**CRECIMIENTO DE CEPAS DE *LACTOBACILLUS* SP AISLADAS DE INTESTINO DE ABEJAS EN MEDIOS ALTERNATIVOS.**

GROWTH OF LACTOBACILLUS SP STRAINS ISOLATED FROM THE INTESTINE OF BEES IN ALTERNATIVE MEDIUM.

Juan Emilio Hernández-García1

José Antonio Rodríguez Díaz2

LairenYaimaGómez Valdivia3

María de los Ángeles Leal del Ojo Blanco4.

1 Doctor en Medicina Veterinaria. Doctor en Ciencias Veterinarias. Profesor Titular. Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Medicina Veterinaria, Sancti Spíritus, Cuba. Correo electrónico: [juanemilio@uniss.edu.cu](mailto:juanemilio@uniss.edu.cu), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7471-0561>

2 Médico Veterinario. Especialista del LaboratoriodeReferenciaparaInvestigaciones ySaludApícola(LARISA),Sancti Spíritus, Cuba. Correo electrónico: [diagnostico@larisa.ulcesa.minag.gob.cu](mailto:diagnostico@larisa.ulcesa.minag.gob.cu)ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6451-5627>

3 Médico Veterinario. Especialista del LaboratoriodeReferenciaparaInvestigaciones ySaludApícola(LARISA),Sancti Spíritus, Cuba. Correo electrónico: [diagnostico@larisa.ulcesa.minag.gob.cu](mailto:diagnostico@larisa.ulcesa.minag.gob.cu)ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9319-1111>

4 Tecnóloga. Especialista del LaboratoriodeReferenciaparaInvestigaciones ySaludApícola(LARISA),Sancti Spíritus, Cuba. Correo electrónico: [diagnostico@larisa.ulcesa.minag.gob.cu](mailto:diagnostico@larisa.ulcesa.minag.gob.cu)ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4906-3080>

**Resumen**

El trabajo se realizó en elLaboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola, Sancti Spíritus, Cuba; la investigación tuvo como objetivo la evaluación del crecimiento de cepas de Lactobacillus sp aisladas de intestino de abejas en medios de cultivo alternativos, utilizando como indicadores indirectos de crecimiento bacteriano los cambios de pH y acidez de los medios. Los resultados de laboratorio mostraron que el medio a base de diferentes proporciones de suero lácteo y residual de la línea de ablandamiento del grano de soya (50, 75, 90 y 100 % v/v de residual líquido de soya-RLS), se influyó por la presencia de lactosa, expresado en la disminución del pH y la elevación de la acidez; siendo las proporciones más efectivas las de 50, 75 y 90 % (v/v), donde a las 12 h difieren los valores de los diferenciales de pH con los de la leche de soya (0.553, 0.500 y 0.470 vs 0.183), mientras que los valores de los diferenciales de % de acidez no difieren (7, 11.3 y 3 vs 14.7). Concluyendo que utilizando los cambios de acidez y pH como métodos indirectos de detección del crecimiento bacteriano las mezclas de suero lácteo y residual liquido de soya son alternativas locales de obtención de masa microbiana de cepas de *Lactobacillus* sp.

Palabras clave: Medio de Cultivo, Lactobacillus, Soya, Residual.

**Abstract**

The work was carried in the Reference Laboratory for Bee Research and Health, Sancti Spíritus, Cuba; the research aimed at evaluating the growth of *Lactobacillus* sp strains isolated from the intestine of bees in alternative culture media, using the changes in pH and acidity of the media as indirect indicators of bacterial growth. The laboratory results showed that the medium based on different proportions of whey and residual from the soybean softening line (50, 75, 90 and 100% v / v of liquid residual soybean-RLS), was influenced by the presence of lactose, expressed in the decrease in pH and the increase in acidity; the most effective proportions being those of 50, 75 and 90% (v / v), where at 12 h the differentials values ​​of the pH differ with those of soy milk (0.553, 0.500 and 0.470 vs 0.183), while that the values ​​of the% acidity differentials do not differ (7, 11.3 and 3 vs 14.7). Concluding that using acidity and pH changes as indirect methods for detecting bacterial growth, mixtures of milk serum and soy residual liquid are local alternatives for obtaining the microbial mass of strains of *Lactobacillus* sp.

*Keywords:* Culture Medium, Lactobacillus, Residual, Soy.

1. **Introducción**

En los últimos años se ha buscado alternativas para promover el crecimiento de los animales a través de una forma más segura, no sólo para el animal, sino también para preservar la salud humana como consecuencia de la antibioresistencia que generan su uso sistemático, este fenómeno favorece la investigación de distintos productos entre los cuales destacan los agentes bioproductos (probióticos, prebióticos y simbióticos), catalogados como productos de origen natural, beneficiosos para la salud, con propiedades biológicas activas y con la capacidad preventiva y terapéutica (Arsène *et al.,* 2021).

En los estudios con animales se utilizan microorganismos cultivados en el laboratorio o probióticos comerciales. En este sentido, los aspectos de mayor importancia son la selección adecuada de la cepa o cepas, el medio de cultivo y las condiciones fermentativas que permitan obtener un alto nivel de viabilidad durante el proceso (Marin-Cárdenas *et al.,* 2020).

En Cuba, a escala industrial, no se producen los aditivos probióticos para animales a pesar de que varios grupos multidisciplinarios de investigación trabajan en esta temática y disponen de microorganismos con estas características (Cossio et al., 2018).

La selección de medios de cultivo adecuados y económicos para las pequeñas producciones y a escala industrial es un aspecto importante en la obtención de probióticos. Santos, (2016), consideran que un medio de cultivo apropiado debe tener péptidos como fuente de nitrógeno, azúcares como fuente de carbono, extracto de levadura como factor de crecimiento, magnesio y manganeso en concentraciones óptimas. Este mismo autor plantea: “cuando se elige un medio de cultivo alternativo, hay que considerar factores como los costos, la capacidad de producir gran número de células y el método de fermentación”.

La generación de subproductos o residuos agroindustriales en las diferentes etapas de los procesos productivos, es actualmente una problemática a nivel mundial, debido a que en la mayoría de los casos no son procesados o dispuestos adecuadamente, situación que contribuye al proceso de contaminación ambiental (Saval, 2012); sin embargo los mismos son fuentes disponibles de nutrientes (Pérez-López, 2017), que se pueden emplear de forma eficiente como medios naturales para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos con actividad probiótica(Santos, 2016).

El objetivo del trabajo fue comprobar el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* sp aisladas de intestino de abejas en diferentes proporciones de suero lácteo y residual líquido del proceso del yogurt de soya como medios alternativos.

1. **Materiales y métodos**

*2.1 Área de estudio.*

El trabajo experimental se realizará en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA).

*2.2 Materia prima.*

Suero de queso Blanco. El suero lácteo fue obtenido en el área productiva de Queso Blanco, en la etapa de desuere de la masa, el mismo se recolectó (500mL) en frascos de cristal estériles de 1000 mL y refrigerado hasta su utilización. Al suero obtenido se le realizó los análisis establecidos por la Norma Cubana de queso Blanco (NC 78-17, 2003), valorándose la acidez.

Residual de la línea de ablandamiento del grano de soya. La infusión de soya se recolectó del proceso de hidratación y ablandamiento del grano de soya empleado en la fabricación de Soyur; el mismo se recolectó en frascos de cristal estériles (500 mL) y se dejó enfriar a temperatura ambiente y se guardó en refrigeración hasta su utilización. A la infusión de soya se le determinó la acidez, tomando como referencia la Norma Cubana de leche Pasteurizada (NC-71: 2000).

*2.3 Preparación del medio de cultivo natural (SQ+RLS).*

Se utilizó como sustrato una mezcla de residual líquido de la línea de ablandamiento del grano de soya (RLS) y suero de Queso Blanco (SQ) tomando como proporción de partida 50 % (v/v) (Raya-Medina, 2018). A partir de esta proporción se hicieron las diferentes combinaciones (Tabla 1).

Tabla 1. Proporciones de cada residual utilizado en la investigación (SQ+LRS).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Réplicas | Proporciones | *Suero de queso blanco (SQ)* | *Residual líquido de la línea de ablandamiento del grano de soya (RLS)* |
| 1 | 50 % (v/v) | 250 mL | 250 mL |
| 2 | 75 % (v/v) | 125 mL | 375 mL |
| 3 | 90 % (v/v) | 50 mL | 450 mL |
| 4 | 100 % | - | 500 mL |
| 5 Control | Leche de Soya |  |  |

Las combinaciones se trabajaron en 5 réplicas, agitando durante 5 minutos y sometida a un proceso de esterilización a una temperatura de 120 0C durante 15 min y 1 atmósfera. (Sakura, Rusia); una vez esterilizada la mezcla fue enfriada a una temperatura de 43°C hasta su inoculación.

* 1. *Selección de la cepa utilizada, inoculación y fermentación del sustrato.*

Se emplearon las cepas fermentativas *Lactobacillus* SS70 *y Lactobacillus* SS73 pertenecientes al Banco de Microorganismos del Departamento de Veterinaria de la Universidad de Sancti Spiritus, José Martí Pérez) (UNISS) y al LARISA.

Posterior a la esterilización de las diferentes proporciones del medio natural (SQ+RLS) se dejó enfriar, atemperado a 37°C, una vez que alcanzó la temperatura óptima de crecimiento se procedió a realizar la inoculación con la simbiosis de gérmenes (*Lactobacillus* SS70 *y Lactobacillus* SS73) al 2,5 % v/v y se incubó a temperatura ambiente ºC (Tiempo 0) por 64 h.

A partir del tiempo cero (T0) y a las 12h, 24h, 36h, 48h y 60h se realizó el estudio de crecimiento bacteriano en el tiempo para determinar si las cepas de ensayo (*Lactobacillus* SS70 *y Lactobacillus* SS73), se desarrollaron favorablemente en las diferentes proporciones del medio de cultivo natural (SQ+RLS).

* 1. *Análisis físico químico del bioproducto.*

A las muestras de cada uno de las réplicas se le determinó en los diferentes tiempos (T0, 12h, 24h, 36h, 48h y 60h) los siguientes indicadores: acidez titulable (%) y pH (NRIAL-173., 2001; NRIAL-174, 2008) (NRIAL-173: 2001 y NRIAL 174: 2008); los cuales son indicadores indirectos del crecimiento de la biomasa microbiana. Para valorar indirectamente el incremento de crecimiento se consideró también los diferenciales de acidez y de pH; donde Diferencial pH/Acidez = pH/Acidez del tiempo de Incubación (Tn) – Tiempo inicial (To).

1. **Resultados y discusión**

En la tabla 2 se presentan los resultados de crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* SS70 *y Lactobacillus* SS73 en cada una de las proporciones de suero de queso blanco y residual líquido de la línea de ablandamiento del grano de soya (SQ+RLS); teniendo como referencia los valores de acidez y pH (expresado en % de ácido láctico y valor de pH). Se reconoce que la acidez y el pH son métodos indirecto que se pueden utilizar para la determinación del crecimiento bacteriano (Díaz *et al.,* 2019), cuando se pretende optimizar el medio de cultivo se debe tener en cuenta que la actividad microbiana no solo se afecta por los componentes del medio y sus concentraciones, sino también por las interacciones entre estos (Cossio *et al.,* 2018).

Del procesamiento estadístico de los datos de las diferentes proporciones utilizadas resultó que la acidez (Tabla 2) al tener como patrón la leche de soya no difieren con las siguientes proporciones, T0 50%, T12 50 y 75%, T48 50% y el pH (Tabla 3), solo no difiere de la proporción al 100% en las lecturas de 48 y 60 h, no obstante reflejan a las 60h los valores máximos la concentración del 50 % (v/v) con 128.6 % de ácido láctico, aunque solo existe diferencia significativa (p < 0.05) cuando se usa el 100% de RLS (24.7 %); el pH más bajo fue en la proporción de 75 % con 3.73, el cual difiere significativamente (p < 0.05) de las siguientes proporciones y la leche de soya.

Tabla 2. Comportamiento de la acidez a los diferentes tiempos y proporciones.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Trata  miento | Medias de lecturas de Acidez | | | | | |
| *SQ* + RLS | T-0 | T-12 | T-24 | T-36 | T-48 | T-60 |
| 1- 50 % | 27,2a ±0.25 | 34,7b ±0.05 | 49,0b ±0.46 | 70,3b ±0.47 | 95,3c ±0.015 | 128,6b ±0.055 |
| 2- 75 % | 19,6b ±0.05 | 31,0b ±0.10 | 42,3b ±0.21 | 63,7b ±0.25 | 78,7b ±0.080 | 96,7b ±0.431 |
| 3- 90 % | 16,0b ±0.10 | 19,0a ±0.26 | 44,3b ±0.49 | 68,3b ±0.05 | 74,0b ±0.036 | 81,7b ±0.030 |
| 4-100 % | 10,7c ±0.11 | 14,6a ±0.05 | 17,7a ±0.21 | 19,0a ±0.26 | 23,3a ±0.021 | 24,7a ±0.015 |
| 5- LS | 27,7a ±0.21 | 32,7b ±0.47 | 67,0c ±0.10 | 89,0c ±0.56 | 124,7c ±0.007 | 131,0b ±0.052 |

LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para p< 0.05.

Tabla 3. Comportamiento del pH a los diferentes tiempos y proporciones del *SQ* + RLS.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tratamiento | Medias de lecturas de pH | | | | | |
| *SQ* + RLS | T-0 | T-12 | T-24 | T-36 | T-48 | T-60 |
| 1- 50 % | 4,89ª  ±0.000 | 4,34a ±0.032 | 4,25a ±0.005 | 4,02a ±0.015 | 3,91a  ±0.061 | 3,74a  ±0.030 |
| 2- 75 % | 5,12b ±0.005 | 4,62b ±0.078 | 4,32a ±0.005 | 3,96a ±0.017 | 3,92a ±0.053 | 3,73a ±0.026 |
| 3- 90 % | 5,34c ±0.020 | 4,87c ±0.045 | 4,47b ±0.005 | 3,99a ±0.005 | 3,86a ±0.061 | 3,86b ±0.011 |
| 4-100 % | 6,08d ±0.021 | 5,75d ±0.069 | 5,20c ±0.037 | 4,91b ±0.044 | 4,84b ±0.015 | 4,84c ±0.025 |
| 5- LS | 6,60e ±0.005 | 6,44e ±0.158 | 5,48d ±0.106 | 5,00c ±0.032 | 4,87b ±0.025 | 4,20c ±0.023 |

LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para p< 0.05.

Et: Error típico.

Los valores de los diferenciales de acidez (Tabla 4) que muestran el crecimiento de las cepas estudiadas reflejan que entra las proporciones a las 12 h (T12), no existen diferencias estadísticas (p< 0.05) al compararlas con la leche de soya, al igual que a las 24 h (T24) y 36 h (T36), con excepción de la proporción 100% RLS. A las 48h todas difieren de la leche de soya y a T60 solo lo hacen las proporciones de 90 y 100 %. Si se comparan las proporciones entre sí no difieren estadísticamente a excepción de la proporción del 100 % a partir de las 36 h.

El diferencial de pH (Tabla 5) varió igualmente con los tiempos de lectura, y a T12 existe diferencia significativa (p < 0.05) con la leche de soya a favor de las proporciones 50, 75 y 90 %. A las 36 h (T36) las proporciones de 75, 90 y 100% no difieren de la leche de soya. Entre proporciones solo se observan diferencias significativas (p < 0.05) a partir de T48 en la del 50 %.

Tabla 4. Comportamiento de los diferenciales de acidez de las diferentes proporciones del líquido residual del ablandamiento del grano de soya.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tratamiento | Medias de diferenciales Acidez | | | | |
| *SQ* + RLS | T-12 | T-24 | T-36 | T-48 | T-60 |
| 1- 50 % | 7,0a ±0.26 | 21,3ab ±0.47 | 42,7a ±0.51 | 67,7b ±0.011 | 101,0c ±0.78 |
| 2- 75 % | 11,3a ±0.05 | 22,7ab ±0.15 | 44,0a ±0.26 | 59,0b ±0.081 | 83,3cb ±1.75 |
| 3- 90 % | 3,0a ±0.26 | 28,3ab ±0.57 | 52,3a ±0.15 | 58,0b ±0.045 | 64,7b ±0.46 |
| 4-100 % | 4,0a ±0.17 | 07,0ac ±0.10 | 08,3b  ±0. 20 | 12,7a ±0.015 | 14,0a ±0.10 |
| 5- LS | 14,7a ±1.76 | 44,3b ±2,84 | 49,3a ±0.0 | 97,0c ±0.055 | 112,3c ±1.66 |

LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para p< 0.05.

Et: Error típico.

Tabla 5. Comportamiento de los diferenciales de pH de las diferentes proporciones del líquido residual del ablandamiento del grano de soya.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tratamiento | Medias de diferenciales pH | | | | |
| *SQ* + RLS | T-12 | T-24 | T-36 | T-48 | T-60 |
| 1- 50 % | 0,553b±0.032 | 0,633a ±0.005 | 0,873a ±0.015 | 0,970a ±0.061 | 1,127a ±0.031 |
| 2- 75 % | 0,500b ±0.079 | 0,803b ±0.015 | 1,163ab ±0.012 | 1,203b ±0.047 | 1,393c ±0.032 |
| 3- 90 % | 0,470b ±0.036 | 0,853b ±0.057 | 1,010ab ±0.581 | 1,477c ±0.075 | 1,477c ±0.030 |
| 4-100 % | 0,337ab ±0.081 | 0,880b ±0.050 | 1,173ab ±0.055 | 1,240b ±0.026 | 1,247b ±0.038 |
| 5- LS | 0,183a ±0.144 | 1,127c ±0.102 | 1,597b ±0.038 | 1,730d ±0.026 | 1,817d ±0.029 |

LEYENDA: Las letras desiguales en la misma columna difieren para p< 0.05.

Et: Error típico.

A partir de las diferentes concentraciones se puede apreciar, que el factor de mayor influencia en la variable respuesta fue la concentración de suero lácteo, lo cual indica que los niveles de lactosa que se utilizaron afectan el nivel de actividad microbiana.

Los lactobacilos requieren medios complejos con diversos aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento y carbohidratos fermentables que estimulan su crecimiento. La formulación del nuevo medio natural se condujo principalmente para la utilización del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya que posee alta concentración de nutrientes (Serventi, 2020) con la inclusión de fuentes de carbohidratos y demás componentes del suero lácteo (Gómez, M’Boumba, & Hernández, 2018). Este aporte se realiza para el incremento de los microorganismos probióticos (Lactobacillus), quienes necesitan estos nutrientes para su rápido crecimiento.

Se conoce que el suero lácteo posee en su composición lactosa (3.8-4.3 %); estos carbohidratos aportan altas concentraciones de azúcares, los cuales pueden utilizarse por los microorganismos como fuente de energía (Nyokabi *et al.,* 2021). Otros autores como Miranda *et al.,* (2015) utilizaron suero de queso dulce para el crecimiento de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*.

(Díaz *et al.,* 2019) propuso un bioproducto utilizando las cepas de *S. thermophilus* SS77 y *L. acidophilus* SS80 y las mismas mostraron capacidad de crecimiento en los medios a base de leche de soya, aunque se hizo más abundante el crecimiento cuando se enriqueció con extracto de levadura.

Luna *et al.,* (2011) estableció una metodología para la incorporación del residual líquido del grano de soya para el crecimiento de micro algas con buenos resultados. Coghetto*et al.,* (2016) en su investigación sobre el crecimiento y actividad fermentativa de cepas de *L. plantarum* BL011 aisladas de queso Serrano, utilizó un medio de cultivo alternativo libre de proteína animal donde incluyó residuo líquido ácido de la obtención de proteína de soya. Los resultados mostraron la posibilidad de incluir ese sustrato como una alternativa para producir probióticos, sin ingredientes derivados de animales, logrando obtener concentraciones altas de la biomasa en birreactores con costos minimizados.

Beret, (2018), siguiendo el mismo principio de utilizar residuos agroindustriales evaluó medios de cultivo más económico para la producción de biomasa de *Lactobacillus paracasei* 90, incluyendo el residual líquido proveniente de la obtención de proteína de soya, concluyendo que este residual puede ofrecer un comportamiento como medio de cultivo base para fermentos lácticos a un costo competitivo y con gran potencial de aplicación en quesería.

El residual de la línea de ablandamiento del grano de soya presenta en su composición entre 16 y 20 % de Nitrógeno Total (Kurup, 2020), por lo que constituye una alternativa para la incorporación de fuentes nitrogenadas en medios alternativos.

Raya-Medina, (2018) incluyó en su investigación sobre el uso en terneros de un bioproducto desarrollados en residuos de la industria láctea, el residual líquido obtenido de la línea de ablandamiento del grano de soya, en el proceso de producción de yogurt de soya. El trabajo incluyó combinación del 50 % (v/v) del residual de la línea de ablandamiento del grano de soya con el suero lácteo. Los resultados fueron comparables con los obtenidos con el yogurt de leche de soya al utilizar como variable de interés la acidez; Giró-Letourneaut (2019), utiliza estas mismas proporciones en su trabajo de obtención de un biopreparado con cepas de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcusthermophiles* SS77 mostrando buen crecimiento en los tiempos evaluados.

Los valores de pH de las diferentes proporciones del 50, 75 y 90 % (v/v) del medio de cultivo (SQ+RLS) disminuyó a valores por debajo de 4.5 en 24h, lo que se corresponde con otros estudios donde las cepas de lactobacilos redujeron el pH a valores ≤ 5,5 en 24h (Jurado-Gámez *et al.,* 2014). La tolerancia a bajo pH son propiedades esenciales requeridas por las bacterias acido lácticas para sobrevivir en el tracto digestivo y expresar sus propiedades benéficas. Con estas características de calidad las cepas incluidas en el ensayo tendrán mayores efectos ya que se conoce que la mayoría de los enteropatógenos inhiben su crecimiento en valores cercanos a un pH de 5,5.

1. **Conclusiones**

Se obtienen niveles de crecimiento de las cepas evaluadas (*Lactobacillus* SS70 *y Lactobacillus* SS73) en las diferentes proporciones de suero lácteo y residual líquido de la línea de ablandamiento del grano de soya y la presencia de lactosa incrementa la población de Lactobacillus, expresado en la disminución del pH y la elevación de la acidez; siendo las proporciones más efectivas las de 50, 75 y 90% (v/v). En cuanto a los tiempos de incubación se puede ajustar a las 12 o 24 h donde se alcanzan diferenciales de acidez y pH que no difieren con la leche de soya.

**Bibliografía**

Arsène, M. M., Davares, A. K., Andreevna, S. L., Vladimirovich, E. A., Carime, B. Z., Marouf, R., & Khelifi, I. (2021). The use of probiotics in animal feeding for safe production and as potential alternatives to antibiotics. *Veterinary world, 14*(2), 319.

Beret, M. V. (2018). Medio de cultivo económico para la producción de biomasa de lactobacillus paracasei 90. *Disponible* [*http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/bitstream/handle/123456789/9035/R*](http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/bitstream/handle/123456789/9035/R) *I31.pdf Consultado: 15 de julio 2020.*

Coghetto, C. C., Vasconcelos, C. B., Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2016). Lactobacillus plantarum BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. *brazilian journal of microbiology, 47*(4), 941-948.

Cossio, D. S., Hernández, Y. G., & Mendoza, J. (2018). Development of probiotics for animal production Experiences in Cuba Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba. *Rev Ciencias Agrícolas, 52*(4).

Díaz, J. R., García, J. H., & Rizzo, L. (2019). Evaluación en Cuba de un medio de cultivo alternativo para recuento en placa de Lactobacillus spp. *InfoCiencia, 23*(2), 24-35.

Giró-Letourneaut, D. ( 2019). Bioproducto probiótico desarrollado en residuos de la industria láctea para uso en terneros lactantes. (Trabajo de diploma). Departamento de Agronomía Facultad de Ciencias Agropecuaria Universidad de Sancti Spíritus, "José Martí Pérez". .

Gómez, M., M’Boumba, A., & Hernández, O. (2018). Aprovechamiento de suero de queso en yogur de soya: Use of cheese whey in soy yogurt. *Ciencia y Tecnología de Alimentos, 28*(1), 32-35.

Jurado-Gámez, H., Andrés-Martínez, Magdalena-Chaspuengal, A., & Y., Y.-C. F. (2014). Evaluación in vitro de la acción de Lactobacillus plantarum con características probióticas sobre Yersinia pseudotuberculosis. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 12*, 49-59.

Kurup, G. G. (2020). *Treatment of dairy wastewater and recovery of organic solids and salts.*RMIT University.

Luna, L. G., Álvarez, I., & Rivero, R. (2011). Cultivo de Chlorella vulgaris sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético. *Revista Colombiana de Biotecnología, 13*(2), 27-38.

Marin-Cárdenas, A., Mbengue, C., Miranda-Yuquilema, J. E., & Artiles, E. N. (2020). Efecto de un biopreparado probiótico sobre el comportamiento productivo y la salud de ternero. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal, 4*(1 Ene-Abr), 68-75.

Miranda, O. F., P.L. Ponce, I. Borges, M. Cutiño, M. Díaz, R. M. Miranda, M. Ramírez, R. . (2015). Evaluación de bacterias probióticas en suero de queso fermentado para la alimentación de cerdos en crecimiento. *Revista Computadorizada de Producción Porcina, 22*(2).

NRIAL-173. (2001). Productos de soya métodos de ensayo. La Habana, Cuba.

NRIAL-174. (2008). Yogur de soya aromatizado requisitos de calidad. La Habana, Cuba.

Nyokabi, S., Luning, P. A., de Boer, I. J., Korir, L., Muunda, E., Bebe, B. O., . . . Oosting, S. J. (2021). Milk quality and hygiene: knowledge, attitudes and practices of smallholder dairy farmers in central Kenya. *Food Control*, 108303.

Pérez-López, E. (2017). Mejora de la funcionalidad de Okara de soja por tratamiento simultáneo con altas presiones hidrostáticas y enzimas alimentarias Improvement of the functionality soybean okara by simultaneous treatment with high hydrostatic pressure and food-grade enzymes.

Raya-Medina, R. (2018). Evaluación probiótica en terneros de un bioproducto desarrollados en residuos de la industria láctea (Trabajo de diploma). . *Departamento de Agronomía. Facultad de Ciencias Agropecuaria. Universidad de Sancti Spíritus, "José Martí Pérez"*.

Santos, M. (2016). Probiotic cell cultivation. . *Advances in Probiotic Technology, 45*.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología, 16*(2), 14-46.

Serventi, L. (2020). Soaking Water Composition *Upcycling Legume Water: from wastewater to food ingredients* (pp. 27-39): Springer.