo animal. Lo que muestra como parte de los resultados es que no solo la leche y el cuajo son factores determinantes, sino también el origen de la leche de las diferentes razas de bovinos, pasando a los diferentes procesos de maduración, siendo los uno de los factores que influyen en los parámetros organolépticos y físico químicos de los quesos.

Álvarez (2011), estudió a *Lactobacillus casei* ATCC 393™ en la producción de quesos frescos, menciona que los quesos frescos poseen un elevado contenido de humedad y no siguen el proceso de maduración, por lo que conservan el sabor a leche fresca o acidificada. El color suele ser blanco y la consistencia pastosa, estos productos tienen un alto contenido de humedad en la pasta (45 – 80 %), ante estas características su tiempo de vida útil es corto, por esta razón deben ser consumido en pocos días. Su transporte y su conservación deben realizarse en un rango de temperaturas bajas de (4-10 °C), para preservar la cadena de frío, como resultado los productos son altamente perecederos para lograr conservar sus características organolépticas.

Pullido (2013), en su estudio evaluó el impacto de la incorporación de cultivos comerciales de bacterias ácido lácticas, para observar las características fisicoquímicas y texturales del queso fresco, así como su viabilidad. Las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Lacticaseibacillus rhamnosus* se evaluaron en dos momentos de incorporación, antes de la etapa de cuajado y salado. Durante un

periodo de almacenamiento y refrigerado de 21 días, con un rango de temperatura entre 4 °C - 5 °C, se registró el recuento total de bacterias, el pH y la acidez. El análisis del perfil de textura se realizó a los 21 días, para evaluar los parámetros de textura después del período de almacenamiento. Los quesos frescos suplementados con *L. rhamnosus* añadido antes del proceso de cuajado mostraron valores similares de pH (5,36), acidez (0,18% de ácido láctico), en comparación con los quesos control sin probiótico. En los resultados no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los parámetros del perfil de textura de los quesos. Además, el queso fresco suplementado con *L. rhamnosus* añadido antes del cuajado mantuvo el recuento de microorganismos superior a 6 ciclos logarítmicos por gramo durante todo el período de almacenamiento. Por ello, este estudio sugiere que el queso fresco peruano presenta una matriz potencial para el aporte de microorganismos probióticos, en particular con el suplemento de *L. rhamnosus*.

Valdiviezo et al (2023), Se estudiaron quesos artesanales tipo suizo del mercado de Huaraz (Ancash), en su investigación seleccionaron tres quesos artesanales, 11 cepas de BAL se confirmaron mediante pruebas bioquímicas como la coloración de Gram; posterior a ello mediante la secuenciación del Gen ARNr 16S , se identificaron cepas como *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lentilactobacillus parabuchneri* y *Lactiplantibacillus sp.*. Evaluando la seguridad, capacidad acidificante, proteólisis, lipólisis y acción antagonista, destacando cepas con alto potencial tecnológico. Otra prueba realizada fue susceptibilidad a los antibióticos, mostrando una alta capacidad de acidificación de la leche con rango de 0,16 % a 1,44 %. Obteniendo como resultado que el uso de cepas de *L. paracasei* probadas en la producción de queso, mostró las mejores cualidades sensoriales, demostrando que las cepas nativas de las BAL mostraron un elevado potencial para la obtención de productos principalmente lácteos naturales, seguros y sensorialmente aceptables.

Díaz-García et al. (2020), afirman que el queso paria es un queso madurado semiduro elaborado principalmente en Arequipa, Puno y Cusco. Son considerados un potencial de exportación; sin embargo, carecen de parámetros de calidad. En su estudio se consideraron como objetivos, la evaluación de características fisicoquímicas y el contenido de bacterias ácido lácticas en tres variedades de queso paria, adquiridas en Arequipa (Perú). Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron: pH, humedad, sólidos totales, actividad de agua (aw), cloruro de sodio, grasas y proteínas. Obteniendo resultados similares a los reportados en la NTP y los valores fisicoquímicos fueron; pH de 5,15 a 6,11; humedad de 42,94 a 45,33 g %; ST de 54,67 a 57,06 g %; aw de 0,93 a 0,96; NaCl de 1,74 a 3,07 g %; grasas de 27,33 a

31,0 g % y las proteínas de 20,58 a 23,41 g %. El contenido de las bacterias ácido lácticas presentaron una relación directa con NaCl, mientras, una relación inversa con el pH y el contenido de grasas; obteniendo estos resultados los parámetros fisicoquímicos pueden ser utilizados para un control indirecto del contenido de bacterias ácido lácticas en quesos.

Pramanik et al. (2023), aportan que los probióticos poseen beneficios potenciales para la salud, pueden no ser reconocidos debido a la reducción sustancial en su viabilidad durante el almacenamiento de alimentos y el paso a través del sistema gastrointestinal. el consumo de probióticos está relacionado directamente con la composición de la microbiota intestinal y la resistencia contra patógenos, siendo esto los beneficios para la salud. El entorno gástrico al poseer un pH de 2,0 los probióticos pierden notablemente su viabilidad, durante el tránsito a través del sistema gastrointestinal. El reto es mantener la viabilidad celular hasta alcanzar el intestino grueso, en condiciones extremas de una disminución del pH o un aumento de temperatura. Ante ello, la tecnología de encapsulación se enfatiza en mejorar la viabilidad de los probióticos, por lo que, las cepas bacterianas probióticas pueden ser encapsuladas de varias maneras, siendo los métodos ampliamente sistematizados en dos categorías como sistemas de administración de líquidos y sólidos.

Xiaochun et al. (2021), aportan que el queso tiene una larga historia y es un producto lácteo de fermentación natural, lo que ofrece una gama de distintos sabores. Los microorganismos presentes en los quesos son un componente esencial, desempeñando un papel crucial tanto en la producción como durante la maduración. Sin embargo, se sabe que los quesos en diferentes países se siguen elaborando artesanal, siendo así, la tecnología de procesamiento diversa, la estructura de la variedad microbiana es compleja, así también, el sabor del queso fluctúa considerablemente. Por lo tanto, estudiar la tecnología general de procesamiento, la relación entre la estructura microbiana y la formación del sabor en el queso es clave para resolver la inestabilidad de la calidad y lograr estandarizar la producción del sabor, garantizando su conservación, lo cual tiene gran importancia para la búsqueda de microorganismos funcionales de levaduras y la perspectiva de industrialización del queso fermentado tradicional.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Leche cruda entera

a. Generalidades

La leche es un fluido complejo conformado por lípidos, agua, carbohidratos, sales, proteínas, y componentes de baja proporción tanto como inorgánicos y orgánicos, la leche igualmente puede contener gran diversidad de células somáticas y microorganismos. La leche al ser la principal materia prima en la elaboración de queso, es especificado como producto de la secreción de la glándula mamaria de animales como bovinos, obtenido por el ordeño. Cabe recalcar que la leche empleada en la producción de productos que deben satisfacer los requerimientos que exige la norma peruana, donde están determinados los parámetros tanto físicos como químicos, así también especifica el manejo de animales saludables, libre de enfermedades zoonóticas, inflamación mamaria y enfermedades que sean infecto contagiosas (Benincore, 2004).

b. Características físico químicas de la leche

La leche tiene una apariencia blanca y líquida, más densa que el agua, de un sabor azucarado y de olor ligero. Las características que presenta en la parte física y química de la leche son fundamentales para garantizar su calidad, identificar posibles adulteraciones y optimizar su uso en procesos industriales como la pasteurización y la producción de derivados lácteos, tales como quesos y yogures (Veisseyre, 2000).

Tabla 1. Características físico químicas de la leche de vaca

Características	Valores
Densidad a 15 °C	1,030 a 1,034 g/ mL
pH	6,5 a 6,6
Calor específico	0,93
Punto de congelación	- 0,55 °C

Fuente: Veisseyre (2000).

c. Composición de la leche y su valor nutricional

El contenido nutricional de la leche suele presentar diferencias que van a depender, de especie del ganado, la alimentación, la época del año, la capacidad de mantenerlo saludable y con bienestar; así también, las circunstancias de higiene que va desde antes, durante y después del ordeño, así se ve influenciado por el acceso al avance tecnológico para desarrollar una producción de forma competitiva (Moncada y Pelayo, 2011).

Tabla 2. Composición de la leche de vaca por cada 100 g

Nutrientes	Cantidad	Unidad
Agua	88,0	g
Energía	61,0	kcal
Lactosa	4,7	g
Grasa	3,4	g
Minerales	0,72	g
Proteína	3,2	g

Fuente: Moncada & Pelayo (2011).

d. Aptitud de la leche en la elaboración de queso

La capacidad de la leche en la elaboración de queso, está determinada por las características organolépticas, tanto físicas, químicas y microbiológicas, ante ello, es fundamental evaluar los análisis previos que permitan garantizar la obtención de un queso uniforme y de alta calidad. Para su adecuado uso en la producción quesera, la leche debe cumplir con cuatro condiciones esenciales: coagular eficientemente con el cuajo, permitir una adecuada eliminación del suero, ofrecer un buen rendimiento quesero y presentar una óptima calidad microbiológica, lo que se puede traducir en la obtención de quesos con sabor y aroma deseados (Madrid, 1993).

2.2.2. El queso

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), el queso es definido como producto alimenticio, que puede ser fresco o madurado, siendo este obtenido mediante la coagulación las caseínas de la leche y la posterior separación del suero. Esta leche puede ser proveniente de los ganados vacuno y/o caprino. En el proceso de producción se incorpora el cuajo, una sustancia que contiene la enzimas como la quimosina o renina (obtenida del 4to estómago de rumiantes en estado de lactancia), el cual actúa sobre la caseína, provocando la coagulación para formar el cuajo. Posteriormente es eliminada el suero y es añadida la sal como parte del proceso de conservación. La producción del queso se remonta a épocas prehistóricas, empleándose leche de diferentes mamíferos. Actualmente, la mayor parte del queso se elabora con leche de vacuno, aunque ha crecido notablemente la elaboración con leche de oveja o cabra (Carranco et al, 2015).

2.2.3. Clasificación del queso según su consistencia (contenido de humedad) (Silva, 2023)

- a. **Queso fresco:** Es un producto elaborado a partir de una leche pasteurizada, la cual no requiere el proceso de maduración, por lo cual está disponible para su ingesta luego de su producción.
- b. **Queso semimadurado:** Se trata de un tipo de queso fabricado con leche pasteurizada, que pasa por un periodo corto de maduración de 10 días bajo condiciones ambientales apropiadas como temperatura y humedad controladas, lo que permite el desarrollo de cambios tanto bioquímicos como físicos característicos de este tipo de quesos.
- c. **Queso madurado:** Este queso, también elaborado con leche pasteurizada, sometido a un proceso de maduración no menos a 20 días en condiciones ambientales apropiadas para desarrollar ciertos cambios característicos bioquímicos y físicos.
- d. **Queso madurado por mohos:** Producto elaborado con leche en cuyo proceso de maduración está influenciado principalmente al desarrollo del crecimiento de mohos, tanto en su interior como por la superficie del producto, lo que confiere atributos distintos en sabor, aroma y apariencia.
- e. **Queso fresco semi seco:** Elaborado a partir de leche pasteurizada y es sometido a un secado parcial en condiciones controladas de temperatura y humedad. Este tratamiento reduce contenido de agua que parcialmente modifica sus características originales, Posee una textura firme, es algo más difícil de ser cortado, y su pasta suele presentar una tonalidad crema amarillenta.

2.2.4. Agentes que participan en la maduración del queso (FAO, 2004).

- a. **Aireación.** El oxígeno proporciona condiciones para el crecimiento de la microbiota ya sea en presencia o ausencia de oxígeno o de manera facultativa. La aireación en dicho proceso asegura los requerimientos de oxígeno para de la microbiota superficial de productos tipo madurados.
- b. **Humedad.** Este agente favorece al crecimiento microbiano participando en el proceso de maduración del queso, teniendo un alto contenido de líquido por lo que maduran rápidamente, a comparación de los que presentan un bajo contenido de humedad la maduración se prolonga considerablemente.
- c. **pH.** Este factor no sólo condiciona el desarrollo microbiano, sino demuestra que los valores de pH que fluctúan desde 4,7 hasta 5,5 en su gran mayoría y desde 4,9 a 7,0 en quesos tipo madurados por los hongos. Las fases iniciales de

elaboración establecen la velocidad de formación de acidez que junto a la pérdida de lactosa determinan que este factor sea más bajo. Posteriormente durante las etapas iniciales de producción del queso, la formación del ácido láctico y la disminución de lactosa provocan una rápida acidificación, alcanzando así un pH más bajo, la acción de las bacterias y mohos generan compuestos de naturaleza neutra o alcalina, lo que eleva progresivamente el pH, este aumento es notorio cuando ocurre una actividad proteolítica modificando así la acidez del producto final.

- d. Los microorganismos y su relación con el pH.** Los denominados no esporulados desempeñan un papel importante dentro de los microorganismos asociados a lo largo de toda la escala de pH. Aunque existan diferencias estructurales de la pared celular entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, esto nos indica que ambos grupos pueden adaptarse a distintos niveles de acidez o alcalinidad del medio, lo que influye de manera directa en su comportamiento durante la etapa de fermentación y conservación de productos lácteos como el queso.

2.2.5. Las bacterias ácido lácticas

a. Características de las bacterias ácido lácticas

La información de los productos lácteos como el yogurt se originó en el Siglo XVIII, donde los agricultores de Europa, África y Asia, lograron observar las características de la leche en las temporadas cálidas, la leche coagulada en estas condiciones presenta un sabor distinto por la inoculación bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL, están incluidas en un grupo de microorganismos denominados cultivos lácticos e iniciadores, su manipulación se da para acidificar la leche, se encuentran presentes de forma natural en la leche, son un grupo diverso de bacterias grampositivas que se especializan en la fermentación de la lactosa (azúcar de la leche). Como subproducto de la fermentación, estas bacterias producen ácido láctico y, al hacerlo, crean un ecosistema único. La fermentación de las BAL también incrementa el contenido vitamínico de la leche, en particular al incrementar los niveles de vitaminas B y K (Hendy et al., 2021).

Estas bacterias presentan una estructura menos compleja a diferencia de las células de los organismos superiores. Estas células son procariotas (su núcleo formado por un cromosoma y carecen de la membrana nuclear). Las bacterias desempeñan un papel fundamental en la industria lo que permite desarrollar importantes progresos en la fisiología celular y la genética. Las bacterias poseen distintas variedades en su

organización estructural como son los cocos, bacilos y espirilos (Aparicio, 2016). Las BAL desempeñan una función indispensable en diferentes productos de la industria principalmente alimentaria, por su capacidad de acidificar, lo que no sólo ayuda a preservar los alimentos, sino también por su implicancia en el sabor, olor, textura y el desarrollo de aromas en alimentos obtenidos por fermentación (Parra, 2010).

Las BAL, son un conjunto de microorganismos formados por diferentes géneros, los cuales presentan semejanzas en sus características fisiológicas, morfológicas y el metabolismo, aunque las bacterias ácido lácticas presentan una gran diversidad genética, son microorganismos Gram positivas, no generan esporas, carecen de pigmentación y no reducen los nitratos, ni producen catalasa. Las bacterias lácticas son anaerobias pero aerotolerantes, se caracterizan por la producción de ácido láctico como el resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Xiaochun et al., 2021). Las bacterias lácticas, desde el punto de vista biotecnológico, son empleadas en la industria láctea, los cuales se pueden clasificar también según su temperatura óptima de crecimiento, por lo tanto, los iniciadores primarios son cepas adecuadas para la producción del ácido láctico, capaces de influir en el descenso de pH, hasta llegar por debajo de 5,3 a las 6 horas de crecimiento a temperatura de 30 y 37 °C (Tedorov 2010; Bachmann et al. 2011).

b. Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman un grupo natural de bacterias Gram positivas, con una morfología de coco, coco-bacilo o bacilo (con la sola excepción del género *Sporolactobacillus*) (Aparicio, 2016), las BAL fermentan carbohidratos para formar el producto más importante como es el ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono (Fox, et al. 2023).

Gran parte de las bacterias ácido lácticas sólo obtienen energía producto de los azúcares y otros compuestos relacionados. Por su limitada capacidad biosintética, son muy exigentes nutricionalmente por ello, necesitan factores de crecimiento como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio et al., 1994).

Las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus*, requieren medios suplementados con nutrientes como aminoácidos naturales, vitaminas del complejo B, glucosa, acetato, ácido y son incapaces de utilizar hidratos de carbono complejos (Loo et al., 2025). Las taxonomías revisadas sugieren que las BAL forman un grupo diverso de géneros que comprenden los siguientes: *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Sporolactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. Sin embargo, los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*. Conforman el corazón del grupo de bacterias del ácido láctico, son los comúnmente aceptados, los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* forman parte de los probióticos más populares en la actualidad. Ya que, el consumo de alimentos fermentados está asociados con diversos beneficios para la salud, como lo es, la modulación del sistema inmunitario y la actividad antibacteriana. (Hakim et al., 2023). La clasificación de las BAL, está basada principalmente en la morfología, en el modo de fermentación de la glucosa, se encuentra a las homolácticas (producen ácido láctico) o heterolácticas (producen ácido láctico y otras sustancias), teniendo crecimiento a diferentes temperaturas (mesófilas o termófilas), facilidad para crecer a altas concentraciones de sal (halotolerantes y no halotolerantes), así también tolerantes a condiciones ácidas y alcalinas.

c. Metabolismo de las bacterias lácticas

La característica esencial del metabolismo de las bacterias ácido lácticas, es su eficiencia para fermentar carbohidratos, generar Adenosina Trifosfato (ATP), para propósitos biosintéticos, además de la gran capacidad para degradar distintos carbohidratos y otros compuestos relacionados. Usualmente el producto final que predominante es el ácido láctico. No obstante, las bacterias ácido lácticas se pueden adaptar a diversas condiciones y así, cambiar su metabolismo, provocando la producción de diversos productos finales del proceso de fermentación. Estos se acumulan dependiendo de las especies involucradas, la composición química del ambiente de cultivo y las condiciones físicas que hay durante el proceso fermentativo, En consecuencia, se puede obtener a partir de una molécula de glucosa, dos moléculas de ácido láctico y dos moléculas de adenosina trifosfato (ATP) a través de la vía glucolítica (Abdul et al., 2023).

Los estudios de microbiología láctica comenzaron con la investigación del proceso de acidificación que ocurre naturalmente en la leche, suero de quesería o suero de manteca (Rodríguez, 2019).

Estos productos acidificados fueron utilizados por mucho tiempo atrás como inóculo para la producción del queso, mantequilla y otros cultivos lácticos, pero las fermentaciones eran imprevisibles y de una calidad desigual. Por ello, la producción comercial de cultivos iniciadores creció exponencialmente en la industria láctea debido a sus múltiples ventajas.

Actualmente, diversos productos del ámbito de lácteos, son elaborados con cultivos iniciadores comerciales, que fueron aislados y seleccionados en función de su variedad, de propiedades deseadas y de la velocidad de producción de ácido láctico. Entre las propiedades valoradas se incluyen la producción de sabores, aromas, resistencia a los bacteriófagos, tolerancia a la sal, entre otros. (Aparicio, 2016).

d. Rutas principales de fermentación

- **Fermentación Homoláctica**

También llamada Glucólisis, es el resultado de la obtención del ácido láctico como producto final, la fermentación homoláctica llamada también Embden Meyerhof Parnas, lo realizan las especies de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* son homofermentadores, que se caracterizan por metabolizar glucosa que es una hexosa, teniendo un rendimiento neto de dos moles de ATP por mol de la hexosa fermentada. Se muestra en la figura 1, la obtención del ácido láctico como producto final de dicho proceso. Lo que da entender es que las bacterias poseen diversas enzimas como la aldosa y hexosa isomerasa, pero no disponen de fosfoetolasa. Dentro de esta clasificación encontramos al género *Lactobacillus* dispuestos en forma de bastones largos, de cadenas especialmente cortas, así también, son ampliamente reconocidas por su capacidad de fermentar carbohidratos.

Estas bacterias se desarrollan en ambientes anaerobios, toleran condiciones ácidas y como una temperatura óptima de crecimiento entre 30 °C a 45 °C, los *Streptococcus*, con formas de esfera y en disposición de cadenas, con una buena acidificación y de menor actividad caseolítica (Hernandez, 2009).

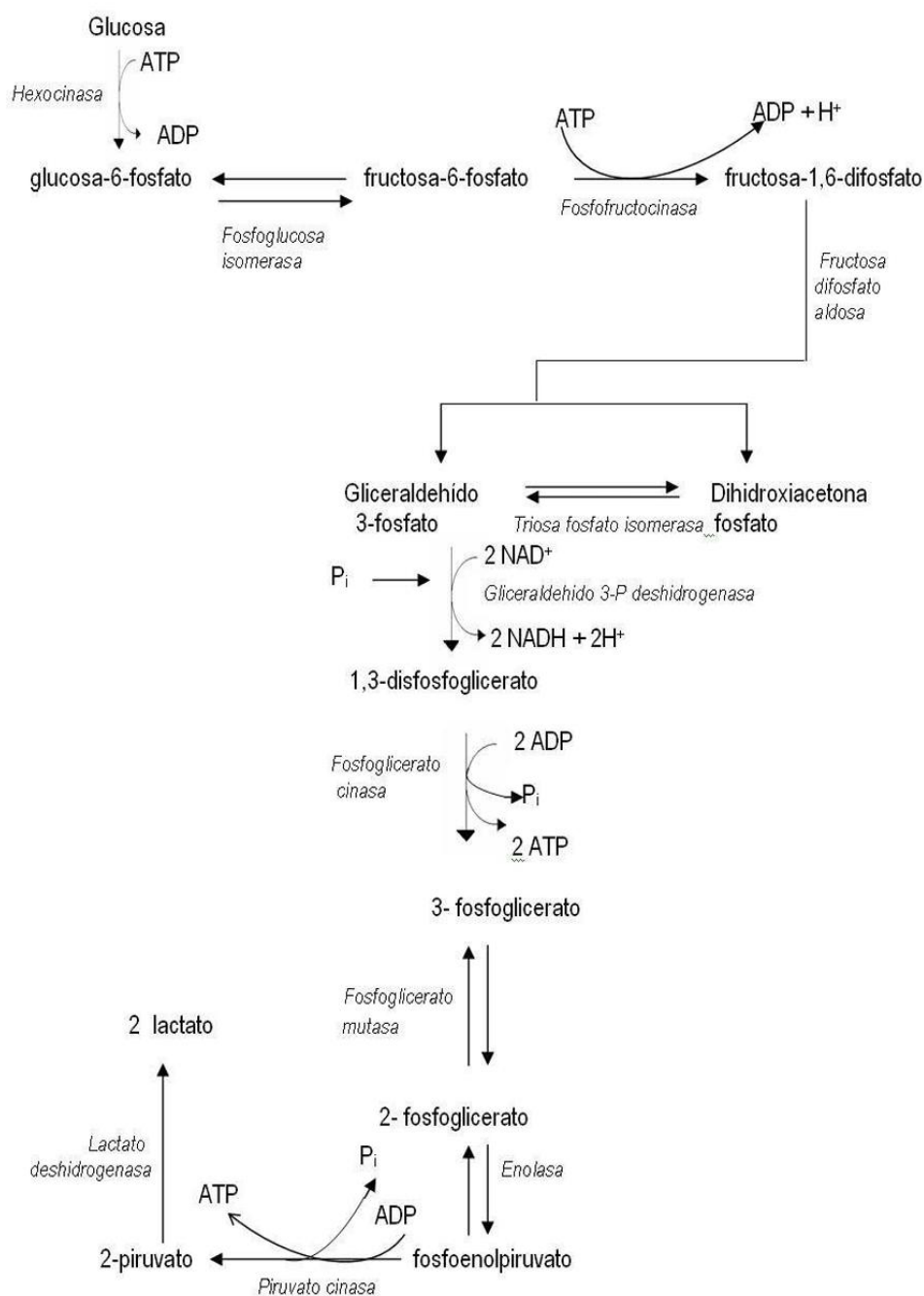


Figura 1: Fermentación homoláctica de azúcares en bacterias ácido lácticas, llamada vía Glicolítica o Embden Meyerhof Parnas (Ortiz, 2006).

- **Fermentación Heteroláctica**

Este proceso es realizado por la enzima 6-fosfogluconato fosfocetolasa, produciendo como resultados cantidades significativas de productos como, el acetato, el CO₂ y el etanol, además del ácido láctico. En la fermentación de hexosas, el ácido láctico puede llegar hasta 70 % de los productos catabólicos finales, que van con las cantidades equimolares de CO₂ y acetato o etanol. Presentando un producto neto de

un mol de ATP por mol de hexosa (Vandamme, et al. 1996).

Este grupo de bacterias posee la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la hexosa isomerasa y la aldosa, ante esto utilizan la vía de las hexosas monofosfato o llamada también vía de la pentosa. En la Figura 2, se tiene a las especies heterolácticas que son obligadas a utilizar la ruta fosfohexosa para metabolizar carbohidratos presentes en la leche, para la producción de lactato, ácido acético y etanol con la generación de dióxido de carbono; también la D-galactosa puede ser metabolizada a través de la ruta tagatosa 6-fosfato (Zuñiga et al., 2020).

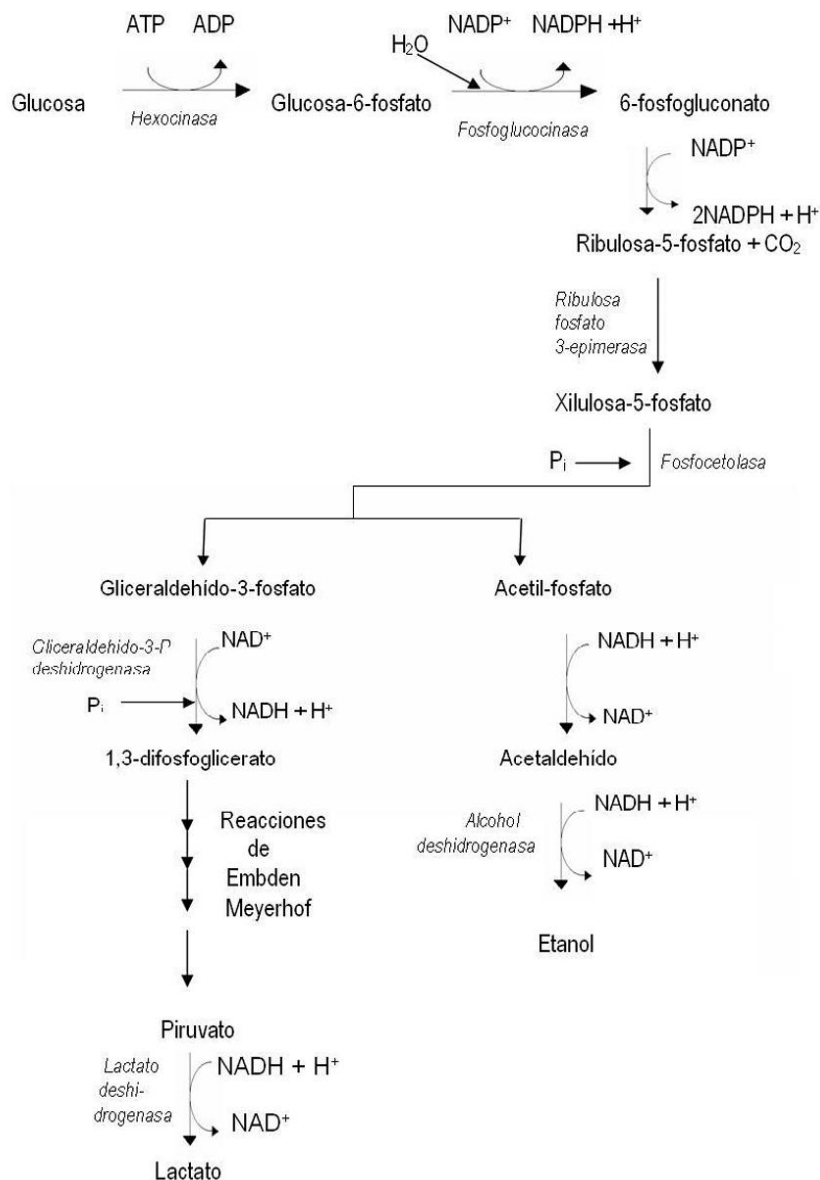


Figura 2: Fermentación heteroláctica de azúcares en bacterias ácido lácticas. Vía de la pentosa fosfato (Ortiz, 2006).

e. Bacteriocinas

Las bacteriocinas, son definidas como péptidos que tienen un origen ribosomal, secretados al medio extracelular que poseen la capacidad de impedir el crecimiento de microorganismos patógenos (Monroy et al., 2009; Beshkova y Frengova, 2012; Mondragón Preciado et al., 2013). En la naturaleza existe una diversidad bacteriana, lo que se estima un 99 % de dichas bacterias logran producir cuando menos una bacteriocina (Dolz, 2008).

En la actualidad las bacteriocinas son definidas: "macromoléculas que contienen proteínas que ejercen una actividad bactericida hacia bacterias taxonómicamente relacionadas con la cepa productora" (Heredia et al. 2017). Gran parte de las bacteriocinas se producen en el periodo exponencial de crecimiento y su cantidad en el medio de cultivo, es directamente dependiente de la cantidad de biomasa producida. Debido a la abundante variedad de bacteriocinas, es necesaria su clasificación. Teniendo en cuenta que las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son basadas en las siguientes características: la composición química, la estructura secundaria y el mecanismo de acción (Heredia et al., 2017).

f. Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas

Industria alimentaria y fermentación: Las BAL son microorganismos clave En el proceso de fermentación de alimentos, es un proceso que no solo mejora la conservación, sino que también potencia el valor nutricional y sensorial de los productos. Son utilizadas en: productos lácteos (yogur, kéfir y quesos), vegetales fermentados (chucrut, kimchi y pepinillos), bebidas (kombucha y jugos funcionales), carnes fermentadas (salchichas, jamones curados) y panificación (masa madre). Además, se producen compuestos antimicrobianos naturales como bacteriocinas (nisina), peróxido de hidrógeno, y ácidos orgánicos, lo que otorgan propiedades conservantes (Gänzle, 2015).

Probióticos y salud humana: Las BAL se utilizan como probióticos, definidos como "microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del hospedero", mejorando el equilibrio de la microbiota intestinal, estimulación del sistema inmunológico y producción de vitaminas (B12, ácido fólico). Desafortunadamente, existe un uso indebido del término probiótico lo que lo convierte en un inconveniente importante, con diversos productos que explotan el término sin estar dentro de los criterios requeridos. Por ello, los productos probióticos poseen la atención de autoridades competentes para su regulación con el interés de proteger a los consumidores de afirmaciones engañosas (Hill, 2014).

Las BAL también se usan en la agricultura, poseen propiedades que benefician el crecimiento de plantas y la salud del suelo, contribuyendo como agente de control biológico inhibiendo hongos como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Botrytis* mediante producción de ácidos orgánicos y compuestos antimicrobianos, así también actúan como bioestimulantes para favorecer la absorción de nutrientes (Radhakrishnan et al., 2017).

g. Perspectivas de las bacterias ácido lácticas

Se desarrollan en el campo de la ingeniería genética y cepas diseñadas, permitiendo el avance de la biología sintética lo que ha ayudado a modificar genéticamente a las BAL, con el fin de expresar proteínas de interés como insulina o antígenos, ayudó al desarrollo de vacunas orales contra *Helicobacter pylori*. Así también, se desarrolló la producción de biomoléculas funcionales, ya que las BAL pueden actuar como fábricas celulares para producir péptidos bioactivos con funciones antihipertensivas o inmunomoduladoras, exopolisacáridos que poseen un potencial prebiótico y espesante alimentario y biosurfactantes usados en cosmética, medicina y biorremediación. La medicina personalizada y microbioma, es otro campo en la cual se recurren a las BAL para desarrollar probióticos personalizados, adaptados a la microbiota individual y usarlos como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades como cáncer, Alzheimer, diabetes y obesidad. Así como en el campo de la salud, se tienen avances en la sostenibilidad ambiental ya que las BAL también tienen un papel potencial en la biotecnología ambiental en el tratamiento de efluentes y residuos orgánicos, en la producción de biogás a partir de biomasa fermentada y la biodegradación de plásticos o contaminantes tóxicos. Otra tecnología es la ómica y metagenómica, utilizando la metagenómica para estudiar su rol en comunidades microbianas, la transcriptómica y proteómica para analizar mecanismos de adaptación y estrés y el uso de CRISPR-Cas para editar genéticamente cepas con precisión (Lee et al. 2017).

2.2.6. Enzimas lácticas

Las enzimas lácticas, son proteínas que actúan como catalizadores en los procesos bioquímicos, los cuales ocurren durante la fermentación y transformación de la leche. Las mencionadas enzimas son formadas en bacterias ácido lácticas, que desempeñan un importante papel clave para elaborar productos como quesos, yogures y otros fermentados lácteos (Savijoki et al. 2006).

Las bacterias lácticas, además de contribuir en preservar alimentos, logran mejorar las características sensoriales como el olor, el sabor, la textura y aumentan la calidad,

en otros casos las enzimas de la materia prima tienen un papel para el desarrollo de las características organolépticas mencionadas (Parra 2010).

Las enzimas presentes en las bacterias ácido lácticas son:

- a. **β -galactosidasa (lactasa):** Es una enzima que tiene función de romper el enlace β -1,4 de lactosa, un disacárido presente en la leche, liberando monosacáridos como la glucosa y galactosa. Esta reacción facilita la digestión de productos lácteos en personas que presentan intolerancia a la lactosa y favorece el crecimiento bacteriano durante la fermentación, por lo tanto, permite la producción baja de lácteos y mejora el dulzor y la fermentabilidad en productos como el yogur y kéfir (Savijoki et al., 2006).
- b. **Proteasas:** Son enzimas encargadas de catalizar los enlaces peptídicos en las proteínas, como la caseína (proteína de leche), generando como resultado los aminoácidos. La proteasa es esencial en la coagulación de la leche formando el cuajo, participando también en la maduración de quesos y desarrollo de la textura (Fuentes et al., 2017).
- c. **Peptidasas:** Son enzimas que actúan sobre los péptidos productos de las proteasas, degradándolas en aminoácidos libres, entre ellos podemos encontrar a las aminopeptidasas, dipeptidasas, poliendopeptidasas, entre otros. Siendo importante su aporte en brindar sabores característicos durante la maduración del queso, mejorando así la digestibilidad y contribuyendo en las funciones bioactivas (antihipertensivos naturales) (Fox, 2023).
- d. **Lipasas:** Enzimas que participan hidrolizando lípidos, especialmente los triglicéridos, rompiendo los enlaces éster y liberando ácidos grasos libres, y glicerol, que contribuyen en el sabor y el aroma intenso, que son característicos de los quesos maduros (Tamime, 2007).
- e. **Glutaminasa:** Encargada de convertir la glutamina en glutamato, dicha enzima en los *Lactobacillus* y *Lactococcus* participan en el sistema proteolítico que permite el crecimiento de las bacterias en la leche y su posterior desarrollo del sabor (propiedad umami) (Tuncer, 2009).
- f. **Decarboxilasas:** Enzimas que eliminan el carboxilo de los aminoácidos, generando aminas biógenas como histamina, tiamina y cadaverina. Participan en el aroma de los alimentos fermentados, pero su acumulación puede ser indeseable produciendo migrañas, presión alta, entre otros (Fuentes et al., 2017).
- g. **Esterasas:** Encargadas de hidrolizar los enlaces éster de compuestos fermentados, desarrollando el sabor con la liberación de ácidos grasos libres,

aroma, maduración de quesos, además participan en la actividad antioxidante por las esterasas que cumplen esa función (Fox, 2023).

2.2.7. Técnicas moleculares en la identificación de bacterias ácido lácticas

- **Taxonomía molecular microbiana**

- a. El Método de Sanger – Terminación de cadena**

El método de Sanger, también llamado método de terminación por dideoxynucleótidos (ddNTPs), se basa en la síntesis *in vitro* de una nueva hebra de ADN, en presencia de nucleótidos modificados (ddNTPs), que impiden la elongación cuando se incorporan. Cada ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) son incorporados en una reacción separada y marca el final de una cadena sintetizada. Produciendo fragmentos de distintas longitudes, con la terminal en una base específica. Dichos fragmentos son separados por electroforesis. Desarrollando así los secuenciadores automáticos mediante electroforesis capilar hasta llegar a la generación de electroferogramas digitales (Sanger et al., 1977), el método de Sanger tiene los siguientes procedimientos:

1. Preparación del ADN molde: Se extrae y purifica la cadena de ADN que se desea secuenciar, dicha cadena será una plantilla para la síntesis de la nueva hebra.
2. Preparación de la mezcla de reacción: se realiza la mezcla de ADN molde, Cebador específico (primer - se une al inicio de la secuencia deseada), ADN polimerasa (enzima que sintetiza la nueva cadena), cuatro dNTPs normales (A, T, C, G - permiten el alargamiento normal de la cadena), una pequeña cantidad de ddNTPs (dideoxynucleótidos - que detienen la síntesis al no tener grupo 3'-OH).
3. Reacciones paralelas; se realizan cuatro reacciones separadas, cada una con un tipo diferente de ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP o ddGTP). En la cual, cada reacción genera una mezcla de fragmentos de ADN de diferentes longitudes, todos terminando en la misma base (A, T, C o G).
4. La separación por electroforesis: los fragmentos producidos son separados por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o por electroforesis capilar.
5. Lectura de la secuencia: se da mediante el método clásico, en la cual, se lee la posición de cada banda en el gel (de abajo hacia arriba) y el método moderno, que utiliza el software interpreta los picos de color para dar la secuencia del ADN.

b. El Método de Maxam - Gilbert – degradación química selectiva

Basada en la modificación química específica de las bases nitrogenadas del ADN, seguida por la hidrólisis del esqueleto fosfodiéster en los sitios modificados. Esto permite generar fragmentos de ADN de diferentes longitudes, cada uno cortado en una base determinada (A, T, C o G). A diferencia del método de Sanger, no depende de la síntesis enzimática de ADN. En su lugar, se fragmenta una cadena marcada de ADN de manera controlada usando reactivos químicos que atacan grupos funcionales específicos de las bases (Heather y Chain, 2016), teniendo los siguientes pasos:

1. Marcado del ADN: el ADN (cadena sencilla) se marca en el extremo 5' con fósforo radiactivo (^{32}P) usando polinucleótido quinasa y ATP- γ - ^{32}P y el marcado permite visualizar los fragmentos después del corte.
2. Desnaturalización del ADN: se desnaturaliza el ADN bicatenario a cadena sencilla con calor o alcalinidad, ya que solo una cadena se secuencia.
3. Tratamiento químico selectivo: el ADN se divide en 4 tubos, y se somete a uno de los siguientes tratamientos.
 - Tubo 1: reactivo Dimetilsulfato (DMS), base atacada G.
 - Tubo 2 ácido fórmico, base atacada A + G.
 - Tubo 3: hidrazina, base atacada C.
 - Tubo 4: hidrazina NaCl, base atacada C+T.
4. Ruptura con piperidina: se agrega piperidina caliente, rompe el ADN en los lugares modificados químicamente y como resultado se obtiene la mezcla de fragmentos que terminan en una base específica.
5. Separación por electroforesis: los fragmentos de ADN se separan según tamaño en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (7 - 20%).
6. Visualización: el gel es expuesto a rayos X. teniendo en cuenta que las bandas oscuras representan fragmentos que terminan en una base específica.
7. Lectura de la secuencia: Se lee de abajo (fragmento más corto) hacia arriba (fragmento largo), combinando la información de los 4 carriles (G, A+G, C, C+T), se deduce la secuencia.

c. Taxonomía molecular microbiana usando NGS - Plataforma Illumina

La taxonomía molecular microbiana mediante secuenciación de nueva generación (NGS), permitió el análisis y la identificación de microorganismos a partir de su ADN

extraído, sin necesidad de cultivo. Utilizando genes altamente conservados como el ARNr 16S (para bacterias y arqueas), el ITS (en hongos) o el 18S (en protistas), que contienen regiones variables suficientes para identificar hasta nivel de género o especie (Klindword et al., 2013), siguiendo etapas como:

1. Extracción del ADN: se obtiene a partir de muestras (cepas de bacterias ácido lácticas).
2. Amplificación por la técnica de PCR, se selecciona un gen universal conservado para bacterias 16S rRNA, en hongos ITS1 o ITS2 y en eucariontes 18S rRNA.
3. Preparación de librerías: se añaden adaptadores Illumina que permiten la unión al Flow cell y etiquetas (barcodes) para la identificación de múltiples muestras en una misma corrida.
4. Secuenciación Illumina MiSeq, permite lecturas paired-end de 2×250 pb, cubriendo completamente regiones como V3–V4 del 16S. En el cual los fragmentos se fijan en una flow cell, se amplifican en clusters mediante amplificación por puente, se incorporan nucleótidos fluorescentes detectados por cámara y se genera una lectura digital por cada base incorporada.

Dentro de la taxonomía molecular microbiana usando NGS – plataforma Illumina, se encuentra el secuenciamiento que se usó para la identificación de las bacterias ácido lácticas.

- **Secuenciamiento del Gen ARNr 16S**

Es una técnica molecular para la identificación, clasificación y filogenia de bacterias. Dicho gen codifica el ARN ribosomal 16S, que es parte de la subunidad pequeña (30S) del ribosoma bacteriano que cuenta con regiones altamente conservadas que posibilitan el diseño de cebadores universales intercaladas por regiones variables que ayudan a distinguir entre especies bacterianas (Woese y Fox, 1977). Por ello, en estudios se convierte en un marcador molecular ideal para estudiar las relaciones evolutivas entre los procariotas especialmente cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, entre otros, con implicancias tecnológicas y de seguridad alimentaria (Clarridge, 2004).

El secuenciamiento comprende las siguientes etapas:

1. Extracción de ADN: Se obtiene el ADN genómico total de cultivos bacterianos puros o mezclas complejas como los alimentos fermentados.
2. Amplificación por PCR: Se utilizan cebadores universales para amplificar

aproximadamente 1500 pares de bases del Gen RNAr 16S.

3. Secuenciación: Puede realizarse mediante secuenciación Sanger para estudios puntuales, o técnicas de nueva generación (NGS) como Illumina,
4. Análisis bioinformático: Las secuencias se comparan con bases de datos como GenBank, SILVA o RDP para identificar los microorganismos presentes.

Las aplicaciones inmersas en el secuenciamiento del Gen RNAr 16S, son para la identificación de bacterias especialmente útil en la microbiología clínica, alimentaria y ambiental lo que permite identificar bacterias no cultivables, participan en la clasificación y filogenia con la reconstrucción de relaciones evolutivas mediante árboles filogenéticos en base del descubrimiento del dominio Archaea por Carl Woese. Otros estudios son los metagenómicos en ayuda para el análisis de la diversidad microbiana en muestras complejas como suelo, intestino, aire o agua.

d. Tecnología Oxford de nanoporos

Esta tecnología sus inicios fueron a principios de la década de 1990, representando una revolución en la genómica moderna, permitiendo así una secuenciación portátil, rápida y de moléculas completas, a diferencia de las tecnologías anteriores (como Illumina o Sanger), ONT no necesita amplificación por PCR ni síntesis de ADN, y puede leer moléculas largas, completas y sin interrupción. Para ello los laboratorios alcanzaron una serie de hitos para el desarrollo de una plataforma funcional de secuenciación por nanoporos. Estos hitos incluyeron el uso de una membrana sintética con nanoporos biológicos, que a través de estos nanoporos pasa una única hebra de ADN o ARN y una corriente eléctrica constante fluye a través del poro. Por ello, cada base nitrógenada (A, T, G, C o U) interfiere con la corriente de manera única en la cual, un detector mide los cambios de voltaje y traduce los patrones eléctricos en secuencias de bases (Tyler et al., 2018).

Para llevar a cabo el proceso de secuenciación, se utilizó el dispositivo MinION, un secuenciador portátil de ADN por nanoporos que pesa aproximadamente 90 gramos. Su componente central es una celda de flujo equipada con hasta 2048 nanoporos, que pueden ser controlados en grupos de 512 a través de un circuito integrado de aplicación específica (ASIC). Antes de la secuenciación, se incorpora adaptadores a ambos extremos de los fragmentos de ADN genómico. Estos adaptadores tienen múltiples funciones: facilitan la captura del ADN, permiten la incorporación de una enzima procesiva en el extremo 5' de la hebra y favorecen el paso controlado de la cadena por el poro, avanzando nucleótido por nucleótido en tiempos del orden de

milisegundos. Además, los adaptadores concentran las moléculas de ADN cerca de la membrana, incrementando significativamente la eficiencia de captura, seguidamente un adaptador en forma de horquilla une covalentemente ambas hebras del ADN de doble cadena, lo que permite leer de forma continua la hebra principal y su complemento. Una vez que la molécula es capturada por un nanoporo, la enzima guía realiza la lectura de la hebra principal y al tener contacto con la horquilla, se inicia la lectura de la segunda hebra complementaria. Durante el paso del ADN por el poro, se detectan variaciones en la corriente iónica, provocadas por las diferencias en las secuencias de bases que atraviesan el poro. Estas variaciones se registran como eventos eléctricos discretos, cada uno con su propia duración, intensidad media y variabilidad. Posteriormente, estos eventos se interpretan mediante modelos computacionales como una secuencia de kmers. Finalmente, las lecturas de ambas hebras se alinean para generar una lectura 2D de alta calidad, basada en la combinación de la información complementaria, lo cual brinda una lectura en tiempo real y se aporta a la clasificación taxonómica con bases como NCBI, SILVA, GTDB, EPI2ME-Live (Sanger et al., 1977).

III. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación

Lugar de muestreo: La localidad de Vizcapalca

- Ubicación política: Departamento e Huancavelica, Provincia de Huaytará, Distrito de Pilpichaca, Centro Poblado de Vizcapalca
- Ubicación geográfica: Región Natural: Sierra, Altitud de 3 377 msnm, coordenadas UTM: 18L 522370.22 m E, 8499929.55 m S

Lugar de procesamiento de muestras

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica del Área Académica de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Muestreo y transporte de las muestras al laboratorio

Se recolectaron 30 muestras de quesos artesanales de los barrios queseros, localidad de Vizcapalca, con el muestreo no probabilístico por conveniencia, siendo las muestras obtenidas por su fácil acceso, dichas muestras se transportaron en *coolers* con bloques de hielo en gel para mantener la temperatura aproximada de 4 °C, posteriormente fueron llevadas a los ambientes del Laboratorio de Bioquímica donde fueron procesadas dentro de las 12 h.

3.3. Aislamiento de bacterias ácido lácticas del queso

A cada muestra de queso recolectado, se realizó un corte de forma radial del centro del queso, usando un cuchillo estéril. Cada porción pesó 25 g, para luego ser homogenizada con 225 mL de caldo MRS por un minuto en una licuadora, en condiciones asépticas. Posteriormente, se realizó diluciones seriales hasta 10^{-4} con 90 ml de caldo MRS. A partir de la dilución 10^{-4} se tomó 0,1 mL de muestra y se realizó la siembra por disseminación.. Dicho proceso fue realizado por duplicado en placas conteniendo agar MRS (Merck 2020). Las placas fueron incubaron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 72 horas (Alvarado et. al., 2007).

3.4. Identificación molecular de las bacterias aisladas

3.4.1. Caracterización física

Para la identificación de los microorganismos a nivel de sus características morfológicas, se realizaron ensayos por triplicado, mediante observaciones macroscópicas y microscópicas con coloración de Gram para su identificación.

3.4.2. Identificación molecular de bacterias ácido lácticas mediante Secuenciación

Las cepas de bacterias ácido lácticas aisladas y características se enviaron al laboratorio Umbrella Genomics Company en ciudad de Lima, para su identificación. En ella se procedió con la extracción de ADN, con los siguiente pasos:

- Se recolectó 1 mL de muestra de cultivo en un tubo estéril con capacidad 1,5 mL. Posteriormente fue sometida a una centrifugación a 800 x g durante 10 min. El pellet resultante fue trasvasado a un nuevo tubo estéril de 1,5 mL.
- Posteriormente se llevó a una segunda centrifugación a 8 000 x g durante 15 min. Eliminando el sobrenadante y proceder a dilución del pellet con 0,2 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline).
- En un siguiente proceso: Se añadieron 0,18 mL de solución de Digestión y 0,02 mL de solución de Proteinasa K, y se homogeneizó la mezcla suavemente mediante un vortex. Dicha mezcla fue incubó a 56 °C durante 40 minutos con agitación a 40 x g.
- En seguida, se añadió 0,02 mL de solución de RNasa A, y se homogenizó con un Vortex suave, permitiendo una incubación adicional de 10 minutos a temperatura ambiente sin agitación.
- Posteriormente, se incorporaron 0,2 mL de solución de Lisis a la muestra. Con una homogenización suave durante 30 segundos y se añadieron 0,4 mL de etanol al 50%, para nuevamente proceder con la homogenización por el Vortex.
- La mezcla obtenida se trasvasó a una columna de purificación, que se encuentra insertada en un microtubo colector de 2 mL, que se centrifugó a 6 000 x g durante 1 min. Luego, se desechó el tubo colector que contenía el líquido de desecho, y la columna de purificación se transfirió a un nuevo microtubo colector de 2 mL.
- En la siguiente etapa, se añadió 0,5 mL de Wash Buffer I (incluye etanol absoluto)

y sometiéndolo a una centrifugación a 8 000 x g. Nuevamente, se desechó el tubo colector con el líquido de residuo, y la columna de purificación se transfirió a un nuevo microtubo colector de 2 mL.

- Seguidamente, fueron añadidos 0,5 mL de Wash Buffer II (contiene etanol absoluto) y sometido a una centrifugación a 20 000 x g durante 3 minutos. Posterior a ello, se descartó el tubo colector que contenía el líquido de residuo, y la columna de purificación se transfirió a un microtubo de 1,5 mL.
- Finalmente, se incorporó 0,1 mL de Elution Buffer en el centro de la columna de purificación, incubándolo por 3 minutos a temperatura ambiente. Realizando la última centrifugación a 8 000 x g por 1 minuto. La columna de purificación fue descartada, y el ADN extraído se almacenó a una temperatura de -20°C, pasando por una evaluación de calidad del ADN extraído de las 4 muestras, en función a su tamaño molecular. Después se procedió con el PCR convencional con el uso de primers universales específicos para el Gen RNAr 16S. Luego se procedió al secuenciamiento del Gen RNAr 16S. Dicho proceso de secuenciación del ADN se realizó utilizando los primers externos 785F y 907R. Obteniendo una calidad de los resultados de secuenciación consideradas óptimas, siendo el valor de calidad superior a 20 (QV>20). El ensamblaje de las secuencias obtenidas de ADN fue realizado usando el software Geneious Prime.

Los resultados obtenidos se sometieron a una búsqueda en el Gen Bank por medio del programa BLAST en la página de la NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) para luego realizar por algoritmo de agrupamiento por el método de Neighbor-Joining (NJ), para la obtención de un dendrograma.

3.5. Caracterización de las bacterias ácido lácticas aisladas

a. Capacidad acidificadora de la leche

Se tomó 200 mL de leche estéril procesada a ultra alta temperatura (UHT), inoculando 2 mL de cultivos de cepas de BAL, incubándolos a 37 °C, se verificó el descenso del pH a las ocho horas posteriores (Alvarado et. al., 2007).

b. Resistencia a antibióticos

Se utilizaron los siguientes antibióticos: bencilpenicilina G 1.000.000 UI, amikacina 500 mg/2mL y Cefazolina 1g/2ml, dicho ensayo fue realizado mediante el método de

Kirby-Bauer. Las cepas a ensayar se incubaron en caldo MRS, la suspensión bacteriana fue sembrada en placas de Petri conteniendo agar MRS, en la superficie de este agar fueron colocadas discos de papel de filtro (5mm de diámetro) impregnados con antibióticos en diferentes concentraciones (5; 25; 50; 75; 100 µg/mL), para la bencilpenicilina se consideró 1.000.000 UI, que fueron equivalentes a 500 mg. Después de una incubación de 12 horas a una temperatura de 37°C, se midieron los halos de inhibición alrededor del disco, considerando a los halos con diámetro menor o igual a 5mm indican resistencia de la cepa (Alvarado et. al., 2007).

c. Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos

Para dicha prueba de acidificación de la leche en presencia de antibióticos, se tomó 200 mL de leche estéril UHT que fueron agregadas a un envase conteniendo antibióticos (bencilpenicilina G 1.000.000 UI, amikacina 500 mg/ 2 mL y Cefazolina 1g/ 2 ml), dichos antibióticos fueron inoculados con 2 mL del cultivo de los consorcios de las cepas seleccionadas, posteriormente fueron incubados a 37°C durante 8 horas, pasado el tiempo de incubación se pasó a medir el descenso del pH (Alvarado et. al., 2007).

IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Capacidad acidificante de las cepas de bacterias ácido lácticas, aisladas de quesos artesanales elaborados en la Localidad de Vizcapalca, durante un periodo de incubación de 8 h. Ayacucho 2024

N°	Muestra	pH inicial	pH final	Acidez (%)
1	A1	6,79	6,77	0,29
2	A2	6,79	6,76	0,45
3	A3	6,79	6,55	3,45
4	A4	6,79	6,00	11,64
5	A5	6,79	5,95	12,38
6	A6	6,79	6,79	0
7	B1	6,79	6,42	5,45
8	B2	6,79	6,62	2,51
9	B3	6,79	5,42	14,00
10	B4	6,79	6,78	0,15
11	B5	6,79	6,14	9,58
12	B6	6,79	6,63	2,36
13	C1	6,79	6,75	0,59
14	C2	6,79	6,76	0,45
15	C3	6,79	6,50	4,28
16	C4	6,79	5,55	18,27
17	C5	6,79	5,00	26,37
18	C6	6,79	6,22	8,4
19	D1	6,79	6,44	5,16
20	D2	6,79	6,25	7,96
21	D3	6,79	6,78	0,15
22	D4	6,79	5,98	11,93
23	D5	6,79	6,79	0
24	D6	6,79	6,22	8,4
25	E1	6,79	6,79	0
26	E2	6,79	6,38	2,04
27	E3	6,79	6,12	9,87
28	E4	6,79	6,40	5,75
29	E5	6,79	6,77	0,3
30	E6	6,79	6,20	8,96

En la presente investigación se realizó el aislamiento de bacterias lácticas tomando como muestras de origen, los quesos artesanales de diferentes barrios queseros del Centro Poblado de Vizcapalca, Distrito de Pillpichaca, Región Huancavelica. Los quesos provenientes de éste Centro Poblado, tienen características peculiares, en el aroma, olor y gusto lo que incrementa la demanda por los consumidores, asociándose a esta calidad, las bacterias lácticas nativas que están presentes en el proceso.

Para el aislamiento de las bacterias ácido lácticas se usó el caldo MRS, éstas bacterias presentan una capacidad de disminuir el pH durante el proceso de manufactura de los quesos, ésta característica también, impide el crecimiento de microorganismos no deseables, por lo que, las cepas de bacterias ácido lácticas que disminuyen el pH en periodos de tiempo más cortos son usados como iniciadores, para procesos de fermentación de productos lácteos. Tuncer (2009), en el estudio de propiedades tecnológicas de cepas de enterococos identificadas fenotípicamente, reporta a BAL, con características de disminuir el pH durante las primeras 8 horas. El resultado se reportó como una disminución del pH; leve, significativa y nula. Concluye que la disminución de pH, ya sea de manera leve, significativa o nula, es debido a la variabilidad en la respuesta metabólica de las bacterias ácido lácticas, relacionadas por factores como la genética o las condiciones ambientales.

En la Tabla 3, se reporta la capacidad acidificante de las bacterias ácido lácticas, mediante la medición del descenso de pH a partir de un valor inicial de 6,79 durante el periodo de incubación de 8 horas, siendo una característica de las bacterias ácido lácticas que se producen durante la fermentación de forma natural en el producto, mostrando que la muestra codificada como C5 disminuyó hasta 5,00 representando un 26,37% de capacidad acidificadora, siendo la que presenta mayor disminución de pH, así también las bacterias con codificación A6, D5 y E1 no varían el pH. Estos resultados coinciden con lo reportado por Nieto et al. (2008), quienes desarrollaron un estudio para elegir cultivos nativos para la elaboración de queso manchego, identificando a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* como los mayores productores de ácido láctico, mostrando que esta característica, inhibe el desarrollo de patógenos.

Tabla 4. Diámetro de halo de inhibición producido por antibióticos en bacterias ácido lácticas con capacidad acidificante, aisladas de quesos artesanales de Vizcapalca. Ayacucho 2024.

N°	MUESTRA	AMIKACINA					CEFAZOLINA					BENCILPENICILINA				
		5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	75 µg/mL	100 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	75 µg/mL	100 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	75 µg/mL	100 µg/mL
1	A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	A5	-	-	-	-	0,2mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	C5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	C6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	D1	-	-	-	0,2mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	D4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	E3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	E6	-	-	-	-	0,1mm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : sin crecimiento de halo

En la Tabla 4, se muestra los diámetros de los halos de inhibición producidos por el desarrollo de bacterias ácido lácticas con capacidad acidificante aisladas, frente al antibiótico amikacina; las bacterias A5 y E6 enfrentadas a la concentración de 100 µg/ml presentan un halo de 0,2 mm y 0,1 mm, respectivamente y la bacteria D1 muestra un halo de 0,2 mm de halo en una concentración de 75 µg/ml de amikacina, dichos resultados indicarían que ésta bacteria es más sensible a dicho antibiótico. La amikacina es un antibiótico usado para tratar infecciones bacterianas graves a diferencia de los antibióticos cefazolina y bencilpenicilina que no muestran sensibilidad, dicha característica fue estudiada por May et al. (2020), en *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* enfrentada a varios antibióticos. Las bacterias del estudio mostraron resistencia a la amikacina, como también, a otros aminoglucósidos como gentamicina y netilmicina. Por otro lado Vanegas et al. (2017), analizaron la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas autóctonas, frente a *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Aunque no especifican la resistencia o sensibilidad a la amikacina, destacan la capacidad de estas bacterias para producir bactericidas, como las bacteriocinas que podrían ofrecer una alternativa a los antibióticos tradicionales. Estos estudios resaltan la resistencia de las BAL, teniendo los resultados de la presente investigación se debe conocer si las BAL presentan susceptibilidad o resistencia para ello la OMS (2019), menciona que realizaron pruebas de susceptibilidad de las bacterias lácticas y se puede inferir que las bacterias lácticas (como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, entre otras) generalmente tienen una resistencia inherente a muchos antibióticos, incluidos los aminoglucósidos como la amikacina, debido a su biología y función. Así aporta que teniendo un halo > 15 mm las BAL son susceptibles al antibiótico, por el contrario al observar un halo <12 mm, concluyendo que las BAL son resistentes a la amikacina, lo cual significa que el antibiótico no tiene una acción efectiva sobre la bacteria.

Tabla 5. Capacidad acidificante en presencia de amikacina de bacterias ácido lácticas, aisladas de quesos artesanales elaborados en la Localidad de Vizcapalca, durante un periodo de incubación de 8 h. Ayacucho 2024

N°	Muestra	pH inicial	pH final
1	A3	6,79	6,66
2	A4	6,79	6,30
3	A5	6,79	6,53
4	B1	6,79	6,76
5	B2	6,79	6,60
6	B3	6,79	5,98
7	B5	6,79	6,00
8	B6	6,79	6,01
9	C3	6,79	6,00
10	C4	6,79	5,95
11	C5	6,79	5,90
12	C6	6,79	6,78
13	D1	6,79	6,73
14	D2	6,79	6,27
15	D4	6,79	6,23
16	D6	6,79	6,30
17	E2	6,79	6,12
18	E3	6,79	6,10
19	E4	6,79	6,55
20	E6	6,79	6,32

La Tabla 5, muestra la capacidad acidificante de bacterias ácido lácticas en presencia de la amikacina, siendo un factor importante para la elaboración de los productos lácteos fermentados, como el yogurt y el queso, teniendo la muestra C5 con la mayor disminución de pH con un valor de 5,90. Dicha capacidad se debe a la habilidad de las bacterias de fermentar glucosa y producir ácido láctico, contribuyendo al sabor y la textura, considerada también, un indicador de calidad en el proceso de fermentación. Vinderola et al. (2020), realizaron estudios sobre las bacterias ácido lácticas en productos fermentados, investigando cómo el uso de antibióticos afecta la microbiota láctica, en consecuencia afecta disminuyendo la acidificación de la leche y la calidad del producto final con ausencia de probióticos. En otro estudio publicado por Baker & Smith (1992), en el que evaluaron el uso de antibióticos en industria láctea, centrando el objetivo de comparar la actividad de los antibióticos sobre la microbiota bacteriana nativa y bacterias comerciales, describen la producción

de ácidos lácticos de las BAL en presencia de los antibióticos, lo que influye también en el aroma, sabor y la textura de los productos. Así mismo, los resultados publicados por González et al. (2020), quienes investigaron, el impacto de los antibióticos sobre la actividad bacteriana en productos lácteos, hacen hincapié en los efectos negativos de los antibióticos como la amikacina sobre la actividad fermentativa de las bacterias ácido lácticas. Según los resultados de la investigación, las concentraciones bajas de antibióticos (5 µg/ml) tienen efecto limitado en la actividad bacteriana, sin embargo, las concentraciones más altas o iguales a 100 µg/ml, tienen un impacto significativo en la capacidad de las bacterias para producir ácido láctico.

Fox et al. (2023), mencionan que Las bacterias ácido lácticas, al ser microorganismos anaerobios facultativos son importantes en producción de alimentos fermentados, estas constituyen el grupo de bacterias Gram positivas, que para facilitar su identificación presentan morfología de coco (*Lactococcus lactis*), diplococo (*Streptococcus thermophilus*) o bacilo (*Lactobacillus acidophilus*), que fermentan carbohidratos para producir principalmente ácido láctico como resultado del proceso metabólico. Anumudu. (2023) reportan que, teniendo en cuenta la capacidad de fermentar lactosa y otros monosacáridos en condiciones anaeróbicas para la obtención de ácido láctico, esto se traduce en la disminución del pH del medio lo que permite la conservación de alimentos y así como la presencia de bacterias ácido lácticas, denominados probióticos, ayudan en el mecanismo de defensa a nivel intestinal del que lo consume, siendo así los alimentos fermentados toman ciertas características únicas debido a las reacciones bioquímicas que realizan las bacterias lácticas (BAL).

Tabla 6. Morfología microscópica de las muestras de bacterias ácido lácticas, aisladas de quesos artesanales elaborados en la Localidad de Vizcapalca, durante un periodo de incubación de 8 h. Ayacucho 2024.

N°	Muestra	Morfología microscópica	Reacción al Gram
1	A3	Cocos	+
2	A4	Estreptococo	+
3	A5	Diplococos	+
4	B1	Cocos	+
5	B2	Bacilo	+
6	B3	Cocos	+
7	B5	Cocos	+
8	B6	Cocos	+
9	C3	Cocos	+
10	C4	Cocos	+
11	C5	Cocos	+
12	C6	Diplococos	+
13	D1	Bacilo	+
14	D2	Diplococos	+
15	D4	Estreptococo	+
16	D6	Cocos	+
17	E2	Cocos	+
18	E3	Cocos	+
19	E4	Cocos	+
20	E6	Cocos	+

En la Tabla 6, se muestran los resultados de la caracterización morfológica de las bacterias ácido lácticas en forma de cocos, diplococos y estreptococos, estas aisladas de quesos artesanales elaboradas en Vizcapalca, mediante el método de coloración de Gram. Así como Aparicio (2016), realizaron estudios de aislamiento y caracterización de BAL a partir de productos lácteos tradicionales, como el queso, yogur y leche fermentada, para lo cual aplicaron métodos fenotípicos enfatizando la coloración Gram, para confirmar que son BAL después de realizar la coloración de Gram, son positivas presentando forma de cocos y bacilos. Dicha caracterización coincide con Caro et al. (2020) en su estudio aislaron y caracterizaron cepas de *Lactococcus* obtenidas de queso Oaxaca elaborado de leche cruda. Seleccionaron 120 colonias del crecimiento en agar M17 y MRS. De ellas veinte se identificaron como *Lactococcus lactis* se caracterizaron por métodos moleculares y fenotípicos, incluyendo el uso de carbohidratos, perfil enzimático, capacidad acidificante y resistencia a antibióticos. Se confirmó la gran diversidad fenotípica entre las *Lactococcus lactis* con forma de cocos Gram positivos (diplococos y cadenas cortas),

mediante huellas dactilares de rep-PCR. Como resultado se obtuvo que el 50 % de las cepas mostraron resistencia a estreptomicina y el 35 % a eritromicina. Nueve de los aislados fueron considerados cepas de acidificación rápida, ante ello, se consideran a las cepas aisladas con un potencial para cultivos iniciadores nativos, por su influencia positivamente en el perfil sensorial del queso.

Tabla 7. Determinación de la identidad de la cepa 1, 2, 3 y 4, obtenida mediante la secuenciación de ADN como herramienta molecular para el análisis de distancia entre especies.

	Nombre	Query Cover	E value	Per. Indet	Accession
Cepa 1	<i>Enterococcus faecium</i>	100%	0.0	99.64%	NR_113904.1
	<i>Enterococcus durans</i>	100%	0.0	99.43%	NR_113900.1
Cepa 2	<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0.0	99.85%	NR_113925.1
	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.70%	NR_113960.1
Cepa 3	<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0.0	99.76%	NR_116443.1
	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.76%	NR_113958.1
Cepa 4	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.85%	NR_040955.1
	<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0.0	99.78%	NR_116443.1

La Tabla 7, muestra la determinación de la identidad de las cepas 1, 2, 3 y 4, obtenida mediante la secuenciación de ADN como herramienta molecular para el análisis de distancia entre especies, dichas secuencias fueron analizadas en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), obteniendo como resultado que la cepa 1, porcentaje de 99.64 % de similaridad con la especie de *Enterococcus faecium* y un 99.43 % con *Enterococcus durans*. Cepa 2. muestra un porcentaje de 99.85 % de similaridad con la especie de *Lactococcus cremoris* y un 99.70 % con *Lactococcus lactis*. Cepa 3, la determinación de la identidad de la cepa 3, obtenida mediante la secuenciación de ADN como herramienta molecular para el análisis de distancia entre especies, dichas secuencias fueron analizadas en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), como resultado nos muestra un porcentaje de 99.76 % de similaridad con la especie de *Lactococcus cremoris* y un 99.76 % con *Lactococcus lactis*. Cepa 4, se obtuvo un porcentaje de 99.85% de similaridad con la especie de *Lactococcus lactis* y un 99.78 % con *Lactococcus cremoris*, lo que coincide con Ferreira et al. (2022), que usaron en su estudio métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) y Secuenciación del gen ARNr 16S, para la comparación de ambas herramientas, dichos método se convirtieron en procesos indispensables en la identificación microbiana. Mediante el análisis de muestras de ADN de 21 quesos de la denominación de origen protegida (DOP) Raclette du Valais. Con base en los resultados obtenidos, se estudiaron en detalle las diferencias, la precisión y la utilidad de ambos enfoques, contrastando esta técnica con el método clásico de aislamiento seguido de secuenciación Sanger. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron

comparadas utilizando BLAST para identificar especies e identificar taxonómica, detectando homologías entre las muestras aisladas.

En el presente trabajo se usó dicha metodología para la identificación de especies de bacterias ácido lácticas de quesos artesanales provenientes de la localidad de Vizcapalca, dicho proceso lo realizó el Laboratorio UMBRELLA GENOMICS COMPANY, teniendo como resultado de las 4 cepas enviadas, especies con una identidad $\geq 97\%$, indican que las especie son: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis*, quienes brindan las características únicas de los quesos artesanales. Respecto al tema, Alvarado & Huamán (2018), recolectaron 50 muestras de quesos elaborados en la Provincia de Huarochirí, obteniendo como resultado el aislamiento de bacterias productoras de bacteriocinas, identificando cepas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*, conocidas por su capacidad de producir compuestos antimicrobianos naturales, lo que sugiere su potencial uso como cultivos iniciadores en la industria quesera peruana. Rodríguez et al. (2019), aportaron con su estudio, aislaron y caracterizaron las bacterias ácido lácticos de quesos artesanales tipo suizo de Cajamarca, la identificación lo realizaron mediante técnicas moleculares, como resultado identificaron a *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus thermophilus*, las cuales tienen gran contribución al desarrollo de características sensoriales y texturas de los quesos. Quispe et al. (2017), realizaron un estudio centrado en la caracterización molecular de bacterias ácido lácticas presentes en quesos artesanales en Puno, en dicho estudio identificaron *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosus* y *Enterococcus durans*, las cuales cumplieron con el proceso de fermentación y con la conservación de los quesos. El presente estudio concuerda con Vargas et al. (2021), quienes llegan a la conclusión que las bacterias ácido lácticas brindan propiedades organolépticas con una buena calidad del producto final, ello con el estudio de identificación de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales de Cusco, utilizando la secuenciación del Gen RNAr 16S, las especies predominantes fueron *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* y *Weissella cibaria*.

■ *Enterococcus faecium* ■ *Enterococcus durans*
■ *Lactococcus cremoris* ■ *Lactococcus lactis*

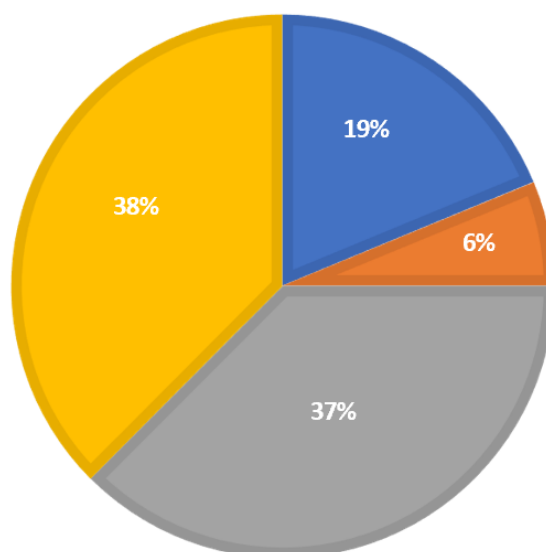


Figura 3. Porcentaje de coincidencia con especies de bacterias ácido lácticas presentes en las cepas 1, 2, 3, y 4, aisladas de quesos artesanales de Vizcapalca, a través de una aproximación taxonómica de distancia basada en la secuenciación de ADN.

En el presente trabajo se identificó 16 especies predominantes a *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis*, lo que se muestra en la Figura 3, los porcentajes de coincidencia con especies de bacterias ácido lácticas presentes en las cepas 1, 2, 3, y 4, aisladas de quesos artesanales de la localidad de Vizcapalca, a través de una aproximación taxonómica de distancia basada en la secuenciación de ADN, con un porcentaje de 38 % a *Lactococcus lactis* y un porcentaje de 6 % a la especie de *Enterococcus durans*. Dichos resultados concuerdan con Mwebesa et al. (2024), que investigaron la microflora dominante en quesos maduros producidos en Uganda, aislándolos, realizando pruebas de catalasa, oxidasa y coloración de Gram, teniendo como resultados un 90% de bacterias ácidos lácticas que incluyen géneros como *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*, mostrando en ello la valiosa diversidad microbiana en quesos artesanales y el potencial en la calidad del producto.

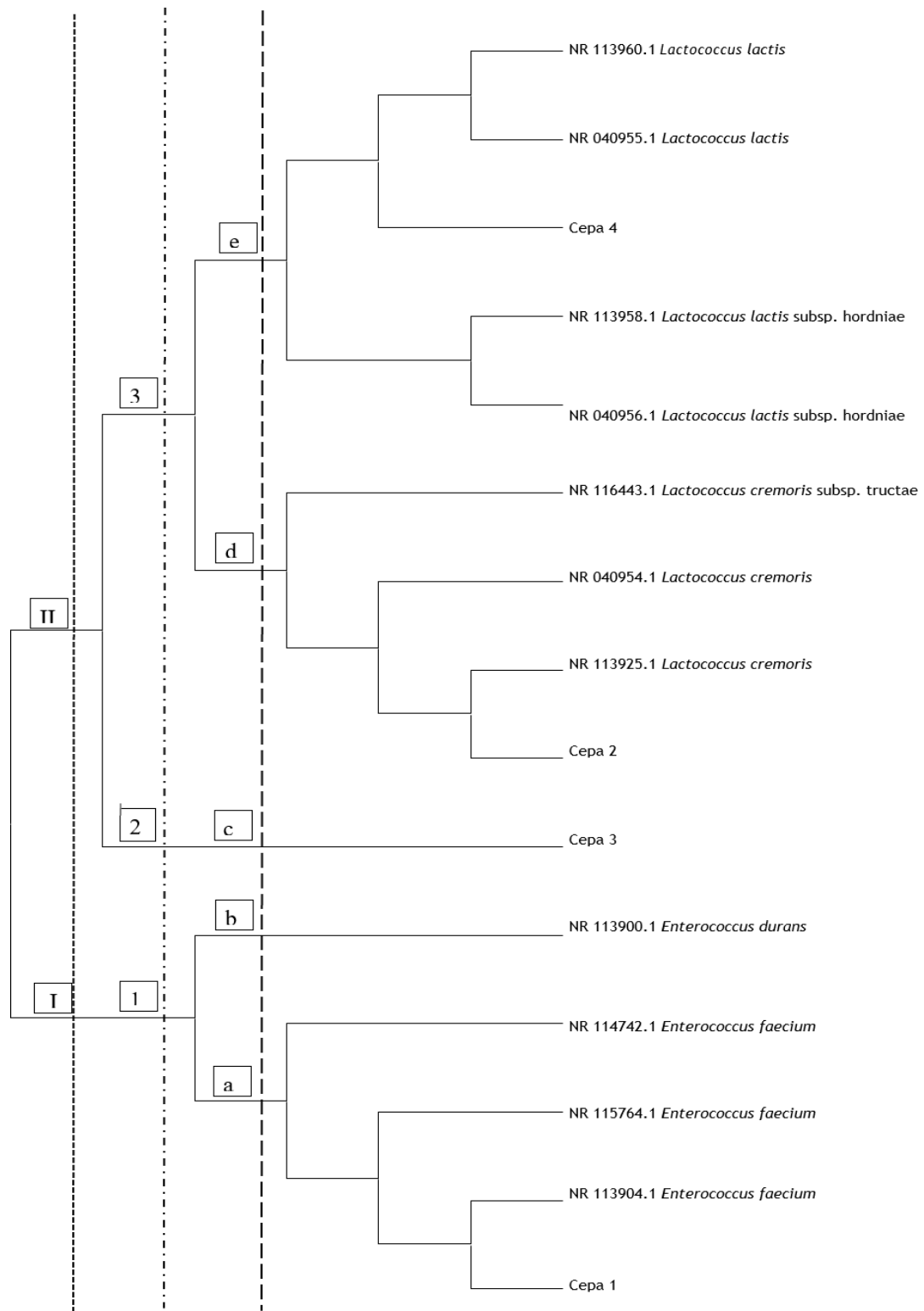


Figura 4. Dendrograma de especies generado por el método de la máxima verosimilitud y Tamura-Nei, a través del algoritmo Neighbor-Joining (NJ), utilizado para representar la proximidad genética entre especies de bacterias ácido lácticas identificadas a partir de cepas aisladas de quesos artesanales de Vizcapalca.

En la Figura 4, muestra el dendrograma de especies, generado por el método de la máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei, a través del algoritmo Neighbor-Joining (NJ), utilizado para representar la proximidad genética entre especies de bacterias ácido lácticas, lo cual es confirmado por los resultados obtenidos mediante la identificación mediante la herramienta BLAST, se observa la cepa 1 presenta un aproximado de “0” lo que es cercano a la especie de *Enterococcus faecium*, lo que evidencia molecularmente que hay una alta probabilidad de que la cepa 1 pertenezca a la especie de *Enterococcus faecium*, así también con una aproximación a la especie de *Enterococcus durans*, conformando el grupo “a”; la cepa 2 incluye al grupo “d”, representando una cercanía a “0” con la especie de *Lactococcus cremoris*, indicando que tiene mayor proximidad, por otro lado, teniendo una menor aproximación con la cepa de *Lactococcus lactis*; la cepa 3 está incluida en los grupos “d” y “e”, con una aproximación con las cepas *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis*, al presentar dos especies cercano no se define a que especie pertenecería, por último la cepa 4 incluido al grupo “e”, muestra una aproximación a la cepa de *Lactococcus lactis*. Respecto al tema Escobar-Zepeda et al. (2018), explican que realizaron la secuenciación masiva para analizar la microbiota de quesos tradicionales, aplicaron filogenia para lograr clasificar especies como *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*, concluyendo que las especies con mayor predominancia fueron *Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*, logrando la identificación de diferentes especies en la microbiota, esto debido al origen geográfico del queso, así también el análisis filogenético reveló relaciones evolutivas entre las cepas aislados y otra que se encuentran reportadas en BLAST, dichos resultados coinciden con Lee et al (2017), quienes aplicaron técnicas filogenéticas para la identificación y clasificación de *Lactococcus* y *Enterococcus* en productos fermentados, lo que destacan son los dendrogramas como ayuda para visualizar la agrupación de las cepas según su similitud genética, siendo clave en estudios de microbiota de quesos artesanales. Delgado et al. (2020), se enfocaron en una identificación a nivel molecular de las bacterias presentes en los quesos artesanales, secuenciando la región 16S del ADN de 22 bacterias ácido lácticas, para posteriormente construir un dendrograma que mostró 10 clados definidos, facilitando así la clasificación de las cepas según su relación. Para lograr el análisis del dendrograma se tiene en cuenta la aplicación de BLAST, como mencionan Gonzáles y Fernández (2011), estudiaron métodos de identificación de bacterias utilizando una secuencia de ADN de las cepas para lo cual se amplifica el Gen RNA ribosomal 16S (Gen RNAr 16S) mediante PCR, dicho gen es altamente conservado y permite la identificación de bacterias. Las secuencias

obtenidas se ingresan a BLAST, el algoritmo analiza la similitud entre la secuencia ingresada y las secuencias de la base de datos dando la identificación precisa basada en identidad $\geq 97\%$, generalmente indica la misma especie, la identidad entre $95 - 97\%$ indica una subespecie o género cercano e identidad $< 95\%$ indica una posible nueva especie o una identificación poco confiable. Lo que corrobora Tamura et al. (2016), en su estudio introduce MEGA7 para los análisis filogenéticos permitiendo la construcción de árboles filogenéticos utilizando los métodos de Máxima Verosimilitud y Neighbor-Joining, incorporando modelos como Tamura-Nei. El software fue utilizado para el análisis de secuencias de ADN, incluyendo genes 16S rRNA, lo que facilitó la identificación, la diversidad y las relaciones evolutivas de las bacterias. Así también, González-de la Cruz et al. (2020), en su estudio se enfocaron en la identificación genética de las bacterias ácido lácticas presentes en leche cruda de vaca y queso artesanal, utilizando técnicas de secuenciación del Gen RNAr 16S y se construyeron árboles filogenéticos para determinar la relación entre las cepas que fueron aisladas con el empleo de algoritmos como Neighbor-Joining junto al modelo de Tamura-Nei.

V. CONCLUSIONES

1. Con el uso del medio selectivo MRS y condiciones específicas de incubación, se aisló cuatro cepas de bacterias ácido lácticas obtenidas a partir de muestras del queso artesanal producido en Vizcapalca, Región de Huancavelica.
2. Las bacterias aisladas presentaron características morfológicas típicas de las BAL, tales como su forma de coco agrupadas en diplococos y estreptococos, con el uso de la coloración de Gram. Dichas propiedades confirman el papel en la producción de ácido láctico, reduciendo el pH y en la maduración del queso artesanal confiriendo aroma, olor y sabor característico.
3. Mediante el análisis molecular basado en la amplificación y la Secuenciación del Gen RNAr 16S, se identificó a las especies *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactococcus cremoris* y *Lactococcus lactis*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Implementar protocolos estandarizados para el aislamiento y preservación, con el fin de garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos y así conservar las cepas autóctonas para estudios futuros.
2. Complementar la caracterización morfológica con la Secuenciación del Gen RNAr 16S, para lograr diferenciar las cepas aisladas.
3. Evaluar la resistencia de las bacterias ácido lácticas (BAL) a diferentes condiciones ambientales, teniendo el fin de determinar su adaptabilidad y potencial aplicación en la industria, para optimizar procesos sin afectar las características tradicionales del queso artesanal.
4. Ampliar el análisis molecular con secuenciaciones profundas, como la metagenómica que apoya a identificar la diversidad total de la microbiota presente en quesos artesanales y conocer la evolución de estas a lo largo del tiempo.
5. Fomentar el uso de herramientas bioinformáticas avanzadas para el análisis de los perfiles genéticos de las BAL aisladas, con el fin de estudiar su potencial.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdul Hakim, BN, Xuan, NJ, y Oslan, SNH (2023). Una revisión exhaustiva de compuestos bioactivos de bacterias lácticas: Funciones potenciales como alimentos funcionales en dietética y la industria alimentaria. *Foods*, 12 (15), 2850. <https://doi.org/10.3390/foods12152850>
2. Alvarado C., Chacón Z. Otoniel J., Guerrero B. y López G. (2007). Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas de un Queso Venezolano Ahumado Andino Artesanal. Su Uso Como Cultivo Iniciador. Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos. Universidad de Los Andes. Venezuela.
3. Alvarado P., N.C., & Huamán G., D.C. (2018). Aislamiento e Identificación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas a partir de quesos frescos de la provincia de Huarochirí. *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 6(2), 45-53.
4. Alvarez E. (2011). *Efectos del Lactobacillus casei ATCC 393™ sobre el Escherichia coli durante la vida comercial del queso fresco*. [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional del Callao. Perú.
5. Anumudu C (2023) Papel de las bacterias del ácido láctico en la producción de alimentos fermentados. *Food Microbiol Saf Hyg*. 8:227.
6. Aparicio, D. (2016). Aislamiento de bacterias lácticas de alimentos lácteos: producción de bacteriocinas (tesis de pregrado). Universidad de Jaén, España.
7. Axelsson L. (2006). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Third Edition.. Food Science and Technology. Editorial Board. 1, 1-66pp.
8. Ayad, E. H. E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H., & El-Soda, M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Food Microbiology*, 21(6), 715–725. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.02.009>
9. Bachmann H., Bütikofer U., Fröhlich M., Isolini D. y Jakob E. (2011). Swiss-type cheeses. Agroscope Liebefeld-Posieux Research Station ALP, Berne. Switzerland, Elsevier Ltd.
10. Baker, J. R., & Smith, D. C. (1992). Antibiotics and their effect on lactic acid bacteria. Academic Press.
11. Benincore D. (2004). Caracterización y Estandarización del Proceso de Producción del Queso Paipa elaborado en Paipa, Colombia.
12. Campagnollo, F. B., Margalho, L. P., Kamimura, B. A., Feliciano, M. D., Freire, L., Lopes, L. S., Alvarenga, V. O., Cadavez, V. A. P., Gonzales-Barron, U., Schaffner, D. W., & Sant'Ana, A. S. (2018). Selección de bacterias lácticas autóctonas con actividad antilisterial y su papel en la reducción del período de maduración y garantía de la seguridad de los quesos tradicionales brasileños. *Food microbiology*, 73, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.006>
13. Caro, I., Quinto, E. J., Fuentes, L., Alessandria, V., Redondo-del-Río, M. P., Flórez, A. B., & Mateo, J. (2020). *Characterization of Lactococcus strains isolated from artisanal Oaxaca cheese*. *LWT – Food Science and Technology*, 122, 109041. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109041>
14. Carranco L., Rodríguez J. & Satama A. 2015. Incidencia del contenido de grasa de la leche de vaca, dosis del probiótico (*Lactobacillus casei* 01) y temperatura de inoculación del cultivo en la elaboración de queso fresco. [Tesis de pregrado] Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ibarra, Ecuador.
15. Clarridge, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical*

- Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862>
16. Coelho, MC, Malcata, FX y Silva, CCG (2022). Bacterias ácido lácticas en quesos de leche cruda: De cultivos iniciadores a funciones probióticas. *Foods*, 11 (15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
 17. Cuevas-González, P. F., Reyes-Díaz, R., Santiago-López, L., Vallejo-Cordoba, B., Hernández-Mendoza, A., Beltrán-Barrientos, L. M., & González-Córdova, A. F. (2024). Microbiological quality and native lactic acid bacteria diversity of artisanal Mexican cheeses: A review. *Food research international*. 194, 114876. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114876>
 18. Delgado Silva, H. D., & Páramo Aguilera, L. A. (2020). Identificación molecular de microorganismos aislados de quesera artesanal ubicada en la Libertad-Chontales. *Revista Científica de Ciencia y Tecnología El Higo*, 10(2). <https://www.camjol.info/index.php/elhigo/article/view/10554>
 19. Devlieghere F., Vermeiren L., y Debevere J. (2004). New preservation
 20. Díaz-García, A. C., Arias, G. C., & Bautista, N. C. (2020). *Caracterización fisicoquímica y contenido de bacterias ácido-lácticas de quesos "Paria" de Arequipa, Perú. Ciencia e Investigación*, 23(1), 59–64. DOI:10.15381/ci.v23i1.18753
 21. Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce de León, A., & Sánchez-Flores, A. (2018). The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. *Frontiers in Genetics*, 9, 112.
 22. Ferreira, I. M. P. L. V. O., Amaral-Collaço, L., & Almeida e Sousa, C. (2022). *High-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing for cheese microbiota analysis: comparative tool to classical isolation + Sanger sequencing. BMC Microbiology*, 22, Article 212.
 23. Fox, P. F. (2003). *Dairy chemistry and biochemistry*. Springer Science & Business Media.
 24. Fuentes M., Londoño A., Durango M., Gutiérrez M., Ochoa S. Y Sepúlveda J., (2017). Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano. *Biotecnología En el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1),
 25. Fuentes M., Zapata A., Londoño A., Durango M., Gutiérrez M., Ochoa S., et al.
 26. Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.004>
 27. Gaya, P., Babin, M., Medina, M., & Núñez, M. (1999). Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 87(6), 849–855. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10692072/>
 28. González, L., Pérez, M., & López, J. (2020). Resistencia a antibióticos en bacterias ácido-lácticas y su presencia en productos lácteos. Digital CSIC. <https://digital.csic.es/handle/10261/212215>
 29. González, R., & Fernández, M. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.05.010>
 30. González-de la Cruz, J. U., Rodríguez-Palma, J. J., Escalante-Herrera, K. S., de la Torre Gutiérrez, L., & Pérez-Morales, R. (2020). Identificación genética de bacterias ácido lácticas nativas en leche cruda de vaca y queso Poro artesanal. *Manglar*, 17(1), 45–54.
 31. Hanchi H., Mottawea W., Sebei K. & Hammami R. 2018. The Genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in Microbiology*, 9: Article 1791. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01791
 32. Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1–8.

- <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
33. Hendy, J., Rest, M. y Warinner, C. (2021). Los orígenes de los microbios del yogur [ensayo]. En M. Vandegrift (Ed.), *Fermentología*. Bibliotecas de la Universidad Estatal de Carolina del Norte. <https://doi.org/10.52750/605475>
 34. Heredia P., Hernández A., González A. Vallejo B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*. vol. 42, núm. 6. pp. 340-346.
 35. Hernández A. (2009). Evaluación del Potencial probiótico de Cepas de *Lactobacillus* para su uso en un Alimento Funcional. Instituto Politécnico Nacional-Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada "CIBA-IPN Tlaxcala". México. 112pp
 36. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G., Merenstein D., Pot B. et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
 37. Joerger M. y Klaenhammer T. (1993). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*, 167, pp.439-446.
 38. Lee, I., Kim, Y. O., Park, S. C., & Chun, J. (2017). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 1100-1103.
 39. Loo, JS, Oslan, SNH, Mokshin, NAS, Othman, R., Amin, Z., Dejtisakdi, W., Prihanto, AA y Tan, JS (2025). Revisión exhaustiva de estrategias para la producción de bacterias ácido lácticas y la mejora de metabolitos en cultivos probióticos: Aplicaciones multifuncionales en alimentos funcionales. *Fermentación*, 11 (5), 241. <https://doi.org/10.3390/fermentation11050241>
 - Madrid A. (1994) Nuevo Manual de Tecnología Quesera. España: Mundiprensa.
 40. May A. Corona A. Luna A. et al (2020). Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas Probióticas Empleadas en Productos Comerciales. *European Scientific Journal*, vol. 16 (18), 43. <https://test.eujournal.org/index.php/esj/article/view/13061>
 41. Merck. (2020a). Caldo LMX modificado según MANAFI y OSSMER | 110620. Retrieved July 22, 2020, from https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/LMX-broth-modified-acc.-to-MANAFI-and-OSSMER,MDA_CHEM-110620#anchor_TI
 42. Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI). (2017). Decreto Supremo N.º 007-2017-MINAGRI: Reglamento de la leche y productos lácteos [Documento oficial]. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). http://www.digesa.minsa.gob.pe/NormasLegales/Normas/DS_7_2017-MINAGRI.pdf
 43. Moncada Jimenez, A., & Pelayo Consuegra, B. (2011). El libro blanco de la leche y los productos lácteos: Análisis químico, microbiológico y fisicoquímico de la leche: Calidad y contenido nutricional (Vol. 1). Mexico: Litho Offset Imprenta Juan
 44. Monroy D., Castro B., Fernández P. y Mayorga R. (2009). Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. Referencia. 73: 63-72.
 45. Mwebesa Muhame, A., Mugampoza, E., Wacoo, P. A., & Byakika, S. (2024). Identification and characterization of dominant microflora isolated from selected
 46. Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J. M., Palop, L., & Cabezas, L. (2009). Genotypic and technological characterization of *Lactococcus lactis* isolates involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5), 1505-1517.

47. Organización de las naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2004, En www.agrocadenas.gov.com
48. Ortiz M. (2006). *Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo*. [Tesis de pregrado]. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo.
49. Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.
50. Pramanik, S., Venkatraman, S., & Vaidyanathan, V. K. (2023). Development of engineered probiotics with tailored functional properties and their application in food science. *Food science and biotechnology*, 32(4), 453–470. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01252-x>
51. Pulido Gonzales, G. (2013). *“Aislamiento e Identificación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas presentes en queso que se elaboran y comercializan en la provincia de Huarochiri, Departamento de Lima”* [tesis de pregrado] Universidad Ricardo Palma - URP. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14138/1713>
52. Quispe, E.R., Huanca, M.A., & Mamani, S.L. (2017). Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales de Puno. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(2), 140-150.
53. Radhakrishnan, R., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2017). Bacillus: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, 8, 667. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00667>
54. Rodríguez, M.P., Pérez, J.L., & Sánchez, A.M. (2019). Aislamiento, caracterización e identificación molecular de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales tipo suizo de Cajamarca. *Revista Peruana de Biología*, 26(3), 317-325.
55. Ruiz, M. A. (2017). Caracterización físico-química y sensorial de los quesos artesanos andaluces. Córdoba, España: UCOPress. 2017 Campus de Ranabales, Km.396 A 14071 Córdoba. www.uco.es/publicaciones@uco.es
56. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
57. Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394–406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0427-1>
58. Silva, B. N., Fernandes, N., Carvalho, L., Faria, A. S., Teixeira, J. A., Rodrigues, C., et al. (2023). Bacterias lácticas de quesos artesanales de leche cruda de cabra: propiedades tecnológicas y potencial antimicrobiano. *Italian journal of food safety*, 12(4), 11559. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2023.11559>
59. Tamime, A.Y. & Robinson, R.K.. (2007). Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology.
60. Todorov S., Franco B. (2010). Lactobacillus plantarum: characterization of species and application in food production. *Food Reviews International*. Vol. 26 N°3. 205 – 229.
61. Tuncer, Y. (2009). Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. *African Journal of Biotechnology*, 8(24), 7008-7016.
62. Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Mulvey, M. R., & Corbett, C. R. (2018). Evaluation of Oxford Nanopore's MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications.

- Scientific Reports, 8, 10931. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29334-5>
63. Valdiviezo-Marcelo, J., Arana-Torres, N. M., Vega-Portalatino, E. J., Ruiz-Flores, L. A., Tamariz-Angeles, C., Olivera-Gonzales, P., Rosales-Cuentas, M. M., & Espinoza-Espinoza, L. A. (2023). *Technological potential of native lactic acid bacteria isolated from Swiss-type artisanal cheese (Ancash, Peru) for their application in food. Frontiers in Sustainable Food Systems, 7.*
 64. Vargas, J.M., Pacheco, R.E., & Huamán, D.T. (2021). Identificación de bacterias ácido lácticas en quesos artesanales de Cusco mediante secuenciación del gen 16S rRNA. *Revista de Biotecnología y Bioingeniería, 35(1)*, 89-98.
 65. Veisseyre R. (2000). *Lactología Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche*, Editorial Acribia. España. p 2 – 3.
 66. Vinderola, G., Ouwehand, A., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2020). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429057465>
 67. Zheng Xiaochun , Shi Xuwei , Wang Bin. the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Frontiers in Microbiology. Volume 12 - 2021.* DOI:10.3389/fmicb.2021.703284
 68. Zúñiga-García D, Montaleza-Auquilla M, Andrade D, León-Vizñay J, Ramírez P, CriolloAyala A, et al. (2020). Cinética de fermentación láctica natural de col blanca (*Brassica oleracea L. capitata*). *Maskana.11(1):57–68*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18537/mskn.11.01.05>

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ARN:	Ácido Ribonucleico
BAL:	Bacterias ácido lácticas
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
MRS:	Man, Rogosa y Sharpe
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH:	Potencial de hidrogeniones
UHT:	Ultra al temperatura

GLOSARIO

Ácido láctico:	Es un ácido orgánico, producto de la fermentación de azúcares.
Bacterias ácido lácticas:	Microorganismo que fermentan carbohidratos.
Bacteriocinas:	Compuestos producidos por bacterias que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otras bacterias.
Caseína:	Principal proteína de la leche.
Cuajo:	Enzima que se utiliza para coagular proteína de la leche
Cultivo iniciador:	Mezcla controlada de microorganismos vivos que se añade a un alimento para iniciar la fermentación.
Dendrograma:	Diagrama en forma de árbol que representa la relación jerárquica entre elementos, basándose en la similitud o diferencia.
Enzima:	Proteína que acelera o cataliza una reacción química.
Fermentación:	Proceso metabólico anaeróbico, usado por microorganismos como bacterias y levaduras para transformar azúcares en otros compuestos
Gen RNAr 16S:	Fragmento de ADN bacteriano que codifica para el ARN del ribosoma.
Gram negativas:	Bacterias con pared delgada y membrana externa, se tiñen de rosado.
Gram positivas:	Bacterias con pared gruesa que retiene el color violeta.
Inóculo:	Cantidad inicial de microorganismos, introducido a un sustrato.
Kirby-Bauer:	Técnica que se utiliza para evaluar la sensibilidad de una bacterias a diferentes antibióticos.
Microbiota:	Conjunto de microorganismos que viven en un entorno determinado.
Microorganismo:	Ser vivo microscópico, se observa con la ayuda de un microscopio.
Probiótico:	Microorganismo vivo, proporciona beneficios para la salud del ser humano.
Suero:	Líquido translúcido que queda después de la coagulación de la proteína de la leche.

ANEXOS

Anexo 1. Queso artesanal procedente de la Localidad de Vizcapalca.



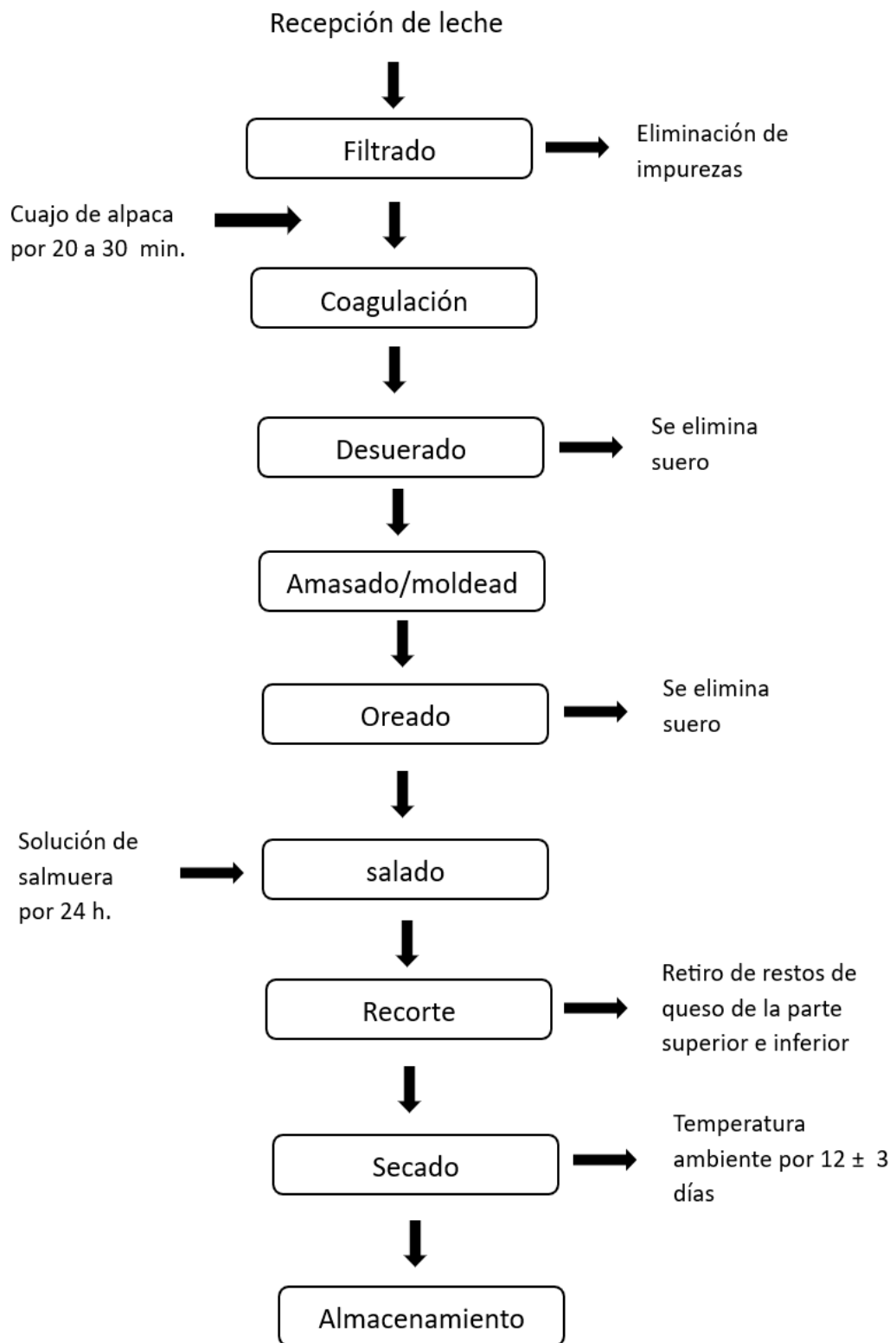
Anexo 2. Ordeño de leche para la elaboración de quesos de Vizcapalca.



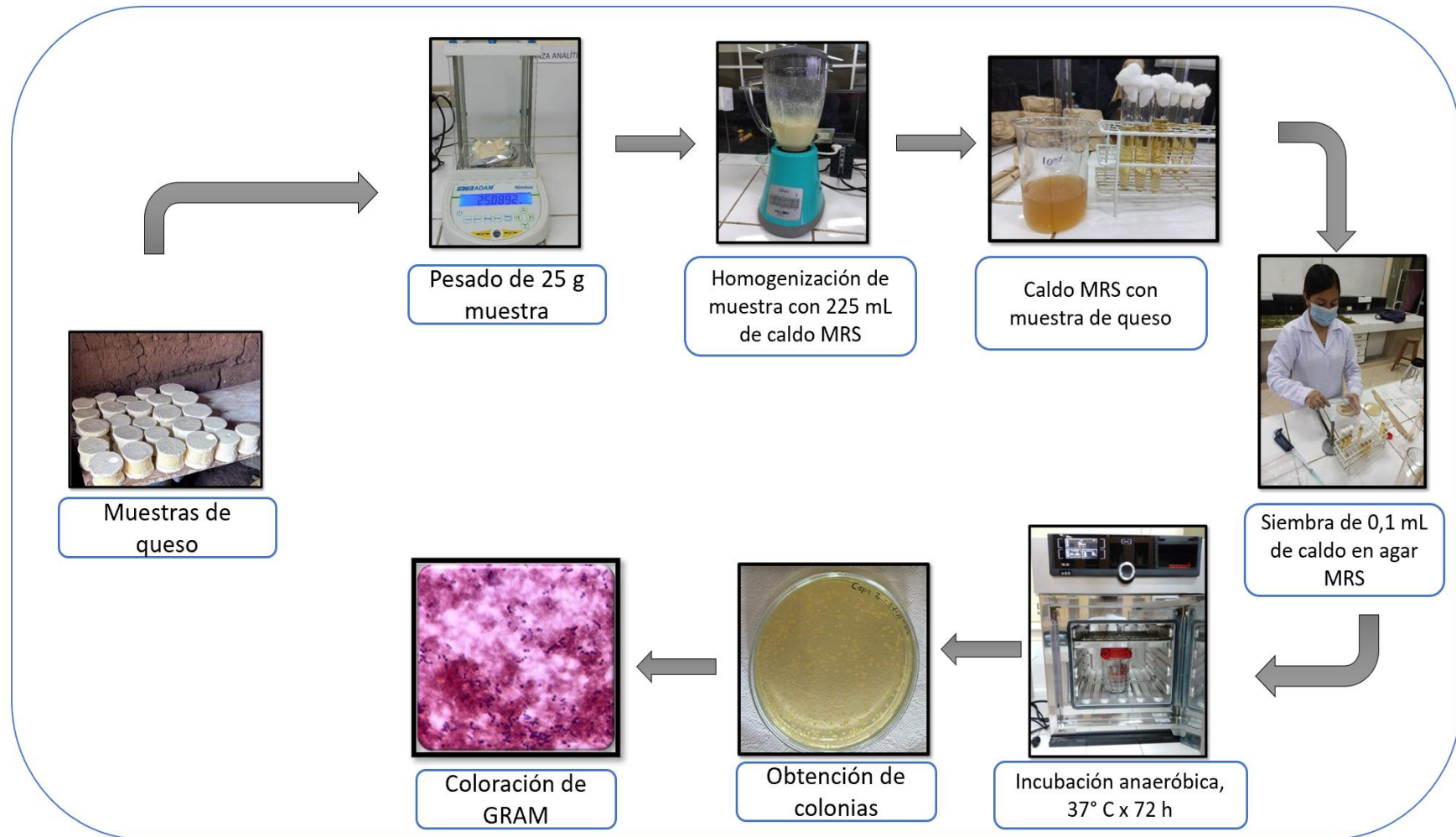
Anexo 3. Productora de quesos, en el procedimiento de corte para obtención de uniformidad en el producto final.



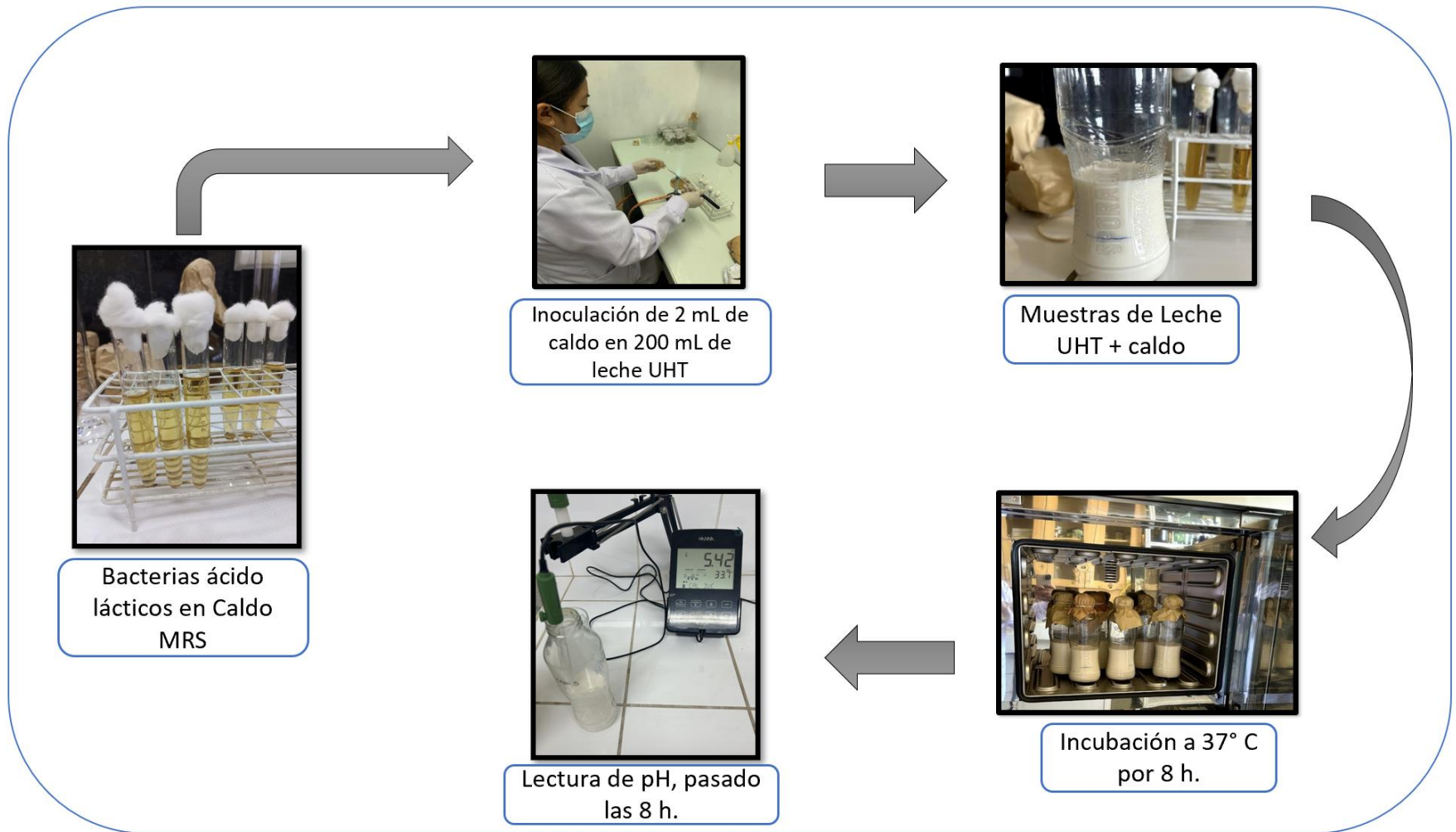
Anexo 4. Proceso para la elaboración de quesos en Vizcapalca.



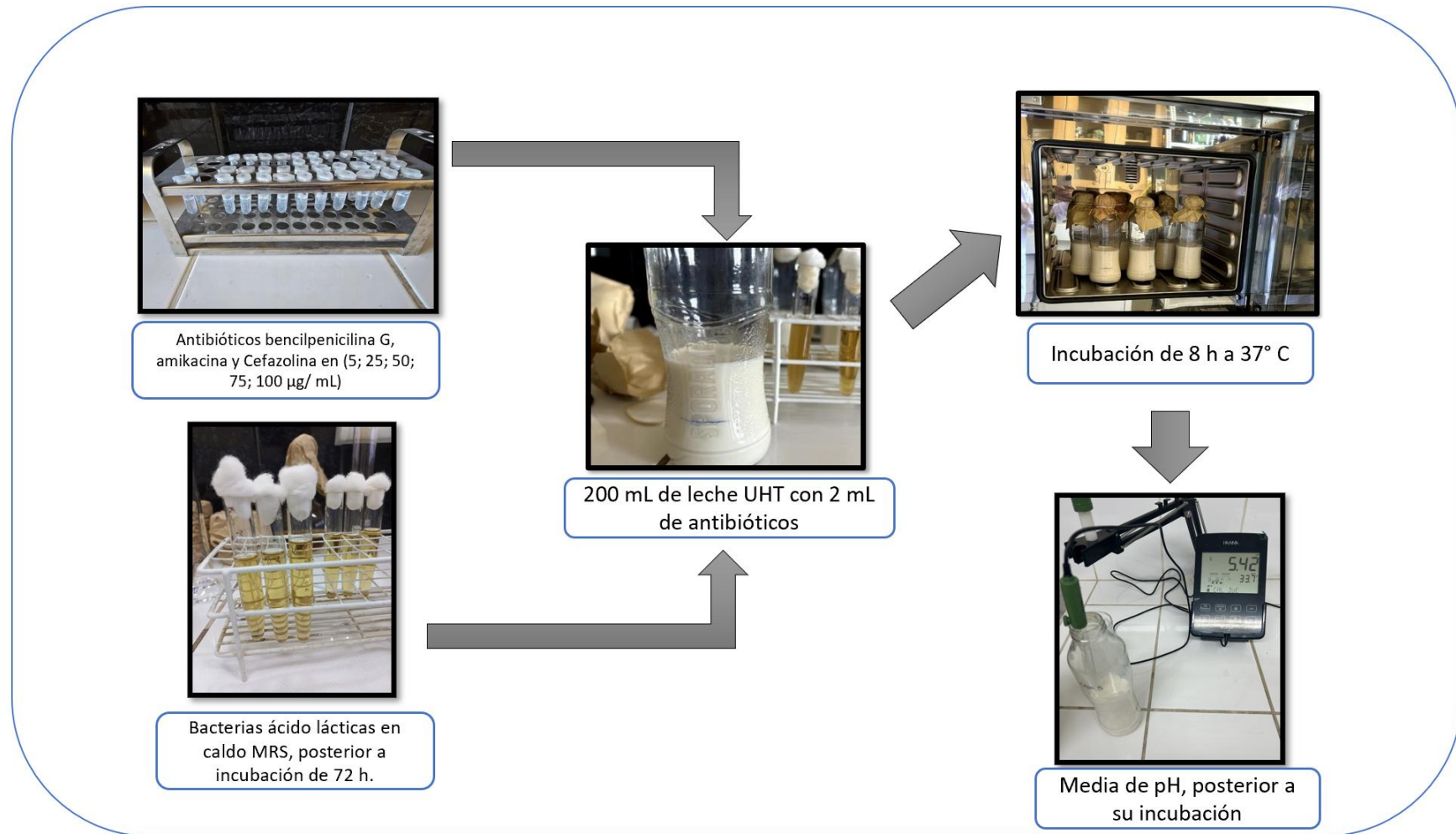
Anexo 5. Procesamiento de muestras para el aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de quesos artesanales.



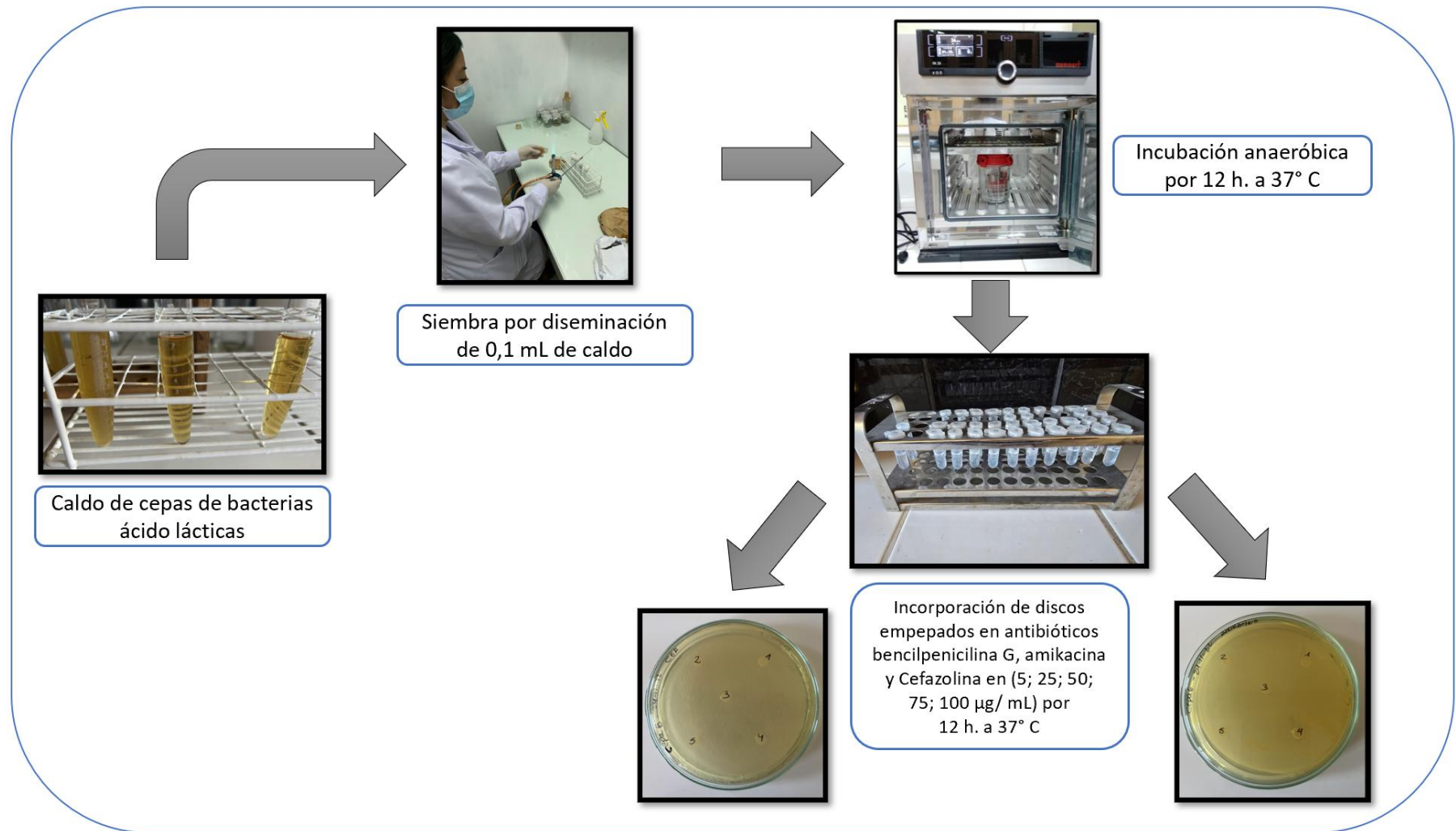
Anexo 6. Capacidad acidificadora de las bacterias ácido lácticas la leche UHT.



Anexo 7. Capacidad acidificadora de la leche en presencia de antibióticos.



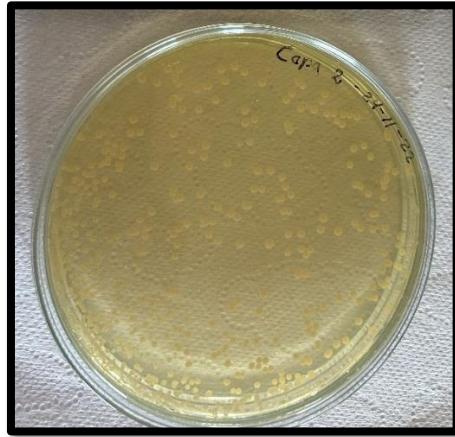
Anexo 8. Procedimiento de resistencia a antibióticos de las bacterias ácido lácticas.



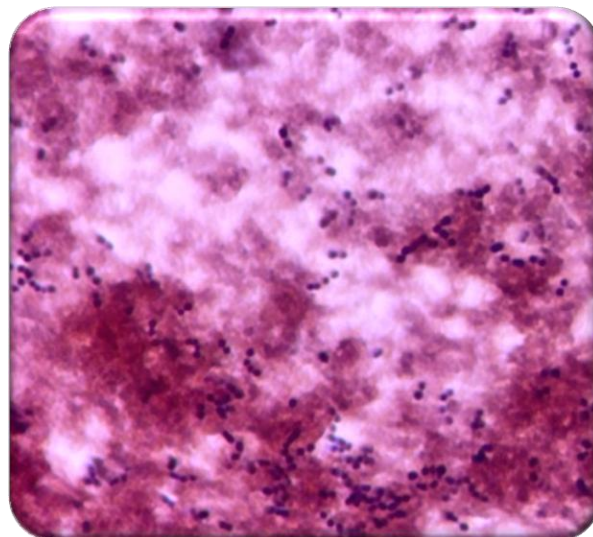
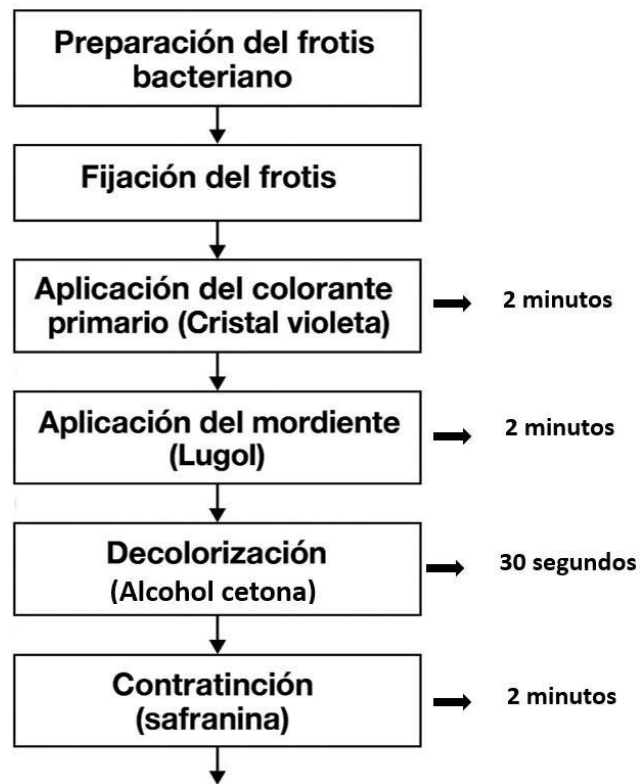
Anexo 9. Incubación en condiciones anaeróbicas de placas por diseminación de muestras del caldo MRS.



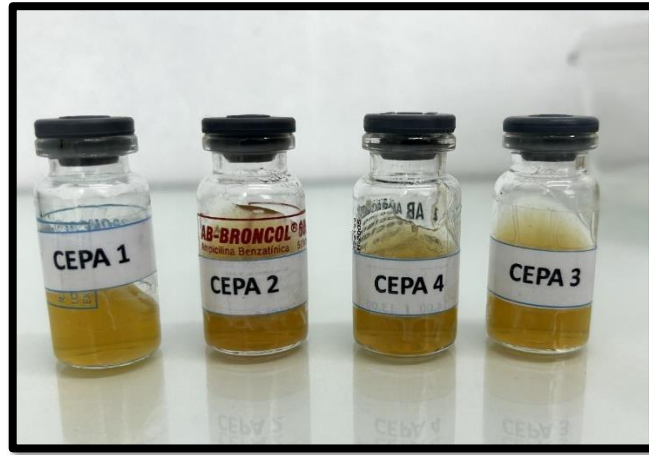
Anexo 10. Placas que muestran el crecimiento de las bacterias ácido lácticas aisladas.



Anexo 11. Procedimiento de la coloración de Gram.



Anexo 12. Cepas seleccionadas para la identificación por el método de Secuenciación de ADN para el análisis de distancia entre especies.



Anexo 13. Resultados de la secuenciación de ADN para el análisis de distancia entre especies.



CARTA N° 00340 – UGENOMICS

Lima, 26 de diciembre del 2024

Señor:

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
Atención: Sra. Roxana Carhuaz Condori

Presente.-

ASUNTO: CARTA DE ENTREGA DE RESULTADOS

**REFERENCIA: SERVICIO DE APROXIMACIÓN TAXONÓMICO POR
SECUENCIACIÓN DE ADN**

Mediante la presente reciba nuestros cordiales saludos. Deseamos indicarle en referencia al servicio de secuenciación contratado, cuyo concepto es:

**SERVICIO DE APROXIMACIÓN TAXONÓMICO POR SECUENCIACIÓN DE
ADN**

Por consiguiente, nuestra empresa UMBRELLA GENOMICS COMPANY SAC con RUC N° 20603365080, hace de conocimiento de la entrega de datos de secuenciamiento

Link: [carpeta de datos de secuenciamiento](#)

Los datos de secuenciación que se entregan son los siguientes:

- Archivos de secuenciación formato abi
- Secuencias consenso por cada muestra

Por consiguiente, agradecemos la atención brindada quedando a sus órdenes para cualquier duda, aclaración o comentario que pudiese surgir de la información presentada.

Sin más por el momento quedamos cordialmente a sus órdenes.

Atentamente

Luis Alberto Salcedo Mejía
Lic. en Biología
C.B.P. 16195

Resultados:

1. Cepa01_vial

Análisis BLAST:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=71JN5K2H01N>

Nombre	Query Cover	E value	Per. Indet	Accession
<i>Enterococcus faecium</i>	100%	0.0	99.64%	NR_113904.1
<i>Enterococcus faecium</i>	100%	0.0	99.64%	NR_114742.1
<i>Enterococcus faecium</i>	99%	0.0	99.64%	NR_115764.1
<i>Enterococcus durans</i>	100%	0.0	99.43%	NR_113900.1

2. Cepa02_vial

Análisis BLAST:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=71K54NRC01N>

Nombr	Query Cover	E value	Per. Indet	Accession
<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0	99.85%	NR_113925.1
<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0	99.85%	NR_040954.1
<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0	99.78%	NR_116443.1
<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0	99.70%	NR_113960.1

3. Cepa03_vial

Análisis BLAST:

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=71M7AU3V01N>

Nombre	Query Cover	E value	Per. Indet	Accession
<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0.0	99.76%	NR_116443.1
<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.76%	NR_113958.1
<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0.0	99.76%	NR_113925.1
<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.76%	NR_113960.1



Luis Alberto Salcedo Mejía
Lic. en Biología
C.B.P. 16195

Dirección: Emilio Althaus 576, Lince
Celular: 925708785

Página web: www.ugenomics.pe
Correo electrónico: ventas@ugenomics.pe

4. Cepa04_vial

Análisis BLAST:

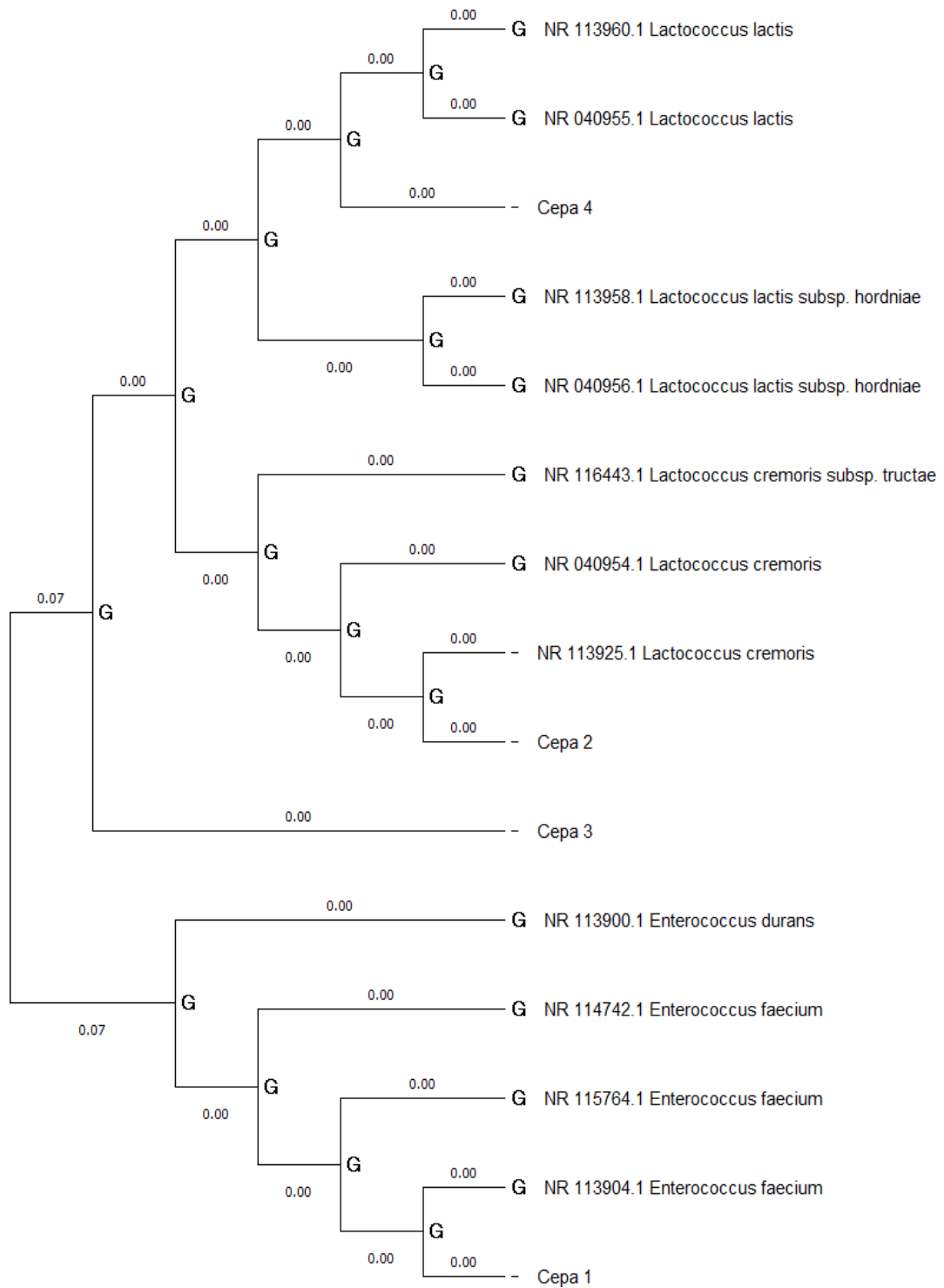
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=71M915HF013>

Nombre	Query Cover	E value	Per. Indet	Accession
<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.85%	NR_040955.1
<i>Lactococcus lactis</i>	99%	0.0	99.85%	NR_113960.1
<i>Lactococcus cremoris</i>	100%	0.0	99.78%	NR_116443.1
<i>Lactococcus lactis</i>	100%	0.0	99.78%	NR_040956.1



Luis Alberto Salcedo Mejía
Lic. en Biología
C.B.P. 16195


Anexo 14. Dendrograma de especies generado por el método de la máxima verosimilitud y Tamura-Nei, a través del algoritmo Neighbor-Joining (NJ), mostrando la distancia presente entre especies.



Anexo 15. Fotografía en la localidad de Vizacapalca.



Anexo 16. Decreto Supremo N° 007-2017-MINAGRI.

12		NORMAS LEGALES		Viernes 30 de junio de 2017 /  El Peruano			
CAPÍTULO VI							
QUESO FRESCO							
Artículo 18.- Especificaciones técnicas							
Fisicoquímicas							
Característica	Unidad	Elaborado a base de leche entera	Elaborado a base de leche parcialmente descremada	Elaborado a base de leche descremada			
Materia grasa láctea en el extracto seco	g/100g	≥ 40	≥ 15	< 15			
Humedad	g/100g	≥ 46	≥ 46	≥ 46			
Artículo 19.- Especificaciones sanitarias							
El queso fresco debe cumplir con las especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad que establece el Ministerio de Salud, según lo siguiente:							
19.1 Microbiológicas							
Agente Microbiano	Unidad	Categoría	Clase	n	c	Límite	
						m	M
Coliformes	UFC/g	5	3	5	2	5 x 10 ²	10 ³
Salmonella sp.	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	—
Escherichia coli	NMP/g	6	3	5	1	3	10
Staphylococcus aureus	UFC/g	7	3	5	2	10	10 ²
Listeria monocytogenes	P o A/25g	10	2	5	0	Ausencia	—
Notas: Categoría: Grado de riesgo que representa los microorganismos en relación a las condiciones previsible de manipulación y consumo del alimento.							
Clase: Es la clasificación que se da a los planes de muestreo por atributos, que pueden ser de dos o tres.							
P = Presencia, A = Ausencia							
19.2 Contaminantes							
Los límites máximos permitidos de contaminantes en el queso fresco serán determinados según lo establecido en el artículo 7 del presente Reglamento.							
CAPÍTULO VII							
YOGUR (YOGURT)							
Artículo 20.- Especificaciones técnicas							
20.1 Fisicoquímicas							
Característica	Unidad	Yogur entero*	Yogur parcialmente descremado**	Yogur descremado**			
Materia grasa láctea	g/100g	Mínimo 3,0	0,6 - 2,9	Máximo 0,5			
Sólidos no grasos lácteos	g/100g	-	Mínimo 6,2	Mínimo 6,2			
Acidez valorable expresada como % de ácido láctico	g/100g	Mínimo 0,6	Mínimo 0,6 Máximo 1,5	Mínimo 0,6 Máximo 1,5			
Proteína láctea (N x 6,38)	g/100g	Mínimo 2,7	Mínimo 2,7	Mínimo 2,7			
*Para elaborado a base de leche entera: Codex Alimentarius.							
**Para elaborado a base de leche parcialmente descremada y descremada: Norma Técnica Peruana.							
20.2 Microbiológicas de identidad							
Agente microbiano	Unidad	Recuento					
Bacterias lácticas totales	UFC/g	Min. 10 ⁷					
Microorganismos etiquetados (*)	UFC/g	Min. 10 ⁶					
(*) Se aplica cuando en el etiquetado se realiza una declaración de contenido que se refiere a la presencia de un microorganismo específico que ha sido agregado a parte de <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> y <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i> .							
Artículo 21.- Especificaciones sanitarias							
El yogur debe cumplir con las especificaciones de calidad sanitaria e inocuidad, que establece el Ministerio de Salud, según lo siguiente:							
21.1 Microbiológicas							
Agente microbiano	Unidad	Categoría	Clase	n	c	Límite	
						m	M
Coliformes	UFC/g	5	3	5	2	10	10 ²
Mohos	UFC/g	2	3	5	2	10	10 ²
Levaduras	UFC/g	2	3	5	2	10	10 ²
Nota:							
Categoría: Grado de riesgo que representa los microorganismos en relación a las condiciones previsible de manipulación y consumo del alimento.							
Clase: Es la clasificación que se da a los planes de muestreo por atributos, que pueden ser de dos o tres.							
21.2 Contaminantes							
Los límites máximos permitidos de contaminantes en el yogur serán determinados según lo establecido en el artículo 7 del presente Reglamento.							
TÍTULO II							
PRINCIPIOS GENERALES DE HIGIENE DE LA LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS							
CAPÍTULO I							
REQUISITOS PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE							
Artículo 22.- Registros de hatos							
Los hatos o animales de producción lechera, deben estar declarados oficialmente libres de brucelosis y tuberculosis por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA, o estar sometidos a control oficial y a programas de erradicación.							
Los animales deben tratarse solamente con medicamentos veterinarios autorizados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA, con arreglo a su uso específico y de una manera que no tenga efectos negativos en la inocuidad de la leche, lo que incluye el respeto del periodo de retiro, teniendo en cuenta lo establecido en el <i>Codex Alimentarius</i> .							
Artículo 23.- Requisitos que deben cumplir los hatos productores de leche							
El diseño, la ubicación y el mantenimiento de los establecimientos de los hatos deben garantizar el mínimo riesgo de contaminación de la leche cruda tanto de origen intrínseco (animal) como de origen extrínseco (ambiental), y deberán cumplir con los siguientes requisitos:							
23.1 De Infraestructura							
1. El diseño de los establecimientos e instalaciones de los hatos debe permitir un flujo operacional con mínimo riesgo de contaminación cruzada de la leche. Las instalaciones donde se realice el ordeño deben estar ubicadas y construidas de forma tal que facilite el drenaje de líquidos, asimismo, deben contar con medios adecuados para la remoción de desechos, de forma tal que reduzca al mínimo o impida la contaminación de la leche.							

2. Las instalaciones deben tener la iluminación y ventilación suficientes, así como el suministro de agua de calidad para las actividades, y contar con medidas de prevención contra el ingreso de vectores.

3. Suministro de agua potable o de fácil potabilización, que no deteriore o altere la leche.

4. Los pisos de las áreas de ordeño deben ser de fácil limpieza y desinfección, que facilite el drenaje del líquido.

5. Los utensilios y equipos empleados en los hatos para el manejo de la leche deben cumplir con los siguientes requisitos:

5.1 Los equipos y utensilios empleados en el manejo de la leche deben ser de material de fácil limpieza y desinfección, resistentes a la corrosión, y ser mantenidos en buen estado de conservación.

5.2 Los materiales que se utilicen en las instalaciones que puedan estar o estén en contacto con los alimentos deben ser de fácil limpieza y desinfección.

5.3 Los utensilios para ordeño deben ser fáciles de limpiar y desinfectar, resistentes a la corrosión e incapaces de transferir sustancias extrañas a la leche.

5.4 El equipo de ordeño debe ser instalado y probado de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a efectos de garantizar que el equipo funcione correctamente.

5.5 Los recipientes para contener la leche cruda, deben ser de exclusivo uso para tal fin, y deben ser de material sanitario que garantice la limpieza y desinfección.

5.6 Las superficies y tuberías de los equipos que entran en contacto con los alimentos deben estar en adecuadas condiciones de conservación y mantenimiento.

23.2 Buenas prácticas de sanidad y alimentación animal

1. Los establecimientos deben garantizar el cumplimiento de las disposiciones sobre Buenas Prácticas Ganaderas, establecidas por la Autoridad Sanitaria Nacional Competente.

2. Los hatos con ganaderías identificadas con enfermedades zoonóticas a través de la leche, deben desarrollar un programa de saneamiento para acceder a la comercialización de la leche, para lo cual se aplicarán las medidas preventivas que establezca la autoridad sanitaria.

3. La leche procedente de animales tratados con antibióticos y otros medicamentos veterinarios cuyos principios activos o metabolitos se eliminen por la leche, solo podrá darse para el consumo humano hasta en tanto haya transcurrido el período de retiro especificado en el rótulo para el medicamento o insumo pecuario en cuestión.

4. Los animales deben tratarse con medicamentos veterinarios autorizados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA, teniendo en cuenta lo establecido en el *Codex Alimentarius*.

5. Deben adoptarse precauciones para garantizar que los animales lecheros no consuman ni tengan acceso al agua contaminada ni a otros contaminantes del medio, que puedan originar enfermedades o contaminar la leche.

6. Para la alimentación de bovinos utilizados para la producción de leche, se debe tener en cuenta lo establecido en el *Codex Alimentarius* o por lo establecido por la autoridad sanitaria competente.

Artículo 24.- Buenas prácticas de ordeño

1. Las operaciones de ordeño deben reducir la introducción de gérmenes patógenos provenientes de cualquier fuente y de residuos químicos procedentes de las operaciones de limpieza y desinfección.

2. Las áreas de espera donde se encuentran los animales inmediatamente antes del ordeño deben estar en condiciones higiénico sanitarias adecuadas. Estas zonas deben estar limpias, evitando acumulaciones de estiércol, lodo o cualquier otra materia no deseable, y mantenerse de forma que se reduzca al mínimo el riesgo de la infección de los animales o la contaminación de la leche.

3. El establo y las zonas de ordeño e instalaciones comunicadas entre sí deben mantenerse libres de animales, tales como perros, gatos y aves de corral, entre otros.

4. Antes del ordeño, los animales deben estar tan limpios como sea posible y verificar que la primera leche que se extrae tenga una apariencia normal; de otra forma, estas leches deben rechazarse.

5. El agua utilizada para limpiar la ubre, el equipo de ordeño, tanques de almacenamiento y otros utensilios, debe ser de tal calidad que no contamine la leche.

6. Los procesos de limpieza y secado de la ubre deben ser adecuados, evitando daños en los tejidos. En caso de emplearse selladores de pezón o desinfectantes para estos, debe evitarse la contaminación de la leche con tales productos.

7. Los equipos deben estar diseñados, calibrados y/o verificados, y los utensilios deben ser diseñados, de tal forma que no dañen los pezones durante las operaciones de ordeño; deben limpiarse y desinfectarse adecuadamente después de cada operación de ordeño.

Artículo 25.- Saneamiento

1. Los productos para el control de plagas deben estar aprobados oficialmente por la autoridad sanitaria competente, y emplearse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2. Se debe realizar un manejo, disposición y tratamiento adecuado de las aguas residuales y desechos sólidos provenientes de las actividades de la producción primaria de acuerdo con la legislación vigente, para evitar la contaminación de las aguas por escurrimiento, filtración en el suelo o arrastre hacia los mantos superficiales o subterráneos.

3. Los establecimientos deben contar con un área destinada para el almacenamiento de detergentes, desinfectantes y sustancias similares.

4. Se deben realizar acciones preventivas orientadas a evitar el ingreso y la proliferación de vectores, conforme a los programas de prevención y control.

5. Las medidas de control (físico, químico, biológico) deben estar orientadas a la eliminación de los vectores, los cuales deben combatirse de manera inmediata y sin constituir riesgo para la inocuidad de la leche.

Artículo 26.- Higiene y salud del personal

El personal que manipula la leche e insumos debe encontrarse en buen estado de salud. Las personas que se sabe o se sospecha que sufren o son portadoras de una enfermedad con probabilidades de transmitirse a la leche deberán ser apartadas inmediatamente respetando sus derechos laborales, pudiendo ser repuestas previa certificación médica, si los motivos clínicos así lo ameritan.

Entre los estados de salud que deben ser cautelados permanentemente por el empleador y estar documentados, se señalan los siguientes:

1. Tuberculosis.
2. Ictericia.
3. Diarrea.
4. Vómitos.
5. Fiebre.
6. Dolor de garganta con fiebre.
7. Lesiones de la piel visiblemente infectadas (furúnculos, cortes, etc.).
8. Supuración de los oídos, ojos y nariz.
9. Otros, que determine la autoridad sanitaria competente.

Artículo 27.- Capacitación

El personal relacionado con la producción y recolección de la leche, según corresponda, debe recibir capacitación continua y tener las habilidades apropiadas en los siguientes temas:

1. Salud y manejo animal.
2. Proceso de ordeño.
3. Prácticas higiénicas en la manipulación de la leche.
4. Higiene personal y hábitos higiénicos.

CAPITULO II

Procedencia, enfriamiento y destino de la leche

Artículo 28.- Recolección y transporte de la leche cruda hacia las plantas de enfriamiento o plantas de procesamiento

1. La leche debe transportarse y entregarse sin retrasos injustificados, de tal forma que se prevenga su contaminación y se reduzca al mínimo la proliferación de microorganismos en el producto, como lo señala el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos del *Codex Alimentarius*.

2. Los vehículos cisterna que transportan la leche cruda desde los establos o desde los centros de acopio a las fábricas, requieren contar con medidas y diseños que aseguren que la leche mantenga la calidad e idoneidad del producto.

3. La leche debe refrigerarse y mantenerse a las temperaturas necesarias para reducir al mínimo el aumento de la carga microbiana, de acuerdo a lo establecido por el *Codex Alimentarius*.

4. Los vehículos y los manipuladores no deben ingresar a lugares donde se encuentren animales o donde haya excretas, ensilaje, etc., a fin de evitar riesgos de contaminación cruzada.

Artículo 29.- Buenas prácticas en el acopio de la leche y controles

Se debe verificar temperatura, densidad y acidez de la leche que ingresa, y realizar como pruebas de campo: El "Ensayo de Reductasa (azul de metileno)", la "Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)" y la de detección de mastitis. El centro de acopio debe llevar los controles documentados de los resultados de las verificaciones que realiza, según lo siguiente:

REQUISITOS	UNIDAD	MIN.	MÁX.
Ensayo de reductasa (azul de metileno)*	Horas	4	-
Reacción de estabilidad proteica (prueba de alcohol)	Para leche destinada a pasteurización: No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol al 74 % en volumen		

*Aplicable a la leche cruda antes de ser sometida a enfriamiento.

CAPÍTULO III

ELABORACIÓN INDUSTRIAL DE LA LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS

Artículo 30.- Condiciones Sanitarias de las Instalaciones, Equipos y Utensilios

30.1 Los establecimientos de procesamiento deben contar con sistemas que protejan a los alimentos de la contaminación del exterior. Deben contar con vías de acceso y áreas de desplazamiento al interior del establecimiento, con superficie de fácil limpieza para la circulación.

30.2 El diseño y distribución de las instalaciones debe permitir el flujo de los procesos operacionales, de manera tal que limite al máximo el riesgo de contaminación cruzada de los productos por efecto de la circulación de equipos rodantes, del personal o por la proximidad de los servicios higiénicos, facilitando la adopción de las BPM y los POES.

30.3 Los equipos y utensilios que intervienen en las operaciones con los alimentos deben estar fabricados con materiales que no produzcan ni emitan sustancias tóxicas ni impregnen a los alimentos de olores o sabores desagradables. Deben ser de superficie lisa y estar exentos de orificios y grietas.

30.4 Los equipos utilizados para aplicar tratamientos térmicos, almacenar, enfriar o congelar, deben permitir que se alcancen las temperaturas requeridas con la rapidez necesaria para mantener la inocuidad y calidad; estos equipos deben tener un diseño que permita controlar

las temperaturas. Los instrumentos de medición para los puntos críticos de control deben estar calibrados y/o verificados, de acuerdo a las disposiciones del Instituto Nacional de Calidad - INACAL.

Artículo 31.- Buenas Prácticas de Manufactura o de Manipulación (BPM)

31.1 El área de recepción de materias primas e insumos debe estar protegida con techo y contar con suficiente iluminación, que permita una adecuada manipulación e inspección de los productos y su entorno. Se debe contar en forma escrita con las especificaciones técnicas y sanitarias para cada uno de los productos, a fin que el personal responsable del control en la recepción, pueda verificarlas por métodos rápidos que le permitan decidir la aceptación o rechazo de los mismos.

31.2 La leche que llega a la fábrica como materia prima debe cumplir con los requisitos especificados en el presente Reglamento, y siempre que la elaboración posterior no permita su uso inmediato; debe refrigerarse a temperaturas apropiada, a fin de reducir al mínimo su carga microbiana hasta su transformación.

31.3 Los aditivos alimentarios deben ser aquellos permitidos por el *Codex Alimentarius* de acuerdo al producto o, en su defecto, con lo señalado en las regulaciones federales de los Estados Unidos de América y, en lo no previsto por estas, con lo establecido por la normativa de la Unión Europea.

31.4 La empresa es responsable que las materias primas, ingredientes, productos industrializados e insumos en general que utilizan, tengan los requisitos de calidad sanitaria e inocuidad, y debe registrarse, como mínimo, la siguiente información con fines de rastreabilidad: Proveedores, especificaciones técnicas y sanitarias, periodo de almacenamiento, condiciones de manejo y conservación, registros sobre los lotes de materias primas e insumos. Dicha información se registrará como parte del Plan HACCP, de cada producto o grupo de productos que se fabrica, y estará disponible durante la inspección sanitaria que realice la autoridad responsable de la vigilancia.

31.5 La estiba de los productos no perecibles debe ser en tarimas (parihuelas) o estantes, cuyo nivel inferior y superior permitan los espacios libres para la circulación del aire, las actividades de limpieza y de inspección; de igual manera, entre las filas de rumas y estas con la pared.

Artículo 32.- Elaboración Industrial

Las plantas deben cumplir la normatividad de la autoridad sanitaria competente durante el proceso de elaboración de los productos, conforme lo señala el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos del *Codex Alimentarius*.

Artículo 33.- Envasado de producto terminado

33.1 Para los productos lácteos líquidos, el cierre de los envases destinados a los consumidores debe efectuarse inmediatamente después del llenado, en el establecimiento en el que se lleve a cabo el último tratamiento térmico mediante un dispositivo de cierre que impida su contaminación. El sistema de cierre debe concebirse de tal forma que, una vez abierto, quede claramente de manifiesto que se ha abierto; asimismo, debe ser de fácil comprobación.

33.2 Es responsabilidad del fabricante determinar técnicamente la vida útil del producto y las condiciones de su almacenamiento, que será verificado por la autoridad competente.

Artículo 34.- Almacenamiento de productos intermedios y terminados

Los productos intermedios deben pasar de forma inmediata a su elaboración ulterior; caso contrario, deben mantenerse en condiciones tales que se limite o evite la proliferación microbiana.

Artículo 35.- Almacenamiento de envases

Se debe contar con un área exclusiva para el almacenamiento de envases; asimismo, la estiba de

Anexo 17. Matriz de consistencia.

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables e indicadores	Metodología
<p>¿Cuáles serán las bacterias ácido lácticas presentes en los quesos artesanales en la Localidad de Vizcapalca, Ayacucho 2024?</p>	<p>Objetivo general: Caracterizar bacterias ácido lácticas a partir del queso en el Anexo de Vizcapalca de la Región de Huancavelica.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aislar bacterias ácido lácticas a partir de queso artesanal, producido en Vizcapalca. 2. Identificar las características morfológicas de las bacterias ácido lácticas. 3. Identificar las bacterias ácido lácticas, mediante la amplificación y secuenciación del Gen RNAr 16S. 	<p>Los quesos de elaboración artesanal procedentes de la Localidad de Vizcapalpa, poseen bacterias ácido lácticas, las cuales brindan características organolépticas particulares.</p>	<p>VARIABLES DEL ESTUDIO Bacterias ácido lácticas aisladas de los quesos artesanales.</p> <p>INDICADORES</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capacidad acidificadora de la leche. • Resistencia de las BAL a antibióticos. 	<p>Tipo de investigación Básica</p> <p>Nivel Descriptivo - cuantitativo</p> <p>Población Quesos artesanales de la localidad de vizcapalpa, Región de Huancavelica.</p> <p>Muestra 30 quesos de la localidad de Vizcapalca.</p> <p>Técnicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aislamiento de las BAL • Caracterización morfológica de las bacterias aisladas • Capacidad acidificadora de la leche • Resistencia a antibióticos • Identificación por técnica molecular de las BAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD N° 62-2025-UNSCH-EPG/OGH

El que suscribe; responsable verificador de originalidad de trabajo de tesis de Posgrado en segunda instancia para la **Escuela de Posgrado – UNSCH**; en cumplimiento a la Resolución De Consejo Directivo N°109-2024-UNSCH-EPG/CD, Reglamento de Originalidad de trabajos de Investigación de la UNSCH, otorga lo siguiente:

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

AUTOR	Bach. Roxana Karen CARHUAZ CONDORI
DENOMINACIÓN DEL PROGRAMA DE ESTUDIOS	MAESTRÍA EN CIENCIAS
GRADO ACADÉMICO QUE OTORGA	MAESTRO
DENOMINACIÓN DEL GRADO ACADÉMICO	MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA
TÍTULO DE TESIS	Aislamiento e identificación molecular de bacterias ácido lácticas (BAL) de quesos artesanales de la localidad de Vizcapalca – Ayacucho 2024
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD	15% de similitud
N° DE TRABAJO	2730490233
FECHA	16 de agosto de 2025

Por tanto, según los artículos 12, 13 y 17 del Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación, es procedente otorgar la constancia de originalidad con depósito.

Se expide la presente constancia, a solicitud del interesado para los fines que crea conveniente.

16 de agosto de 2025.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
Escuela de Posgrado



Dr. Oscar Gutiérrez Huamani

Aislamiento e identificación molecular de bacterias ácido lácticas (BAL) de quesos artesanales de la localidad de Vizcapalca - Ayacucho 2024

por Roxana Karen CARHUAZ CONDORI

Fecha de entrega: 16-ago-2025 05:40p. m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2730490233

Nombre del archivo: TESIS_POSGRADO.docx (10.12M)

Total de palabras: 17725

Total de caracteres: 100201

Aislamiento e identificación molecular de bacterias ácido lácticas (BAL) de quesos artesanales de la localidad de Vizcapalca - Ayacucho 2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Trabajo del estudiante

3%

2

hdl.handle.net

Fuente de Internet

3%

3

vdocuments.es

Fuente de Internet

2%

4

www.grafiati.com

Fuente de Internet

1%

5

colposdigital.colpos.mx:8080

Fuente de Internet

1%

6

repositorio.unsch.edu.pe

Fuente de Internet

1%

7

repositorio.unsaac.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

8

aprenderly.com

Fuente de Internet

<1%

9

purl.org

Fuente de Internet

<1%

10

bibliotecadigital.fvet.edu.uy

Fuente de Internet

<1%

11

www.redalyc.org

Fuente de Internet

<1%

12

cybertesis.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1%

13

ru.dgb.unam.mx

Fuente de Internet

<1%

14

biotecnia.unison.mx

Fuente de Internet

<1%

15	dgsa.uaeh.edu.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
16	www.copladi.udg.mx Fuente de Internet	<1 %
17	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
19	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1 %
20	derpharmachemica.com Fuente de Internet	<1 %
21	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas Activo Excluir coincidencias < 30 words
Excluir bibliografía Activo



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA
RESOLUCIÓN DIRECTORAL N°00530-2025-UNSCH-EPG/D.**

Siendo las 04:00 p.m. del 14 de julio de 2025 se reunieron en el auditorium de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis, presidido por el **Dr. OSCAR GUTIERREZ HUAMANI** Director (e) de la Escuela de Posgrado, el **Dr. WALTER WILFREDO OCHOA YUPANQUI** Director de la Unidad de Posgrado de la Facultad Ciencias Biológicas, e integrado por los siguientes miembros: **Dr. FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA** y la **Mtra. SONIA HAYDEE PALOMINO FELICES**; para la sustentación oral y pública de la tesis titulada: **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) DE QUESOS ARTESANALES DE LA LOCALIDAD DE VIZCAPALCA – AYACUCHO 2024**, presentado por la **Bach. ROXANA KAREN CARHUAZ CONDORI**. Teniendo como asesora a la **Dra. ROBERTA BRITA ANAYA GONZALEZ**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar el Grado Académico de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduanda.

A continuación, el Jurado Examinador y Calificador de Tesis procedió a la votación, la que dio como resultado el siguiente calificativo: DIECIOCHO (18).

CALIFICACION (x)

Aprobado(a) por Unanimidad.	<input checked="" type="checkbox"/>
Aprobado(a) por Mayoría.	<input type="checkbox"/>
Desaprobado(a) por Unanimidad.	<input type="checkbox"/>
Desaprobado(a) por Mayoría.	<input type="checkbox"/>

(x) Marcar con aspa.

Luego, el presidente del Jurado recomienda que la Escuela de Posgrado proponga que se le otorgue a la **Bach. ROXANA KAREN CARHUAZ CONDORI**, el Grado Académico de **MAESTRO(A) EN CIENCIAS, MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**. Siendo las.....5:45.....hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en la ciudad de Ayacucho, a las.....5:45.....hrs. del 14 de julio de 2025.

.....
Dr. OSCAR GUTIERREZ HUAMANI
Director(e) de la Escuela de Posgrado.

.....
Dr. WALTER WILFREDO OCHOA YUPANQUI
Director de la UPG-FCB

.....
Dr. FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA
Miembro.

.....
Mtra. SONIA HAYDEE PALOMINO FELICES
Miembro.

.....
Dr. JOSE ALARCON GUERRERO
Secretario Docente.

Observaciones:

.....
.....
.....