



Evaluación tecnológica de bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda de vaca como cultivos iniciadores

Hernández, Dioselauren; García, Efraín; Tovar, Belkis y Peralta, Darlene

Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). Venezuela

<http://orcid.org/0000-0002-4301-2576> dioselaurenhernandez@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0003-2973-7949> efrainagarcia6418@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0002-8407-2313> belkismonsa@gmail.com

<http://orcid.org/0000-0001-6700-192X> darleneperalta11@gmail.com

ASA/Artículo

doi: <http://doi.org/10.5281/zenodo.12788075>

Recibido: 04-10-2023

Aceptado: 22-06-2024

RESUMEN

Las bacterias ácido-lácticas durante años han constituido un grupo heterogéneo de bacterias. Son microorganismos empleados en la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados. El objetivo de este trabajo fue evaluar tecnológicamente dos cepas de bacterias ácidos lácticas aisladas de leche cruda de vaca. La investigación se dividió en 3 fases 1) aislamiento y selección, 2) evaluación de las características fenotípicas de las bacterias lácticas seleccionadas y 3) evaluación tecnológica de las cepas como cultivos iniciadores a nivel de laboratorio. La metodología utilizada consistió en la aplicación de métodos, técnicas y normas bajo las cuales se aislaron, caracterizaron y evaluaron las cepas aisladas obteniendo como resultado la formulación de 3 cultivos iniciadores (cepa LSF, cepa LMM y la combinación de ambas LSF-LMM). En cuanto a los resultados obtenidos se observó que para la variable de ácido láctico (g/l) evaluada, ambas cepas y su combinación presentaron el mismo comportamiento, es decir que pueden ser utilizadas para sustituir la cepa comercial que generalmente se utiliza para la elaboración de yogur, aun cuando tienen una baja producción de ácido láctico. En cuanto al pH la combinación de las cepas LSF – LMM, logro una disminución del pH de 6,05 a 4,29 a las 24 horas. Esto lleva a confirmar que de las cepas aisladas utilizadas como cultivos iniciadores por lo menos una fue diferente en cuanto a las características de las dos formulaciones desarrolladas.

Palabras clave: Bacterias ácido láctica, aislamiento, caracterización, cultivo iniciador.



Technological evaluation of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk as starter cultures

ABSTRACT

Lactic acid bacteria have for years constituted a heterogeneous group of bacteria. They are microorganisms used in the food industry for the production of fermented products. The objective of this work was to technologically evaluate two strains of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk. The research was divided into 3 phases 1) isolation and selection, 2) evaluation of the phenotypic characteristics of the selected lactic acid bacteria and 3) technological evaluation of the strains as starter cultures at the laboratory level. The methodology used consisted of the application of methods, techniques and standards under which the isolated strains were isolated, characterized and evaluated, resulting in the formulation of 3 starter cultures (LSF strain, LMM strain and the combination of both LSF-LMM). Regarding the results obtained, it was observed that for the lactic acid variable (g/l) evaluated, both strains and their combination presented the same behavior, that is, they can be used to replace the commercial strain that is generally used for the production of yogurt, even though they have a low production of lactic acid. Regarding pH, the combination of the LSF – LMM strains achieved a decrease in pH from 6.05 to 4.29 after 24 hours. This leads to confirmation that of the isolated strains used as starter cultures, at least one was different in terms of the characteristics of the two formulations developed.

Keywords: Lactic acid bacteria, isolation, characterization, starter culture.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas tres décadas, se ha prestado mucha atención a la agroindustria de los productos lácteos fermentados dado que contienen bacterias probióticas. “Estas bacterias se han empleado con el fin de reducir los tiempos de fermentación, homogenizar procesos, potenciar sabores, aromas y lograr características sensoriales deseables en los productos finales” (Karimí et al. 2012).

Esto ha llevado, a que las mismas tengan un alto valor económico, puesto que permiten la obtención de diversos productos fermentados, cada uno con características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas únicas, aunado a ello son capaces de inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos (Hernández et al. 2023).

Por consiguiente, desde el punto de vista biotecnológico, constituyen un grupo de microorganismos de gran importancia, debido a que son los componentes fundamentales de muchos de los cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria, participan en la transformación primaria, y en muchos casos en la maduración, de una gran variedad de

alimentos fermentados. En ellos producen cambios estructurales y sensoriales que aumentan el valor añadido de la materia prima. (Lars, 2004)

Es por ello que los cultivos iniciadores generalmente son formulados a partir de varias cepas pertenecientes a una o varias especies de bacterias, puesto que cada una aporta una característica distinta que finalmente se traduce en un cultivo iniciador químicamente estable y de calidad, los cuales juegan un papel importante en el inicio de la fermentación, desarrollando acidez, favoreciendo la coagulación y promoviendo la maduración en el caso de los quesos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar tecnológicamente dos cepas de bacterias ácidos lácticas aisladas de leche cruda de vaca, en la elaboración de un producto a nivel de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODO

Materia Prima

La materia prima utilizada, fue leche cruda de vaca proveniente de dos fincas ubicadas en diferentes municipios del Estado Yaracuy, específicamente en el municipio San Felipe y Manuel Monge. De cada una de las fincas seleccionadas, se recolecto un total de 4 litros de leche cruda de vaca considerando que las

muestras fueran frescas y sin adición de conservantes. La caracterización físico-química y microbiológica de las muestras de leche cruda de vaca, se realizaron siguiendo los métodos de ensayo establecidos por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) y normas internacionales.

Aislamiento de Bacterias Lácticas

Se tomó 10 ml de cada una de las muestras por separado, se agregaron a 90 ml de agua peptonada al 1%, seguidamente se homogenizaron con ayuda de un vortex y se realizaron diluciones seriadas hasta 10^6 . Cada una de las diluciones se sembró por triplicado en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS), utilizando la técnica de siembra en superficie, para lo cual se tomó 100μ y se extendió sobre la placa con la espátula de drigalsky. Seguidamente las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis simulando un ambiente sin oxígeno a 37° por 48 horas. El aislamiento de las bacterias lácticas se realizó aplicando resiembras sucesivas en agar MRS por el método de estrías, hasta lograr un total de 103 cepas.

Selección de bacterias lácticas

La pureza y selección de las bacterias lácticas se realizó a través de la observación macro y microscópica de las colonias, la cual permitió

observar las características morfológicas de las colonias (color, borde, apariencia, superficie y elevación), así como la forma de la bacteria (cocos, micrococos, bastones). De igual forma se realizó la aplicación de pruebas bioquímicas con la finalidad de identificar las características metabólicas de las mismas.

Evaluación de características fenotípicas

La caracterización fenotípica de las bacterias lácticas aisladas y seleccionadas, se realizó evaluando determinadas características de interés para esta investigación. Para ello se determinó: 1.- crecimiento a diferentes temperaturas, 2.- producción de ácido láctico, 3.- tolerancia a diferentes pH y 4.- capacidad acidificante, todos los análisis fueron realizados por triplicado.

1.- Crecimiento a diferentes temperaturas:

Para esta prueba se preparó en una fiola de 250ml, 90 ml de MRS caldo pH 6,5, se agregó 10 ml de inóculo (cepas en estudio) cada una a 10^8 UFC/ml, se incubó a diferentes temperaturas (30°C , 37°C y 45°C), se tomó una muestra a diferentes tiempos, (0, 24, 48 y 72 horas), y se realizó las determinaciones de pH, densidad óptica a 600 nm, conteo en cámara Neubauer.

2.- Producción de ácido láctico: La producción de ácido láctico, se realizó bajo el método de la

NORMA COVENIN 658-1997, para ello, en una fiola de 500 ml se agregó 180 ml de leche pasteurizada, seguidamente se agregó 20 ml de las cepas en estudio por separado y combinadas, previamente crecidas en leche para su adaptación, se incubo a 37°C y se tomó muestra en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 y 48 horas), y se realizó la determinación de ácido láctico.

3.- Tolerancia a diferentes pH: Para la prueba de tolerancia a pH (3 y 5), se inoculo 1 ml de las cepas en estudio por separado en 9 ml de medio MRS por triplicado, se incubaron a 37°C. La determinación de resistencia se midió por densidad óptica a 600 nm, en diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas).

4.- Capacidad acidificante: La evaluación de la capacidad de las cepas de disminuir el pH se realizó en función del tiempo, para ello se inoculo 10 ml de las cepas en estudio por separado y triplicado, en 90 ml de leche pasteurizada, se incubo a 37° C, se tomó muestras en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, determinándose pH en cada uno de los tiempos y determinando a través de pruebas estadísticas las diferencias entre ambas cepas seleccionadas.

Evaluación tecnológica de las cepas como cultivos iniciadores a nivel de laboratorio

La evaluación tecnológica de las cepas como cultivos iniciadores se realizó elaborando un yogurt natural, conjuntamente con un tratamiento testigo, para ello cada cepa y la combinación de ambas, se inoculo en leche pasteurizada, con 12 y 16% de sólidos y la adición de azúcar y se realizó la incubación a 45°C por 24 horas, la evaluación de las variables pH y producción de ácido láctico, se determinó tomando muestras de los tratamientos a las 0, 4 y 24 horas, la determinación del pH se realizó con pHmetro y la acidez se realizó aplicando la NORMA COVENIN 658- 97, el tratamiento adicional consistió en un yogurt elaborado bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, sin embargo el cultivo utilizado fue un yogurt natural comercial.

Evaluación estadística de los cultivos iniciadores formulados

Los datos obtenidos de las pruebas realizadas se analizaron mediante la aplicación de un análisis de varianza, considerando el tiempo como variable respuesta al valor de pH deseado y evaluando así las cepas por separado y la combinación de estas, para ello se aplicó la comparación de medias con el estadístico de prueba Tukey al 5 %, determinando si hay efecto de las cepas separadas y combinadas sobre la leche, así como si son iguales o diferentes al

producto testigo (yogurt) elaborado. Para ello se hizo uso del programa estadístico el Infostat estudiantil 2021.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las muestras de leche cruda de vaca de los municipios San Felipe y Manuel Monge Cuadro 1, se puede observar una marcada diferencia en cuanto a los niveles de proteína, grasa y cenizas, siendo estos más altos en la muestra de leche del municipio Manuel Monge. Aunque de manera general los valores están dentro de lo establecido en la norma COVENIN 906-03. Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos, con algunos investigadores como Vázquez et al. 2018 y Minaya et al. 2015, en cuanto a los valores de grasa, estos se encuentran por debajo a los reportados por los mencionados autores. En relación a los valores de proteína y acidez titulable también se encuentran por debajo de los reportados por Arias et al. 2010, finalmente para los valores de ceniza, se encuentran en los rangos establecidos por González et al. 2010.

Es importante acotar que la composición de la leche cruda de vaca varía de acuerdo con

diferentes factores, como la raza del animal, la alimentación de este, el ambiente donde se desarrolla, entre otros; lo que influye directamente en la composición de esta. Es por ello que los resultados obtenidos de la caracterización realizada presentan variaciones con respecto a los autores tomados como referencia.

Cuadro 1. Caracterización Físico – química de las muestras de leche cruda de vaca recolectadas en los municipios San Felipe y Manuel Monge.

Característica	Composición (% v/v)	
	(LSF) Leche San Felipe	(LMM) Leche Manuel Monge
Proteína (%p/v)	1,78	1,96
Grasa (%p/v)	2,65	3,02
Ceniza (%p/v)	0,68	0,85
Acidez titulable MI NaOH 0,1 N/100 ml-leche	10	12
pH	6,47	6,53

Caracterización microbiológica

Los resultados obtenidos de las muestras de leche utilizadas, se muestra en el Cuadro 2. Se evidencia la carga microbiana para cada muestra, encontrándose ambas sin clasificación, puesto que la carga bacteriana fue elevada. Para efectos de la investigación que se realizó el

resultado de la evaluación microbiológica es aceptable, ya que las muestras se destinaron para el aislamiento y caracterización de posibles bacterias lácticas. Los autores consultados durante este trabajo no realizaron evaluación microbiológica por lo cual no se cuenta con referencias para realizar la comparación de los resultados que se obtuvieron. Sin embargo, se consultó una evaluación de la calidad sanitaria realizada por Luigi et al. 2013, quienes obtuvieron resultados similares a esta investigación, indicando que superan los límites establecidos en la norma, sugiriendo una contaminación durante el proceso de ordeño o traslado de la muestra.

Cuadro 2. *Caracterización Microbiológica de las muestras de leche recolectadas*

Análisis	Unidad de Medida	Resultados	
		(LSF) Leche San Felipe	(LMM) Leche Manuel Monge
Recuento de Colonias de Bacterias Aerobias en placas de Petri (mesófilas)	UFC/ml	4,5 x 10 ⁷	6,0 x 10 ⁷
Clasificación	Categoría	Sin Clasificación	Sin Clasificación
		Más de 5.000.000 UFC/ml	Más de 5.000.000 UFC/ml

Aislamiento de Bacterias Lácticas

Ambas muestras presentaron un gran número de crecimiento, sin embargo la muestra de leche proveniente del municipio Manuel Monge, presento un total de 58 colonias, mientras que la muestra de leche proveniente del municipio San Felipe presento un total de 47 colonias, formando un banco total de cepas de 105 con diferentes características.

Selección de bacterias lácticas

Las cepas seleccionadas presentaron características del género *Lactobacillus* en relación con su morfología (bastones gruesos y delgados), el resultado obtenido de la tinción Gram positivos, catalasa y oxidasa negativo.

Evaluación de características fenotípicas

La caracterización fenotípica se realizó aplicando diferentes pruebas de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

1.- Crecimiento a diferentes temperaturas: En las Figuras 1, 2 y 3, se evidencia que las cepas fueron capaces de crecer a las diferentes temperaturas a las que se sometieron, sin embargo, se observa que la cepa LSF presentó un menor crecimiento con respecto a la cepa LMM, de igual forma se observó que a 37°C, cuando ya había transcurrido 24 horas de crecimiento comenzó la disminución del pH, mientras que el resto de las temperaturas, tienen

un efecto relevante sobre las cepas, retardando su crecimiento.

Este comportamiento fue registrado por Ávila et al. 2010, quienes aislaron bacterias del tracto digestivo de pollos, determinando su capacidad probiótica, y al someter a las cepas a las temperaturas de (15°, 37° y 45°C), evidenciaron que los niveles de temperatura ejercieron efectos significativos ($P < 0,05$) sobre el crecimiento de las cepas de manera específica. De igual forma Sánchez et al. 2014, reportaron que a la temperatura de 45°C las cepas de *Lactobacillus* procedentes de fuente animal y sometidas a diferentes temperaturas (15°, 30°, 37° y 45°C), no presentaron buen crecimiento, a 45°C. Este resultado es indicativo de que ambas cepas son sensibles dicha temperatura y de acuerdo con los resultados estarían en la clasificación de bacterias mesófilas.

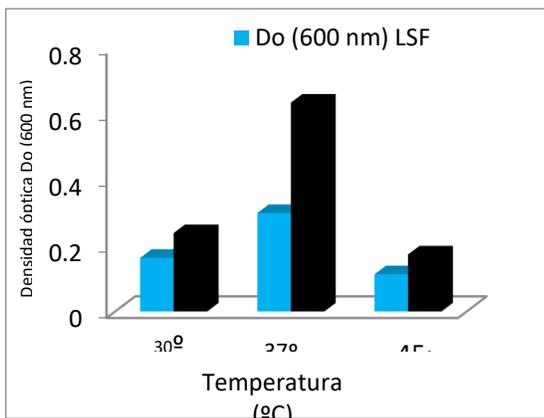


Figura 1. Comparación del crecimiento de las cepas LSF y LMM a 30°C.

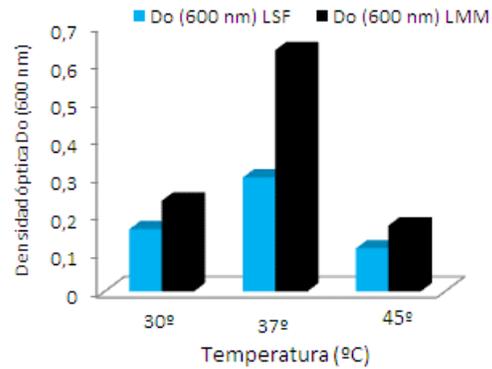


Figura 2. Comparación del crecimiento de las cepas LSF y LMM a 37°C.

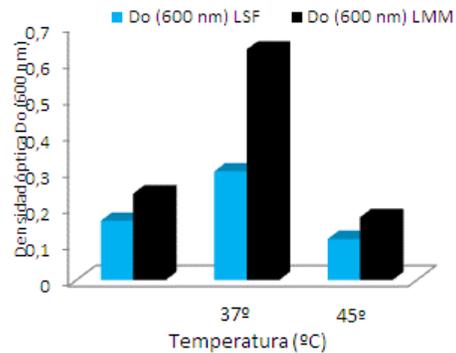


Figura 3. Comparación del crecimiento de las cepas LSF y LMM a 45°C.

2.- Producción de ácido láctico: Los resultados generados de la producción de ácido láctico por las cepas en estudio (LSF – LMM), se observan en la Figura 4, donde se evidencia, que la cepa LMM desde el principio mantiene una producción elevada en comparación con la cepa LSF, la cual va progresivamente aumentando con el tiempo. El uso de estas bacterias juntas o separadas como un posible cultivo iniciador le podría dar estabilidad en el tiempo al producto

elaborado ya que el ácido láctico en los alimentos inhibe en gran parte el desarrollo de microorganismos indeseables. Aunque los resultados obtenidos, se encuentran por debajo de los reportados por Velázquez et al. 2018, durante la evaluación de acidez de las cepas aisladas de queso y leche cruda, ellos explican que posiblemente influyan factores como la nutrición y raza del animal, ya que obtuvieron valores similares en todas las muestras evaluadas. Otra investigación realizada por Guillen et al. 2017, reportó valores elevados de ácido láctico en las cepas aisladas a partir de quesos de cabra.

estudio, sin embargo, ambas tienen un alto rango de tolerancia a los pH que fueron sometidas tal como se muestra en la Figura 5 y 6, demostrando que su crecimiento no se ve afectado, en cuanto a la cepa LSF tiene un mayor crecimiento en el pH3, mientras que la cepa LMM presentó mayor crecimiento a pH 5.

Ávila et al. (2010), evaluaron dos de las cepas aisladas de intestinos de animales a diferentes concentraciones de pH, estas presentaron un comportamiento similar al de las cepas evaluadas en esta investigación. Asimismo, una investigación realizada por Arrollo et al. (2018). Estos resultados indican que las cepas aisladas y evaluadas pertenecen al género *Lactobacillus*.

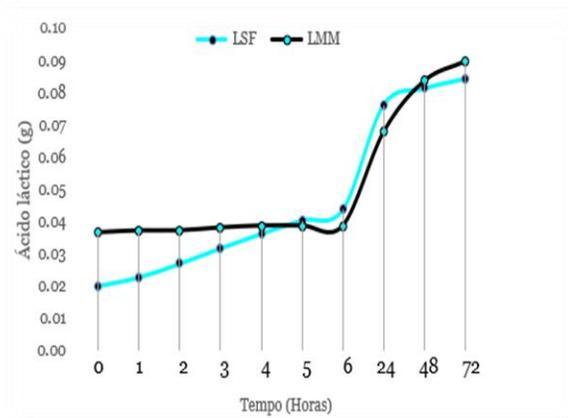


Figura 4. Comparación de los niveles de ácido láctico producidos por las cepas en estudio LSF y LMM durante 96 horas de crecimiento.

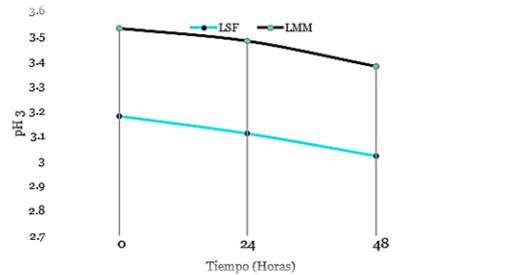


Figura 5. Comparación de los valores de pH 3 obtenidos durante la evaluación de las cepas LSF y LMM

3.- Tolerancia a diferentes pH: Los resultados obtenidos indican diferencias entre las cepas en

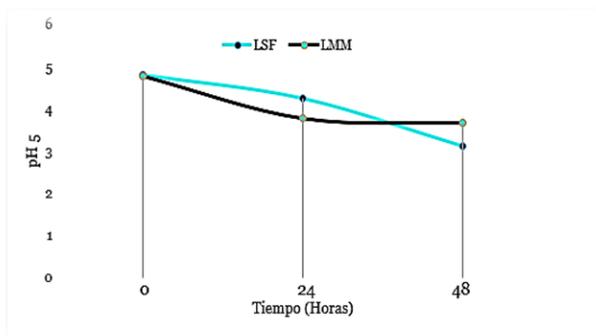


Figura 6. Comparación de los valores de pH 5 obtenidos durante la evaluación de las cepas LSF y LMM

4.- Capacidad acidificante: Los resultados obtenidos de la prueba de acidificación de leche de vaca pasteurizada, se evidencia que la cepa LSF tiende a la disminución del pH de manera progresiva, logrando la disminución de este a las 72 horas, mientras que la cepa LMM presento un comportamiento estático, debido a ello, para cada cepa se calculó la variación de pH, observando que la cepa LSF tardo 72 horas para generar una diferencia de pH mayor a 1, respecto al pH inicial. En la figura 7 se observa la cinética de pH en función del tiempo, en base a estos resultados, las cepas no pueden considerarse como fermentadoras rápidas. Sin embargo, tienen la capacidad de disminuir el pH, cumpliendo así con un criterio importante ya que pueden evitar o retrasar el crecimiento microbiano indeseable. Guillen et al (2017, p. 48), determinaron la capacidad acidificante a

través de la producción de ácido láctico, en su investigación obtuvieron 6 cepas con capacidad de disminuir el pH a las 12 horas de crecimiento.

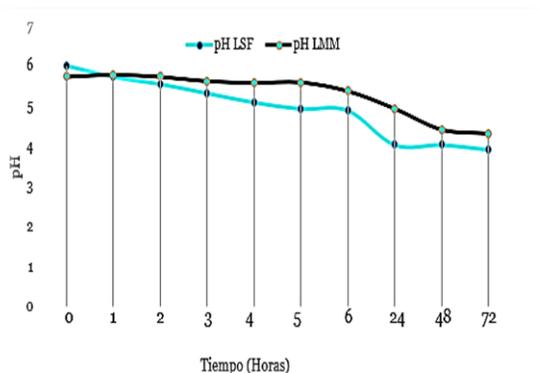


Figura 7. Comparación del comportamiento de las cepas LSF y LMM durante la acidificación de la leche.

Evaluación tecnológica de las cepas como cultivos iniciadores a nivel de laboratorio

Se evidenció que el poder de acidificar la leche por parte de las cepas evaluadas tanto solas como combinadas, fue lento alcanzando un pH que oscilo entre 4,60 a 4,22 de igual forma la producción de ácido láctico fue baja, si se compara los resultados obtenidos de la evaluación de las cepas aisladas con respecto a la muestra testigo, yogurt elaborado con el inoculo comercial, el poder como cultivo iniciador de las cepas aisladas para la elaboración de este producto fue aceptable. Estos resultados concuerdan con los reportados por Mogollón et al., (2021, p. 133), los cuales evaluaron un inoculo lácteo el cual utilizaron para la elaboración de un yogurt que

posteriormente sería utilizado en la alimentación porcina, el inóculo lo formularon a partir de cepas aisladas del tracto digestivo de lechones, de la evaluación realizada obtuvieron un yogur con características aceptables similares al obtenido en esta investigación.

Evaluación estadística de los cultivos iniciadores formulados

El análisis estadístico realizado se presenta en el cuadro 3 del mismo se concluye que, las cepas aisladas e implementadas como cultivos iniciadores tienen efecto sobre la leche de vaca con dos niveles de sólidos. De igual forma se observa para la variable de ácido láctico (g/l) evaluada ambas cepas y su combinación, presentan el mismo comportamiento, es decir que pueden ser utilizadas para sustituir a la cepa comercial utilizada, aun cuando tienen una baja producción de ácido láctico. En cuanto al pH la combinación de las cepas LSF – LMM, logra una disminución del pH a las 24 horas. Esto lleva a confirmar que de las cepas aisladas utilizadas como cultivos iniciadores por lo menos una fue diferente en cuanto a las características de las dos formulaciones desarrolladas.

Cuadro 3. Comparación de medias de cada uno de los cultivos iniciadores aplicando el estadístico de Tukey

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00923
Error: 0,0001 gl: 48

Cepa	Medias	n	E.E	
Comercial	4,39	18	2,5E-03	A
LSF-LMM	4,54	18	2,5E-03	B
LMM	4,72	18	2,5E-03	C
LSF	5,30	18	2,5E-03	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCLUSIONES

La diferencia presentada entre la caracterización de las muestras de leche utilizadas para esta investigación, con respecto a los autores consultados puede estar relacionada por factores genéticos, climáticos, calidad del suelo, y alimentación de las vacas. Los parámetros fisicoquímicos evaluados de las dos muestras de leche recolectadas se encontraron dentro de los parámetros exigidos por la norma venezolana COVENIN, sin embargo, en cuanto a los parámetros microbiológicos, esta se encontró fuera de los exigidos por esta norma, mostrando que ambas muestras no eran de buena calidad. Esto fue evidenciado en el bajo número de bacterias Gram positivas aisladas en ambas muestras.

A pesar de la baja calidad de las muestras de leche, fue posible aislar e identificar 2 cepas de

bacterias lácticas Gram positiva, catalasa y oxidasa negativa, una en forma de coco y otra en forma de bastón que permitieron el desarrollo de esta investigación.

Mediante la caracterización fenotípica de las dos cepas aisladas, se observó las características de estas, mostrando propiedades típicas de las bacterias utilizadas como cultivos iniciadores como resistencia a diferentes pH, sales biliares y NaCl, diferentes temperaturas y capacidad de acidificación.

Por los resultados obtenidos de la evaluación de las cepas cuando fueron empleadas como cultivos iniciadores, se confirma que las cepas aisladas son de calidad ya que el producto generado (yogur) presentó características típicas del producto.

REFERENCIAS

- Arroyo P., Hurtado C., Pérez E. (2018). Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia. *Rev Inv Vet Perú* 2018; 29(2): 438-448
- Ávila J., Ávila M., Tovar B., Brizuela M., Perazzo Y., Hernández H. (2010). Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. *Revista Científica*, vol. XX, núm. 2, pp. 161-169 Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela.
- Guillén B., Cruz M., Hernández F., Flores M., Martínez G., Rangel C. (2017). Selección de bacterias ácido-lácticas del queso artesanal de leche de cabra de Coahuila para su uso como cultivos iniciadores. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 25(72), 45-52.
- González G., Sánchez B., Vázquez R. (2010). Calidad de la leche cruda. Primer Foro sobre Ganadería Lechera de la Zona Alta de Veracruz.
- Karimi R., Mortazavian M., Rigi A. (2012). Recuento selectivo de microorganismos probióticos en queso. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Nutrición, Ciencia Tecnología de Alimentos/Instituto Nacional de Investigación de Tecnología de Alimentos y Nutrición, Universidad de Ciencias Médicas Shahid Beheshti, PO Box 19395-4741, Teherán, Irán
- Lars Axelsson & Dekker Marcel (2004). *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. Copyright © 2004 by Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved. *Microbiological and Functional Aspects Third Edition*, (1).
- Luigi T., Rojas L., Valbuena E. (2013). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de leche cruda y pasteurizada expandida en el estado Carabobo, Venezuela. *Evaluación higiénico-sanitaria de la leche p. 35*
- Minaya Magaly Brousett; Torres Jiménez Ana; Chambi Rodríguez Alex; Mamani Villalba Bethy; Gutiérrez Samata Hernán. (2015). Calidad fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de leche

cruda en las cuencas ganaderas de la
región Puno. Facultad de Ciencias
Agropecuarias Universidad Nacional de
Trujillo. Scientia Agropecuaria 6 (3): 165
– 176. DOI:
10.17268/sci.agropecu.2015.03.03

Mogollón C., Mogollón G., Aguilera R., Ortiz J.,
Suárez H. (2021). Producción y
evaluación de inóculos lácteos
probióticos obtenidos del tracto digestivo
de lechón (*Sus scrofa domestica*)
propuestos para alimentación porcina.
Rev Mex Cienc Pecu 2021;12(1):120-
137

NORMA VENEZOLANA COVENIN
658:1997. LECHE y sus derivados.
Determinación de la Acidez titulable.
(3ra. Revisión).

NORMA VENEZOLANA COVENIN
2393:2001. Yogurt. (3ra. Revisión).

NORMA VENEZOLANA COVENIN
903:2022. LECHE CRUDA.
REQUISITOS. (2da. Revisión)

Sánchez L., Tromps J. (2014). Caracterización in
vitro de bacterias ácido-lácticas con
potencial probiótico. Revista Salud
Animal. Vol. 36 No. 2: 124-129

Velázquez R., Figueroa M., Anaya L., Cordova
G., Ovando A., (2018). Uso de cultivo
iniciador de bacterias ácido lácticas
nativas para producir un queso mexicano
artesanal seguro y aceptable
sensorialmente CyTA \rightarrow Jornal of Food ,
16:1, 460-468.