



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Caracterización genética mediante ADN de las cepas productoras de CO₂ para acelerar la formación de “ojos” en el queso tipo Gouda.

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN ALIMENTOS

Autor:

LUISANA YAMILÉ TELLO SAMANIEGO

Director:

CLAUDIO ESTEBAN SÁNCHEZ JÁUREGUI

CUENCA, ECUADOR

2016

DEDICATORIA

Todo esfuerzo tiene su recompensa, porque cuando algo nos apasiona en la vida luchamos día a día por conseguir ese sueño o esa meta, no importa cuántas veces nos caemos, lo que cuenta es cuántas veces nos levantamos y seguimos adelante, es por esto y por mucho más que quiero dedicar cada uno de los pasos que doy y cada uno de mis logros, a mis padres Luis Tello y Olga Samaniego, ellos son los pilares fundamentales en mi vida, porque con cada palabra, con cada abrazo y con su apoyo incondicional he sabido salir adelante y superar cualquier dificultad.

Quiero dedicar también cada una de éstas líneas a mi hermano, a mis abuelos y a quien en este momento no se encuentra a mi lado, pero sé que comparte conmigo cada uno de mis logros, mis alegrías, mis tristezas, él una persona que me regaló muchos momentos de felicidad y sobretodo me brindó el cariño más sincero, a mi abuelito Germán Tello, que desde el cielo comparte esta alegría que ahora siento y que está presente todos los días en cada uno de mis pensamiento y oraciones.

AGRADECIMIENTOS

El despertarnos cada mañana y con perseverancia poder lograr cada una de nuestras metas, es siempre gracias a nuestro Dios y a la Virgen Auxiliadora, quienes me acompañan en cada paso que doy y están presentes en todas mis oraciones.

Agradezco a mis padres, a mi hermano, a mis primos, a mis tíos, a mis abuelos, porque todos ellos forman parte de mi vida y con cada palabra, con cada ocurrencia, con cada sonrisa hacen que mi vida esté llena de felicidad, sabiendo que yo puedo contar con ellos para todo y que ellos pueden contar conmigo a pesar de cualquier circunstancia, porque el apoyo de nuestra familia, la unión y la comprensión hacen mejor llevadero cualquier problema.

Durante todo este tiempo he conocido a personas muy importantes, a grandes amigos que jamás los voy a olvidar y siempre ocuparán un lugar en mi corazón, porque los amigos son la familia que uno escoge, muchas gracias a mi gran amiga Diana O, que estuvimos juntas desde el primer día de clases, a mis amigos Ivana, Doris, Xavier, Vladimir, Diego, María, Omar, con quienes hemos compartido muchas cosas y jamás nos podremos olvidar de cada uno de los momentos vividos, de todos los viajes, los proyectos, en fin todas las anécdotas que recordaré con una grata alegría en mi corazón. Gracias a todos mis amigos porque con ellos he aprendido el valor de una verdadera amistad y el apoyo incondicional.

Este trabajo de investigación no hubiese sido posible sin el apoyo y la ayuda de mi director, gracias al ingeniero Claudio Sánchez, gracias porque con cada palabra nos alienta a descubrir nuevos horizontes, de igual manera estoy tan agradecida con mi amigo Diego Montero, por su ayuda y apoyo incondicional, por estar siempre conmigo durante todo este tiempo, al Dr. Piercosimo Tripaldi, a la Ing. Lady González, y a todos mis profesores por aportar con su conocimiento, su sabiduría y su experiencia. Gracias infinitas a todos los que forman parte de la Universidad del Azuay.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Bacterias Ácido Lácticas.....	3
1.1.1 Definición y clasificación.....	3
1.1.2 Generalidades.....	4
1.1.3 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas.....	7
1.1.4 <i>Lactococcus</i>	11
1.1.4.1 <i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>	12
1.1.4.2 <i>Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i>	12
1.1.5 <i>Leuconostoc</i>	13
1.1.5.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13
1.1.6 Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas en los alimentos.....	14
1.1.7 Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas....	15
1.1.8 Ingeniería genética aplicada a las bacterias ácido lácticas.....	16
1.2 Queso Gouda – características generales.....	16

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Ubicación del experimento.....	17
2.1.1 Material experimental.....	17
2.1.2 Equipos, materiales e instalaciones.....	17
2.1.2.1 Equipos.....	17
2.1.2.2 Materiales de laboratorio.....	18
2.1.2.3 Reactivos.....	19
2.1.2.4 Aditivos.....	19
2.1.2.5 Instalaciones.....	20
2.2 Métodos de análisis.....	20
2.2.1 Activación de las cepas.....	20
2.2.1.1 Preparación de los medios de cultivo.....	23
2.2.1.1.1 Agar MRS.....	23
2.2.1.1.2 Agar Sangre.....	24
2.2.1.1.3 Caldo de cultivo MRS.....	24
2.2.1.1.4 Agua peptonada.....	24
2.2.2 Verificación de las bacterias ácido lácticas.....	24
2.2.2.1 Tinción de Gram.....	24
2.2.3 Elaboración del diseño experimental.....	27
2.2.4 Elaboración del queso tipo Gouda.....	31
2.2.4.1 Preparación de las bacterias.....	31
2.2.4.2 Elaboración de cada uno de los experimentos.....	33
2.2.5 Extracción de las bacterias de los ocho experimentos.....	36
2.2.5.1 Caracterización de las bacterias ácido lácticas mediante ADN.....	37
2.2.5.1.1 Extracción de ADN.....	37
2.2.5.1.2 Electroforesis con gel de agarosa al 1%.....	39
2.2.5.1.3 PCR.....	43
2.2.5.1.4 Electroforesis con gel de agarosa al 1.4%.....	46
2.2.6 Análisis Sensorial.....	50
2.2.7 Análisis de componentes principales.....	52
2.2.8 Métodos de decisiones de las funciones multicriterio.....	52

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1 Resultados.....	53
3.1.1 Activación de las bacterias ácido lácticas.....	53
3.1.2 Tinción de Gram.....	53
3.1.3 Resultados de la elaboración del diseño experimental.....	56
3.1.4 Resultados del ADN de las bacterias ácido lácticas.....	58
3.1.5 Resultados del análisis sensorial.....	65
3.2 Discusiones.....	71
CONCLUSIONES.....	74
GLOSARIO.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	8
Fig. 1.2 Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	9
Fig. 1.3 Diferentes tipos de quesos.....	14
Fig. 2.1 Activación de las cepas en leche.....	20
Fig. 2.2 Siembra de las cepas en Agar Sangre en la cámara de flujo laminar.....	21
Fig. 2.3 Placas colocadas en la incubadora a 37°C.....	21
Fig. 2.4 Caldo MRS y agua peptonada.....	22
Fig. 2.5 Placas de Agar Sangre y MRS en la incubadora a 37°C.....	23
Fig. 2.6 Kit para realizar la tinción de Gram.....	25
Fig. 2.7 Microscopio OLYMPUS CX22LED.....	27
Fig. 2.8 Diseño experimental 4.....	30
Fig. 2.9 Diseño experimental 3.....	31
Fig. 2.10 Leche con 9% de sólidos con las tres cepas.....	32
Fig. 2.11 Envases con la leche y las bacterias colocadas en la incubadora a 37°C (Segundo día).....	33
Fig. 2.12 Diagrama de flujo para la elaboración del queso tipo Gouda.....	34
Fig. 2.13 Muestra del queso colocada en agua peptonada.....	37
Fig. 2.14 Equipo de electroforesis.....	42
Fig. 2.15 Gel de agarosa en el equipo Enduro GDS.....	43
Fig. 2.16 Programa de PCR 16S.....	46
Fig. 2.17 Gel de agarosa.....	48
Fig. 2.18 Muestras colocadas en la cámara de electroforesis.....	48
Fig. 2.19 Electroforesis en gel de agarosa.....	49
Fig. 2.20 Equipo ENDURO GDS.....	49
Fig. 2.21 Ficha de catación.....	51
Fig. 3.1 <i>Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i>	54
Fig. 3.2 <i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>	55
Fig. 3.3 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	55
Fig. 3.4 Gráfico de Lenth para detectar el valor de los factores y de las interacciones.....	58
Fig. 3.5 Presencia de ADN de los experimentos 1, 2, 3 y 4.....	59
Fig. 3.6 Presencia de ADN de los experimentos 5, 6, 7 y 8.....	59

Fig. 3.7 Perfil electroforético de <i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i> del experimento 4.....	62
Fig. 3.8 Diplot de la APC.....	64
Fig. 3.9 Función de utilidad de los ocho experimentos.....	68
Fig. 3.10 Gráfico de Lenth para detectar el valor de los factores significativos.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Requerimiento o exigencias para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas.....	6
Tabla 1.2 Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas.....	10
Tabla 2.1 Matriz del Diseño Factorial 2 ³	28
Tabla 2.2 Valores de cada bacteria para los modelos del diseño experimental.....	29
Tabla 2.3 Interacciones entre dos y tres factores.....	29
Tabla 2.4 Preparación de las soluciones para PCR para cada tubo.....	45
Tabla 3.1 Cantidad de “ojos” por cm ² de cada experimento.....	57
Tabla 3.2 Diseño experimental, densidad de los “ojos” y respuestas.....	57
Tabla 3.3 Pesos moleculares de las 8 bandas obtenidas del <i>Ladder 1</i>	60
Tabla 3.4 Pesos moleculares de las 10 bandas obtenidas del <i>Ladder 2</i>	60
Tabla 3.5 Valores de las bandas de ADN de las bacterias.....	61
Tabla 3.6 Pesos moleculares de las bacterias.....	61
Tabla 3.7 Posiciones de las bandas de la bacteria 1 (<i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>) de los 8 experimentos.....	62
Tabla 3.8 Posiciones de las bandas de la bacteria 2 (<i>Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i>) de los 8 experimentos.....	63
Tabla 3.9 Posiciones de las bandas de la bacteria 3 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>) de los 8 experimentos.....	63
Tabla 3.10 Códigos de los parámetros a evaluar.....	65
Tabla 3.11 Resultados del análisis sensorial.....	66
Tabla 3.12 Función de utilidad de los ocho experimentos.....	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Crecimiento <i>Leuconostoc mesenteroides</i> en Agar MRS pH 6.....	79
Anexo 2 Crecimiento <i>Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i> en Agar Sangre pH 5.5.....	79
Anexo 3 Centrífuga refrigerada.....	80
Anexo 4 Equipo para PCR.....	80
Anexo 5 Preparación de las muestras para extracción de ADN.....	81
Anexo 6 Cámara para electroforesis.....	81
Anexo 7 Cámara climatizada para maduración de los quesos.....	82
Anexo 8 Preparación de las muestras para electroforesis.....	82
Anexo 9 Compuestos necesarios para el gel de agarosa.....	83
Anexo 10 Adición de las muestras en gel de agarosa.....	83
Anexo 11 Colocación del gel en el equipo Enduro GDS.....	84
Anexo 12 Quesos colocados en los moldes.....	84
Anexo 13 Quesos tipo Gouda.....	85
Anexo 14 Parafinado de los quesos.....	85
Anexo 15 Quesos en la cámara climatizada.....	86
Anexo 16 Muestras de ADN colocadas en la centrífuga.....	86
Anexo 17 Incubadora.....	87
Anexo 18 Cámara de flujo laminar.....	87
Anexo 19 Ladder 1 kb.....	88
Anexo 20 Catación de los ocho modelos de diseño experimental.....	88
Anexo 21 Análisis en Totallab del experimento 4 y 8.....	89

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE ADN DE LAS CEPAS
PRODUCTORAS DE CO₂ PARA ACELERAR LA FORMACIÓN DE “OJOS”
EN EL QUESO TIPO GOUDA.**

RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo caracterizar las bacterias ácido lácticas formadoras de CO₂ (*Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subesp. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*), activándolas utilizando como sustrato la leche, éstas se sembraron en medios de cultivos selectivos y posteriormente fueron identificadas y caracterizadas mediante la técnica de tinción de Gram y extracción de ADN. Una vez aisladas las cepas se determinó mediante diseño experimental Diseño factorial 2³ la mejor mezcla de bacterias para la elaboración del queso tipo Gouda en un menor tiempo propuesto por la fórmula original, con las mismas características organolépticas pero con una mayor formación de ojos.

Palabras claves: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, extracción de ADN, tinción de Gram.



Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Director del Trabajo de Titulación



Fausto Tobías Parra Parra

Director de Escuela



Luisana Yamilé Tello Samaniego

Autora

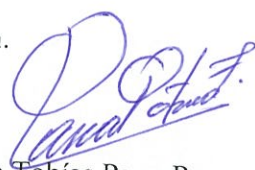
**GENETIC CHARACTERIZATION TO ACCELERATE THE
FORMATION OF "EYES" IN GOUDA TYPE CHEESE THROUGH THE
DNA OF CO2 PRODUCING STRAINS**

ABSTRACT

The aim of this research is to characterize lactic acid bacteria producer of CO₂ (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and *Leuconostoc mesenteroides*), activating them by using milk as substrate. These were seeded in selective culture media, and subsequently identified and characterized by Gram staining technique and DNA extraction. Once the strains were isolated, it was possible to determine by means of 23 Factorial Experimental Design, the best bacteria culture for the preparation of Gouda-type cheese with the same organoleptic characteristics but with greater eye formation, in a shorter time than the one proposed by the original formula,


Keywords: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, DNA Extraction, Gram Stain.


Claudio Esteban Sánchez Jáuregui
Thesis Director


Fausto Tobías Parra Parra
School Director


Luisana Yamilé Tello Samaniego
Author


UNIVERSIDAD DEL
AZUAY
Dpto. Idiomas


Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

Tello Samaniego Luisana Yamilé

Trabajo de Titulación

Ing. Claudio Esteban Sánchez Jáuregui

Septiembre, 2016.

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MEDIANTE ADN DE LAS CEPAS
PRODUCTORAS DE CO₂ PARA ACELERAR LA FORMACIÓN DE “OJOS”
EN EL QUESO TIPO GOUDA.**

INTRODUCCIÓN

Mediante el presente trabajo de investigación se pretende proponer una nueva mezcla de bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso Gouda, realizando diferentes análisis para conocer la función que cumplen cada una de las bacterias ya que no se han realizado estudios para determinar cuál de las bacterias tiene una mayor capacidad de formación de CO₂, de esta manera poder elaborar el queso tipo Gouda con las mismas características que la fórmula original pero en un menor tiempo.

En el laboratorio de Biotecnología de Alimentos contamos con nuevos equipos que nos son útiles para muchos temas de investigación, uno de los principales es el equipo de modulación y desarrollo de condiciones climáticas, utilizando este para elaborar el queso y así nos aseguramos de dirigir el proceso biotecnológico motivo de esta investigación. Por otra parte actualmente el queso tipo Gouda tiene un tiempo de maduración y formación de “ojos” de un mes o hasta un año en quesos de mejor calidad, con esta propuesta se pretende que los tiempos de maduración sean menores y que se dé una mayor formación de “ojos” en el queso. Se aspira también conocer los métodos, realizar el aislamiento de las cepas y proponer la mejor mezcla de las bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso tipo Gouda proveniente de la aplicación del diseño experimental Diseño factorial 2³ en las mezclas de cepas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar la caracterización genética de las cepas productoras de CO₂ mediante ADN y aplicación de diseño experimental para la aceleración de la formación de “ojos”, en la elaboración del queso tipo Gouda.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Recopilar información de las bacterias ácido lácticas, su ingeniería genética y su aplicación en la industria de los alimentos.
- Investigar los métodos y realizar el aislamiento de las cepas, su caracterización mediante ADN y proponer la mejor mezcla de las bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso tipo Gouda proveniente de la aplicación del diseño experimental.
- Aplicar el diseño experimental Diseño factorial 2³ en las mezclas de cepas
- Realizar un análisis sensorial

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Bacterias Ácido Lácticas

1.1.1 Definición y Clasificación

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que tienen diversas aplicaciones dentro del campo de los alimentos, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales, y de esta manera obtener productos como el yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. Así como también pueden ser utilizadas para la producción de vino y cerveza (Ramírez et al., 2011).

Las bacterias ácido lácticas además de mejorar las características sensoriales a los alimentos como sabor, olor, textura y aumentar su calidad nutritiva, contribuyen con la conservación de los alimentos y además al ser consumidas en cantidades adecuadas pueden mejorar la salud de las personas y animales que las consumen (Ramírez et al., 2011).

Las bacterias ácido lácticas según la fermentación de la glucosa se clasifican en homofermentativas o heterofermentativas. Según Ramírez *et al* (2011) en la naturaleza existen los siguientes géneros:

<i>Aerococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Alloinococcus</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactosphaera</i>
<i>Dolosigranulum</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>Globicatella</i>	<i>Pediococcus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weisella</i>

Según Parra Huertas (2010) las BAL también pueden clasificarse por la temperatura ideal para su crecimiento:

- **Mesófilas:** la temperatura óptima para su crecimiento es de 20 a 25 °C, el tiempo de incubación es de 18 a 20 horas, la acidez final es de 0,8 % de ácido láctico.
- **Termófilas:** la temperatura óptima para su crecimiento es de 40 a 45 °C, el tiempo de incubación necesario es de 2 a 4 horas, la acidez final es de 0,9 % de ácido láctico.

1.1.2 Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias Gram – positivas, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa negativas, mayoritariamente nitrato reductoras negativas, anaerobias facultativas o microaerofílicas (Olivera, J., 2011). Las BAL poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos. Su clasificación se basa en la morfología, la forma de fermentar la glucosa, su desarrollo a diferentes temperaturas, el ácido láctico que produce y su tolerancia a la alcalinidad y acidez. La gran mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas crecen a temperaturas de 5°C y otras a 45°C (Mora, N., García, A., 2007).

Las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer ciertas bacterias a valores de pH bajos como 3.2, otras a valores tan altos como 9.6, mientras que la mayoría de bacterias crecen a pH entre 4 y 4.5 (Ramírez et al., 2011). Para su nutrición requieren una gran cantidad de factores nutritivos (Tabla 1.1) como aminoácidos, bases nitrogenadas, ciertas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono. La mayor parte de las BAL obtienen energía solo del metabolismo de las azúcares y compuestos de la fermentación, por consiguiente para su desarrollo necesitan ambientes ricos en azúcares (Mora, N., García, A., 2007).

La leche es el medio común que requieren las bacterias ácido lácticas para su proliferación. Sus hábitats son muy variados, pudiéndose encontrar en:

- Flora normal de la superficie de frutas y verduras
- Diversos alimentos fermentados y sobretodo ricos en azúcares
- Leche y derivados
- Productos cárnicos

Según Madigan y *col*, quienes son mencionados por Mora y García (2007), a pesar de la utilidad que tienen las bacterias ácido lácticas para la industria de los alimentos, existen muchas dificultades para cultivarlas por su necesidad de varios nutrientes. Las vitaminas son la principal fuente para su crecimiento, entre las principales se encuentran: la tiamina (vitamina B₁), biotina, piridoxina (vitamina B₆) y cobalamina (vitamina B₁₂).

Tabla 1.1: Requerimientos o exigencias para el crecimiento de las bacterias

EXIGENCIAS PARA CRECIMIENTO						
Metabolitos	Lc. Lactis subesp. Lactis	Lc. Lactis subesp. Diacetylactis	Lc. Lactis subesp. Cremoris	S. thermophilus	Lactobacillus	Leuc. Cremoris
Aminoácidos						
Asp	-	-	-	+	+	?
Thr	-	-	-	?	?	?
Ser	-	?	+/-	?	?	+/-
Glu	+	+	+	+/-	+	?
Gly	-	?	+/-	?	?	?
Pro	-	?	+	?	?	?
Ala	-	?	+/-	?	?	+/-
Cys	S	S	+	+	S	+
Val	+	+	+	+	+	+/-
Met	+	+	+	+/-	+	+/-
Ile	+	+	+	+/-	+	+/-
Leu	+	+	+	+	+	+
Tyr	?	?	?	+/-	+	¿?
Phe	+/-	?	+	?	?	+/-
Lys	-	-	+/-	+	+	+/-
His	+	+	+	+	+	?
Trp	?	+/-	?	?	?	?
Arg	+/-	+/-	+/-	?	?	?
Vitaminas						
B12	+	+	+	+	+	?
Biotina	+	+	+	+	+	?
Nicotiamida	+	+	+	+	+	+
Pantotenato	+	+	+	+	+	+
Roboflavina	+	+	+	+	+	+
Tiamina	+	+	+	+	-	+
Piridoxal	+	+	+	+	-	+
Ácido fólico	+	+	+	+	-	+
Ácidos Orgánicos						
Á. acético	+	+	+	?	?	?
Á. oleico	+	+	+	?	S	?
Á. orótico	?	?	?	?	S	?
Á. fórmico	?	?	?	?	S	?
Bases Nucleicas						
Hipoxantina	S	-	-	?	-	+
Adenina	S	S	-	?	S	+
Guanina	S	-	-	?	S	+
Timina	S	-	-	?	-	-
Timidina	S	-	-	?	-	-

Uracilo	S	-	-	?	S	+
---------	---	---	---	---	---	---

Asp= Ácido aspártico, Thr= Treonina, Ser= Serina, Glu= Ácido glutámico, Gly= Glicina, Pro= Prolina, Ala= Alanina, Cys= Cisteína, Val= Valina, Met= Metionina, Ile= Isoleucina, Leu= Leucina, Tyr= Tirosina, Phe= Fenilalanina, Lys= Lisina, His= Histidina, Trp= Triptófano, Arg= Arginina.

Fuente: (Mora, N., García, A., 2007).

1.1.3 Metabolismo de las BAL

Las BAL pueden ser consideradas como homofermentativas o heterofermentativas, de acuerdo a su manera de fermentar los azúcares en condiciones de crecimiento no limitadas.

Homofermentativas

Las bacterias lácticas homofermentativas generan como producto principal de la fermentación ácido láctico, estos microorganismos son del género *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*, las cuales poseen la enzima adolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación (Ramírez et al., 2011).

Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden Meyerhof Parnas (EMP) al convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, produciendo un 85 % de ácido láctico a partir de la glucosa, dando como producto final únicamente el ácido láctico (Fig. 1) (Parra Huertas, 2010).

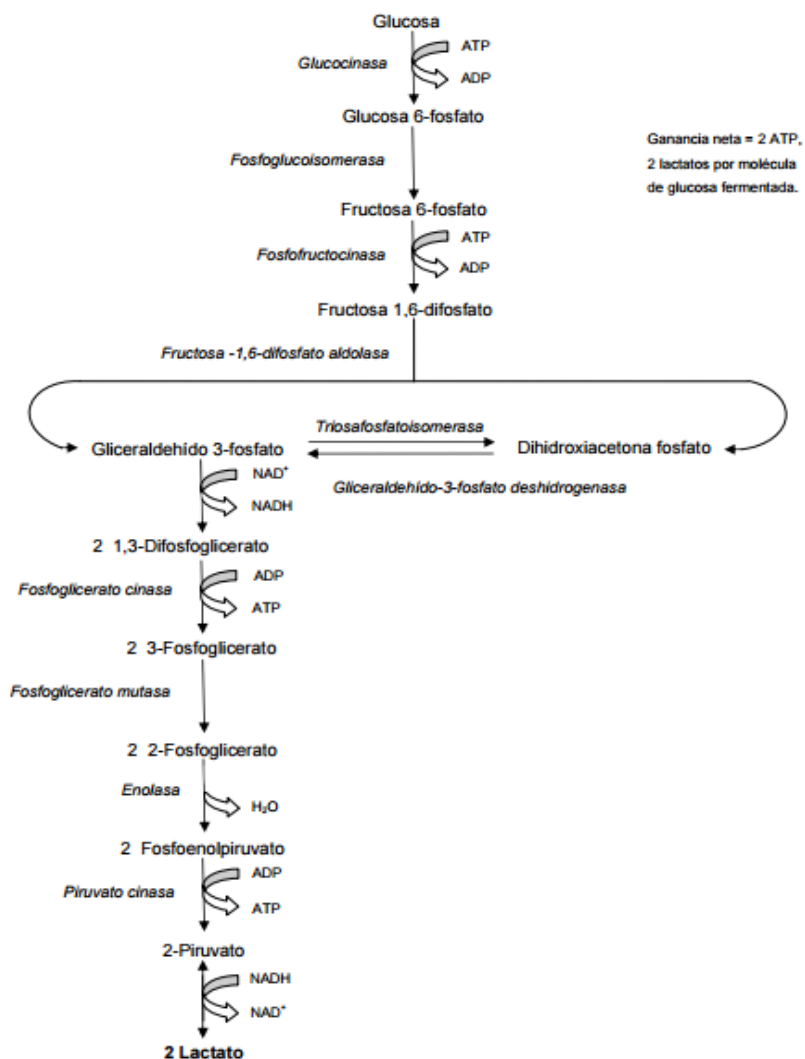


Figura 1.1: Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas

Fuente: (Mora, N., García, A., 2007).

Heterofermentativas

Las bacterias heterolácticas en la fermentación además de producir ácido láctico producen dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico y etanol. A este grupo pertenecen los microorganismos de los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* (Ramírez et al., 2011).

Las BAL heterofermentativas usan la vía 6 – fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) o de las pentosas fosfato, éstas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂, es decir este grupo de bacterias produce solamente un 50 % de ácido láctico (Fig. 2) (Parra Huertas, 2010).

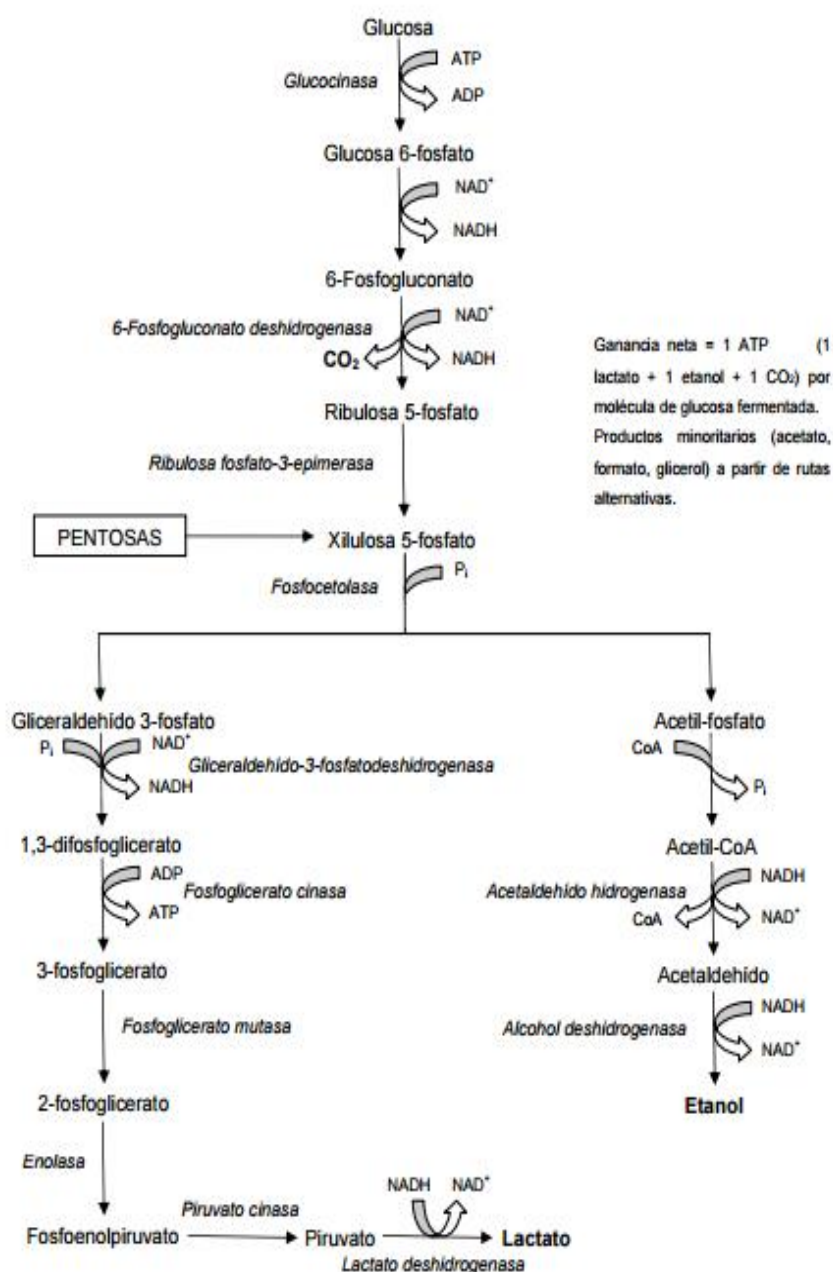


Figura 1.2: Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas

Fuente: (Mora, N., García, A., 2007).

En la siguiente tabla se menciona las bacterias correspondientes al grupo de las homofermentativas o heterofermentativas. Según ésta clasificación (Tabla 1.2) el género *Lactococcus* pertenece al grupo de bacterias homofermentativas y el género *Leuconostoc* al grupo heterofermentativas.

Tabla 1.2: Bacterias ácido lácticas homo- y heterofermentativas.

HOMOFERMENTATIVAS		HETEROFERMENTATIVAS	
Organismos	Configuración lactato	Organismos	Configuración lactato
<i>Lactobacillus</i>		<i>Lactobacillus</i>	
<i>Lb. Acidophilus</i>	DL	<i>Lb. Brevis</i>	DL
<i>Lb. Alimentarius</i>	L(D)	<i>Lb. Buchneri</i>	DL
<i>Lb. Bulgaricus</i>	D(-)	<i>Lb. Cellobiosus</i>	DL
<i>Lb. Casei</i>	L(+)	<i>Lb. Coprophilus</i>	DL
<i>Lb. Coryniformis</i>	DL	<i>Lb. Fermentum</i>	DL
<i>Lb. Curvatus</i>	DL	<i>Lb. fructivorans</i>	DL
<i>Lb. Delbruekii</i>	D(-)	<i>Lb. Hilgardii</i>	DL
<i>Lb. Helveticus</i>	DL	<i>Lb. Pontis</i>	DL
<i>Lb. Jurgurti</i>	DL	<i>Lb. Sanfrancisco</i>	DL
<i>Lb. Jensenii</i>	D(-)	<i>Lb. Trichoides</i>	DL
<i>Lb. Lactis</i>	D(-)	<i>Leuconostoc</i>	
<i>Lb. Leichmanii</i>	D(-)	<i>Leuc. cremoris</i>	D(-)
<i>Lb. Plantarum</i>	DL	<i>Leuc. Dextranicum</i>	D(-)
<i>Lb. Salivarius</i>	L(+)	<i>Leuc. Lactis</i>	D(-)
<i>Pediococcus</i>		<i>Leuc. Mesenteroides</i>	D(-)
<i>P. acidilactici</i>	DL	<i>Leuc. Gelidum</i>	D(-)
<i>P. cerevisiae</i>	DL	<i>Leuc. Camosum</i>	D(-)
<i>P. pentosaceus</i>	DL	<i>Leuc. Mesenteroides subesp.</i>	
<i>P. damnosus</i>		<i>Mesenteroides</i>	
<i>P. dextrinicus</i>		<i>Leuc. Mesenteroides subesp.</i>	
<i>P. inopinatus</i>		<i>Cremoris</i>	
<i>P. parvulus</i>		<i>Leuc. Mesenteroides subesp.</i>	
<i>Tetragenococcus</i>		<i>Dextranicum</i>	
<i>T. halophilus</i>	L	<i>Leuc. Argentinum</i>	
<i>T. muriaticus</i>		<i>Leuc. Citreum</i>	
<i>Streptococcus</i>		<i>Leuc. Fallax</i>	
<i>S. bovis</i>	D(-)	<i>Leuc. Pseudomesenteroides</i>	
<i>S. thermophilus</i>	D(-)	<i>Carnobacterium</i>	
<i>Lactococcus</i>		<i>C. divergens</i>	
<i>Lc. lactis subesp. Lactis</i>		<i>C. mobile</i>	
<i>biovar diacetylactis</i>	L(+)	<i>C. gallinarum</i>	

<i>Lc. Lactis subesp. Cremoris</i>	L(+)	<i>C. piscicola</i>	
<i>Lc. Lactis subesp. Hordniae</i>		Weissella	
<i>Lc. Garvieae</i>		<i>W. confusa</i>	DL
<i>Lc. Plantarum</i>		<i>W. hellenica</i>	D(-)
<i>Lc. Raffinolactis</i>		<i>W. halotolerans</i>	DL
Vagococcus		<i>W. Kandleri</i>	DL
<i>V. fluvialis</i>		<i>W. minor</i>	DL
<i>V. salmoninarum</i>		<i>W. paramesenteroides</i>	D(-)
		<i>W. viridescens</i>	DL
		Oenococcus	
		<i>O. oeni</i>	DL

Fuente: (Mora, García, 2007).

1.1.4 *Lactococcus*

El género *Lactococcus* pertenece a la familia *Streptococcaceae*, son cocos esféricos u ovoides, su diámetro puede variar entre 0,5 y 1 µm y pueden encontrarse en pares, formando cadenas cortas o en forma simple. El rango de pH óptimo de crecimiento es entre 6 y 6,5 pero algunas especies pueden a crecer a pH 4.4, 5 y 5.5 (Olivera, J., 2001).

Según Prescor y *col*, quienes son citados por Mora y García (2007), estos microorganismos son cocos no esporulados, inmóviles, pueden crecer a temperaturas de 10°C pero no a 45°C, estos pueden encontrarse en parejas o cadenas cortas, son catalasa negativos, anaerobios facultativos, homofermentativos y con necesidades nutricionales complejas. La longitud de la cadena va a depender también del tipo de cepa y en ciertos casos también por el tipo de medio de cultivo. También conocidos por el género *Streptococcus*. Se clasifican en:

- *Lc. lactis subesp. Lactis*
- *Lc. Lactis subesp. lactis biovar diacetyllactis*
- *Lc. lactis subesp. cremoris*
- *Lc. lactis subesp. hordniae*
- *Lc. garvieae*

- *Lc. plantarum*
- *Lc. raffinolactis*.

Se aíslan fácilmente de la leche cruda (*Lc. cremoris*) y de otros hábitats, como los vegetales (*Lc. lactis subesp. diacetylactis*) (Mora, García, 2007).

1.1.4.1 *Lactococcus lactis subesp. Lactis*

El *Lactococcus lactis subesp. Lactis* es un microorganismo mesófilo, muy utilizada como cultivo iniciador, capaz de fermentar la lactosa y producir grandes cantidades de ácido láctico. Es capaz de producir sustancias antibacterianas conocidas como bacteriocinas, entre las cuales se destacan la nisina y la diplococcina. Entre su acidez y su capacidad de producir bacteriocinas pueden inhibir el crecimiento de un gran número de microorganismos (Valbuena, E *et al* 2008).

La temperatura y pH óptimo para el crecimiento y desarrollo del *Lactococcus lactis subesp. Lactis* es de 30°C y 6.5 respectivamente. La mayoría de estas bacterias no crecen a temperaturas mayores a 45°C. Su crecimiento se da en un tiempo mayor a las 19 horas (MacFaddin, 2003).

1.1.4.2 *Lactococcus Lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*

El *Lactococcus Lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* es capaz de usar citrato como fuente de energía para su crecimiento aún en presencia de otras fuentes hidrocarbonadas. Este tipo de bacteria aporta a los alimentos con características organolépticas como olor, gusto y aroma (Martínez, F., *et al* 2009).

Según, Martínez, F., *et al* (2009), la temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria es a 35°C a un pH de 4.5 a 5.5, presentando velocidades máximas de crecimiento a ésta temperatura.

1.1.5 *Leuconostoc*

Según Prescott y *col*, quienes con son citados por Mora y García (2007), estos microorganismos son cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, su forma puede ser alargada o elíptica y pueden encontrarse en parejas o en cadenas, este género pertenecen al grupo heterofermentativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20°C a 30°C. Éstos pueden ser aislados de plantas, ensilados y leche (Mora, García, 2007).

Son muy utilizados en las industria de los lácteos (elaboración de mantequilla, quesos y para la manufactura del suero de leche) como cultivos iniciadores, ya que producen compuestos responsables del sabor (diacetilo, acetoína) (Mora, García, 2007). Estos microorganismos son mesófilos y pueden presentar crecimiento desde los 8°C y en cuanto a su pH se pueden desarrollar a un pH mayor a 4,5 (Olivera, J., 2011).

Al pertenecer al grupo heterofermentativo, estos microorganismos además de producir ácido láctico, son también capaces de producir etanol y CO₂, lo cual es necesario para la formación de ojos en diferentes tipos de quesos, como el queso Gouda.

1.1.5.1 *Leuconostoc mesenteroides*

La temperatura óptima de crecimiento para el desarrollo del *Leuconostoc mesenteroides* es de 20 a 30°C, tiene un crecimiento lento, por lo que el tiempo ideal para obtener una cantidad considerable de colonias es de 120 horas (MacFaddin, 2003).

El medio de cultivo óptimo que se utiliza para el crecimiento y desarrollo de este tipo de bacteria es el Agar MRS y el pH óptimo para el crecimiento es de 6 a 6.5 (Lozano Rodríguez, A., *et al* 2009).

Éste género se desarrolla también en placas de Agar Sangre, y como se habían mencionado anteriormente crecen de forma esférica o lenticular y pueden medir de 0.5 a 0.7 μ de ancho por 0.7 a 1 μ de longitud. En algunos casos por su forma de crecimiento se pueden confundir con el género *Lactococcus*, para lo cual es necesario realizar tinciones de Gram y luego ser observadas mediante un microscopio, y así diferenciarlas por su forma y manera de agruparse (Jofré, L., *et al* 2006).

1.1.6 Aplicaciones de las BAL en los alimentos

Estas bacterias son generalmente utilizadas como cultivos iniciadores para la elaboración y conservación de diferentes productos lácteos (Tabla 1.3) como: leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema, kéfir y quesos de diferentes tipos, destacando también su uso en productos cárnicos, bebidas alcohólicas y vegetales (Ramírez *et al.*, 2011).

Las principales funciones de las bacterias ácido lácticas en productos lácteos son: la producción de ácido, la inhibición de microorganismos indeseables, la coagulación de la leche, sinéresis del lactosuero, la reducción del contenido de azúcares, formación de aromas producidos por el diacetilo y acetaldehído, la producción de gas necesario para la formación de “ojos” en ciertos tipos de quesos y la proteólisis para su maduración (Ramírez *et al.*, 2011).



Figura 1.3: Diferentes tipos de quesos

Fuente: (Ramírez et al., 2011).

Tabla 1.3: Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.

PRODUCTOS	BACTERIAS PRINCIPALES	USOS
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Provee sabor, gusto suave, delicado y promueve la cuajada, mejora la digestión, absorción, contribuye a promover la salud.
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Lactobacillus herlveticus</i> .	Adiciona sabor, contribuye a promover la salud
Mantequilla madurada	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i> .	Promueve moderado sabor agrio y aroma.
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis ssp.</i> <i>Diacetylactis</i> .	Promover sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo).
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i> .	Promueve moderado sabor agrio y aroma. Contribuye a promover la salud.

Fuente: (Ramírez et al., 2011)

1.1.7 Compuestos antimicrobianos producidos por las BAL

Las bacterias ácido lácticas actualmente se consideran microorganismos GRAS por su acción conservadora. Su principal mecanismo de antagonismo es por sus nutrientes y por la formación de ácidos lácticos y acéticos. Además, también pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, CO₂, diacetilo, acetaldehído, H₂O₂, ácido benzoico, isómeros D de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas (Mora, García, 2007).

1.1.8 Ingeniería genética aplicada a las bacterias lácticas

El mejoramiento genético de las bacterias ácido lácticas puede tener varias vertientes, de acuerdo al tipo de aplicación para el que se pretendan. En la industria de productos lácteos son tres las áreas de mayor interés en cuanto a mejoramiento de cepas: el conocimiento del metabolismo de carbohidratos, que determinará la capacidad de asimilación de sustrato y generación de ácido láctico y de productos aromáticos; el conocimiento del sistema de proteasas y peptidasas, que determinará velocidades de crecimiento, textura del producto final y amargura; la resistencia a fagos, que determinará la estrategia de producción a seguir (Castillo Pompeyo, C. *et al*, 1991).

1.2 Queso Gouda características generales

Según la norma CODEX el Gouda es un tipo de queso con textura firme semimadurado. Tiene un color que puede ir del marfil al amarillo claro o amarillo, con pocos o abundantes ojos ocasionados por el CO₂ más o menos redondos, el tamaño de los ojos pueden variar entre la cabeza de un alfiler hasta el tamaño de una arveja (10 mm de diámetro), estos pueden estar distribuidos por el interior del queso de forma regular. Se pueden aceptar algunas grietas o aberturas. El Gouda tiene forma de cilindro aplanado con lados convexos, de bloque plano o de pan. Este tipo de queso se elabora y se vende con una corteza seca que puede tener revestimiento. En el caso del queso Gouda listo para el consumo, el proceso de maduración para desarrollar las características típicas de sabor y cuerpo, normalmente, es menos de tres semanas a una temperatura entre 10 – 15°C (Norma CODEX STAN 266 – 1966).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología, en el laboratorio de Microbiología y en el laboratorio de Tecnología de Lácteos de la Escuela de Ingeniería en Alimentos ubicados en la Facultad de Ciencia y Tecnología propiedad de la Universidad del Azuay.

2.1.1. Material Experimental

Para este proyecto de investigación se utilizó el fermento CHN – 22 (Hansen), que consta de las siguientes bacterias: *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subesp. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*.

2.1.2 Equipos, materiales e instalaciones

2.1.2.1 Equipos

- Incubadoras a 37°C
- Refrigeradora
- Balanza analítica
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar CSB 120
- Potenciómetro Mettler Toledo
- Computadora
- Equipo de electroforesis Agarosa
- Centrífuga refrigerada

- Purificador de agua por ósmosis inversa
- Transiluminador
- Vórtex Genie 2

Para la elaboración de los quesos:

- Cocineta
- Prensa
- Moldes para el queso
- Lienzos
- Recipientes
- Cámara de ambientes controlados
- Mesas
- Termómetro

2.1.2.2. Materiales de laboratorio

- Cajas Petri
- Hisopos estériles
- Cinta de parafina selladora
- Guantes estériles
- Gradillas
- Azas
- Vasos de precipitación
- Envases boeco (250, 500 y 1000 ml)
- Tubos de ensayo
- Frascos
- Pipetas serológicas
- Pipetas automáticas de 10, 100 y 1000 ul
- Puntas estériles de 10, 100 y 1000 ul
- Mecheros de alcohol
- Marcadores
- Termómetro

2.1.2.3 Reactivos

- Cepas de *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subesp. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*.
- Agar Sangre
- Agar MRS
- Agua peptonada
- Caldo MRS
- Hidróxido de Sodio 0,1 N
- Ácido Clorhídrico 0,1 N
- Kit de Extracción de ADN (Promega)
- Agarosa
- Gotaq
- TAE 50X (tris base, Ácido acético, EDTA)
- Syber Safe
- Agua ultra pura
- Primer 16SF y 16SR
- Solución Salina estéril 0,9%
- Estándar Macfarland

2.1.2.4 Aditivos

- Leche ultrapasteurizada
- Leche en polvo
- Citrato de sodio
- Tiamina
- Tripolifosfato de sodio

Para la elaboración de los quesos:

- Leche entera
- Cuajo HANSEN
- Cloruro de calcio
- Colorante para quesos

- Cloruro de sodio
- Parafina para alimentos

2.1.2.5 Instalaciones

Para llevar a cabo este proyecto de investigación se utiliza el laboratorio de Biotecnología, el laboratorio de Microbiología y el laboratorio de Tecnología de Lácteos de la escuela de Ingeniería en Alimentos de la facultad de Ciencia y Tecnología pertenecientes a la Universidad del Azuay.

2.2. Métodos de Análisis

2.2.1 Activación de las cepas

Para el desarrollo de este proyecto de investigación el primer paso a seguir es activar las cepas liofilizadas de *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*, utilizando como sustrato la leche. Para esto se esteriliza 500 ml de leche en el autoclave a 121°C por 15 minutos, el siguiente paso es pesar 0,01 gr del fermento CHN – 22 y colocar en la leche esterilizada. Se colocó en una incubadora a 37°C por un tiempo de 96 horas, tiempo necesario para que las bacterias puedan desarrollarse (Figura 2.1).



Figura 2.1: Activación de las cepas en leche

Transcurrido las 96 horas, en la cámara laminar y con todo completamente esterilizado se siembra mediante hisopado dichas cepas en Agar Sangre previamente plaqueados a diferentes pH 5.5, 6 y 6.5 (Figura 2.2), que son los pH óptimos para el crecimiento de *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Leuconostoc Mesenteroides* y *Lactococcus lactis subesp. lactis*, respectivamente.



Figura 2.2: Siembra de las cepas en Agar Sangre en la cámara de flujo laminar.

Las placas se colocan en una incubadora a 37°C (Figura 2.3), por un tiempo de 72 horas, tiempo en el cual las bacterias pudieron desarrollarse y crecer.

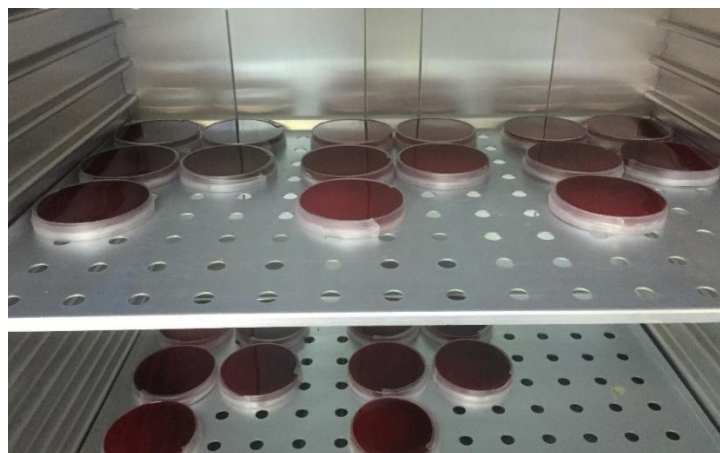


Figura 2.3: Placas colocadas en una incubadora a 37°C.

Para obtener una mayor cantidad de bacterias y seleccionar el tipo de bacteria según el medio y el pH en el que se desarrollan, se procede a colocar una cantidad de bacteria a pH 5.5 y 6.5 en tubos previamente preparados y esterilizados de agua peptonada (Figura 2.4), en un ambiente completamente estéril y así evitar cualquier tipo de contaminación, para luego ser sembradas en Agar Sangre a los mismos pHs.

De igual manera se toma una cantidad de bacteria a pH 6 y se coloca en tubos de ensayo previamente preparados y esterilizados de caldo MRS (Figura 2.4), para luego ser sembradas en Agar MRS, el cual es el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *Leucnostoc mesenteroides*.

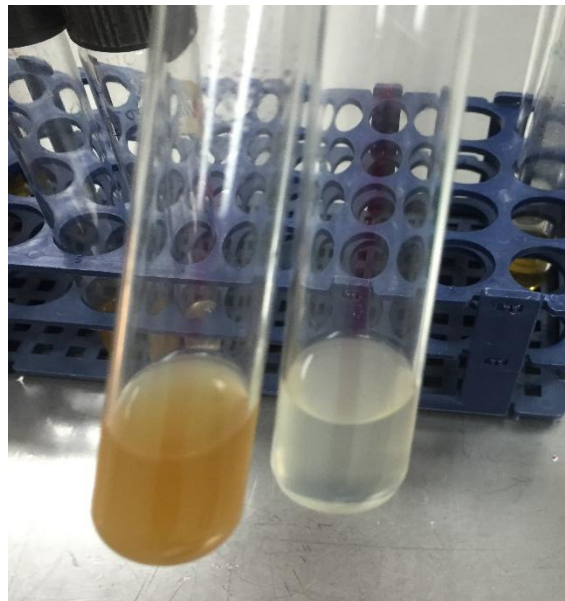


Figura 2.4: Caldo MRS y agua peptonada respetivamente.

Después de colocar las bacterias en caldo MRS y agua peptonada respectivamente, se procede a sembrar las bacterias colocadas en el agua peptonada en Agar Sangre a pH 5.5 y 6.5 para el crecimiento y desarrollo de *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*, y *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

De igual manera se siembra en Agar MRS a pH 6 las bacterias colocadas en el caldo MRS, el cual es el pH y el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *Leucnostonoc mesenteroides*.

Las siembras se realizan en la cámara de flujo laminar, con todos los objetos necesarios completamente esterilizados para evitar cualquier tipo de contaminación en el momento de la siembra de las cepas. Se colocan en una incubadora (Figura 2.5) a 37°C por un tiempo de 72 horas, tiempo necesario para que las bacterias se desarrollen completamente en cada uno de los medios de cultivo.

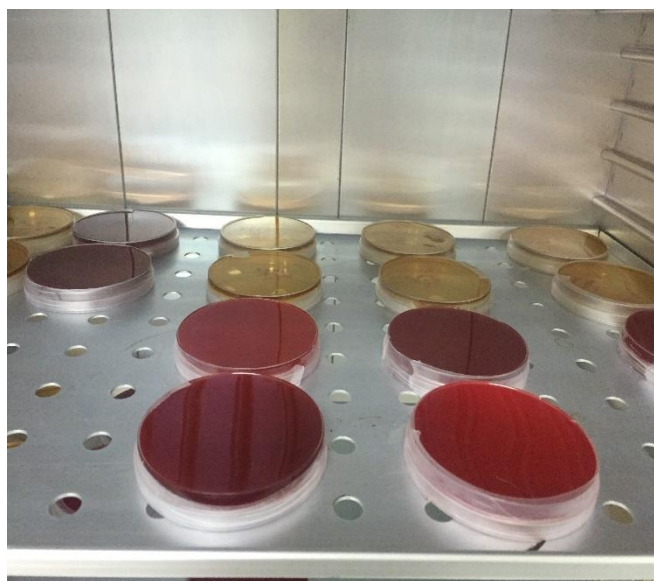


Figura 2.5: Placas de Agar Sangre y MRS en una incubadora a 37°C.

2.2.1.1 Preparación de los medios de cultivo

2.2.1.1.1 Agar MRS: Se pesa 70 gramos del Agar MRS y se disuelve en 1000 ml de agua purificada, se homogeniza y se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

2.2.1.1.2 Agar Sangre: Se pesa 40 gramos de Agar Sangre y se disuelve en 1000 ml de agua purificada, se mezcla completamente y se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos. Se enfría hasta 30°C y se coloca sangre, se homogeniza completamente y se plaquea en un ambiente estéril.

2.2.1.1.3 Caldo de cultivo MRS: Se pesa 52.2 gramos de caldo MRS y se disuelve en 1000 ml de agua purificada, se homogeniza y se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

2.2.1.1.4 Agua peptonada: Se pesa 20 gramos de peptona y se coloca en 1000 ml de agua purificada, se homogeniza y se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

2.2.2. Verificación de las bacterias

2.2.2.1 Tinción de Gram

La técnica de la tinción de Gram fue desarrollada en 1884, por el bacteriólogo danés, Christian Gam, ésta técnica permite separar a las bacterias en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas, basados en si retienen o no, el colorante primario (cristal violeta) luego del proceso de coloración. Los organismos que retienen el color violeta se designan como Gram-positivas y aquellos que pierden el color violeta después de la decoloración con alcohol (acetona), y se tiñen con el siguiente colorante (safranina) y aparecen como rojos, se denominan Gram-negativas. Una reacción positiva o negativa a la Tinción de Gram es realmente importante, ya que nos puede dar una idea clara de una primera clasificación de las bacterias en estudio (Vizcarrondo & Gutiérrez, 2008).

Después de 72 horas en la incubadora a 37°C, se observa notablemente el crecimiento de cada una de las cepas en los diferentes pH, por lo que fue necesario realizar una Tinción de Gram y observar en un microscopio, para comprobar o diferenciar cada una de las cepas.

Para la Tinción de Gram se usa el kit de tinción de Gram y se colocados en diferentes frascos, los mismos que están compuestos por violeta de genciana, lugol, alcohol cetona y fucsina. Como se observa en la figura 2.6 de derecha a izquierda.



Figura 2.6: Kit para realizar la Tinción de Gram.

Preparación de la muestra en el portaobjetos

Se toma una pequeña cantidad de la colonia con un aza de siembra previamente esterilizada con la ayuda de un mechero, se coloca en el portaobjetos, se adiciona una gota de agua destilada y se mezcla cuidadosamente, una vez diluida la muestra se flamea en un mechero bunsen pasando tres o cuatro veces por la llama hasta que la muestra se adhiera al portaobjetos, se debe evitar que la bacteria tome demasiado calor y se queme, de esta manera se impide que la muestra se lave durante el procedimiento de tinción.

Tinción de Gram

1. Se coloca primeramente el portaobjetos en la primera cubeta que contiene la solución de violeta de genciana, asegurándonos que cubra completamente el portaobjetos y se dejó teñir por 1 minuto, transcurrido este tiempo se lava con abundante agua destilada. En este paso las bacterias se van a teñir de morado.
2. Se coloca el portaobjetos en la cubeta con una solución de lugol asegurándonos que lo cubra completamente, se deja por 1 minuto y se lava con abundante agua destilada. En este paso se va a fijar el color morado en este caso ya que las bacterias en estudio son Gram-positivas.
3. Siguiendo con el proceso se coloca el portaobjetos en la cubeta con una solución de alcohol acetona, de deja actuar por 1 minuto y se lava con abundante agua destilada. En este paso se lavará el color morado de las bacterias en las que no se ha fijado el color si es que se diera este caso.
4. Por último se coloca el portaobjetos en la cubeta que contiene la solución de fucsina, se cubre totalmente y se deja actuar por 1 minuto, se lava con abundante agua destilada. En este último paso si es que existiera alguna contaminación se tiñen de rosado las bacterias Gram-negativas.
5. Se flamea el portaobjetos en un mechero pasando tres o cuatro veces por la llama hasta que se seque y el procedimiento de adhiera al portaobjetos, se coloca aceite de inmersión en la parte del portaobjetos donde se encuentra la muestra y se procede a observar el resultado mediante un microscopio.

Para observar y verificar el tipo de bacteria se utilizar el microscopio (Figura 2.7) de luz LED de la marca OLYMPUS CX22LED.



Figura 2.7: Microscopio OLYMPUS CX22LED

2.2.3 Elaboración del Diseño Experimental

Con el **diseño factorial 2^3** se puede estudiar el efecto de tres factores en dos niveles cada uno y tiene 2^k tratamientos o puntos de diseño, es decir consta de $2^3 = 2 \times 2 \times 2 = 8$ tratamientos diferentes. La matriz de diseño se construye alternando el signo menos y el signo más en la primera columna, dos menos y dos más en la segunda columna, y cuatro menos y cuatro más en la tercera, el diseño resulta en el orden estándar o de Yates (Tabla 2.1). Con el diseño factorial completo 2^3 se puede estudiar en total 3 efectos principales, 2 efectos dobles y 1 interacción simple (Gutiérrez. H., De la Vara. R., 2012)

Formato de la matriz

Los tres factores a evaluar:

Factor 1 (X1): *Lactococcus lactis subesp. lactis*

Factor 2 (X2): *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*

Factor 3 (X3): *Leuconostoc mesenteroides*

Tabla 2.1: Matriz del Diseño Factorial 2^3

Tratamientos	Notación de Yates	X1	X2	X3
1	(1)	-1	-1	-1
2	a	1	-1	-1
3	b	-1	1	-1
4	ab	1	1	-1
5	c	-1	-1	1
6	ac	1	-1	1
7	bc	-1	1	1
8	abc	1	1	1

Para la elaboración de cada uno de los experimentos se toma en cuenta la formulación original para la elaboración del queso Gouda, el cual es necesario utilizar el 1.2% del fermento. Cada uno de los diseños se realiza con 4 litros de leche, para lo cual es necesario 16 ml de cada bacteria, que es la cantidad máxima a utilizar.

Siguiendo el protocolo de la matriz del modelo del diseño experimental demostrado en la tabla 2.1, se arma la siguiente tabla con los volúmenes de cada cepa previamente activas en leche enriquecida (Tabla 2.2).

20%		20%
-1	16 ml	1
12.8 ml	3,2 ml	19,2 ml

Tabla 2.2: Valores de cada bacteria para cada diseño.

Lote	Bacteria 1 (A)	Bacteria 2 (B)	Bacteria 3 (C)
1	12,8 ml	12,8 ml	12,8 ml
2	12,8 ml	12,8 ml	19,2 ml
3	12,8 ml	19,2 ml	12,8 ml
4	12,8 ml	19,2 ml	19,2 ml
5	19,2 ml	12,8 ml	12,8 ml
6	19,2 ml	12,8 ml	19,2 ml
7	19,2 ml	19,2 ml	12,8 ml
8	19,2 ml	19,2 ml	19,2 ml

Para el cálculo de los efectos se debe expandir la matriz para tener en cuenta otros aportes, es decir cuáles son los aportes de las interacciones entre dos y tres factores. Entonces la matriz del modelo matemático es la siguiente (Tabla 2.3):

Tabla 2.3: Interacciones entre dos y tres factores.

N	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1	1

Con esta matriz y el vector de las respuestas se calcula los coeficientes del modelo de superficie de resta utilizando la técnica de regresión de mínimos cuadrados en forma matricial. Los coeficientes se calculan con la fórmula:

$$\beta = (X'X)^{-1} X'y$$

La ecuación que representa el modelo es la siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3$$

Los coeficientes β representan el aporte de cada factor y/o interacción a la respuesta. Se debe determinar si el aporte es o no significativo. Para el efecto se ha utilizado el método de Lenth, que determina la significatividad de las variables dependiendo si el valor absoluto del efecto del coeficiente es mayor de un límite que representa el error experimental expandido calculado no a partir de repeticiones de experimentos iguales sino más bien a partir de la mediana de los valores de los coeficientes (Lewis, Recherche, & Mazarin).

Como respuesta del diseño experimental se utiliza el número de ojos por cm^2 de cada queso producido, para obtenerlos se ha utilizado un método fotográfico, tomando una foto de una superficie de 2 cm^2 y recontando los ojos que comprende (Figura 2.8 y 2.9).

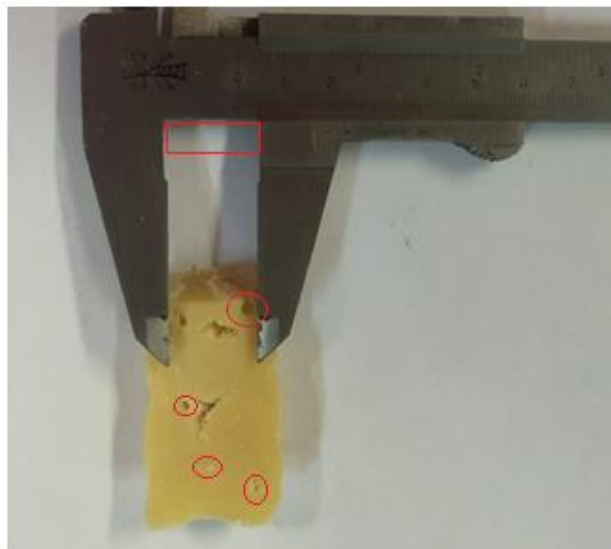


Figura 2.8: Diseño experimental 4

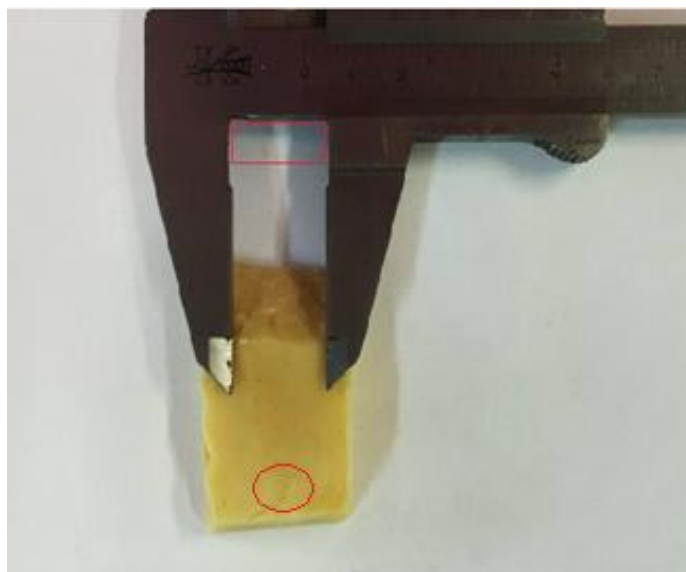


Figura 2.9: Diseño experimental 3

2.2.4. Elaboración del queso Gouda

2.2.4.1. Preparación de las bacterias

Para que las bacterias que han sido aisladas; *Lactococcus lactis subesp. lactis*, *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* estén viables y listas para utilizarse en la elaboración de cada uno de los diseños, se prepara leche con un 9% de sólido:

Leche en polvo: 45 g

Tiamina: 0,001 g

Politrifosfato: 0,15 g

Citrato: 3,5 g

Se prepara 3 litros de leche con un 9% de sólidos, 1 litro para cada bacteria colocados en envases diferentes y correctamente señalizados, y se lleva a esterilizar en el autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizada la leche en cada uno de los envases (Figura 2.10) se enfría hasta unos 30°C y se coloca una colonia de cada una de las bacterias.



Figura 2.10: Leche con 9% de sólidos con cada una de las bacterias. (*Lactococcus lactis subesp. lactis*, *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*)

Se colocan en una incubadora por un tiempo de 4 días a una temperatura de 37°C, para que las bacterias puedan actuar en la leche, y desarrollarse favorablemente. Transcurrido este tiempo se observa que las bacterias están actuando en la leche (Figura 2,11) y que ya están listas para ser utilizadas en la elaboración de los quesos en los diferentes diseños experimentales.



Figura 2.11: Envases de leche con la bacterias colocados en la incubadora a 37°C.
(Segundo día)

2.2.4.2. Elaboración de cada uno de los experimentos

Como patrón de comparación se elabora un queso con el mismo proceso pero con cantidades iguales de las tres bacterias (16 ml), colocada en la cámara de maduración con las mismas condiciones de temperatura (15°C) y humedad (80%) una semana antes que los ocho diseños experimentales, de esta manera se puede determinar la mejor mezcla de bacterias en cuanto al factor tiempo para su maduración y formación de “ojos”.

Para la elaboración de cada uno de los diseños del queso tipo Gouda, se sigue el siguiente protocolo, variando en cada diseño la cantidad de bacteria a utilizar (Tabla 2.3).

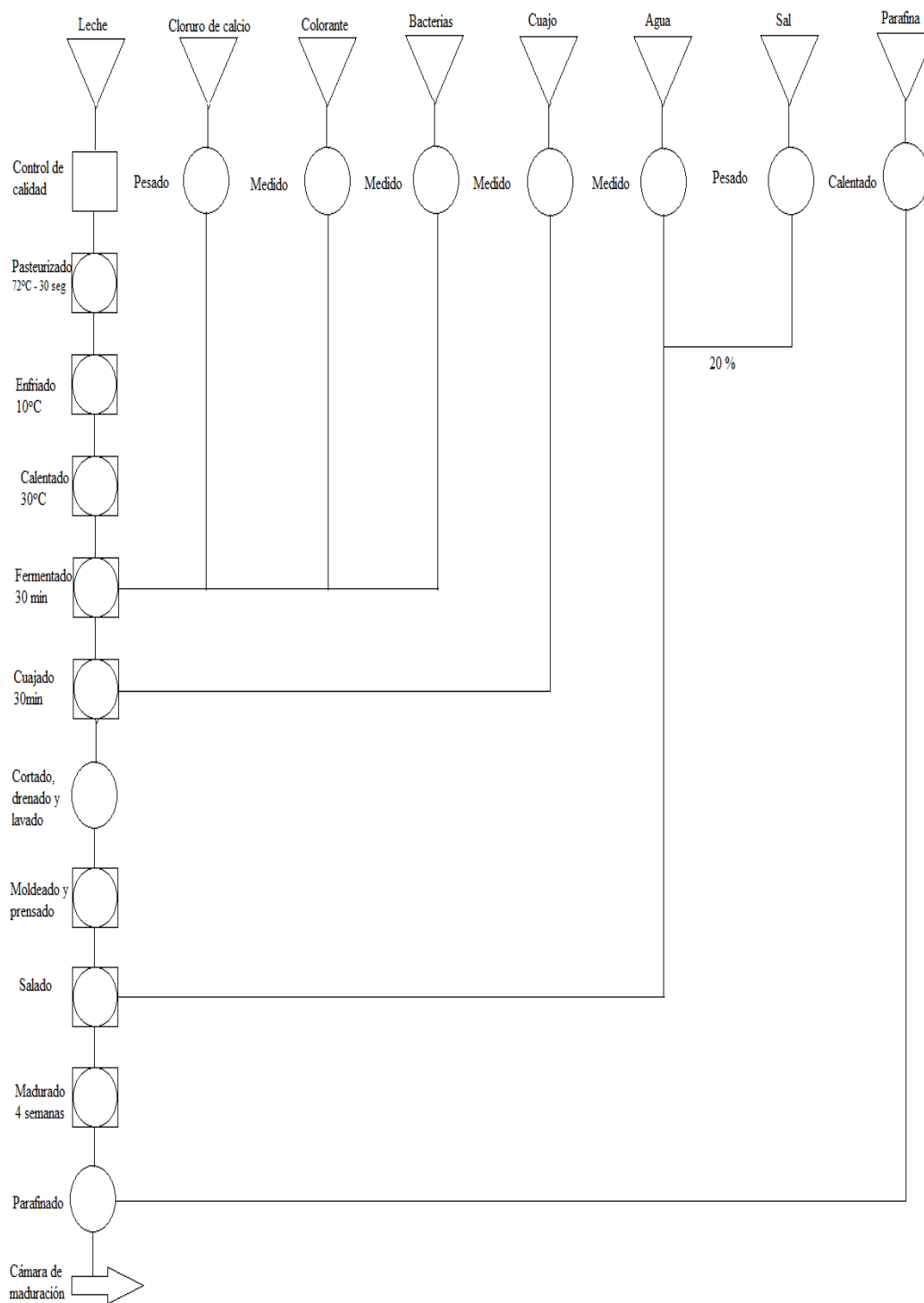


Figura 2.12: Diagrama de flujo para la elaboración del queso tipo Gouda.

Proceso de elaboración:

Control de calidad de la leche

Se realiza el control de calidad de la leche, para determinar la cantidad de grasa que tiene, la crioscopía, la acidez, el pH.

Pasteurizado, enfriado y calentado

Se pasteuriza a 72°C por 30 segundos. Se enfría la leche hasta 10°C y se lleva a almacenamiento intermedio. Se realiza un precalentamiento hasta 30°C.

Mezclado

Se adiciona Cloruro de Calcio, 0,5 gramos por cada litro de leche y 2 ml de colorante para quesos por cada 100 litros de leche, hasta 20 – 25 ml si se desea un color amarillo más fuerte.

Fermentado

Se añade las cantidades de bacterias según el diseño experimental (Tabla 2.3) y se deja madurar por 20 o 30 minutos. La temperatura de la leche debe estar entre 28 – 30°C.

Cuajado

Se adiciona el cuajo HANSEN^{MR}, 8 ml por cada 100 litros de leche y se deja cuajar por 30 minutos. La acidez debe estar entre 0,19 a 0,20%.

Cortado, drenado y lavado

Se corta la cuajada sólida que es ligeramente suave con una lira de quesería de 0,5 – 1,5 cm, se revuelve por 20 – 30 minutos hasta que el suero suba.

Se drena el 30% del suero, utilizando un colador para no perder ninguna cuajada.

Se agita la cuajada añadiendo agua caliente a una temperatura de 45°C hasta que alcance una temperatura de 38°C, se homogeniza la cuajada por unos 30 minutos. Se agrupa la cuajada y se drena el suero.

Moldeado y prensado

Se coloca la cuajada en los moldes de plástico que se cubren en el interior con lienzo y se procede a llenarlos de forma uniforme. Los quesos se prensan durante 5 horas. Durante este tiempo se voltean y se les da la forma redonda en las esquinas. La acidez del suero que sale del prensado debe estar entre 0,38%.

Salado

Los quesos se sumergen en salmuera (20% a una temperatura de 15°C) por un tiempo aproximado de 2 horas, dependiendo de la cantidad de queso.

Madurado

Los quesos se maduran por un tiempo de 4 semanas en un ambiente controlado con una temperatura de 15°C y una humedad del 80%.

Parafinado

Se parafinan los quesos para evitar la contaminación por microorganismos.

2.2.5 Extracción de las bacterias de los ocho experimentos

Las bacterias fueron aisladas de cada uno de los experimentos, para esto se pesa 10 gr de cada queso, se corta lo más fino posible y se coloca en 90 ml de agua peptonada (Figura 2.13) previamente preparada como se explica en el punto 2.2.1.1.4, en la cámara de flujo laminar con todos los materiales completamente esterilizados se siembra en Agar Sangre a un pH 5.5 para el crecimiento de *Lactococcus lactis subesp. Lactis*, en el mismo medio de cultivo a un pH 6.6 para el crecimiento de *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* y en Agar MRS a un pH 6 para el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, la siembra y crecimiento de las bacterias se puede observar de manera más detallada en el punto 2.2.1.



Figura 2.13: Muestra del queso colocado en agua peptonada

2.2.5.1 Caracterización de las bacterias ácido lácticas mediante ADN

Las técnicas de extracción de ADN son muy utilizadas para la caracterización de las bacterias en este caso, esta técnica se realiza mediante corridas en geles de agarosa lo que permite que las moléculas migren y se pueda determinar los diferentes pesos moleculares de cada una de las bacterias en estudio. De esta manera se puede armar una base de datos con los resultados obtenidos. Para realizar esta técnica se preparó diferentes reactivos como el TAE (tris base, ácido acético, EDTA), el cual es necesario para preparar los geles de agarosa.

2.2.5.1.1. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN de cada una de las bacterias en estudio se utilizó un kit de extracción: *Wizard® Genomic DNA Purification kit*, cada uno de los pasos se detallan en el siguiente listado. (*Promega Corporation*, 2010):

- Agregar 1ml de caldo de cultivo con la bacteria que vayamos a analizar de 72 horas de crecimiento a un tubo de 1,5ml *ependorf*.

- Centrifugar a 13000-16000 rcf por 2 minutos hasta obtener un sedimento por la centrifugación. A continuación, remover el sobrenadante.
- Resuspender las células en 480µl de una solución de EDTA 50Mm
- Agregar la enzima en un volumen de 120µl y resuspender las células obtenidas por la centrifugación en los sedimentos, posteriormente pipetear generosamente hasta mezclar la solución para ayudar a la eficiente lisis celular.
- Agregar 600µl de *Nuclei Lysis Solution*. y Generosamente se pipetear hasta resuspender.
- Incubar a 80°C por 5 minutos para la lisis de las células; y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 3µl de *RNase Solution* a las células ya efectuada la lisis. Invertir dos a cinco veces para mezclar.
- Incubar a 37°C de 15-60min. Y enfriar a temperatura ambiente.
- Agregar 200µl de *Protein Precipitation Solution* a la solución anterior. Después realizar un vortex vigorosamente a la máxima velocidad por 20 segundos para mezclar las dos soluciones.
- Incubar la muestra en hielo por 5 minutos. y centrifugar a 13000-16000 rcf por 3 minutos.
- Transferir el sobrenadante contenido el ADN a un tubo limpio de 1.5ml para microcentrífuga, colocado previamente 600µl de isopropanol a temperatura ambiente.

- Mezclar de una manera generosa hasta conseguir una masa visible de ADN y centrifugar a 13000-16000 rcf por 2 minutos.
- Cuidadosamente quitar el sobrenadante y drenar el tubo con papel absorbente. Posteriormente agregar 600µl de Etanol al 70% a temperatura ambiente y agitar varias veces para lavar la masa visible de ADN.
- Centrifugar a 13000-16000 rcf por 2 minutos. Cuidadosamente quitar el Etanol y drenar el tubo mediante un papel absorbente y con la ayuda de una corriente de aire evaporar el alcohol por 10-15 minutos.
- Agregar 100µl de *ADN rehydration solution* al tubo y rehidratarlo al incubarlo a 65°C por 1 hora, periódicamente mezclar los tubos
- Guardar los tubos a 4°C.

2.2.5.1.2 Electroforesis con gel de agarosa al 1%

Según lo citado por María Mercé Sanz, la electroforesis en gel de agarosa se basa en la separación de las moléculas de las muestras según su carga, su tamaño y su forma a través de una matriz sólida que funciona como un filtro. Las moléculas más pequeñas pasan fácilmente por el tramo del gel de agarosa que las moléculas más grandes (Sanz Magrané, M., 2012).

La electroforesis con gel de agarosa es una de las formas más eficaces para separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños que van desde 1000 pb a 25 kb. Para realizar esta técnica se carga el ADN en los pocillos prefabricados en el gel y se aplica una corriente. Las moléculas de ADN tienen carga negativa por lo que cuando se aplica una fuente de corriente eléctrica migran al polo positivo (Sanz Magrané, M., 2012).

El ADN tiene una relación masa/carga, las moléculas de ADN se separan por tamaños en el gel de agarosa, por lo que el recorrido de las moléculas es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. La velocidad con la que se mueven las moléculas a través de un gel se determina por: el tamaño de la molécula, la concentración de agarosa, la tensión aplicada, presencia de bromuro de etidio, del tipo de tampón que se utiliza para la electroforesis (Costumbrado, J., *et al*, 2012).

Este proceso se lleva a cabo utilizando un buffer o tampón que puede ser el TAE, esto hace que en el caso de los ácidos nucleicos el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, y por consiguiente durante el proceso de electroforesis las moléculas migran hacia el polo positivo. Para la aplicación de geles de agarosa se utiliza el bromuro de etidio, el cual es una molécula intercalante que se une al ADN, éste tiene un efecto fluorescente al estar en contacto con la luz UV lo que hace posible la visualización de bandas de los especímenes de las muestras de ADN y de los *ladder* utilizados (Tamay de Dios, L., *et al*, 2013).

El análisis de electroforesis se realiza para saber si hay presencia de ADN en cada una de las muestras preparadas en el proceso anterior y de esta manera poder seguir con los análisis para la caracterización de cada una de las muestras de bacterias. Como primer paso para llevar a cabo este proceso se prepara TAE 50X mediante el siguiente procedimiento:

Para preparar un litro de TAE 50X se necesita medir 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M y pesar 242 g de tris base, todos los reactivos se colocan en una botella BOECO para esterilizar, disolver completamente todos los reactivos y llevar al autoclave por 15 minutos a 121°C.

Para utilizar en la cámara de electroforesis y en la preparación de los geles de agarosa se necesita TAE 1X, por lo que es necesario bajar la concentración de la preparación anterior, para esto se sigue el siguiente procedimiento:

Partiendo de la ecuación para bajar la concentración:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

C1: TAE 50X

V1: Volumen a utilizar del TAE 50X

C2: TAE 1X

V2: Volumen a preparar de TAE 1X (1000 ml)

$$V1 = (C2 \cdot V2) / C1$$

$$V1 = (1 \cdot 1000) / 50$$

$$\mathbf{V1 = 20 \text{ ml de TAE 50X}}$$

Para preparar 1000 ml de TAE 1X se mide 20 ml de TAE 50X y 980 ml de agua ultrapura.

Preparación del gel de agarosa al 1%

Para preparar el gel de agarosa se mide 80 ml de TAE 1X y se coloca en un Erlenmeyer de 250 ml, se pesa y agrega 0,8 g de agarosa para preparar un gel al 1%, para disolver completamente la mezcla se calienta en el microondas en 4 intervalos de 15 segundos hasta obtener que la mezcla esté completamente disuelta.

A esta mezcla se agrega 8 μ l de *Syber Safe* 10000X de concentración, se mezcla completamente y se coloca en el molde para hacer los geles, se coloca la peineteta para formar los pocillos, y se deja reposar por aproximadamente veinte minutos colocados en un ambiente oscuro, una vez formado el gel se retira la peineteta.

Una vez preparado el gel se coloca en el equipo de electroforesis (Figura 2.14) y se coloca el TAE 1X hasta que cubra la superficie del gel, se coloca en el primero y ultimo pocillo el *LADDER* (0,5 μ l de agua ultrapura y 0,5 μ l de *LADDER*), en el penúltimo pocillo se coloca el blanco y en el resto de pocillos se colocan una mezcla de 2 μ l de Loading Buffer y 8 μ l de la muestra.

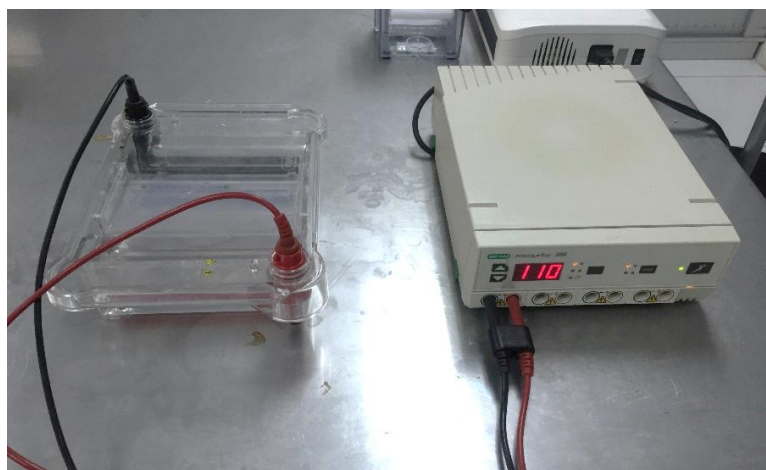


Figura 2.14: Equipo de electroforesis.

Se coloca en el equipo y se calibra a 110V por 25 minutos hasta que las moléculas migren. Una vez realizado el proceso de electroforesis con cada una de las muestras se coloca el gel en el equipo ENDURO GDS (Figura 2.15) que es un transiluminador de luz ultravioleta que se utiliza para revelar los geles de agarosa.

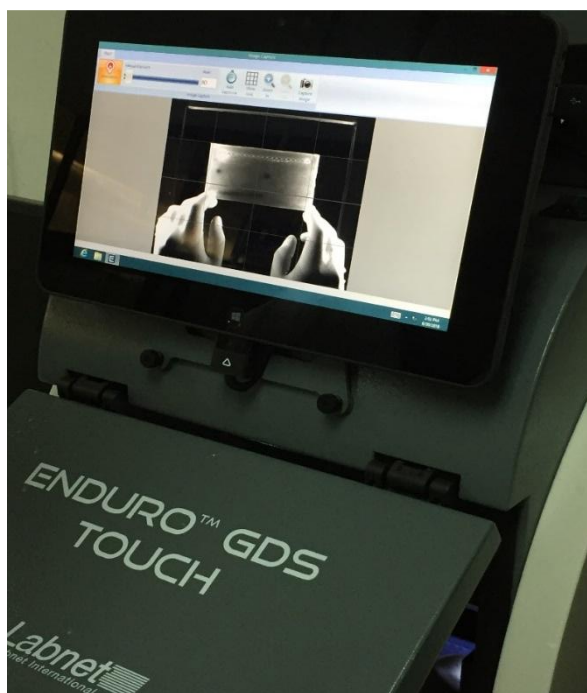


Figura 2.15: Gel de agarosa en el equipo Enduro GDS

Las fotografías obtenidas mediante este equipo nos muestra la presencia de ADN en cada una de las muestras, representadas en el anexo 13. De esta manera se confirma la presencia de ADN en cada una de las muestras y se puede dar paso a la realización de los siguientes análisis.

2.2.5.1.3 PCR

Uno de los métodos más utilizados que permiten estandarizar protocolos experimentales para realizar estudios de ADN es el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR por sus singlas en inglés). La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN. Esta reacción aprovecha la capacidad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar el ADN en las células (Tamay de Dios, L., *et al*, 2013).

Si se usa como sustrato ADN genotipo, se habla específicamente de un PCR, por lo contrario si se usa ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se conoce como RT – PCR (*Reverse transcription – PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra con la enzima transcriptasa reversa, la misma que es capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc (Tamay de Dios, L., *et al*, 2013).

La enzima más utilizada para realizar este método es la Taq ADN polimerasa, la cual proviene de una bacteria termófila, lo cual significa que es una enzima termoestable por lo que soporta altas temperaturas y no pierde su funcionalidad, y esto es lo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos. Para que la enzima funcione con alta especificidad se necesitan de primers, que son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar (Tamay de Dios, L., *et al*, 2013).

La PCR se lleva a cabo mediante tres etapas principales, **desnaturalización:** en esta etapa las cadenas de ADN son calentadas y separadas por una temperatura de 95°C durante 20 o 30 segundos, **hibridación:** en esta etapa los primers se alinean con su secuencia complementaria, esto se lleva a una temperatura de 50°C - 60°C y **extensión:** en la etapa final actúa la Taq polimerasa y agrega dNTP's para crear las cadenas completas de ADN, la temperatura para esta reacción es de 72°C. El producto final de este proceso son los amplicones los cuales pueden ser visualizados mediante el proceso de electroforesis en geles de agarosa, esto garantiza que el proceso se ha realizado exitosamente (Tamay de Dios, L., *et al*, 2013).

Este proceso se lleva a cabo en el termociclador, el cual mantiene constante el tiempo y la temperatura, lo que garantiza que el proceso se va a llevar a cabo de una manera eficiente.

PCR o reacción de cadena de polimerasa es un método utilizado para multiplicar o ampliar las cadenas de ADN de las cepas en estudio mediante altas temperaturas, en este caso se utilizó el primer 16S para bacterias, y para su desarrollo se siguió el siguiente protocolo.

Se preparó en los tubos *ependorf* de 0,2µl propiamente para ser utilizados en PCR, en cada tubo se colocó los siguientes compuestos con el ADN de las bacterias en estudio y además se preparó un blanco, como se muestra en el siguiente cuadro:

Tabla 2.4: Preparación de las soluciones para PCR para cada tubo

Compuestos	<i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>	<i>Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Blanco
Gotaq	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Primer 16SF	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Primer 16SR	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Agua	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
ADN	1 µl	1 µl	1 µl	X
TOTAL	20 µl	20 µl	20 µl	19 µl

Una vez preparados los tubos se colocaron en el termociclador con el programa 16S como se muestra en la siguiente figura:

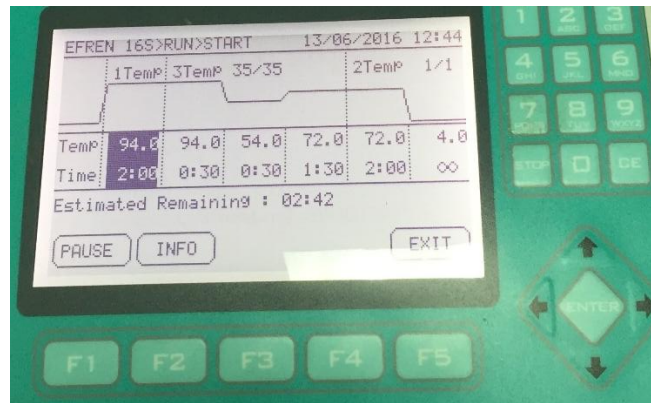


Figura 2.16: Programa de PCR 16S

Este proceso tiene un tiempo de duración de 2 horas con 42 minutos, tiempo en el cual las muestras colocadas en el equipo pasan por diferentes temperaturas, a 94°C temperatura en la cual se desnaturalizan las cadenas de ADN, a 54°C temperatura a la cual se da el anillamiento con los primers y a 72°C temperatura en la cual se da el anillamiento y extensión de las cadenas, después del tiempo transcurrido y de los diferentes procesos las cadenas de ADN de cada una de las muestras se duplicaron de manera significativa, obteniendo de esta manera suficiente ADN para poder visualizar posteriormente mediante el proceso de electroforesis con geles de agarosa.

2.2.5.1.4. Electroforesis con gel de agarosa al 1,4%

Para utilizar en la cámara de electroforesis y en la preparación de los geles de agarosa se necesita TAE 1X, por lo que es necesario bajar la concentración de la preparación anterior, para esto se sigue el siguiente procedimiento:

Partiendo de la ecuación para bajar la concentración:

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

C1: TAE 50X

V1: Volumen a utilizar del TAE 50X

C2: TAE 1X

V2: Volumen a preparar de TAE 1X (1000 ml)

$$V1 = (C2 * V2) / C1$$

$$V1 = (1 * 1000) / 50$$

$$V1 = 20 \text{ ml de TAE 50X}$$

Para preparar 1000 ml de TAE 1X se mide 20 ml de TAE 50X y 980 ml de agua ultrapura.

Preparación del gel de agarosa al 1.4%

Para preparar el gel de agarosa se mide 80 ml de TAE 1X y se coloca en un Erlenmeyer de 250 ml, se pesa y agrega 1,12 g de agarosa para preparar un gel al 1,4%, para disolver completamente la mezcla se calienta en el microondas en 4 intervalos de 15 segundos hasta obtener que la mezcla esté completamente disuelta.

A esta mezcla se agrega 8µl de *Syber Safe* 10000X de concentración, se mezcla completamente y se coloca en el molde para hacer los geles, se coloca la peineta para formar los pocillos, y se deja reposar por aproximadamente veinte minutos colocados en un ambiente oscuro, una vez formado el gel se retira la peineta (Figura 2.17).

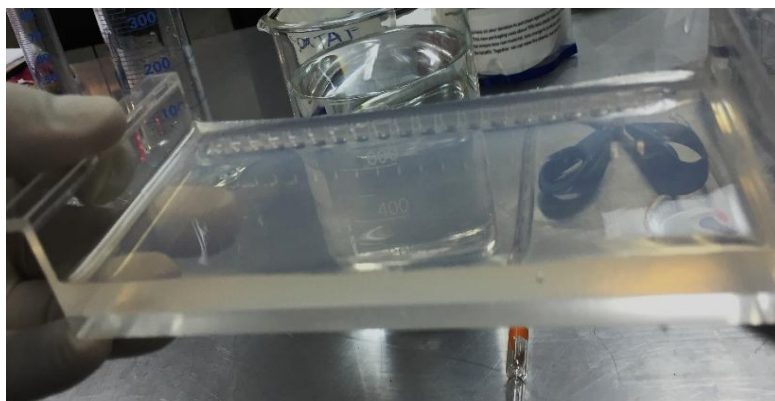


Figura 2.17: Gel de agarosa

Una vez preparado el gel se coloca en la cámara de electroforesis (Figura 2.18) y se coloca el TAE 1X hasta que cubra la superficie del gel, se coloca en el primero y ultimo pocillo el *LADDER* (0,5 μ l de agua ultrapura y 0,5 μ l de *LADDER*), en el penúltimo pocillo se coloca el blanco y en el resto de pocillos se colocan las muestras sometidas anteriormente al método de PCR.



Figura 2.18: Muestras colocadas en la cámara de electroforesis.

Se coloca en el equipo y se calibra a 110V por 25 minutos hasta que las moléculas migren (Figura 2.19).

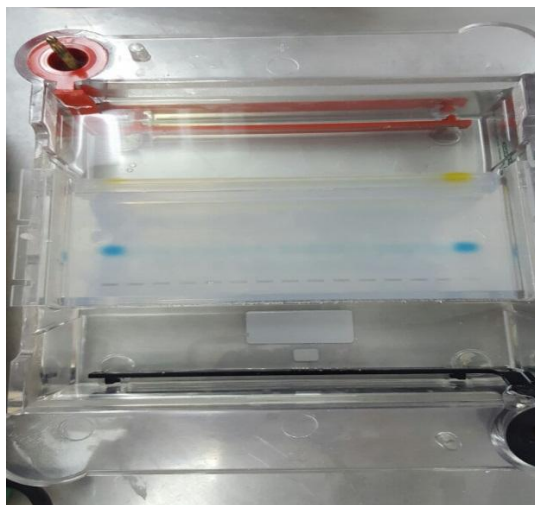


Figura 2.19: Electroforesis en gel de agarosa.

Después de haber realizado la electroforesis con cada una de las muestras, se lleva el gel al equipo ENDURO GDS (Figura 2.20) que es un transiluminador de luz ultravioleta que se utiliza para revelar los geles de agarosa.



Figura 2.20: Equipo ENDURO GDS

Para culminar con este análisis, las fotografías tomadas con el transiluminador se estudiaron y analizaron con el programa *Totallab*, midiendo los diferentes recorridos de las moléculas de ADN de cada una de las muestras en el gel de agarosa.

2.2.6 Análisis Sensorial

Para realizar el análisis sensorial de los ocho diseños experimentales se selecciona a 10 personas que han probado y conocen el queso tipo Gouda, estas personas son estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad del Azuay.

Para obtener mejores resultados antes de comenzar con la catación se realiza una breve introducción de lo que es el queso tipo Gouda, los parámetros a evaluar en cuanto a su sabor, olor, color, textura y cantidad de “ojos” presentes en los diferentes diseños, como patrón de comparación se expuso el queso Gouda de la marca Alpina presente en los supermercados del país y la muestra cero de queso realizado con cantidades iguales de las tres bacterias. Así se puede observar de manera notoria la cantidad de “ojos” que se formaron en cada muestra y por consiguiente se puede elegir el mejor diseño teniendo en cuenta también su sabor, textura y tiempo de maduración.

En cuanto al factor visual los parámetros a evaluar son el color, la forma, la cantidad de ojos y el tamaño de los ojos, del factor olfativo se toma en cuenta el aroma, el aroma a leche y el aroma a sustancias extrañas y del factor gustativo se evalúa el sabor, cremosidad, textura y regusto, teniendo en cuenta la calificación que va del 1 al 5, siendo 1 deficiente y 5 excelente representando su semejanza con el queso de referencia. En la figura número 2.21 se presenta la ficha de catación.

Figura 2.21: Ficha de catación

QUESO GOUDA							
Número de ficha		Fecha:			Catador:		
¿Ha probado alguna vez queso Gouda?				SI		NO	
NOMENCLATURA							
5	EXCELENTE						
4	MUY BUENO						
3	BUENO						
2	REGULAR						
1	DEFICIENTE						
ANÁLISIS Y CALIFICACIÓN ORGANOLÉPTICA							
FACTOR VISUAL							
Características			Calificación				
			1	2	3	4	5
COLOR							
FORMA							
CANTIDAD DE OJOS							
TAMAÑO DE LOS OJOS							
Observaciones:							
FACTOR OLFATIVO							
Características			Calificación				
			1	2	3	4	5
AROMA							
AROMA A LECHE							
AROMAS EXTRAÑOS							
Observaciones:							
FACTOR GUSTATIVO							
Características			Calificación				
			1	2	3	4	5
SABOR							
CREMOSIDAD							
TEXTURA							
REGUSTO							
Observaciones:							
TOTAL:			/55				

2.2.7 Análisis de componentes principales

El APC o análisis de componentes principales es un método que se basa en la proyección de los datos originales en la influencia de un nuevo espacio ortogonal y normal, de manera que la información contenida en las variables originales se concentre toda en las primeras componentes principales que son las coordenadas en el espacio (García Álvarez-Coque & Ramis Ramos).

Las coordenadas de los datos en el nuevo espacio se conocen como score mientras que los valores de los cosenos directores de la rotación se conocen como loading y representan la importancia que tiene cada variable en las diferentes coordenadas del nuevo espacio. Un gráfico combinado entre score y loading se denomina diplot permite correlacionar las variables con los objetos (García Álvarez-Coque & Ramis Ramos).

2.2.8 Métodos de decisiones de las funciones multicriterio

Este método se utiliza para optimizar datos de un experimento, para esto se utiliza la siguiente ecuación:

$$U_i = \sum_{j=1}^m W_j Y_{ji}$$

El principal problema de las funciones multicriterios es:

- a. Este es muy dificultoso para dar un paso *priori* para todos los criterios
- b. Es posible que los criterios múltiples óptimos indiquen un valor inaceptable de uno o más de los criterios

Sin embargo éste método también se ha utilizado ampliamente en cromatografía. (García Álvarez-Coque & Ramis Ramos).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

3.1.1 Activación de las bacterias ácido lácticas

Las cepas fueron activadas utilizando como sustrato la leche, se sembraron en Agar Sangre a diferentes pHs correspondientes a los pHs óptimos de crecimiento de cada una de las cepas en estudio.

El crecimiento de las bacterias fue suficiente para realizar los análisis pero era necesario ser un poco más específicos en cuanto al medio en el que se desarrollan las cepas ya que tenemos dos tipo de bacterias, por lo que fue necesario enriquecer las cepas en agua peptonada y caldo MRS para que se dé el crecimiento de las bacterias tipo *Lactococcus* y *Leuconostoc* respectivamente, para luego ser sembradas en Agar Sangre y en Agar MRS al pH óptimo de crecimiento de cada una de las cepas, como se describió de manera más detallada en la parte metodológica.

3.1.2 Tinción de Gram

Mediante la técnica de la tinción de Gram se obtuvieron diferentes imágenes que muestran de manera clara la diferencia que existe entre cada una de las cepas en estudio, en cuanto a su forma, su agrupación y su tamaño.

En la figura 3.1 se observa el crecimiento de bacterias en Agar Sangre a un pH de 5.5, según los análisis realizados corresponden al tipo de bacteria *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* por el medio y el pH al que se pueden desarrollar,

es un tipo de bacteria Gram positivo, en forma de cocos, se encuentran distribuidas y agrupadas en cadenas pequeñas, sin presencia de contaminación, por lo que se puede deducir que la activación y siembra de las bacterias se han realizado con éxito.

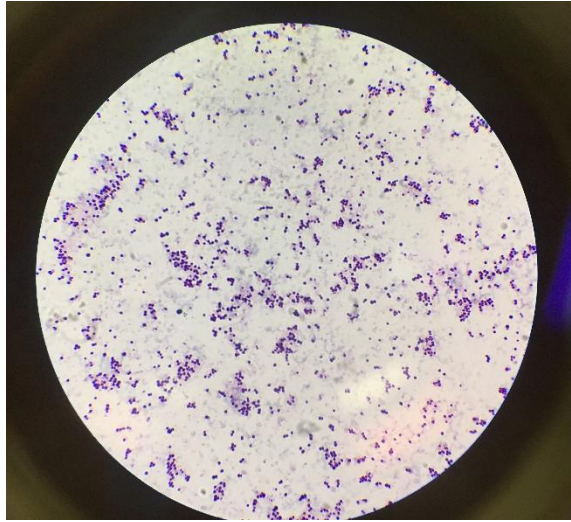


Figura 3.1: *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*

Siguiendo con el análisis de resultados, en la figura 3.2 se observa el crecimiento de las bacterias en Agar Sangre a un pH de 6.5 que según los análisis realizados anteriormente se deduce que es el tipo de bacteria *Lactococcus lactis subsp. Lactis* por el medio y el pH en el que se desarrollan, es un tipo de bacteria Gram positivo, tiene forma de cocos, se encuentran distribuidas y agrupadas en cadenas más largas, sin presencia de ningún tipo de contaminación.

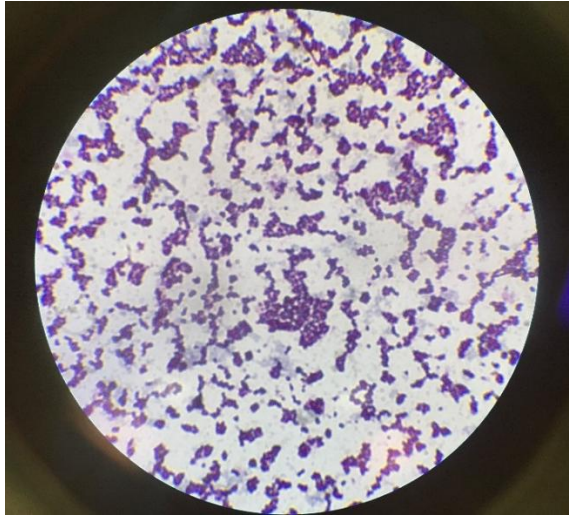


Figura 3.2: *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

Por ultimo en la figura 3.3 se puede observar el crecimiento de las bacterias en Agar MRS a un pH 6, por lo que se puede decir que es el tipo de bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, es un tipo de bacteria Gram positivo, se observa claramente que a diferencia de las cepas anteriores éste tipo de bacteria tiene una forma alargada y se encuentran agrupadas en cadenas largas, sin presencia de bacterias Gram negativas, es decir que no se observa contaminación de ningún tipo.

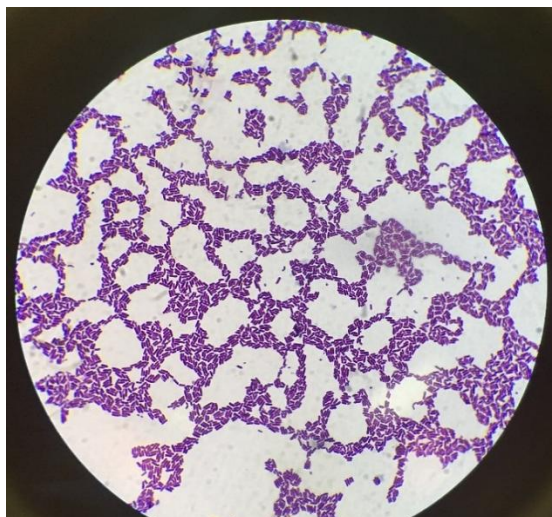


Figura 3.3: *Leuconostoc mesenteroides*.

Con el análisis de cada una de las cepas, se puede observar de manera clara la presencia de los tres tipos de bacterias en estudio, mediante éste método es posible diferenciar y poder deducir cada una de las muestras, ya sea por su forma o por su manera de agruparse, etc.

3.1.3 Resultados de la elaboración del Diseño Experimental

Como muestra de comparación se elabora un queso con cantidades iguales de bacterias, siguiendo el mismo proceso de elaboración y condiciones climáticas de madurado, aumentando únicamente el tiempo de maduración (1 semana), de esta manera se puede determinar el tiempo de maduración y formación de “ojos” que tendrán los ocho experimentos.

Se realiza exitosamente los ocho experimentos del queso tipo Gouda provenientes de la elaboración del diseño factorial 2^3 , en las mismas condiciones en cuanto al proceso y maduración, pero utilizando diferentes cantidades de las cada bacterias, dependiendo del modelo del diseño experimental. Para el análisis de resultados de cada diseño se mide la cantidad de “ojos” presentes en 2 cm^2 de cada experimento (Tabla 3.1):

Factor 1 (X1): *Lactococcus lactis subesp. lactis*

Factor 2 (X2): *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*

Factor 3 (X3): *Leuconostoc mesenteroides*

Tabla 3.1: Cantidad de “ojos” por cm² de cada experimento

Lote	Bacteria 1 (X1)	Bacteria 2(X2)	Bacteria 3 (X3)	Densidad de ojos (# de ojos por cm ²)
1	12,8 ml	12,8 ml	12,8 ml	2
2	19,2 ml	12,8 ml	12,8 ml	0
3	12,8 ml	19,2 ml	12,8 ml	1
4	19,2 ml	19,2 ml	12,8 ml	4
5	12,8 ml	12,8 ml	19,2 ml	2
6	19,2 ml	12,8 ml	19,2 ml	3
7	12,8 ml	19,2 ml	19,2 ml	1
8	19,2 ml	19,2 ml	19,2 ml	2

Con estos datos se determina la respuesta, en la siguiente tabla se muestra la parte del diseño experimental y la respuesta:

Tabla 3.2: Diseño experimental, densidad de los ojos y respuestas

N	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Densidad	R
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	0
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0	-1
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,5	-0,5
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	2	1
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	1,5	0,5
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0,5	-0,5
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0

Aplicando el método de regresión de mínimos cuadrados multivariante se obtuvo el siguiente modelo:

$$Y = 0,9375 + 0,1875*X1 + 0,0625*X2 + 0,0625*X3 + 0,3125*X1*X2 + 0,0625*X1*X3 - 0,315*X2*X3 - 0,3125*X1*X2*X3$$

Los factores cuyos coeficientes son en valor absoluto más grandes que cero son los significativos. Para decretar esta significatividad se aplica el método de Lenth y se obtuvo la siguiente gráfica:

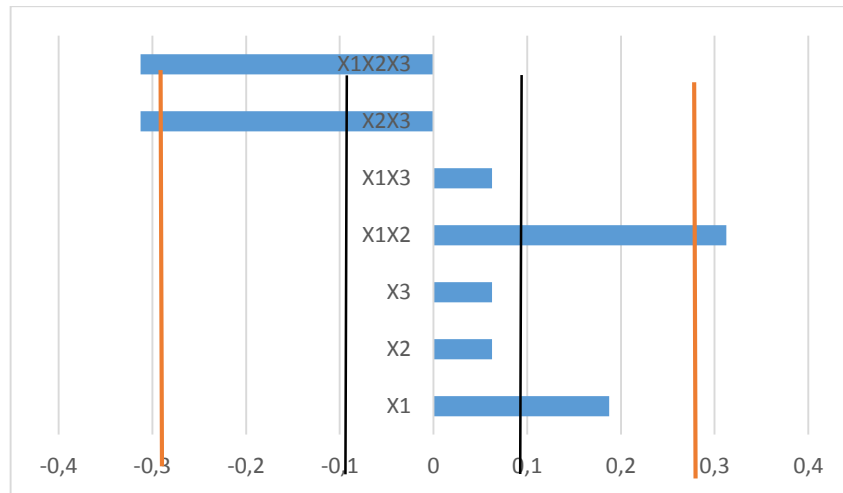


Figura 3.4: Gráfico del Lenth para detectar el valor de los factores y de las interacciones.

El factor X1 (*Lactococcus lactis subesp. lactis*) es significativo y contribuye en forma positiva, de la misma manera la interacción X1X2 (*Lactococcus lactis subesp. lactis* - *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*) es significativa y contribuye en forma positiva, por el contrario X2X3 (*Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* - *Leuconostoc mesenteroides*) son significativas pero contribuyen en forma negativa, por lo tanto, para aumentar el número de “ojos” es necesario aumentar el valor de X1 (*Lactococcus lactis subesp. lactis*) manteniendo medianamente alta X2 (*Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*) para evitar que los efectos negativos puedan disminuir el número de “ojos”.

3.1.4 Resultados del ADN de las bacterias

Se puede observar mediante las fotografías obtenidas del equipo Enduro GDS que efectivamente existe ADN de las tres bacterias en cada experimento.

En la figura 3.5 se observa en cada banda el ADN de las bacterias presentes en los experimentos 1, 2, 3 y 4 y en la figura 3.6 se observa el ADN de las bacterias presentes en los experimentos 5, 6, 7 y 8. Para observar detalladamente los resultados del experimento 4 ver Anexo 24.

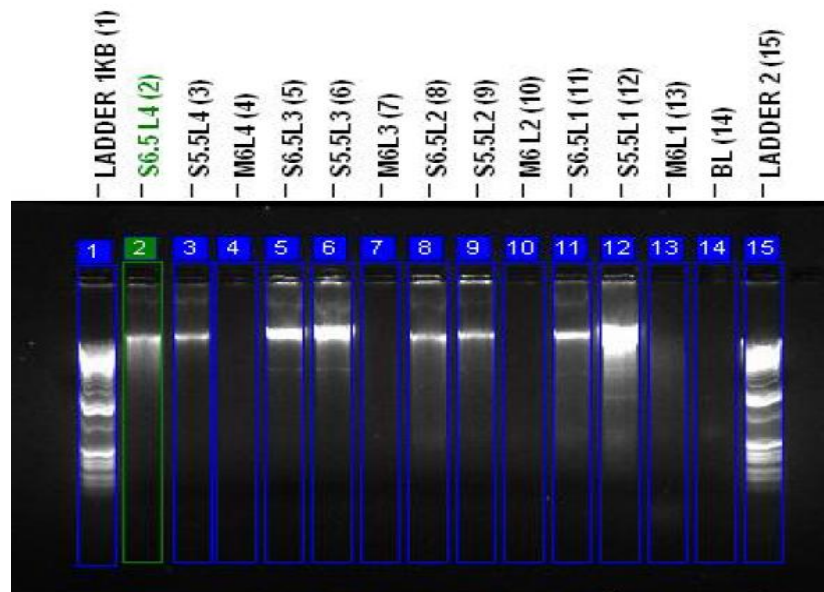


Figura 3.5: Presencia de ADN de los experimentos 1, 2, 3 y 4.

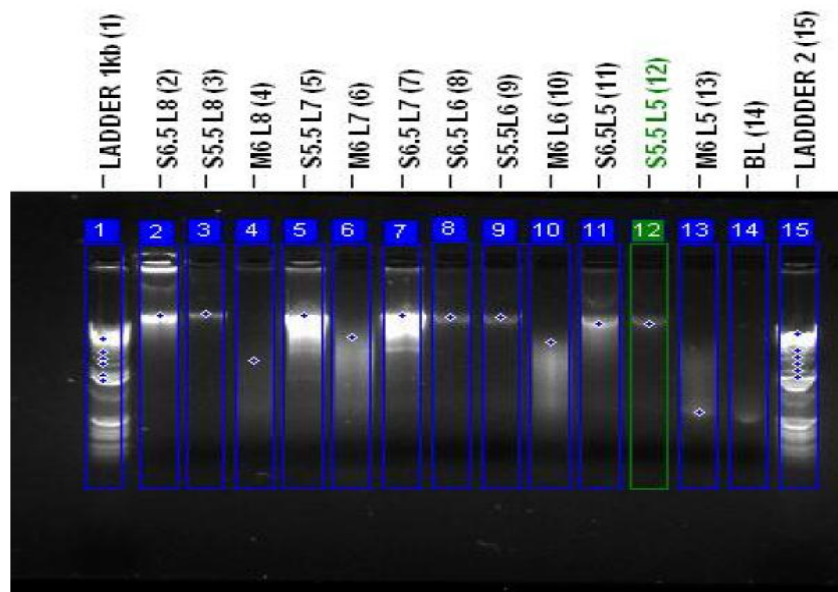


Figura 3.6: Presencia de ADN en los experimentos 5, 6, 7 y 8.

Para determinar el peso molecular de las tres bacterias se utiliza la relación de los pesos moleculares de los *Ladders* mostrados en la tabla 3.3 y 3.4, en el caso de que no existan los mismos valores se realiza una extrapolación con los valores más cercanos a los valores obtenidos de las bandas de ADN de las bacterias analizadas.

Tabla 3.3: Pesos moleculares de las 8 bandas obtenidas del *Ladder 1*

LADDER 1		
Bandas	Recorrido	Peso molecular (pb)
1	198	12.216
2	221	5090
3	231	4072
4	245	2036
5	264	1636
6	282	1018
7	320	506,517
8	344	201

Tabla 3.4: Pesos moleculares de las 10 bandas obtenidas del *Ladder 2*

LADDER 2		
Bandas	Recorrido	Peso molecular (pb)
1	197	12.216
2	219	8144
3	227	7126
4	239	5090
5	252	4072
6	276	3054
7	310	2036
8	330	1636
9	380	1018
10	449	506,517

Los valores obtenidos de las bandas de ADN de las tres bacterias se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Valores de las bandas de ADN de las bacterias

	LOTE 4	LOTE 8
	Valores de las bandas	
<i>Lactococcus Lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i>	191	194
<i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>	194	190
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		397

Con los valores del recorrido las bandas de ADN de las bacterias se realizan los cálculos para determinar el peso molecular de las bacterias en estudio, se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 3.6).

Tabla 3.6: Pesos moleculares de las bacterias

	<i>Lactococcus Lactis subesp. lactis biovar diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis subesp. Lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
LOTE 4	12599,749 pb	12404,907 pb	
LOTE 8	12404,907 pb	12666,06 pb	891,99 pb

En el lote 4 no se pudo identificar el ADN de la bacteria 3 (*Leuconostoc mesenteroides*) probablemente porque es un experimento en el cual la bacteria está en menor cantidad con respecto a las otras o también porque el método utilizado debe ser afinado para determinar trazas más pequeñas de ADN de las bacterias. Por el contrario el lote 8 en el cual todas las bacterias están en el máximo nivel se logra identificarlas exitosamente.

Luego se estudia los perfiles de cada corrida de las muestras de quesos, como ejemplo se presenta la corrida del lote 4.

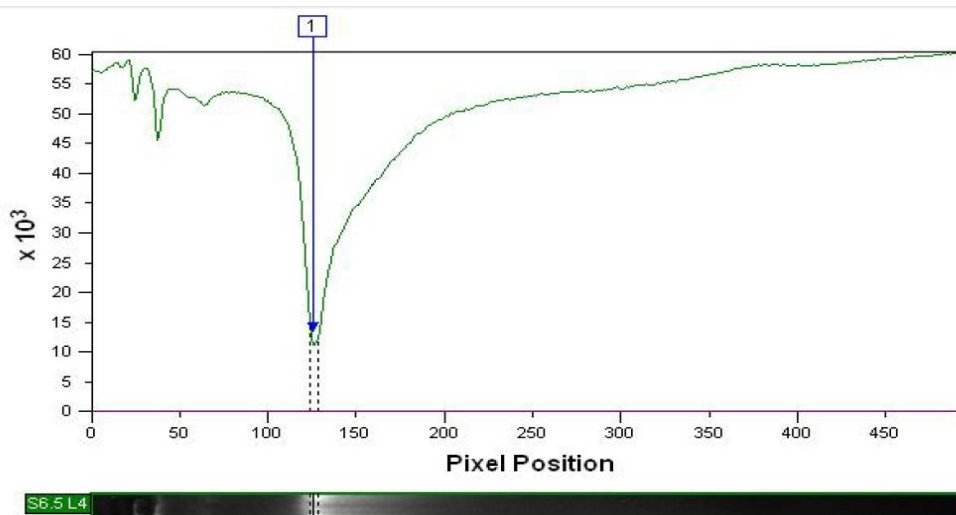


Figura 3.7: Perfil electroforético de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* del experimento 4.

En la figura 3.7 se puede notar que se presenta además de la banda principal dos bandas pequeñas ubicadas en una posición de 31 y 40. De esta manera se estudia las 24 corridas de las bacterias de los ocho experimentos y se han identificado las diferentes posiciones de las bandas. En las siguientes tablas 3.7, 3.8 y 3.9 se indica la presencia o ausencia de las bandas en las diferentes posiciones, indicando con 1 la presencia y con 0 la ausencia.

Tabla 3.7: Posiciones de las bandas de la bacteria 1 (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) de los 8 experimentos.

N	X1-20	X1-31	X1-41	X1-75	X1-115-117	X1-123	X1-126	X1-133	X1-175
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0	1	0	0
3	1	1	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	1	0	0
5	0	0	1	0	0	0	0	1	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0
7	0	0	1	0	1	0	0	0	1
8	1	1	1	1	1	0	0	0	0

Tabla 3.8: Posiciones de las bandas de la bacteria 2 (*Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*).

N	X2-20	X2-30	X2-35	X2-41	X2-55	X2-109	X2-116	X2-119	X2-120	X2-123	X2-133
1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
3	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
7	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Tabla 3.9: Posiciones de las bandas de la bacteria 3 (*Leuconostoc mesenteroides*).

N	X3-170	X3-200	X3-260	X3-279	X3-349	X3-358	X3-360
1	0	0	0	0	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	1	0
5	0	0	0	1	0	0	0
6	0	1	0	0	0	0	0
7	1	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	0	0

Se ha unificado esta tabla con la tabla número 3.2 y sobre la matriz completa se ha aplicado el análisis de componentes principales utilizando el macro de excel XLSTAT. El resultado final se presenta en la figura 3.8.

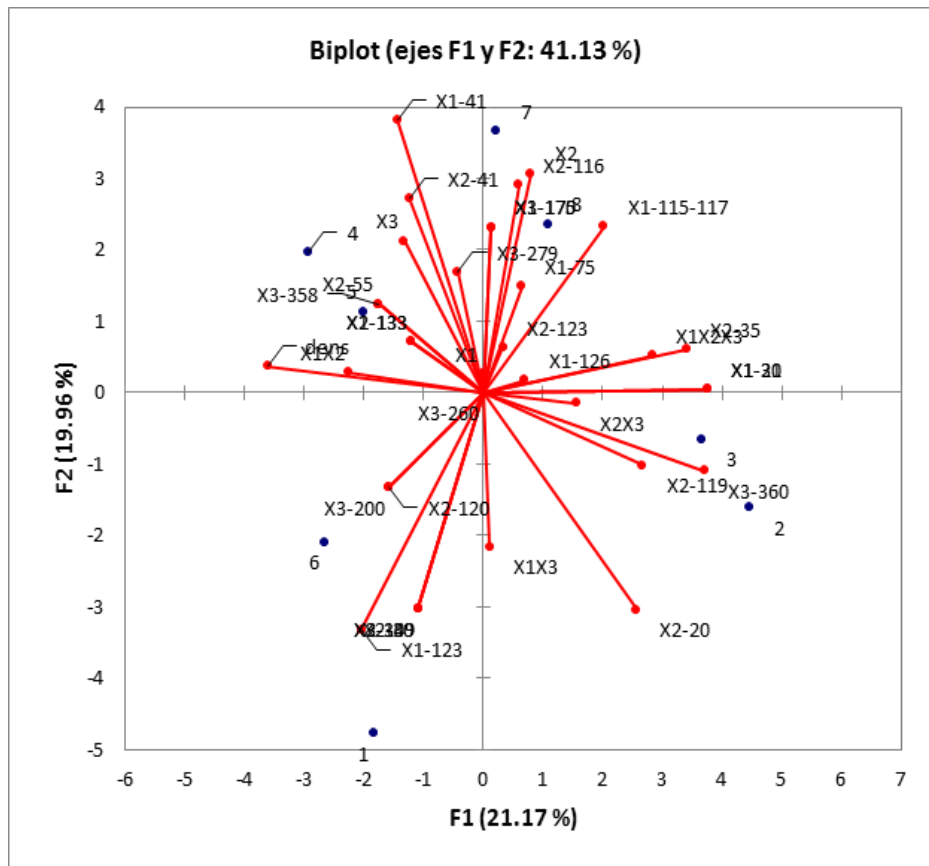


Figura 3.8: Diplot de la APC

En el diplot se puede ver que el experimento número 4 está en la dirección de las bandas a la distancia 55 correspondiente a la bacteria 2 (*Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis*) y la banda 355 de la bacteria 3 (*Leuconostoc mesenteroides*) y la banda 133 de la bacteria 1 (*Lactococcus lactis subsp. lactis*).

De esta forma se confirma cualitativamente la presencia de las tres bacterias en el experimento 4 lo que no fue posible por el método de extracción de ADN, ya que como se mencionó anteriormente no se pudo identificar la bacteria 3 (*Leuconostoc mesenteroides*).

3.1.5 Resultados del análisis Sensorial

Los resultados del análisis sensorial se presentan en la tabla 3.11 y los códigos de cada parámetro que se evalúa se observa en la tabla 3.10. Las calificaciones van del 1 al 5, siendo 1 deficiente y 5 una calificación excelente representando su semejanza con el queso Gouda de referencia de la marca Alpina.

Tabla 3.10: Códigos de los parámetros a evaluar

1	Color
2	Forma
3	Cantidad de ojos
4	Tamaño de ojos
5	Aroma
6	Aroma a leche
7	Aromas extraños
8	Sabor
9	Cremosidad
10	Textura
11	Regusto

Tabla 3.11: Resultados del análisis sensorial.

Experimento 1										
	Persona 1	Persona 2	Persona 3	Persona 4	Persona 5	Persona 6	Persona 7	Persona 8	Persona 9	Persona 10
1.1	5	5	3	4	5	4	2	4	3	2
1.2	5	5	5	4	5	5	3	3	4	5
1.3	4	3	3	3	2	2	1	3	1	3
1.4	3	3	4	3	1	3	3	4	1	3
1.5	5	4	3	4	4	4	3	5	4	4
1.6	3	4	3	5	5	3	4	4	4	4
1.7	1	5	5	5	3	5	3	4	3	5
1.8	5	4	3	4	2	3	3	5	3	4
1.9	3	2	4	5	1	3	3	5	2	4
1.10	4	1	4	4	2	3	2	5	3	4
1.11	1	4	4	5	5	5	3	5	3	5
Experimento 2										
2.1	5	5	4	5	3	4	4	4	3	5
2.2	5	5	5	4	5	5	3	5	4	5
2.3	4	2	4	3	4	3	2	3	2	2
2.4	4	4	4	3	4	4	2	4	2	2
2.5	2	4	5	2	3	1	4	4	2	2
2.6	1	4	5	2	5	1	4	3	2	2
2.7	5	4	5	4	5	1	5	4	2	2
2.8	1	3	2	2	3	1	5	4	3	2
2.9	4	3	5	3	4	3	4	5	4	5
2.10	4	4	5	3	4	3	4	5	4	4
2.11	5	4	3	4	5	5	4	2	3	3
Experimento 3										
3.1	3	4	5	4	3	4	4	5	4	5
3.2	5	4	5	4	5	5	4	5	4	5
3.3	3	4	3	4	3	2	3	3	2	3
3.4	3	3	4	4	4	3	4	4	2	3
3.5	3	3	3	3	5	3	5	5	5	4
3.6	3	3	4	4	5	4	5	5	5	3
3.7	4	3	4	5	5	3	5	5	5	4
3.8	1	5	4	4	5	4	4	5	4	5
3.9	1	3	5	3	4	2	3	5	3	4
3.10	2	4	5	4	3	2	4	3	4	4
3.11	5	5	5	5	4	5	5	4	4	5
Experimento 4										
4.1	4	5	5	4	4	4	5	5	4	5
4.2	4	5	5	5	5	5	4	5	4	4
4.3	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
4.4	5	5	4	5	4	5	4	4	4	4
4.5	4	4	5	4	5	4	4	5	4	4
4.6	5	5	5	3	5	4	5	5	5	5
4.7	4	5	5	3	5	5	4	5	5	5
4.8	3	4	4	5	3	4	5	4	4	3
4.9	4	5	5	4	4	4	4	5	5	5
4.10	4	5	5	3	4	4	4	5	4	5
4.11	5	4	4	5	5	5	4	5	5	4

Experimento 5										
5.1	2	5	5	4	4	4	3	3	4	5
5.2	4	5	4	3	5	4	4	4	4	5
5.3	4	4	4	4	3	5	5	4	3	3
5.4	5	4	4	5	3	4	4	3	3	3
5.5	4	4	5	4	5	4	2	4	4	4
5.6	4	5	4	4	5	4	2	3	4	3
5.7	1	5	5	5	5	5	4	3	4	5
5.8	5	4	3	3	3	4	4	4	3	4
5.9	2	4	3	2	1	3	4	5	2	3
5.10	2	5	3	4	2	3	5	3	4	3
5.11	1	5	4	5	5	5	5	5	3	5
Experimento 6										
6.1	4	4	4	4	4	3	3	4	4	2
6.2	4	4	3	3	5	5	4	5	4	5
6.3	5	3	4	4	2	4	5	3	3	2
6.4	5	4	4	3	2	4	4	4	3	3
6.5	4	4	5	5	5	3	4	5	5	3
6.6	4	3	5	5	5	2	3	5	5	3
6.7	4	4	5	5	5	2	2	5	5	4
6.8	1	4	5	3	3	2	2	4	3	5
6.9	2	3	5	3	4	4	3	5	4	4
6.10	3	3	3	3	3	4	3	5	4	3
6.11	4	3	4	4	5	5	3	4	2	4
Experimento 7										
7.1	3	5	5	3	4	4	4	5	5	4
7.2	5	4	4	3	5	5	4	4	5	3
7.3	4	1	3	2	2	3	4	3	2	4
7.4	4	3	3	2	2	4	3	4	2	4
7.5	5	5	5	4	4	4	3	5	3	5
7.6	3	5	4	3	4	4	4	5	3	5
7.7	1	5	5	5	3	5	5	5	3	4
7.8	5	5	4	5	4	4	2	5	4	5
7.9	3	3	4	5	4	2	3	5	2	5
7.10	3	4	5	4	4	2	4	3	4	5
7.11	1	5	4	5	5	5	3	5	3	5
Experimento 8										
8.1	4	5	4	3	5	4	4	5	5	5
8.2	5	3	3	4	5	5	5	5	4	5
8.3	2	3	2	5	4	4	3	3	4	4
8.4	2	4	3	4	4	5	3	3	4	5
8.5	4	5	5	4	4	4	5	5	5	4
8.6	3	5	5	4	3	4	5	4	5	4
8.7	1	5	5	5	3	5	5	5	5	4
8.8	4	5	4	5	4	4	3	3	4	4
8.9	3	2	3	4	4	3	4	5	5	5
8.10	3	4	5	5	3	4	4	5	4	4
8.11	3	5	5	5	5	5	4	2	3	5

Los datos de los resultados del análisis sensorial se cargaron en el programa DART2 y se obtuvo las siguientes posiciones de las funciones de utilidades de los ocho experimentos, es decir de los quesos cuyas características sensoriales se asemejan más a los rasgos del queso Gouda de referencia.

En el gráfico se presenta los valores de las funciones de utilidad de los diferentes quesos:

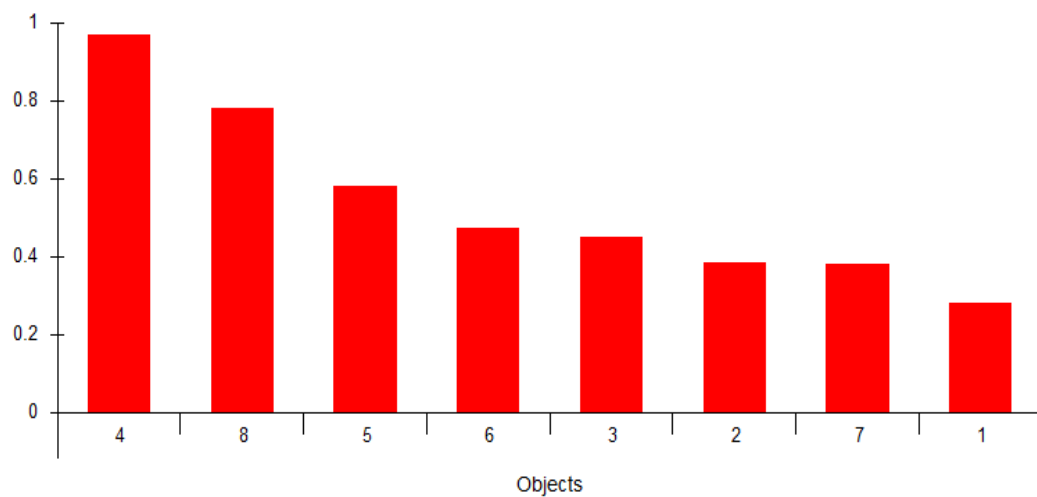


Figura 3.9: Función de utilidad de los ocho experimentos.

El queso cuyas características se acercan más al patrón de referencia es el experimento número 4, que es el mismo que tiene más “ojos” según el análisis del diseño experimental.

Se aplicó el método de la regresión lineal multivariante a las condiciones del diseño experimental con una respuesta función de utilidad. La matriz del modelo se presenta en la tabla 3.12.

Tabla 3.12: Función de utilidad de los ocho experimentos.

N	I	X1	X2	X3	X1X2	X1X3	X2X3	X1X2X3	Utility
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	0,968
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	0,778
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	0,38
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	0,471
5	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,58
6	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	0,382
7	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	0,449
8	1	1	1	1	1	1	1	1	0,279

Factor 1 (X1): *Lactococcus lactis subesp. lactis*

Factor 2 (X2): *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*

Factor 3 (X3): *Leuconostoc mesenteroides*

El modelo obtenido por regresión es:

$$Y = 0,535875 - 0,058375 * X1 - 0,141125 * X2 - 0,113375 * X3 + 0,038625 * X1 * X2 - 0,033625 * X1 * X3 + 0,082625 * X2 * X3 - 0,031625 * X1 * X2 * X3$$

Se determinó la significatividad de los factores aplicando nuevamente el método de Lenth. En la figura 3.10 se puede ver el valor de los factores significativos.

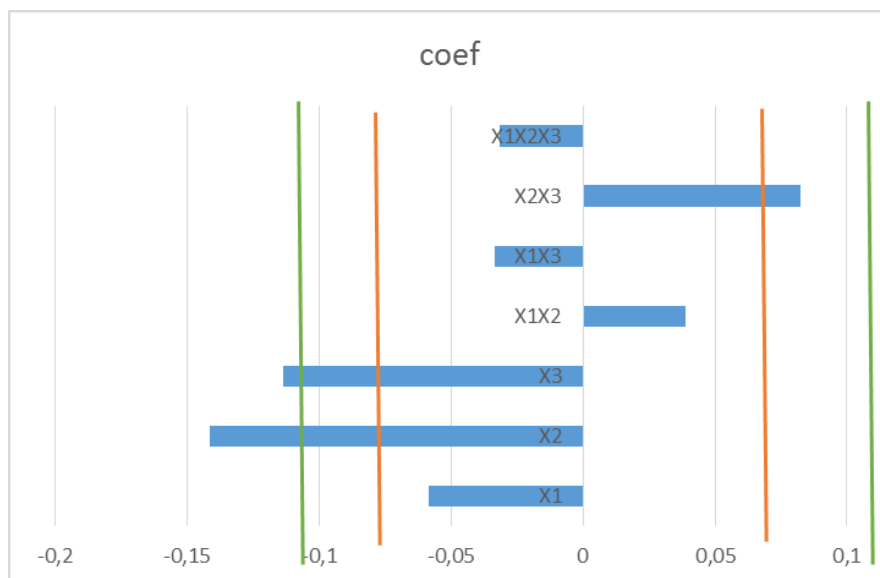


Figura 3.10: Grafico del Lenth para detectar el valor de los factores significativos.

En el gráfico de Lenth se observa que la interacción entre X2X3 (*Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* - *Leuconostoc mesenteroides*) mejora la función de utilidad, mientras que la presencia excesiva de X2 (*Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*) y X1 (*Lactococcus lactis subesp. Lactis*) empeora el resultado, es decir que los dos al mismo tiempo tienen un efecto sinérgico aumentando la cantidad de “ojos”, mientras que aisladamente tienen efectos de disminuir la calidad organoléptica, en este caso el X1 (*Lactococcus lactis subesp. Lactis*) no es significativo sobre la caracterización organoléptica.

3.2 DISCUSIONES

La activación de las bacterias ácido lácticas se realizó exitosamente, utilizando como sustrato la leche previamente esterilizada, medio en el cual se desarrollaron y actuaron en el sustrato, observando notablemente los cambios que ocasionan las bacterias en la leche, en un tiempo de 96 horas a una temperatura de 37°C, sin tener problema alguno durante el proceso. Se recomienda realizar un análisis de la leche que se va a utilizar ya que si ésta contiene antibióticos puede retrasar el crecimiento o inhibir de las bacterias.

Según Parra (2010), en su artículo publicado, dice que las bacterias ácido lácticas cumplen un papel importante en los alimentos, en la formación del sabor, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aromas, producción de gas requerido para la formación de “ojos” en algunos tipos de quesos. Con el desarrollo de esta investigación se pudo corroborar la función que cumplen las cepas en estudio, dando como producto final quesos con una buena cantidad de “ojos” producidos por la cepa *Leuconostoc mesenteroides* el cual era nuestro tema de investigación.

Olivera J. 2001, en su tesis “Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche”, en cuanto al crecimiento de las bacterias ácido lácticas, dice, que el rango de pH para el desarrollo y crecimiento del género *Lactococcus* es de 6 y 6.5, y ciertas especies de *Lactococcus* pueden crecer a un pH de 4.5 a 5.5, lo cual se puso en práctica para la investigación dando buenos resultados de crecimiento.

Según MacFaddin, (2003), la temperatura y el pH óptimo para el crecimiento del *Lactococcus lactis subesp. Lactis* es de 30°C y 6.5 respectivamente. En el caso de esta investigación las bacterias se desarrollaron correctamente y crecieron en cantidades considerables a un pH de 6.5, pero en cuanto a la temperatura lo mencionado por MacFaddin no funcionó, es decir a 30°C las colonias formadas fueron demasiado

pequeñas siendo imposible su conteo, mientras que a una temperatura de 37°C las colonias formadas fueron notables, haciendo posible el uso de estas colonias para los siguientes análisis.

Martínez F., *et al* 2009, en su investigación asegura que, el género *Lactococcus Lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, tiene una temperatura óptima de crecimiento de 35°C a un pH entre 4.5 y no mayor a 5.5, en la investigación realizada las cepas *Lactococcus Lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, crecieron efectivamente a un pH de 5.5, ya que a un pH menor el agar sangre no tenía la suficiente firmeza y era imposible la selección de una colonia ya que ésta resultaba contaminada por el agar, con la diferencia de que en nuestro caso la temperatura óptima de crecimiento para esta cepa fue de 37°C, mostrando la formación y crecimiento de una mayor cantidad de colonias que a una temperatura de 35°C.

Según lo citado por MacFaddin 2003, la temperatura óptima de crecimiento para el género *Leuconostoc mesenteroides* es de 20 a 30°C, en ésta investigación esta técnica no funcionó ya que a estas temperaturas el crecimiento de las colonias fueron casi nulas, siendo imposible el conteo y uso de estas colonias, mientras que a una temperatura de 38°C, las cepas crecieron notablemente, obteniendo de esta manera las colonias necesarias para realizar los siguientes procesos. En cuanto al pH óptimo para su crecimiento y el medio de cultivo necesario, Lozano Rodríguez, A., *et al* 2009, en su recopilación, explica que el pH para que esta cepa se desarrolle está en un rango entre 6 y 6.5 utilizando como medio de cultivo el Agar MRS, efectivamente en esta investigación se siguió este protocolo utilizando el pH y medio de cultivo mencionados, obteniendo buenos resultados a un pH 6, ya que a este pH crecieron un mayor número de colonias que a un pH de 6,5.

Para realizar las tinciones de Gram se siguió el protocolo de Merck (1994), sin realizar ningún cambio ya que esta técnica se ha utilizado de la misma manera durante muchos años dando buenos resultados. Según lo citado por Vizcarrondo & Gutiérrez (2008), mediante esta técnica se pudo diferenciar el tipo de bacteria, si son Gram-positivas o

Gram-negativas, en esta investigación las muestras fueron Gram-positivas, asegurándonos de esta manera que la separación de las cepas se ha realizado exitosamente, se observó notablemente mediante un microscopio la diferencia que hay entre cada una de las cepas, por su forma, su tamaño y su manera de agruparse, sin observar ninguna contaminación por bacterias Gram-negativas.

Para la extracción de ADN de cada una de las cepas aisladas de los ocho experimentos se utiliza el *Wizard® Genomic DNA Purification kit*, siguiendo el protocolo de *Promega Corporation* (2010), así se extrajo el ADN de las muestras, teniendo un inconveniente en el experimento 4 ya que no se pudo extraer el ADN de la bacteria 3 (*Leuconostoc mesenteroides*) por lo que se debería reconsiderar la utilización de éste método para realizar el análisis de trazas pequeñas de ADN considerando que en éste experimento dicha bacteria se encontraba en menor cantidad en comparación con las otras. De esta manera se pudo realizar la caracterización de las cepas, mediante el proceso de electroforesis, observado los resultados en el equipo ENDURO GDS, y con estos resultados mediante el programa *Totallab* se supo determinar los pesos moleculares de cada una de las cepas en estudio.

Con la aplicación del diseño experimental **Diseño factorial 2³** en las bacterias aisladas se pudo determinar y proponer una nueva mezcla de bacterias ácido lácticas para la elaboración del queso tipo Gouda, sin alterar las características organolépticas expuesto por la norma CODEX STAN 266 – 1966 para este tipo de queso, deduciendo que para aumentar el número de “ojos” es necesario aumentar el valor de X1 (*Lactococcus lactis subesp. lactis*) manteniendo medianamente alta X2 (*Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*) para evitar que los efectos negativos puedan disminuir el número de “ojos”.

CONCLUSIONES

- Se recopila información suficiente de las bacterias ácido lácticas, la cual nos permite conocer sus generalidades, sus características, su clasificación por su manera de fermentar los azúcares (Homo y heterofermentativas), por su temperatura de crecimiento (mesófilas y termófilas), así se sabe cuál es la ruta metabólica y a qué grupo pertenecen cada una de las bacterias en estudio, la temperatura y pH óptimo de crecimiento, investigando de esta manera que el medio de crecimiento para la cepa *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* es el Agar Sangre y pH óptimo es de 5.5, el medio de crecimiento para el *Lactococcus lactis subesp. Lactis* es el Agar Sangre a un pH de 6.5 y el medio para el *Leuconostoc mesenteroides* es el Agar MRS a un pH de 6. Por otra parte se investiga también la aplicación de las bacterias ácido lácticas en la industria de los alimentos, la cual engloba una gran diversidad como: yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc. Así como también pueden ser utilizadas para la producción de vino y cerveza.
- Se activa las cepas utilizando como sustrato la leche, luego se siembra en Agar Sangre a pH 5.5 y 6.5 y en Agar MRS a un pH 6, siendo los medios y pHs óptimos para el crecimiento del *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subesp. Lactis* y *Leuconostoc mesenteroides* respectivamente. Mediante un microscopio se observa la taxonomía de cada una de las cepas, en los tres casos son bacterias Gram positivas, *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis*, *Lactococcus lactis subesp. Lactis* tienen forma de cocos y *Leuconostoc mesenteroides* tiene una forma alargada, cada una de estas cepas se encuentran agrupadas de manera diferente en cadenas cortas y largas, por lo que fue más fácil la diferenciación de cada una de las cepas. Mediante los análisis realizados de los experimentos 4 y 8 para caracterizar cada una de las cepas se obtuvo los siguientes pesos moleculares:

	<i>Lactococcus Lactis</i> <i>subesp. lactis biovar</i> <i>diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> <i>subesp. Lactis</i>	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>
LOTE 4	12599,749 pb	12404,907 pb	
LOTE 8	12404,907 pb	12666,06 pb	891,99 pb

En el lote 4 no se pudo identificar el ADN de la bacteria 3 (*Leuconostoc mesenteroides*) probablemente porque es un experimento en el cual la bacteria está en menor cantidad con respecto a las otras o también porque el método utilizado debe ser afinado para determinar trazas más pequeñas de ADN de las bacterias. Por el contrario el lote 8 en el cual todas las bacterias están en el máximo nivel se logra identificarlas exitosamente.

- Se aplica el diseño experimental Diseño factorial 2^3 en la elaboración de los quesos tipo Gouda, obteniendo ocho modelos con diferentes mezclas de bacterias, como respuesta del diseño experimental se mide 2 cm^2 de cada experimento y se cuenta la cantidad de “ojos” que tiene, siendo la mejor mezcla la perteneciente al experimento número 4 con las mezclas de bacterias; *Lactococcus lactis subesp. lactis biovar diacetylactis* (19.2 ml), *Lactococcus lactis subesp. Lactis* (19.2 ml) y *Leuconostoc mesenteroides* (12.8 ml). El tiempo de maduración de éste modelo fue de 4 semanas, logrando de esta manera acelerar la formación de “ojos” en comparación con la muestra cero que tuvo un tiempo de maduración de 5 semanas.
- Se realiza como análisis final una catación de los ocho experimentos, el panel de catación semientrenado lo conformaron estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la Universidad del Azuay, dando una breve introducción del queso Gouda y las características que se tomaron en cuenta para su análisis, en cuanto a su sabor, su textura, su aroma y sobretodo la cantidad de ojos presentes en cada queso. Mediante el programa de Excel DART2 se dedujo que el queso cuyas características se acercan más al patrón de referencia es el experimento número 4, que es el mismo que tiene más “ojos” según el análisis del diseño experimental.

GLOSARIO

BAL: Bacterias ácido lácticas

Mircroaerofílicas: microorganismos que requieren de una baja tensión de oxígeno para desarrollarse.

EMP: Ruta metabólica de las bacterias homofermentativas. (Embden Meyerhof Parnas)

ATP: molécula utilizada por organismos vivos para proporcionar energía en las reacciones químicas (Adenosina trifosfato).

GRAS: microorganismos generalmente reconocidos como seguros.

PCR: Reacción de Cadena de Polimerasa

Auxótrofos: requieren de una serie de componentes (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas como la vitamina B, el ácido pantoténico, la biotina y el ácido fólico). (Olivera. J., 2001)

Pb: pares de bases (medida de ADN)

BIBLIOGRAFÍA

Castillo Pompeyo, C., Rosas, R., Salcedo, L., Morlon Guyot, J., & Farres, A. (s.f.). *Perspectiva en la manipulación genética de las Bacterias Lácticas*. Obtenido de http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_1991_3/perspectiva.pdf

García Álvarez-Coque, M., & Ramis Ramos, G. (s.f.). *Quimiometría*. Madrid: Síntesis.

Gutiérrez, H., & De la Vara Salazar, R. (2012). *Análisis y Diseño de experimentos*. México: Mac Graw Hill.

Jofré M, L., Sakurada Z, A., Ulloa F, M., Hormázabal O, J., Godoy M, V., Fernández O, J., . . . Canales P, A. (2006). Infección por *Leuconostoc* en pacientes con síndrome de intestino corto, nutrición parenteral y alimentación enteral continua. *Revista chilena de infectología*. Obtenido de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182006000400008&script=sci_arttext

Jorge Olivera. (Junio de 2011). *Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche*. Obtenido de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1331/1/uy24-15316.pdf>

Lee, Y., Costumbrado, J., Hsu, C., & Kim, Y. (Abril de 2012). *Electroforesis en gel de agarosa para la separación de los fragmentos de ADN*. Obtenido de <http://www.jove.com/video/3923/electroforesis-en-gel-de-agarosa-para-la-separacin-de-los-fragmentos?language=Spanish>

Lewis, G., Recherche, S., & Mazarin, C. (s.f.). *Pharmaceutical Experimental Desing*. Francia: Marcel Dekker, Inc.

Lozano Rodríguez, A., Arvizu Medrano, S., Padilla Frausto, J., Pérez Alma, G., & Ibarra Vallejo, J. (2009). *Evaluación del desarrollo microbiano y comportamiento a diferentes condiciones de *Leuconostoc mesenteroides**. Obtenido de http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/OctavoVerano_38/19_Lozano_Ana.pdf

MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Argentina.

Magrané, M. M. (Septiembre de 2012). *Electroforesis de ADN en gel de agarosa*. Obtenido de http://www.formacionprofesionalquimica.com/index.php?option=com_k2&view=item&id=149:protocolo-4&Itemid=120&lang=ca

Martínez, F., Yulán, C., Villafañe, R., Cardozo, M., & Vasek, O. (2009). *Efecto de la temperatura en el crecimiento de Lactococcus Lactis subsp. Lactis bv. diacetyLactis*. Obtenido de <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2009/CE-023.pdf>

Mora Peñaflor, N., & García Gerrero, A. (2007). *Suseptibilidad de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos*. Obtenido de <http://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Susceptibilidad%20de%20bacterias%20acido%20lacticas.pdf>

Parra Huertas, R. A. (Junio de 2010). *BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS: PAPEL FUNCIONAL EN LOS ALIMENTOS*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>

Ramírez Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (Junio de 2011). Obtenido de Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud: <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/03-07/1.pdf>

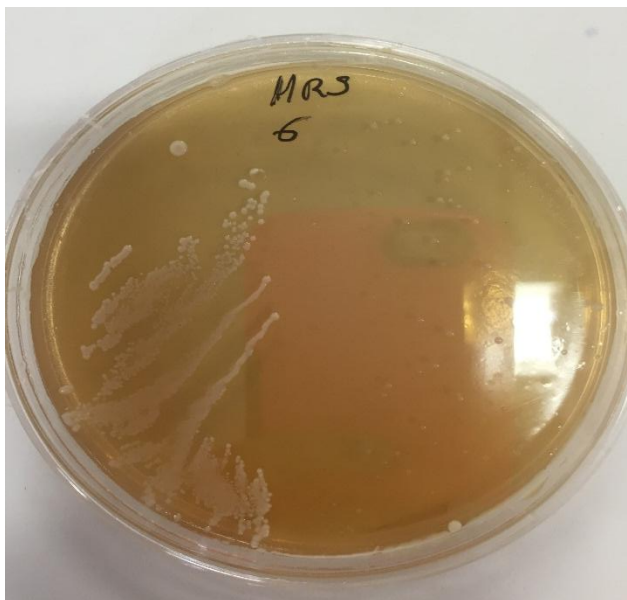
Tamy de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (Agosto de 2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Briñez, W., & Kutchinskaya, V. (2005). Modelos cinéticos aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95915511>

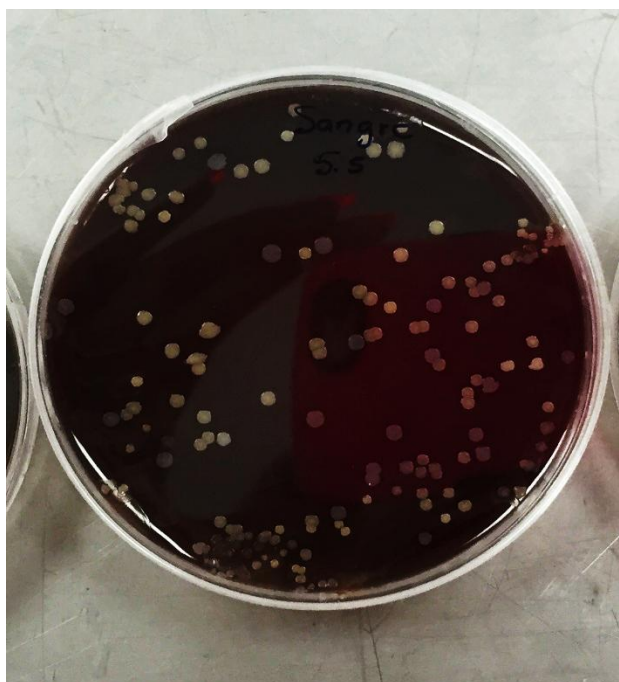
Vizcarrondo, M., & Gutiérrez, S. (Noviembre de 2008). *Morfología y tinción de los microorganismos*. Obtenido de http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Morfolog%C3%ADa_y_Tinci%C3%B3n.pdf

ANEXOS

Anexo 1 Crecimiento *Leuconostoc mesenteroides* en Agar MRS pH 6



Anexo 2 Crecimiento *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* en Agar Sangre pH 5,5



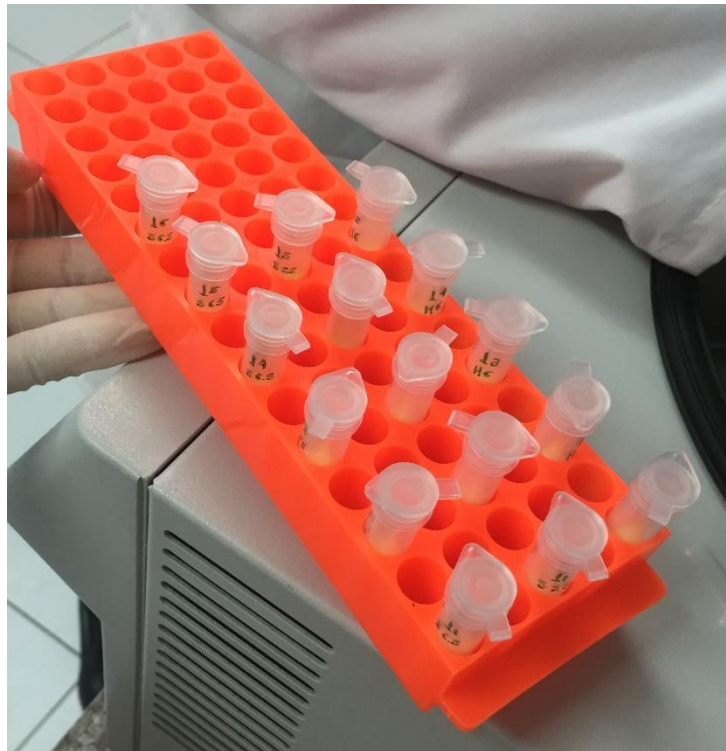
Anexo 3 Centrifuga refrigerada



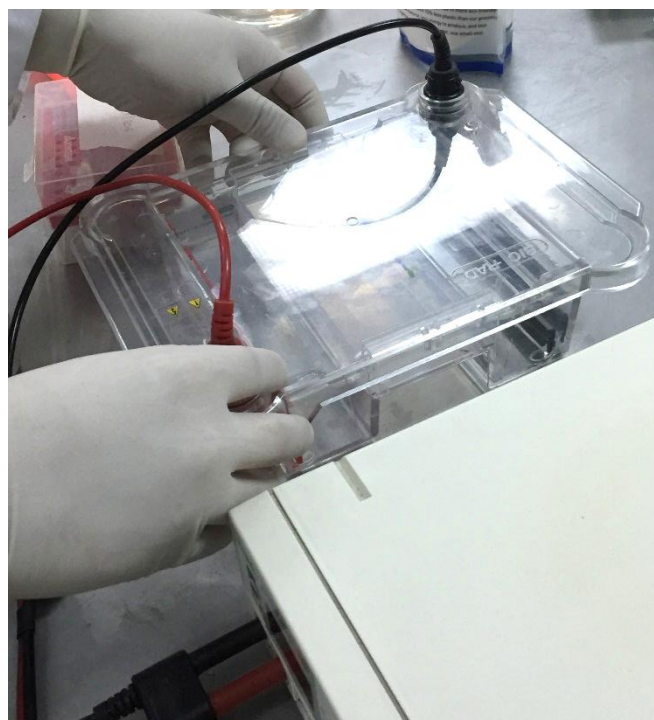
Anexo 4 Equipo para PCR



Anexo 5 Preparación de las muestras para extracción de ADN



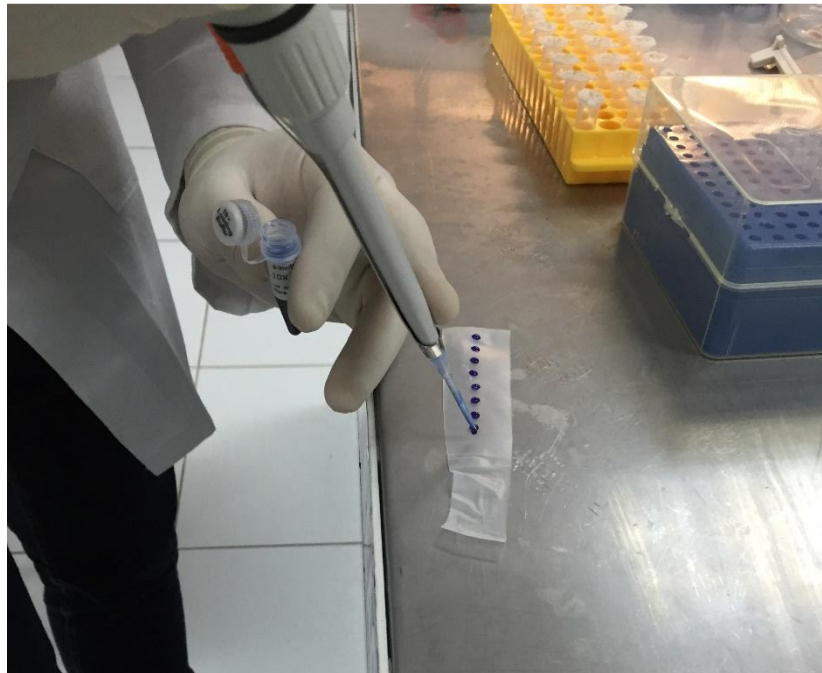
Anexo 6 Cámara para electroforesis



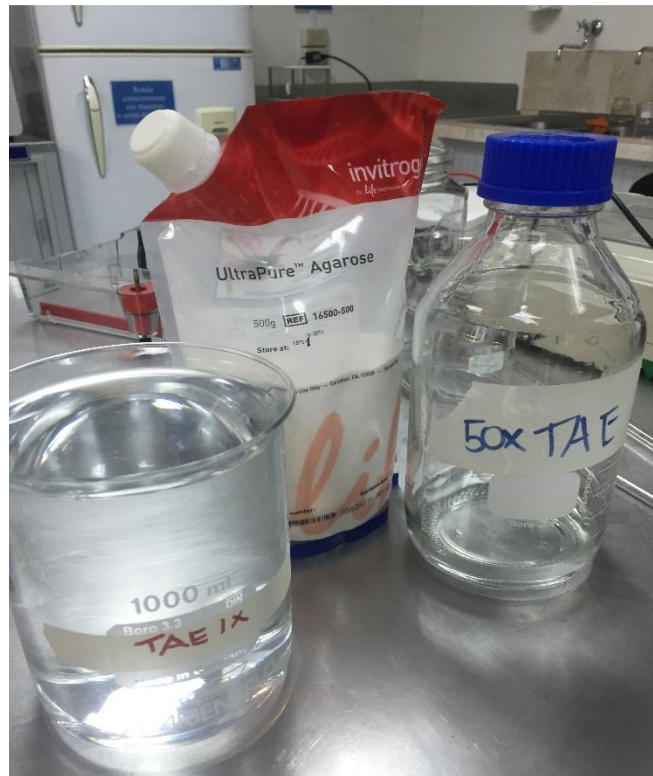
Anexo 7 Cámara climatizada para la maduración de los quesos



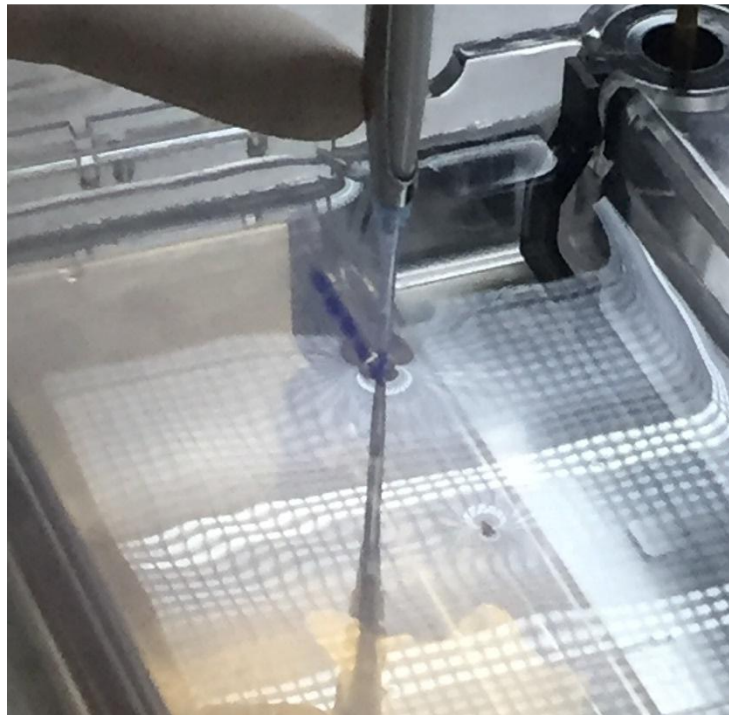
Anexo 8 Preparación de las muestras para electroforesis



Anexo 9 Compuestos necesarios para el gel de agarosa



Anexo 10 Adición de las muestras en gel de agarosa



Anexo 11 Colocación del gel en el equipo Enduro GDS



Anexo 12 Quesos colocados en los moldes



Anexo 13 Quesos tipo Gouda



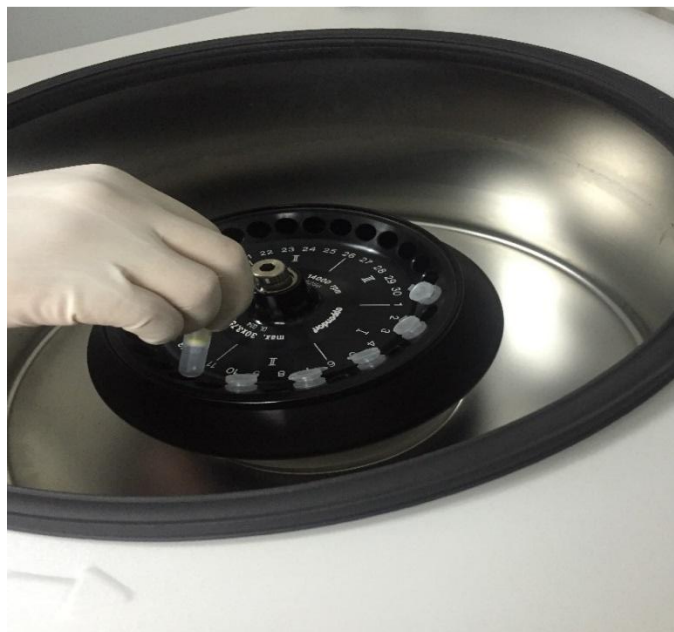
Anexo 14 Parafinado de los quesos



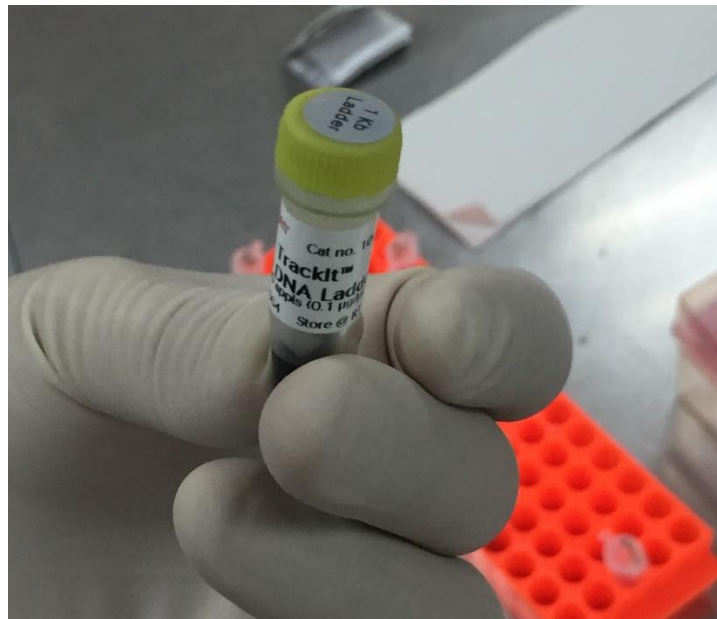
Anexo 15 Quesos en la cámara climatizada



Anexo 16 Muestras ADN colocadas en la centrifuga



Anexo 19 Ladder 1 kb



Anexo 20 Catación de los ocho modelos de diseño experimental

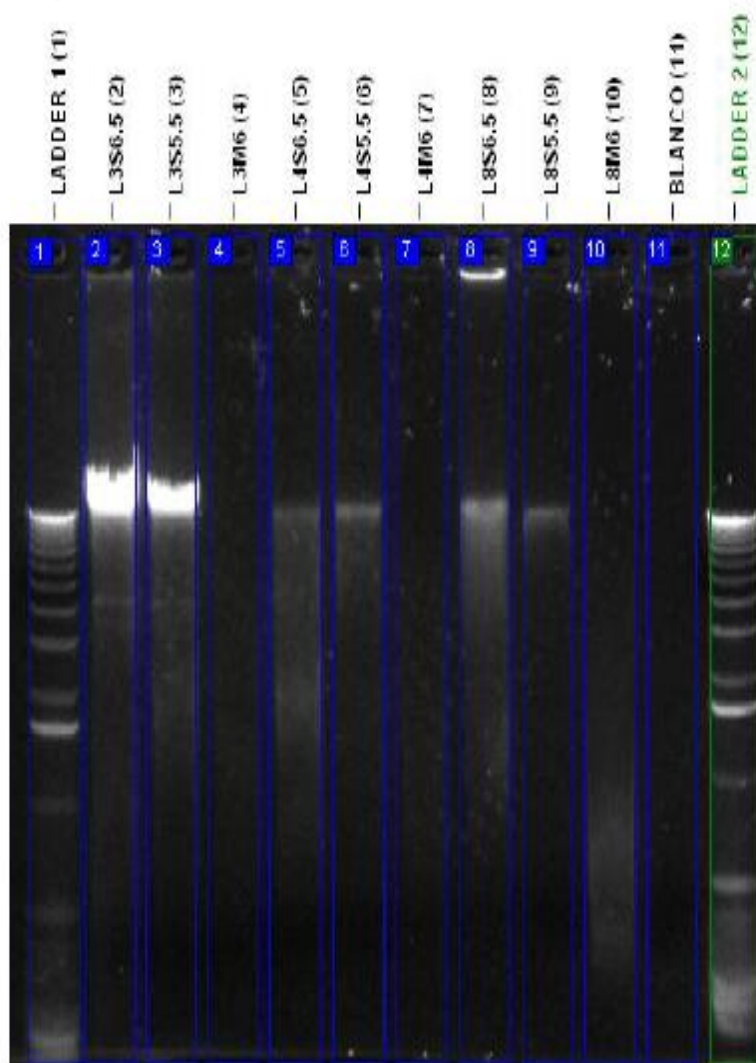


Anexo 21 Análisis en Totallab experimento 4 y 8

Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)

totallab

Analysis Report: lui 30062016 1.tif



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
LADDER 1	8	212159808,00	1428497088,00
L3S6.5	2	20130240,00	1360594816,00
L3S5.5	2	23970912,00	1401329408,00
L3M6	0	0,00	0,00
L4S6.5	1	343499840,00	1464314816,00
L4S5.5	1	14944480,00	1484532576,00
L4M6	0	0,00	0,00
L8S6.5	1	341586560,00	1438879488,00
L8S5.5	1	20397184,00	1503009472,00
L8M6	1	171740256,00	1481037888,00
BLANCO	0	0,00	0,00
LADDER 2	10	387463520,00	1395046304,00

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 1

Summary

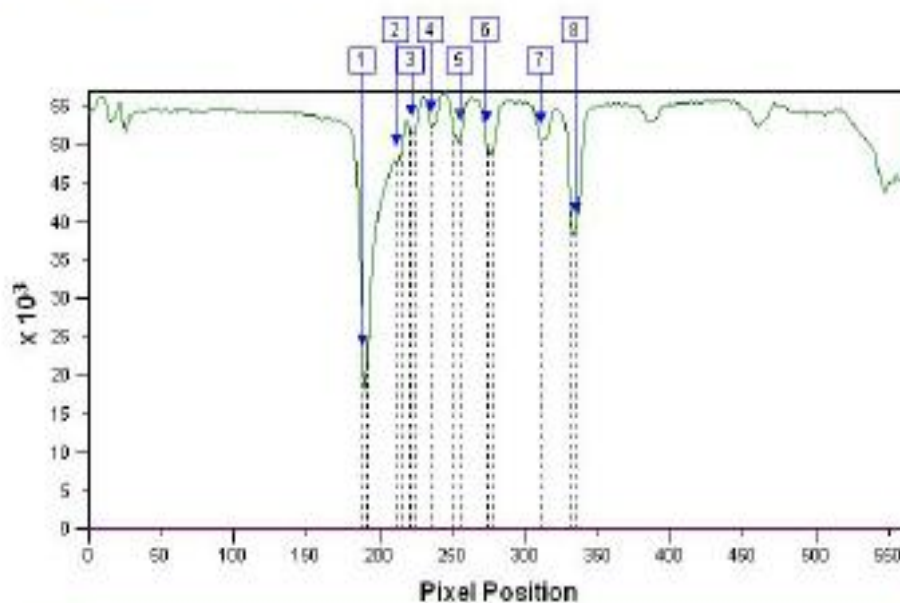
Name: LADDER 1

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol=Bl*Gnd	Calc Vol(μmole)
1	43	190	189	66,99	4095104,00	4095104,00	-
2	43	221	212	74,81	9180640,00	9180640,00	-
3	43	231	223	76,33	7443816,00	7443816,00	-
4	43	245	236	83,27	33734368,00	33734368,00	-
5	43	264	255	89,96	12236662,00	12236662,00	-
6	43	282	273	96,33	47113952,00	47113952,00	-
7	43	320	311	109,74	86833280,00	86833280,00	-
8	43	344	335	116,21	9523296,00	9523296,00	-

Band No	Area	Base Peak	RI
1	192	-	0,336
2	192	-	0,377
3	144	-	0,394
4	824	-	0,419
5	240	-	0,453
6	864	-	0,485
7	1632	-	0,552
8	240	-	0,598

Reporting Tool version 1.1.4301.25383
 Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 5

Summary

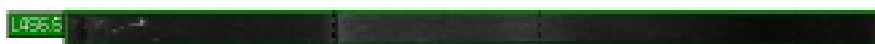
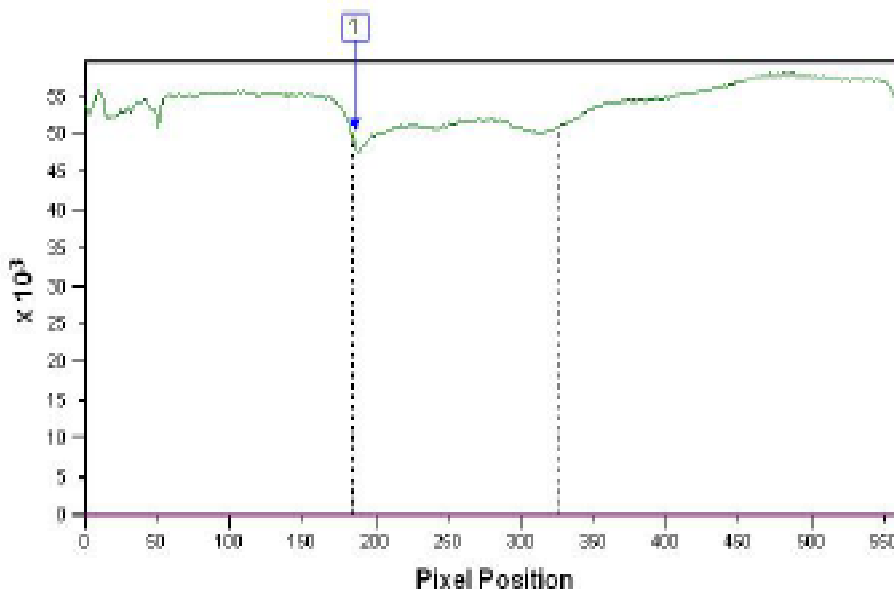
Name: L498.5

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pix)	Y Coord (pix)	Position	Position (mm)	Volume	Vol(BkGnd)	Cells Vol(pmol)
1	372	194	180	85.81	343499940.00	343499940.00	-

Band No	Area	Base Pairs	RF
1	8768	-	0.330

Reporting Tool version 1.1.4301.25383
 Time of Report: 10:41 05/07/2018 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 6

Summary

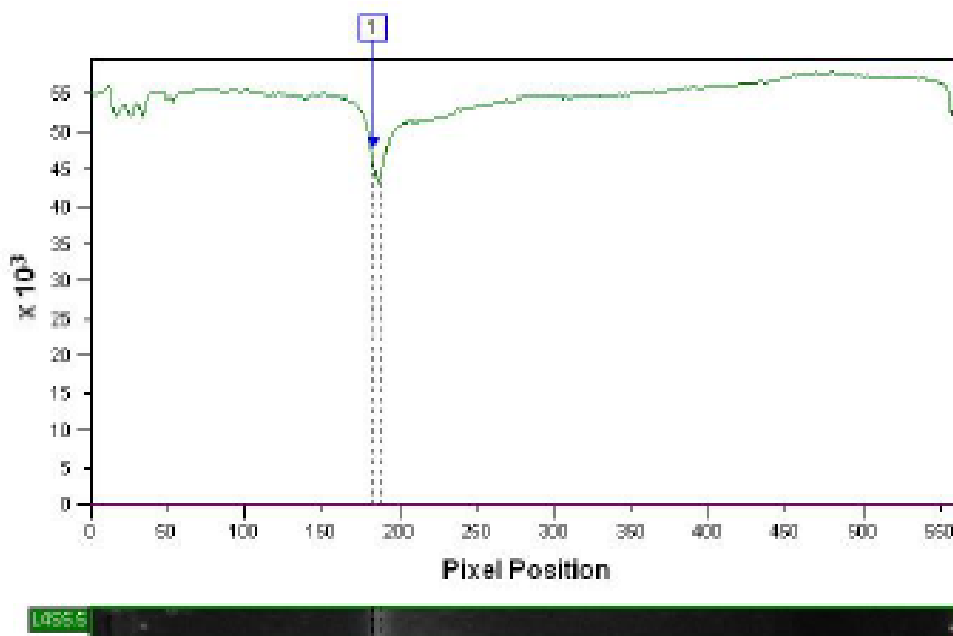
Name: L488.5

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol(BkGnd)	Cell Vol(pmoles)
1	332	121	180	64.57	1494480.00	1494480.00	-

Band No	Area	Base Pairs	RF
1	332	-	0.325

Reporting Tool version 1.1.4301.25383
Time of Report: 10:41 05/07/2018 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 7

Summary

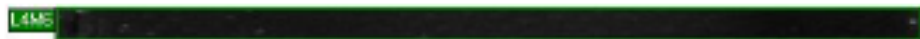
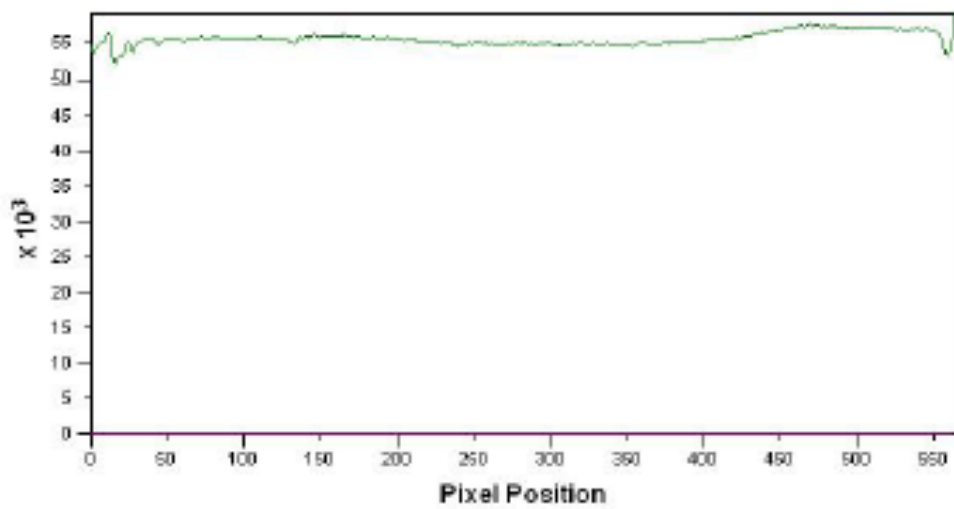
Name: L4MS

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
Edge Detection Method: Automatic Edges
Band Positions Edited: No



Band Table

Reporting Tool version 1.1.4301.25383
 Time of Report: 10:41 05/07/2018 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 8

Summary

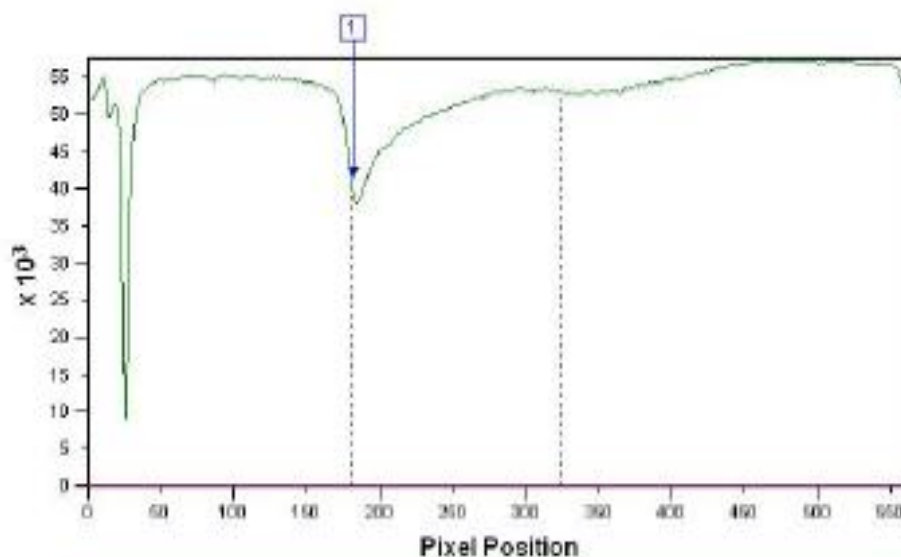
Name: L896.5

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pix)	Y Coord (pix)	Position	Position (mm)	Volume	Vol/BkGnd	Cells Vol(pixels)
1	450	190	182	64,32	341500590,00	341500590,00	-

Band No	Area	Base Pixel	Rf
1	6664	-	0,322

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
 Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 9

Summary

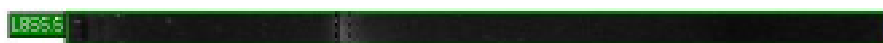
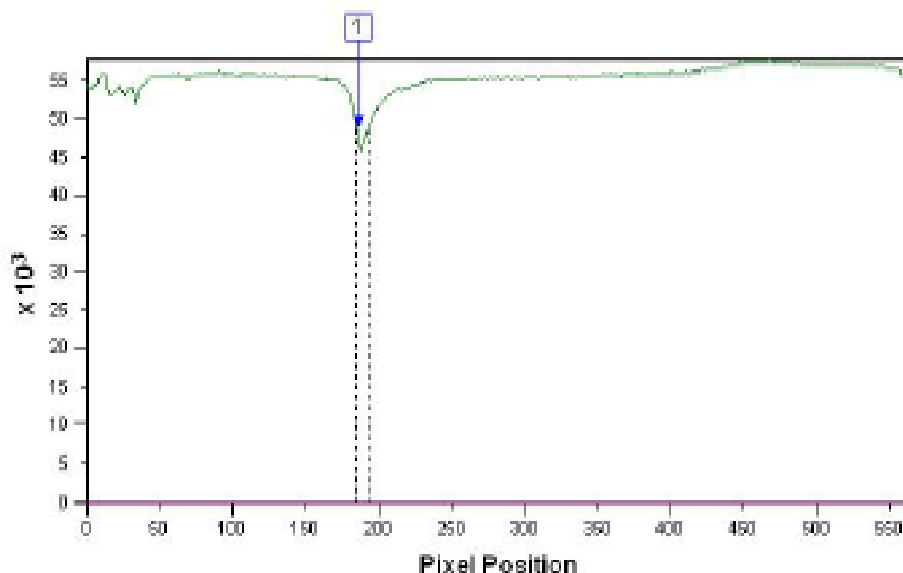
Name: L855.5

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (min)	Volume	Vol%BrGnd	Cellb Vol(pmoles)
1	502	194	185	65,03	20327104,00	20327104,00	

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	432	-	0,330

Reporting Tool version 1.1.4301.25383
 Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 10

Summary

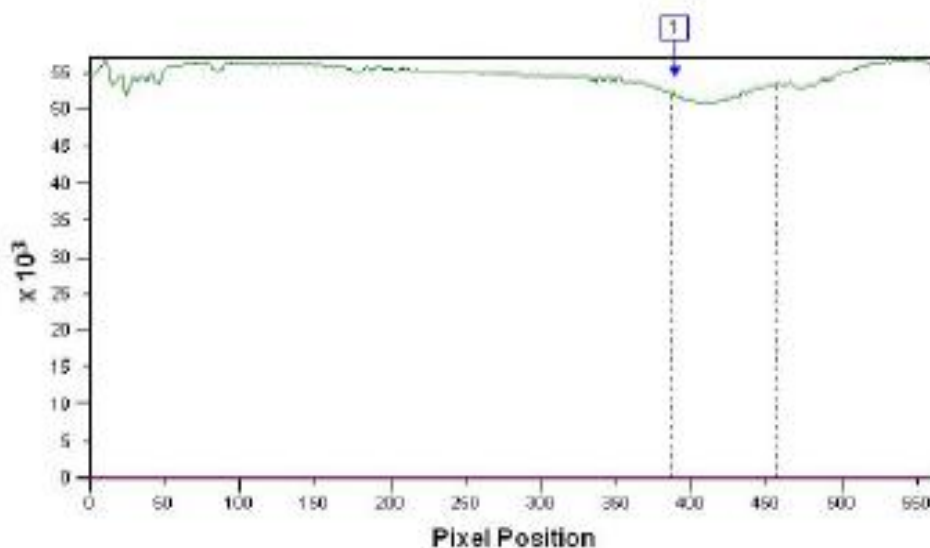
Name: L5M5

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol=DeQnd	Calib Vol(pixels)
1	562	397	389	137,26	171740256,00	171740256,00	-

Band No	Area	Base Pels	Rf
1	3312	-	0,6911

Reporting Tool version 1.1.4301.25363
Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacífico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 11

Summary

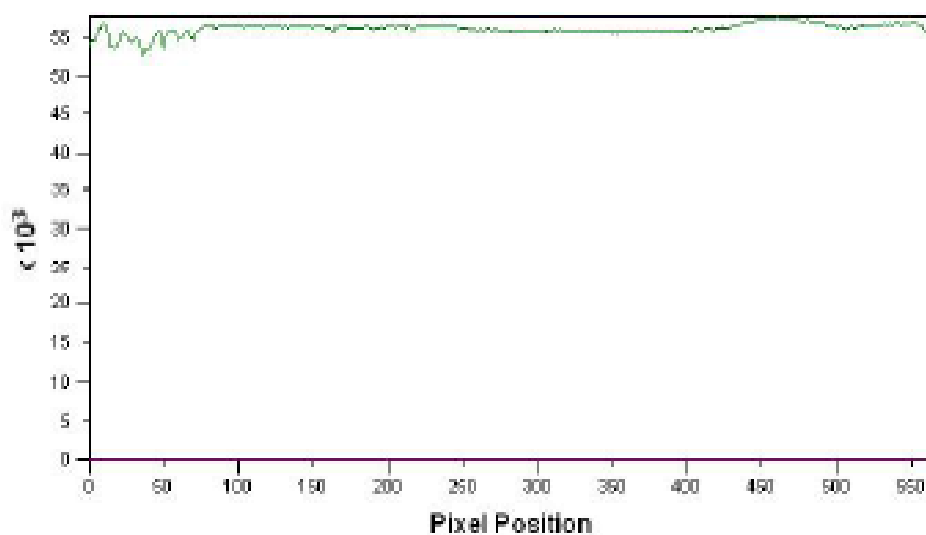
Name:	BLANCO
-------	--------

Background

Background Type:	None Calculated
------------------	-----------------

Band Detection

Automatic Detection:	No
Edge Detection Method:	Automatic Edges
Band Positions Edited:	No



Band Table

Reporting Tool version 1.1.4301.25383
 Time of Report: 10:41 05/07/2016 (Hora est. del Pacifico de SA)



Lane Data Report: lui 30062016 1.tif, Lane 12

Summary

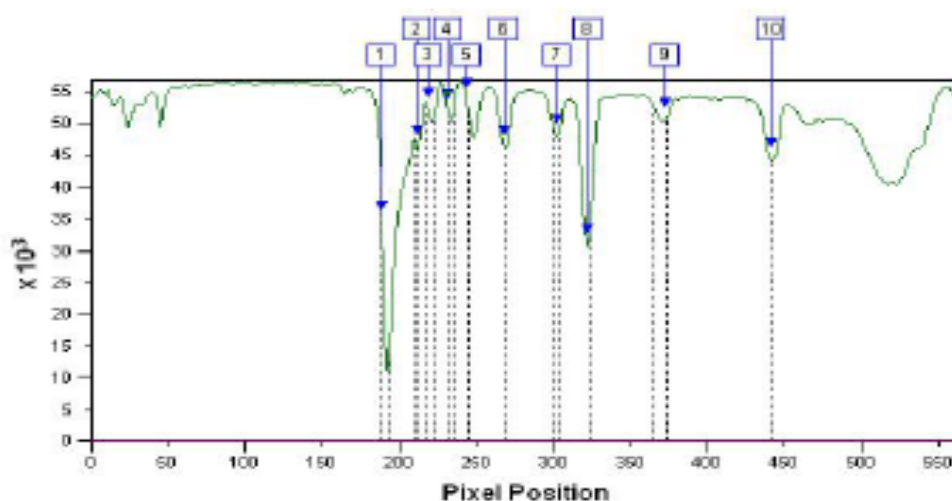
Name: LADDER 2

Background

Background Type: None Calculated

Band Detection

Automatic Detection: No
 Edge Detection Method: Percentage
 Percentage: 1
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	X Coord (pels)	Y Coord (pels)	Position	Position (mm)	Volume	Vol%StkGnd	Calib Vol(pmoles)
1	600	197	189	66,89	6023456,00	6023456,00	-
2	600	219	211	74,45	8900112,00	8900112,00	-
3	600	227	219	77,28	9002368,00	9002368,00	-
4	600	239	231	81,51	25076432,00	25076432,00	-
5	600	252	244	86,10	26373856,00	26373856,00	-
6	600	276	268	94,57	59059424,00	59059424,00	-
7	600	310	302	106,56	9308928,00	9308928,00	-
8	600	330	322	113,62	45464736,00	45464736,00	-
9	600	380	372	131,28	19590000,00	19590000,00	-
10	600	449	441	155,61	175374208,00	175374208,00	-

Band No	Area	Base Pairs	Rf
1	266	-	0,336
2	192	-	0,375
3	192	-	0,369
4	480	-	0,610
5	480	-	0,433
6	1152	-	0,478

Band No	Area	Base Pairs	Rf
7	192	-	0,536
8	960	-	0,572
9	384	-	0,661
10	3312	-	0,783

