



**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**Caracterización molecular y biotecnológica de bacterias  
pigmentadas de lácteos artesanales elaborados en la parroquia  
Jima**

**Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:  
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**Autora:**

**NICOLE VERENISSE APOLO GARCÍA**

**Directora:**

**ROSA CECILIA PALACIOS OCHOA**

**Co-director:**

**RODRIGO SEBASTIÁN CAROCA CÁCERES**

**CUENCA - ECUADOR**

**2018**

## **DEDICATORIA**

A mi familia, sin ustedes mi vida carecería de sentido.

## **AGRADECIMIENTOS**

A las siguientes personas e instituciones:

Universidad del Azuay por la oportunidad brindada para prepararme profesionalmente.

Universidad San Francisco de Quito por permitirme desarrollar parte de este trabajo en sus instalaciones, de manera especial al MSc. Juan Mosquera y la Dra. Sonia Zapata por su predisposición y apoyo.

Al Grupo de laboratoristas de la facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay, sin ustedes, Ing. Jhoana Tacuri, Ing. Diego Montero, Ing. María Inés Valdez, Ing. Mónica Tinoco e Ing. Ximena Orellana, no hubiera sido posible terminar con éxito este estudio.

Especial gratitud a mis directores, Dra. Cecilia Palacios y Dr. Rodrigo Caroca, por la confianza depositada en mi persona para desarrollar este trabajo, por su dedicación e invaluables conocimientos impartidos.

A la Ing. Aida Cazar por su valioso aporte en todos los aspectos del desarrollo de esta investigación.

A mis amigos y compañeros, gracias por hacer de esta pequeña etapa de mi vida un agradable recuerdo.

## Caracterización molecular y biotecnológica de bacterias pigmentadas de lácteos artesanales elaborados en la parroquia Jima

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue identificar, mediante la secuenciación del gen 16S, a 32 bacterias pigmentadas aisladas de lácteos artesanales elaborados en Jima y definir su aptitud biotecnológica. En base a la coloración presentada se seleccionaron cuatro especies para los ensayos biotecnológicos: *Kocuria rhizophila* (pigmento amarillo), *Corynebacterium flavescens* (pigmento crema), *Microbacterium oxydans* (pigmento amarillo) y *Brevundimonas vesicularis* (pigmento naranja). Se analizó su respuesta a tres factores: pH, temperatura y concentración de cloruro de sodio. Se determinó la capacidad lipolítica, proteolítica y poder acidificante. El pH óptimo para todas las especies fue de 7, excepto para *M. oxydans* que fue de 9. La temperatura óptima para *K. rhizophila* y *C. flavescens* fue de 37°C, mientras que para *B. vesicularis* y *M. oxydans* fue de 30°C. *K. rhizophila* y *C. flavescens* demostraron halotolerancia a 15% y 10% de sal respectivamente. Ninguna bacteria presentó capacidad lipolítica, a su vez que todas demostraron una lenta reacción acidificante. La capacidad proteolítica fue positiva en todas excepto en *C. flavescens*. Se puede concluir que *K. rhizophila*, *M. oxydans* y *B. vesicularis* tienen una posible aplicación en procesos de producción de derivados lácteos, además de un gran potencial como fuentes de biopigmentos.

**Palabras clave:** Bacterias pigmentadas, gen 16S, artesanales, biotecnológica, biopigmentos.



Ing. Ma. Fernanda Rosales M.  
Coordinadora Escuela  
Ingeniería en Alimentos



Dra. Cecilia Palacios  
Directora de Tesis



Srta. Nicole Apolo García

Autora

**Molecular and biotechnological characterization of pigmented bacteria from artisanal dairy products elaborated in the Jima parish**

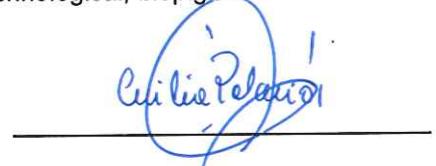
**ABSTRACT**

The objective of the present study was to identify 32 pigmented bacteria and define their biotechnological aptitude. These were isolated from artisanal dairy products made in Jima by sequencing the 16S gene. Four species were selected for the biotechnological tests based on the presented colors: *Kocuria rhizophila* (yellow pigment), *Corynebacterium flavescens* (cream pigment), *Microbacterium oxydans* (yellow pigment) and *Brevundimonas vesicularis* (orange pigment). Their responses to the following three factors were analyzed: pH, temperature and concentration of sodium chloride. The lipolytic, proteolytic and acidifying capacity were determined. The optimum pH for all species was 7, except for *M. oxydans*, which was 9. The optimum temperature for *K. rhizophila* and *C. flavescens* was 37°C, while for *B. vesicularis* and *M. oxydans* it was 30°C. *K. rhizophila* and *C. flavescens* showed halotolerance at 15% and 10% of salt respectively. No bacteria presented lipolytic capacity, all showed a slow acidifying reaction. The proteolytic capacity was positive in all but *C. flavescens*. It could be concluded that *K. rhizophila*, *M. oxydans* and *B. vesicularis* had a possible application in dairy production processes and a great potential as biopigment sources.

**Keywords:** Pigmented bacteria, gene 16S, artisanal, biotechnological, biopigment.



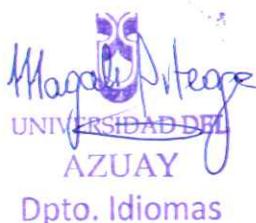
Ing. Ma. Fernanda Rosales M.  
Faculty Coordinator  
Food Engineering



Dra. Cecilia Palacios  
Thesis Director



Srta. Nicole Apolo García  
Author



Magali Stege  
UNIVERSIDAD DEL  
AZUAY  
Dpto. Idiomas



Translated by  
Ing. Paul Arpi

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>iv</b>
<b>PALABRAS CLAVE .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT Y KEYWORDS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO .....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS.....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>8</b>
1.1.    Obtención de las cepas.....	8
1.2.    Área de estudio .....	8
1.3.    Recuperación de cepas.....	8
1.4.    Identificación de bacterias en base a Tinción de Gram .....	9
1.5.    Caracterización Molecular.....	9
1.5.1.    Extracción del ADN bacteriano .....	9
1.5.2.    Amplificación .....	9
1.5.4.    Secuenciación .....	10
1.6.    Caracterización Biotecnológica.....	10
1.6.1.    Curva de crecimiento .....	11
1.6.2.    Curva de calibración.....	11
1.6.3.    Efecto del pH y temperatura en el crecimiento bacteriano. ....	12
1.6.4.    Efecto del cloruro de sodio en el crecimiento bacteriano .....	12
1.6.5.    Capacidad acidificante .....	12
1.6.6.    Capacidad proteolítica.....	13
1.6.7.    Capacidad lipolítica .....	13

1.7. Extracción y aplicación de los pigmentos bacterianos.....	13
1.7.1. Extracción de los pigmentos .....	13
1.7.2. Aplicación del pigmento .....	14
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>15</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
2.1. Identificación morfológica.....	15
2.2. Caracterización molecular.....	16
2.3. Caracterización biotecnológica .....	18
2.3.1 Curvas de crecimiento y calibración .....	19
2.3.2. Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento bacteriano .....	21
2.3.3. Efecto del cloruro de sodio.....	22
2.3.4. Capacidad acidificante .....	23
2.3.5. Capacidad proteolítica .....	24
2.3.6. Capacidad lipolítica .....	25
2.3.7. Extracción y aplicación de los pigmentos bacterianos.....	26
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>28</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
3.1. Identificación morfológica y molecular .....	28
3.2. Caracterización biotecnológica .....	29
3.3. Extracción y aplicación de pigmentos .....	32
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Corrida de productos de PCR en gel de electroforesis. ....	16
<b>Figura 2.</b> <i>Kocuria rhizophila</i> (37) en medio semisólido y en suspensión. ....	18
<b>Figura 3.</b> <i>Microbacterium oxydans</i> (49) en medio semisólido y en suspensión. ....	18
<b>Figura 4.</b> <i>Corynebacterium flavescens</i> (88) en medio semisólido y en suspensión. ....	19
<b>Figura 5.</b> <i>Brevundimonas vesicularis</i> (125) en medio semisólido y en suspensión. ....	19
<b>Figura 6.</b> Curvas de crecimiento cepas 37, 49, 88 y 125. ....	19
<b>Figura 7.</b> Curvas de calibración cepas 37, 49, 88 y 125. ....	21
<b>Figura 8.</b> Crecimiento expresado en UFC/mL de suspensión de bacterias pigmentadas a diferentes valores de pH. ....	21
<b>Figura 9.</b> Crecimiento expresado en UFC/mL de suspensión de bacterias pigmentadas a diferentes temperaturas de incubación. ....	22
<b>Figura 10.</b> Crecimiento expresado en OD <sub>600</sub> de suspensión de bacterias pigmentadas a diferentes concentraciones de NaCl. ....	23
<b>Figura 11.</b> Curva de descenso de pH. ....	23
<b>Figura 12.</b> Curva de aumento de la acidez titulable expresada en grados Dórníc. ....	24
<b>Figura 13.</b> Reacciones en el medio Litmus Milk para determinación de capacidad proteolítica de las 4 cepas de estudio. ....	24
<b>Figura 14.</b> Bacterias sembradas en agar nata para determinación de actividad lipolítica. ....	25
<b>Figura 15.</b> Pigmento bruto naranja y amarillo en suspensión. ....	26
<b>Figura 16.</b> Aplicación de pigmentos bacterianos en “gomitas”. . . . .	27

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Abundancia relativa según la forma celular y tipo de pigmentación de colonias bacterianas encontradas en cada muestra .....	15
<b>Tabla 2.</b> Abundancia relativa de géneros bacterianos en función del total de cepas aislada de cada muestra.....	16
<b>Tabla 3.</b> Abundancia relativa de especies bacterianas en función del total de cepas aisladas de cada muestra.....	17
<b>Tabla 4.</b> Ecuaciones de correlación entre absorbancia y concentración bacteriana en UFC/mL .....	21
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de resistencia de las bacterias pigmentadas a diferentes concentraciones de NaCl.....	22

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Métodos de extracción de ADN .....	42
<b>Anexo 2.</b> Metodología de secuenciación reportada por Macrogen Inc., Corea del Sur. ....	43
<b>Anexo 3.</b> Método de diluciones seriadas para conteo bacteriano. ....	44
<b>Anexo 4.</b> Diagrama de proceso de elaboración de “gomitas”. ....	45
<b>Anexo 5.</b> Características de los cultivos y tinción de Gram. ....	46
<b>Anexo 6.</b> Resultados de secuenciación. ....	47
<b>Anexo 7.</b> Efecto del pH sobre la pigmentación bacteriana. ....	48
<b>Anexo 8.</b> Efecto de la temperatura sobre la pigmentación bacteriana. ....	48
<b>Anexo 9.</b> Efecto de la concentración de NaCl sobre la pigmentación bacteriana. ....	49
<b>Anexo 10.</b> Fichas técnicas de colorantes artificiales empleados. ....	50

Nicole Verenisse Apolo García

Trabajo de Graduación

Rosa Cecilia Palacios Ochoa

Agosto, 2018

**Caracterización molecular y biotecnológica de bacterias pigmentadas de lácteos artesanales elaborados en la parroquia Jima**

**INTRODUCCIÓN**

En la actualidad, la industria láctea emplea cultivos iniciadores que son el producto de la selección de bacterias, las cuales han sido aisladas en base a algunas propiedades biotecnológicas deseables (Leroy y De Vuyst 2004; Asteri et al 2009). Sin embargo, esta práctica ha contribuido a la desaparición de las características típicas de los lácteos artesanales debido al reemplazo de su compleja microbiota nativa por productos comerciales (Piraino et al 2008, Lebos Pavunc et al 2012).

Las bacterias autóctonas que residen en sustratos naturales provocan fenómenos bioquímicos que expresan una mayor potencialidad que las cepas producidas industrialmente. Pueden aislarse de la mayoría de ambientes como suelo, agua, aire, materia vegetal, alimentos elaborados con materia prima cruda y de los fermentados de manera espontánea (Montel et al 2014, Yoon et al 2016).

El término “artesanal” relacionado a los alimentos, hace referencia a aquellos elaborados a mano o con muy poco uso de maquinaria, cuyas recetas y técnicas de elaboración son regularmente ancestrales, por lo que poseen características representativas tradicionales de una región o cultura. Además, no toman en cuenta la existencia de regulaciones técnico-sanitarias con parámetros específicos, que un producto alimenticio debe cumplir para ser comercializado (Domínguez et al 2010).

Los microorganismos presentes en los productos fermentados de manera artesanal son los responsables de sus características típicas como: sabores, texturas y aromas (Marino et al 2003, Neviani 2009), no obstante, no todas las bacterias que se desarrollan en un lácteo artesanal como el queso tienen una función biotecnológica relevante en términos de generación de atributos organolépticos deseables (Ramírez y Vélez 2016)

La gran diversidad de la microbiota autóctona de estos productos incluye bacterias pertenecientes a diferentes grupos fisiológicos con una variedad de características como psicrófilas, pigmentadas, proteolíticas, lipolíticas, entre otras (Yoon et al 2016).

El conocer la función biotecnológica de los microorganismos de un lácteo artesanal hace posible la estandarización de sus características organolépticas, lo que permitiría obtener productos alimenticios con propiedades uniformes y definidas que puedan acceder en un futuro a una Denominación de Origen (DOP), lo que aportaría significativamente a la mejora de la situación económica de los productores locales.

El aislamiento y la selección de bacterianas a partir de estos alimentos artesanales permite también disponer de cepas con propiedades específicas, haciendo posible la potenciación de estas cualidades tecnológicas y su empleo en la obtención de mejores propiedades organolépticas en productos lácteos (Beresford et al 2001, Ruiz y Wachter 2003).

Diversos estudios han empleado cepas aisladas de lácteos artesanales como cultivos iniciadores para producción de queso fresco, en fermentaciones aceleradas de quesos, en la mejora de la calidad sensorial y además se la logrado definir cepas probióticas (Lebos Pavunc et al 2012, Montel et al 2014, Ramírez y Vélez 2016).

En los últimos años se ha visto incrementado el interés de la industria alimentaria por estudiar la capacidad de los microorganismos para producir pigmentos debido a la posible toxicidad de los colorantes artificiales y el riesgo que estos representan para la salud de los consumidores (Prasad 2015). Se han descubierto algunas especies bacterianas pigmentadas que además de aportar color a los alimentos cumplen con funciones complementarias, como la *Psychrobacter celer* que se la emplea para producir fermentaciones superficiales de quesos pintados (Irlinger et al 2012). De igual manera, bacterias de los géneros *Brevibacterium* y *Arthrobacter* comúnmente asociadas a la superficie de quesos, se les considera responsables del desarrollo de sabor, aroma y color de los quesos pintados (Bockelmann y Hoppe-Seyler 2001).

Diversas investigaciones apoyadas en técnicas bioquímicas e ingeniería genética han permitido el estudio de las reacciones y compuestos envueltos en el proceso de biosíntesis de carotenoides. Gracias a esto, se han desarrollado técnicas de clonación para la obtención de nuevos genes carotenogénicos y su implantación en nuevos organismos huésped (Sandmann 1994, Isaacson et al 2002). Un gran referente en este tema ha sido el mejoramiento genético del arroz dorado (Beyer et al 2002). Trabajos como estos demuestran el interés actual por conocer y aprovechar el gran potencial biotecnológico que poseen las bacterias pigmentadas, particularmente en el campo alimentario.

### **Descripción de algunas bacterias pigmentadas de interés**

***Kocuria rhizophila***. – Bacterias cocáceas grampositivas de la familia *Micrococcaceae*, son aerobias estrictas, no presentan motilidad, no producen esporas, se agrupan en racimos, son catalasa positiva, coagulada negativa, no hidrolizan la lactosa, galactosa ni maltosa, pero si la sacarosa. Sus colonias presentan un color amarillo en agar nutritivo. Son halotolerantes que

muestran un buen crecimiento en soluciones al 10% de NaCl, pero su crecimiento es limitado en soluciones al 15% de NaCl. Se han aislado de suelos, agua marina, alimentos fermentados, carnes y pollos. El rango de pH necesario para un buen desarrollo oscila entre 5.7 a 7.7, además no presentan crecimiento sobre los 40°C (Moriguchi et al 1994, Kovács et al 1999, Savini et al 2010)

Algunas especies del género *Kocuria* incluyendo a *K. rhizophila* han sido asociadas a infecciones humanas, sepsis asociada a catéter, endocarditis, peritonitis y abscesos, en general en pacientes inmunocomprometidos. Además, esta bacteria es comúnmente usada en los tests de eficacia antimicrobiana en la industria alimentaria (Schinor et al 2007, Becker et al 2008, Savini et al 2010, Purty et al 2013).

***Corynebacterium flavescens***. – Esta bacteria es también llamada *Microbacterium flavum* y *Mycobacterium flavum*, son bacilos grampositivos a gram-variable, sin motilidad, no formadores de esporas. Su metabolismo es aeróbico y anaeróbico facultativo, son catalasa positivo, no fermentan lactosa, galactosa, glucosa, fructosa, manosa o manitol, no hidroliza la gelatina y no coagula la leche porque no hidrolizan la caseína.

Sus colonias presentan pigmentación cremosa en agar nutritivo. Pueden crecer en medios con 5% de NaCl y crecen débilmente en medios con 10% de NaCl. Se aíslan mayoritariamente de productos lácteos y en la superficie de los utensilios que se utilizan en la industria láctea. Algunos estudios han evidenciado la presencia de *C. flavescens* en la superficie de quesos madurados (Barksdale et al 1979, Bockelmann y Hoppe-Seyler 2001, Brennan et al 2002, Galaup et al 2005).

La bacteria *C. flavescens* ha sido asociada a una infección superficial denominada Tricomocosis que afecta por lo regular pelos axilares, cabello y en menor grado los bellos púbicos (Luna-Hernández et al 2012, Bonifaz et al 2016).

***Microbacterium oxydans***. – Son bacilos grampositivos que no forman esporas, muestran motilidad, sus colonias presentan una pigmentación amarilla en agar nutritivo. Su metabolismo es aeróbico, producen ácidos a partir de glucosa, fructosa, galactosa, manosa y maltosa. Son catalasa positiva y oxidasa negativa. Hidrolizan la gelatina y caseína. Su temperatura óptima de crecimiento va alrededor de los 30°C. Se han aislado del suelo y material hospitalario contaminado, sin embargo, no ha sido determinada la patogenicidad de esta bacteria (Schumann et al 1999).

Estudios han demostrado la capacidad de *M. oxydans* para degradar Laminarin, y los desechos resultantes de la gran producción de esta alga marina en Asia (Shaopeng Yan et al 2013).

***Brevundimonas vesicularis***. – Bacterias en forma de bacilo gramnegativo que poseen un flagelo polar. Sus colonias presentan colores naranjas y en ocasiones amarillas por la producción de un

pigmento carotenoide intracelular. Su metabolismo es aerobio estricto, su temperatura óptima fluctúa entre 26 y 30°C sin mostrar crecimiento a 4 o 41°C. Para su crecimiento utilizan glucosa, galactosa, maltosa, celobiosa, acetato, butirato, succinato, L-malato, DL-alanina, L- aspartato.

Esta bacteria produce una enzima esterasa que es capaz de hidrolizar ácidos grasos de cadena corta de ocho carbonos. Se ha aislado de agua, suelo y raramente de muestras clínicas humanas. No obstante, ha sido involucrada en casos de infecciones humanas en India y Taiwan (Segers et al 1995, Garrity et al 2005, Bhatawadekar y Sharma 2011, Chun-Cheng et al 2012)

Estudios han reportado el potencial uso de *B. vesicularis* en bio-remediación ambiental, por su capacidad como bio-adsorbente de plomo en aguas residuales y en la degradación de polímeros de poli-vinyl alcohol, un componente altamente utilizado en la fabricación de plásticos (Kawagoshi y Fujita 1998, Sakay et al 1998, Resmi et al 2009).

### **Métodos de caracterización fenotípica y genotípica**

Un estudio del fenotipo de un microorganismo está comprendido por su caracterización cultural, morfológica, fisiológica y bioquímica. La identificación de estas propiedades tiene una gran validez predictiva y representan una pequeña parte de la expresión genética la cual está condicionada por los factores ambientales. Sin embargo, este tipo de análisis ofrece en ocasiones resultados ambiguos, baja sensibilidad y reproducibilidad puesto que se pueden obtener diferentes respuestas entre cepas pertenecientes a una misma especie, viéndose altamente limitado cuando se requiere identificar especies y subespecies de microorganismos (Amarocho-Cruz 2011).

En la actualidad los métodos de identificación más recomendados por su exactitud y precisión son los genéticos ya que trabajan directamente sobre el ADN de los microorganismos, logrando diferenciar especies, subespecies y cepas específicas.

En el estudio de la filogenia y taxonomía bacteriana la región ARNr 16S ha sido la más utilizada en el establecimiento de las relaciones filogenéticas de estos organismos, gracias a lo cual han logrado crear un marco apropiado para su clasificación e identificación. A pesar de que los ácidos nucleicos y las proteínas cambian con el tiempo, esta región específica del ADN de las células procariontas es altamente conservada, debido a las bajas tasas de evolución de el gen que la codifica (Rodicio y Mendoza 2003). Por esto, la amplificación y secuenciación de este gen ha sido clave en la identificación de bacterias.

El método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es uno de los más empleados para la amplificación de segmentos de ADN. La PCR ha sido descrita como un proceso simple, exacto y altamente reproducible, que proporciona la ventaja de necesitar solo una pequeña cantidad de ADN para amplificar millones de veces un fragmento específico, durante ciclos repetidos de

desnaturalización, hibridación y elongación. Esta reacción es posible gracias a la labor de la enzima Taq Polimerasa en la síntesis de nuevas cadenas de ADN, mediante el emparejamiento de los nucleótidos de la hebra del ADN molde con su complementario (Amarocho-Cruz 2011, Tamay de Dios et al 2013).

La secuenciación consiste en un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es determinar el orden de los nucleótidos en el fragmento de ADN amplificado. El método más utilizado consiste en la elongación de la cadena de ADN, pero con el uso de dideoxynucleótidos (ddNTP), marcados con un compuesto fluoróforo distinto, que emite luz con una longitud de onda característica. La luz es captada mediante electroforesis capilar, en el que cada color de fluorescencia determina el nucleótido terminal de cada fragmento y su posición en la molécula de ADN (Bakin y Ofengang 1992, Palomino y González 2014).

La secuencia de los nucleótidos con el fragmento de ADN constituye la información genética de cada organismo vivo y en base a la cual puede ser identificado el organismo portador.

### **Propiedades biotecnológicas de interés en la industria láctea**

El potencial tecnológico de un microorganismo en la industria alimentaria está determinado por las reacciones bioquímicas que estos son capaces de desarrollar y el impacto que estas reacciones tienen sobre la estructura, composición, calidad sensorial y vida útil de los alimentos.

La fermentación es el proceso bioquímico más relevante en la industria láctea, del cual resultan compuestos que contribuyen no solo a la preservación del alimento sino también al desarrollo de su aroma, sabor y textura, lo que en conjunto favorece en la definición las características únicas del producto (Caplice y Fitzgerald 1999, Rubio-Texeira 2007). Caplice y Fitzgerald (1999) consideraron que la fermentación sería uno de los temas de mayor estudio en los inicios del siglo XXI, debido a que a partir de este proceso se obtienen componentes funcionales como vitaminas, antioxidantes, probióticos, péptidos bioactivos y aminoácidos esenciales. Gracias a este proceso bioquímico la calidad nutricional del alimento mejora ya que se aumenta la digestibilidad de ciertas macromoléculas, especialmente las proteínas (Ross et al 2002).

La capacidad de acidificación de las bacterias es de vital importancia en la industria láctea debido a que contribuye a inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes a lo largo del proceso productivo (Alvarado et al 2007; Morais 2004). Además, la acumulación de ácido láctico y otros ácidos producidos por estas bacterias facilitan la coagulación de la leche y subsiguiente formación de la cuajada (Narváez 2015).

La proteólisis y lipólisis son fenómenos bioquímicos de especial interés en la industria láctea ya que juegan un papel importante durante la maduración de quesos, en los que su acción es

deseada y beneficiosa (Morais 2004). Sin embargo, durante el almacenamiento de leches tratadas térmicamente estos procesos provocan la descomposición del alimento, debido a la acción de enzimas producidas por bacterias psicrófilas (Hantsis-Zacharov y Halpern 2007, Baur et al 2015).

Los procesos proteolíticos contribuyen directa o indirectamente al gusto y aroma del queso, potenciando el sabor al provocar la liberación de compuestos sápidos durante la masticación (péptidos y aminoácidos libres). Además, poseen un rol importante en el desarrollo de la textura de la cuajada, debido a la ruptura de la red de caseína (McSweeney y Sousa 2000, Morais 2004).

Durante la maduración de los alimentos lácteos la proteólisis es catalizada por enzimas de diferentes fuentes: el agente coagulante (quimosina, pepsina), proteasas propias de la leche (plasmina y catepsina D), el cultivo iniciador, los fermentos secundarios (*Coryneformes*, *P. camemberti*, *P. roqueforti*, entre otros) (McSweeney y Sousa 2000). Sin embargo, se ha observado que la microbiota que no forma parte del fermento puede también degradar las caseínas. Ciertos estudios han demostrado que la microbiota autóctona de la leche modifica el perfil peptídico de los quesos, principalmente en las concentraciones de péptidos hidrofílicos e hidrofóbicos (González del Llano et al 1995, Morais 2004).

La grasa láctea, al igual que las proteínas, es esencial para el correcto desarrollo del sabor en quesos durante la maduración (McSweeney y Sousa 2000). La lipólisis es un fenómeno bioquímico que consiste en la liberación de ácidos grasos por medio de la hidrólisis enzimática de los triglicéridos presentes en la leche (McSweeney y Sousa 2000).

Las enzimas lipolíticas se dividen en dos grupos de acuerdo con su especificidad de sustrato, aquellas que hidrolizan las cadenas cortas de ácidos grasos (menos de 10 de carbonos) son las esterases y aquellas que hidrolizan ácidos grasos de 10 o más carbonos son las lipasas. Las esterases son activas en soluciones acuosas mientras que las lipasas en interfases lípido/agua (Chen et al 2002).

El 98% de la grasa láctea está constituida por triglicéridos, de los ácidos grasos presentes el 70% son saturados, 26% son monoinsaturados y 4% son poliinsaturados. Los ácidos grasos más abundantes en la fracción lipídica de la leche son el palmítico C16, mirístico C14 y esteárico C18; mientras que aproximadamente el 11% de los ácidos grasos saturados son de cadena carbonada corta (García et al 2014).

Los ácidos grasos de cadena corta son los que mayor impacto presentan sobre el sabor de los quesos maduros cuando son liberados. No obstante, una extensa lipólisis es poco deseada en la mayoría de quesos de maduración interna, como el Cheddar, Gouda y Suizo, puesto que altos niveles de ácidos grasos libres llegan a provocar rancidez. Por consiguiente, concentraciones bajas de ácidos grasos libres son las adecuadas para contribuir al sabor de este tipo de quesos,

especialmente cuando son balanceadas con los compuestos resultantes de la proteólisis (McSweeney y Sousa 2000).

### **Pigmentos de origen microbiano**

La industria está aprovechando la capacidad de las bacterias y en general de los microorganismos para producir biopigmentos, con aplicaciones en alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos y textiles (Chidambaram et al 2013, Navin y Radhan 2015). En el campo alimenticio los biopigmentos, además de brindar color, aportan con beneficios para la salud como poder antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y fortalecimiento del sistema inmune. Por estas razones, existe mayor adaptabilidad y aceptación de los consumidores por el uso de colorantes naturales en los alimentos (Duffosse 2006).

La creciente preocupación de los consumidores por su salud y la tendencia actual por conservar una alimentación más saludable ha desencadenado un aumento de la demanda de pigmentos de origen natural, especialmente de carotenoides. En el 2011, el monto de ventas globales de colorantes naturales se estimó en 600 millones de dólares (Hardeep et al 2014), para el 2016 el mercado específico de los carotenoides ascendió a los 500 millones de dólares y se estimó que para este año la expectativa de ventas de este pigmento ascendería a los 1.2 billones de dólares (Samyuktha y Naphade 2016).

Los tipos de pigmentos que producen los microorganismos son: carotenoides, melaninas, flavinas, monascinas, violaceínas e índigos; de los cuales los más estudiados y utilizados son los carotenoides, a los que se atribuyen la mayoría de las propiedades beneficiosas para la salud antes mencionadas. Los carotenoides poseen una fracción lipídica, lo que los hace sensibles al oxígeno, el calor y la luz. El cuerpo humano no es capaz de sintetizarlos por lo que es indispensable incorporarlos por medio de la dieta. Especies como *Streptomyces chrestomyceticus subsp.* que produce licopeno y *Flavobacterium sp.* que produce zeaxantina y luteína, han sido objeto de recientes estudios sobre bacterias pigmentadas (Samyuktha y Naphade 2016).

A nivel local existen pocos estudios sobre este tema, por lo que en este trabajo tiene como objetivo la identificación molecular y caracterización biotecnológica de las bacterias pigmentadas nativas de lácteos artesanales de la parroquia Jima, con el propósito de disponer de un banco de cepas que a futuro se puedan utilizar en la elaboración de alimentos con propiedades definidas y uniformes, con énfasis en la obtención de los pigmentos bacterianos y su posible aplicación como biocolorantes.

## CAPÍTULO I

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1.1. Obtención de las cepas

Se trabajó con 32 aislados bacterianos pigmentados obtenidos de un banco de microorganismos provenientes de lácteos artesanales elaborados en Jima, que pertenecen al proyecto de investigación 106-2017<sup>1</sup> de la Universidad del Azuay.

#### 1.2. Área de estudio

Jima es una parroquia del cantón Sigsig de la provincia del Azuay, su centro parroquial se sitúa a una altura de 2700 m.s.n.m. Posee temperaturas que oscilan entre los 3 hasta los 18°C, con una temperatura media de 12°C. Presenta un clima mesotérmico semi húmedo con un rango de 59 - 88% de humedad. Su precipitación anual es de 500 a 2000 mm, con dos estaciones lluviosas que fluctúan entre febrero-mayo y octubre-noviembre.

El 67% de la población económicamente activa se dedica a la agricultura, ganadería, silvicultura y pesca. Su sistema de producción está basado en la agricultura y ganadería convencional, siendo su principal fuente de ingreso la ganadería.

El principal producto que se comercializa en Jima es la leche con el 48%, seguido del ganado de carne con el 26%, el quesillo ocupa el tercer lugar (PDOT Jima 2012, PDOT Sigsig 2012)

Jima se caracteriza por la producción de derivados lácteos artesanales como el quesillo y quesos semimaduros, elaborados por pequeñas asociaciones que los comercializan en ferias locales, en la cabecera parroquial y fuera de la misma, principalmente en Cañar, Loja y Cuenca (PDOT Jima).

Las cepas estudiadas fueron aisladas de cinco alimentos artesanales elaborados en Jima: queso fresco, queso semimaduro, queso amasado, requesón y leche cruda.

#### 1.3. Recuperación de cepas

Los medios de cultivo usados para el establecimiento de cultivos frescos fueron: Caldo Nutritivo (Criterion, Hardy Diagnostics, USA) y Agar Nutritivo (TM Media, India), los cuales se prepararon de acuerdo con las especificaciones del proveedor y luego esterilizados por 15 minutos a 121°C, para su posterior uso. Las condiciones de incubación fueron similares para todas las cepas: 37°C por 24 a 48 horas en aerobiosis y pH 7.

---

<sup>1</sup> Proyecto N° 106: Proyecto denominado “*Selección de bacterias autóctonas con beneficios potenciales a partir de lácteos artesanales de la parroquia Jima*” a cargo de la Dra. Cecilia Palacios.

## **1.4. Identificación de bacterias en base a Tinción de Gram**

### **1.4.1. Obtención de cultivos axénicos.**

Las cepas congeladas en crioviales se reconstituyeron en caldo nutritivo estéril por 48 horas a 37°C. Después fueron sembradas en agar nutritivo estéril. Del cultivo en placa y partiendo de una sola colonia se practicaron varias siembras en nuevas placas de agar estéril para asegurar que el cultivo sea puro. Cuando se aseguró que el cultivo de placa fue axénico se procedió a la inoculación de una colonia en caldo nutritivo.

### **1.4.2. Ensayo de tinción de Gram**

Las cepas bacterianas puras inicialmente se analizaron a simple vista para ser clasificadas de acuerdo con el color y opacidad de sus colonias. Luego, se sometieron al ensayo de Tinción de Gram, según el método reportado por Santambrosio et al (2009), para identificar la forma y su reacción a la tinción de Gram al ser observadas a través del microscopio.

## **1.5. Caracterización Molecular**

### **1.5.1. Extracción del ADN bacteriano**

La extracción del ADN bacteriano se realizó con dos Kits comerciales: DNAzol Reagent (Life Technologies - USA) y Pure Link – Invitrogen (Thermo Fisher Scientific - USA).

#### **1.4.1.1 Preparación de las muestras**

Un cultivo axénico de caldo nutritivo de 48 horas de incubación fue centrifugado (Eppendorf 5804, Alemania) en tubos Eppendorf de 1 mL a 4400 rpm por 3 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en agua estéril. Se realizaron dos lavados adicionales y finalmente se eliminó el agua de lavado y se procedió con la extracción de ADN.

#### **1.4.1.2. Extracción con DNAzol Reagent**

Se desarrolló el método reportado por Englen y Kelley (2000) con una modificación (Anexo 1). El ADN extraído se disolvió en 50 µL de una solución de NaOH 8mM, mientras que los autores mencionados lo disolvieron en 40 µL de buffer TE.

#### **1.4.1.3. Extracción con Mini Kit Pure Link® Genomic DNA Qty: 250rxn – Invitrogen.**

Se siguieron las indicaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific – USA) especificadas en el (Anexo 1).

### **1.5.2. Amplificación**

La amplificación de la región ARNr 16S bacteriano se realizó mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, en donde se utilizaron los primers: **8F** (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y **1492R** (5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT3') (Amor et al 2007).

El resto de los reactivos de la reacción de PCR se mantuvieron constantes; el volumen de reacción de 25  $\mu$ L consistió en las siguientes concentraciones de reactivos: 5U/  $\mu$ L de Taq Polimerasa (Taq Polimerase Recombinant 500 units), 1X de Buffer de PCR, 4mM de  $MgCl_2$ , 0.4  $\mu$ M de dNTPs, 2  $\mu$ L de cada primer de concentración 10  $\mu$ M, 13  $\mu$ L de agua desionizada estéril, y 2  $\mu$ L de ADN molde previamente extraído. Todos los reactivos utilizados fueron provistos por Invitrogen (California-USA). Las condiciones de amplificación se programaron en un termociclador (Multi Gene Gradient, USA) de la siguiente manera: 35 ciclos: desnaturalización a 95°C por 2 minutos, anillamiento a 55°C por 40 segundos y elongación a 72°C por 10 minutos.

### **1.5.3. Gel de electroforesis**

Después de la amplificación, se confirmó el tamaño adecuado de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (Invitrogen Agarose Ultra Pure™, USA) corridos a 80 voltios durante 40 minutos en buffer TAE 1X en una cámara de electroforesis (Bio Rad Power Pac 200, USA). Los geles fueron teñidos con Sybro Safe 1X (Invitrogen, USA) para facilitar la visualización del ADN.

En los pocillos del gel se colocaron 10  $\mu$ L de cada amplicón obtenido. Para establecer su tamaño se utilizó un marcador de peso molecular TrackIt 100 bp DNA Ladder (Invitrogen-USA). Además, se agregó un control negativo para descartar interferencias por posible contaminación. Finalmente, las bandas en el gel de agarosa fueron reveladas en un transluminador UV (Bio Rad Gel Doc™ XRT, USA).

### **1.5.4. Secuenciación**

La purificación y secuenciación de los productos de PCR fue desarrollada por la empresa MACROGEN INC. de Corea del Sur, cuyo reporte está detallado en el (Anexo 2).

Las secuencias recibidas se leyeron y limpiaron en el programa CHROMAS (Versión 2.65), el alineamiento y consenso de las secuencias en sentido 3'-5' y su reverso 5'-3' se desarrolló en el programa PRABI-Doua: CAP3 Sequence Assembly (Huang y Madan 1999). Una vez obtenida la secuencia compuesta se introdujo en la herramienta BLAST (Altschul 2011) para encontrar similitudes con la base de datos de GenBank y así determinar los géneros y especies de las cepas estudiadas.

## **1.6. Caracterización Biotecnológica**

Para la establecer la calidad biotecnológica se seleccionaron cuatro cepas de interés en base al color e intensidad de su pigmentación, las cuales fueron: cepa 125 (pigmento naranja intenso), cepa 37 (amarillo intenso), cepa 88 (crema opaco) y cepa 49 (amarillo brillante).

El cultivo axénico madre para el desarrollo de las curvas de crecimiento y calibración consistió en una suspensión bacteriana en caldo nutritivo estéril de 24 horas de incubación con una concentración 2 McFarland.

#### **1.6.1. Curva de crecimiento**

Esta curva se desarrolló con el fin de identificar las etapas de crecimiento de las cepas seleccionadas y estimar los tiempos de duración de cada una. Se siguió la metodología reportada por Narváez (2015).

Para obtener esta curva se utilizaron matraces de 250 mL, se inocularon 70 mL de caldo nutritivo al 1% con la bacteria de interés, se incubaron los matraces con las cepas 37 y 88 a 37°C y a 30°C las cepas 125 y 49, todas en aerobiosis y con agitación de 150 rpm en una incubadora (Grant Bio ES-20, Inglaterra). Para analizar la evolución del crecimiento se midió la densidad óptica (OD) cada dos horas por 24 a 48 horas, a una longitud de onda de 600 nanómetros en un espectrofotómetro UV visible (EVO 60 Thermo Fisher Scientific). Como blanco se tomó caldo nutritivo estéril. Finalmente se graficaron cada una de las lecturas de absorbancia vs tiempo de incubación para observar la curva de crecimiento de cada cepa.

#### **1.6.2. Curva de calibración**

Esta curva se desarrolló con el objetivo de estimar la correlación existente entre la densidad óptica de un cultivo líquido y su concentración bacteriana expresada en UFC/mL. Se siguió la metodología reportada por Narváez (2015).

Para obtener esta curva se inocularon las bacterias bajo las mismas condiciones del ensayo anterior. Se realizaron cuatro mediciones de  $OD_{600}$  dentro del periodo de tiempo en que la cepa estaba en la fase de crecimiento exponencial, la cual fue identificada en su curva de crecimiento.

En simultáneo con cada medición de  $OD_{600}$  se realizó el conteo de colonias en placa mediante el método de diluciones seriadas (Anexo 3) para determinar la concentración bacteriana de la suspensión en UFC/mL. El objetivo fue obtener un valor de absorbancia y contenido bacteriano en cada período de incubación. Finalmente se construyó la curva con los datos obtenidos de  $OD_{600}$  vs concentración de bacterias en UFC/mL.

La tendencia de la curva es lineal, a partir de ésta se estableció la ecuación de la recta, para determinar la relación directamente proporcional entre las UFC/mL y la  $OD_{600}$  de los cultivos (Narváez, 2015).

### 1.6.3. Efecto del pH y temperatura en el crecimiento bacteriano.

Se partió de un cultivo líquido bacteriano de 18 horas de incubación. De este cultivo se tomó 0.1 mL y se inoculó en 10 mL de caldo nutritivo estéril con pH ajustado a 3, 5, 7 y 9. Se incubó por un tiempo de 48 horas a una temperatura de 37°C para las cepas 37 y 88 y a 30°C para las cepas 125 y 49.

Del mismo cultivo inicial se inoculó al 1% caldo nutritivo estéril con pH 7 constante y se incubó a las temperaturas de 15, 30, 37 y 45°C. La OD<sub>600</sub> del caldo fue medida al tiempo cero de incubación y a las 48 horas, se cuantificó el crecimiento bacteriano en términos de UFC/mL mediante la ecuación obtenida en la curva de calibración. Finalmente, se centrifugaron los caldos para formar un pellet y determinar el efecto del pH sobre la producción de pigmento de las cepas (Rondón 2008; Prasad 2015).

### 1.6.4. Efecto del cloruro de sodio en el crecimiento bacteriano

A partir de un cultivo líquido preparado en las mismas condiciones ya mencionadas, se sometió a concentraciones de NaCl de 2.5, 5, 10 y 15%. Se incubó a una temperatura de 37°C para las cepas 37 y 88 y a 30°C para las cepas 125 y 49 por un tiempo de 48 horas. El control constituyó el caldo nutritivo estéril sin NaCl y se incubó bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo (Rondón et al 2008)

La OD<sub>600</sub> fue medida antes de la incubación (t: 0) y después de ésta (t:48). La tolerancia al NaCl fue definida por el porcentaje de células sobrevivientes después de la incubación en los cultivos con cloruro de sodio añadido (Gómez et al 1998; Rondón et al 2008). Los valores de UFC/mL se obtuvieron a partir de la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración de cada cepa. El porcentaje de resistencia se calculó con la siguiente ecuación (Kociubinski et al 1999).

$$\%R \text{ NaCl} = \frac{(\text{UFC/mL})\text{suspensión con NaCl} \times 100}{(\text{UFC/ml})\text{suspensión sin NaCl}}$$

Finalmente, se centrifugaron los caldos para formar un pellet y determinar el efecto de la concentración de NaCl sobre la producción de pigmento de las cepas.

### 1.6.5. Capacidad acidificante

Se desarrolló el método propuesto por la Federación internacional de lechería (IDF 306, 1995), en donde se inocularon 10 mL de leche descremada UHT con 200 µL de la suspensión bacteriana de interés y se incubó a la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa: 30°C para las cepas 49 y 125 y 37°C para 37 y 88. El descenso del pH fue medido cada 2 horas por 24 horas en un potenciómetro (Mettler Toledo, Seven Compact™, China). La acidez también fue medida en cuatro periodos de tiempo, a las 0, 6, 12, y 24 horas de incubación, mediante titulación con NaOH 0.11 N y con fenolftaleína como indicador. Los resultados de acidez fueron expresados en grados Dornic (Morais 2004; Prasad 2015).

### **1.6.6. Capacidad proteolítica**

La capacidad proteolítica para cada una de las 4 cepas se determinó en tubos de ensayo con 10 mL de medio Limus milk (TM Media, India), el cual se inoculó con 200  $\mu$ L de una suspensión bacteriana de concentración 3 McFarland ( $9.0 \times 10^8$  UFC/mL). Se incubó durante 7 días a 30° para las cepas 125 y 49 y a 37°C para las cepas 37 y 88. Se realizó una lectura diaria de los tubos (Ramírez-López y Vélez-Ruiz 2016).

Como lo indican Ramírez-López y Vélez-Ruiz (2016), este medio permite identificar el tipo de reacción causada por los microorganismos de interés. La reacción es ácida cuando el medio vira de azul-púrpura a rosado-rojo debido a la fermentación de la lactosa y la glucosa. La reacción es alcalina cuando el microorganismo ataca las sustancias nitrogenadas presentes en el medio, formando amoníaco o aminas, el color del medio permanece sin cambios. Mientras que la reducción ocurre cuando el oxígeno es eliminado del "Litmus" por acción de la enzima reductasa, generándose una decoloración del medio. Por otro lado, la coagulación indica la precipitación de la caseína por acción ácida y en la digestión se observa una clarificación del medio y la disolución de la cuajada por digestión de la caseína.

### **1.6.7. Capacidad lipolítica**

Se sembró la cepa de interés en agar nutritivo al 2.5% de nata, cuyo contenido graso fue de alrededor del 30%. Se hicieron pequeños orificios de 4mm de diámetro en el agar, en los cuales se inoculó una suspensión de cada cepa. Se incubaron las placas a 30°C para las cepas 125 y 49 y a 37°C para las cepas 37 y 88 por un período de 72 horas. Al término de este tiempo se observaron las colonias contra luz para visualizar la presencia de un halo alrededor de la colonia, que es indicativo de degradación de la grasa o lipólisis positiva (Morais 2004; Ramírez-López y Vélez-Ruiz 2016). Para este análisis se sembró *Staphylococcus aureus* en el mismo medio como control positivo.

## **1.7. Extracción y aplicación de los pigmentos bacterianos**

### **1.7.1. Extracción de los pigmentos**

Se escogió la cepa 37 para obtención de pigmento amarillo y la cepa 125 para extraer el pigmento naranja. Se desarrolló el método reportado por Ahmad (2012) con pequeñas variaciones. Las cepas pigmentadas fueron sembradas en agar nutritivo por 48 horas, se recogió toda la biomasa bacteriana de las placas y se transfirió a tubos Falcon de 50mL. Se añadió 35 mL de metanol al 96%, se agitó en vórtex por 5 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 30 minutos y recolectó el sobrenadante en tubos limpios. Al pellet se le añadió nuevamente el solvente y se repitió el proceso hasta que el pellet estaba decolorado. El sobrenadante coloreado se concentró en un rotavapor (Buchi, R-215, Suiza) a 65°C por 2 horas, hasta conseguir alrededor del 5% (v/v) del volumen inicial del solvente. Finalmente, el pigmento concentrado fue sometido a liofilización en un liofilizador (Scientz 10N Freeze Dryer, China). Los pigmentos liofilizados se suspendieron en

una solución de etanol al 70% y glicerol en proporción 1:3 v/v, hasta visualizar homogeneidad, sin presencia de grumos.

### **1.7.2. Aplicación del pigmento**

Los pigmentos se aplicaron a una fórmula estándar de caramelos masticables de gelatina, comúnmente denominados como “gomitas” (Anexo 4).

Se siguió el proceso de elaboración hasta obtener una suspensión caliente de gelatina, dulce e incolora. Se tomaron 4 volúmenes iguales de la suspensión y se aplicó a cada uno un agente de color. Se emplearon los pigmentos bacterianos amarillo y naranja y dos artificiales. Se estableció una comparación visual entre el color logrado por los pigmentos bacterianos y los colorantes artificiales sobre las gomitas. Además, se determinó el grado de concentración de los biopigmentos en relación a la intensidad aparente de coloración obtenida por la aplicación de los pigmentos artificiales.

## CAPÍTULO II

### RESULTADOS

#### 2.1. Identificación morfológica

Las treinta y dos cepas bacterianas pigmentadas aisladas de lácteos artesanales se caracterizaron morfológicamente. De ellas el 31% se obtuvo de queso semimaduro, 25% de leche cruda, 22% de queso fresco, 19% de requesón y 3% de queso amasado.

Las bacterias presentaron coloraciones de diferentes intensidades. Las cepas de color amarillo representaron el 44% del total; las de color crema el 34% y las cepas de color naranja el 22%. Las formas celulares con más abundancia relativa en las 32 cepas estudiadas fueron los cocos grampositivos (38%), seguidos de los bacilos gramnegativos (28%) (Anexo 5).

**Tabla 1.** Abundancia relativa según la forma celular y tipo de pigmentación de colonias bacterianas encontradas en cada muestra.

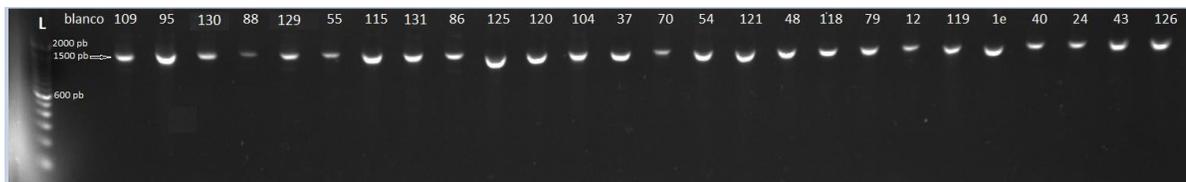
	Leche cruda	Queso amasado	Queso fresco	Queso semimaduro	Requesón
<b>Tipo de célula</b>	<b>Porcentaje de abundancia relativa</b>				
Bacilos Gram +	13	-	29	10	17
Bacilos Gram -	25	-	43	30	17
Cocos Gram +	50	100	14	30	50
Cocos Gram -	-	-	-	-	-
Cocobacilos Gram +	-	-	-	10	-
Cocobacilos Gram -	13	-	14	20	17
<b>Color de colonia</b>					
Amarilla	50	-	29	60	33
Naranja	13	-	43	20	17
Crema	38	100	29	20	50

En el queso fresco, al igual que en el queso semimaduro y requesón, se identificaron variedad formas celulares entre cocos, bacilos y cocobacilos. Sin embargo, los bacilos gramnegativos fueron los que mayor abundancia relativa presentaron para este producto.

En el queso semimaduro los bacilos gramnegativos y los cocos grampositivos se presentaron con abundancia relativa igual del 30%, no obstante, un buen porcentaje de esta población la ocuparon los cocobacilos gramnegativos con un valor del 20% (Tabla 1).

## 2.2. Caracterización molecular

De las 32 muestras de ADN extraído, 26 presentaron una amplificación exitosa de la región ARNr 16S, en la que la cantidad y calidad del ADN fue la adecuada. En la visualización UV del gel de electroforesis se evidenciaron bandas únicas de producto de PCR, sin la presencia de interferencias por bandas inespecíficas. Se obtuvo un tamaño de ADN amplificado de 1500 pares de bases, determinado gracias al Ladder 100bp TrackIt™ (Invitrogen, USA); este fue el tamaño esperado según los primers empleados para la PCR. (Figura 1).



**Figura 1.** Corrida de productos de PCR en gel de electroforesis. L: Ladder TrackIt™ 100bp, carril 2: blanco, carriles 3 al 28: amplicones codificados de acuerdo con la cepa de la que provienen (Anexo 6).

**Tabla 2.** Abundancia relativa de géneros bacterianos en función del total de cepas aislada de cada muestra.

	Leche cruda	Queso amasado	Queso fresco	Queso semimaduro	Requesón
Géneros	Porcentaje de abundancia relativa				
<i>Arthrobacter</i>	-	-	-	40	-
<i>Brevundimonas</i>	-	-	29	-	-
<i>Citricoccus</i>	-	-	-	-	17
<i>Corynebacterium</i>	-	-	29	20	17
<i>Kocuria</i>	13	-	-	20	17
<i>Listeria</i>	13	-	-	-	-
<i>Luteimonas</i>	-	-	14	-	-
<i>Macrococcus</i>	13	100	-	-	17
<i>Microbacterium</i>	25	-	-	-	-
<i>Shewanella</i>	-	-	-	-	17
<i>Staphylococcus</i>	13	-	-	-	-

Mediante secuenciación se logró identificar 25 especies bacterianas de las cuales 5 pertenecieron al género *Corynebacterium*, 4 a *Arthrobacter*, 4 a *Kocuria*, 3 a *Macrococcus*, 2 a *Brevundimonas*, 2 a *Microbacterium* y 5 especies más distribuidas entre los géneros *Listeria*, *Luteimonas*, *Citricoccus*, *Shewanella* y *Staphylococcus* (Anexo 6).

En el queso semimaduro se identificó un género bacteriano dominante, el *Arthrobacter*, y dos géneros subdominantes, *Corynebacterium* y *Kocuria*. Por otro lado, debido a que solo una cepa pigmentada fue aislada del queso amasado, ésta fue definida como la dominante en este producto y perteneció al género *Macrococcus*.

La leche cruda y el requesón demostraron la mayor diversidad de géneros, siendo el *Microbacterium* el de mayor abundancia relativa en la leche con un 25%; mientras que en el requesón el dominio de bacterias pigmentadas fue compartido, sin la presencia de un género dominante.

En el caso del queso fresco se identificaron dos géneros dominantes, *Brevundimonas* y *Corynebacterium*, con 29% de abundancia relativa y un subdominante con 14%, denominado *Luteimonas* (Tabla 2).

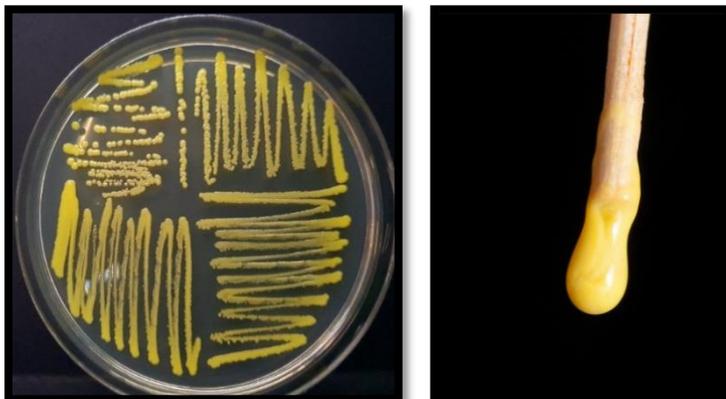
**Tabla 3.** Abundancia relativa de especies bacterianas en función del total de cepas aisladas de cada muestra.

	Leche cruda	Queso amasado	Queso fresco	Queso semimaduro	Requesón
Especies	Porcentaje de abundancia relativa				
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	-	-	-	10	-
<i>Arthrobacter bergerei</i>	-	-	-	10	-
<i>Arthrobacter gandavensis</i>	-	-	-	20	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i>	-	-	29	-	-
<i>Citricoccus nitrophenolicus</i>	-	-	-	-	17
<i>Corynebacterium flavescens</i>	-	-	14	20	-
<i>Corynebacterium variabile</i>	-	-	14	-	17
<i>Kocuria rhizophila</i>	13	-	-	20	17
<i>Listeria innocua</i>	13	-	-	-	-
<i>Luteimonas terrae</i>	-	-	14	-	-
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	13	100	-	-	17
<i>Microbacterium flavum</i>	13	-	-	-	-
<i>Microbacterium oxydans</i>	13	-	-	-	-
<i>Shewanella xiamenensis</i>	-	-	-	-	17
<i>Staphylococcus devriesei</i>	13	-	-	-	-

En la identificación de especies las tendencias de dominio y subdominio fueron similares a las obtenidas de los géneros, tal y como lo refleja la Tabla 3.

### 2.3. Caracterización biotecnológica

Se seleccionaron cuatro cepas en función del color e intensidad de su pigmentación para ser caracterizadas biotecnológicamente (Figuras 2, 3, 4 y 5).



**Figura 2.** *Kocuria rhizophila* (37) en medio semisólido y en suspensión.



**Figura 3.** *Microbacterium oxydans* (49) en medio semisólido y en suspensión.

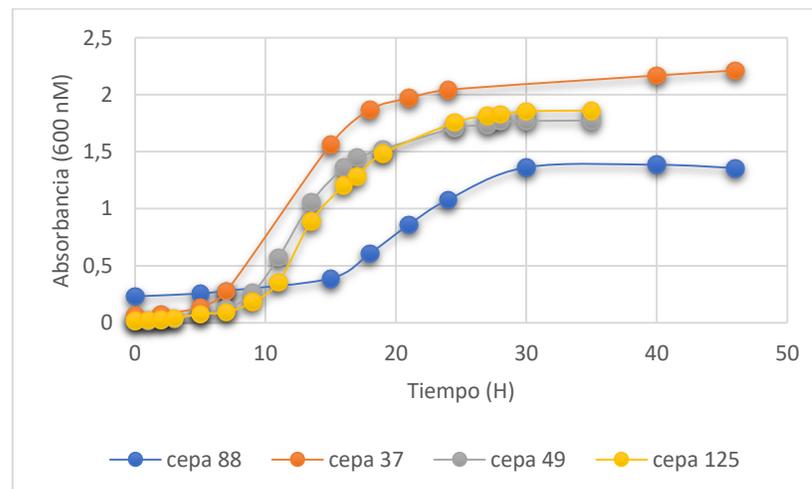


**Figura 4.** *Corynebacterium flavescens* (88) en medio semisólido y en suspensión.

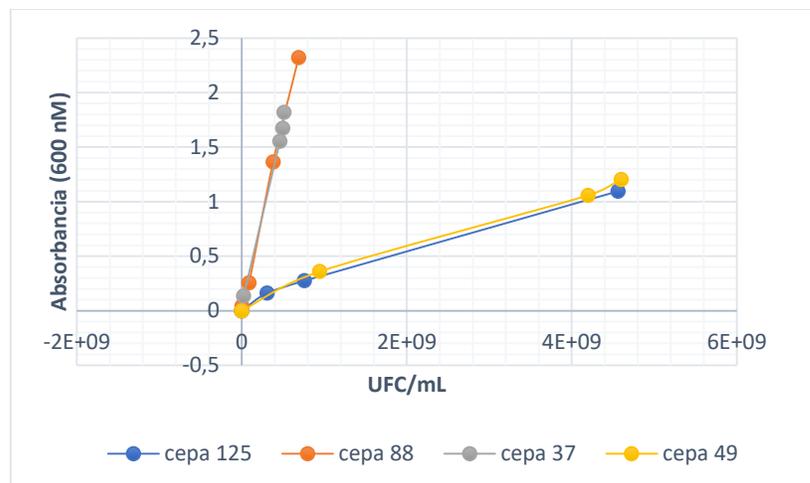


**Figura 5.** *Brevundimonas vesicularis* (125) en medio semisólido y en suspensión.

### 2.3.1 Curvas de crecimiento y calibración



**Figura 6.** Curvas de crecimiento cepas 37, 49, 88 y 125.



**Figura 7.** Curvas de calibración cepas 37, 49, 88 y 125.

**Tabla 4.** Ecuaciones de correlación entre absorbancia y concentración bacteriana en UFC/mL

Especie	Ecuación	Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>
<i>Kocuria rhizophila</i> (37)	$y = 3E-09x + 0.0248$	0.9974
<i>Microbacterium oxydans</i> (49)	$y = 2E-10x + 0.0542$	0.9904
<i>Corynebacterium flavescens</i> (88)	$y = 3E-09x + 0.008$	0.9978
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (125)	$y = 2E-10x + 0.0618$	0.991

x: concentración de bacterias en la suspensión expresada en UFC/mL  
y: absorbancia a 600nm

Los datos obtenidos de las curvas de crecimiento demostraron el tiempo en que cada cepa inicia y termina su etapa de crecimiento exponencial (Figura 6). A partir de esta gráfica se elaboró la curva de calibración (OD<sub>600</sub> vs UFC/mL), la misma que al presentar una tendencia lineal (Figura 7), permitió obtener la ecuación de la recta y con ello se determinó las UFC/mL en función de las lecturas de OD<sub>600</sub> (Tabla 4).

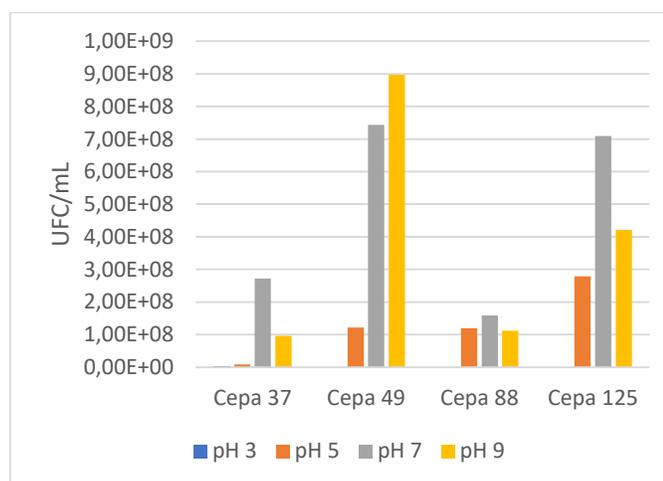
Se presentaron diferencias entre el tiempo de inicio y fin de la etapa de crecimiento exponencial entre la especie *Corynebacterium flavescens* (88), en la cual esta fase duró entre las horas 15 y 30 de incubación, comparada con el resto de las cepas, cuyo tiempo de inicio osciló entre las 7 y 9 horas, y terminó entre las 18 y 24 horas de incubación.

## 2.3.2. Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento bacteriano

### 2.3.2.1 Efecto del pH

El pH óptimo de crecimiento para *Kocuria rhizophila* (37), *Corynebacterium flavescens* (88) y *Brevundimonas vesicularis* (125) fue de 7, mientras que para *Microbacterium oxydans* (49) fue pH 9. *Kocuria rhizophila* demostró que puede crecer bajo condiciones alcalinas (pH 9) pero su desarrollo es muy bajo en medios con pH ácido. *C. flavescens* y *B. vesicularis* presentaron tolerancia tanto a condiciones alcalinas de pH 9 y levemente ácidas de pH 5, mientras que *M. oxydans* demostró un buen crecimiento a pH neutro a pesar de que su óptimo fue pH 9, sin embargo, su tolerancia a pH levemente ácido fue baja (Figura 8).

En lo que concierne al efecto del pH sobre el nivel de pigmentación de las bacterias, se denotó que no hubo cambios significativos en la pigmentación de *C. flavescens* y *B. vesicularis*, mientras que para *K. rhizophila* y *M. oxydans*, el pH 3 provocó que el color se opaque levemente (Anexo 7).

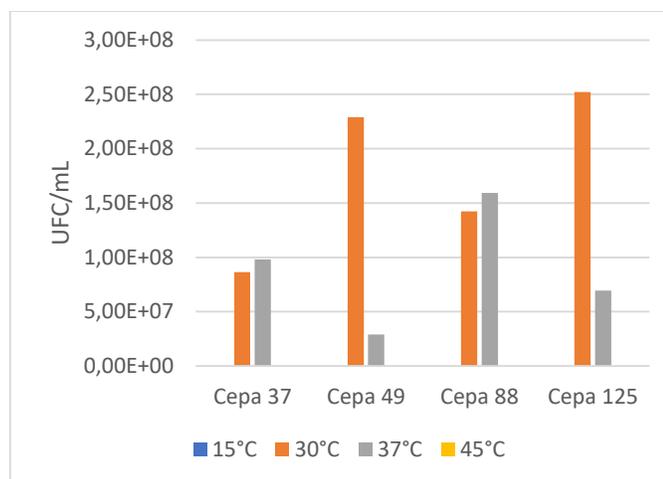


**Figura 8.** Crecimiento expresado en UFC/mL de suspensión de bacterias pigmentadas a diferentes valores de pH.

### 2.3.2.2. Efecto de la temperatura

Las cuatro cepas de estudio no presentaron crecimiento a 15 y 45°C de incubación. La temperatura óptima de crecimiento para *Corynebacterium flavescens* (88) y *Kocuria rhizophila* (37) fue de 37°C, pero presentaron un muy buen desarrollo a 30°C. Por otro lado, para *Microbacterium oxydans* (49) y *Brevundimonas vesicularis* (125) la temperatura óptima fue de 30°C, exhibiendo un bajo desarrollo a 37°C, especialmente la cepa 49 ya que su crecimiento fue casi nulo (Figura 9).

Al exponer los pellets bacterianos a las diferentes temperaturas, no se denotaron cambios sobre el color aparente de las bacterias (Anexo 8).



**Figura 9.** Crecimiento expresado en UFC/mL de suspensión de bacterias pigmentadas a diferentes temperaturas de incubación.

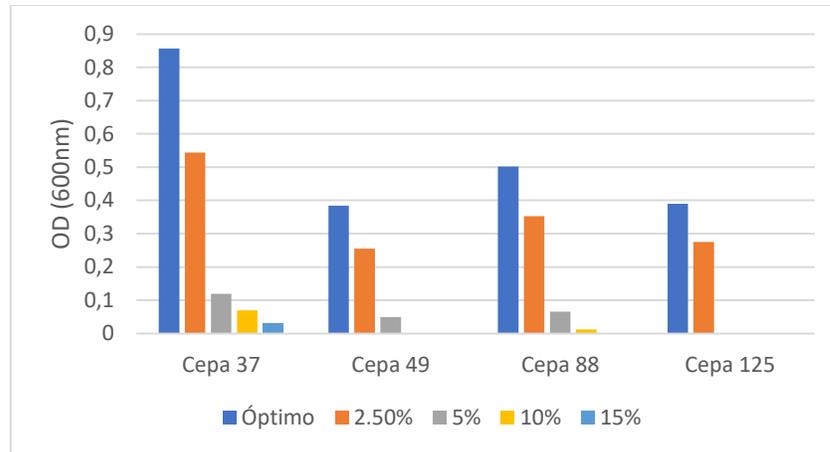
### 2.3.3. Efecto del cloruro de sodio

Las 4 cepas presentaron resultados similares de resistencia a concentraciones de 2.5% de NaCl, no obstante, a partir del 5% de salinidad se evidenciaron diferencias entre la respuesta de cada bacteria en estas condiciones.

**Tabla 5.** Porcentaje de resistencia de las bacterias pigmentadas a diferentes concentraciones de NaCl.

Especie bacteriana	Concentraciones de NaCl			
	2.50%	5%	10%	15%
	Porcentajes de resistencia			
<i>Kocuria rhizophila</i> (37)	62.4	18.3	5.4	0.6
<i>Microbacterium oxydans</i> (49)	61.0	7.5	-	-
<i>Corynebacterium flavescens</i> (88)	69.8	11.7	0.8	-
<i>Brevundimonas vesicularis</i> (125)	62.2	-	-	-

Como se refleja en la Tabla 5 todas lograron crecer en un medio con 2.5% de NaCl presentando valores entre 60 y 70% de resistencia. Para el medio con 5% de NaCl las especies *Kocuria rhizophila* (37) y *Corynebacterium flavescens* (88) demostraron mayor resistencia con valores de 18.3 y 11.7% respectivamente, seguidas de la *Microbacterium oxydans* (49) con un valor más bajo de 7.5%.

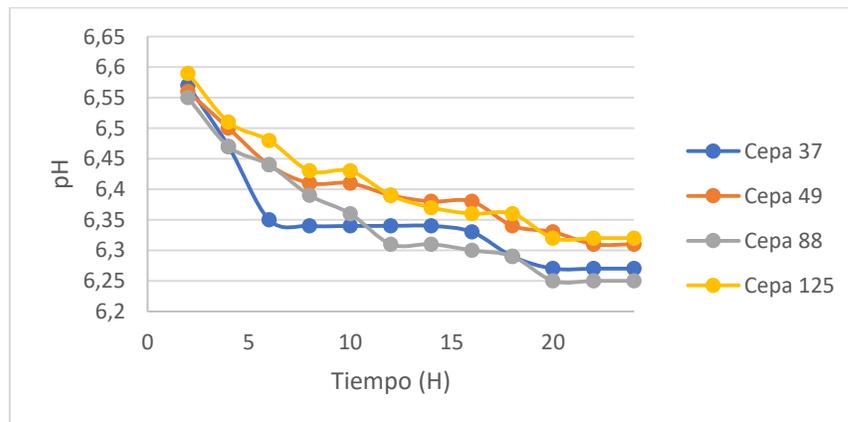


**Figura 10.** Crecimiento expresado en OD<sub>600</sub> de suspensión de bacterias pigmentadas a diferentes concentraciones de NaCl.

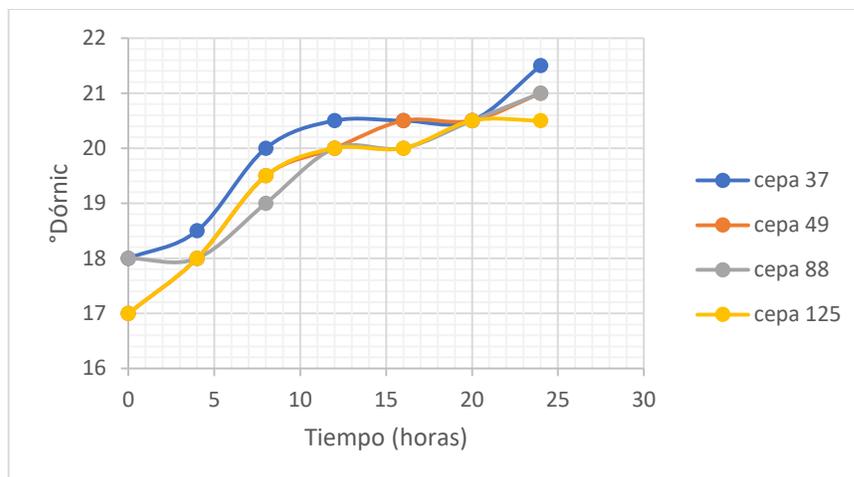
En términos generales se puede decir que las bacterias con mayor característica halófila fueron *Kocuria rhizophila* ya que sobrevivió en un medio con 15% de NaCl y *Corynebacterium flavescens* que toleró un medio con 10% de NaCl (Figura 10). La concentración de NaCl no provocó cambios sobre el color aparente de las bacterias estudiadas con excepción de la especie *Kocuria rhizophila* en la que se observó un opacado leve del color en todas las concentraciones de sal (Anexo 9).

#### 2.3.4. Capacidad acidificante

Las cuatro cepas estudiadas lograron reducir el pH inicial de la leche. Después de las 24 horas de incubación las especies *Corynebacterium flavescens*, *Kocuria rhizophila*, *Microbacterium oxydans* y *Brevundimonas vesicularis* disminuyeron el pH del sustrato desde un valor de 6.59 hasta 6.25, 6.27, 6.31 y 6.32 respectivamente (Figura 11). El promedio de descenso del pH de las bacterias fue de 0.3 unidades.



**Figura 11.** Curva de descenso de pH

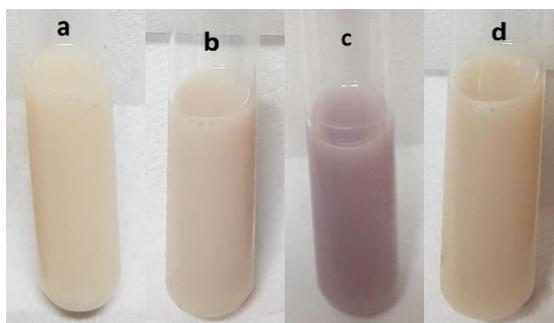


**Figura 12.** Curva de aumento de la acidez titulable expresada en grados Dórníc.

En concordancia con el descenso del pH, las bacterias estudiadas aumentaron la acidez titulable del sustrato desde un valor inicial entre 17 y 18°Dórníc, hasta un valor final entre 20.5 y 21°Dórníc, en un período de 24 horas (Figura 12). El valor promedio de aumento de la acidez de la leche lograda por las cuatro bacterias fue de 3.2°Dornic.

### 2.3.5. Capacidad proteolítica

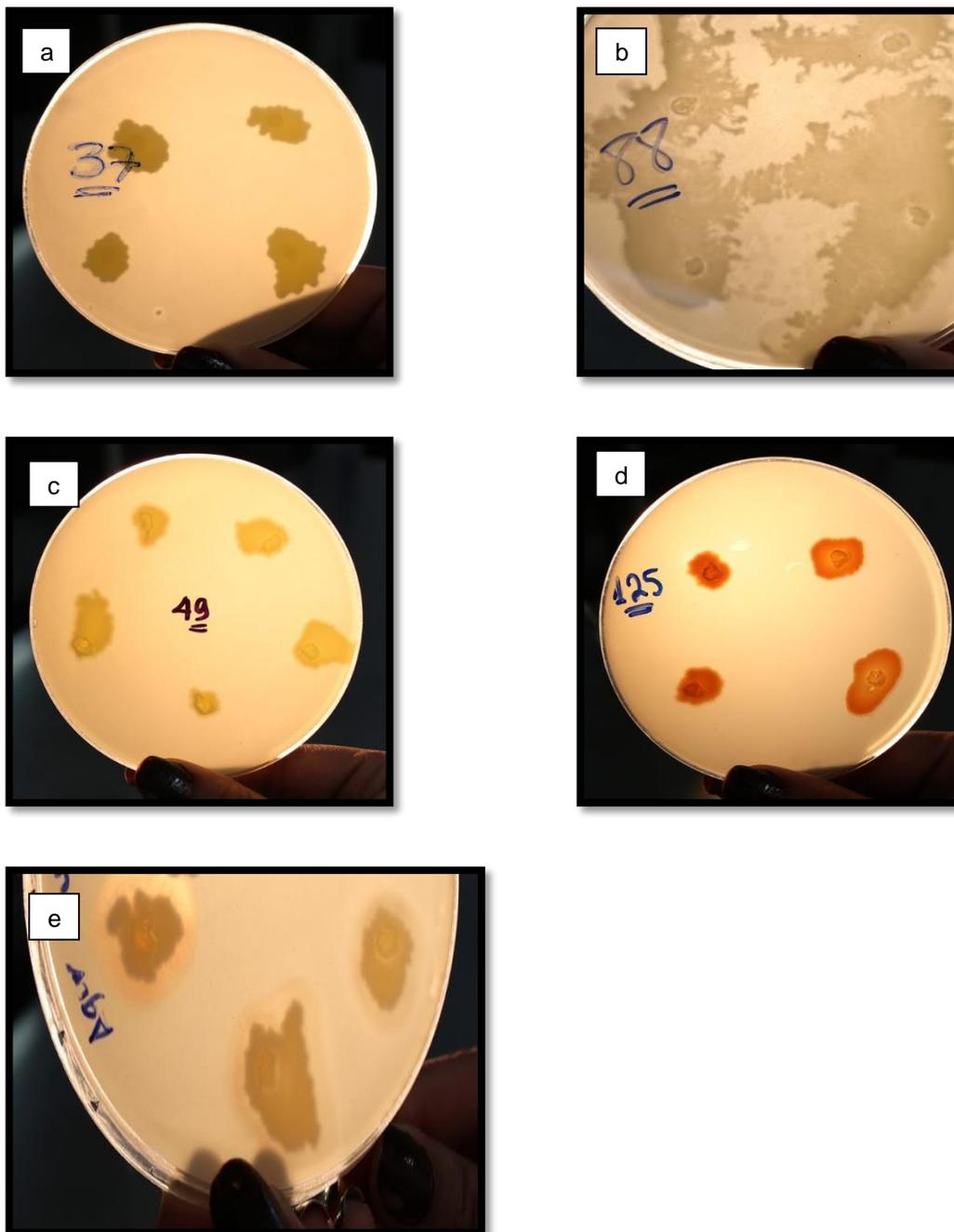
Las especies *Kocuria rhizophila* (37), *Microbacterium oxydans* (49) y *Brevundimonas vesicularis* (125), demostraron poseer una capacidad proteolítica a partir de los 5 días de incubación en el medio Litmus Milk. Por otro lado, la bacteria *Corynebacterium flavescens* (88) no presentó capacidad para hidrolizar proteínas, más bien, el tipo de reacción que provocó fue alcalina, debido a que no se evidenció ningún cambio en la coloración del medio Litmus Milk (Figura 13).



**Figura 13.** Reacciones en el medio Litmus Milk para determinación de capacidad proteolítica de las 4 cepas de estudio. A: Cepa 37 proteólisis positiva a los 5 días de incubación; b: cepa 49 proteólisis positiva a los 6 días de incubación; c: cepa 88 reacción alcalina y d: cepa 125, proteólisis positiva a los 5 días de incubación.

### 2.3.6. Capacidad lipolítica

Ninguna de las cuatro cepas de estudio presentó capacidad lipolítica, ya que no se evidenciaron halos alrededor de las colonias, después de ser sembradas en un medio suplementado con nata al 2.5%. Sin embargo, si se observaron halos de lipólisis en el control positivo (Figura 14), lo que implica que el método se llevó a cabo correctamente.



**Figura 144.** Bacterias sembradas en agar nata para determinación de actividad lipolítica. a: *Kocuria rhizophila* (37), b: *Corynebacterium flavescens* (88), c: *Microbacterium oxydans* (49), d: *Brevundimonas vesicularis* (125), e: *S. aureus* (control positivo).

### 2.3.7. Extracción y aplicación de los pigmentos bacterianos

Se obtuvieron los biopigmentos en bruto, el amarillo proveniente de *Kocuria rhizophila* (37) y el naranja de *Brevundimonas vesicularis* (125), en forma de polvo gracias al proceso de liofilización. Los liofilizados fueron suspendidos en una solución de etanol 70% y glicerol en proporción 1:3 v/v para su posterior uso en la formulación de los caramelos masticables de gelatina “gomitas” (Figura 15).

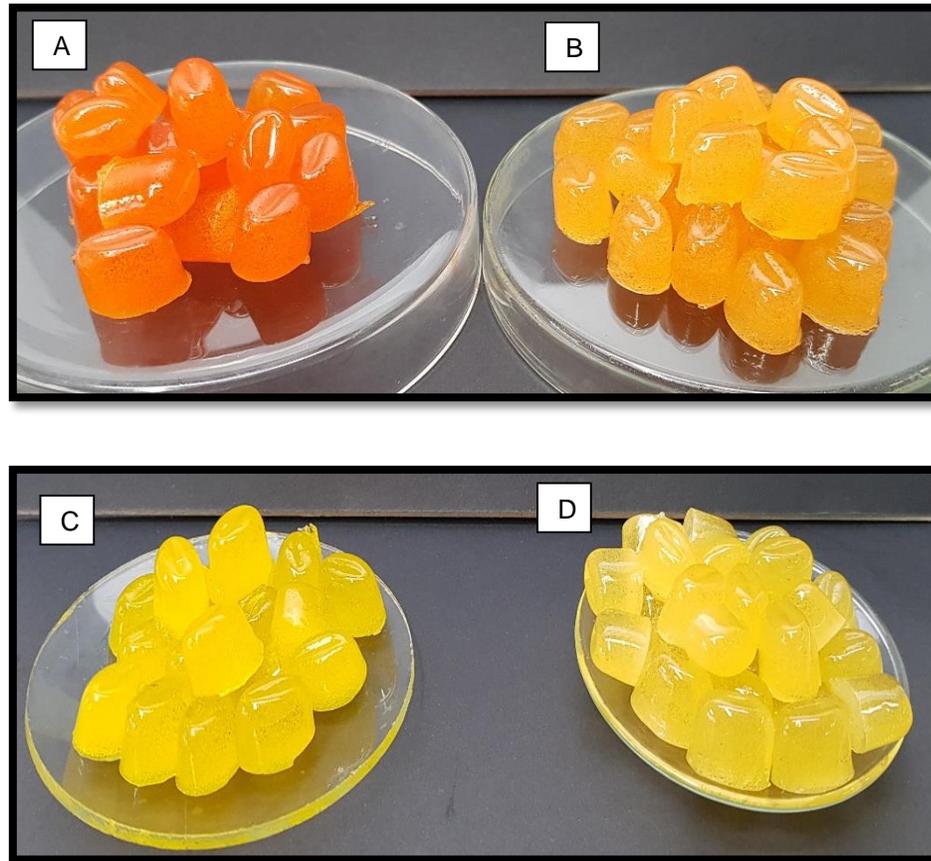


**Figura 15.** Pigmento bruto naranja y amarillo en suspensión.

Las suspensiones de los pigmentos bacterianos amarillo y naranja se prepararon en una concentración al 60% y 40% de polvo de pigmento bruto, respectivamente, utilizando como vehículo la solución de etanol-glicerol 1:3 v/v. Cabe recalcar que la adición de la solución vehículo se realizó hasta observar homogeneidad de la suspensión sin presencia de grumos.

Para aplicar el colorante artificial naranja se mezcló volúmenes iguales de colorante amarillo y rojo. La concentración de dichos colorantes fue de 85% y 88% para el amarillo y rojo, respectivamente. Las fichas técnicas se exponen en el Anexo 10.

Como resultado de la comparación visual se obtuvo que la intensidad aparente del color de los caramelos con pigmento bacteriano naranja fue marcadamente más baja que la de los pintados con el colorante artificial, mientras que en los caramelos amarillos la diferencia fue leve. Sin embargo, la cantidad empleada de pigmento bacteriano amarillo fue diez veces mayor que la cantidad aplicada del colorante artificial del mismo color, de la misma manera la cantidad de pigmento naranja fue tres veces mayor a la de su homólogo artificial (Figura 16).



**Figura 116.** Aplicación de pigmentos bacterianos en gomitas. A: gomitas con colorante artificial naranja, B: gomitas con pigmento bacteriano naranja, C: gomitas con colorante artificial amarillo y D: gomitas con pigmento bacteriano amarillo.

## CAPÍTULO III

### DISCUSIÓN

La leche animal por ser un alimento completo, es el medio ideal para el crecimiento de diferentes microorganismos como bacterias, hongos y levaduras, los cuales a lo largo del tiempo, se han adaptado para sobrevivir en este nicho ecológico. (Agudelo y Bedoya 2005, Rubio-Teixeira 2007).

Los lácteos artesanales poseen una compleja y diversa microbiota debido a que se elaboran a partir de leche cruda (Yoon et al 2016). Es importante mencionar que los microorganismos encontrados en este tipo de alimentos no solo provienen de la leche, sino también de los intestinos de animales, del pasto, del ambiente de producción y del ser humano (Montel et al 2014).

#### 3.1. Identificación morfológica y molecular

En el queso semimaduro se identificaron la mayor cantidad de cepas bacterianas pigmentadas, con un 31%. Esto concuerda con diversas investigaciones realizadas sobre el análisis de la flora bacteriana en quesos madurados de pigmentación natural (Bockelmann y Hoppe-Seyler 2001, Brennan et al 2001, Galaup et al 2005). En estos estudios reconocen que las condiciones del proceso de maduración y la acción metabólica de las levaduras sobre la superficie de los quesos, favorecen el crecimiento de bacterias pigmentadas.

Según Galaup et al (2005), las bacterias corineformes son predominantes en la superficie de los quesos madurados. Cabe acotar que se les considera “bacterias corineformes” a las especies que pertenecen, entre otros géneros, a *Brevibacterium sp.*, *Corynebacterium sp.* y *Arthrobacter sp.* (Bockelmann y Hoppe-Seyler 2001). En este aspecto se justifica la gran abundancia relativa presentada por los géneros *Arthrobacter* y *Corynebacterium* en el queso semimaduro.

En el queso fresco los géneros dominantes identificados fueron *Corynebacterium* y *Brevundimonas* con un valor igual de abundancia relativa de 29%. La presencia de *Corynebacterium* está justificada debido a que los productos lácteos forman parte de los hábitats comunes de este género (Barksdale et al 1979). Sin embargo, en estudios realizados sobre la microflora de algunos quesos frescos artesanales como el de Alessandria et al (2010), Golic et al (2013) y Bozoudi et al (2016), no se reporta la presencia del género *Brevundimonas*. Esto puede ser debido a que se produjo una contaminación a través del agua empleada durante la elaboración artesanal de este tipo de queso, ya que especies como la *Brevundimonas vesicularis* se encuentran comúnmente en el agua y el suelo (Segers et al 1995).

En el queso amasado solo se identificó una especie, *Macroccoccus caseolyticus*. Esto puede ser debido a que el queso amasado típico de Jima presenta una concentración de sal mayor a la de un queso fresco regular, lo que limita el crecimiento de diversas bacterias pigmentadas que no

poseen capacidad halotolerante. Kloos et al (1998) describe a *M. caseolyticus* como una bacteria que presenta un buen desarrollo en sustratos con 10% de cloruro de sodio, lo cual explica su capacidad para sobrevivir en este alimento.

En el requesón y la leche cruda se manifestó una alta diversidad de bacterias pigmentadas, en ambos casos no se evidenció dominancia de una especie en específico ya que todas presentaron iguales valores de abundancia relativa. Todos los géneros y algunas de sus especies identificadas en la leche cruda coinciden con la flora bacteriana normal de este alimento descrita en las investigaciones de Hantsis-Zacharov y Halpern (2007) y Baur et al (2015).

El requesón que se produce en el Austro ecuatoriano se caracteriza por ser un tipo de queso fresco con poco o nulo contenido de sal, lo que favorece la proliferación de variedad de bacterias, esto se refleja en diversidad encontrada en este estudio y que coincide con los hallazgos de Alessandria et al (2010), Golic et al (2013) y Bozoudi et al (2016).

La presencia de *Macrococcus caseolyticus* y *Kocuria rhizophila* se repitió en la mayoría de los alimentos de este estudio. Estas dos bacterias comparten varias características, ambas son halotolerantes, forman parte de la microbiota normal del ganado y carnes crudas. Además, presentan actividad proteolítica, siendo capaces de hidrolizar la caseína (Moriguchi et al 1994, Kloos et al 1998, Kovács et al 1999, Randazzo et al 2002). Todo esto justifica y explica la presencia de estas dos bacterias en la leche y sus derivados, especialmente los de elaboración artesanal. Al mismo tiempo, coincide con los hallazgos del estudio de Alessandria et al (2010)

### **3.2. Caracterización biotecnológica**

Las características reportadas por Wieser et al (2002) acerca de las condiciones ideales de crecimiento de *Kocuria rhizophila* coincidieron con los resultados de este trabajo. La baja tolerancia a pH ácido presentada por esta bacteria se confirma al ser identificada mayoritariamente en el queso semimaduro. Brennan et al (2002) y Galaup et al (2005) coinciden en que durante la maduración de los quesos, la acción metabólica de las levaduras provocan el aumento del pH del sustrato, lo que promueve el crecimiento de bacterias catalasa positivas y halotolerantes.

En concordancia con lo expuesto, Kovács et al (1999) describen a *K. rhizophila* como una bacteria que presenta un buen crecimiento a una concentración de 10% de NaCl y débil crecimiento a 15% de NaCl, lo que concuerda con los valores obtenidos.

Al igual que *Kocuria rhizophila*, la bacteria *Corynebacterium flavescens* también se considera como una especie halotolerante, puesto que, reportó resistencia a concentraciones de NaCl de hasta el 10%, resultado que coincide con expuesto por Barksdale et al (1979) y Masoud y Jakobsen (2003). De la misma forma, *C. flavescens* se identificó en el queso semimaduro pero también tuvo una presencia importante en las muestras de queso fresco. El pH de los quesos

frescos artesanales es ligeramente ácido, con valores desde 5.3 hasta 6.15 (Gaber et al 2006). *C. flavescens* demostró un muy buen crecimiento a pH 5 a pesar de que su óptimo fue de 7; esto justifica su presencia en este alimento.

La bacteria *Microbacterium oxydans* demostró un crecimiento óptimo a pH 9 y un muy buen crecimiento a pH neutro. Sin embargo, su capacidad de tolerar la acidez es casi nula. Estos resultados concuerdan con lo estudiado por Shaopeng Yan et al (2013), que reportan que *M. oxydans* son bien adaptadas a condiciones alcalinas, con un óptimo de crecimiento a pH 8. Esto se relaciona con que esta especie solo se encontró en la leche cruda, cuyo pH es muy cercano a la neutralidad. La inexistencia de esta bacteria en el queso semimaduro se puede deber a que durante la cuagulación de la leche, el pH ácido del medio provocó su completa eliminación.

En su mismo trabajo, Shaopeng Yan et al (2013) evidencia que *M. oxydans* tolera condiciones de salinidad de 3%, lo que concuerda con sus resultados de resistencia a NaCl en este estudio.

En el año 1994 Segers y colaboradores reclasificaron a las bacterias *Pseudomonas vesicularis* como *Brevundimonas vesicularis*. En el presente trabajo se estudió a la especie *Brevundimonas vesicularis*, la cual se identificó únicamente en el queso fresco. Este aspecto se justifica puesto que esta bacteria reportó un desarrollo aceptable en condiciones ligeramente ácidas de pH 5, a pesar de que su óptimo es la neutralidad (Segers et al 1994). Por otro lado, esta especie no tolera condiciones salinas de más de 2.5% de NaCl. Estos valores se relacionan con las condiciones que Kawagoshi y Fujita (1998) ajustaron para lograr un crecimiento rápido de este microorganismo.

Con respecto al efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano, se evidenció que ninguna de las cepas estudiadas demostró desarrollo al ser incubadas a 15 y 45°C. Su prevalencia en este tipo de lácteos artesanales se debe a que la leche que se emplea en la elaboración de estos alimentos se mantiene cruda, es decir, no es sometida a temperaturas de pasteurización que llegan a los 74°C (Montel et al 2014, Yoon et al 2016). Además, se debe tomar en cuenta que el ambiente de producción y el ser humano pueden ser la fuente de donde éstas bacterias se trasladen al alimento (Montel et al 2014).

No se han realizado estudios específicos sobre los efectos que suponen los cambios de temperatura, pH y concentración de cloruro de sodio sobre el color aparente de las colonias de *Kocuria rhizophila*, *Microbacterium oxydans* y *Brevundimonas vesicularis*. En este trabajo se llevó a cabo este análisis de manera cualitativa en el cual se determinó que el color presentado por *K. rhizophila* se torna opaco frente a sal y valores altos de acidéz; para el resto de las especies estudiadas estos factores no modificaron su color aparente. Sin embargo, los resultados de *Corynebacterium flavescens* difieren de lo investigado por Masoud y Jakobsen (2003), quienes

reportaron que el pH y la concentración de cloruro de sodio juegan un papel importante sobre la intensidad de pigmentación de esta bacteria, cuyo óptimo fue de 4% de NaCl y pH 7.

La capacidad de acidificación de las bacterias es de vital importancia en la industria láctea debido a que contribuye a inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes a lo largo del proceso productivo (Alvarado et al 2007; Morais 2004), además la acumulación de ácido láctico y otros ácidos producidos por estas bacterias facilitan la coagulación de la leche y subsiguiente formación de la cuajada, en la elaboración de quesos (Narváez 2015).

En este estudio las cuatro cepas no presentaron una rápida capacidad acidificante, puesto que en 24 horas apenas lograron bajar el pH hasta un valor de 6.25, partiendo de 6.57; en comparación con la capacidad reportada por las BAL, que disminuyen el pH hasta 5.3 dentro de las primeras 6 horas de inoculación (Rivas et al 2007, Beresford et al 2008). Con esto se puede decir que las cepas estudiadas no se podrían emplear como cultivos starter en la industria láctea.

Por otro lado, tres de las cuatro cepas, *Kocuria rhizophila*, *Brevundimonas vesicularis* y *Microbacterium oxydans*, presentaron una baja capacidad proteolítica, en concordancia con los estudios de Kovács et al (1999), Wieser et al (2002), Hantsis-Zacharov y Halpern (2007) y Baur et al (2015), lo cual es positivo ya que como lo indican McSweeney y Sousa (2000) un exceso de proteólisis está fuertemente asociado a la descomposición del alimento.

Según Akabanda et al (2014) aquellas bacterias con lenta capacidad proteolítica y acidificante suelen ser utilizadas como cultivos secundarios y/o adjuntos en función de otras características deseadas. Este tipo de cultivos son importantes porque proveen características y funciones bien definidas en los derivados lácteos, como por ejemplo la producción de gas, aspecto, coloración y desarrollo de sabores y aromas típicos (Irlinger et al 2017).

En el presente estudio ninguna de las cepas presentó capacidad lipolítica. Investigaciones como las de Kovács et al (1999) y Baur et al (2015) descartan esta característica en las bacterias *Kocuria rhizophila*, *Microbacterium oxydans* y *Corynebacterium flavescens*. Sin embargo Segers (1994) describe una enzima ester lipasa, producida por *Brevundimonas vesicularis*, que degrada los ácidos grasos de cadena corta de 8 carbonos y Sakai et al (2014) estudió una enzima esterasa de *B. vesicularis* involucrada en la degradación de poli vinil alcohol. Se infiere que en este estudio no hubo lipólisis debido a que el sustrato empleado fue grasa láctea, en la cual predominan los ácidos grasos de cadena intermedia (89%) (García et al 2014). Este tipo de ácidos grasos son el sustrato óptimo para las enzimas lipasas, más no para las esterasas, por lo cual no se evidenció una lipólisis positiva para *B. vesicularis*.

### 3.3. Extracción y aplicación de pigmentos

Múltiples estudios se han propuesto la extracción de pigmentos de origen bacteriano, en los cuales el metanol ha sido el disolvente más empleado por lograr altos rendimientos de extracción en comparación con otros disolventes como el etanol, acetona, entre otros (Henriques et al 2007, Ahmad et al 2012, Vora et al 2014).

La aplicación de los dos pigmentos extraídos en bruto, el amarillo de la especie *Kocuria rizophila* y el naranja de *Brevundimonas vesicularis*, fue factible en los caramelos masticables de gelatina, comunmente llamados “gomitas”. Se apreció visualmente una afinidad entre el sustrato y el pigmento, ya que no se evidenció tonos desuniformes en el cuerpo del caramelo.

La intensidad de coloración aparente aportada por los biopigmentos bacterianos a los caramelos, fue muy baja comparada con la transferida por colorantes artificiales. Además, el volúmen necesario de biopigmento para colorear los caramelos fue notablemente más alto que el de los colorantes artificiales. Esto concuerda con Hardeep et al (2014), quienes reportaron que una gran desventaja de los pigmentos de origen microbiano, es su alto costo de producción por su bajo rendimiento frente a los pigmentos artificiales. Aunque los pigmentos bacterianos no alcanzaron la misma intensidad de coloración que los colorantes artificiales, su aplicación logró una apariencia más natural de los caramelos, lo que resulta de gran interés para la industria. La demanda de alimentos libres de aditivos artificiales y más saludables ha ido creciendo marcadamente año a año, tanto así que en Europa y en Asia se llevó a nivel comercial la producción de los pigmentos producidos por el hongo *Blakeslea trispora* y el moho *Monascus* (Samyuktha y Naphade 2016). Esto marca una tendencia que probablemente en los años futuros reduzca los costos de producción de este tipo de biopigmentos, haciendo posible la comercialización de productos de mayor calidad nutricional con un precio competitivo.

## CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que los lácteos artesanales de Jima poseen una gran diversidad de bacterias pigmentadas. *Kocuria rhizophila*, *Microbacterium oxydans* y *Brevundimonas vesicularis* demuestran una posible aplicación en procesos de elaboración de productos lácteos, puesto que poseen capacidad proteolítica y acidificante lenta, que son factores importantes durante la maduración de quesos. Además, la capacidad halotolerante de *K. rhizophila* y *M. oxydans* les permite emplearse como cultivos adjuntos en diversos derivados lácteos, en los que pueden cumplir con funciones como pigmentación y generación de sabores y aromas típicos. Sin embargo, es muy importante estudiar a fondo las características que garanticen la inocuidad y seguridad alimentaria de las distintas especies identificadas en este trabajo. A pesar de esto, la extracción y aplicación de los pigmentos bacterianos demuestran el gran potencial de estas especies como nuevas fuentes de biopigmentos para ser aprovechados por la industria.

## RECOMENDACIONES

Los futuros desafíos en este campo específico son varios, entre ellos el estudiar la posible capacidad de las estas bacterias para producir exopolisacáridos, debido a que provocaron un cambio en la consistencia y viscosidad de los cultivos líquidos.

Se recomienda un estudio exhaustivo del papel que cumple el género *Corynebacterium* en los alimentos lácteos artesanales, especialmente su especie *C. flavescens*, puesto que, con los análisis realizados y resultados obtenidos en el presente trabajo, esta bacteria aparentemente no posee cualidades de interés en la industria láctea.

Sería también interesante un estudio completo de los pigmentos producidos por las bacterias descritas en este trabajo puesto que se han identificado diversas características funcionales en los pigmentos de origen microbiano.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad W. A., Wan Ahmad W. Y., Zakaria Z. A., Yusof N. Z. "Application of Bacterial Pigments as Colorant." *Springer* (2012): 25-44. [en línea].  
<[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-24520-6\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-24520-6_4)>.
- Akabanda F., Owusu K. J., Tano D. K., Parkouda C., Jerpersen L. "The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of Nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana ." *International Journal of Food Science* (2014).
- Alessandria, Dolci, Rantsiou, Pattono, Dalmaso. "Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands." *World J Microbiol. Biotechnol.* (2010).
- Alvarado C., Chacón Z., Otoniel J., Guerrero B., López G. "Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas de un Queso Venezolano Ahumado Andino Artesanal. Su uso como Cultivo Iniciador." *Revista Científica* (2007): 301-308. [en línea].  
<[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592007000300014](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592007000300014)>.
- Amor K, Vaughan E, de Vos W. "Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria." *The Journal of Nutrition* (2007): 741-747.  
<<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/137/3/741S/4664733>>.
- Amornrat, Deng-Cheg, Adisorn, Aphacha, Chirapiphat, Wanwisa, Fa-Jui. "Lactic acid bacterial population dynamics during fermentation and storage of Thai fermented sausage according to restriction fragment length polymorphism analysis." *International Journal of Food Microbiology* (2014): 61-67.
- Amorcho-Cruz, C. *Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra*. Tesis doctoral. España: UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA, 2011.
- Asteri I, Robertson N, Kagkli D, Andrewes P, Nychas G, Coolbear T, Holland R, Crow V, Tsakalidou E. "Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional greek cheeses - A pool of novel species and starters." *Elsevier* (2009): 595-604.
- Asteri, et al. "Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses – A pool of novel species and starters." *Elsevier* (2009): 595-604. [en línea].
- Bakin A, Ofengand J. "A high sensitivity method for sequencing RNA: application to ribosomal RNA." *BioTechniques* (1992): 682-683.
- Barksdale L., Laneelle M., Pollice M. "Biological and Chemical Basis for the Reclassification of *Microbacterium flavum* Orla- Jensen as *Corynebacterium flavescens* nom. nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* (1979): 222-233.
- Baur C., Krewinkel M., Kranz B., Neubeck M., Wenning M., Scherer S., Stoeckel M., Hinrichs J., Stressler T., Fischer L. "Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk." *International Dairy Journal* (2015): 23-29. [en línea]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694615000928>>.

- Becker, et al. "Kocuria rhizophila Adds to the Emerging Spectrum of Micrococcal Species Involved in Human Infections." *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* (2008): 3537-3539.
- Beresford, Fitzsimons, Brennan, Cogan. "Recent advances in cheese microbiology." *Elsevier* (2001): 259-274.
- Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I. *American Society for Nutritional Sciences* (2002): 506-510. <<https://academic.oup.com/jn/article-abstract/132/3/506S/4687202>>.
- Bhatawadekar S, Sharma J. "Brevundimonas vesicularis bacteremia: A rare case report in a female infant." *Indian Journal of Medical Microbiology* (2011): 420-422. <<http://www.ijmm.org/text.asp?2011/29/4/420/90184>>.
- Bockelmann, Hoppe-Seyler. "The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk." *Elsevier* (2001): 307-314.
- Bonifaz, Ramírez, Rodríguez, Hernández. "Tricomycosis (trichobacteriosis) en un infante. Aspectos microbiológicos, dermatoscópicos y ultraestructurales Trichomycosis (trichobacteriosis) capitis in an infant. Microbiological, dermoscopic and ultrastructural features." *Revista Chilena de Pediatría* (2016).
- Bozoudi, Torriani, Zdragas, Litopoulou. "Assessment of microbial diversity of the dominant microbiota in fresh and mature PDO Feta cheese made at three mountainous areas of Greece." *Elsevier* (2016): 525-533.
- Brennan, Ward, Beresford, Fox, Goodfellow. "Biodiversity of the Bacterial Flora on the Surface of a Smear Cheese." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (2002): 820-830.
- Caplice, Fitzgerald. "Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation." *Elsevier* (1999): 131-149.
- Chen, Daniel, Coolbear. "Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders." *Elsevier* (2003): 255-275.
- Chun-Cheng, Hui-Jine, Chien-Ming. "Brevundimonas vesicularis bacteremia resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole and ceftazidime in a tertiary hospital in southern Taiwan." *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* (2012).
- Díaz, M. *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias productoras de histamina en queso*. Universidad de Oviedo. Oviedo, 2012.
- Englen M., Kelley L. "A rapid DNA isolation procedure for the identification of Campylobacter jejuni by the polymerase chain reaction." *The Society for Applied Microbiology* (2000).
- Englen, Kelley. "A rapid DNA isolation procedure for the identification of Campylobacter jejuni by the polymerase chain reaction." *The Society for Applied Microbiology* (2000): 421-426.

- F. Abu-Bakar, S. Abdulmir, N. Nordin. "Methods to precise molecular detection of probiotic microflora: using adjusted molecular biology protocols, primer sets and PCR assays." *Biotechnology* (2010): 25-32.
- Flores M., Zavaleta A., Chávez E. "Bacterias halotolerantes con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana San Martín." *Ciencia e Investigación* (2010): 87-91. [en línea]. <<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3232>>.
- Fox P., Stepaniak L. "Enzymes in Cheese Technology." *Elsevier* (1993): 509-530.
- Gaber, Delacroix-Buchet, Ogier. "Biodiversity of Bacterial Ecosystems in Traditional Egyptian Domiat Cheese." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (2007): 1248-1255.
- Galaup, Flamin, Dufosse. "HPLC analysis of the pigments produced by the microXora isolated from the 'Protected Designation of Origin' French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot." *Elsevier* (2005).
- García, Montiel, Borderas. "Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación." *Arch. Zootec.* (2014).
- Garrity G, et al. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. Second Edition. Vol. 2. Epsilonproteobacteria, 2005.
- Golic, Cadez, Terzic, Suranska, Beganovic. "Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia." *Elsevier* (2013): 294-300.
- Gómez A., Naranjo D., Montoya O., Gallego D. "Caracterización de un pigmento naranja producido por una cepa nativa de bacillus spp." *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* (2007): 55-61. [en línea]. <<http://www.redalyc.org/html/1812/181221557006/>>.
- Gómez, Kiciubinski, Pérez, Antoni. "Isolation and Characterization of Bifidobacterium Strains for Probiotic Formulation." *Journal of Food Protection* (1998): 865-873.
- Guamán, Carvajal. "Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador." *Universitas SCIENTIARUM* (2009): 187-197.
- Hantsis-Zacharov, Halpern. "Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (2007): 7162-7168.
- Hardeep, Chaudhary, Beniwal. "Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives." *Food Science Technology Journal* (2015): 4669-4678.
- Henriques M., Silva A., Rocha J. "Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method." *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (2007): 586-593. [en línea]. <[http://www.seacolors.eu/images/Extraction\\_and\\_quantification\\_of\\_pigments\\_from\\_a\\_marine\\_.pdf](http://www.seacolors.eu/images/Extraction_and_quantification_of_pigments_from_a_marine_.pdf)>.

- Hien T, Chang S. "Luteimonas terrae sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Radix ophiopogonis*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2016): 1920-1925.
- Inlinger F, Yuen In Yung, Sarthou A, Delbes C, et al. "Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese." *International Journal of Food Microbiology* (2012): 332-338. en línea.
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J. "Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of B-carotene and xanthophylls in plants." *American Society of Plant Biologists* (2002): 333-342. The plant cell Volumen 14.
- Jung E., Fathoni A., Jeong G., Jeong H., Nam T., Kong I., Kim J. "Microbacterium oxydans, a novel alginate- and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste." *Journal of Environmental Management* (2013): 153-159. [en línea]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479713005902>>.
- Kaur H., Singh R., Singh H., Kumar V. "Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications." *ResearchGate* (2016). [en línea]. <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-016-0378-x>>.
- Kawagoshi Y., Fujita M. "Purification and properties of the polyvinyl alcohol-degrading enzyme 2,4-pentanedione hydrolase obtained from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (1998): 95-100. [en línea]. <<https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1008884719267>>.
- Kerstens, et al. "Recent Changes in the Classification of the Pseudomonads: an Overview." *System. Appl. Microbiol.* (1996).
- Kloos, Ballard, George, Webster, Hubner. "Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperficus* Spm nov., *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* (1998): 859-877.
- Kociubinski G., Pérez P., Antoni G. "Screening of Bile Resistance and Bile Precipitation in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria." *Journal of Food Protection* (1999).
- Kovacs, Burghardt, Pradella, Schumann. "*Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov. isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*)." *International Journal of Systematic Bacteriology* (1999): 167-173.
- Lebos Pavunc A, Beganovic J, Kos B, Uroic K, Blazic M, Suskovic J. "Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production." *Food Technology and Biotechnology* (2012): 141-151.
- Leroy F, De Vuyst L. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." *Elsevier* (2004): 67-78.

- Leroy F., De Vuyst L. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." *Food Science & Technology* (2003). [en línea]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224403002085>>.
- Leroy F., Vuyst L. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." *Trends in Food Science & Technology* (2004): 67-78. [en línea]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224403002085>>.
- Luna-Hernández, Villanueva, Balcazar. "Tricomocosis: una patología infrecuente de localización inusual." *Dermatol PERU* (2012).
- Masoud W., Jakobsen M. "Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*." *Elsevier* (2003): 231-237.
- McSweneey P., Sousa M. J. "Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review." *INRA, EDP Sciences* (2000): 293-324.
- Montel, Buchin, Mallet, Delbes. "Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits." *Elsevier* (2014): 136-154.
- Morais, J. *Estudio de adecuación de cepas lácticas autóctonas aisladas de leche cruda de oveja guirra para la elaboración de queso*. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, 2004. <<https://ddd.uab.cat/record/37761>>.
- Moriguchi M., Sakai K., Tateyama R., Furuta Y., Wakayama M. "Isolation and Characterization of Salt-Tolerant Glutaminases from Marine *Micrococcus luteus* K-3." *Journal of Fermentation and Bioengineering* (1994): 621-625. [en línea]. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0922338X94901430>>.
- Narváez. *Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas del queso de cabra artesanal del sureste de coahuila para su uso comocultivos iniciadores de quesos pasteurizados*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México, 2015.
- Nornberg, Friedrich, Weiss, Tondo. Brandelli. "Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk." *International Journal of Dairy Technology* (2009).
- Palacios, C. *Análisis de las comunidades microbianas autóctonas durante la maduración de quesos artesanales de dos regiones del Sur del Ecuador*. Tesis doctoral. Cuenca: Universidad del Azuay, 2016.
- Palomino-Camargo, González-Muñoz. "Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones." *Rev Peru Med Exp Salud Publica* (2014): 535-546.
- Pavunc, Beganovic, Kos, Uroic, Blazic, Suskovic. "Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production." *Food Technol. Biotechnol.* (2012): 141-151. [en línea].

- Piraino P, Zotta T, Ricciardi A, McSweeney P, Parente E. "Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from filata cheeses: A multivariate screening study." *Elsevier* (2008): 81-92.
- Piraino, Zotta, Ricciardi, McSweeney, Parente. "Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study." *Elsevier* (2008): 81-92.
- Prasad, M. P. "Optimization of media parameters for pigment production in bacteria from." *Biolife* (2015): 428-433. [en línea]. <<http://biolifejournal.com/33.9%20PRASAD%20428-433.pdf>>.
- Purty, Saranathan, Prashanth, Narayanan, Asir, Devi. "The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review." *Emerging Microbes and Infections* (2013).
- Radolfo, R. *Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Colombia, 2010.
- Ramirez C., Vélez J. "Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra." *Información Tecnológica* (2016): 115-128. [en línea]. <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000600012&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000600012&script=sci_arttext)>.
- Randazzo, Torriani, Akkermans, De Vos, Vaughan. "Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis." *Applied and Environmental Microbiology* (2002): 1882-1892.
- Randazzo, Torriani, Akkermans, de Vos, Vaughan. "Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (2002): 1882-1892.
- Resmi, G., Thampi, S. G., Chandrakaran, S. "Brevundimonas vesicularis: A Novel Bio-sorbent for Removal of Lead from Wastewater." *Int. J. Environ. Res* (2010): 281-288. [en línea]. <[https://ijer.ut.ac.ir/article\\_20.html](https://ijer.ut.ac.ir/article_20.html)>.
- Rodicio MR, Mendoza MC. "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica." *Elsevier* (2003): 238-245. en línea.
- Rondón A. J., Samaniego L. M., Bocourt R., Rodríguez S., Milián G., Ranilla M. J., Laurencio M., Pérez M. "AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE *Lactobacillus* sp. PROCEDENTES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL DE POLLOS DE CEBA." *Ciencia y Tecnología Alimentaria* (2008): 56-63. [en línea]. <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358120809487628>>.
- Ross, Morgan, Hill. "Preservation and fermentation: past, present and future." *Elsevier* (2002): 3-16.

- Rubio-Teixeira. "Milk: Microbe's Heaven Making Human's Paradise." *Global Science Books* (2007).
- Sakai K., Fukuba M., Hasui Y., Moriyoshi K., Ohmoto T., Fujita., Ohe T. "Purification and Characterization of an Esterase Involved in Poly(vinyl alcohol) Degradation by *Pseudomonas vesicularis* PD ." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (1998): 2000-2007. [en línea].  
<[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/62/10/62\\_10\\_2000/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/62/10/62_10_2000/_article/-char/ja/)>.
- Samyuktha S., Napahade Mahajan S. "Isolation and identification of pigment producing bacteria and characterization of extracted pigments." *International Journal of Applied Research* (2016): 657-644. [en línea].  
<<http://www.allresearchjournal.com/archives/2016/vol2issue7/PartJ/2-7-16-907.pdf>>.
- Sandmann, G. "Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants." *European Journal of Biochemistry* (1994): 7-24. FEBS.
- Santambrosio E, Ortega M, Garibaldi P. *Tinción y observación de microorganismos*. Cátedra de biotecnología y trabajo de laboratorio. Rosario: Universidad Tecnológica Nacional , 2009.
- Sarantinopoulou, Andrighetto, Georgalaki. "Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance." *Elsevier* (2001): 621-647.
- Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, et al. "Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*." *J Med Microbiol.* (2010): 215-216.
- Schinor, Salvador, Ito, Dias. "Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*." *Brazilian Journal of Microbiology* (2007): 145-149.
- Schumann P., Rainey F., Burghardt J., Stackebrandt E., Weiss N. "Reclassification of *Brevibacterium oxydans* (Chatelain and Second 1996) as *Microbacterium oxydans* comb. nov." *International Journal of Systematic Bacteriology* (1999): 175-177. [en línea].  
<[https://www.researchgate.net/profile/Fred\\_Rainey/publication/237314713\\_Re\\_c\\_l\\_a\\_s\\_s\\_i\\_f\\_i\\_c\\_a\\_t\\_i\\_o\\_n\\_o\\_f\\_Br\\_e\\_vibacteriurn\\_oxydans\\_Chatelain\\_and\\_Second\\_1966\\_as\\_Micr\\_obacterium\\_NOTEi\\_oxydans\\_comb\\_nov/links/0046352ae8323a7a62000000/Re-c-l-ass-if-i-cat-i-on-of-Bre-v](https://www.researchgate.net/profile/Fred_Rainey/publication/237314713_Re_c_l_a_s_s_i_f_i_c_a_t_i_o_n_o_f_Br_e_vibacteriurn_oxydans_Chatelain_and_Second_1966_as_Micr_obacterium_NOTEi_oxydans_comb_nov/links/0046352ae8323a7a62000000/Re-c-l-ass-if-i-cat-i-on-of-Bre-v)>.
- Segers, et al. "Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov., Respectively." *International Journal of Sistematic Bacteriology* (1994): 499-510.
- Sharpe, Law. "Methanethiol Production by Coryneform Bacteria : Strains from Dairy and Human Skin Sources and *Brevibacterium linens*." *Journal of General Microbiology* (1977): 345-349.

- Tamay de Dios, Ibarra, Velasquillo. "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real." *Medigrafic* (2013): 70-78.
- Teh, Flint, Palmer, Lindsay, Andrewes, Bremer. "Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers." *Elsevier* (2011): 742-747.
- Vora J. U., Jain N. K., Modi H. A. "Extraction Characterization and Application studies of red pigment of halophile *Serratia marcescens* KH1R KM035849 isolated from Kharaghoda soil." *International Journal of Pure & Applied Bioscience* (2014): 160-168. [en línea].
- Wieser M., Denner E., Kampfer P., Schumann P., Tindall B., Steiner U., Vybiral D., Lubitz W., Maszenan A. M., Patel B., Seviour R., Radax C., Busse H. "Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1972) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1947)." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2002): 629-637. [en línea].  
<<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-52-2-629>>.
- Yan, Wang, Qu, Li. "Characterization of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes." *A&EB* (2013): 3932-3938. [en línea].  
<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.5504/BBEQ.2013.0050>>.
- Yoon, Lee, Choi. "Microbial benefits and risks of raw milk cheese." *Elsevier* (2016): 201-215.
- Zarei M., Pourmahdi M., Khezzadeh M., Kazemipour S., Hesami G., Bemani E. "Growth and Cell Morphology of *Listeria monocytogenes* as Affected by Various Concentrations of NaCl and KCl." *J. BIOL. ENVIRON. SCI* (2012): 99-104. [en línea].

## ANEXOS

### **Anexo 1. Métodos de extracción de ADN**

Para desarrollar los dos métodos se parte de un pellet bacteriano axénico contenido en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

#### **DNAzol Reagent (Englen y Kelley 2000)**

1. Se suspendió el pellet bacteriano en 0.1 mL de agua estéril.
2. Se colocaron los tubos en agua hirviendo por 10 minutos y se enfriaron rápidamente en agua helada.
3. Se añadió 1 mL del reactivo DNAzol y se procedió a centrifugar a 10500 g por 10 minutos con el fin de pelletizar los desechos celulares.
4. El líquido sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf limpio de capacidad de 2 mL.
5. Se añadió 0.5 mL de etanol al 100%, se invirtieron los tubos varias veces para mezclar bien el contenido.
6. Se dejó reposar por 30 minutos a 4°C para que se precipite el ADN.
7. Se centrifugó el precipitado a 14000 g por 10 minutos y se desechó el sobrenadante.
8. Se lavó añadiendo 0.8 mL de etanol al 95%, invirtiendo los tubos para resuspender el pellet.
9. Se centrifugó a 14000 g por 2 minutos para repelletizar el ADN.
10. El fluido sobrenadante se eliminó y se repitió el lavado una vez más.
11. El pellet de ADN final obtenido se disolvió en 50 µL de una solución de NaOH 8mM.

#### **Mini Kit Pure Link® Genomic DNA Qty: 250rxn – Invitrogen. Recomendado por el fabricante.**

1. Se coloca en el tubo con el pellet 180 µL de solución de digestión.
2. Se agregan 20 µL de la enzima proteinasa K y se agita en vórtex.
3. Se incuba a 55°C por 3 horas, agitando en vórtex cada 30 minutos.
4. Se añade al pellet 20 µL de la enzima ARNasa y agita en vórtex.
5. Incubar los tubos a temperatura ambiente por 2 minutos.
6. Se añade 200 µL de la solución: Genomic lysis binding buffer y se agita en vórtex.
7. Se agregan 200 µL de etanol al 96% y se agita en vórtex.
8. Se transfirió el contenido de los tubos a las columnas “genomic spin”.
9. Se centrifugó a 10.000 g por 1 minuto.
10. Se cambió el tubo de colección de la columna por uno limpio.
11. Se añadió 500 µL de la solución 1 de lavado.
12. Se centrifugó a 10.000 g por 1 minuto.
13. Nuevamente se cambió el tubo de colección.
14. Se añadió 500 µL de la solución 2 de lavado.
15. Se centrifugó a 14.000 rpm por 3 minutos.
16. Las columnas se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.
17. Se agregaron 75 µL de solución de elución.
18. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos.
19. Se centrifugó a 14.000 rpm por 2 minutos, hasta que todo el líquido de la columna pase al tubo.
20. Se descartó la columna y se almacenó el ADN contenido en el tubo Eppendorf en congelación.

**Anexo 2.** Metodología de secuenciación reportada por Macrogen Inc., Corea del Sur.

## Material & Method(standard)

- Genomic DNA extraction: QIAamp DNA mini kit (QIAgen)
- PCR taq polymerase: Dr.MAX DNA Polymerase (Doctor protein)
- PCR machine: DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD)
- PCR product purification: multiscreen filter plate (Millipore Corp)
- Sequencing Kit : BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
- Sequencer: ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type)

Genomic DNA samples were extracted using a QIAamp DNA mini kit (QIAgen, Germany). Target gene specific primer pairs (Table1) and Dr.MAX DNA Polymerase (Doctor protein INC, Korea), were utilized for the PCR reactions. PCR amplification conditions were as follows: 94°C 5 min; 94°C 30 sec, variable temperature 30 sec, 72°C 40 sec for 35 cycles; 72°C 7 min. PCR products were purified using Millipore plate MSNU030 (Millipore SAS, Molsheim, France). The purified PCR products were then Sanger-sequenced with the BigDye terminator v3.1 sequencing kit and a 3730xl automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Nucleotide sequences were determined on both strands of PCR amplification products at the Macrogen sequencing facility (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Macrogen Inc.

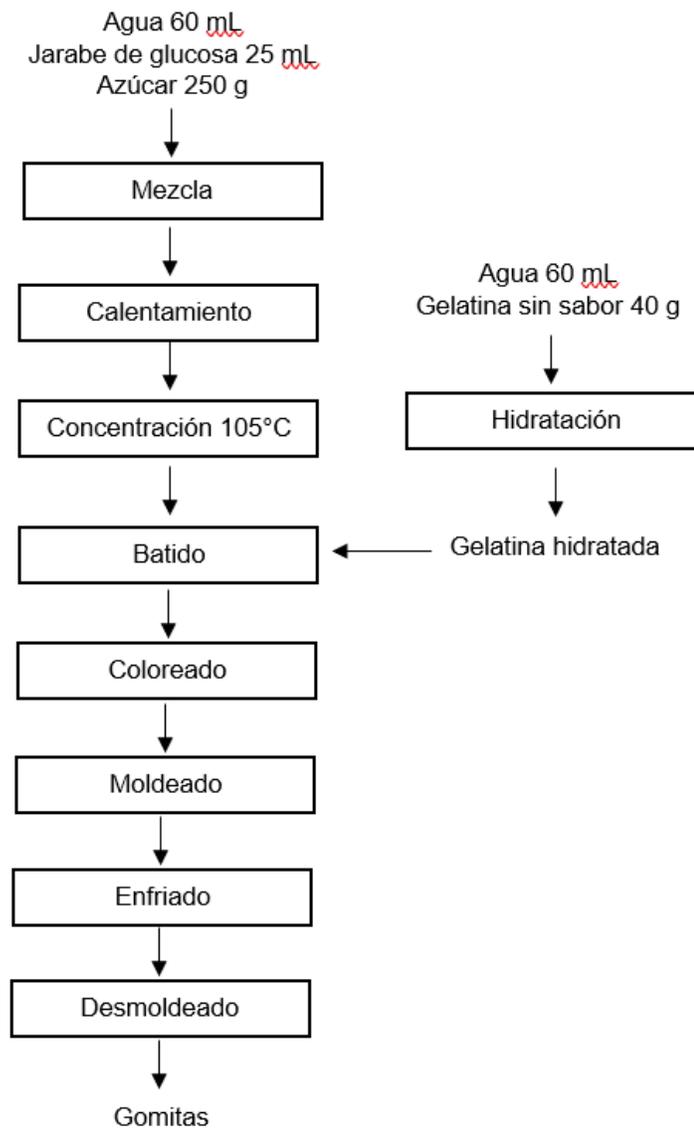
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Myoung Chong".

Chief Executive Officer Myoung Chong

**Anexo 3.** Método de diluciones seriadas para conteo bacteriano.

1. De la suspensión bacteriana para conteo se toma 1 mL y se inocula en 9 mL de agua peptonada estéril. Esto significa la dilución de 10 veces el contenido de bacterias.
2. Se diluyen las veces necesarias.
3. De la última dilución se siembra 0.1 mL en agar nutritivo estéril.
4. Se incuba a 37°C por 48 horas.
5. Se procede al conteo de bacterias, tomando como criterio de conteo un número de bacterias entre 25 y 250 UFC.
6. Si el número es menor a 25 UFC la suspensión fue muy diluida y si el número es mayor a 250 UFC se requiere hacer una dilución más.
7. Al número de colonias contadas se multiplica por las veces en que se disolvió la suspensión madre y se obtiene la concentración de UFC por unidad de volumen o peso.

**Anexo 4.** Diagrama de proceso de elaboración de “gomitas”.



**Anexo 5.** Características de los cultivos y tinción de Gram.

<b>Código</b>	<b>Fuente</b>	<b>Color</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Opacidad</b>	<b>Forma</b>	<b>Gram</b>
11	queso fresco	crema	bajo	opaco	bacilo	positivos
12	requesón	crema	bajo	opaco	cocobacilo	negativos
24	queso semimaduro	amarillo	intenso	opaco	cocos	positivo
37	requesón	amarillo	intenso	opaco	cocos	positivo
40	queso semimaduro	crema	intenso	opaco	bacilo	negativos
43	requesón	crema	bajo	opaco	cocos	positivos
48	queso fresco	amarillo	intenso	brillante	cocobacilo	negativo
49	leche cruda	amarillo	intenso	brillante	bacilo	positivo
54	Requesón	naranja	bajo	brillante	bacilo	negativo
55	leche cruda	naranja	intenso	opaco	cocos	positivos
66	leche cruda	amarillo	bajo	brillante	cocobacilo	negativo
67	leche cruda	amarillo	intenso	opaco	cocos	positivo
70	leche cruda	amarillo	bajo	opaco	cocos	positivo
79	queso amasado	crema	bajo	opaco	cocos	positivos
86	requesón	amarillo	bajo	opaco	cocos	positivo
88	queso semimaduro	crema	intenso	opaco	bacilo	positivos
95	queso semimaduro	naranja	bajo	brillante	bacilo	negativo
103	queso semimaduro	amarillo	bajo	opaco	cocobacilo	positivo
104	queso semimaduro	naranja	bajo	brillante	bacilo	negativo
109	queso fresco	naranja	intenso	brillante	bacilo	negativo
115	leche cruda	crema	intenso	opaco	cocos	positivos
118	queso semimaduro	amarillo	intenso	opaco	cocos	positivo
119	queso semimaduro	amarillo	bajo	opaco	cocos	positivo
120	queso semimaduro	amarillo	intenso	opaco	cocobacilo	negativos
121	queso semimaduro	amarillo	intenso	opaco	cocobacilo	negativo
125	queso fresco	naranja	intenso	brillante	bacilo	negativo
126	leche cruda	biege	intenso	opaco	bacilo	negativo
128	leche cruda	crema	bajo	opaco	bacilo	negativo
129	queso fresco	crema	bajo	opaco	bacilos	positivos
130	Requesón	crema	intenso	opaco	bacilo	positivo
131	queso fresco	amarillo	intenso	opaco	cocos	Positivo
132	queso fresco	naranja	intenso	brillante	bacilo	Negativo

## Anexo 6. Resultados de secuenciación.

Cód. Cepa	Long. Secuencia Obtenida	Identificación Molecular	Long. Secuencia alineamiento significativo	Query Cover	% Identidad
125	1328	<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain NBRC 12165	1386	100%	99%
132	1192	<i>Brevundimonas vesicularis</i> strain NBRC 12165	1386	100%	100%
88	1303	<i>Corynebacterium flavescens</i> strain NCDO 1320	1489	99%	99%
54	1183	<i>Shewanella xiamenensis</i> strain S4	1535	100%	99%
11	1214	<i>Corynebacterium flavescens</i> strain NCDO 1320	1489	100%	99%
49	1218	<i>Microbacterium oxydans</i> strain DSM 20578	1466	100%	99%
66	1372	<i>Microbacterium flavum</i> strain YM18-098	1467	100%	99%
67	1363	<i>Kocuria rhizophila</i> strain TA68	1471	100%	99%
24	1006	<i>Kocuria rhizophila</i> strain TA68	1471	100%	99%
37	1359	<i>Kocuria rhizophila</i> strain TA68	1471	100%	99%
126	1237	<i>Listeria innocua</i> strain ATCC 33090	1501	100%	99%
103	1351	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> strain Re117	1459	100%	99%
40	1020	<i>Corynebacterium flavescens</i> strain NCDO 1320	1489	100%	99%
43	1388	<i>Macrococcus caseolyticus</i> strain ATCC 13548	1547	100%	100%
48	1276	<i>Luteimonas terrae</i> strain THG-MD21	1469	100%	99%
70	1374	<i>Staphylococcus devriesei</i> strain KS-SP_60	1537	100%	99%
79	1375	<i>Macrococcus caseolyticus</i> strain ATCC 13548	1547	100%	100%
86	1258	<i>Citricoccus nitrophenolicus</i> strain PNP1	1513	100%	99%
115	1288	<i>Macrococcus caseolyticus</i> strain ATCC 13548	1547	100%	99%
118	1316	<i>Kocuria rhizophila</i> strain TA68	1471	100%	99%
119	1275	<i>Arthrobacter bergerei</i> strain Ca106	1468	100%	99%
120	1000	<i>Arthrobacter gandavensis</i> strain R 5812	1445	99%	99%
121	1176	<i>Arthrobacter gandavensis</i> strain R 5812	1445	100%	99%
129	1295	<i>Corynebacterium variabile</i> strain DSM 20132	1436	100%	99%
130	1013	<i>Corynebacterium variabile</i> strain DSM 20132	1436	100%	99%

**Anexo 7.** Efecto del pH sobre la pigmentación bacteriana.



**Anexo 8.** Efecto de la temperatura sobre la pigmentación bacteriana.

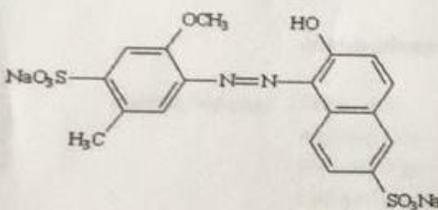
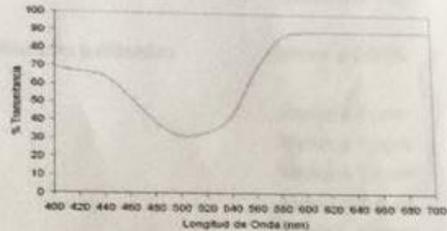


**Anexo 9.** Efecto de la concentración de NaCl sobre la pigmentación bacteriana.



## Anexo 10. Fichas técnicas de colorantes artificiales empleados.

CORALIM INGREDIENTS & COLOURS		FICHA TECNICA TECHNICAL DATA SHEET		P000010010 P000060042 P000110032 16/02/2017 - A.O. 96 Pagina 1 de 5	
<b>CORALCOLOR</b>					
<b>AMARILLO ANARANJADO FCF E110 85% P – SUNSET YELLOW FCF E110 85% P</b>					
<b>Color Index:</b>	15985	<b>Color Index:</b>	15985	<b>Color Index:</b>	15985
<b>EINECS:</b>	220-491-7	<b>EINECS:</b>	220-491-7	<b>EINECS:</b>	220-491-7
<b>Número CEE:</b>	E-110	<b>CEE Number:</b>	E-110	<b>CEE Number:</b>	E-110
<b>Sinónimos:</b>	CI food yellow 3; amarillo ocaso FCF Yellow 6	<b>Synonyms:</b>	CI Food Yellow 3; Orange Yellow 5 Yellow 6	<b>Synonyms:</b>	CI Food Yellow 3; Orange Yellow 5 Yellow 6
<b>FD&amp;C:</b>		<b>FD&amp;C:</b>		<b>FD&amp;C:</b>	
<b>Aspecto físico:</b>	Polvo naranja	<b>Appearance:</b>	Orange powder	<b>Appearance:</b>	Orange powder
<b>Colorante contenido</b>	Mín. 85%	<b>Color content</b>	Min. 85%	<b>Color content</b>	Min. 85%
<b>Insoluble en agua</b>	Máx. 0.2%	<b>Water insoluble</b>	Max. 0.2%	<b>Water insoluble</b>	Max. 0.2%
<b>Extractos de éter</b>	Máx. 0.2%	<b>Ether extracts</b>	Max. 0.2%	<b>Ether extracts</b>	Max. 0.2%
<b>Colorantes secundarios</b>	Máx. 5%	<b>Subsidiary coloring matters</b>		<b>Subsidiary coloring matters</b>	
<b>Sudán I</b>	Máx. 0.5 mg/kg	<b>Sudan I</b>	Max. 0.5 mg/kg	<b>Sudan I</b>	Max. 0.5 mg/kg
<b>Compuestos orgánicos distintos de los colorantes:</b>	Máx. 0.5%	<b>Organic compounds other than coloring matters:</b>	Max. 0.5%	<b>Organic compounds other than coloring matters:</b>	Max. 0.5%
<b>Aminas aromáticas primarias no sulfonadas:</b>	Máx. 0.01%	<b>Unsulfonated primary aromatic amines:</b>	Max. 0.01%	<b>Unsulfonated primary aromatic amines:</b>	Max. 0.01%
<b>Arsénico (As)</b>	≤ 3 mg/kg	<b>Arsenic (As)</b>	≤ 3 mg/kg	<b>Arsenic (As)</b>	≤ 3 mg/kg
<b>Plomo (Pb)</b>	≤ 2 mg/kg	<b>Lead (Pb)</b>	≤ 2 mg/kg	<b>Lead (Pb)</b>	≤ 2 mg/kg
<b>Mercurio (Hg)</b>	≤ 1 mg/kg	<b>Mercury (Hg)</b>	≤ 1 mg/kg	<b>Mercury (Hg)</b>	≤ 1 mg/kg
<b>Cadmio (Cd)</b>	≤ 1 mg/kg	<b>Cadmium (Cd)</b>	≤ 1 mg/kg	<b>Cadmium (Cd)</b>	≤ 1 mg/kg
<b>Almacenamiento:</b>	Almacenar en lugar fresco y seco en recipientes cerrados.		<b>Storage:</b>	Keep away from humidity.	
<b>Vida útil:</b>	4 años desde la fecha de producción.		<b>Shelf life:</b>	4 years from production date.	
<b>Legislación:</b>	Este producto cumple con el REGLAMENTO (UE) Nº 231/2012 DE LA COMISIÓN de 9 de marzo de 2012 por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.		<b>Legislation:</b>	This product complies with Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council.	
<b>Etiquetado (Reglamento CE 1333/2008)*:</b>	"E110: puede tener efectos negativos sobre la actividad y la atención de los niños." *Con la excepción de alimentos en los que el colorante se ha utilizado para el marcado sanitario o de otro tipo de productos cárnicos o para estampar o colorear con fines decorativos cáscaras de huevo y bebidas con un volumen de alcohol superior a 1,2 %		<b>Labelling (Regulation CE 1333/2008)*:</b>	"E110: may have an adverse effect on activity and attention in children." *With the exception of foods where the color(s) has been used for the purposes of health or other marking on meat products or for stamping or decorative coloring on eggshells and drinks with an alcohol volume more than 1.2%.	

		<b>FICHA TÉCNICA DE PRODUCTO</b> <b>Rojo No. 40 Novacolor Supra</b>		Página 1 de 3	
Revisado / Aprobado por Wilmar Suárez G.					
Fecha Julio de 2015				Versión 9	
<b>IDENTIFICACIÓN</b>					
Nombre Comercial Otros Nombres Nombre Químico Color Index No. EU-No. (INS) CAS No. EINECS No.		Rojo No. 40 Novacolor Supra Rojo Allura C.I. Food Red 17 Sal disódica del ácido 6-hidroxi-5-[(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenil)azo]-2-naftalensulfónico 16035 129 25956-17-6 247-368-0			
<b>DESCRIPCIÓN QUÍMICA</b>		Familia Química Fórmula Molecular Peso Molecular		Monoazo C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ·Na <sub>2</sub> 496,43	
Fórmula Química 		Espectro Visible de Absorbancia Conc.: 10 mg/L      pH: 7 			
<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA</b>		Contenido de Colorante Puro Contenido de Colorante Puro, base seca Cloruros y Sulfatos, como sales de Sodio Material Volátil a 135°C		88% Mínimo 90% Mínimo 10% Máximo 5% Máximo	
<b>APARIENCIA FÍSICA</b>		En Polvo En Solución 10 ppm		Polvo fino inodoro de color rojo Solución diluida de color rojo en medio neutro o ácido y rojo pálido en medio alcalino.	
<b>PROPIEDADES ESPECTROFOTOMÉTRICAS</b>		Longitud de Onda de Máxima Absorción (pH 7.0) Concentración recomendada para análisis Absortividad (pH 7.0) pH de cambio de tonalidad		500 +/- 4 nm 17.5 - 22.5 ppm 0.052 (L/(mg·cm)) 11.0 - 12.0	