

Universidad Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



**Universidad
Zamorano®**

Proyecto Especial de Graduación
**Evaluación de leche entera como un medio de cultivo alternativo para
el crecimiento de *Lactobacillus spp***

Estudiante

Maria Antonella Verdaguer Bravo

Asesores

Ligia Elizabeth Luna Jarrín M.Sc.

Cristina Elizabeth Chuck Hernandez, Ph.D.

Carmen Lizeth Salinas Salazar Ph.D.

Honduras, noviembre 2025

Autoridades

KEITH L. ANDREWS

Rector i.a.

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA ACOSTA MARCHETTI

Directora del Departamento de Agroindustria Alimentaria

JULIO NAVARRO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	4
Índice de Anexos	5
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Materiales y Métodos	11
Ubicación del Estudio	11
Fase I. Análisis Microbiológicos.....	11
Fase II. Análisis Proximales.....	12
Azúcares Reductores.....	13
Proteínas	13
Resultados y Discusión.....	15
Fase I. Análisis Microbiológicos.....	15
Comportamiento de Crecimiento de <i>L.acidophilus</i>	17
Comportamiento de Crecimiento de <i>L. plantarum</i>	17
Fase II. Análisis Proximales.....	21
Azúcares Reductores.....	21
Proteínas	23
Conclusiones	25
Recomendaciones.....	26
Referencias.....	27
Anexos.....	30

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Descripción de los tratamientos aplicados a las muestras de leche para su análisis proximal.	13
Cuadro 2 Evolución del crecimiento de <i>L. acidophilus</i> (log UFC/mL \pm D.E) en medio MRS y en leche entera pasteurizada comercial durante el periodo de evaluación (T0–T7).....	15
Cuadro 3 Evolución del crecimiento de <i>L. plantarum</i> (log UFC/mL \pm D.E) en medio MRS y en leche entera pasteurizada comercial durante el periodo de evaluación (T0–T7).....	16
Cuadro 4 Comportamiento del pH en medios de cultivo seleccionados durante el crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
Cuadro 5 Comportamiento del pH en medios de cultivo seleccionados durante el crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i>	19
Cuadro 6 Efecto de la fermentación láctica sobre los azúcares reductores y las proteínas en leche entera pasteurizada comercial.	24

Índice de Anexos

Anexo A Composición del medio MRS para cultivo de bacterias ácido-lácticas.....	30
Anexo B Leche entera comercial pasteurizada utilizada como medio de cultivo.	31
Anexo C Preparación de tubos con reactivo DNS para la determinación de azúcares reductores.	32
Anexo D Microplaca utilizada en la prueba de Lowry para determinación de proteínas.	33
Anexo E Preparación experimental para el estudio cinético de <i>Lactobacillus plantarum</i>	34
Anexo F Placa Petri con crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> tras 48 horas de incubación.	35

Resumen

El presente estudio evaluó el uso de leche entera pasteurizada comercial como alternativa al medio sintético MRS para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*. El experimento se llevó a cabo en dos fases. En la Fase I, se comparó el crecimiento microbiano de ambas cepas en medio MRS y leche entera durante 48 horas de incubación a 37 °C, a través del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y la medición del pH. En la Fase II, se analizaron los cambios en azúcares reductores y proteínas en la leche tras la fermentación con cada cepa. Los resultados demostraron que tanto *L. acidophilus* como *L. plantarum* crecieron eficientemente en leche entera, alcanzando concentraciones comparables a las obtenidas en MRS. Asimismo, se observó una disminución significativa en los niveles de azúcares reductores en leche inoculada, sin alteraciones estadísticamente significativas en el contenido de proteínas. El descenso de pH evidenció actividad microbiana activa en ambos medios, aunque fue más marcado en MRS. Se concluye que la leche entera puede ser un medio viable y funcional para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *plantarum*, lo cual abre posibilidades para su aplicación en el desarrollo y mantenimiento de cepas en matrices naturales.

Palabras clave: azúcares reductores, bacterias ácido-lácticas, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, medio MRS, proteínas.

Abstract

This study evaluated the use of commercial pasteurized whole milk as an alternative to synthetic MRS medium for the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. The experiment was conducted in two phases. In Phase I, microbial growth of both strains in MRS medium and whole milk was compared during 48 hours of incubation at 37°C, using colony-forming unit (CFU) counting and pH measurement. In Phase II, changes in reducing sugars and proteins in milk following fermentation with each strain were analyzed.

The results demonstrated that both *L. acidophilus* and *L. plantarum* grew efficiently in whole milk, reaching concentrations comparable to those obtained in MRS. A significant decrease in reducing sugar levels was also observed in inoculated milk, with no statistically significant changes in protein content. The pH decrease demonstrated active microbial activity in both media, although it was more pronounced in MRS. It is concluded that whole milk can be a viable and functional medium for the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *plantarum*, opening up possibilities for its application in fermented products and the development of functional foods.

Keywords: Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, lactic acid bacteria, MRS medium, proteins, reducing sugars.

Introducción

Las bacterias ácido-lácticas (BAL), particularmente las del género *Lactobacillus*, son microorganismos grampositivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos y no esporulados, cuya principal característica metabólica es la fermentación de azúcares, especialmente la glucosa, con producción predominante de ácido láctico (Fernández, 2022).

El medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) ha sido formulado específicamente para satisfacer las necesidades nutricionales de las BAL. Está compuesto peptona de proteosa No 3, extracto de res, extracto de levadura, dextrosa, polisorbato 80, citrato de amonio, acetato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y fosfato dipotásico (Vázquez-Ortiz et al., 2022). La glucosa actúa como fuente principal de carbono y energía, mientras que, compuestos como el citrato de amonio, el acetato de sodio y el fosfato dipotásico ayudan a estabilizar el medio, aportan elementos minerales y favorecen el crecimiento selectivo al inhibir microorganismos competidores (Santander-Cortés y Castro-Rosas, 2024). Además, el medio contiene sales como sulfato de magnesio y sulfato de manganeso que actúan como cofactores enzimáticos, y un surfactante (Tween 80) que facilita la absorción de nutrientes liposolubles a nivel de membrana celular (Fernández, 2022).

Por otro lado, la leche entera es una matriz natural que contiene una amplia gama de nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano. Su composición incluye lactosa como fuente de carbono, proteínas como caseína y proteínas del suero que aportan nitrógeno, así como lípidos, vitaminas (tanto hidrosolubles como liposolubles) y minerales como calcio, fósforo y magnesio (Olortegui Broncano y Santos Delgado, 2019). A diferencia del medio MRS, la leche no ha sido formulada artificialmente para el cultivo microbiano, pero presenta una complejidad nutricional que puede ser aprovechada por las BAL.

Entre las especies más estudiadas del género *Lactobacillus* se encuentran *L. acidophilus* y *L. plantarum*, reconocidas por su capacidad fermentativa, tolerancia a condiciones variables y relevancia en investigaciones microbiológicas y funcionales. *Lactobacillus acidophilus* es una especie

homofermentativa ampliamente utilizada por su habilidad para fermentar lactosa y su potencial probiótico (Gao et al., 2022). Mientras que *Lactobacillus plantarum* es heterofermentativo, de metabolismo flexible, se caracteriza por su capacidad de adaptación a diversas matrices y condiciones ambientales (Krieger-Weber et al., 2020).

Además del tipo de medio, es clave evaluar su efecto en el crecimiento y metabolismo de *L. acidophilus* y *L. plantarum* mediante herramientas microbiológicas y fisicoquímicas. El conteo en placa permite medir su viabilidad como unidades formadoras de colonias (UFC), mientras que los análisis de proteínas y azúcares reductores reflejan los cambios del medio durante la fermentación, complementando la comprensión del metabolismo bacteriano. El análisis proximal complementa la caracterización microbiológica, ya que permite establecer la relación entre los cambios fisicoquímicos del medio y el metabolismo microbiano (Espinoza-Córdova et al., 2021).

Por tanto, estudiar a *L. acidophilus* y *L. plantarum* en leche y medio MRS permite entender su adaptación a entornos con diferente complejidad nutricional y su comportamiento en condiciones naturales.

La evaluación de la leche entera como alternativa al medio MRS para el crecimiento de *Lactobacillus spp.* constituye una vía relevante para profundizar en el estudio del comportamiento fisiológico de las BAL en medios de cultivo de diferente naturaleza. Si bien el MRS es un medio sintético ampliamente utilizado por su eficacia en promover el crecimiento de estas bacterias en condiciones controladas (Hernández-García et al., 2019), no reproducen la complejidad y variabilidad de los entornos naturales donde estas bacterias también se desarrollan.

En este contexto, la leche entera se plantea como una matriz alternativa interesante. A diferencia del MRS, presenta una organización molecular y una disponibilidad de nutrientes menos accesible, lo que requiere que *Lactobacillus spp.* active mecanismos específicos para metabolizar los sustratos disponibles (Íñiguez et al., 2018). Esta diferencia nutricional representa una oportunidad para observar cómo estas bacterias se adaptan y mantienen su viabilidad en sistemas naturales.

Dentro de este género, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* se destacan por su importancia en estudios microbiológicos debido a su capacidad para crecer en distintas matrices, fermentar lactosa y tolerar condiciones variables. Ambas especies han sido ampliamente estudiadas, lo que las convierte en modelos adecuados para evaluar el comportamiento bacteriano frente a la complejidad de la leche entera en comparación con un medio definido como el MRS.

Asimismo, la caracterización microbiológica mediante conteo en placa resulta fundamental para cuantificar la viabilidad y proliferación de las bacterias ácido-lácticas en los distintos medios de cultivo. De forma complementaria, los análisis proximales proporcionan información detallada sobre la composición química del medio, evaluando componentes como proteínas y azúcares reductores. Estos datos son esenciales para comprender cómo las características nutricionales del sustrato impactan en el comportamiento metabólico de las BAL durante el proceso fermentativo.

Comparar el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* en leche entera y MRS no solo permite evaluar la eficacia de la leche como medio alternativo, sino que también aporta información valiosa sobre su influencia en el entorno químico del cultivo. Esto contribuye a generar conocimiento más representativo del comportamiento bacteriano en condiciones naturales. Con base en lo anterior se establecen como objetivos de este estudio:

Comparar el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* en leche entera pasteurizada comercial y en el medio MRS, utilizando como parámetros el pH y el recuento microbiano (log UFC/mL), con el propósito de identificar diferencias en su comportamiento en función del tipo de sustrato utilizado.

Determinar los cambios en la composición química de la leche entera pasteurizada comercial tras la inoculación con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*, con el fin de evaluar cómo el crecimiento de estas bacterias influye en las propiedades químicas del medio, en comparación con leche entera pasteurizada comercial sin inocular.

Materiales y Métodos

Ubicación del Estudio

El estudio se llevó a cabo en el Tecnológico de Monterrey, que se encuentra en el estado de Nuevo León, México. Los métodos de microbiología se realizarán en el Centro de Biotecnología (FEMSA) y los análisis proximales de la leche entera pasteurizada comercial para determinar su composición química se trabajaron en El Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas (CIDPRO).

El proyecto se realizó en dos fases. En la primera fase de la investigación se desarrollaron los análisis microbiológicos. En la segunda fase se hicieron los análisis proximales de la matriz sin inocular, y de las matrices inoculadas.

Fase I. Análisis Microbiológicos

Para cuantificar la carga microbiana, se emplearon dos cepas específicas: *Lactobacillus acidophilus* y *L. plantarum*. El experimento se llevó a cabo utilizando dos tipos de sustratos: un medio comercial estándar (Man-Rogosa-Sharpe, MRS), empleado como control, y una matriz alimentaria natural (leche entera pasteurizada de uso comercial). Las cepas, previamente conservadas por congelación, fueron reactivadas en medio MRS el cual es un medio comercial (Ver Anexo 1) en una proporción de 1:10 (1 mL de inóculo por 10 mL de medio), incubándose a 37 °C por 24 horas en incubadora, con pases diarios para asegurar su viabilidad y adaptación. Un día antes del experimento, la propagación se realizó en matraces Erlenmeyer de 50 mL, empleando una relación 3:30.

Para la preparación de diluciones seriadas, se siguió la metodología establecida en la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, utilizando agua peptonada compuesta por peptona (1.0 g; Solbiosa) y cloruro de sodio (8.5 g; JT Baker) disueltos en 1 L de agua destilada estéril, con pH ajustado a 7.0 ± 0.1 . La mezcla fue esterilizada en autoclave modelo MLS-3781 (Sanyo Panasonic). Las diluciones (de 10^{-1} a 10^{-5}) se prepararon en tubos de ensayo con 4.5 mL de agua peptonada y 0.5 mL de la muestra.

El medio sólido utilizado para el conteo en placa fue Agar Triptona-Extracto de Levadura, formulado conforme a la NOM-092-SSA1-1994. Se preparó con triptona (5.0 g), extracto de levadura (2.5 g), dextrosa (1.0 g) y agar (15.0 g) disueltos en 1 L de agua, y se esterilizó en autoclave. Posteriormente, se vertieron 15 mL del medio en cajas Petri estériles y se dejó solidificar. Para la siembra, se empleó la dilución 10^{-5} , inoculando 0.1 mL con micropipeta de 1000 μ L y distribuyéndolo con un hisopo estéril. Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones anaeróbicas durante 48 horas.

El ensayo incluyó siete tiempos experimentales (T_0 - T_7) cada uno replicado tres veces, con muestreos en T_0 (0 h), T_1 (1 h), T_2 (2 h), T_3 (4 h), T_4 (6 h), T_5 (8 h), T_6 (10 h) y T_7 (12 h). Se realizaron tres repeticiones para cada momento en el tiempo considerando el control (MRS) como para la matriz alimentaria. En cada intervalo de muestreo, se midió el pH con un potenciómetro Laqua PH1200 (Horiba Scientific), el cual se tomaron tres muestras de 4 mL cada una del matraz Erlenmeyer. Se realizaron dos ensayos comparativos: uno en medio MRS y otro en leche entera pasteurizada comercial. La leche entera pasteurizada comercial esta adicionada con (leche entera de Vaca, Vitamina A, y D, proteína, grasa de Leche y 61 kcal por 100 mL) (Ver Anexo 2).

Ambos sustratos se mantuvieron bajo condiciones controladas para prevenir el crecimiento de levaduras, con ayuda del control de pH. Tras la incubación, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias con un contador de colonias, comparando la adaptación en ambos sustratos. Se expresan los resultados en log UFC/mL, con el fin de facilitar la comparación del crecimiento microbiano entre medios.

Fase II. Análisis Proximales

En el Cuadro 1 se realizó una caracterización de la leche entera pasteurizada comercial, tanto sin inocular como inoculada con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*, con el objetivo de determinar el contenido de azúcares reductores y proteínas. Las mediciones se efectuaron luego

de una incubación de 12 horas a 37 °C, condiciones bajo las cuales se permitió el crecimiento bacteriano y su interacción con el medio.

Cuadro 1

Descripción de los tratamientos aplicados a las muestras de leche para su análisis proximal.

Tratamiento	Descripción
Control	Leche entera pasteurizada comercial sin inocular
T1	Leche entera pasteurizada comercial inoculado con <i>L. acidophilus</i>
T2	Leche entera pasteurizada comercial inoculado con <i>L. plantarum</i>

Azúcares Reductores

Para determinar azúcares reductores se utilizó el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Primero se elaboró una curva de calibración, y posteriormente se analizaron las muestras de leche. Para cada punto de la curva y cada muestra de leche, se tomaron 3 mL y se transfirieron a tubos de ensayo de 15 mL, añadiendo posteriormente 1 mL del reactivo DNS. También se preparó un blanco con 3 mL de agua destilada y 1 mL del reactivo DNS. Los tubos fueron calentados en baño de agua hirviendo durante 5 minutos y posteriormente enfriados en agua fría hasta alcanzar temperatura ambiente (Ver Anexo 3). Finalmente, se midió la absorbancia de cada tubo a 540 nm. Este procedimiento permitió obtener la curva de calibración, la cual fue utilizada para calcular la concentración de azúcares reductores en las muestras de leche, tras aplicar el mismo tratamiento químico a dicha matriz.

Proteínas

Para la cuantificación de proteínas totales en las muestras de leche entera pasteurizada comercial, se aplicó un tratamiento previo con el fin de eliminar la fracción lipídica y obtener una muestra adecuada para el análisis colorimétrico. En primer lugar, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y posteriormente homogeneizadas mediante agitación en vórtex durante 15 segundos.

Con el objetivo de desgrasar las muestras, se realizó un preenfriamiento durante 15 minutos a 4 °C, seguido de una centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos a 2 °C. La capa superior de grasa formada fue cuidadosamente removida con ayuda de una espátula, puntilla o jeringa.

Para la cuantificación de proteínas totales, se empleó el método de Lowry utilizando el reactivo *Lowry Assay Mix*. Este procedimiento fue aplicado tanto para la construcción de la curva de calibración, a partir de estándares de albúmina sérica bovina (BSA), como para el análisis de las muestras de leche.

En cada caso, se añadieron 200 µL del reactivo recién preparado a los pocillos correspondientes. Posteriormente, se pipetearon 40 µL de cada estándar de BSA y de cada muestra de leche en una microplaca de 96 pocillos. La microplaca fue inmediatamente mezclada durante 30 segundos.

Después, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz con papel aluminio. A continuación, se agregaron 20 µL de la solución Folin (Lowry Working Solution) en cada pocillo, seguido de una nueva mezcla de 30 segundos. Finalmente, la microplaca fue incubada durante 30 minutos adicionales a temperatura ambiente (Ver Anexo 4), siempre cubierta con aluminio, y se realizó la lectura de absorbancia a 750 nm en un lector de placas.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA). En la Fase I, se evaluaron dos tratamientos y dos controles utilizando 12 unidades experimentales (tres repeticiones por tratamiento), se analizó mediante un ANDEVA mixto. Se aplicó la separación de medias mediante el método de Duncan, considerando un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Para la Fase II, se analizaron dos tratamientos y un control con un total de 9 unidades experimentales (tres repeticiones por tratamiento), utilizando un ANDEVA de una vía con separación de medias mediante Duncan y un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Todos los análisis se realizaron utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS, versión 9.4)

Resultados y Discusión

Esta sección expone y examina los resultados obtenidos al evaluar el crecimiento de *L. acidophilus* y *L. plantarum* en dos medios diferentes: el medio comercial Man-Rogosa-Sharpe (MRS) y leche entera pasteurizada comercial. Se incluyen datos de análisis microbiológicos, que abarcan la evolución del conteo de colonias y el pH, así como análisis proximales enfocados en las variaciones de la composición nutricional del medio, especialmente en cuanto al contenido de azúcares reductores y proteínas.

Fase I. Análisis Microbiológicos

Durante esta etapa, se analizó el crecimiento de *L. acidophilus* y *L. plantarum* a través de la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) y las variaciones en el pH. Estos parámetros permitieron evaluar la viabilidad y adaptación de las cepas tanto en el medio de cultivo MRS como en la matriz alimentaria representada por la leche entera pasteurizada comercial.

El Cuadro 2 y Cuadro 3 muestra la evolución del crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* a lo largo de 48 horas de incubación en dos sustratos: el medio de cultivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS), ampliamente utilizado por su formulación optimizada para bacterias ácido-lácticas, y leche entera pasteurizada comercial, una matriz de interés práctico en el contexto alimentario. Las concentraciones bacterianas, expresadas en log UFC/mL \pm desviación estándar, reflejan un crecimiento sostenido en ambos medios, con diferencias estadísticas significativas tanto entre tiempos de muestreo como entre tratamientos.

Cuadro 2

Evolución del crecimiento de L. acidophilus (log UFC/mL \pm D.E) en medio MRS y en leche entera pasteurizada comercial durante el periodo de evaluación (T0–T7).

Tiempo (h)	MRS <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Log UFC/mL) \pm DE	Leche <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Log UFC/mL) \pm DE
T0	7.15 \pm 0.04 ^{Ya}	8.00 \pm 0.02 ^{Za}
T1	7.22 \pm 0.02 ^{Ya}	8.05 \pm 0.04 ^{Zb}
T2	7.10 \pm 0.13 ^{Ya}	8.26 \pm 0.01 ^{Zc}
T3	7.52 \pm 0.07 ^{Yb}	8.26 \pm 0.03 ^{Zc}
T4	7.77 \pm 0.06 ^{Yc}	8.35 \pm 0.03 ^{Zd}
T5	8.28 \pm 0.18 ^{Yd}	8.38 \pm 0.01 ^{Zde}

Tiempo (h)	MRS <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Log UFC/mL) ± DE	Leche <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Log UFC/mL) ± DE
T6	8.54 ± 0.08 ^{Ye}	8.40 ± 0.01 ^{Zde}
T7	8.60 ± 0.15 ^{Ye}	8.41 ± 0.01 ^{Ze}
CV %	1.41	0.32

Nota. D.E.: Desviación estándar. CV%: Coeficiente de variación. a-e: Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempos dentro de un mismo tratamiento (P<0.05). Y-Z: Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo (P<0.05).

Cuadro 3

Evolución del crecimiento de L. plantarum (log UFC/mL ± D.E) en medio MRS y en leche entera pasteurizada comercial durante el periodo de evaluación (T0–T7).

Tiempo (h)	MRS <i>Lactobacillus plantarum</i> (Log UFC/mL) ± DE	Leche <i>Lactobacillus plantarum</i> (Log/UFC/mL) ± DE
T0	9.16 ± 0.09 ^{Ya}	9.22 ± 0.10 ^{Za}
T1	9.95 ± 0.86 ^{Yb}	9.39 ± 0.01 ^{Zb}
T2	9.73 ± 0.28 ^{Yb}	9.31 ± 0.01 ^{Zb}
T3	9.97 ± 0.12 ^{Yb}	9.33 ± 0.02 ^{Zb}
T4	9.78 ± 0.06 ^{Yb}	9.06 ± 0.09 ^{Za}
T5	9.79 ± 0.11 ^{Yb}	9.20 ± 0.05 ^{Za}
T6	10.07 ± 0.04 ^{Yb}	9.34 ± 0.02 ^{Zb}
T7	10.21 ± 0.04 ^{Yb}	9.40 ± 0.01 ^{Zb}
CV%	3.36	0.55

Nota. D.E.: Desviación estándar. CV%: Coeficiente de variación. a-b: Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempos dentro de un mismo tratamiento (P<0.05). Y-Z: Letras mayúsculas distintas en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo (P<0.05).

Para *L. acidophilus*, se observó un incremento en MRS desde 7.15 ± 0.04 hasta 8.60 ± 0.15 log UFC/mL, mientras que en leche entera la concentración pasó de 8.00 ± 0.02 a 8.41 ± 0.01 log UFC/mL. En *L. plantarum*, los valores en MRS aumentaron de 9.16 ± 0.09 a 10.21 ± 0.04 log UFC/mL, y en leche entera de 9.22 ± 0.10 a 9.40 ± 0.01 log UFC/mL. Para *Lactobacillus acidophilus*, sí se observaron diferencias significativas entre tiempos en ambos medios, aunque en MRS fueron más marcadas y sostenidas que en leche. Por otro lado, *Lactobacillus plantarum*, en MRS se detectaron diferencias significativas entre T0–T1 y el resto de los tiempos, mientras que en leche las variaciones fueron mínimas y con diferencias significativas de baja magnitud.

Comportamiento de Crecimiento de *L. acidophilus*

En las 48 horas evaluadas, *L. acidophilus* mostró un incremento más pronunciado en medio MRS que en leche entera pasteurizada comercial. En MRS, la población pasó de 7.15 ± 0.04 a 8.60 ± 0.15 log UFC/mL, equivalente a +1.45 log. En leche, el aumento fue de 8.00 ± 0.02 a 8.41 ± 0.01 log UFC/mL, lo que representa solo +0.41 log. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) en la mayoría de las comparaciones entre tiempos para MRS, mientras que en leche estas diferencias fueron menos frecuentes y de menor magnitud. Esto confirma que el medio de cultivo ejerce un efecto determinante en el ritmo de crecimiento.

Esta diferencia en el comportamiento se explica por la composición del medio: MRS aporta glucosa, peptonas y extracto de levadura ricos en vitaminas del grupo B, todos de alta biodisponibilidad, que reducen el tiempo de adaptación y aceleran la síntesis de biomasa (Bolivar-Jacobo et al., 2023). En contraste, la leche requiere que la bacteria hidrolice lactosa mediante β -galactosidasa y realice proteólisis de caseínas para liberar aminoácidos y péptidos (Esquer-Álvarez et al., 2023) procesos que implican un costo energético adicional y, por tanto, ralentizan el aumento neto de células viables. Además, la capacidad tampón de la leche y su matriz coloidal pueden amortiguar cambios de pH y dispersar las células, favoreciendo la viabilidad, pero no necesariamente la multiplicación rápida (Widyastuti y Febrisiantosa, 2014). Por ello, aunque en ambos medios se registró crecimiento, la magnitud fue significativamente mayor en MRS.

Comportamiento de Crecimiento de *L. plantarum*

En el caso de *L. plantarum*, el incremento poblacional también fue más alto en MRS que en leche, aunque las diferencias absolutas fueron menores que las observadas para *L. acidophilus*. En MRS, la población pasó de 9.16 ± 0.09 a 10.21 ± 0.04 log UFC/mL, lo que equivale a un aumento de 1.05 log. En leche, el cambio fue mínimo, de 9.22 ± 0.10 a 9.40 ± 0.01 log UFC/mL, equivalente a 0.18 log. Las diferencias significativas entre tiempos fueron más frecuentes en MRS, reflejando una multiplicación constante, mientras que en leche la mayoría de los valores se mantuvieron

estadísticamente similares, lo que indica un crecimiento muy lento. Este comportamiento se debe a que *L. plantarum* es una especie heterofermentativa facultativa con un amplio repertorio enzimático que le permite fermentar lactosa, oligosacáridos y carbohidratos derivados de la hidrólisis de proteínas lácteas (Dan et al., 2019). Además, posee una elevada tolerancia al estrés osmótico y a las caídas de pH (Cao et al., 2019) lo que le permite mantenerse viable en condiciones menos favorables para el crecimiento rápido. Sin embargo, el incremento observado en leche es reducido.

La presencia de otros microorganismos en la leche puede interferir significativamente en los resultados de un experimento de crecimiento bacteriano, ya que compiten por los mismos nutrientes, modifican el pH y pueden producir metabolitos que inhiben o favorecen el desarrollo de determinadas especies. Por ejemplo, bacterias contaminantes como *Pseudomonas spp.* y *Enterobacteriaceae* pueden degradar proteínas y lípidos, alterando la disponibilidad de sustratos y generando compuestos que modifican el ambiente de cultivo (Yuan et al., 2022). Asimismo, levaduras y mohos presentes en la leche pueden producir ácidos orgánicos o enzimas que aceleran la acidificación y cambian la dinámica de crecimiento de bacterias ácido-lácticas (Widyastuti y Febrisiantosa, 2014). Estos efectos no controlados pueden generar variabilidad en la cinética microbiana observada, dificultando la interpretación de parámetros como la velocidad específica de crecimiento o la producción de ácido láctico, lo cual resalta la importancia de trabajar con leche estéril o con un control riguroso de la microbiota inicial.

En términos absolutos, *L. acidophilus* mostró el mayor incremento en MRS (+1.45 log), mientras que *L. plantarum* presentó el menor cambio en leche (+0.18 log). En ambos casos, MRS resultó significativamente más favorable para la multiplicación, lo que se explica por la disponibilidad inmediata de nutrientes simples y fácilmente asimilables, en contraste con la leche, cuya matriz compleja requiere transformaciones enzimáticas previas para liberar sustratos útiles. La leche, más que un medio para un aumento rápido actúa como un entorno que sostiene la viabilidad celular. Estas diferencias, respaldadas tanto por el tamaño del incremento como por las comparaciones estadísticas,

evidencian que la naturaleza y accesibilidad de los nutrientes son factores clave en el comportamiento de crecimiento observado.

El Cuadro 4 y el Cuadro 5 muestran la evolución del pH durante la incubación de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* en dos sustratos: el medio MRS, formulado para favorecer el desarrollo de bacterias ácido-lácticas, y leche entera pasteurizada comercial, una matriz alimentaria de relevancia práctica. Los valores de pH, expresados como media \pm desviación estándar, evidencian una disminución progresiva a lo largo del tiempo en ambos medios, coherente con la producción de ácido láctico derivada de la fermentación de carbohidratos. Se detectaron diferencias estadísticas significativas tanto entre tiempos de muestreo como entre tratamientos, lo que indica que la tasa y magnitud de la acidificación dependen del tipo de sustrato.

Cuadro 4

Comportamiento del pH en medios de cultivo seleccionados durante el crecimiento de Lactobacillus acidophilus.

Tiempo (h)	MRS <i>Lactobacillus acidophilus</i> pH \pm DE	Leche <i>Lactobacillus acidophilus</i> pH \pm DE
T0	6.02 \pm 0.01 ^a	6.73 \pm 0.05 ^a
T1	5.95 \pm 0.00 ^b	6.65 \pm 0.04 ^a
T2	5.88 \pm 0.01 ^c	6.65 \pm 0.10 ^a
T3	5.80 \pm 0.01 ^d	6.67 \pm 0.08 ^a
T4	5.51 \pm 0.01 ^e	6.65 \pm 0.08 ^a
T5	6.12 \pm 0.01 ^f	6.58 \pm 0.06 ^{ab}
T6	4.63 \pm 0.03 ^g	6.45 \pm 0.13 ^b
T7	4.50 \pm 0.03 ^h	6.09 \pm 0.09 ^c
CV%	0.29	1.25

Nota. D.E.: Desviación estándar. CV%: Coeficiente de variación. a-h: Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tiempos dentro de un mismo tratamiento.

Cuadro 5

Comportamiento del pH en medios de cultivo seleccionados durante el crecimiento de Lactobacillus plantarum.

Tiempo (h)	MRS <i>Lactobacillus plantarum</i> pH \pm DE	Leche <i>Lactobacillus plantarum</i> pH \pm DE
T0	5.70 \pm 0.02 ^a	6.51 \pm 0.05 ^a
T1	5.70 \pm 0.02 ^a	6.53 \pm 0.03 ^a

Tiempo (h)	MRS <i>Lactobacillus plantarum</i> pH ± DE	Leche <i>Lactobacillus plantarum</i> pH± DE
T2	5.58 ± 0.01 ^b	6.48 ± 0.02 ^a
T3	5.17 ± 0.02 ^c	6.20 ± 0.04 ^b
T4	4.81 ± 0.02 ^d	6.23 ± 0.01 ^b
T5	4.19 ± 0.04 ^e	5.10 ± 0.03 ^c
T6	4.08 ± 0.01 ^f	6.03 ± 0.03 ^d
T7	3.68 ± 0.01 ^g	5.85 ± 0.01 ^e
CV%	0.40	0.46

Nota. D.E.: Desviación estándar. CV%: Coeficiente de variación. a-g: Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas (P < 0.05) entre tiempos dentro de un mismo tratamiento.

En ambos microorganismos se observó una disminución progresiva del pH durante la incubación, coherente con la producción de ácido láctico propia de las bacterias ácido-lácticas (BAL) a partir de la fermentación de carbohidratos. Sin embargo, la magnitud, la velocidad de descenso y las diferencias significativas entre tiempos y medios muestran comportamientos particulares para cada especie.

En *L. acidophilus*, la reducción del pH en MRS fue estadísticamente significativa desde las primeras horas de incubación, descendiendo de 6.02 en T0 a 5.80 en T3, lo que indica una acidificación temprana y sostenida. Posteriormente, la caída se intensificó a partir de T4 (5.51) hasta alcanzar un valor final de 4.50 en T7, reflejando un metabolismo rápido y constante en el tiempo (Bolívar-Jacobo et al., 2023). La tendencia también fue significativa, aunque más gradual: el pH pasó de 6.73 en T0 a 6.65 en T1–T4 y continuó descendiendo progresivamente hasta 6.09 en T7. En este caso, la mayor disminución ocurrió en las etapas finales de incubación, lo que puede atribuirse a la necesidad de hidrolizar lactosa mediante β -galactosidasa antes de disponer de monosacáridos fermentables, junto con el efecto tampón de proteínas y sales minerales que retardan la acidificación (Meng et al., 2021). La capacidad tampón de las caseínas y sales minerales presentes en la leche contribuyó a moderar la disminución en el tiempo, ralentizando la caída del pH (Mega et al., 2020).

En *L. plantarum*, el análisis temporal mostró un descenso significativo en todos los tiempos evaluados dentro de cada tratamiento. En MRS, los valores bajaron de 5.70 en T0 a 5.17 en T3 y alcanzaron finalmente 3.68 en T7, con un coeficiente de variación bajo (0.40), lo que evidencia un

comportamiento homogéneo y estable entre repeticiones. En leche, la acidificación fue más lenta al inicio, con valores estables entre T0 y T2 (6.51–6.48), y un descenso progresivo a partir de T4 hasta alcanzar 5.85 en T7. Esto refleja un patrón más gradual de acidificación, relacionado con su metabolismo heterofermentativo facultativo, que además de ácido láctico genera compuestos secundarios como etanol, CO₂ y otros ácidos orgánicos (Hang et al., 2020).

En conjunto, los resultados confirman que tanto en *L. acidophilus* como en *L. plantarum*, la acidificación del medio sigue un patrón progresivo en el tiempo, con descensos significativos de pH en cada etapa de incubación. Este comportamiento evidencia la relación directa entre el crecimiento poblacional y la producción de metabolitos ácidos. El análisis debe realizarse únicamente dentro de cada matriz, destacando la tendencia temporal, sin establecer comparaciones directas entre leche y MRS debido a las diferencias iniciales de pH y composición.

Fase II. Análisis Proximales

En esta etapa se evaluaron los niveles de azúcares reductores y proteínas presentes en los tratamientos, con el propósito de identificar las modificaciones en la composición nutricional de la leche entera pasteurizada comercial derivadas de la actividad metabólica de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* durante el proceso fermentativo. La cuantificación de azúcares reductores permite inferir el grado de utilización de carbohidratos simples como principal fuente energética para las bacterias ácido-lácticas, mientras que el análisis proteico ofrece indicios sobre la posible síntesis de biomasa microbiana y la transformación de los compuestos nitrogenados del medio.

Estos indicadores proporcionan una perspectiva complementaria a los datos microbiológicos, ya que permiten valorar la eficiencia de crecimiento y adaptación de cada cepa al sustrato.

Azúcares Reductores

El Cuadro 6 muestra el efecto de la fermentación láctica sobre los niveles de azúcares reductores en leche entera pasteurizada comercial, después de 12 horas de inoculado el medio (leche) con *L. acidophilus* y *L. plantarum*. Se observa una disminución significativa ($p = 0.003$) en el contenido

de azúcares en ambos tratamientos fermentados en comparación con la leche sin inocular, lo que evidencia la capacidad de estas bacterias para metabolizar carbohidratos disponibles en la matriz láctea.

Aunque ambos tratamientos mostraron diferencias significativas respecto al control, lo que sugiere que ambas especies poseen una eficiencia fermentativa similar en cuanto al consumo de azúcares. En la leche, la velocidad de utilización de azúcares no solo depende de la capacidad enzimática de la cepa, sino también de las propiedades físicas y químicas del medio. La lactosa y otros azúcares reductores pueden encontrarse parcialmente asociados a micelas de caseína o interactuar con proteínas del suero, lo que limita su disponibilidad inmediata. Además, la estructura coloidal y la viscosidad de la leche restringen la difusión de sustratos hacia la superficie celular, reduciendo la tasa de transporte y, en consecuencia, la velocidad de metabolización (Widyastuti y Febrisiantosa, 2014). Estas limitaciones explican por qué, a pesar de que ambas especies metabolizan carbohidratos de forma activa, el consumo y la acidificación en leche son más graduales que en un medio sintético como MRS, donde los azúcares están libres en solución y las bacterias pueden acceder a ellos rápidamente.

Resultados similares han sido reportados, que estas restricciones de disponibilidad y transporte afectan la cinética fermentativa en medios complejos, ralentizando tanto el descenso de pH como el incremento poblacional en comparación con sustratos simples (Lacerda et al., 2022). Asimismo, señalaron que la velocidad de consumo de azúcares está estrechamente relacionada con la tasa de acidificación (Taye et al., 2021), lo que coincide con los patrones de descenso de pH observados en la sección correspondiente de este estudio. En el presente estudio, la similitud en el consumo de azúcares entre *L. acidophilus* y *L. plantarum* sugiere que las características de la leche como medio de cultivo fueron el principal factor modulador del metabolismo de carbohidratos, por encima de las diferencias fisiológicas entre especies.

Proteínas

En cuanto al contenido proteico, los resultados del Cuadro 6 indican que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.310$) entre los tratamientos, lo que sugiere que la fermentación láctica por parte de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* no provocó una modificación relevante en el porcentaje total de proteínas de la leche durante el periodo de estudio.

La leche sin fermentar presentó un contenido de $32.31 \pm 0.81\text{g/L}$, mientras que los tratamientos con *L. acidophilus* y *L. plantarum* mostraron valores de $36.310 \pm 0.39\text{g/L}$ y $31.83 \pm 5.65\text{g/L}$, respectivamente. Aunque se detectó un valor ligeramente más alto en el tratamiento con *L. acidophilus*, la variabilidad dentro de los datos no permitió establecer una diferencia significativa. Cabe destacar que estos valores representan el contenido total de proteínas, sin distinguir entre proteínas originales del sustrato y las potencialmente sintetizadas por las bacterias durante la fermentación.

Es bien conocido que las bacterias lácticas poseen sistemas proteolíticos que hidrolizan las proteínas lácteas, particularmente las caseínas, generando péptidos y aminoácidos libres esenciales para su crecimiento (Zhao et al., 2022). Sin embargo, estos cambios no siempre se reflejan en el contenido global de proteínas, ya que lo que ocurre principalmente es una transformación estructural o funcional, más que una pérdida neta de materia nitrogenada. Las modificaciones proteicas inducidas por *Lactobacillus spp.* son más evidentes en análisis de fraccionamiento proteico o perfiles de péptidos, pero no necesariamente en el contenido total (Meng et al., 2021).

Además, la presencia de proteínas microbianas producidas durante la proliferación celular puede compensar parcialmente la degradación de las proteínas originales del medio, manteniendo constante la concentración global. Esto explicaría la ausencia de diferencias significativas en el contenido proteico de los tratamientos fermentados. Por lo tanto, lo que sugiere que la fermentación con *L. acidophilus* y *L. plantarum* no compromete el valor proteico de la leche, manteniéndola como una fuente rica en compuestos nitrogenados aun después del proceso fermentativo.

Cuadro 6

Efecto de la fermentación láctica sobre los azúcares reductores y las proteínas en leche entera pasteurizada comercial.

Tratamiento	% Azúcares reductores \pm DE	Proteínas (g/L) \pm DE
Leche entera pasteurizada comercial	2.49 \pm 0.03 ^x	32.31 \pm 0.81 ^x
<i>L Lactobacillus acidophilus</i>	1.52 \pm 0.20 ^y	36.31 \pm 0.39 ^x
<i>L Lactobacillus plantarum</i>	1.66 \pm 0.10 ^y	31.83 \pm 5.65 ^x
CV%	6.20	9.57
Valor p	0.00	0.31

Nota. D.E.: Desviación estándar. CV%: Coeficiente de variación. x-y: Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos. El orden alfabético de las letras representa la magnitud de los valores de mayor a menor dentro de cada parámetro analizado. En este caso, no se evaluaron diferencias a través del tiempo.

Conclusiones

Lactobacillus acidophilus y *Lactobacillus plantarum* presentaron diferencias significativas en su crecimiento entre el medio MRS y la leche entera pasteurizada comercial. El MRS al ser formulada específicamente para las BAL, favoreció una multiplicación más rápida y de mayor magnitud.

La leche a pesar de contener menor disponibilidad inmediata de nutrientes permitió una alta viabilidad, lo que confirma que es un sustrato que permite el desarrollo de ambas cepas en condiciones de cultivo controladas.

La fermentación de la leche con ambas bacterias provocó una reducción significativa en los azúcares reductores, sin afectar de forma significativa el contenido total de proteínas. Esto indica una actividad metabólica centrada en el consumo de carbohidratos, con mínimas alteraciones en la fracción proteica.

Recomendaciones

Realizar estudios complementarios que evalúen los cambios en las proteínas durante la fermentación, particularmente en cuanto a su estructura, tamaño y tipo; no obstante no se observaron variaciones en la concentración proteica, es probable que hayan ocurrido modificaciones estructurales relevantes que podrían influir en la funcionalidad o digestibilidad del producto final.

Incorporar un estudio de vida útil y viabilidad bacteriana post-fermentación, lo que permitiría valorar el comportamiento de *L. acidophilus* y *L. plantarum* durante el almacenamiento en condiciones reales de aplicación.

Referencias

- Bolivar-Jacobo, N. A., Reyes-Villagrana, R. A., Rentería-Monterrubio, A. L., Sánchez-Vega, R., Santellano-Estrada, E., Tirado-Gallegos, J. M. y Chávez-Martínez, A. (2023). Culture age, growth medium, ultrasound amplitude, and time of exposure influence the kinetic growth of *Lactobacillus acidophilus*. *Fermentation*, 9(1), 63. <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/1/63>
- Cao, P., Wu, L., Wu, Z., Pan, D., Zeng, X., Guo, Y. y Lian, L. (2019). Effects of oligosaccharides on the fermentation properties of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 2863–2872. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219301249>
- Dan, T., Chen, H., Li, T., Tian, J., Ren, W., Zhang, H [Heping] y Sun, T. (2019). Influence of *Lactobacillus plantarum* P-8 on fermented milk flavor and storage stability. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3133. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.03133/full>
- Espinoza-Córdova, G., Rojas, R. y Espinoza-Montesinos, F. (2021). Análisis químico proximal de granos y harina de Pajuro (*Erythrina edulis*) para elaborar bebidas proteicas. *Alfa Revista De Investigación En Ciencias Agronómicas Y Veterinaria*, 5(14), 297–318. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2664-09022021000200297&script=sci_arttext
- Esquer-Álvarez, A., Flores-Dórame, D. N., Cabrera-Pinto, J., Pérez-Osuna, V. U. y Rojas-Padilla, J. (Eds.). (2023). *Estudio de la calidad microbiológica de productos comerciales fermentados con bacterias ácido-lácticas (BAL)*. https://www.researchgate.net/profile/Alejandro-Figueroa-Lopez/publication/383552958_Explorando_escenarios_hacia_un_futuro_sostenible_en_Biotecnologia_y_Alimentos/links/66d1e98d64f7bf7b194a2202/Explorando-escenarios-hacia-un-futuro-sostenible-en-Biotecnologia-y-Alimentos.pdf#page=93
- Fernández, S. (2022). *Caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de ácido láctico (AL) a escala de planta piloto* [Tesis, Universidad de Costa Rica, Costa Rica]. EndNote Tagged Import Format. <https://www.ingbiosistemas.ucr.ac.cr/wp-content/uploads/TFG-SilviaFernandezFernandez.pdf>
- Gao, H., Li, X [Xin], Chen, X., Hai, D., Wei, C., Zhang, L. y Li, P. (2022). The functional roles of *Lactobacillus acidophilus* in different physiological and pathological processes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10), 1226. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9668099/>
- Hang, F., Jiang, Y., Yan, L., Hong, Q., Lu, W., Zhao, J., Zhang, H [Hao] y Chen, W. (2020). Preliminary study for the stimulation effect of plant-based meals on pure culture *Lactobacillus plantarum* growth and acidification in milk fermentation. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 4078–4087. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030220301466>
- Hernández-García, J. E., Sebastián-Frizzo, L., Rodríguez-Fernández, J. C., Valdez-Paneca, G., Virginia-Zbrun, M. y Calero-Herrera, I. (2019). Evaluación in vitro del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Revista De Salud Animal*, 41(1). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=10020650>
- Íñiguez, C., Rodríguez, T., Hernández, O., Martínez, I. y Nieto, M. (2018). Desarrollo de una leche fermentada a partir de leche de búfala y cultivo de *Lactobacillus acidophilus*: Development of fermented milk from buffalo milk using culture of *Lactobacillus acidophilus*. *Ciencia Y*

Tecnología De Alimentos, 28(2), 1–6.
<https://revcital.iiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/es/article/view/53>

- Krieger-Weber, S., Heras, J. M. y Suarez, C. (2020). Lactobacillus plantarum, a new biological tool to control malolactic fermentation: A review and an outlook. *Beverages*, 6(2), 23. <https://www.mdpi.com/2306-5710/6/2/23>
- Lacerda, S., Santos, M. C. d., Martins, O. A. y Pereira, J. G. (2022). Microbiological and physicochemical characterization of probiotic fermented milk throughout the shelf life under different storage temperatures. *Food Science and Technology*, 42, 102521. <https://www.scielo.br/j/cta/a/hhWryMtm33ygMTjt6dPLGbv/?format=html&lang=en>
- Mega, O., Jahidin, J. P., binti Sulaiman, N., Yusuf, M., Arifin, M. y Arief, I. I. (2020). Total count of lactic acid bacteria in goats and cows milk yoghurt using starter *S. thermophilus* RRAM-01, *L. bulgaricus* RRAM-01 and *L. acidophilus* IIA-2B4. *Buletin Peternakan*, 44(1), 50–56. <https://pdfs.semanticscholar.org/138a/ed74ed029adc65e4662451fa2d6a82a1b054.pdf>
- Meng, L., Li, S., Liu, G., Fan, X., Qiao, Y., Zhang, A., Lin, Y., Zhao, X., Huang, K. y Feng, Z. (2021). The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 138–150. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030220308808>
- Olortegui Broncano, A. H. y Santos Delgado, S. S. (2019). *Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas de leche entera en el hato lechero de la Universidad Nacional Jose Faustino Sánchez Carrión 2016* [Tesis, Universidad Nacional de José Faustino Sánchez Carrión, Perú]. EndNote Tagged Import Format. <https://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/20.500.14067/3215>
- Santander-Cortés, A. I. y Castro-Rosas, J. (2024). Aislamiento de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de alimentos fermentados típicos de México: una revisión. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 11(22), 59–68. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/icbi/article/view/11072>
- Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H. y Mathewos, M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. *The Scientific World Journal*, 2021(1), 4697445. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2021/4697445>
- Vázquez-Ortiz, A. A., Vázquez-Ovando, A., Ruiz-González, S., López-Martínez, G., Gyves-Córdova, M. G. de y Mejía-Reyes, J. D. (2022). Capacidad probiótica preliminar de bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes fuentes. *Ibciencias*, 5(2). <https://revistas.unach.mx/index.php/ibciencias/article/view/213>
- Widyastuti, Y. y Febrisiantosa, A. (2014). The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 5(4). <https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=42817>
- Yuan, H., Han, S., Zhang, S., Xue, Y., Zhang, Y [Yaoguang], Lu, H. y Wang, S. (2022). Microbial properties of raw milk throughout the year and their relationships to quality parameters. *Foods*, 11(19), 3077. <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/19/3077>
- Zhao, L., Shi, F., Xie, Q., Zhang, Y [Yifan], Evivie, S. E., Li, X [Xuetong], Liang, S., Chen, Q., Xin, B. y Li, B. (2022). Co-fermented cow milk protein by *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 and *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0386 attenuates its allergic immune response in Balb/c mice.

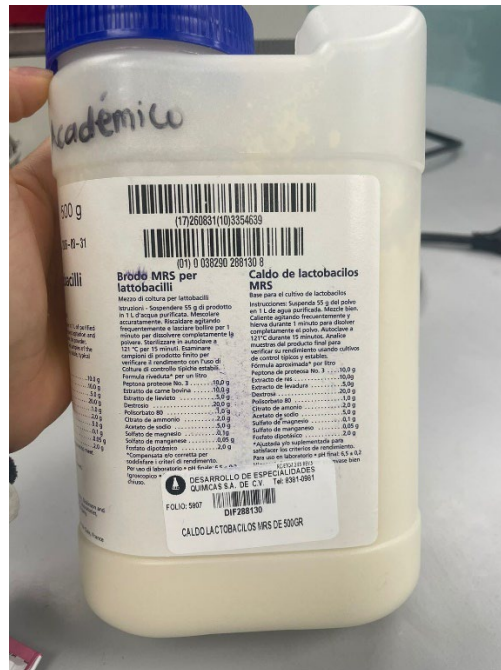
Journal of Dairy Science, 105(9),
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030222004179>

7190–7202.

Anexos

Anexo A

Composición del medio MRS para cultivo de bacterias ácido-lácticas.



Anexo B

Leche entera comercial pasteurizada utilizada como medio de cultivo.



Anexo C

Preparación de tubos con reactivo DNS para la determinación de azúcares reductores.



Anexo D

Microplaca utilizada en la prueba de Lowry para determinación de proteínas.



Anexo E

Preparación experimental para el estudio cinético de Lactobacillus plantarum.



Anexo F

Placa Petri con crecimiento de Lactobacillus acidophilus tras 48 horas de incubación.

