



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Evaluación de la actividad proteolítica de bacterias aisladas de leche cruda,  
pasteurizada y procesada por tratamiento de ultra alta temperatura (UHT)**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología**

**ERIKA ALEXANDRA MOLINA MORALES**

Quito, 2023

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la señorita Erika Alexandra Molina Morales ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



---

PhD. Martín Marcial Coba  
Director de la Disertación  
Quito, 16 de junio de 2023

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanas.

A Sebastián, aunque ya no estás aquí, te llevo siempre conmigo.

Los amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres y a mis hermanas por su apoyo incondicional en la consecución de mis objetivos personales y académicos. Su amor incondicional me ha dado la motivación para luchar por mis metas y no rendirme ante las dificultades. Ustedes me han ayudado a convertirme en mi mejor versión.

Agradezco enormemente a mi director de tesis por su compromiso, dedicación y paciencia, ya que sin su orientación y sus precisas correcciones no habría logrado llegar a esta instancia tan deseada. Le agradezco por su guía y sobre todo por los consejos que me ha brindado, los cuales me serán muy útiles en mi futuro profesional.

A mis amigos, los mejores compañeros de estudio y de vida a lo largo de estos cuatro años, gracias por su apoyo, por cada risa y momentos inolvidables que guardaré en mi mente y en mi corazón.

A Gabriela Felicita le estaré eternamente agradecida por su apoyo y colaboración en el desarrollo y culminación de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS:.....	13
OBJETIVO GENERAL:.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	13
4. METODOLOGÍA.....	14
4.1. CEPAS BACTERIANAS.....	14
4.2. TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....	14
4.3. EVALUACIÓN DE TERMORRESISTENCIA DE PROTEASAS EXTRACELULARES MICROBIANAS.....	15
4.4. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EN LECHE ANTES DE SU ESTERILIZACIÓN.....	15
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1. TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....	17
5.2. EVALUACIÓN DE TERMORRESISTENCIA DE PROTEASAS EXTRACELULARES MICROBIANAS.....	19
5.3. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EN LECHE ANTES DE SU ESTERILIZACIÓN.....	22
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	25
7. CONCLUSIONES.....	29
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
9. TABLAS.....	33

**LISTA DE TABLAS**

Tabla 2: Evaluación de resistencia térmica de proteasas producidas por las cepas psicrotróficas evaluadas.....	20
Tabla 3: Evaluación de resistencia térmica de proteasas producidas por las cepas mesofílicas evaluadas .....	21
Tabla 4: Evaluación de resistencia térmica de proteasas producidas por las cepas termófilas evaluadas .....	21
Tabla 5: Efecto de la inoculación de bacterias psicrotróficas con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización.....	23
Tabla 6: Efecto de la inoculación de bacterias mesofílicas con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización .....	24
Tabla 7: Efecto de la inoculación de bacterias termófilas con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización .....	24
Tabla 1: Aislamientos bacterianos evaluados en el tamizaje de capacidad proteolítica .....	33

## 1. RESUMEN

Por su alto contenido nutricional, la leche bovina constituye un medio óptimo para el desarrollo de microorganismos contaminantes como bacterias psicrotróficas, mesófilas y termófilas. Aunque el tratamiento de ultra alta temperatura (UHT) puede inactivar la viabilidad de estas, algunas enzimas extracelulares, como las proteasas, son capaces de mantener su actividad. Estas, al ser capaces de degradar las micelas de caseína, provocan cambios organolépticos en el producto terminado (Guerrero et al., 2003). Con el propósito de determinar su potencial deteriorador, esta investigación evaluó la capacidad proteolítica de 33 cepas bacterianas aisladas de la cadena de producción de leche UHT.

Para esto, se realizó un tamizaje de la capacidad proteolítica de las cepas, en pocillos perforados en placas de agar Plate count más 10% de leche descremada y se incubaron a 7°C durante 10 días, 30°C por 48 horas y 55°C durante 48 horas, en el caso de bacterias psicrotróficas, mesófilas y termófilas, respectivamente. Después de la incubación, se observó la formación de halos de digestión de caseína alrededor del inóculo y se determinó su diámetro. De un total de quince cepas psicrotróficas, doce presentaron capacidad proteolítica. El mismo fenómeno ocurrió con ocho de catorce y tres de cuatro aislamientos mesofílicos y termofílicos, respectivamente. El menor diámetro (1.0 cm) correspondió a *Lactocaseibacillus paracasei* P2.20, mientras que *Bacillus licheniformis* SDP.15 registró el mayor valor (3.3 cm). Sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas de los tres grupos bacterianos. En cuanto a la evaluación de termorresistencia de las proteasas, solamente *Pseudomonas lactis* E6.10 fue la única cepa capaz de mantener su actividad enzimática tras el tratamiento térmico del sobrenadante libre de células a 92°C durante 8 minutos. Por otro lado, seis cepas psicrotróficas y tres termófilas inoculadas en leche descremada UHT, coagularon la caseína después de 7 días de incubación a 45°C. Este estudio, realizado por primera vez en Ecuador, constituye una herramienta para el desarrollo de futuras investigaciones relacionadas al potencial deteriorador de bacterias contaminantes de leche UHT.

Palabras clave: cepa, coagulación, leche, mesófilos, proteasas, psicrotróficos, termófilos



## 2. ABSTRACT

Due to its high nutritional content, bovine milk constitutes an ideal medium for the development of contaminating microorganisms such as psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic bacteria. Although ultra-high temperature (UHT) treatment can inactivate the viability of these bacteria, some extracellular enzymes, such as proteases, are able to maintain their activity. These proteases, capable of degrading casein micelles, cause organoleptic changes in the finished product. In order to determine their deteriorating potential, this research evaluated the proteolytic capacity of 33 bacterial strains isolated from the UHT milk production chain.

To do this, screening was performed on the proteolytic capacity of the strains, in perforated wells in agar plates with Plate count plus 10% skimmed milk, and incubated at 7°C for 10 days, 30°C for 48 hours, and 55°C for 48 hours, in the case of psychrotrophic, mesophilic, and thermophilic bacteria, respectively. After incubation, the formation of casein digestion halos around the inoculum was observed, and their diameter was determined. Of a total of fifteen psychrotrophic strains, twelve showed proteolytic capacity. The same phenomenon occurred with eight out of fourteen mesophilic isolates and three out of four thermophilic isolates, respectively. The smallest diameter (1.0 cm) corresponded to *Lactocaseibacillus paracasei* P2.20, while *Bacillus licheniformis* SDP.15 recorded the highest value (3.3 cm). However, there was no statistically significant difference between the strains of the three bacterial groups. Regarding the evaluation of protease thermostability, only *Pseudomonas lactis* E6.10 was the only strain capable of maintaining its enzymatic activity after heat treatment of the cell-free supernatant at 92°C for 8 minutes. On the other hand, six psychrotrophic and three thermophilic strains inoculated in UHT skimmed milk coagulated the casein after 7 days of incubation at 45°C. This study, carried out for the first time in Ecuador, constitutes a tool for the development of future research related to the deteriorating potential of contaminating UHT milk bacteria.

**Keywords:** strain, coagulation, milk, mesophiles, proteases, psychrotrophs, thermophiles, proteases, coagulation.

### 3. INTRODUCCIÓN

La leche bovina es un alimento ampliamente consumido por el ser humano alrededor del mundo. Esto se relaciona con su elevado contenido nutricional, que incluye minerales, agua y proteínas como caseína, seroglobulina y albúmina (Fuentes et al., 2013). Estas mismas propiedades, convierten a la leche en un medio de alta riqueza para la proliferación de microorganismos contaminantes a lo largo de la cadena de producción (Fuentes et al., 2019). Estos provienen de diferentes fuentes asociadas a la suciedad en la superficie de los pezones y de una limpieza inadecuada de la zona y del equipo de ordeño. Adicionalmente, las condiciones de almacenamiento de la leche influyen en la composición de su carga microbiana (Decimo et al., 2014). En ese contexto, el almacenamiento de la leche cruda bajo condiciones de refrigeración (4 - 7 °C) durante un tiempo máximo de 72 horas es aplicado con el propósito de limitar el desarrollo de bacterias mesofílicas y termofílicas (Yuan et al., 2019). Aunque esta práctica contribuye a la preservación de la leche, también favorece la selección de microorganismos psicrotrofos, los mismos que se definen como bacterias mesofílicas capaces de adaptar su desarrollo bajo temperaturas de refrigeración (Decimo et al., 2014). Los organismos clasificados dentro de este grupo, y que más frecuentemente se aíslan de la cadena de producción de leche, son mayoritariamente bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* spp., *Pantoea conspicua*, *Achromobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Serratia* spp., *Alcaligenes* spp., *Chromobacterium* spp., *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. (de Oliveira et al., 2015). La viabilidad de estas bacterias es inactivada durante el procesamiento industrial de la leche que incluye métodos como pasteurización, que consiste en la destrucción de los microorganismos mediante la aplicación de diferentes temperaturas y tiempos con el fin de garantizar su inocuidad. Para ello, este proceso puede ser aplicado de dos maneras. La primera consiste en el sometimiento de la leche a 72 °C durante 15 segundos si se desea que se lleve a cabo en un tiempo corto, mientras que, para una pasteurización de tiempo prolongado, la leche debe ser sometida a 63°C durante 30 minutos (Galván, 2005). Adicionalmente, se aplica el tratamiento por ultra alta temperatura (UHT), que consiste en someter uniformemente la totalidad de la leche a una temperatura entre (130 – 145 °C durante 2 a 4 segundos) (Abarca et al., 2018). Estos tratamientos térmicos son de los más eficientes para la eliminación de microorganismos. Sin embargo, enzimas extracelulares producidas por este tipo de bacterias, al final de su fase de crecimiento exponencial e inicio

de la fase estacionaria, son capaces de mantener su actividad incluso luego de exponerse a altas temperaturas (Aguirre Aguirre, 2016).

Por otra parte, mientras el proceso de pasteurización es capaz de degradar únicamente las células vegetativas de los microorganismos, (Soni et al., 2016) las bacterias termorresistentes y formadoras de esporas como *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. sporothermodurans*, *Enterococcus durans*, *Geobacillus stearothermophilus* y *Paenibacillus polymyxa* sobreviven a temperaturas propias de este tratamiento (63 °C) y, eventualmente, a tratamientos UHT. Estos microorganismos en conjunto con los psicrotróficos tienen un gran impacto sobre la vida útil de los productos manufacturados a base de este tipo de materia prima (Christiansen et al., 2006), puesto que, al ser capaces de adherirse a superficies de acero inoxidable, comúnmente utilizadas en este tipo de industria, pueden formar biopelículas que representan reservorios de contaminación microbiana (Van Houdt et al., 2010). Además, al igual que las bacterias psicrotróficas, pueden producir toxinas y enzimas proteolíticas y lipolíticas como las proteasas que, tras ser secretadas en la leche, su inactivación, mediante tratamientos térmicos, no es lo suficientemente eficiente (Novoa y Restrepo, 2007).

En matrices alimentarias como los productos lácteos, las proteasas degradan las principales proteínas de la leche, entre las que se destaca la caseína. Esta es definida como una fosfoproteína de alto valor biológico que se encuentra asociada al fosfato de calcio presente en este alimento (Guevara et al., 2014). La caseína representa el 80% del total de las proteínas en la leche bovina y se encuentran formando agregados multimoleculares conocidos como micelas (Calvo, 2017). La desestabilización de tales estructuras por la acción de las enzimas proteolíticas conduce a cambios en las características organolépticas del producto terminado que incluyen la coagulación, gelificación y la formación de sabores amargos en la leche. Se sabe que a bajas temperaturas las micelas están en un estado soluble, por lo que se sugiere que la refrigeración provoca que las fracciones de caseínas sean más susceptibles a la proteólisis por bacterias psicrotróficas durante su almacenamiento (Guerrero et al., 2003).

Cabe destacar que, aunque el desarrollo de este tipo de bacterias es indeseable, tanto en la leche cruda como durante su procesamiento y almacenamiento, no todos los microorganismos están estrechamente relacionados con el deterioro de esta matriz. Este fenómeno radica principalmente en la actividad de las enzimas antes mencionadas, siendo la capacidad proteolítica una característica que varía entre especies e incluso entre cepas de la misma especie. Por ejemplo, el predominio de *Pseudomonas fluorescens* entre las distintas

bacterias psicrotróficas proteolíticas que pueden colonizar la leche es atribuido a su excelente capacidad de adaptación frente a modificaciones ambientales, su habilidad de multiplicación en tiempos de generación más cortos y su mayor competencia para hidrolizar proteínas a comparación de otras especies del mismo género (Márquez et al., 2007). Aunque estos fenómenos han sido estudiados en diferentes países, en Ecuador no se han realizado investigaciones relacionadas al potencial deteriorador con base en la actividad proteolítica de bacterias aisladas a partir de la cadena de manufactura de leche UHT. Por lo tanto, la presente investigación evaluó la capacidad proteolítica de bacterias psicrotróficas, mesófilas y termófilas aisladas de leche cruda, pasteurizada y procesada por ultra alta temperatura (UHT), con el propósito de determinar el potencial deteriorador de estos microorganismos durante el almacenamiento del producto comercial. Los resultados alcanzados en esta investigación constituyen un componente que debe considerarse para el desarrollo de estrategias enfocadas en la optimización de los tratamientos térmicos, de envasado y almacenamiento industrial a bajas temperaturas, con el fin de asegurar la estabilidad física y las características organolépticas de la leche.

**OBJETIVOS:****OBJETIVO GENERAL:**

Determinar el potencial deteriorador de bacterias psicrotróficas, mesófilas y termófilas aisladas de leche cruda, pasteurizada y procesada por ultra alta temperatura (UHT) mediante la evaluación cualitativa y cuantitativa de su capacidad proteolítica.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- a) Comparar la actividad proteolítica de los grupos bacterianos aislados de la leche.
- b) Evaluar la estabilidad de las enzimas proteolíticas extracelulares de las especies bacterianas a condiciones de alta temperatura.
- c) Determinar el efecto de la inoculación de las bacterias con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización y durante su posterior almacenamiento.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. CEPAS BACTERIANAS**

Las 15 cepas psicrotróficas, junto con 14 mesófilas y 4 termófilas que se incluyeron en este estudio fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de alimentos de la carrera de Microbiología – PUCE. Estas fueron aisladas previamente de muestras de leche cruda, pasteurizada y procesada por ultra alta temperatura (UHT). A partir de cultivos preservados en caldo BHI más glicerol 20% (v/v), las cepas seleccionadas fueron reactivadas en agar nutriente, de acuerdo con la temperatura y tiempo de crecimiento óptimo de cada aislamiento. Posteriormente, estas fueron propagadas en caldo BHI, bajo las mismas condiciones ambientales. Al finalizar la incubación, se adicionó glicerol en una concentración final de 20%, el volumen de la suspensión se distribuyó en tres alícuotas de 1 mL y se criopreservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . De esta manera, se estableció una colección de cultivos microbianos que fueron utilizados en los ensayos descritos a continuación (Morandi et al., 2021).

### **4.2. TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS**

Las cepas bacterianas fueron propagadas en 5mL de caldo BHI, bajo las condiciones ambientales óptimas para cada aislamiento, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente, las células fueron sedimentadas mediante centrifugación ( $4000\text{ g} \times 10\text{ min}$ ), el sobrenadante fue desechado y, utilizando la misma velocidad de centrifugación, las células fueron enjuagadas dos veces con 2.5 mL de tampón fosfato salino (PBS). El sedimento fue diluido en PBS, ajustando el volumen hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 0.8 (aproximadamente  $4\text{ a }6.4 \times 10^8\text{ UFC/mL}$ ), determinada espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ), un espectrofotómetro i3 (Hanon, China). Subsecuentemente, alícuotas de 25 uL de cada inóculo bacteriano se dispensaron en tres pocillos, de 5 mm de diámetro, perforados en placas de agar Plate Count suplementado con 10% de leche descremada. En el caso de las especies psicrotróficas, estas se incubaron a  $7^{\circ}\text{C}$  durante 10 días, mientras que mesófilas y termófilas se incubaron durante 24 horas a 30 y  $55^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Luego de este período, se observó y se midió la formación de halos de aclaración alrededor de los inóculos como resultado de la capacidad proteolítica de los aislamientos bacterianos.

#### **4.3. EVALUACIÓN DE TERMORRESISTENCIA DE PROTEASAS EXTRACELULARES MICROBIANAS**

Para este análisis, se seleccionaron las cepas que presentaron actividad proteolítica en el apartado 4.2. Estas fueron propagadas en 10 mL de caldo BHI, suplementado con 10% de leche descremada, e incubadas durante 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento de cada grupo bacteriano. Transcurrido este tiempo las células fueron sedimentadas por centrifugación (6500 rpm x 30 min). Brevemente, el sobrenadante resultante fue esterilizado dos veces por filtración (diámetro de poro 0.22  $\mu\text{m}$ ). Se utilizaron tres diferentes condiciones de pH, proporcionados por tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH 5,0), tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,5) y tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). Para esto, se tomaron 3 alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante filtrado de cada cepa y se mezcló cada una de ellas con el buffer respectivo en una proporción 1:1. Posteriormente, los sobrenadantes libres de células (SLC) tamponados, con tres diferentes pHs, y uno sin tampón de cada cepa fueron tratados térmicamente a 92°C durante 8 minutos en baño maría. Finalmente, para comprobar la presencia de enzimas proteolíticas termorresistentes, se inocularon los SLC en un volumen de 60  $\mu\text{L}$  en pocillos perforados en agar leche junto con los controles que correspondieron a los sobrenadantes libres de células sin tratamiento térmico. Las placas se incubaron a las temperaturas óptimas para cada especie bacteriana durante 24 horas y se evaluó la formación de halos de aclaración del medio y se midió su diámetro.

#### **4.4. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EN LECHE ANTES DE SU ESTERILIZACIÓN**

Las cepas que exhibieron capacidad proteolítica fueron propagadas en 5 mL de caldo BHI e incubadas durante 24 horas a la temperatura óptima de crecimiento de cada grupo bacteriano. Posteriormente alícuotas de 1 mL de cada cultivo, diluidas 1:100 en tampón fosfato salino (PBS), fueron inoculadas en 5 mL de leche descremada UHT. Como control se utilizó leche descremada UHT sin inocular. Inmediatamente, cada preparación se agitó manualmente durante 1 minuto y se incubó a 4 °C durante 48 horas. Transcurrido ese periodo de tiempo se realizó un control visual de cada suspensión con el fin de determinar si se produjo gelificación o coagulación de la leche. Después, se dispensaron alícuotas de 1 mL de cada muestra, incluyendo al control, en microtubos cónicos estériles, y se trataron térmicamente a 130 °C durante 30 segundos en un termobloque para posteriormente ser enfriados en hielo. Adicionalmente se comprobó la esterilidad de las muestras mediante una siembra en superficie de 100  $\mu\text{l}$  de cada una de ellas en agar BHI. Finalmente, los tubos

fueron incubados a 45°C durante 10 días. De igual manera se realizó un control visual diariamente y al término del tiempo de incubación.

#### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los ensayos experimentales se llevaron a cabo por triplicado. Los diámetros de los halos de degradación de caseína se compararon estadísticamente utilizando un análisis de varianza de un factor (ANOVA) con un nivel de significancia de 0.05, con el fin de contrastar la hipótesis nula de que las medias de los tres grupos bacterianos evaluados son iguales, en contraposición a la hipótesis alternativa de que al menos uno de ellos difiere estadísticamente del resto.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. TAMIZAJE DE LA CAPACIDAD PROTEOLÍTICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS

De un total de 15 aislamientos psicrotrofos, se observó que doce de ellos presentaron capacidad proteolítica, lo cual se evidenció mediante la formación de halos de digestión de caseína en el medio de cultivo (Fig. 1). Dentro de este grupo, se registraron diámetros de halos que oscilaron entre 1.2 y 3.2 cm. Es importante destacar que el menor valor correspondió a la actividad de *Pseudomonas brenneri* C10.34, mientras que *Pseudomonas lurida* C2.2 mostró el mayor diámetro. Asimismo, se observó que dos de las cinco cepas de *Pseudomonas* grupo *fragi* evaluadas no presentaron dicha actividad (Fig. 2).

Por otro lado, de las quince cepas mesófilas evaluadas, ocho de ellas exhibieron capacidad proteolítica, generando halos con diámetros comprendidos entre 1.1 y 2.9 centímetros. Se pudo destacar que *Staphylococcus epidermidis* E3.6 alcanzó el mayor valor y *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20 presentó el menor diámetro dentro de este grupo y del total de aislamientos evaluados.

Finalmente, aunque no existió diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los diámetros de los halos formados (Tabla 1), se observó que las bacterias termófilas exhibieron los halos de mayor diámetro en el ensayo. Estas registraron valores comprendidos entre 2.8 cm para *Bacillus sonorensis* C4.13 y 3.3 cm para *Bacillus licheniformis* SDP.15.

Adicionalmente, fue posible distinguir la formación de dos tipos de halos como resultado de la capacidad proteolítica de las cepas evaluadas. Algunos de estos fueron transparentes, mientras que otros se observaron con una tonalidad blanquecina alrededor del inóculo bacteriano (Fig. 1 y 3).

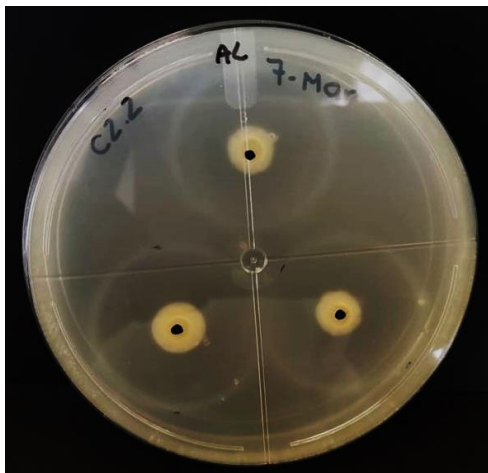


Figura 1. Halos transparentes producidos por la actividad proteolítica de *Pseudomonas lurida* C2.2

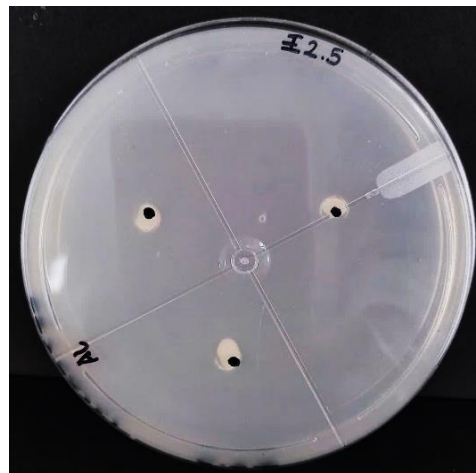


Figura 2. Ausencia de actividad proteolítica al evaluar a *Pseudomonas grupo fragi* E2.5



Figura 3. Halos blanquecinos formados por la actividad proteolítica de *Enterococcus durans* E10.19

## 5.2. EVALUACIÓN DE TERMORRESISTENCIA DE PROTEASAS EXTRACELULARES MICROBIANAS

De las veinticuatro cepas proteolíticas evaluadas, después del tratamiento térmico a 92°C durante 8 minutos, únicamente *Pseudomonas lactis* E6.10 mostró digestión de caseína, evidenciada por halos transparentes con diámetros de  $1.06 \pm 0.1$  cm (Tabla 2). Los resultados fueron consistentes tanto entre el SLC sin tamponar y aquellos evaluados a diferente pH (Fig. 4). En contraste, otra cepa de la misma especie, *Pseudomonas lactis* D1.11, no produjo proteasas termoestables (Fig. 5).

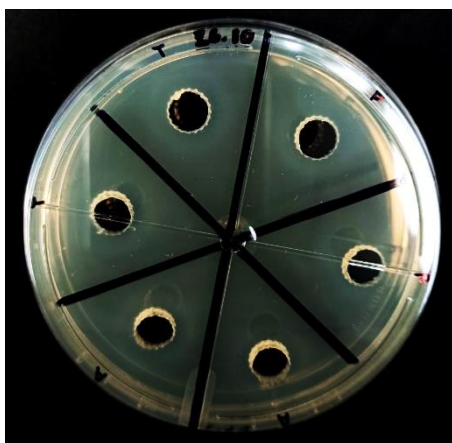


Figura 4. Halos formados como producto de la actividad de proteasas termorresistentes de *Pseudomonas lactis* E6.10

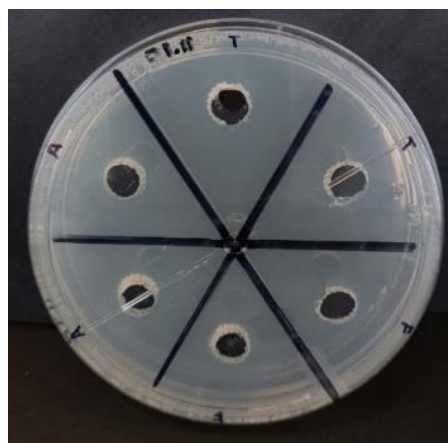


Figura 5. Ausencia de halos de digestión de caseína termorresistentes al evaluar a *Pseudomonas lactis* D1.11

**Tabla 2: Evaluación de resistencia térmica de proteasas producidas por las cepas psicrotróficas evaluadas**

<b>Psicrotróficas</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Diámetro de halo de degradación de caseína</b>	<b>Tipo de halo</b>
<i>Pseudomonas lactis</i> E6.10	1.06 ± 0.1	Transparente
<i>Pseudomonas lactis</i> D1.11	NP	-
<i>Janthinobacterium lividum</i> C5.27	NP	-
<i>Pseudomonas grupo fragi</i> C6.28	NP	-
<i>Pseudomonas brenneri</i> C10.34	NP	-
<i>Pseudomonas lurida</i> C2.2	NP	-
<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E4.7	NP	-
<i>Pseudomonas lurida</i> C4.18	NP	-
<i>Pantoea conspicua</i> SDT.21	NP	-
<i>Pseudomonas brenneri</i> C7.29	NP	-
<i>Pantoea ananatis</i> D.22	NP	-
<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E11.31	NP	-

Valores numéricos corresponden a media ± desviación estándar de los halos de digestión de caseína formado por acción de proteasas termorresistentes; NP: no exhibió proteasas termorresistentes; -: sin halo

**Tabla 3: Evaluación de resistencia térmica de proteasas producidas por las cepas mesofílicas evaluadas**

<b>Mesofílicos</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Diámetro de halo de degradación de caseína</b>	<b>Tipo de halo</b>
<i>Pseudomonas azotoformans</i> C8.30	NP	-
<i>Staphylococcus pasteurii</i> RE1.9	NP	-
<i>Raoultella terrigena</i> E7.12	NP	-
<i>Enterococcus durans</i> E10.19	NP	-
<i>Enterobacter hormaechei</i> E5.8	NP	-
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> P2.20	NP	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> E3.6	NP	-
<i>Lactococcus lactis</i> D.24	NP	-
<i>Enterococcus durans</i> E12.33	NP	-

NP: no exhibió proteasas termorresistentes; -: sin halo

**Tabla 4: Evaluación de resistencia térmica de proteasas producidas por las cepas termófilas evaluadas**

<b>Termófilos</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Diámetro de halo de degradación de caseína</b>	<b>Tipo de halo</b>
<i>Bacillus sonorensis</i> C4.13	NP	-
<i>Bacillus licheniformis</i> SDP.15	NP	-
<i>Bacillus licheniformis</i> E9.17	NP	-

NP: no exhibió proteasas termorresistentes; -: sin halo

### 5.3. EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD PROTEOLÍTICA EN LECHE ANTES DE SU ESTERILIZACIÓN

De un total de 15 aislamientos psicrotróficos, se observó que seis de ellos causaron una sinéresis en la leche tras 7 días de incubación a 45°C (Tabla 3), lo cual se evidenció mediante la separación del lactosuero debido a la coagulación de la caseína al término de este tiempo (Figuras. 6 y 7).

Este mismo fenómeno fue evidenciado con las tres cepas termófilas evaluadas correspondientes a *Bacillus sonorensis* C4.13, *B. licheniformis* SDP.15 y *B. licheniformis* E9.17 (Figuras 8, 9 y 10). Interesantemente, no se observó ningún efecto en las muestras de leche inoculadas con cepas mesófilas (Fig. 11). Cabe destacar que se evaluó la esterilidad de la leche inmediatamente después del tratamiento térmico y al finalizar la evaluación visual, por lo que se sugiere que la sinéresis fue causada por la presencia y metabolismo de las bacterias proteolíticas antes de la esterilización.



Figura 6. Coagulación de caseína de la leche tras 7 días de incubación a 45°C por *Pseudomonas lactis* E6.10



Figura 7. Coagulación de caseína de la leche tras 7 días de incubación a 45°C por *Pantoea ananatis* D.22

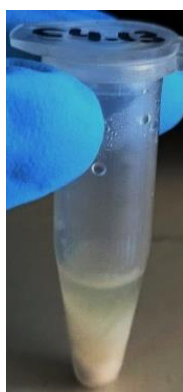


Figura 8. Coagulación de caseína de la leche tras 7 días de incubación a 45°C por *Bacillus sonorensis* C4.13



Figura 9. Coagulación de caseína de la leche tras 7 días de incubación a 45°C por *Bacillus licheniformis* SDP.15



Figura 10. Coagulación de caseína de la leche tras 7 días de incubación a 45°C por *Bacillus licheniformis* E9.17



Figura 11. Coagulación de caseína de la leche tras 7 días de incubación a 45°C por *Enterobacter hormaechei* E5.8

**Tabla 5: Efecto de la inoculación de bacterias psicrotróficas con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización**

Psicrotróficos	
Cepa	Efecto
<i>Pseudomonas lactis</i> E6.10	Coagulación de caseína
<i>Pseudomonas lactis</i> D1.11	NP
<i>Janthinobacterium</i> <i>lividum</i> C5.27	Coagulación de caseína
<i>Pseudomonas grupo fragi</i> C6.28	NP
<i>Pseudomonas brenneri</i> C10.34	NP
<i>Pseudomonas lurida</i> C2.2	Coagulación de caseína
<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E4.7	Coagulación de caseína
<i>Pseudomonas lurida</i> C4.18	Coagulación de caseína
<i>Pantoea conspicua</i> SDT.21	NP
<i>Pseudomonas brenneri</i> C7.29	NP
<i>Pantoea ananatis</i> D.22	Coagulación de caseína
<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E11.31	NP

Efecto observado luego de 7 días de incubación a 45 °C, tras la inoculación de leche descremada con las cepas bacterianas evaluadas y posterior esterilización a 130 °C.

NP: sin efecto en la leche

**Tabla 6: Efecto de la inoculación de bacterias mesofílicas con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización**

<b>Mesofílicas</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Efecto</b>
<i>Pseudomonas azotoformans</i> C8.30	NP
<i>Staphylococcus pasteurii</i> RE1.9	NP
<i>Raoultella terrigena</i> E7.12	NP
<i>Enterococcus durans</i> E10.19	NP
<i>Enterobacter hormaechei</i> E5.8	NP
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> P2.20	NP
<i>Staphylococcus epidermidis</i> E3.6	NP
<i>Lactococcus lactis</i> D.24	NP
<i>Enterococcus durans</i> E12.33	NP

NP: sin efecto en la leche

**Tabla 7: Efecto de la inoculación de bacterias termófilas con capacidad proteolítica en leche antes de su esterilización**

<b>Termófilas</b>	
<b>Cepa</b>	<b>Efecto</b>
<i>Bacillus sonorensis</i> C4.13	Coagulación de caseína
<i>Bacillus licheniformis</i> SDP.15	Coagulación de caseína
<i>Bacillus licheniformis</i> E9.17	Coagulación de caseína

Efecto observado luego de 7 días de incubación a 45 °C, tras la inoculación de leche descremada con las cepas bacterianas evaluadas y posterior esterilización a 130 °C.



## 6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La capacidad proteolítica de las cepas analizadas fue evidenciada mediante la formación de halos de digestión de caseína alrededor de los inóculos. Con respecto a los aislamientos psicrotrofos, se pudo evidenciar que gran parte de estos presentaron una notable actividad proteolítica a partir de las 24 horas de incubación, principalmente en el caso de las especies pertenecientes al género *Pseudomonas*. El predominio de estas cepas sobre los demás psicrotrofos proteolíticos podría relacionarse, en gran medida, a su alta habilidad de adaptar su metabolismo a temperaturas de refrigeración y su capacidad de multiplicación en tiempos de generación menores cuando están sometidos a esta temperatura (Belchior y Pucci, 2004). Esto concuerda con los hallazgos de distintas investigaciones como las de Costa et al. (2001) y Meng et al. (2017) quienes exponen que las bacterias psicrotrofas, incluyendo cepas de *Pseudomonas* spp. sintetizan mayores cantidades de proteasas a temperaturas bajas, con el objetivo de compensar la disminución de la actividad enzimática de su metabolismo, el cual les permite el crecimiento y el mantenimiento de sus funciones celulares. Asimismo, en este estudio se comprobó que la actividad proteolítica es propia de cada cepa y que existen notables variaciones dentro de este género, puesto que de cinco cepas del grupo *fragi* de *Pseudomonas*, dos no presentaron dicha capacidad. Este fenómeno podría asociarse con el hecho de que tal grupo taxonómico está compuesto por diferentes especies como *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. taetrolens* y *P. psychropila* (Garrido-Sanz et al., 2016). De igual manera, en un estudio desarrollado por Ribeiro et al. (2018), se mostró que existe una gran diversidad con respecto a la actividad proteolítica de los aislamientos confirmados como *Pseudomonas* sp., puesto que algunas de ellas pueden exhibir mayor o menor proteólisis en la leche bovina a distintas temperaturas dependiendo de su potencial de producción de metaloproteasas (Ribeiro et al., 2018). Estas son las principales proteasas producidas por este género (Ertan, 2015) y juegan un papel importante en el proceso de deterioro de los alimentos, principalmente en la leche, ya que pueden mantener su actividad a niveles de pH entre 5 y 10 (Matéos et al., 2005). La producción de metaloproteasas alcalinas está determinada por la expresión del gen *aprX*, que está disperso entre numerosas especies de *Pseudomonas* y, por lo tanto, junto a otros factores, puede asociarse con el potencial proteolítico de cada cepa. En ese contexto, varios estudios como el de Caldera et al., (2016) observaron que la bacteria psicrotrofica identificada como *Pseudomonas taetrolens* portadora del gen *aprX* codificante de metaloproteasas puede exhibir capacidad proteolítica a 35°C, pero no cuando es incubada a 7°C. Además, cabe destacar que la presencia de este gen no siempre implica su expresión

y, por ende, la exhibición de actividad proteolítica. Estudios realizados por Dufour et al. en 2018 y Marchand et al. en 2009 comprobaron que la ausencia o presencia de actividad proteolítica no se debe a diferencias en la secuencia del gen, sino a la regulación o expresión diferencial del mismo.

Considerando los resultados presentados, con base en la evaluación de la actividad proteolítica de las cepas, podemos decir que la mayoría de los aislamientos psicrotróficos no representarían un mayor problema a lo largo de la cadena de producción, debido a que, al ser aislados de leche cruda, su viabilidad puede ser inactivada cuando esta matriz sea sometida al tratamiento UHT, que es el principal punto crítico de control para garantizar la inocuidad del producto final (Organización Panamericana de la Salud, 2019). Sin embargo, a diferencia de las cepas correspondientes a *Pantoea conspicua* SDT.21, *Pseudomonas lactis* D1.11 y *Pantoea ananatis* D.22, que fueron aisladas del producto terminado, representan un riesgo significativo, en relación a la estabilidad del alimento. Estas cepas, además de poder contribuir a la pérdida de nutrientes de la leche debido a los cambios en las características organolépticas durante su almacenamiento a bajas temperaturas, pueden representar un riesgo para la salud del consumidor, dado que ocasionalmente podrían causar enfermedades transmitidas por alimentos o producir metabolitos indeseables como aminas biogénicas (Aguilera et al., 2014).

Por otro lado, de acuerdo con Roque (2021), tanto las bacterias mesófilas como las termófilas poseen la capacidad de secretar proteasas extracelulares en el medio circundante, tal como la proteasa extracelular menor (Epr), producida por ciertas bacterias como *Bacillus licheniformis*, caracterizada por su capacidad de degradar tanto la kappa-caseína como la beta-caseína. La actividad proteolítica de esta enzima se evidencia mediante halos de digestión con diámetros considerablemente mayores a comparación de otras especies bacterianas (Ageitos, 2011), lo que coincide con los resultados obtenidos en este primer ensayo. Por el contrario, algunas especies mesófilas como las del género *Lactococcus* producen proteasas neutrales B (nprB), que también son capaces de degradar esta proteína, aunque la actividad proteolítica puede variar según la especie, las condiciones específicas de cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, entre otros (Nogueira et al., 2018). De igual manera, con base en los resultados obtenidos (Tabla 1), podemos inferir que las cepas *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans* P2.20 y *Bacillus licheniformis* SDP.15, aisladas del producto terminado también comprometen la inocuidad del alimento. Sin embargo, su

impacto en la calidad de la leche podría diferir en función de factores específicos, tales como la cantidad de bacterias presentes y el nivel de actividad enzimática.

En cuanto a la termorresistencia, únicamente *Pseudomonas lactis* E6.10 aislada de leche pasteurizada, mantuvo su actividad proteolítica tras el tratamiento térmico a 92°C, en comparación con las otras veinte y tres cepas incluidas en este ensayo. Esta diferencia podría atribuirse a una posible disimilitud relacionada con la estructura tridimensional de las enzimas, ya que, por lo general, las proteasas termorresistentes poseen una mayor cantidad de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, una menor cantidad de aminoácidos polares y sobre todo una mayor cantidad de enlaces covalentes cruzados a comparación de otras proteasas (Gutiérrez y Guerrero, 2019). Además, se sabe que las proteasas termoestables tienen más puentes disulfuro y una mayor proporción de estructuras secundarias helicoidales, lo que le permite mantener una menor flexibilidad estructural que contribuye a su estabilidad térmica, puesto que reduce significativamente la capacidad de la enzima para desplegarse o desnaturalizarse cuando se somete a temperaturas de 90°C o más (Gutiérrez y Guerrero, 2019). Por otra parte, es preciso mencionar que, algunas proteasas termorresistentes del género *Pseudomonas* si pueden desnaturalizarse a temperaturas utilizadas en el proceso UHT (Calvo, 2018), por lo que en futuras investigaciones se podría evaluar la termoestabilidad de esta proteasa a 145°C con el fin de determinar su posible impacto en el producto terminado.

Por otro lado, con respecto a los cambios observados en las muestras de leche tras su inoculación con cada una de las veinticuatro cepas proteolíticas, se pudo evidenciar que la capacidad de coagulación depende de cada especie, de la tasa de acidificación de la leche, y del tiempo de incubación tal como señalan Delgado et al. (2005). Por esta razón, algunas de las cepas evaluadas no lograron dicho efecto en la leche durante los primeros siete días a comparación de las nueve cepas que sí lo hicieron, debido a que muy probablemente estas no acidificaron la leche hasta provocar la desnaturalización de caseína, ya que, según un estudio de Revilla en 1996, las especies bacterianas deben disminuir el pH de la leche a 4,6 para provocar la coagulación. Cuando se alcanza ese nivel de acidez, la caseína se encuentra en un estado isoeléctrico, lo que significa que la proteína tiene una carga neta igual a cero, y se agrupa en estructuras menos solubles, conocidas como micelas, que al ser hidrolizadas precipitan (Hernández et al., 2012). Es importante tener en cuenta que no hay estudios concluyentes que demuestren que las proteasas bacterianas causen directamente la sinéresis en la leche (Márquez et al., 2007 y Sudheer et al., 2007). Sin embargo, debido a su capacidad

para hidrolizar las proteínas, pueden afectar la estructura de estas, haciéndolas más porosas y permitiendo que el suero se filtre más fácilmente, lo que influye en el grado de sinéresis (Sánchez et al., 2008).

Así, por primera vez en el Ecuador se estudió el potencial deteriorador de bacterias aisladas de la cadena de producción de leche UHT. En este contexto, es de suma importancia la comprensión de la diversidad proteolítica bacteriana para desarrollar estrategias de control de calidad que aseguren la inocuidad de los alimentos en el país, así como para la optimización de procesos enzimáticos en el ámbito biotecnológico.

## 7. CONCLUSIONES

1. Veinticuatro cepas mostraron capacidad proteolítica mediante la formación de halos de digestión de caseína alrededor de los inóculos. Las cepas termofílicas exhibieron halos con los mayores diámetros, sin embargo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las cepas de los tres grupos bacterianos analizados.
2. La expresión de la actividad proteolítica es variable entre las distintas cepas bacterianas. Esto sugiere que existen factores genéticos y de regulación que influyen en la capacidad de producción de proteasas en cada cepa.
3. Aunque no hay evidencia concluyente que demuestre que las proteasas bacterianas influyan directamente en la coagulación de caseína, su capacidad de hidrolizar proteínas puede influir en la estructura de las micelas, y consecuentemente afectar la capacidad de retención de agua y causar sinéresis en la leche.
4. La diversidad en la actividad proteolítica puede tener implicaciones en la calidad y seguridad de los alimentos, debido a que las proteasas bacterianas pueden contribuir al deterioro de los productos alimenticios al degradar las proteínas presentes y así, afectar su sabor, textura y valor nutricional.
5. Aunque la mayoría de cepas proteolíticas evaluadas no produjeron proteasas termorresistentes, se observaron cambios en las muestras de leche inoculadas con cada una de ellas después de la esterilización, lo que indica la necesidad de llevar a cabo investigaciones posteriores que permitan fundamentar este fenómeno.
6. Siendo este el primer estudio referente al potencial deteriorador de bacterias aisladas de la cadena de producción de leche UHT en el Ecuador, los resultados alcanzados en esta investigación constituyen un componente que debe considerarse para el desarrollo de estrategias que contribuyan a la optimización de los tratamientos térmicos, de envasado y almacenamiento industrial, con el fin de asegurar la inocuidad, estabilidad física y las características organolépticas de la leche.
7. Comprender la diversidad y las características de las proteasas bacterianas es importante tanto para la industria alimentaria como para la investigación científica. Puede proporcionar información relevante para el desarrollo de estrategias de control de calidad de alimentos, así como para el diseño y optimización de procesos enzimáticos y biotecnológicos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, R., Carrillo, B y Riquelme, G. (2018). Efecto de los tratamientos térmicos y parámetros que pueden indicar origen de la leche. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile.
- Aguilera, A., Urbano, E y Jaimes, C. (2014). Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83-93.
- Aguirre Aguirre, M. (2016). *DETERMINACIÓN DEL PERFIL MICROBIOLÓGICO DE LA LECHE PASTEURIZADA A TRAVÉS DE SU LÍNEA DE PRODUCCIÓN EN LA PLANTA PROCESADORA COLANTA-PLANETA RICA*.
- Belchior, E y Pucci, O. (2004). Caracterización de bacterias con actividad proteolítica. Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada. Universidad Nacional de la Patagonia. San Juan Bosco. Chubut, Argentina.
- Calvo, M. (2017). Caseínas y su estructura. Bioquímica de los alimentos. Laboratorio de Productos Lácteos.
- Costa M., Gómez M., Molina I y Romero A. (2001). Cinética de crecimiento y producción de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda en refrigeración. Instituto de ciencia y tecnología de alimentos, ICYTAL. Universidad Austral de Chile. ALAN, 51(1), 371-375
- Christiansen, P., Nielsen, W., Vogensen, K., Brogren, H., y Ardö, Y. (2006). Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International dairy journal*, 16(10), 1196-1204
- Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2014). Characterization of Gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*, 79(10), M2081–M2090. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12645>
- Dufour, D., Nicodème, M., Perrin, C., Driou, A., Brusseau, E., Humbert, G y Dary, A. (2008). Molecular typing of industrial strains of *Pseudomonas* spp. isolated from milk and genetical and biochemical characterization of an extracellular protease produced by one of them. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 188-196.
- Ertan H., Cassel C., Verma A., Poljak A., Charlton T., Aldrich-Wright J., Omar S., Siddiqui A y Cavicchioli, R. (2015). A new broad specificity alkaline metalloprotease from a *Pseudomonas* sp. Isolated from refrigerated milk: role of calcium in improving enzyme productivity. *J. Mol. Catalysis B, Enzymatic* 113:1-8. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.010>>  
» <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.12.010>
- Eugenia, M., Gómez, C., Marcela González Co-Tutor, M y Reginensi, S. (2018). Identificación de microorganismos termodúricos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro, y evaluación de su actividad en biofilms.

- Fuentes, G., Ruiz, R., Sánchez, J., Ávila, D. y Escutia, J. (2013). Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura Sociedad y Desarrollo*. 10: 419-432.
- Guerrero, L., Román, S., & Pacheco, L. (2003). *PROTEÓLISIS DE LA LECHE CRUDA ALMACENADA EN FRÍO. EFECTO DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS SOBRE LA INTEGRIDAD DE LAS CASEÍNAS* *Proteolysis During Cold Storage of Refrigerated Raw Milk. Effect of Proteolytic Enzymes on Casein Integrity: Vol. XIII*.
- Guevara, L., Cuartas, D y Naranjo, F. (2014). Kappa caseína de la leche: aspectos bioquímicos, moleculares, productivos y nutricionales. *Revista Médica de Risaralda*. 20(1), 7-10
- Gutiérrez, S y Guerrero, R. (2019). Caracterización de proteasas termorresistentes. *Latin American Journal of Pharmacy*, 38(10), 1969-1976.
- Hernández, J., García, F., Cruz, V., Santillán, Y y Marzo, M. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Multidisciplinary Scientific Journal*. 22(1), 11-18.
- Matéos A., Guyard-Nicodème M., Baglinière F., Jardin J., Gaucheron F., Dary A., Humbert G. & Gaillard J.L. 2015. Proteolysis of milk proteins by AprX, an extracellular protease identified in *Pseudomonas* LBSA1 isolated from bulk raw milk, and implications for the stability of UHT milk. *Int. Dairy J.* 49:78-88. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>> » <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.008>
- Marchand, S., Vandriesche, G., Coorevits, A., Coudijzer K., De Jonghe, V y Dewettinck. K. (2009). Heterogeneidad de proteasas resistentes al calor de especies de *Pseudomonas* de leche. *En t. J. Food Microbiol*, 133, 68–77.
- Márquez, C., Piramanrique, K., Carrascal, A., Clavijo, B y Quevedo, B. (2007). Determinación cuantitativa de proteasas de bacterias psicrófilas aisladas de leche cruda. Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.
- Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J y Zheng, N. (2017). Characterization of *Pseudomonas* spp. and Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures. *Frontiers in Microbiology*
- Morandi, S., Pica, V., Masotti, F., Cattaneo, S., Brasca, M., de Noni, I., & Silvetti, T. (2021). Proteolytic traits of psychrotrophic bacteria potentially causative of sterilized milk instability: Genotypic, phenotypic and peptidomic insight. *Foods*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/foods10050934>
- Nogueira, T., Sousa, S. F., & Empadinhas, N. (2018). Bacterial proteases and their role in virulence and survival. In *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control* (pp. 131-160). Springer, Cham. DOI: 10.1007/82\_2017\_20

- Novoa, C y Restrepo, L. (2007). INFLUENCIA DE LAS BACTERIAS PSICRÓTROFAS EN LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE LA LECHE. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 54(1), 9-16. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá Bogotá, Colombia
- Parra, R. (2010). BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL NOS ALIMENTOS. *Biocología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Park, Y., Juárez, M., Ramos, M y Haenlein, G. (2007). Características fisicoquímicas de la leche. *American Journal of Pharmacy*, (68), 88-113.
- Revilla, A. (1996). *Tecnología de la leche*. Bib. Orton IICA/CATIE.
- Ribeiro, J., Tamanini, R., Soares, B., Oliveira, A., Silva, F., Silva, F., Augusto, N y Beloti, V. (2018). Efficiency of boiling and four other methods for genomic DNA extraction of deteriorating spore-forming bacteria from milk. *Semina, Ciênc. Agrárias* 37:3069-3078.
- Sánchez, D., Torres, M., Gutiérrez, N., Rojas, R., Ramírez, C y Ramírez, E. (2008). Bacterial biodiversity in artisanal cheeses from Jalisco, Mexico. *Int J Food Microbiol*. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.024.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). Bacillus spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1139-1148.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., Von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S y Fischer, L. Crecimiento de *Pseudomonas Weihenstephanensis*, *Pseudomonas Proteolytica* y *Pseudomonas sp.* en Leche Cruda: Impacto de la Actividad Enzimática Residual Estable al Calor en la Estabilidad de la Leche UHT durante la Vida Útil en lácteos. 59, 20–28.
- Sudheer, K., Manoharan, N y Gopakumar, K. (2007). Influencia de las proteasas bacterianas en la sinéresis de la leche. *Indian Journal of Dairy Science*, (60) 6, 337-341.
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N., & He, G. (2019). Insights into psychrotrophic bacteria in raw milk: A review. *Journal of Food Protection*, 82(7), 1148–1159. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology*, 109(4), 1117-1131.



## 9. TABLAS

Tabla 1: Aislamientos bacterianos evaluados en el tamizaje de capacidad proteolítica

Grupo	Cepa	Diámetro de halo de degradación de caseína	Tipo de halo	Origen del aislamiento
Psicrotróficos	<i>Pseudomonas brenneri</i> C7.29	1.5 ± 0.1	Transparente	Leche Cruda
	<i>Janthinobacterium lividum</i> C5.27	1.4 ± 0.1	Transparente	Leche Cruda
	<i>Pseudomonas grupo fragi</i> C6.28	1.2 ± 0.1	Transparente	Leche Cruda
	<i>Pseudomonas brenneri</i> C10.34	1.1 ± 0.1	Blanquecino	Leche Cruda
	<i>Pseudomonas lurida</i> C2.2	3.2 ± 0.2	Transparente	Leche Cruda
	<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E4.7	1.4 ± 0.1	Transparente	Leche Entera
	<i>Pseudomonas lurida</i> C4.18	1.6 ± 0.1	Transparente	Leche Cruda
	<i>Pantoea conspicua</i> SDT.21	2.4 ± 0.2	Blanquecino	Producto terminado Leche semidescremada
	<i>Pseudomonas lactis</i> D1.11	1.2 ± 0.2	Blanquecino	Producto terminado Leche Descremada
	<i>Pantoea ananatis</i> D.22	2.3 ± 0.3	Blanquecino	Producto terminado Leche Descremada
	<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E11.31	1.8 ± 0.3	Transparente	Leche Entera
	<i>Pseudomonas grupo fragi</i> C9.32	NP	-	Leche Cruda

	<i>Flavobacterium plurextorum</i> C3.3	NP	-	Leche Cruda
	<i>Pseudomonas grupo fragi</i> E2.5	NP	-	Leche Entera
	<i>Pseudomonas lactis</i> E6.10	1.06 ± 0.1	Transparente	Leche Entera
Mesofílicas	<i>Pseudomonas azotoformans</i> C8.30	2.1 ± 0.1	Transparente	Leche Cruda
	<i>Staphylococcus pasteurii</i> RE1.9	1.6 ± 0.1	Transparente	Leche Entera
	<i>Raoultella terrigena</i> E7.12	2.1 ± 0.2	Transparente	Leche Entera
	<i>Enterococcus durans</i> E10.19	1.7 ± 0.2	Blanquecino	Leche Entera
	<i>Enterobacter hormaechei</i> E5.8	2.3 ± 0.3	Transparente	Leche Entera
	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> P2.20	1.1 ± 0.1	Blanquecino	Leche Pasteurizada
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> E3.6	2.9 ± 0.2	Transparente	Leche Entera
	<i>Lactococcus lactis</i> D.24	1.4 ± 0.1	Blanquecino	Leche Descremada
	<i>Enterococcus durans</i> E12.33	1.2 ± 0.1	Transparente	Leche Entera
	<i>Pantoea deleyi</i> C11.35	NP	-	Leche Cruda
	<i>Pantoea conspicua</i> P.26	NP	-	Leche Pasteurizada
	<i>Pantoea conspicua</i> D.23	NP	-	Producto terminado Leche Descremada

	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> C1.1	NP	-	Leche Cruda
	<i>Enterobacter hormaechei</i> E8.16	NP	-	Leche Entera
<b>Termofílicas</b>	<i>Bacillus sonorensis</i> C4.13	2.8 ± 0.3	Blanquecino	Leche Cruda
	<i>Bacillus licheniformis</i> SDP.15	3.3 ± 0.3	Blanquecino	Leche Pasteurizada
	<i>Bacillus licheniformis</i> E9.17	3.1 ± 0.1	Blanquecino	Leche Entera
	<i>Enterococcus durans</i> E1.4	NP	-	Leche Entera
<p>Valores numéricos en la columna de diámetro de halos de digestión de caseína corresponden al promedio del diámetro de halos de digestión de caseína de tres réplicas ± desviación estándar</p> <p>Valores alfanuméricos que suceden a los nombres científicos corresponden a la codificación interna del laboratorio para cada cepa</p> <p>NP: no exhibió capacidad proteolítica</p> <p>-: sin formación de halo</p>				



---

**Firma de la estudiante**

Erika Alexandra Molina Morales  
Quito, 16 de junio de 2023



---

**Firma del director de disertación**

PhD. Martín Marcial Coba  
Quito, 16 de junio de 2023

---

**Firma de la coordinadora de carrera**

Mgtr. Sonia Margarita Estrella Vásquez  
Quito, 16 de junio de 2023