

UNIVERSIDAD NACIONAL DE FRONTERA

Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias y Biotecnología

Escuela Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias



**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**“Aislamiento, caracterización e identificación molecular de
bacterias lácticas de interés industrial provenientes del
queso tipo suizo”**

Autor: Bch. Jaime Valdiviezo Marcelo

Asesor: Dr. Luis Alfredo Espinoza Espinoza

Coasesor: M.Sc. Edwin Jorge Vega Portalatino

Registro: PY-EPIIA-048

SULLANA - PERÚ

2022

Dedicatoria

Esta investigación va dedicada a:

Dios todo poderoso

Por su misericordia infinita, por el cuidado, la paciencia y el amor que nos demuestra a diario. “*Y todo lo que hagáis, hacedlo de corazón, como para el Señor y no para los hombres; sabiendo que del Señor recibiréis la recompensa de la herencia, porque a Cristo el Señor servís*”. Colosenses 3:23-24

Mis padres

Jaime Valdiviezo Correa y mi madre Lilia del Socorro Marcelo Becerra, quienes me brindaron su amor, valores, principios. El haber culminado la presente investigación es sinónimo de la retribución a la confianza que depositaron en mí.

Familiares

Mis hermanas Violeta, Claudia, Diana y Beni; a mis hermanos Luciano, Leonardo, Bruno y Franco; y a mis sobrinos Mateo, Flavia y Dorian; porque son parte de mis motivaciones para seguir adelante.

Agradecimiento

Expresar mis más sinceros agradecimientos:

A mi Dios y Padre Eterno por el amor, la salud y el bienestar que siempre me ha brindado.

Al Dr. Luis Alfredo Espinoza Espinoza y al M.Sc. Edwin Jorge Vega Portalatino, excelentes profesionales investigadores quienes contribuyeron con sus conocimientos durante el inicio, desarrollo y el cierre de la presente investigación.

A la Dra. Carmen Del Rosario Tamariz Angeles, profesional especialista en el área de biología molecular por el apoyo brindado en la etapa final de la presente investigación.

Al Dr. Heber Peleg Cornelio Santiago por ser una de las personas que me motivó a seguir en el camino de la investigación.

A la Ing. Nancy Maribel Arana Torres por el apoyo brindado durante la ejecución de la presente investigación.

Al Ing. Luis Alberto Ruiz Flores, Henry Daniel Muñoz More y Juliana Maricielo Nole Jaramillo amigos del Laboratorio de Alimentos Funcionales y Bioprocesos por el apoyo y ánimo brindado.

Asimismo, expresarle mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Frontera que mediante el “II Concurso para el Financiamiento de Investigaciones Conducentes al Grado Académico de Bachiller o Título Profesional de la Universidad Nacional de Frontera” con Convenio N° 007-2021-UNF, permitió que la presente investigación fuera posible.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE FRONTERA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

La Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias y Biotecnología de la Universidad Nacional de Frontera, hace constar por la presente, que el Trabajo de Investigación titulado: "Aislamiento, caracterización e identificación molecular de bacterias lácticas de interés industrial provenientes del queso tipo suizo"

cuyo(s) autor(es) es : JAIME VALDIVIEZO MARCELO

con asesor el (la) docente : Dr. LUIS ALFREDO ESPINOZA ESPINOSA

Cumple con los requisitos exigidos por el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional de Frontera.

Habiendo sido sometido a mecanismos de control antiplagio mediante el Software Turnitin, presentando un grado de similitud del 10%.

Se emite la presente, para los fines correspondientes.

Sullana, 29 de noviembre de 2022

Dr. Luis Ángel Paucar Flores
Coordinador (e) FIIAB
Universidad Nacional de Frontera

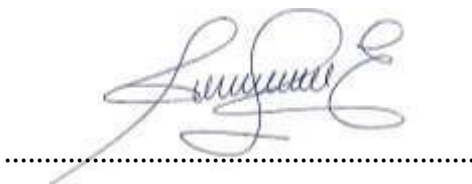
REG. N°046-2022-CO-FIIAB

Visto bueno del asesor de la tesis

Los docentes de la Universidad Nacional de Frontera, Dr. LUIS ALFREDO ESPINOZA ESPINOZA y M.Sc. EDWIN JORGE VEGA PORTALATINO asesor y coasesor designados según resolución N° 213-2021-UNF-VPAC/FIIA, hacemos constar que se ha asesorado la tesis titulada **“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS LÁCTICAS DE INTERÉS INDUSTRIAL PROVENIENTES DEL QUESO TIPO SUIZO”**, del bachiller **JAIME VALDIVIEZO MARCELO** de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias y Biotecnología, Escuela profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias.

Los suscritos dan el visto bueno del mencionado informe de investigación dándole pase para que sea sometido a las siguientes etapas correspondientes para la obtención de la constancia de aprobación del informe de investigación por parte de las autoridades correspondientes de la Facultad de Ingeniería de Industrias Alimentarias y Biotecnología.

Sullana, 11 de noviembre de 2022.



Dr. Luis Alfredo Espinoza Espinoza

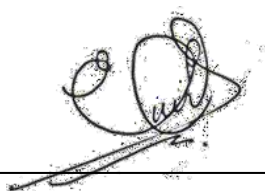
Asesor



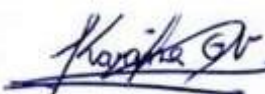
M.Sc. Edwin Jorge Vega Portalatino

Coasesor

Jurado evaluador



MSc. Milagros Del Pilar Espinoza Delgado
Presidente



MSc. Karina Silvana Gutiérrez Valverde
Secretario



Dr. Luis Alfredo Espinoza Espinoza
Vocal



UNIVERSIDAD NACIONAL DE FRONTERA

vii

Acta de Evaluación de Sustentación del Informe de Tesis

Siendo las 14:30 horas del día jueves 24 de noviembre del año 2022 se reunieron en la sala virtual <https://meet.google.com/sax-hsgw-ckm> de la Universidad Nacional de Frontera, los miembros del Jurado de Tesis para evaluar el Informe de Tesis, denominado: "Aislamiento, caracterización e identificación molecular de bacterias lácticas de interés industrial provenientes del queso tipo suizo".

Siendo sustentado en sesión pública por el autor: Br. Jaime Valdiviezo Marcelo, como requisito para obtener el Título Profesional de Ingeniero en Industrias Alimentarias.

Terminada la sustentación, se procedió a la defensa del Informe de Tesis, etapa en que los miembros del Jurado de Tesis formularon sus inquietudes y preguntas de manera individual, las que fueron respondidas por el sustentante.

Seguidamente, el Jurado se retiró a otra sala virtual para evaluar la sustentación; el Jurado de Tesis determinó la calificación concedida a la sustentación del Informe de Tesis para la Obtención de Título Profesional, en términos de:

Aprobado (a) con el calificativo de **Excelente- diecinueve (19)**, levantándose la sesión a las 15:30 horas del mismo día. Se concluye el acto de sustentación, suscribiendo el acta.

Presidente

Mg. Milagros del Pilar Espinoza Delgado

Secretario

Dra. Karina Silvana Gutiérrez Valverde

Vocal

Dr. Luis Alfredo Espinoza Espinoza

No.	DESCRIPCIÓN	RECOMENDAR	
		SI	NO
1.	Recomendar para presentar en eventos	X	
2.	Recomendar para publicación	X	
3.	Recomendar para patente	X	
4.	Recomendar para Meritorio	X	
5.	Recomendar para Laureado	X	

Código: PY-EPIIA-048

Índice

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Constancia de originalidad.....	iv
Visto bueno del asesor de la tesis	v
Jurado evaluador	vi
Acta de Evaluación de Sustentación del Informe de Tesis	vii
Índice.....	viii
Índice de tablas	x
Índice de figuras.....	xi
Resumen.....	xii
Abstract	xiii
I. INTRODUCCIÓN	14
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1. Materia prima, materiales, equipos y reactivos.....	18
2.1.1. Materia prima.....	18
2.1.2. Materiales.....	18
2.1.3. Equipos	20
2.1.4. Reactivos e Insumos	20
2.2. Metodología	22
2.2.1. Obtención de la materia prima.....	22
2.2.2. Preparación de la muestra y aislamiento de bacterias lácticas.....	22
2.2.3. Purificación de bacterias lácticas	23
2.2.4. Identificación fenotípica de las bacterias aisladas	23
2.2.4.1. Prueba de coloración Gram	23
2.2.4.2. Prueba de catalasa	24
2.2.5. Preparación de inóculo y ajuste de la densidad óptica (DO)	25
2.2.6. Caracterización tecnológica de las bacterias lácticas aisladas	26
2.2.6.1. Actividad acidificante	26
2.2.6.2. Actividad proteolítica.....	27
2.2.6.3. Producción de diacetilo	28
2.2.6.4. Susceptibilidad a los antibióticos	29
2.2.7. Identificación molecular de las bacterias lácticas aisladas	29

III. RESULTADOS	31
3.1. Aislamiento e identificación fenotípica de bacterias aisladas del queso tipo suizo	31
3.2. Caracterización tecnológica de las bacterias lácticas aisladas	32
3.2.1. Actividad acidificante	32
3.2.2. Actividad proteolítica y producción de diacetilo	34
3.2.3. Susceptibilidad a los antibióticos.....	35
3.3. Identificación molecular de las bacterias aisladas.....	37
IV. DISCUSIÓN	38
V. CONCLUSIONES.....	48
VI. RECOMENDACIONES.....	49
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
VIII. ANEXOS.....	61

Índice de tablas

Tabla 1 Caracterización fenotípica de las bacterias aisladas.	31
Tabla 2 Variación de la acidez de los aislados a las 6,12 y 24 horas de incubación	32
Tabla 3 Variación del pH de los aislados a las 6,12 y 24 horas de incubación.....	33
Tabla 4 Actividad proteolítica y producción de diacetilo de las bacterias aisladas	34
Tabla 5 Prueba de susceptibilidad a los antibióticos de las bacterias aisladas.....	36

Índice de figuras

Figura 1 Lugar de colecta de las muestras	21
Figura 2 Forma bacilar de los aislados TQ1 y KQ3	31
Figura 3 Variación de la acidez titulable de los aislados con respecto al tiempo de incubación	33
Figura 4 Variación del pH de los aislados con respecto al tiempo de incubación.....	34
Figura 5 Actividad proteolítica del aislado QQ3 en comparación con el control.....	35
Figura 6 Producción de diacetilo del aislado QQ3	35
Figura 7 Susceptibilidad a los antibióticos de los aislados EQ1, BQ2 y CQ1	36
Figura 8 Árbol filogenético de las bacterias lácticas aisladas	37
Figura 9 Queso tipo suizo obtenido de la ciudad de Huaraz, región Ancash	61
Figura 10 Preparación de la muestra.....	61
Figura 11 Aislamiento de bacteria lácticas	62
Figura 12 Crecimiento y selección preliminar de bacterias lácticas.....	63
Figura 13 Primera Purificación de bacterias lácticas.....	63
Figura 14 Purificación final de bacterias aisladas	64
Figura 15 Crecimiento en de bacterias purificadas en tubos con medio agar MRS inclinado	65
Figura 16 Prueba de tinción Gram	66
Figura 17 Prueba de catalasa	66
Figura 18 Preparación de inóculo y ajuste de la densidad óptica (DO).....	67
Figura 19 Prueba de actividad acidificante.....	68
Figura 20 Prueba de actividad proteolítica	69
Figura 21 Prueba de producción de diacetilo.....	70
Figura 22 Prueba de Susceptibilidad a los antibióticos	71
Figura 23. Análisis bioinformático de las bacterias lácticas aisladas	72
Figura 24 Árbol filogenético de las bacterias lácticas aisladas	73

Resumen

Los quesos artesanales tipo suizos presentan buena aceptabilidad sensorial, la cual está asociada a los microorganismos lácticos que los conforman. En el Perú los estudios sobre la recuperación y caracterización de este tipo de microbiota es casi nulo. El objetivo del estudio fue aislar, caracterizar e identificar molecularmente las bacterias lácticas de interés industrial provenientes del queso tipo suizo artesanal. Para ello se emplearon tres quesos artesanales tipo suizos obtenidos de la ciudad de Huaraz, región Ancash; fueron aisladas un total de 13 bacterias en medio agar MRS. Los aislados se codificaron arbitrariamente y se caracterizaron de manera preliminar mediante pruebas de catalasa y tinción Gram, para su confirmación como aislados lácticos. Posteriormente se caracterizaron en términos de capacidad acidificante, actividad proteolítica, producción de diacetilo y susceptibilidad a los antibióticos. Los resultados evidenciaron que solo 11 aislados eran catalasa negativa y Gram positivas, además los aislados con códigos QQ3, KQ3, EQ1, CQ1 y TQ1 mostraron alta capacidad acidificante y proteolítica, los aislados QQ3 y TQ1 fueron los únicos que mostraron producción de diacetilo, y en cuanto a la susceptibilidad a los antibióticos fue variable entre cepas. La identificación molecular mediante el secuenciamiento del gen ADN_r 16S reveló que 07 aislados pertenecen al grupo de *Lacticaseibacillus paracasei* subs. *tolerans*, 03 aislados a *Lentilactobacillus parabuchneri* y 01 aislado a *Lentilactobacillus* sp. En conclusión, los aislados *Lentilactobacillus* sp. QQ3 y *Lacticaseibacillus paracasei* subs. *tolerans* KQ3, EQ1, CQ1 y TQ1, muestran el potencial prometedor para ser empleados en la industria alimentaria.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, BAL, cultivos no iniciadores, resistencia a los antibióticos, compuestos aromáticos, proteólisis y PCR.

Abstract

Swiss-type artisanal cheeses have good sensory acceptability, which is associated with the lactic microorganisms that make them up. In Peru, studies on the recovery and characterization of this type of microbiota are almost nonexistent. The objective of the study was to isolate, characterize and molecularly identify lactic acid bacteria of industrial interest from artisanal Swiss type cheese. For this purpose, three artisanal Swiss type cheeses obtained from the city of Huaraz, Ancash region, were used; a total of 13 bacteria were isolated on MRS agar medium. The isolates were arbitrarily coded and preliminarily characterized by catalase and Gram staining tests for their confirmation as lactic isolates. They were then characterized in terms of acidifying ability, proteolytic activity, diacetyl production and antibiotic susceptibility. The results showed that only 11 isolates were catalase negative and Gram positive, in addition, isolates with QQ3, KQ3, EQ1, CQ1 and TQ1 codes showed high acidifying and proteolytic capacity, isolates QQ3 and TQ1 were the only ones that showed diacetyl production, and antibiotic susceptibility was variable among strains. Molecular identification by 16S rDNA gene sequencing revealed that 07 isolates belonged to the *Lacticaseibacillus paracasei* subs. *tolerans* group, 03 isolates to *Lentilactobacillus parabuchneri* and 01 isolate to *Lentilactobacillus* sp. In conclusion, the isolates *Lentilactobacillus* sp. QQ3 and *Lacticaseibacillus paracasei* subs. *tolerans* KQ3, EQ1, CQ1 and TQ1, show promising potential to be employed in the food industry.

Key words: Lactic acid bacteria, LAB, non-starter cultures, antibiotic resistance, aromatic compounds, proteolysis and PCR.