

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* de *Lactobacillus* spp. aislado de yogures comerciales expendidos en la ciudad de Cuenca frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autor:

Thalía Gabriela Jachero Sigüencia

Grace Alexandra Pinto Alvarez

Director:

Jéssica Andrea León Vizñay

ORCID:  0000-0003-4913-1717

Cuenca, Ecuador

2023-11-07

Resumen

En la actualidad, el uso de conservantes químicos en el yogurt cuestiona la seguridad alimentaria. No obstante, el consumo de yogurt proporciona beneficios debido a sus probióticos destacando el género *Lactobacillus* capaz de producir posbióticos como producto de su metabolismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de *Lactobacillus* spp. aislado de yogures comerciales (TN, NT, AP y PC) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 mediante la estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) aplicando la técnica de microdilución en caldo; se utilizó el sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* como agente antibacteriano. El estudio demostró que la CMI de *Lactobacillus* spp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 de TN y PC fue al 12,5% y la CMB al 25%. La CMI de NT fue al 25% y la CMB al 50%. AP tiene una CMI al 50%, y una CMB superior al 50%. Mientras que frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, la CMI fue al 12,5 % y la CMB al 25% para TN, NT y PC, para AP la CMI fue al 25% y la CMB al 50%. Se concluyó que la concentración de *Lactobacillus* en yogures comerciales no es suficiente para ejercer un óptimo efecto como bioconservante. Sin embargo, los posbióticos poseen una capacidad significativa para contrarrestar varias bacterias patógenas por lo que podría ser una estrategia para mejorar la inocuidad alimentaria y brindar beneficios a la salud del consumidor.

Palabras clave: probiótico, posbióticos, bioconservante



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Currently, the use of chemical preservatives in yoghurt raises questions about food safety. However, yoghurt consumption provides benefits due to its probiotics, with the *Lactobacillus* genus capable of producing postbiotics as a product of its metabolism. The aim of this work was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from commercial yoghurts (TN, NT, AP and PC) against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 by estimating the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using the broth microdilution technique; the supernatant of the *Lactobacillus* culture was used as the antibacterial agent. The study demonstrated that the MIC of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 of TN and PC was 12.5% and the MBC was 25%. The MIC of NT was 25% and the MBC was 50%. AP has MIC of 50% and MBC of over 50%. While against *Escherichia coli* ATCC 25922, the MIC was 12.5% and the MBC 25% for TN, NT and PC, for AP the MIC was 25% and the MBC 50%. It was concluded that the concentration of *Lactobacillus* in commercial yoghurts is not sufficient to exert an optimal biopreservative effect. However, postbiotics have a significant capacity to counteract several pathogenic bacteria and could therefore be a strategy to improve food safety and provide health benefits to the consumer.

Keywords: probiotic, postbiotic, biopreservative



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen	2
Abstract	3
Dedicatorias	8
Introducción	10
Objetivos	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
1. Marco teórico	13
1.1 Yogurt.....	13
1.2 Aditivos en el yogurt.....	13
1.2.1 Conservantes en el yogurt.....	13
1.2.2 Efectos de los conservantes en la salud.....	15
1.3 <i>Lactobacillus</i> spp.....	16
1.3.1 Fermentación homofermentativa.....	16
1.4 Participación de <i>Lactobacillus</i> en la fabricación de yogurt.....	18
1.5 Viabilidad de <i>Lactobacillus</i>	19
1.6 Efectos de <i>Lactobacillus</i> spp. en la salud.....	20
1.7 Función de <i>Lactobacillus</i> spp. en la seguridad de los alimentos.....	21
1.8 Aplicaciones de los posbióticos	23
1.9 Contaminación microbiológica y actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus</i>	25
1.9.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.9.2 <i>Escherichia coli</i>	26
2. Metodología	28
2.1 Tipo de diseño de investigación	28
2.2 Muestreo y tamaño de la muestra	28
2.3 Materiales e Insumos	28
2.4 Métodos y técnicas de análisis	30
2.4.1 Recuento en placa por siembra en profundidad de <i>Lactobacillus</i> spp.	30
2.4.2 Cálculos para la determinación de células viables de <i>Lactobacillus</i> spp.	31
2.5 Identificación de <i>Lactobacillus</i> spp.	31
2.6 Método de microdilución en caldo	32
2.6.1 Preparación de los sobrenadantes.....	33
2.6.2 Preparación de los microorganismos	33
2.6.3 Preparación del inóculo de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	33
2.6.4 Técnica de microdilución en caldo	34

UCUENCA

5

2.7	Manejo estadístico de datos	35
3.	Resultados y discusiones	37
3.1	Recuento en placa de <i>Lactobacillus</i> spp. de las marcas de estudio	37
3.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida	38
4.	Conclusiones	49
	Recomendaciones.....	50
	Referencias	51
	Anexos.....	65

Índice de figuras

Figura 1.	Vía de Embden-Meyerhof.....	17
Figura 2.	Recuento medio de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>L. acidophilus</i> en muestras de yogurt a lo largo de su almacenamiento refrigerado.....	20
Figura 3.	Representación de los beneficios para la salud de los posbióticos.....	25
Figura 4.	Proceso de la técnica recuento en placa por siembra en profundidad.....	31
Figura 5.	Flujograma de la Tinción de Gram.....	32
Figura 6.	Flujograma de la prueba de la catalasa.....	32
Figura 7.	Flujograma de la prueba de la oxidasa.....	32
Figura 8.	Proceso para la dilución del inóculo.....	34
Figura 9.	Concentraciones del sobrenadante de <i>Lactobacillus</i> spp.....	35
Figura 10.	Esquema de la placa de microdilución.....	35
Figura 11.	Recuento de <i>Lactobacillus</i> spp. de las marcas de estudio.....	38
Figura 12.	Concentración mínima inhibitoria de los sobrenadantes de <i>Lactobacillus</i> spp. de las marcas de estudio para <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	40
Figura 13.	Concentración mínima bactericida de los sobrenadantes de <i>Lactobacillus</i> spp. de las marcas de estudio para <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	40
Figura 14.	CMI de los sobrenadantes de <i>Lactobacillus</i> spp. de las marcas de estudio y porcentaje de inhibición de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 y <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	42
Figura 15.	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de sobrenadantes libres de células (CFS) en cepas patógenas mediante análisis de curvas de tiempo de muerte.....	44
Figura 16.	Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 en medios con fracción neutralizada de sobrenadantes de cultivos de <i>Lactobacillus</i> y fracción ácida de sobrenadantes.....	45
Figura 17.	Efectos de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad antimicrobiana de posbiótico.....	47

Índice de tablas

<i>Tabla 1.</i> Conservantes permitidos en el yogurt.....	14
<i>Tabla 2.</i> Resultado del recuento de <i>Lactobacillus</i> spp. de las marcas de estudio.....	37
<i>Tabla 3.</i> Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del sobrenadante de las marcas de estudio.....	39
<i>Tabla 4.</i> Porcentaje de inhibición de la concentración mínima inhibitoria del sobrenadante libre de células de <i>Lactobacillus</i> aislados del yogurt de las marcas de estudio.....	43

Dedicatorias

A mi madre, que con su ejemplo me ha motivado a seguir adelante a pesar de las dificultades y por alentarme a seguir formándome profesionalmente.

A mi padre, quien me ha brindado apoyo para culminar esta etapa y por guiarme en la vida con consejos para ser una persona de bien.

A mi querida hermana, quien ha estado siempre presente y me ha ayudado con sus conocimientos.

Thalía Gabriela Jachero Siguencia

Este trabajo lo dedico a mis padres Sandra y Renato, a mi abuelita Angelita, a mis hermanas Karen y Belén, quienes me han brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida en mi etapa estudiantil. Ellos, supieron ser mi guía en este camino de la vida, llenarme de cariño, impulsarme a ser mejor, aconsejarme oportunamente en las travesías presentadas en el camino.

A mis amigas, Gema y Jennifer, quienes me han acompañado en todas las experiencias académicas desde un inicio, me han brindado su apoyo emocional, su valiosa amistad y con quienes he compartido un sin fin de experiencias, alegrías y tristezas.

Grace Alexandra Pinto Alvarez

Agradecimientos

A Dios, por su bendición, fortaleza y protección en cada etapa de nuestra vida personal y profesional.

A nuestros padres, quienes han sabido inculcarnos desde pequeños confianza y perseverancia en todas las metas que nos proponíamos a cumplir.

A nuestra apreciada Universidad de Cuenca, por habernos brindado una educación de calidad, con docentes que han aportado sus conocimientos y han motivado el aprendizaje para formarnos como profesionales.

A nuestra tutora, Dra. Jessica León Mgt., quien de manera amable supo guiarnos, aconsejarnos y solventar las dudas, durante el trayecto de la elaboración del presente trabajo de titulación.

A nuestra asesora, Dra. Carmen Lucía López, por toda su colaboración desinteresada, enseñanzas, experiencias compartidas como docente y facilitarnos los laboratorios e insumos que fueron indispensables para el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Priscila Plaza, quien nos brindó apoyo, experiencias académicas y su valioso tiempo para ayudarnos a solventar los inconvenientes presentados.

A nuestras amistades formadas durante la etapa universitaria, quienes nos han apoyado desde siempre con palabras de aliento.

Introducción

En los últimos años, ha existido un interés creciente por las formas naturales alternativas para controlar el deterioro de los alimentos causados por microorganismos capaces de producir enfermedades transmitidas por alimentos y debido a la preocupación por los efectos nocivos de los conservantes químicos a la salud del consumidor (Nayyeri et al., 2017).

La prevención del deterioro de los alimentos mediante el uso de agentes bioconservantes como los probióticos y/o metabolitos antimicrobianos (posbióticos) de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* spp. es un enfoque alternativo para evitar el deterioro y aumentar el valor nutritivo sin alterar las propiedades organolépticas de los productos alimenticios (Galvez et al., 2008). Tsilingiri et al., (2013) define a los posbióticos como "factores resultantes de la actividad metabólica de un probiótico o cualquier molécula liberada capaz de conferir efectos beneficiosos al huésped de manera directa o indirecta". Estas moléculas secretadas por células viables pueden recuperarse a partir de sobrenadantes, y las células viables pueden eliminarse del cultivo mediante centrifugación y/o filtración (Cuevas et al., 2020). Sin embargo, estudios sobre la actividad de *Lactobacillus* spp. y la producción de sus posbióticos como sustancias inhibidoras de patógenos, es un tema poco valorado de su uso como un posible bioconservante para productos alimenticios.

Lactobacillus spp. se caracteriza por una variedad de posbióticos que son liberados tras la lisis celular, durante el crecimiento y fermentación en cultivos microbiológicos complejos. Los posbióticos de los cultivos probióticos son una fuente rica en bacteriocinas y otras sustancias inhibidoras como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etc., con actividad antagonista sobre los principales patógenos transmitidos por los alimentos entre ellos se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Sanam, et al., 2022). Una de las principales causas de antagonismo es la síntesis de ácidos orgánicos cuyo mecanismo de inhibición radica en la acumulación de aniones intracelulares, efectos de membrana, la inhibición de la síntesis de biomacromoléculas y efectos de pH intracelular (Gao, et al., 2019). Otro mecanismo importante es mediante las bacteriocinas, que ejercen su acción inhibitoria por alteraciones en la membrana celular, cambios de gradiente, de tal manera que, la consecuencia es la pérdida del contenido celular y finalmente la muerte del microorganismo (Ibrahim, et al., 2021).

Por otro lado, la actividad inhibitoria de los posbióticos depende de factores como el tipo de microorganismo objetivo, la concentración de posbióticos y la naturaleza de los prebióticos de origen involucrados (Thorakkattu et al., 2022).

El estudio de los posbióticos se ha introducido en varias áreas, incluida la ciencia de los alimentos, la microbiología de los alimentos y nutrición (Teame et al., 2020). Un aspecto importante que impulsa la aplicación de los posbióticos en las industrias es su estabilidad inherente, ya que son estables en un amplio rango de pH y temperatura, mayor vida útil y poca interacción con las matrices alimentarias (Barros et al., 2020). Por tales motivos se puede encontrar un uso notable en el perfil de seguridad alimentaria, por ejemplo, bioconservación, envases activos a modo de recubrimiento en la superficie del alimento y en desinfectantes en las industrias alimentarias por su potencial mecanismo de eliminar biopelículas bacterianas. Además, los posbióticos muestran un enorme potencial como componentes de alimentos funcionales pues presentan actividad inmunomoduladora, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, etc (Aggarwal et al., 2022).

Por lo tanto, en el presente trabajo investigativo se evaluó el efecto de los metabolitos de *Lactobacillus* spp. aislados de marcas comerciales como un bioconservante que genere la inhibición de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* que se han implicado en la contaminación microbiológica del yogurt y por ende en enfermedades transmitidas por alimentos lo cual se ha convertido en uno de los desafíos de salud pública más común a nivel mundial (Zamani, 2016).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de *Lactobacillus* spp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922 con el fin de determinar su potencial como bioconservante de alimentos.

Objetivos específicos

Aislar *Lactobacillus* spp., a partir de yogures expendidos en la ciudad de Cuenca, para analizar su efectividad como posible alternativa a la adición de conservantes químicos.

Estimar la actividad bactericida de *Lactobacillus* spp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922, mediante un ensayo *in vitro* de la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

1. Marco Teórico

1.1 Yogurt

El yogurt es un producto elaborado a partir de la leche, generalmente bovina con o sin la adición de algún derivado natural de la leche, como leche descremada en polvo, concentrados de suero, caseinatos o crema. Presenta una estructura de gel que resulta de la coagulación de las proteínas de la leche debido al ácido láctico secretado por cultivos iniciadores termofílicos simbióticos, como *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*; estas bacterias deben ser “viables y abundantes” en el momento del consumo (Chandan, 2006). Este producto lácteo al igual que otras leches fermentadas son alimentos funcionales que cada vez están más presentes en la alimentación diaria; el aumento de la popularidad y el mayor consumo a escala mundial se puede atribuir a la creciente evidencia de muchos efectos positivos para la salud incluida la mejora de la salud intestinal y del sistema inmunitario (Gasmala et al., 2017). En la actualidad tras la alta demanda del yogurt se ha visto una preferencia de los consumidores por productos con menos o nulos ingredientes químicos como aditivos que se adicionan para mejorar la apariencia y calidad (Kalhor et al., 2023).

1.2 Aditivos en el yogurt

Un aditivo es toda sustancia añadida de manera intencionada al alimento con fines tecnológicos, incluidos los organolépticos, en sus fases de elaboración, preparación, fabricación, tratamiento, envasado, empaquetado, almacenamiento o transporte (NTE INEN-CODEX 192, 2016).

Para mejorar la calidad del yogurt y prolongar su vida útil se utilizan sustancias químicamente sintetizadas o naturales como aditivos alimentarios; los comúnmente empleados en el procesamiento del yogurt son emulsionantes, espesantes, saborizantes, colorantes, edulcorantes, reguladores de acidez y conservantes, aunque su seguridad es uno de los temas más importantes en la ciencia nutricional (Jiang et al., 2022). Los aditivos deben agregarse de conformidad con la legislación nacional e internacional de acuerdo a la ingesta diaria admisible que representa la cantidad de consumo diario de una sustancia sin ningún riesgo, incluso durante toda la vida (Zamani Mazdeh et al., 2017).

1.2.1 Conservantes en el yogurt

Generalmente, se emplean conservantes químicos sintéticos y naturales para prevenir la degradación microbiológica del yogurt. De acuerdo al Codex Alimentarius, los conservantes químicos permitidos en el yogurt son del grupo de los sorbatos y benzoatos, mientras que como conservante natural está la nisina (Tabla 1).

Tabla 1. Conservantes permitidos en el yogurt

SIN	Conservante	Dosis máxima
E200 E202 E203	Sorbatos Ácido sórbico Sorbato de potasio Sorbato de calcio	1000 mg/kg como ácido sórbico
E210 E211 E212 E213	Benzoatos Ácido benzoico Benzoato de sodio Benzoato de potasio Benzoato de calcio	300 mg/kg como ácido benzoico
E234	Nisina	500 mg/kg

SIN: Sistema Internacional de Identificación adoptado por la Unión Europea

(Codex Alimentarius, 2003)

- Ácido sórbico

El ácido sórbico es un compuesto orgánico de estado sólido incoloro aplicado ampliamente en la industria alimentaria como conservante debido a su alta estabilidad, solubilidad y facilidad de uso. Se aplican con más frecuencia las sales de ácido sórbico como el sorbato de potasio y el sorbato de calcio en su forma ácida porque son más solubles en agua, actúan a un pH menor a 6,5. El espectro de acción del sorbato de potasio es amplio contra bacterias, mohos y levaduras, entre ellos, están los microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, y *Penicillium notatum* (Dehghan et al., 2018). No obstante, factores como temperatura, pH, combinación de alimentos, actividad acuosa, diversos metales y otros aditivos en los alimentos pueden influir en la estabilidad del compuesto. Además, el sorbato es inestable y se degrada en el contenido de agua de los alimentos pues se ha observado que los alimentos almacenados a 30°C por 3 meses pierden el 35% del compuesto y a los 40 días almacenados a 35°C se pierde hasta un 25% (Dehghan et al., 2018).

- Ácido benzoico

El ácido benzoico es un compuesto orgánico presente en estado sólido inodoro o con un ligero olor a benzaldehído, ligeramente soluble en agua. Las sales del ácido benzoico como el benzoato de sodio, benzoato de potasio y benzoato de calcio actúan como agentes antifúngicos y suelen ser empleados en la industria alimentaria (National Center for

Biotechnology Information, 2023). Sin embargo, los benzoatos se ven afectados por el pH, ya que, a mayor pH, disminuye la eficacia del conservante, por lo que, se requiere aumentar la concentración para ejercer su actividad contra bacterias y levaduras (Robinson, 2014).

El uso de sorbatos o benzoatos en el yogurt depende de la industria de producción, algunas marcas de yogurt optan por mezclas de conservantes debido al alto costo del sorbato de potasio y el sabor astringente poco agradable que presenta el benzoato de sodio, además en combinación estos dos conservantes potencian la efectividad antimicrobiana (Medina, 2012; Loyola, 2021).

- Nisina

La nisina es un antibiótico policíclico y peptídico, sintetizado de forma natural por *Lactococcus lactis* y *Streptococcus lactis* a partir de una fermentación en medio ácido modificado. La molécula exhibe su mayor estabilidad bajo condiciones ácidas y es más soluble a pH bajo. Su acción inhibitoria es de bajo espectro, actuando contra bacterias Gram positivas, pero no contra hongos, levaduras ni bacterias Gram negativas (Cabrero, P et al., 2019).

1.2.2 Efectos de los conservantes en la salud

El uso extensivo de sales de benzoato y sorbato para la conservación de alimentos inicialmente se consideraba seguro, pues para establecer los niveles máximos de estos aditivos se realizaron estudios que garantizaban inocuidad (Andersen & Narir, 2001). Pero a lo largo de los años se ha discutido su seguridad gracias a avances tecnológicos que permiten investigar el daño a nivel de células y tejidos (Piper et al., 2017).

Se ha observado que el sorbato de potasio puede presentar efectos secundarios nocivos en la salud como urticaria, alergia y asma cuando su ingesta supera los límites autorizados. La ingesta a dosis elevadas provoca alteraciones cromosómicas en los linfocitos (Piper & Piper, 2017).

El grupo de los benzoatos se ha caracterizado por la presencia de reacciones de hipersensibilidad, debido a que inducen la liberación de histamina del cuerpo generando urticaria crónica, granulomatosis orofacial y asma bronquial (Collado, R et al., 2019).

El benzoato de sodio puede tener efectos teratogénicos en el embrión manifestándose en deformidades craneofaciales. Las malformaciones más comunes son la hipoplasia mandibular y la deformación de la columna vertebral entre ellos está la escoliosis y los defectos del tubo neural (Piper & Piper, 2017). Otros impactos severos incluyen alteraciones en los factores de crecimiento, expresión génica, el ciclo celular y las deformaciones durante el nacimiento. El benzoato de potasio inhibe la síntesis intracelular de proteínas y ADN a dosis menores de 100 pg/ml y mayores a 500 pg/ml. En dosis de 200 y 500 pg/ml hay un aumento

de anomalías cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas y prevalencia de micronúcleos en las células humanas (Sambu et al., 2022).

De acuerdo a un estudio, donde se evaluó si la ingesta de aditivos alimentarios artificiales afectaba el comportamiento infantil en niños de 2 a 9 años, se determinó que el consumo de benzoato de sodio en la dieta produce un aumento en la hiperactividad en los niños (McCann et al., 2007).

1.3 *Lactobacillus* spp.

El género *Lactobacillus* se clasifica en el filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae*. Dentro de la familia *Lactobacillaceae*, el género *Lactobacillus* representa el grupo más grande y diverso contando con 261 especies (Zheng et al., 2020). El género *Lactobacillus* spp., pertenece al grupo de bacterias ácido lácticas (BAL). Se caracterizan por su forma bacilar Gram positivo, anaerobio, aerotolerante o microaerófilo, no esporulado, no móvil, no posee la enzima catalasa ni la oxidasa (Ramírez et al., 2011). Sus colonias en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) son de aspecto circular, convexas o planas, de borde entero con una ligera elevación y de coloración blanquecina (Morales-Nolasco et al., 2019).

Según la fermentación de la lactosa se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas. El producto principal del primer grupo es el ácido láctico mientras que para el segundo grupo es el ácido láctico y etanol con generación de dióxido de carbono (CO₂) (Parra, 2010). Para la fabricación del yogurt únicamente se emplean cepas de bacterias ácido lácticas homofermentativas.

1.3.1 Fermentación homofermentativa

En la clase de bacterias homofermentativas se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y algunas especies de *Lactobacillus* tales como: *acidophilus*, *lactis*, *thermophilus*, *helveticus*, *delbrueckii subsp delbrueckii*, *delbrueckii subsp bulgaricus* y *delbrueckii subsp lactis*. Estas bacterias poseen la enzima hexosa isomerasa y aldolasa, pero carecen de la fosfoacetolasa (Parra, 2010). Este grupo utiliza la ruta Embden Meyerhoff Parnas (EMP) (Figura 1), la cual cataboliza la glucosa a piruvato en condiciones de respiración aerobia, anaerobia y fermentación (Carroll, K et al., 2016). Esta vía convierte 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico, representando una cantidad mayor al 85% de este ácido a partir de la glucosa (Parra, 2010).

En la vía de Embden hay cuatro reacciones de fosforilación del sustrato que acompañan la conversión de la triosa – fosfato a dos moléculas de piruvato mediante un proceso oxidativo en el cual se forma en el primer paso metabólico nicotinamida adenina dinucleótida (NADH),

que se convertirá a NAD⁺ para que continúe la fermentación. La reducción directa de piruvato por NADH produce lactato como producto terminal de la fermentación (Carroll et al., 2016). Como resultado de la homofermentación también se generan compuestos que atribuyen sabor al yogurt generados a partir de la lipólisis de la grasa de la leche y las transformaciones microbiológicas de la lactosa y el citrato. Más de 100 compuestos volátiles, incluidos compuestos carbonílicos, alcoholes, ácidos, ésteres, hidrocarburos, compuestos aromáticos, compuestos que contienen azufre y compuestos heterocíclicos, se encuentran en el yogurt en concentraciones bajas o trazas (Cheng, 2010).

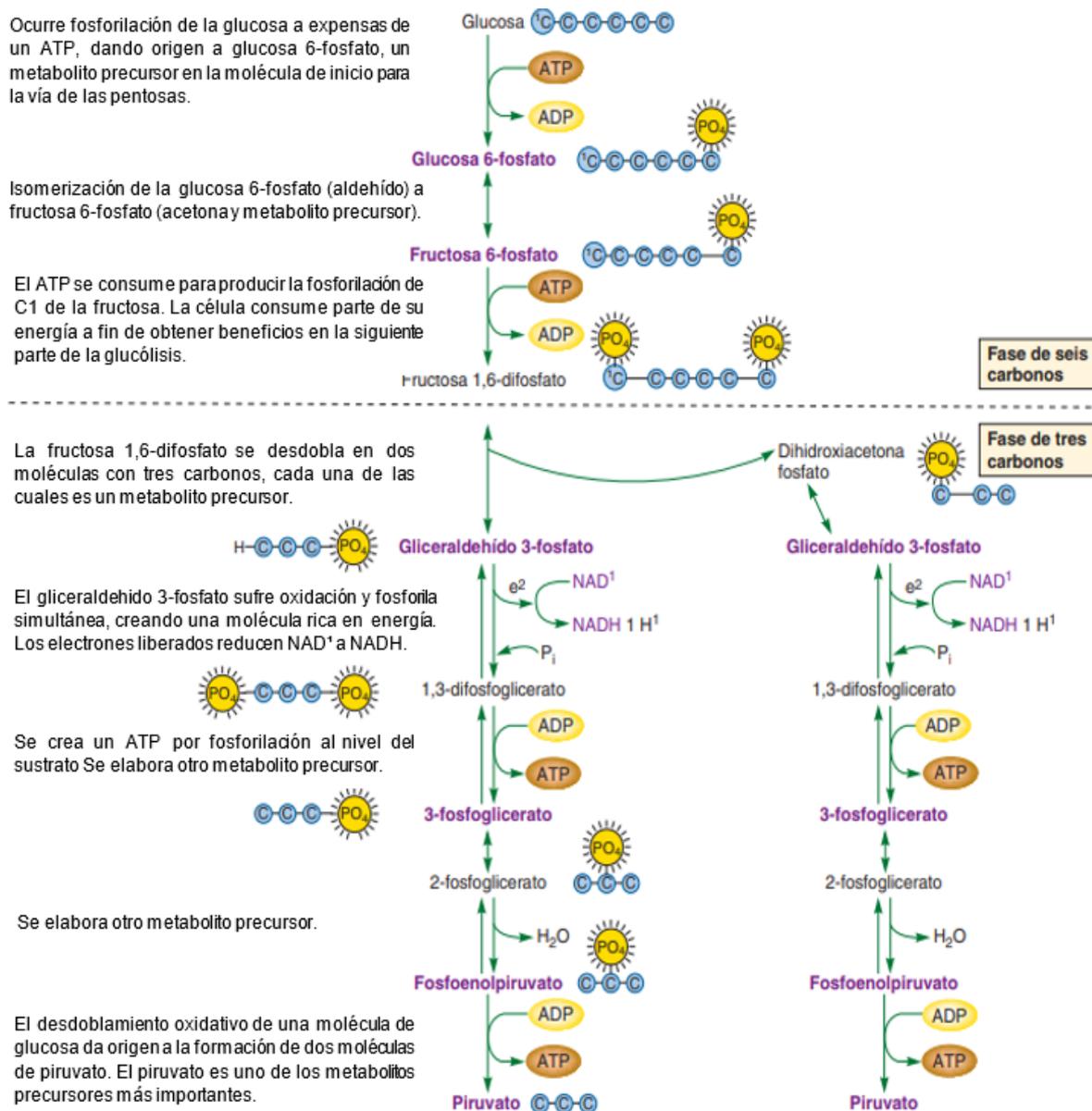


Figura 1. Vía de Embden-Meyerhof (Tomado de: Carroll, K et al., 2016)

1.4 Participación de *Lactobacillus* en la fabricación de yogurt

Las bacterias del ácido láctico, particularmente del género *Lactobacillus*, han sido involucradas y empleadas en la microbiología de los alimentos, especialmente en la fermentación de la leche, debido a su alto potencial para producir metabolitos importantes y mejorar la calidad nutricional del producto, es decir, el empleo de un cultivo iniciador actúa a través de reacciones bioquímicas para provocar la formación de la cuajada y el desarrollo de los componentes organolépticos y bioactivos (Le Roy et al., 2022).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el yogurt se produce mediante la fermentación de la leche con dos bacterias productoras de ácido láctico viables, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*). Sin embargo, los cultivos iniciadores de yogurt también pueden incluir otros microorganismos, como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus jugurti*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidus* y *Bifidobacterium infantis* (Sfakianakis & Tzia, 2014). La selección de los cultivos iniciadores es uno de los factores más importantes en la determinación de las características tecnológicas y organolépticas de los alimentos lácteos fermentados.

Las marcas de yogurt que se expenden a nivel nacional suelen contener una combinación de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* los cuales muestran sinergia en el entorno de la leche y como resultado permiten un mayor metabolismo de la lactosa y producción de ácido láctico y otros metabolitos en comparación del metabolismo individual de cada uno (Vedamuthu, 2006; Walstra et al., 2006). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* como cultivos iniciadores de yogurt generalmente se adicionan en una proporción de 1:1 o 1:2. Las diferentes proporciones de cultivos iniciadores tienen un efecto significativo sobre el tiempo de fermentación, el pH, la viscosidad y otras características del producto (Dan, et al, 2023).

Durante la incubación entre 43 - 45 °C el crecimiento del cultivo iniciador da como resultado un aumento en el contenido microbiano del sistema de 10^8 a 10^{10} UFC/g. Los compuestos carbonílicos formados durante la fermentación son principalmente ácido láctico, acetaldehído, sulfuro de dimetilo, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona, 2-metiltiofeno, 3-metil-2-butenal, 1-octen-3-ona, trisulfuro de dimetilo, 1-nonen-3-ona, ácido acético, metional, (*cis, cis*)-nonenal, 2-metil tetrahidrotiofen-3-ona, 2-feniactaldehído, ácido 3-metilbutírico, ácido caproico y benzotiozol (Sfakianakis & Tzia, 2014). Estos compuestos contribuyen al sabor distintivo del yogurt.

Por lo general, cuando se alcanza un pH de 4,6 se finaliza la fermentación del yogurt ya que la caseína está en forma solubilizada y se crea la matriz de gel del yogurt (Muncan et al., 2020). Una vez que el pH del yogurt alcanza el valor de 4,7 - 4,3, el yogurt se enfría a unos 5

°C para inhibir el crecimiento y detener el metabolismo del cultivo iniciador (Sfakianakis & Tzia, 2014).

Durante la incubación los lactobacilos también intervienen en las características de calidad de los productos fermentados a través de capacidades biosintéticas específicas, como la síntesis de hidrocoloides espesantes (exopolisacáridos) que permiten producir yogures con propiedades reológicas mejoradas (Torino et al., 2015).

Como producto de la fermentación también se disminuye la inmunorreactividad de las proteínas al hidrolizar epítomos de β -lactoglobulina y las caseínas, evitando el reconocimiento por inmunoglobulina E (IgE) de pacientes alérgicos, este fenómeno se ha estudiado en proteínas de leche hidrolizadas por *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Zheng et al., 2013; Pescuma et al., 2015). Así mismo, la actividad microbiana sobre la lactosa y lípidos, permite no sólo la generación de un producto de mayor riqueza aromática, sino también la obtención de un producto final más fácilmente absorbible por el organismo humano, lo que redundará en notables beneficios de carácter nutricional (Tojo et al., 2006).

1.5 Viabilidad de *Lactobacillus*

Para que los efectos beneficiosos de los probióticos se produzcan en los consumidores es necesario que las bacterias se encuentren viables en el producto y sean capaces de superar las barreras fisiológicas del estómago (acidez gástrica) e intestino delgado (acción bactericida de sales biliares), que alcancen el colon y lo colonicen, dando lugar a una microbiota bacteriana adecuada para la salud (Tojo et al., 2006). Se ha estudiado la viabilidad de estas bacterias mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en individuos sanos que consumieron durante 10 días leche fermentada con *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, confirmando la viabilidad de la bacteria a lo largo del tracto intestinal pues se identificaron estos microorganismos en heces en una concentración de 5×10^5 UFC/g; (Hernández, 2005). Otros estudios realizados *in vitro* donde se simuló las condiciones del sistema gastrointestinal también demostraron la viabilidad de *Lactobacillus* spp. (Lo Curto et al., 2011).

Otro factor importante es la concentración de bacterias ácido lácticas presentes en diferentes productos comerciales de yogurt pues deben ser constantes en el tiempo en un rango de 10^6 a 10^8 UFC/g, que es la concentración recomendada por la FAO/OMS (2010) (Gueimonde et al., 2004). Diferentes estudios han demostrado que la concentración de bacterias ácido lácticas disminuye entre un 7 al 33 %, aunque los recuentos al final del almacenamiento suelen mantenerse en el rango establecido. Por ejemplo Othman, et al. (2017) registró un cambio en los conteos viables de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* en yogurt

durante la fabricación y el almacenamiento (Figura 2); los cultivos aumentaron ligeramente hasta los días 5 y 7, luego disminuyó lentamente hasta el final del período de almacenamiento, no obstante la supervivencia de probióticos del yogurt fue satisfactoria pues los recuentos microbianos permanecieron estables con valores alrededor de 10^6 a 10^8 UFC/g durante todo el período de almacenamiento.

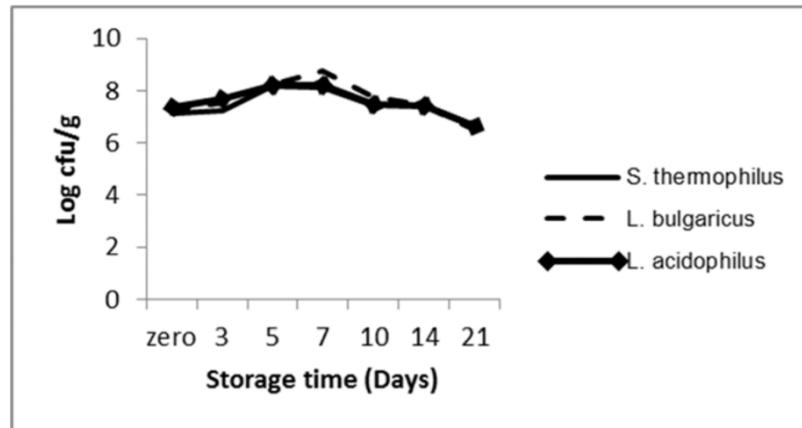


Figura 2. Recuento medio de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* en muestras de yogurt a lo largo de su almacenamiento refrigerado (Tomado de: Othman et al., 2017).

En general, la viabilidad de las bacterias probióticas depende del tipo de cepa, las condiciones de almacenamiento y la combinación de cultivos iniciadores (Mani-López et al., 2014).

Por otro lado, varios estudios han analizado el efecto de los conservantes sobre las bacterias ácido lácticas señalando que tanto el sorbato de potasio como el benzoato de sodio ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas como las cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*. Este comportamiento se debe a que el sorbato inhibe las deshidrogenasas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (Escobar, 2019), ocasionando la acumulación de ácidos grasos β -insaturados que son productos intermedios en el metabolismo lipídico. Otro mecanismo está asociado a los dobles enlaces que posee, los cuales interfieren con la actividad catalítica de las enzimas responsables del crecimiento microbiano (Quispe et al., 2010).

1.6 Efectos de *Lactobacillus* spp. en la salud

Existen claras evidencias de los efectos nutricionales, preventivos y terapéuticos de los probióticos (*L. casei rhamnosus* LGG, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. salivaris*, *L. johnsonii*, *B. bifidum*, *S. thermophilus*) en las enfermedades del tracto gastrointestinal como la diarrea aguda de origen viral, bacteriana, post antibióticos y quimioterápicos, en la intolerancia a la lactosa, alergia a los alimentos, colitis, síndrome del colon irritable,

enfermedad inflamatoria intestinal, inhibición de la colonización gástrica y actividad de *Helicobacter pylori*, estreñimiento e incluso cáncer. Sin embargo, el papel principal de los probióticos es la capacidad de modular la microbiota intestinal (Bourrie et al., 2016).

Diversos estudios evidenciaron como los lactobacilos probióticos promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas contra microorganismos dañinos, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* entérica serotipo *Typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica* (Bourrie et al., 2016).

Las diferentes cepas de *Lactobacillus* tienen especificidades hidrolíticas para las proteínas y, en consecuencia, pueden liberar péptidos bioactivos diferentes, dependiendo del tipo de proteína utilizada como sustrato por las bacterias. En el caso de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* genera péptidos bioactivos con actividad antioxidante e inmunomoduladora (Raveschot et al., 2018). Se ha encontrado oligosacáridos funcionales generados a partir de la fermentación ácido láctica con una efectividad en la prevención de las caries dentales, facilitación de la absorción de minerales, propiedades antioxidantes, mejora de la inmunidad y como reguladores alternativos de la glucosa en sangre en diabéticos (Patel y Goyal, 2011).

1.7 Función de *Lactobacillus* spp. en la seguridad de los alimentos

Las tecnologías de fermentación tienen una importancia considerable para la industria alimentaria porque contribuyen a la conservación de los productos alimenticios prolongando su vida útil al mismo tiempo que les proporcionan las propiedades sensoriales deseadas. Durante la fermentación, los metabolitos de las BAL inhiben el desarrollo de microflora indeseable y la formación de compuestos desfavorables, este es un fenómeno muy deseable, porque está relacionado con la posibilidad de reducir la adición de conservantes químicos a los alimentos (Śmiechowska et al., 2018). La actividad antimicrobiana de las BAL está vinculada a la disminución del pH debido a su metabolismo fermentativo y a la producción de metabolitos inhibidores (Delavenne et al., 2013).

La acción antimicrobiana se genera mediante un sinergismo entre compuestos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas, que pueden inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Sanam et al., 2022). Aunque, la variedad y concentración de metabolitos sintetizados y por ende su efecto depende de las cepas microbianas, las condiciones de cultivo y las condiciones de procesamiento (Aggarwal et al., 2022).

- **Ácidos orgánicos**

El principal mecanismo de inhibición de patógenos está relacionado por la secreción de varios ácidos orgánicos, como el ácido láctico, el ácido fórmico y el ácido acético, que reducen el pH del medio, inactivando gradualmente a las bacterias a medida que el pH desciende (Guo

et al., 2017). Los ácidos orgánicos tienen múltiples actividades inhibitoras, incluida la competencia energética, la acumulación de aniones intracelulares (que aumenta la presión osmótica intracelular), los efectos de membrana, la inhibición de la síntesis de biomacromoléculas y efectos de pH intracelular (Gao et al., 2019). De acuerdo a la teoría del ácido débil, que se basa en la acción lipofílica de los ácidos débiles cuando no están disociados, estos actúan ingresando a la célula bacteriana a través de la membrana plasmática y se descomponen en iones a pH alto, provocando la acidificación del citoplasma. Este proceso, puede alterar el metabolismo celular al dañar las enzimas, inhibir la síntesis de proteínas, destruir el material genético, interrumpir la absorción de nutrientes, dañar la subestructura y por lo tanto la función de la pared celular (Li et al., 2014).

- **Biosurfactantes**

Los biosurfactantes son moléculas poliméricas sintetizadas durante el registro tardío o la fase estacionaria temprana del ciclo de crecimiento de un organismo y se secretan extracelularmente o se unen a la pared celular. Los principales incluyen moléculas anfifílicas que comprenden restos hidrofóbicos (ácidos grasos o cadena hidrocarbonada) e hidrofílicos (polisacáridos, péptidos o ácidos) para proporcionar propiedades activas de superficie y de emulsificación que reducen la tensión interfacial en la superficie. Esta propiedad anfifílica interfiere en la formación de biopelículas preformadas y previene la formación de biopelículas por parte de microorganismos patógenos (Satpute et al., 2016). Estos también interrumpen la integridad de la membrana celular y la salida del contenido citoplasmático de los patógenos (Aggarwal et al., 2022).

- **Bacteriocinas**

Otro mecanismo con acción inhibitoria contra bacterias patógenas es la producción de bacteriocinas, que constituyen un grupo diverso de péptidos antimicrobianos que se sintetizan en los ribosomas. Los mecanismos antimicrobianos de las bacteriocinas incluyen un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, la formación de poros en la superficie de las membranas celulares, un cambio en el gradiente de pH transmembrana, la disipación del potencial de la membrana citoplasmática y la destrucción de la integridad de la membrana celular (Ibrahim et al., 2021). La consecuencia de estos procesos es la pérdida del contenido celular y finalmente, la muerte celular.

Las bacteriocinas varían en su peso molecular, estructura y actividad; se han clasificado en tres clases: bacteriocinas o lantibióticos de clase I termoestables (nisina, mersacidina, lacticina) que se modifican mucho después de la traducción; bacteriocinas de clase II estables al calor (lactacina F, lactococina G, pediocina PA-1, sakacina A) que no se modifican luego de la traducción; y bacteriocinas de clase III termolábiles (colicinas, megacinas, enterolisina,

helveticina I) (Negash & Tsehai, 2020). El espectro bacteriano de las bacteriocinas son las bacterias Gram-positivas, excepto los de clase III y de la subclase IIa que tienen actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Kumariya et al., 2019). Dado su espectro estrecho a amplio contra el crecimiento bacteriano, se ha propuesto su uso terapéutico como antimicrobianos de próxima generación para controlar la amenaza global de organismos infecciosos resistentes a los medicamentos (Soltani et al., 2020).

- **Peróxido de hidrógeno**

El peróxido de hidrógeno producido por muchas bacterias, incluidas las BAL también se ha asociado al efecto antimicrobiano, aunque se requiere de oxígeno como sustrato esencial para la producción de H₂O₂. Se ha observado que el peróxido de hidrógeno es sintetizado por ocho cepas diferentes de *L. johnsonii* y *L. gasserii* mata la *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* (Pridmore et al., 2008). Su actividad antimicrobiana se basa en su poder oxidante. De esta forma, reacciona con grupos sulfhidrilo, dobles enlaces en proteínas y lípidos afectando por lo tanto la membrana citoplasmática (López et al., 2023).

1.8 Aplicaciones de los posbióticos

Los metabolitos bioactivos a los que se denomina posbióticos son los ácidos orgánicos, ácidos grasos de cadena corta, carbohidratos, péptidos antimicrobianos, enzimas, vitaminas, cofactores, compuestos de señalización inmunitaria y agentes complejos (Moradi et al., 2019). Los productos posbióticos son generalmente más convenientes que los probióticos debido a las ventajas industriales, ya que son estables en un amplio rango de pH y temperatura, a menudo no requieren cadena de frío, mayor vida útil y poca interacción con las matrices alimentarias (Barros et al., 2020). Por tales motivos se puede encontrar un uso notable en el perfil de seguridad alimentaria, por ejemplo, bioconservación, envasado y eliminación de biopelículas (Aggarwal et al., 2022).

La bioconservación ha sido descrita como una alternativa sustentable, segura y ecológica, por lo que ha existido una creciente demanda de estudios que esclarezcan las principales estrategias de aplicación y mecanismos de acción, especialmente para su uso en productos lácteos, cárnicos y productos de origen vegetal para prevenir el deterioro microbiano de los alimentos y mejorar su vida útil (Hernández et al., 2022). Los productos lácteos especialmente pueden beneficiarse de la bioconservación, ya que la viabilidad de las cepas probióticas puede verse afectada por factores extrínsecos o intrínsecos (Aggarwal et al., 2022).

En cuanto a los envases, dado que el deterioro de la mayoría de los alimentos se produce desde el exterior por la acción de microorganismos patógenos, los posbióticos tienen un gran potencial de aplicación en la conservación de alimentos a través de su uso en envases

activos, a modo de recubrimiento formando una fina capa polimérica con posbióticos en la superficie del alimento (Moradi et al., 2020). Esto se ha aplicado en cárnicos utilizando directamente el recubrimiento posbiótico (Aggarwal et al., 2022). Por ejemplo, Yordshasi et al. (2020) prepararon un polvo liofilizado que contenía posbióticos derivados de *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, que se incorporó en nanocelulosa bacteriana para desarrollar un nanopapel antimicrobiano para envolver carne molida.

Los posbióticos también se pueden utilizar como desinfectantes en las industrias alimentarias (Moradi et al., 2020). Su potencial uso se debe a que cada metabolito tiene un mecanismo de acción particular afectando diferentes etapas de la formación de biopelículas bacterianas (Moradi et al., 2020). Se ha demostrado que *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Lactobacillus casei* 431 y *Lactobacillus salivarius* tienen efecto antimicrobiano sobre la biopelícula formada por *L. monocytogenes* en las superficies de poliestireno (Homayouni et al., 2021).

Los posbióticos también muestran un enorme potencial como componentes de alimentos funcionales pues presentan actividad inmunomoduladora, antimicrobiana y anticancerígena. Además, provoca reducción de la inflamación, estrés oxidativo, reducción de la presión arterial, nivel de colesterol y peso corporal (Figura 3) (Aggarwal et al., 2022). Los hallazgos de los nuevos estudios de respuesta biótica de metabolitos o de interacciones entre el huésped y el posbiótico pueden apuntar en un futuro a nuevas aplicaciones en áreas como la farmacéutica y cosmética (Nataraj et al., 2020). En el área clínica los organismos genéticamente modificados son muy prometedores como microorganismos progenitores de posbióticos por lo que tienen potenciales aplicaciones que requieren mayor investigación (Salminen et al., 2021).

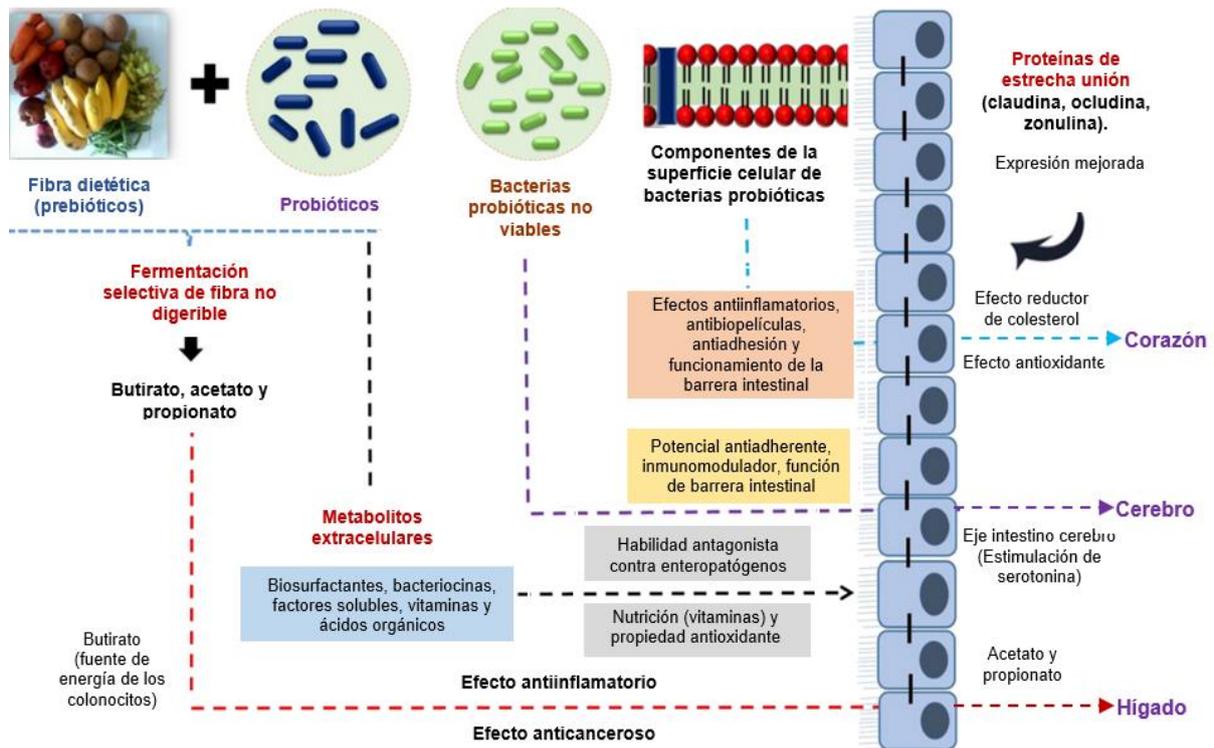


Figura 3. Representación esquemática de varios beneficios para la salud de los posbióticos (Tomado de: Nataraj et al., 2020).

1.9 Contaminación microbiológica del yogurt y actividad antimicrobiana de *Lactobacillus*

La calidad bacteriológica del yogurt está influenciada por la flora inicial de la leche cruda, las condiciones de procesamiento y la contaminación posterior al tratamiento térmico. Debido a condiciones insalubres, existe la posibilidad de contaminación microbiana, que puede tener efectos graves en la salud del consumidor (Ghajarbeygi et al., 2016). La leche cruda como componente principal del yogurt, contiene una gran cantidad de microorganismos que provienen del proceso de ordeño. Estos microorganismos suelen causar deterioro del yogurt y patología a los consumidores, por lo que la pasteurización es la mejor manera de lidiar con este problema. Sin embargo, aunque una adecuada pasteurización elimina a bacterias como *Escherichia coli*, otras como las bacterias psicotrópicas que causan el deterioro de los productos lácteos a través de sus enzimas extracelulares (proteasas y lipasas) pueden resistir la pasteurización. Las especies comunes de bacterias psicotrópicas que se asocian a menudo con la leche cruda son *Bacillus*, *Staphylococcus*, y *Pseudomonas* spp. (Hill & Kethireddipalli, 2013; Jiang, 2022). Luego de la pasteurización, al disminuir la temperatura a 7°C las bacterias psicotrópicas tienden a reproducirse de tal manera que se constituyen como un peligro biológico potencial intrínseco para el yogurt (Jiang, 2022). Por otro lado, el tiempo de fermentación prolongado se ha relacionado con una mayor tasa de contaminación por

microorganismos dañinos como mohos y levaduras (Alline et al., 2018). A pesar de las nuevas tecnologías de fabricación, algunos productos lácteos como el yogurt pueden servir como vehículo de varios patógenos transmitidos por los alimentos (Frazier y Westhoff, 1992).

1.9.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es uno de los patógenos más importante en la leche y sus derivados. Su presencia se debe a un procesamiento, manipulación y envasado poco higiénico (Mohamed & Mazyed, 2015).

La intoxicación alimentaria estafilocócica se caracteriza por dolores abdominales, náuseas, vómitos y diarrea. Las lesiones a las mucosas se presentan a nivel de la parte superior del intestino delgado y del estómago. Estas están asociadas con la presencia de bordes en cepillo rotos y criptas agrandadas en el yeyuno e infiltración de neutrófilos en el epitelio y corion o lámina propia (Ahmad-Mansour et al., 2021). La emesis es inducida por la interacción de las enterotoxinas con los mastocitos en el corion, que provoca la liberación de la 5 hidroxitriptamina (5 HT, precursor de la serotonina) e interactúa con el nervio vago para provocar la respuesta emética. La diarrea es causada por la inhibición de la reabsorción de agua y electrolitos a nivel del intestino delgado (Fisher et al., 2018).

S. aureus es uno de los patógenos más comúnmente transmitido por los alimentos, además el surgimiento de *S. aureus* resistente a la meticilina ha resultado en una extensa búsqueda de métodos de inhibición (Gao et al., 2019). Se ha determinado actividad inhibidora de BAL contra *S. aureus*, donde *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus fermentum* inhiben eficazmente seis cepas de *S. aureus*, incluyendo tres cepas resistentes a la meticilina (Kang et al., 2017).

1.9.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli es otro patógeno transmitido por productos lácteos cuando la materia prima no ha recibido un tratamiento térmico adecuado o ha existido una inadecuada manipulación y condiciones sanitarias deficientes durante la producción. Su presencia es indicativa de una contaminación directa o indirecta de origen fecal (Guillén et al., 2014). Es causante de gastroenteritis aguda, que se caracteriza por presentar un cuadro de menos de dos semanas de evolución de diarrea con un número de deposiciones anormales mayor o igual a 3 en 24 horas, que puede o no ir acompañado de dolor abdominal, fiebre y vómitos (Lucero, Y, 2014). Se han llevado a cabo estudios de inhibición de BAL sobre *E. coli* indicando que los sobrenadantes de tres cepas de *Lactobacillus acidophilus* (KLDS1.0901, KLDS1.0902 y KLDS1.1003) podrían inhibir *E. coli* ATCC 25922 (Du et al., 2016). Otras investigaciones sobre el control de la proliferación de *E. coli* O157:H7 generó conclusiones similares (Gao et al., 2019). También se ha determinado que la combinación de cuatro BAL (*L. acidophilus*,

Lactobacillus rhamnosus, *L. casei* y *Lactobacillus plantarum*) generó un mejor efecto de inhibición ante este patógeno (Wang et al., 2013).

2. Metodología

2.1 Tipo de diseño de investigación

El diseño de investigación fue descriptivo y transversal.

2.2 Muestreo y tamaño de la muestra

Las muestras de yogurt se recolectaron en base a las marcas preferidas de consumo reportados en el estudio de Escandón & Togra, 2017, siendo 4 marcas las cuales se codificó como: TN, NT, AP y PC. De cada marca, se recolectó un producto para el aislamiento y recuento de *Lactobacillus* spp. de cada uno de ellos, mediante un muestreo aleatorio simple obtenido de diferentes establecimientos en la ciudad de Cuenca, Ecuador en el periodo febrero a marzo del 2023. Cada producto seleccionado fue transportado en condiciones de refrigeración de 2 a 8°C hasta el laboratorio de Microbiología de la Universidad de Cuenca.

2.3 Materiales e Insumos

2.3.1 Insumos y reactivos para la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad e identificación de *Lactobacillus* spp.

- Papel aluminio
- Papel film
- Cajas petri
- Cajas bipetri
- Jarras Gaspak: Marca Merck
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Tipos de tapa rosca de 15 ml
- Pipetas volumétricas de 1,5 y 10 ml
- Pera de succión
- Lámpara de alcohol
- Porta y cubre objetos
- Pipeta automática de 1000µL
- Agua destilada
- Caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Marca Merck
- Peptona de carne: Marca Merck
- Agar Bacto Simple: Marca Becton Dickinson
- Tiras reactivas de Oxidasa
- Peróxido de hidrógeno 3%
- Reactivos de la Tinción de Gram: violeta cristal, lugol, alcohol - acetona, safranina

2.3.2 Equipos para la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad e identificación de *Lactobacillus* spp.

- Estufa Fanem Modelo: 002 CB
- Contador de colonias Quebec
- Cocineta eléctrica Mantua Modelo: 110V.2kwts. 84-4-B
- Autoclave Trident Modelo: EA-632
- Balanza electrónica de precisión Mettler Modelo: PC 440
- Refrigeradora Indurama
- Microscopio Olympus Modelo: CX21FS1

2.3.3 Insumos y reactivos para la técnica de microdilución en caldo

- Fundas ziploc
- Lámpara de alcohol
- Recipientes estériles boca ancha de polipropileno
- Tubos Falcon de 15 ml
- Filtro de jeringa de acetato de celulosa estéril de 0,22 μ m
- Pipeta automática de 1000 μ L
- Pipeta automática de 100 μ L
- Pipeta automática de 5-10 μ L
- Pipeta automática de 10 – 100 μ L
- Placas de microtitulación de fondo plano: Marca Corning
- Asa calibrada de 0,01 ml
- Agua destilada estéril y no estéril
- Caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS): Marca Merck
- Agar Mueller Hinton: Marca Merck
- Caldo Mueller Hinton: Marca Merck

2.3.4 Equipos para la técnica de microdilución en caldo

- Estufa Fanem Modelo: 002 CB
- Densitómetro Erba Lachema
- Criopreservador BIOBASE Modelo: BDF – 86V100
- Cabina de seguridad biológica tipo 2 Labcongo Modelo: Clase II Tipo A2
- Cocineta eléctrica Mantua Modelo: 110V.2kwts. 84-4-B
- Autoclave Trident Modelo: EA-632
- Balanza electrónica de precisión Mettler Modelo: PC 440

- Refrigeradora Indurama
- Centrífuga Hettich Modelo: Universal 32R
- Estereomicroscopio Nikon

2.4 Métodos y técnicas de análisis

2.4.1 Recuento en placa por siembra en profundidad de *Lactobacillus* spp.

El método de recuento en placa por siembra en profundidad se utiliza para determinar el número de microorganismos viables anaerobios facultativos o microaerófilos en un medio sólido tras la incubación a una temperatura adecuada. La técnica de siembra en profundidad consiste en mezclar el inóculo con el agar, donde pasado el tiempo de incubación las colonias se desarrollan tanto en la superficie como al interior del agar lo que permite el recuento de UFC/g o ml de la muestra del producto alimentario (Alvarez, A et al., 2017).

Para el recuento de *Lactobacillus* spp. se emplea el agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) que contiene proteosa peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa como fuente nutritiva por su aporte de nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. Para el crecimiento bacteriano tiene monooleato de sorbitán, sales de magnesio, sodio y manganeso. Para la inhibición de bacterias Gram negativas actúa el citrato de amonio y agar base como agente solidificante (Martínez & Zhurbenko, 2018).

- Procedimiento

Para cada una de las muestras obtenidas de las marcas TN, NT, AP y PC se pesó 10 g del producto y se llevó a 90 mL de agua de peptona 0,1% (p/v) homogenizando por 5 minutos y se procedió a realizar diluciones seriadas hasta 10^{-7} en tubos que contenían 9 ml de agua de peptona 0,1%. Se tomó 1ml de cada dilución y se inoculó en el centro de la placa petri. Posteriormente, se añadió el agar MRS y las placas petri fueron incubadas a una temperatura de 37 °C durante 48 horas en atmósfera de dióxido de carbono (CO₂). Este proceso fue realizado por duplicado para los 4 productos de yogures.

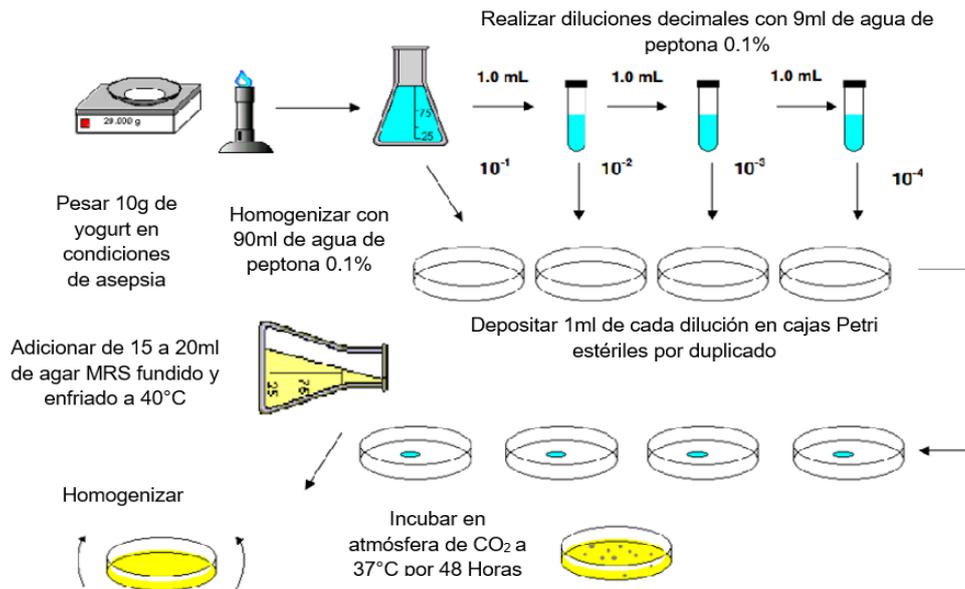


Figura 4. Esquema del proceso de la técnica recuento en placa por siembra en profundidad. Fuente: autoras

2.4.2 Cálculos para la determinación de células viables de *Lactobacillus* spp.

El recuento del número de colonias de *Lactobacillus* spp. se realizó mediante el equipo de contador de colonias y se consideraron las colonias de aspecto circular, convexas o planas, de borde entero con una ligera elevación y de coloración blanquecina desarrolladas en el medio MRS. Para determinar las UFC/g se aplicó la normativa ISO 7889:2003 - IDF 117:2003, donde se eligió las placas que tengan entre 15 y 300 colonias y se aplicó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

En donde:

N= es el valor numérico del número de microorganismos característicos por gramo de muestra de ensayo.

ΣC = suma de las colonias contadas en todas las placas elegidas

n_1 = número de placas de la primera dilución seleccionada

n_2 = número de placas de la segunda dilución seleccionada

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos

2.5 Identificación de *Lactobacillus* spp.

La identificación de *Lactobacillus* spp. consistió en realizar tinción de Gram, prueba de la catalasa y oxidasa de las colonias características del microorganismo que tuvieron crecimiento en el medio MRS, ya que este microorganismo se caracteriza por ser Gram positivo de morfología bacilar, no posee la enzima catalasa ni oxidasa.

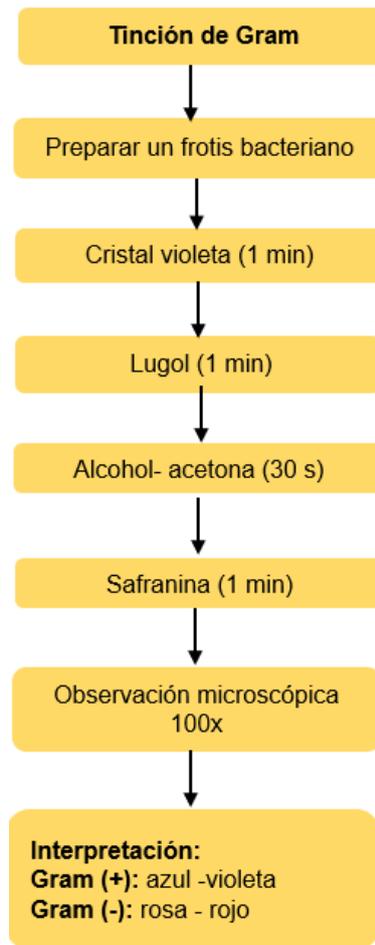


Figura 5. Flujograma de la Tinción de Gram. Fuente: autoras

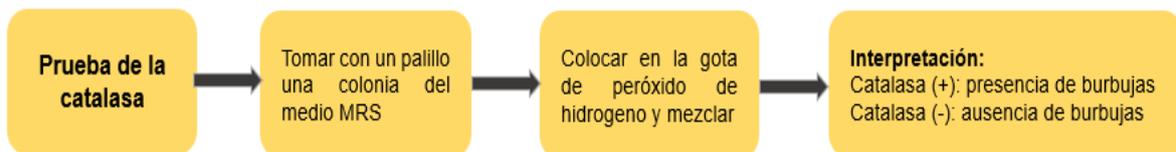


Figura 6. Flujograma de la prueba de la catalasa. Fuente: autoras

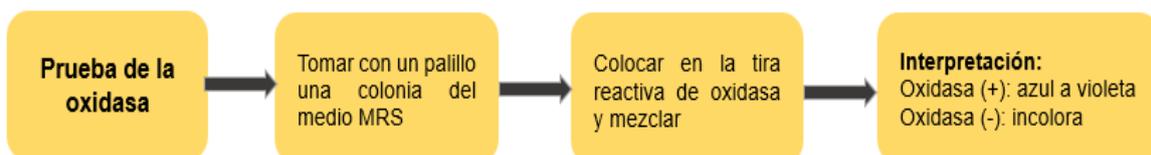


Figura 7. Flujograma de la prueba de la oxidasa. Fuente: autoras

2.6 Método de microdilución en caldo

Este método evalúa el efecto *in vitro* de un agente antimicrobiano mediante la determinación del crecimiento o inhibición del microorganismo de estudio en presencia de concentraciones del antimicrobiano, que se encuentran diluidas de forma seriada en un medio de cultivo. Además, el método permite determinar si hay un efecto bacteriostático (inhibición del

crecimiento) o bactericida (muerte del microorganismo) (Pérez & Rivas, 2021). En este estudio, se consideró que la concentración mínima inhibitoria (CMI), es la concentración más baja del antimicrobiano ensayado que inhibe el crecimiento visible del microorganismo ensayado, mientras que, para la concentración mínima bactericida (CMB) es la menor concentración capaz de matar al 100% de la población bacteriana.

El ensayo de microdilución en caldo se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Danilova et al. (2019) con algunas modificaciones. La metodología se basa en utilizar como agente antimicrobiano el sobrenadante de *Lactobacillus* spp. obtenido de un cultivo en caldo MRS.

2.6.1 Preparación de los sobrenadantes

A partir de las colonias de *Lactobacillus* spp. aisladas en el medio MRS, se tomó entre 4 a 6 colonias y se suspendió en 5 ml de solución salina estéril. La suspensión se ajustó en el densitómetro a una turbidez estándar de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) y se tomó 100 μ L de ella, la cual se inoculó en 15 ml de caldo MRS para ser incubado a 37 °C por 24 horas. Este proceso se llevó a cabo para cada marca de yogurt y se inoculó en 2 tubos de caldo MRS por marca para obtener la cantidad adecuada de sobrenadante requerido para la técnica de microdilución en caldo.

Los cultivos resultantes se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 minutos y se separó el sobrenadante del sedimento. Los sobrenadantes fueron recolectados en recipientes estériles boca ancha de polipropileno y cada uno de ellos fue sometido a filtración esterilizante a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 μ m. Los sobrenadantes estériles se recolectaron en tubos Falcon y se almacenaron a -80°C hasta su uso en el proceso de microdilución en caldo.

2.6.2 Preparación de los microorganismos

Los microorganismos usados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Estos se sembraron en agar Mueller Hinton (MH) mediante la técnica de agotamiento por estría y se incubaron entre 18 a 24 horas a 37 °C.

2.6.3 Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

La preparación se realizó de acuerdo a la guía *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) M07-A9. Se preparó el inóculo suspendiendo las colonias bacterianas individuales precultivadas en agar MH en 5,0 mL de solución salina estéril. La suspensión se ajustó en el densitómetro a una turbidez estándar de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación, se diluyó la suspensión realizada en solución salina estéril para conseguir una concentración de 5×10^5 UFC/mL. Este proceso se llevó a cabo en tres días diferentes. Para cada día, se prepararon 4 tubos de 12 ml del inóculo a una

concentración de 5×10^5 UFC/mL, donde 2 tubos se designaron para la preparación del inóculo de *S. aureus* ATCC 29213 y 2 tubos para el inóculo de *E. coli* ATCC 25922.

Cálculos de la dilución McFarland para la preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Fórmula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$

Datos	Cálculos
<p>V1:</p> <p>C1: $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.</p> <p>V2: 12 mL</p> <p>C2: 5×10^5 UFC/mL</p>	$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$ $V1 = \frac{12\text{mL} \times (5 \times 10^5 \text{ UFC/mL})}{1,5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}}$ <p>V1= 0,04 ml (40 µL)</p>

Donde:

V1: volumen de la solución más concentrada

C1= concentración de la solución más concentrada

V2= volumen de la solución menos concentrada

C2= concentración de la solución menos concentrada

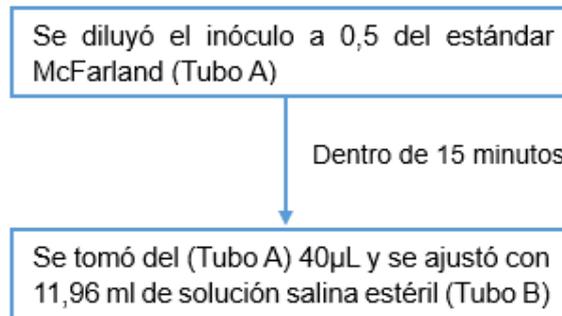


Figura 8. Proceso para la dilución del inóculo. Fuente: autoras

2.6.4 Técnica de microdilución en caldo

Para esta técnica, se inoculó 100 µL de caldo MH en las columnas de la 1 a la 10. El sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* spp. aislado de cada marca se descongeló a temperatura ambiente para inocularlo tomando 100 µL en la columna 1 con la precaución de homogenizarlo adecuadamente. Luego se tomó 100 µL de la columna 1 y se inoculó en la columna 2 y así sucesivamente hasta la columna 10, de forma que se realizaron diluciones seriadas dobles por duplicado de cada marca de yogur (Figura 9). Posteriormente, se inoculó

100 µl del cultivo bacteriano de concentración 5×10^5 UFC/mL, obteniendo un volumen final de 200 µl (columna 1-10).

Para el control positivo se inoculó 100 µL de inóculo bacteriano de *S. aureus* ATCC 29213 o *E. coli* ATCC 25922 según la placa de microdilución correspondiente y se añadió 100 µL de caldo MH en los pocillos de la columna 11. Para el control negativo se inoculó 200 µL de caldo MH en la columna 12 (Figura 10). Una vez inoculado, las placas de microdilución se incubaron a 37 °C por 24 h en aerobiosis. Este proceso se llevó a cabo en tres días diferentes.

Columna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración del sobrenadante de <i>Lactobacillus</i> spp. (%)	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09

Figura 9. Concentraciones del sobrenadante de *Lactobacillus* spp.

Marca		Diluciones seriadas										CP 11	CN 12
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
TN	A	(100 µL de CMH + 100 µL ASL- TN) + 100 µL IB										100 µL IB + 100 µL CMH	200 µL CMH
TN	B												
NT	C	(100 µL de CMH + 100 µL ASL- NT) + 100 µL IB											
NT	D												
AP	E	(100 µL de CMH + 100 µL ASL- AP) + 100 µL IB											
AP	F												
PC	G	(100 µL de CMH + 100 µL ASL- PC) + 100 µL IB											
PC	H												

CP: control positivo, **CN:** control negativo; **CMH:** Caldo Mueller Hinton

IB: Inóculo Bacteriano *S.aureus* ATCC 29213 o *E. coli* ATCC 25922

ASL: alícuota del sobrenadante de *Lactobacillus* spp.

A-H: codificación de la placa de microdilución de 96 pocillos.

Figura 10. Esquema de la placa de microdilución

2.6.5 Determinación de la CMI y CMB

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) se realizó un cultivo en agar MH con un asa calibrada de 0,01 ml de las placas de microdilución de la columna 1 a la 3 o de aquellos pocillos sin aparente crecimiento caracterizados por ausencia de turbidez. Se incubaron a 37 °C por 24 horas en aerobiosis.

Posteriormente, se realizó un recuento de las colonias (n) que se desarrollaron en agar MH ($UFC/mL = n/0.01ml$) para calcular el porcentaje de inhibición, considerando como el 100% el inóculo bacteriano inicial (5×10^5 UFC/mL) de la bacteria patógena correspondiente en relación al recuento obtenido.

2.7 Manejo estadístico de datos

El manejo de datos se basó en estadística descriptiva haciendo uso del programa Microsoft Excel 2022, Windows 10. Según sea pertinente, en cada caso se calculó la media, desviación

estándar y coeficiente de variación para los porcentajes de inhibición en base al crecimiento de *S.aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922. Además, se empleó diagramas de barras para representar las concentraciones mínimas inhibitorias, porcentajes de inhibición de acuerdo a la CMI y concentraciones mínimas bactericidas obtenidas de cada *Lactobacillus* spp. probado de cada marca de yogurt en los tres días que se desarrolló el experimento.

3. Resultados y discusiones

Previo a realizar el recuento y la selección de colonias para su aislamiento se identificó las pertenecientes al género *Lactobacillus*, donde las colonias fueron confirmadas mediante sus características y propiedades como forma de bastón, tinción de Gram positivo, catalasa negativa y oxidasa negativa (Anexo B, C, D y E).

3.1 Recuento en placa de *Lactobacillus* spp. de las marcas de estudio

La cuantificación microbiológica de *Lactobacillus* spp. difiere según la marca comercial. La marca TN presenta una mayor concentración de *Lactobacillus* spp. con 4.85×10^7 UFC/g, seguido de la marca NT con 1.48×10^6 UFC/g, PC con 7×10^5 UFC/g y con una menor concentración está AP con 1.08×10^4 UFC/g (Tabla 2, Figura 11).

Tabla 2. Resultado del recuento de *Lactobacillus* spp. de las marcas de estudio

Dilución	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	Recuento
TN								
Inicial	I	I	I	I	I	47	3	4.85×10^7 UFC/g
Duplicado	I	I	I	I	I	50	4	
NT								
Inicial	I	I	I	123	12	-	-	1.48×10^6 UFC/g
Duplicado	I	I	I	169	18	-	-	
PC								
Inicial	I	I	I	65	5	-	-	7×10^5 UFC/g
Duplicado	I	I	I	75	7	-	-	
AP								
Inicial	I	106	12	-	-	-	-	1.08×10^4 UFC/g
Duplicado	I	110	10	-	-	-	-	

I: Incontable para *Lactobacillus*

-: Negativo para el crecimiento de *Lactobacillus*

Tras obtener los resultados del recuento en placa por siembra en profundidad (Anexo A), se determinó que la marca TN presenta una concentración mayor de *Lactobacillus* (Figura 11) lo cual corresponde a que es la única marca que adiciona dos especies diferentes las cuales se reportan en la etiqueta del producto como *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus* GG, mientras que en las marcas como NT, AP y PC emplean únicamente *Lactobacillus bulgaricus*, por lo que presentaron un recuento inferior. Aunque, para determinar si cumple con el requisito establecido en la NTE INEN 2395: 2011 sobre la cantidad mínima de bacterias probióticas en el yogurt después de la fermentación que corresponde a 10^6

UFC/g se requiere el recuento de otras bacterias ácido lácticas como *S. thermophilus*. La concentración depende también de la proporción de los cultivos iniciadores que las marcas adicionan a su yogurt y el tiempo luego de la fecha de elaboración ya que existe una tendencia a disminuir levemente hasta el final del período de almacenamiento (Othman et al., 2017).

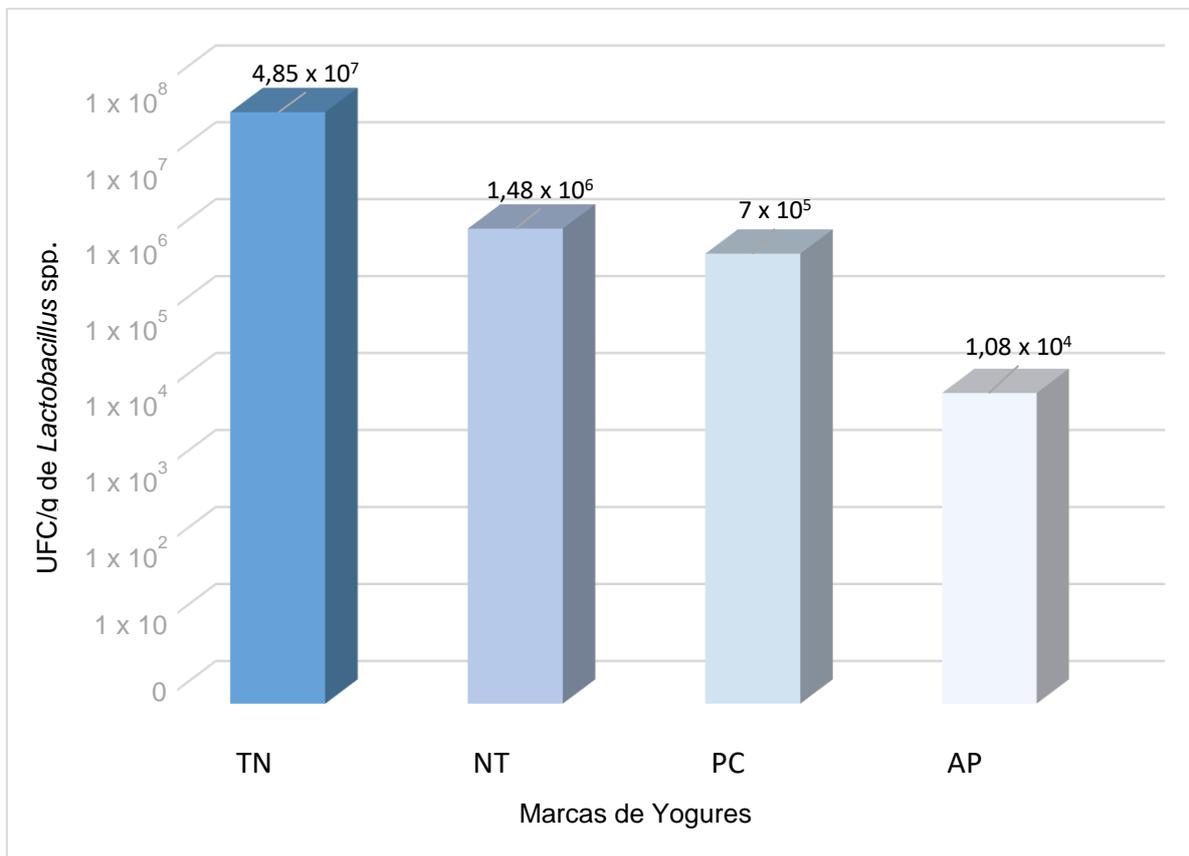


Figura 11. Recuento de *Lactobacillus* spp. de las marcas de estudio

3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida

La determinación de la concentración mínima inhibitoria del preparado posbiótico de las marcas TN, NT, AP y PC se realizó considerando que el contenido de metabolitos varía por el genotipo de cada especie y el nicho de la cepa bacteriana de *Lactobacillus*, por lo que su actividad inhibitoria difiere entre las marcas empleadas para el estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del sobrenadante de las marcas de estudio

<i>S. aureus</i> ATCC 29213						
Sobrenadantes de las marcas de estudio	Día 1		Día 2		Día 3	
	CMB (%)	CMI (%)	CMB (%)	CMI (%)	CMB (%)	CMI (%)
TN	25	12,5	25	12,5	25	12,5
NT	50	25	50	25	50	25
AP	>50	50	>50	50	>50	50
PC	25	12,5	25	12,5	25	12,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922						
TN	25	12,5	25	12,5	25	12,5
NT	25	12,5	25	12,5	25	12,5
AP	50	25	50	25	50	25
PC	25	12,5	25	12,5	25	12,5

Se ha determinado que las cepas de una especie bacteriana específica pueden mostrar un grado notable de diversidad fenotípica y genotípica, lo que les permite adaptarse a una variedad de condiciones como la disponibilidad de nutrientes, actividad antimicrobiana o diversas condiciones de temperatura y pH que se aplican durante la producción (Barraclough et al., 2012; Ceapa et al., 2015). Además, el empleo de diferentes cepas con una diversidad en su capacidad metabólica también refleja las diferencias de características como aroma, sabor y textura de cada marca (Dhaisne et al., 2013).

Muchas de estas moléculas del metabolismo fermentativo están parcial o totalmente caracterizadas (Zhang et al., 2013; Ge et al., 2016), pero se ha asumido que cada cepa de *Lactobacillus* es capaz de producir sus propios posbióticos peculiares (Fuochi et al., 2019). Desde esta perspectiva, los posbióticos preparados a partir de *Lactobacillus* spp. comprenden metabolitos individuales con actividad antagónica diferente sobre los principales patógenos transmitidos por los alimentos (Hernandez & Robles, 2020; Moradi et al., 2021).

De las placas de microdilución se obtuvo la CMI por medio de inspección visual, seleccionando los pocillos caracterizados por la ausencia de turbidez visible (Anexo F - P) y mediante la determinación del porcentaje de inhibición en relación al inóculo bacteriano inicial. De esta manera, se determinó que la concentración mínima inhibitoria del sobrenadante de los *Lactobacillus* spp. se encuentra entre 12.5 - 50% (Figura 12), mientras que la

concentración bactericida varía entre 25% a concentraciones superiores al 50% (Figura 13), dependiendo la marca de yogurt. Las concentraciones inferiores a 12,5 % (6,25 %; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19% y 0,09%) no tienen actividad inhibitoria frente a *S. aureus* ATCC 29213 ni *E. coli* ATCC 25922, ya que los pocillos se visualizaban en el estereomicroscopio muy turbios (+++) por el crecimiento microbiano similar al control positivo.

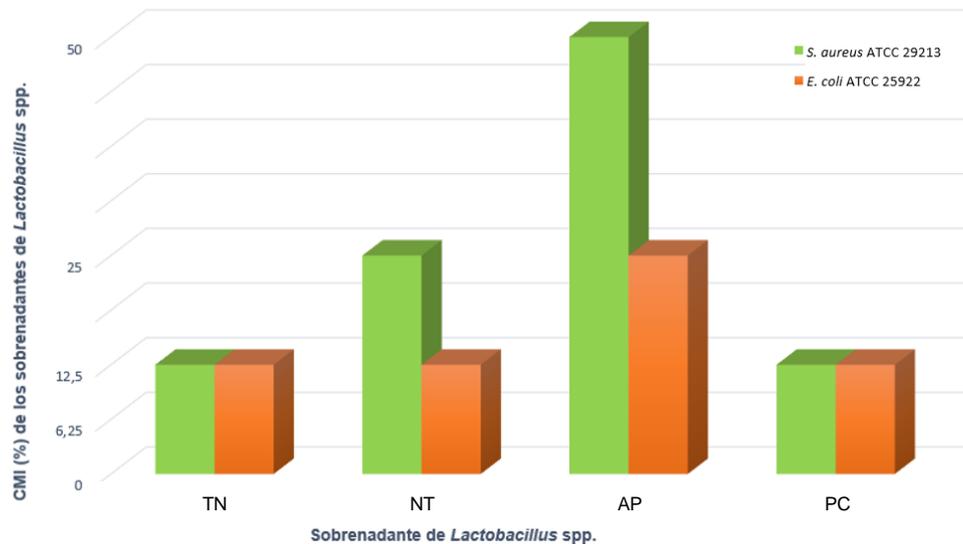


Figura 12. Concentración mínima inhibitoria de los sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. de las marcas de estudio para *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922

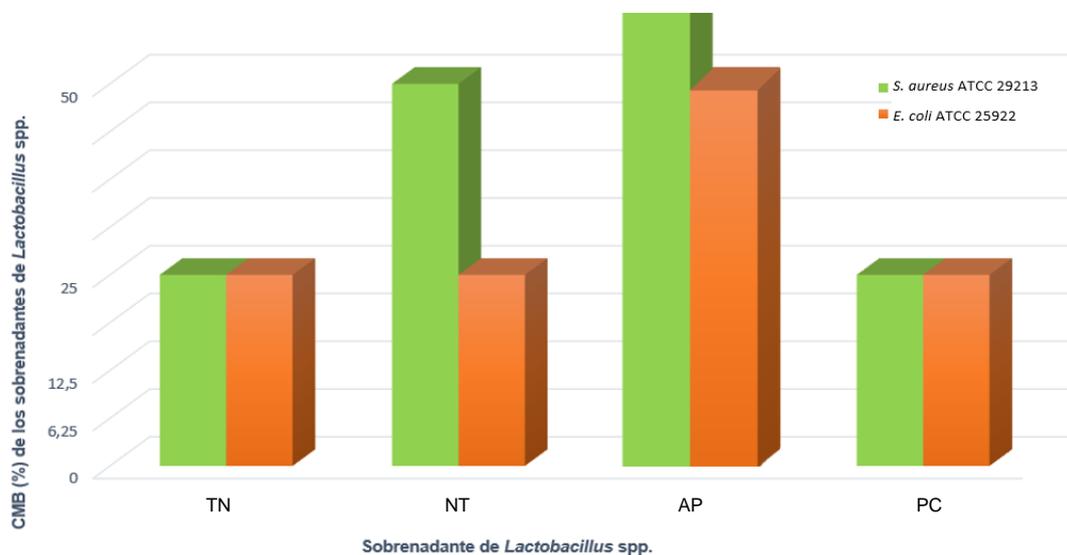


Figura 13. Concentración mínima bactericida de los sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. de las marcas de estudio para *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC 25922

Los sobrenadantes del cultivo de *Lactobacillus* spp. aislados de las 4 marcas TN, NT, AP y PC en concentraciones mayores al 12,5% evidentemente exhibieron actividad inhibitoria y bactericida. La actividad antagónica frente a *S. aureus* ATCC 29213 para el sobrenadante

obtenido de *Lactobacillus* de TN como CMI es al 12,5 % y CMB al 25 %. Para el sobrenadante de *Lactobacillus* de NT la CMI fue al 25% y la CMB al 50%. La CMI para el sobrenadante de AP fue al 50% y la concentración mínima bactericida se deduce que corresponde a concentraciones mayores al 50%, debido a que no se obtuvo el efecto bactericida con las concentraciones probadas. Por último, para el sobrenadante de PC la CMI fue al 12,5% y la CMB al 25% (Figura 12 y 13). Respecto a la actividad de *Lactobacillus* spp. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, la CMI fue del 12,5 % y la CMB del 25% para el sobrenadante libre de células de TN, NT y PC, mientras que para el sobrenadante de AP la CMI fue al 25% y la CMB al 50% (Figura 12 y 13).

La CMI de 12,5% del sobrenadante de TN presentó una inhibición de $98,8 \pm 0,17\%$ para *E. coli* y $99,77 \pm 0,16$ para *S. aureus* (Figura 14, Tabla 4). Mientras que la concentración mínima bactericida fue del 25% tanto para *E. coli* como para *S. aureus*.

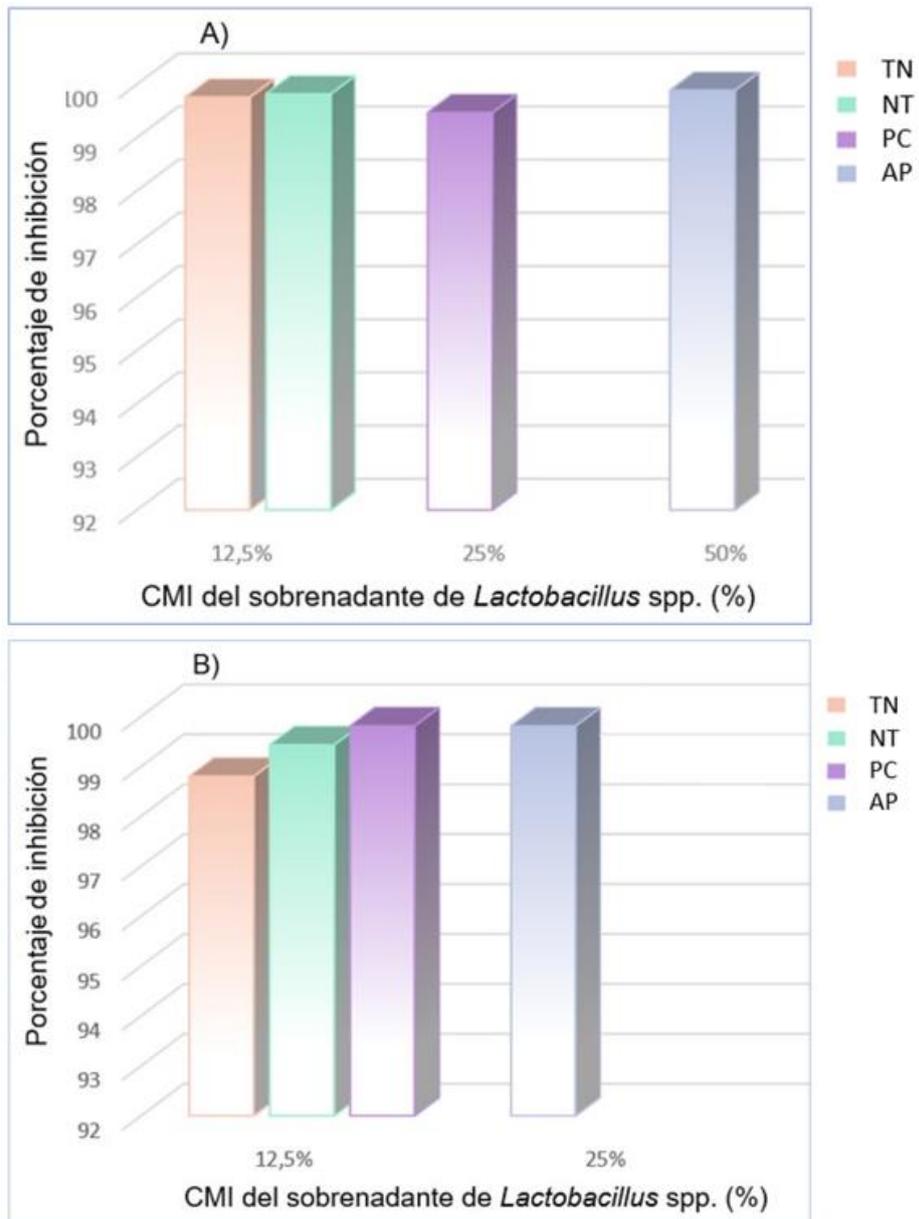


Figura 14. CMI de los sobrenadantes de *Lactobacillus* spp. de las marcas de estudio y porcentaje de inhibición de *S. aureus* ATCC 29213 (A) y *E. coli* ATCC 25922 (B)

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la CMI del sobrenadante libre de células de *Lactobacillus* aislados del yogurt de las marcas de estudio

	TN				NT			
	CMI: 12,5% <i>E. coli</i> ATCC 25922		CMI: 12,5% <i>S. aureus</i> ATCC 29213		CMI: 12,5% <i>E. coli</i> ATCC 25922		CMI: 25% <i>S. aureus</i> ATCC 29213	
	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición
Día 1 \bar{x}	$6,4 \times 10^3$	98,71%	$1,3 \times 10^3$	99,74%	3×10^3	99,40%	$5,8 \times 10^3$	98,83%
Día 2 \bar{x}	$6,2 \times 10^3$	98,76%	2×10^2	99,96%	3×10^3	99,40%	$9,7 \times 10^2$	99,81%
Día 3 \bar{x}	$5,3 \times 10^3$	98,93%	2×10^3	99,60%	$2,3 \times 10^3$	99,53%	1×10^3	99,79%
	\bar{x}	98,8%	\bar{x}	99,77%	\bar{x}	99,44%	\bar{x}	99,47%
	DS	0,17	DS	0,16	DS	0,12	DS	0,49
	CV	0,18%	CV	0,17%	CV	0,12%	CV	0,50%
	AP				PC			
	CMI: 25% <i>E. coli</i> ATCC 25922		CMI: 50% <i>S. aureus</i> ATCC 29213		CMI: 12,5% <i>E. coli</i> ATCC 25922		CMI: 12,5% <i>S. aureus</i> ATCC 29213	
	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición	Concentración (UFC/ml)	Porcentaje de inhibición
Día 1 \bar{x}	$9,5 \times 10^2$	99,81%	6×10^2	99,88%	$6,2 \times 10^2$	99,88%	$8,7 \times 10^2$	99,83%
Día 2 \bar{x}	$4,7 \times 10^2$	99,91%	$4,7 \times 10^2$	99,91%	1×10^3	99,80%	$3,7 \times 10^2$	99,93%
Día 3 \bar{x}	$1,4 \times 10^3$	99,72%	$4,5 \times 10^2$	99,91%	$1,1 \times 10^3$	99,78%	$1,5 \times 10^3$	99,70%
	\bar{x}	99,81%	\bar{x}	99,89%	\bar{x}	99,81%	\bar{x}	99,82%
	DS	0,11	DS	0,05	DS	0,09	DS	0,13
	CV	0,11%	CV	0,05%	CV	0,09%	CV	0,14%

\bar{x} : Media aritmética, DS: Desviación estándar, CV: Coeficiente de variación

El yogurt de la marca TN presentó inhibición con concentraciones más bajas del preparado posbiótico para las dos bacterias patógenas lo cual está asociado al perfil metabólico de cada cepa como *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus rhamnosus* GG pues se ha determinado que la combinación de *Lactobacillus* genera mayor diversidad y concentración de metabolitos antimicrobianos.

Scillato, et al. (2021) determinó que los sobrenadantes libres de células de una combinación de tres especies de *Lactobacillus* presentan mayor efecto antagónico que como entidades únicas contra los aislados clínicos resistentes a múltiples fármacos, incluido *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras (Figura 15).

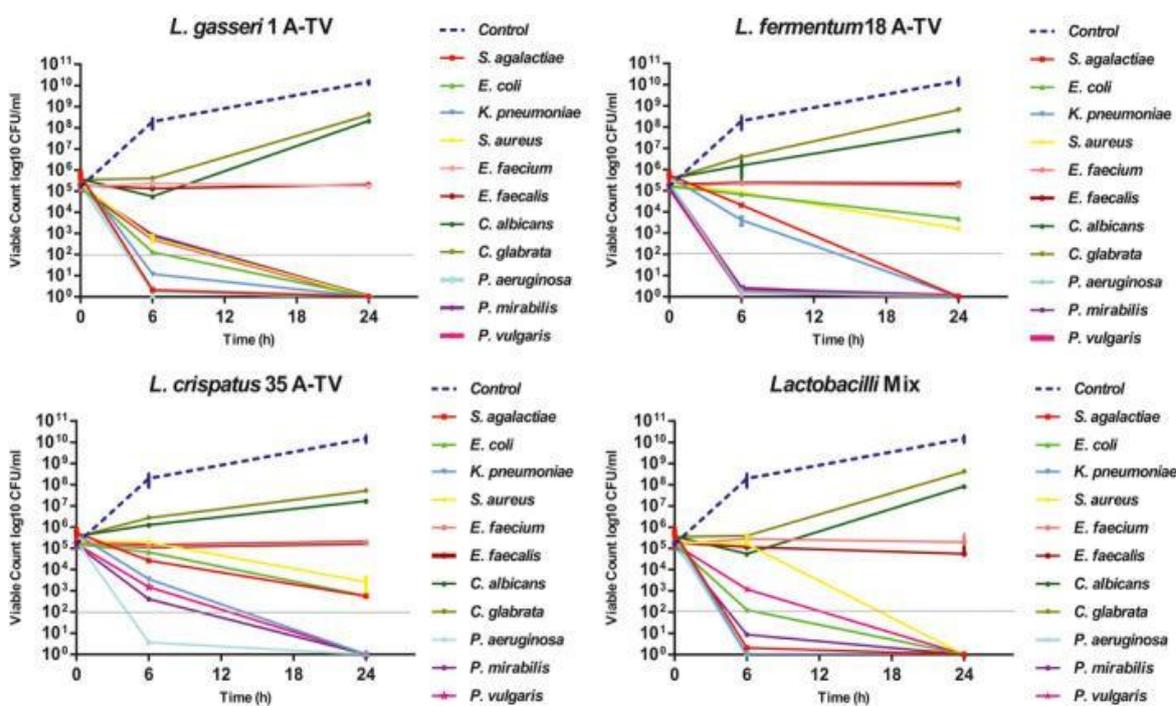


Figura 15. Actividad antimicrobiana *in vitro* de sobrenadantes libres de células (CFS) en cepas patógenas mediante análisis de curvas de tiempo de muerte. La línea de puntos gris indica una disminución de 10^3 UFC/ml frente al número inicial, mientras que la línea de puntos azul indica un crecimiento de control general (Tomado de: Scillato, et al. 2021).

El análisis de la concentración mínima inhibitoria y bactericida del sobrenadante libre de *Lactobacillus* aislados de las marcas NT y AP muestra una concentración más baja para generar efecto antagónico sobre *E. coli* ATCC 25922 en comparación con *S. aureus* ATCC 29213 (Figura 12 y 13); es decir *E. coli* muestra mayor susceptibilidad a la actividad antibacteriana del sobrenadante lo cual podría estar asociado a la presencia de ácidos

orgánicos que se producen durante el crecimiento celular de *Lactobacillus*. Se ha determinado que un cultivo de *Lactobacillus* spp. en caldo MRS de 18 horas de incubación es capaz de producir ácido láctico en concentraciones superiores a 12,4 g/L, además de ácido acético a concentraciones superiores a 2,0 g/L (Poppi et al., 2015). Estos ácidos orgánicos de cadena corta exhiben una alta actividad antimicrobiana debido a la fácil difusión de la forma no disociada a través de las membranas celulares de patógenos (Li et al., 2014). Además, la combinación de los ácidos orgánicos ejerce un importante efecto sinérgico en la inhibición de *Escherichia coli* (Poppi et al., 2015). Para determinar la importancia de los ácidos orgánicos sobre la inhibición de *E. coli* O157:H7 Poppi et al. (2015) probaron el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de varias cepas de *Lactobacillus* en medio MRS con la fracción normalmente ácida y otra neutralizada con bicarbonato de sodio 3 g/L, en el que los resultados sugieren que el ajuste del pH resulta en una significativa pérdida de la actividad antagónica (Figura 16), por otro lado, también se demostró que la combinación de cepas de *Lactobacillus* mostraron mayor actividad inhibitoria hacia *E. coli* O157:H7 que los cultivos individuales independientemente de la presencia o ausencia de bicarbonato de sodio.

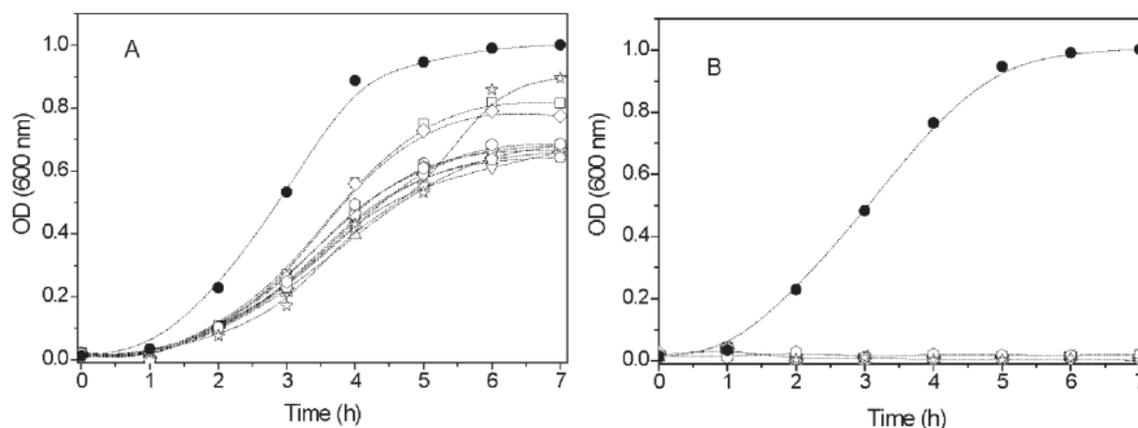


Figura 16. Crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 en medios con la fracción neutralizada de sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus* (A) y la fracción ácida de sobrenadantes (B) de *L. plantarum* 11fb (□), *L. delbruecki subsp. delbruecki* 17bf (○), *L. reuteri* 18fa (△), *L. reuteri* 19fa (▽), *L. plantarum* 22c (<), *L. casei subsp. pseudoplatantum* 30b (▷), *L. casei subsp. pseudoplatantum* 30c (◇) y control (●) (Tomado de: Poppi et al., 2015).

Por otra parte, *S. aureus* requirió una concentración mayor o igual al 25% del sobrenadante de NT y concentraciones mayores al 25% del sobrenadante de AP para presentar inhibición (Figura 12), aunque de igual manera la actividad antibacteriana parece estar condicionada por el pH, ya que los péptidos son más bioactivos entre un pH de 2,0–6,0 pues al tener una carga positiva se unen fácilmente a la membrana de *S. aureus* (Wattanasakphuban et al., 2016). Además, según Yamamoto et al. (2016) los péptidos tienen efectos sinérgicos con los

ácidos orgánicos. Wang et al. (2022) determinó que las sustancias antibacterianas producidas por *Lactobacillus* ocasionan poros de aproximadamente 1,4 a 2,3 nm en la superficie de la membrana celular de *S. aureus*, lo que da como resultado una mayor permeabilidad, fuga de ácido nucleico y proteínas intracelulares, despolarización del potencial de membrana, producción y acumulación masiva de especies reactivas de oxígeno que resultan en daño del ADN y en última instancia, la muerte de la bacteria.

El sobrenadante obtenido de *Lactobacillus* aislado del yogurt NT presentó la concentración mínima inhibitoria en 12,5% para *E. coli* ATCC 25922 generando una inhibición del 99,44% \pm 0,12 y la acción bactericida se estableció en una concentración del 25%, mientras que, para *S. aureus* ATCC 29213 la CMI fue al 25% con una inhibición del 99,47% \pm 0,49 y la CMB del 50% (Tabla 4).

El sobrenadante obtenido de *Lactobacillus* aislado de AP fue el que presentó menos actividad antagónica ya que se requirió mayor concentración para generar inhibición; la CMI fue del 25% para *E. coli* generando una inhibición del 99,81% \pm 0,11 y la acción bactericida se estableció en una concentración del 50%. Para *S. aureus* la CMI fue al 50% con una inhibición del 99,89% \pm 0,05; aunque la concentración bactericida no se detectó en el rango de concentraciones que se emplearon en la microdilución (Tabla 4).

Otro punto a considerar es la actividad inhibitoria del sobrenadante de PC, siendo la CMI de 12,5% con un porcentaje de inhibición 99,81% \pm 0,09 para *E. coli* ATCC 25922 y de 99,82% \pm 0,13 para *S. aureus* ATCC 29213 y la concentración bactericida de 25% (Tabla 4, Figura 14), concentraciones que son relativamente bajas y comparables con el sobrenadante de *Lactobacillus* de TN.

Las concentraciones mínimas inhibitorias para *E. coli* ATCC 25922 varían entre el 12,5% al 25%, mientras que, para *S. aureus* ATCC 29213 el rango de la concentración mínima inhibitoria varía entre el 12,5% al 50% del preparado posbiótico de *Lactobacillus* spp. Estos resultados son similares a los registrados en el ensayo de Arena et., al (2016), mediante el cual a partir de sobrenadantes libres de células de diferentes cepas de *L. plantarum* demostraron una inhibición significativa al usar concentraciones del 25% del sobrenadante sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7 que se redujo alrededor del 70 y 93 %, en comparación con el crecimiento de *S. aureus* que presentó reducciones de hasta el 99%.

Se ha indicado que existe una variabilidad de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las marcas de estudio debido a factores como el propio genotipo, además de la influencia de factores ambientales como el pH, tiempo de incubación o fermentación,

temperatura, matrices alimentarias y la presencia de diversas sustancias que interfieren en la supervivencia de algunas cepas de BAL y su actividad (Zapasnik et al., 2022). Ooi et al., (2021) indican que hay mayor actividad antimicrobiana con medios de crecimiento que contienen glucosa o lactosa como fuente de carbono en comparación con fructosa y sacarosa; observándose también actividad antimicrobiana más alta entre las 24 y las 30 h de incubación cuando se utilizó lactosa o glucosa como fuente de carbono (Figura 17).

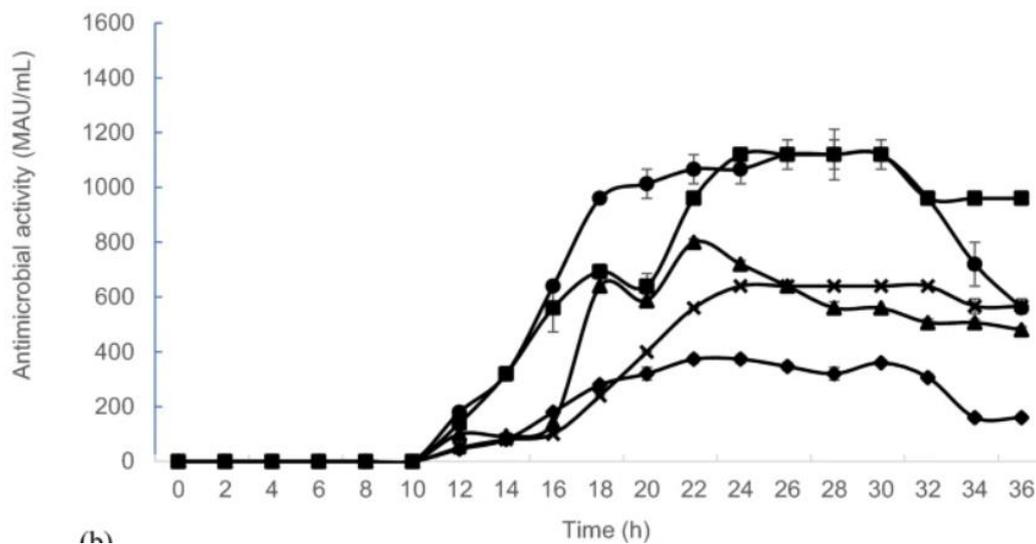


Figura 17. Efectos de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad antimicrobiana de posbiótico: medio de crecimiento que contiene glucosa (●), lactosa (■), fructosa (◆) y sacarosa (▲) (Tomado de: Ooi et al., 2021).

Al establecer una relación de la concentración de posbióticos según el recuento de *Lactobacillus* obtenidos en el yogurt con la concentración de metabolitos en caldo MRS empleado para la preparación del sobrenadante, donde después de la incubación (24 horas) de *Lactobacillus* la concentración fue mayor a 30×10^8 UFC/ml (equivalente a 10 McFarland), lo cual es más de 200 veces mayor al recuento de *Lactobacillus* obtenido de la marca TN e incluso estableciendo una concentración del 12,5% del sobrenadante se requiere aumentar más de 25 veces la concentración de *Lactobacillus* en el yogurt para ejercer un efecto antimicrobiano como el demostrado mediante este estudio. Sin embargo, se consideran otros factores como el tiempo de incubación, combinación con otras bacterias ácido lácticas, la matriz alimentaria y temperatura de almacenamiento que generan una variación en la producción de metabolitos. A pesar de ello, se establece que se requieren mayores concentraciones de *Lactobacillus* para ejercer actividad como bioconservante.

El uso de bacterias ácido lácticas (probióticos) para aumentar la vida útil y prevenir el deterioro microbiano tiene ventajas sobre los aditivos químicos como los sorbatos, pero presenta desafíos para la industria láctea. Un ejemplo en este sentido incluye el mantenimiento de la

viabilidad, puesto que, *Lactobacillus* es sensible a condiciones ambientales adversas por lo que su uso como bioconservante es susceptible a perder su rendimiento con el tiempo de almacenamiento (Homayouni et al., 2021). Otro inconveniente importante es la capacidad de *Lactobacillus* a transmitir genes de resistencia a bacterias patógenas (Mathur & Singh, 2005). Debido al alto costo de mantenimiento de probióticos, problemas de viabilidad y los problemas clínicos que podrían asociarse a los probióticos, el uso de formas no vivas como los posbióticos es una alternativa ideal como bioconservante (Homayouni et al., 2021). Por lo mencionado, existe la necesidad de establecer el método de aplicación más eficaz en el modelo alimentario (Zapasnik et al., 2022).

Puesto que se ha demostrado la eficacia como bioconservante, también es importante destacar los beneficios para la salud del consumidor, un ejemplo en ese sentido se presentó en un estudio donde se estableció que el sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* GG que emplea TN tiene moléculas bioactivas con actividad anticancerígena al sensibilizar las células cancerosas a los fármacos quimioterapéuticos (Salemi, et al., 2023). De esta manera se podría aumentar los beneficios del consumo de yogurt y asegurar la estabilidad microbiológica disminuyendo a la vez la prevalencia de enfermedades transmitidas por alimentos y los costos asociados.

Por otro lado, el uso de *Lactobacillus* spp. como posible bioconservante se ha evidenciado con diversos estudios en diferentes alimentos. Hashemi et al. (2021), investigó los efectos de 4 *Lactobacillus*, siendo *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus* sobre su actividad antioxidante, producción de ácido láctico y actividad antimicrobiana en un postre de yogurt almacenado en frío a 5 °C durante 10 días. De tal manera que, *L. helveticus*, tuvo un mayor efecto en la actividad antioxidante y *L. fermentum* tuvo una mayor concentración de ácido láctico, viabilidad y una mayor acción antibacteriana frente a *E. coli*, *S. aureus*. en comparación con los otros *Lactobacillus*. Otro estudio, evaluó los sobrenadantes del cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa F17 y *Leuconostoc lactis* cepa H52 en uvas, en el cual, un grupo fue tratado con el sobrenadante y el otro no durante 20 días. Se demostró que las dos cepas influyeron en la reducción de bacterias aerobias mesófilas y coliformes, así como en el retraso de la madurez de las uvas, pero *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cepa F17 tuvo mayor actividad (Fang et al., 2020). Además, se ha evidenciado que un cultivo de *Lactobacillus plantarum* en suero de queso fresco hidrolizado permite un mayor crecimiento celular, mayor producción de ácido láctico y una mayor actividad como bioconservante (Da Silva Sabo et al., 2017).

4. Conclusiones

Se demostró la actividad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922, de tal manera que, se asoció a la capacidad de esta bacteria de producir posbióticos, los cuales constituyen el principal mecanismo para ejercer actividad antimicrobiana.

La marca que tuvo un mayor número de *Lactobacillus* spp. viables fue TN con 4.85×10^7 UFC/g, mientras que el menor número fue de la marca AP con 1.08×10^4 UFC/g. De esta manera, la producción de compuestos posbióticos de *Lactobacillus* spp. será mayor para TN dado su número viable en el yogurt.

Lactobacillus spp. presentó actividad inhibitoria de su sobrenadante a concentraciones mayores o iguales al 12,5% y la concentración mínima bactericida es a concentraciones mayores al 25%. Mientras que, concentraciones menores al 12,5% no contrarrestan significativamente bacterias patógenas.

La actividad inhibitoria o bactericida de *Lactobacillus* spp. difiere de acuerdo a la cepa aislada de las 4 marcas de yogures. La actividad que tuvo *Lactobacillus* spp. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para la marca TN y PC como CMI fue al 12,5% y la CMB al 25%. La marca NT la CMI es al 25% y la CMB al 50%. La marca AP tiene una CMI al 50%, y no tiene CMB. Por otro lado, la actividad que tuvo *Lactobacillus* spp. frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 fue como CMI al 12,5 % y la CMB al 25% para la marca TN, NT y PC, mientras que para la marca AP la CMI fue al 25% y la CMB al 50%.

Finalmente, los posbióticos producidos en el yogurt de las diferentes marcas según la concentración obtenida del recuento de *Lactobacillus* no tendrían por si solos una óptima actividad antimicrobiana. Sin embargo, la adición de posbióticos mediante un adecuado diseño de fabricación puede emplearse como bioconservante, pues los metabolitos de los *Lactobacillus* en concentraciones mayores al 12,5% tienen una significativa inhibición de bacterias patógenas.

Recomendaciones

Ampliar el estudio de los posbióticos mediante la identificación y la concentración de los metabolitos presentes en el sobrenadante de *Lactobacillus* spp. en caldo MRS y compararlos con los metabolitos generados en la fermentación para la producción de yogurt.

Determinar la actividad antibacteriana de los posbióticos directamente en el yogurt para determinar su aplicación como bioconservante.

Referencias

- Aggarwal, S., Sabharwal, V., Kaushik, P., Joshi, A., Aayushi, A., & Suri, M. (2022). Postbiotics: From emerging concept to application. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2022.887642>
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J.-P., & Molle, V. (2021). Staphylococcus aureus Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 13(10), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- Alline, A., Luma, R., Bruno, R. et al., (2018). Perfil de fermentación y características del yogurt elaborado a partir de leche de oveja congelada. En t. *Lechería J*; 78 :36–45. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.10.005.
- Alvarez, A., Parra, V, & Ramírez, J. (2017). *Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos*. <https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/17610>
- Anand, S & Sati, S. (2013, julio 1). ARTIFICIAL PRESERVATIVES AND THEIR HARMFUL EFFECTS: LOOKING TOWARD NATURE FOR SAFER ALTERNATIVES | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH. 2013, 4(7), 2496-2501.
- Andersen, F. (2001). Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate. *Intl J Toxicol* 20(Suppl. 3):23–50
- Arena, M., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 7, 464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>
- Barracough, T., Balbi, K., Ellis, R. (2012). Conceptos en evolución de las especies bacterianas. *Evol Biol* 39 :148–157. doi: 10.1007/s11692-012-9181-8.
- Barros, C., Guimaraes, J., Esmerino, E., Duarte, M., Silva, M., Silva, R., et al. (2020). Paraprobióticos y posbióticos: conceptos y aplicaciones potenciales en productos lácteos. *actual Opinión Ciencia de los alimentos* 32, 1–8. 10.1016/j.cofs.2019.12.003

- Bourrie, B., Willing, B., Cotter, P. (2016). La microbiota y las características promotoras de la salud del kéfir de bebida fermentada . *Frente. microbiol* _ 7 :647. 10.3389/fmicb.2016.00647
- Braun, K., Hanewald, A., & Vilgis, T. A. (2019). Milk Emulsions: Structure and Stability. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(10), 483.
- C.G., De, I. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and Bifidobacterium
- Cameotra, S. y Makkar, R. (2010). Biorremediación mejorada con biosurfactantes de contaminantes hidrofóbicos. *aplicación pura química* 82, 97–116. doi: 10.1351/PAC-CON-09-02-10
- Carroll, K, Detrick, B, Hobden, J, McKerrow, J, Mietzner, T, Miller, S, Mitchell, T, Morse, S, & Sakanari, J. (2016). Microbiología Médica (27.a ed.). McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V. <https://bibliotecaia.ism.edu.ec/Repos-book/m/MicrobiologiaMedica.pdf>
- Ceapa, C., Lambert, J., van Limpt, K., Wels, M., Smokvina, T., Knol, J., & Kleerebezem, M. (2015). Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Signatures Determined by Phenotype Profiling. *Applied and environmental microbiology*, 81(16), 5458–5470. <https://doi.org/10.1128/AEM.00851-15>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. 61(1), 28-40.
- Chandan, R. (2006). Chapter 1 History and consumption trends. In: Chandan R.C., editor. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Blackwell Publishing; Ames, IA, USA; pp. 3–17.
- Cheng, H. (2010). Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(10), 938-950. <https://doi.org/10.1080/10408390903044081>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Codex Alimentarius. (2003). NORMA PARA LECHEs FERMENTADAS CXS 243. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243s.pdf

- Cuevas, P., Liceaga, A., Aguilar, J. (2020). Posbióticos y paraprobióticos: de los conceptos a las aplicaciones. *Alimentos Res Int.* 136 :109502. [10.1016/j.foodres.2020.109502](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109502)
- Da Silva Sabo, S., Pérez-Rodríguez, N., Domínguez, J. M., & De Souza Oliveira, R. P. (2017). Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. *Food Research International*, 99, 762-769. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.05.026>
- Dan, T., Hu, H., Tian, J., He, B., Tai, J., He, Y. (2023). Influence of Different Ratios of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on Fermentation Characteristics of Yogurt. *Molecules*; 28(5):2123. doi: 10.3390/molecules28052123. PMID: 36903370; PMCID: PMC10004190.
- Danilova, T. A., Adzhieva, A. A., Danilina, G. A., Polyakov, N. B., Soloviev, A. I., & Zhukhovitsky, V. G. (2019). Antimicrobial Activity of Supernatant of *Lactobacillus plantarum* against Pathogenic Microorganisms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 167(6), 751-754. <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04615-9>
- Dehghan, P., Mohammadi, A., Mohammadzadeh-Aghdash, H., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.012>
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G. y Le Blay, G. (2013). Evaluación de cepas de lactobacilos como cultivos bioprotectores de yogur. *Control de Alimentos*, 30(1), 206–213.
- Deshpande, H., y Kulkarni, A. (2019). Estandarización del proceso y evaluación de la calidad del yogurt fortificado con jugo de noni. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 8(10):179186. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.810.018>
- Dhaisne, A., Guellerin, M., Laroute, V., Laguerre, S., Cocaïgn-Bousquet, M., Le Bourgeois, P., Loubiere, P. (2013). Análisis genotípico y fenotípico de la biodiversidad láctea de *Lactococcus lactis* en la leche: compuestos orgánicos volátiles como marcadores discriminatorios. *Appl Environ Microbiol* 79 :4643–4652. doi: 10.1128/AEM.01018-13.
- di Caracalla (1997). VDT Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento.

- Du, J., Xu, M., Li, B., Ding, X. & Huo, G. (2016). Preliminary screening of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* and the research of probiotic potential for the screening
- Eman, M., Ebtessam, M. (2015). Incidence of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins in yoghurt. *Benha Veterinary Medical Journal*, Vol. 28, No. 2:107-114
- Escobar, A. (2019). Desarrollo de una bebida a base de harina de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y salvado de arroz (*Oryza sativa*) con fermentación sólida y sumergida (Vol. 8, Issue 2)
- Fang, X., Duan, Q., Wang, Z., Li, F., Du, J., Ke, W., Liu, D., Beier, R. C., Guo, X., & Zhang, Y. (2020). Products of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* Strain F17 and *Leuconostoc lactis* Strain H52 Are Biopreservatives for Improving Postharvest Quality of 'Red Globe' Grapes. *Microorganisms*, 8(5), 656. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050656>
- Fisher, E. L., Otto, M., & Cheung, G. Y. C. (2018). Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Frontiers in Microbiology*, 9, 436. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00436>
- Fox, P. (2011). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2nd ed. Elsevier Ltd., Academic Press; London, UK: Fat globules in milk; pp. 1564–1548.
- Fuochi, V., Coniglio, M. A., Laghi, L., Rescifina, A., Caruso, M., Stivala, A., & Furneri, P. (2019). Metabolic Characterization of Supernatants Produced by *Lactobacillus* spp. With in vitro Anti-Legionella Activity. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01403
- Galvez, A., Lopez, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Revisión crítica en biotecnología*. 2008; 28(2):125–152. doi: 10.1080/07388550802107202.
- Gao, Z., Daliri, E., Wang, J., Liu, D., Chen, S., Ye, X. Y Ding, T. (2019). Efecto inhibitorio de las bacterias del ácido láctico sobre los patógenos transmitidos por los alimentos: una revisión. *Revista de Protección Alimentaria*, 82(3), 441–453. doi:10.4315/0362-028x.jfp-18-303
- Gasmala, M., Teesema, H., Salaheldin, A., Kamal-Alahmad, H., Aboshora, W. (2017). Health Benefits of Milk and Functional Dairy Products. *MOJ Food Process. Technol*; 4:00099

- Ge, J., Sun, Y., Xin, X., Wang, Y. y Ping, W. (2016). Purificación y caracterización parcial de una nueva bacteriocina sintetizada por *Lactobacillus paracasei* HD1-7 aislada del jugo de chucrut chino. *ciencia Rep.* 6:19366. doi: 10.1038/srep19366
- Ghajarbeygi, P., Palizbán, M., Mahmoudi, R., Sadeghi N., Soltani, A. (2016). Calidad higiénica del yogurt tradicional e industrial producido en la provincia iraní de Qazvin. *Archivos de Ciencias de la Higiene.*6:39–43.
- Grabek-Lejko, D., Kluz, M. (2017). Bakterie fermentacji mlekowej i ich metabolity–możliwość zastosowania w biokonserwacji ryb i owoców morza. *Nauka. Przyroda. Technol*;11:207–221.
- Grace, D., Wu, F. & Havelaar, A. H. (2020). MILK Symposium review: Foodborne diseases from milk and milk products in developing countries-Review of causes and health and economic implications. *Journal of dairy science*, 103(11), 9715–9729. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18323>
- Gueimonde, M., Delgado, S., Mayo, B., RuasMadiedo, P., Margolles, A., Reyes-Gavilan,
- Guillén, L., Millán, B., & Araque, M. (2014). Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio*, 18(3), 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>
- Guo, H., Chen, D., Chen, X., Huang, Y., Gu, R. (2017). Efectos inhibitorios de bacterias de ácido láctico simples y mixtas sobre patógenos intestinales. *Ciencia de la comida Technol*, 42, pp. 26 – 30
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., Dary-Mouro, A. (2014). Estrategias de producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de leche para funcionalizar productos lácteos fermentados. *Alimentos Res. Int.* 63, 71–80. [10.1016/j.foodres.2014.06.002](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.002)
- Hashemi, S. M. B., Gholamhosseinpour, A., & Abedi, E. (2021). Biopreservative potential of *Lactobacillus* strains in yoghurt dessert. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 1634-1643. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00755-z>
- Hernández, A., Rodríguez, A., Córdoba, M., Martín, A., Ruiz-Moyano, S. (2022). Fungal Control in Foods through Biopreservation. *Curr. Opin. Food Sci*; 47:100904. doi: 10.1016/j.cofs.2022.100904

- Hernández, G. (2005). Alimentos funcionales. Tratado de Nutrición. Tomo II. Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos. Madrid: Acción Médica. Pp. 543-70
- Hernandez, M., Robles, E. (2020). Postbiotics in human health: possible new functional ingredients? *Food Res. Int.* 137 (2020) 109660, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109660>.
- Hill, A., Kethireddipalli, P. (2013). Dairy Products: Cheese and Yogurt. *Biochemistry of Foods*, 3: 319-362.
- Homayouni, A., Aghebati-Maleki, L., Kafil, H., Gilani, N., Abbasi, A., & Khani, N. (2021). Postbiotics, as Dynamic Biomolecules, and Their Promising Role in Promoting Food Safety. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11, 14529-14544. <https://doi.org/10.33263/BRIAC116.1452914544>
- Homayouni, R., Samadi, K., Fathi Zavoshti H., Shahbazi, N., Abbasi, A. (2020). Therapeutically Effects of Functional Postbiotic Foods. *Clinical Excellence*: 10, 33-52, <http://ce.mazums.ac.ir/article-1-532-en.html>.
- Hu, Y., Liu, X., Shan, C., et al. (2017). Nueva bacteriocina producida por *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 de una carne fermentada tradicional china Nanx Wudl: Purificación, identificación y características antimicrobianas. *Control de alimentos*; 77:290–297. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.007.
- Ibrahim, S. A., Ayivi, R. D., Zimmerman, T., Siddiqui, S. A., Altemimi, A. B., Fidan, H., Esatbeyoglu, T., & Bakhshayesh, R. V. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(12), 3131. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- Jiang, Y. (2022). The Health Effects of Yogurt and Its Safety Hazards. Department of Food, NTtion, Bioprocessing Science, North Carolina State University, Raleigh, Vol. 19
- Jones, M., MarTN, C. y Prakash, S. (2012). Reducción del colesterol e inhibición de la absorción de esteroides por *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: un ensayo controlado aleatorio. *EUR. J. Clin. Nutrición* 66, 1234–1241. doi: 10.1038/ejcn.2012.126
- Kalhor, M., Anal, A., Kalhor, D., Hussain, T., Murtaza, G. y Mangi, M. H. (2023). Actividades antimicrobianas y potencial de biopreservación de bacterias del ácido láctico (LAB) a partir de leche cruda de búfalo (*Bubalus bubalis*). *Medicina oxidativa y longevidad celular*, 8475995. <https://doi.org/10.1155/2023/8475995>

- Kang, M., et al., (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 75:1–10
- Kao, C., & Frazier, W. (1966). Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 14:251–255.
- Kristo, E., Biliaderis, C., Tzanetakis, N. (2003). Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chem*; 83:437–446.
- Kumariya, R., Garsa, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., Patel, S. (2019). Bacteriocinas: clasificación, síntesis, mecanismo de acción y desarrollo de resistencia en bacterias causantes de deterioro de alimentos. *Patogénesis microbiana*; 128:171–177. doi: 10.1016/j.micpath.2019.01.002.
- Le Roy, C., Kurilshikov, A., Leeming, E., Visconti, A., Bowyer., Menni, C., Falchi, M., Koutnikova, H., Veiga, P., Zhernakova, A., Derrien, M., & Spector, T. (2022). Yoghurt consumption is associated with changes in the composition of the human gut microbiome and metabolome. *BMC microbiology*, 22(1), 39.
- Li, S., Gao, M., Cui, C., Liu, C., Mou, H., Zhao, X., Wang, Z. (2014). Efectos de la irradiación sobre la actividad antimicrobiana de los conservantes de ácidos orgánicos débiles. *Food Sci* , 35, págs. 58 – 62
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655-683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
- Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J., Faulks, R. y Wickham, M. (2011). Supervivencia de los lactobacilos probióticos en el tracto gastrointestinal superior utilizando un modelo de digestión gástrica *in vitro*. *Microbiología de alimentos*, 28(7), 1359–1366. doi:10.1016/j.fm.2011.06.007
- Lobato, C., Ramírez, C., Vernon, E., & Alvarez, J. (2014). Impact of native and chemically modified starches addition as fat replacers in the viscoelasticity of reduced-fat stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*, 131, 110–115. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.01.019
- López, Y. L. P., Torres-Rosas, R., & Argueta-Figueroa, L. (2023). Mecanismos de acción de los probióticos en la inhibición de microorganismos cariogénicos. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 34(3), 216-223. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2023.03.010>

- Loyola, M. (2021). Evaluación del efecto del benzoato de sodio y sorbato de potasio sobre el crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* del yogur. Quito: UCE
- Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Viabilidad probiótica y estabilidad al almacenamiento de yogures y leches fermentadas preparados con varias mezclas de bacterias ácido lácticas. *Revista de ciencia láctea*, 97(5), 2578–2590. doi:10.3168/jds.2013-7551
- Martínez, C. R., & Zhurbenko, R. (2018). MANUAL DE MEDIOS DE CULTIVO 2018. <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>
- Martínez, N., & Fernández, M. (2013). Los Aditivos. In Escuela de Ingeniería en Construcción - Universidad Central de Venezuela
- Mathur, S., Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*: 105, 281-295, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>.
- Melo, E. S. D., Amorim, W. R. D., Pinheiro, R. E. E., Corrêa, P. G. D. N., Carvalho, S. M. R. D., Santos, A. R. S. S., Barros, D. D. S., Oliveira, E. T. A. C., Mendes, C. A., & Sousa, F. V. D. (2018). Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. *Pubvet*, 12(10), 1-9. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n10a191.1-9>
- Mohamed, E., & Mazyed, E. (2015). Incidence of Staphylococcus aureus and its enterotoxins in yoghurt. *Benha Veterinary Medical Journal*, 28(2), 107-114. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2015.31875>
- Moradi, M., Kousheh, S., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J., Yilmaz, N., et al. (2020). Posbióticos producidos por bacterias del ácido láctico: la próxima frontera en seguridad alimentaria. *compr. Rev. ciencia de los alimentos. Seguridad alimenticia*. 19, 3390–3415. doi: 10.1111/1541-4337.12613
- Moradi, M., Molaei, R., & Guimarães, J. (2021). A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. *Enzyme and microbial technology*, 143, 109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>
- Morales-Nolasco, E., Adriano-Anaya, L., Gálvez-López, D., Rosas-Quijano, R., & Vázquez-Ovando, A. (2019). Características fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas de queso crema elaborado con adición de bacterias ácido lácticas como cultivo

- iniciador//Physicochemical, sensory, and microbiological characteristics of 'queso crema' cheese made with lactic acid bacteria as a starter culture. *Biotechnia*, 22(1), 93-101. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v22i1.1129>
- Muncan, J., Tei, K., & Tsenkova, R. (2020). Real-Time Monitoring of Yogurt Fermentation Process by Aquaphotomics Near-Infrared Spectroscopy. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(1), 177. <https://doi.org/10.3390/s21010177>
- Nair, B. (2001). Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate. *Intl J Toxicol* 20(Suppl. 3):23–50.
- Nataraj, B., Ali, S., Behare, P. et al. (2020). Postbióticos-parabióticos: los nuevos horizontes en bioterapia microbiana y alimentos funcionales. *Microb Cell Fact* 19, 168 <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01426-w>
- Nayyeri, N., Edalatian, Dovom, M., Habibi, M. Bahreini, M. (2017). Un estudio preliminar sobre la actividad antifúngica de bacterias lácticas aisladas de diferentes etapas de producción de queso Lighvan en *Penicillium expansum* y *Rhodotorula mucilaginosa*. *Revista de Medición y Caracterización de Alimentos*; 11(4):1734–1744. DOI: 10.1007/S11694-017-9554-X.
- Nishimura, J. (2014). Los exopolisacáridos producidos a partir de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Adv. Microbiol.* 4, 1017–1023. doi: 10.4236/objetivo.2014.414112
- Ooi, M., Foo, H., Loh, T., et al. (2021). A refined medium to enhance the antimicrobial activity of postbiotic produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RS5. *Sci Rep* 11, 7617. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87081-6>
- Othman, H., Elbaba, A., Abdelsamei, H., Abdou, A. e Ibrahim, E. (2017). Evaluación del efecto del cultivo probiótico de *Lactobacillus acidophilus* sobre *Staphylococcus aureus* durante la producción y almacenamiento de yogurt acidophilus. *Revista médica veterinaria de Benha* , 32 (1), 127-131. doi: 10.21608/bvmj.2017.31197
- Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos | *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8(1), 93-105.
- Patel, S. y Goyal, A. (2012). Las tendencias actuales y las perspectivas futuras de la investigación de los prebióticos: una revisión. *3 Biotecnología* . 2, 115–125. doi: 10.1007/s13205-012-0044-x

- Pérez, E., & Rivas, A. (2021). *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos.*
- Pescuma, M., Hébert, E., Haertlé, T., Chobert, J., Mozzi, F., Font de Valdez, G. (2015). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 454 escinde péptidos alergénicos de β -lactoglobulina. *Química alimentaria* 170 407–414. [10.1016/j.foodchem.2014.08.086](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.086)
- Piper, J. D., & Piper, P. W. (2017). Benzoate and Sorbate Salts: A Systematic Review of the Potential Hazards of These Invaluable Preservatives and the Expanding Spectrum of Clinical Uses for Sodium Benzoate: Hazards and clinical uses of benzoate... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 868-880. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12284>
- Poppi, L., Rivaldi, J., Coutinho, T., Astolfi-Ferreira, C., Ferreira, A., & Mancilha, I. (2015). Effect of *Lactobacillus* spp. isolates supernatant on Escherichia coli O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(4), 353–359. doi:10.1590/s0100-736x201500040000
- Quispe, J., Saldaña, J., Verde, T., & Valderrama, S. (2010). Effect of Potassium Sorbate at different concentrations and exposure. *Revista Del Encuentro Científico Internacional*, 71–78. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mca/garcia_g_rm/capitulo2.pdf
- Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. 7.
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., & Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in microbiology*, 9, 2354. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>
- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M., & Estrada-García, T. (2019). Escherichia coli enterotoxigénica y enteroagregativa: Prevalencia, patogénesis y modelos muridos. *Gaceta Médica de México*, 155(4), 1851. <https://doi.org/10.24875/GMM.19004716>
- Robinson, R. (2014). *Enciclopedia de microbiología de los alimentos*. Prensa académica Segunda edición: Pp. 76–81

- Salemi, R., Vivarelli, S., Ricci, D. et al. (2023). *Lactobacillus rhamnosus* Sobrenadante libre de células GG como un nuevo adyuvante contra el cáncer. *J Transl Med* 21, 195 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04036-3>
- Sanam, M., Detha, A. & Rohi, N. (2022). Detection of antibacterial activity of lactic acid bacteria, isolated from Sumba mare's milk, against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 9(1), 53–58. <https://doi.org/10.5455/javar.2022.i568>
- Sar, T., Harirchi, S., Ramezani, M., Bulkan, G., Akbas, M. Y., Pandey, A., & Taherzadeh, M. J. (2022). Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review. *Science of The Total Environment*, 810, 152253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152253>
- Satpute, S., Kulkarni, G., Banpurkar, A., Banat, I., Mone, N., Patil, R., et al. (2016). Biosurfactante/s de especies de Lactobacilli: propiedades, desafíos y posibles aplicaciones biomédicas. *J. Microbiol básico*. 56, 1140–1158. doi: 10.1002/jobm.201600143
- Scillato, M., Spitale, A., Mongelli, G., Privitera, G., Mangano, K., Cianci, A., Stefani, S., & Santagati, M. (2021). Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *MicrobiologyOpen*, 10(2), e1173. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>
- Sfakianakis, P., & Tzia, C. (2014). Conventional and Innovative Processing of Milk for Yogurt Manufacture; Development of Texture and Flavor: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 3(1), 176–193. <https://doi.org/10.3390/foods3010176>
- Shaker R.R., Jumah R.Y., Abu-Jdayil B. Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: Impact of fat content and preheat treatment of milk. *J. Food Eng.* 2000;44:175–180. doi: 10.1016/S0260-8774(00)00022-4. [CrossRef] [Google Scholar]
- Śmiechowska, M., Jakubowski, M., Dmowski, P. (2018). Nowe trendy na rynku niskoalkoholowych napojów fermentowanych. *Kosmos. Probl. Nauk. Biologicznych*;67:575–582. doi: 10.36921/kos.2018_2443.
- Soltani, S., Hammami, R., Cotter, PD, Rebuffat, S., Said, LB, Gaudreau, H., et al. (2020). Bacteriocinas como nueva generación de antimicrobianos: aspectos de toxicidad y normativa. *FEMS Microbiol. Rev.* 45. doi: 10.1093/femsre/fuaa039

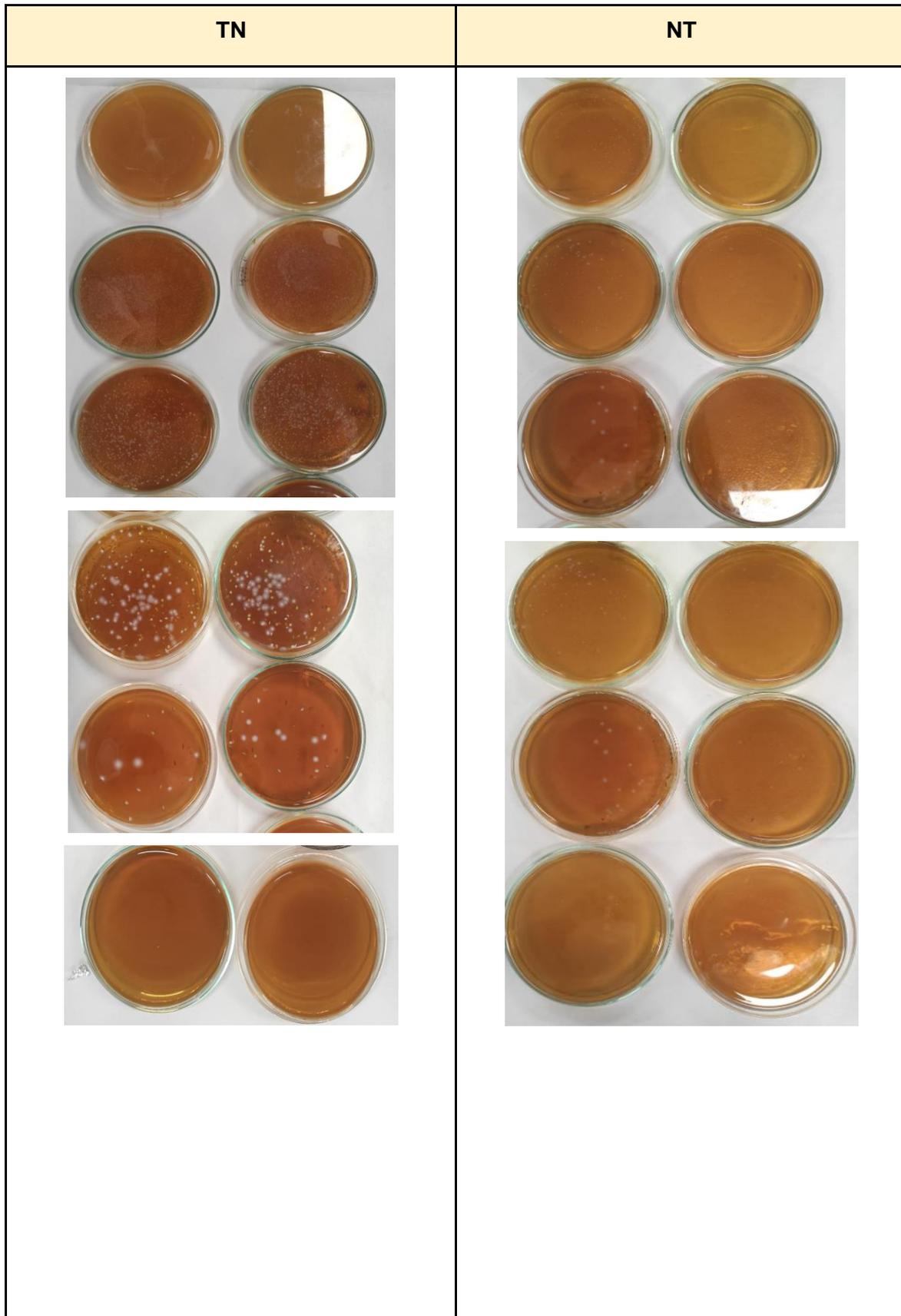
- Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R., Tzia, C. (2007). Industrial yogurt manufacture: Monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *J. Dairy Sci*; 90:2641–2654. doi: 10.3168/jds.2006-802.
- Tamime, A., Robisons, R., (2007). *Yogurt: Science and Technology*. 3rd ed. Woodhead Publishing LTD; Cambridge, UK. Chapter 2 Background to manufacturing practice; pp. 11–118.
- Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., Gao, C., Olsen, R. E., Ran, C., & Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 570344. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.570344>
- Thorakkattu, P., Khanashyam, A., Shah, K., Babu, K., Mundanat, A., Deliephan, A., Deokar, G., Santivarangkna, C., Nirmal, N. (2022). Postbióticos: tendencias actuales en la industria alimentaria y farmacéutica; 11(19):3094. <https://doi.org/10.3390/foods11193094>
- Tojo, R., Leis, R., Barros, J., & Prado, M. (2006). Productos lácteos fermentados. *Anales de Pediatría*, 04, 54-66.
- Tsilingiri, K., Rescigno, M. (2013). Postbióticos: ¿qué más? Beneficiar a los microbios. 4 :101–7. 10.3920/BM2012.0046
- Vedamuthu, E. (2006). Chapter 6 Starter cultures for yogurt and fermented milks. In: Chandan R.C., editor. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Blackwell Publishing; Ames, IA, USA: Pp. 89–117.
- Walstra, P., Wouters, J., Geurts, T. (2006). *Dairy Science and Technology*. Taylor & Francis Group, LLC; Boca Raton, FL, USA. Chapter 22 Fermented milks; pp. 551–573.
- Wang, F., Zhang, J. & Ning, X. (2013). Antibacterial effect of compound *Lactobacillus* on *E. coli* O157:H7. *Sci. Technol. Food Ind.* 34:83–86.
- Wang, G., y Hong, Z. (2022). "Efecto antibacteriano del sobrenadante sin células de *Lactobacillus pentosus* L-36 contra *Staphylococcus aureus* de mastitis bovina" *Molecules* 27, no. 21: 7627. <https://doi.org/10.3390/molecules27217627>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.612285>

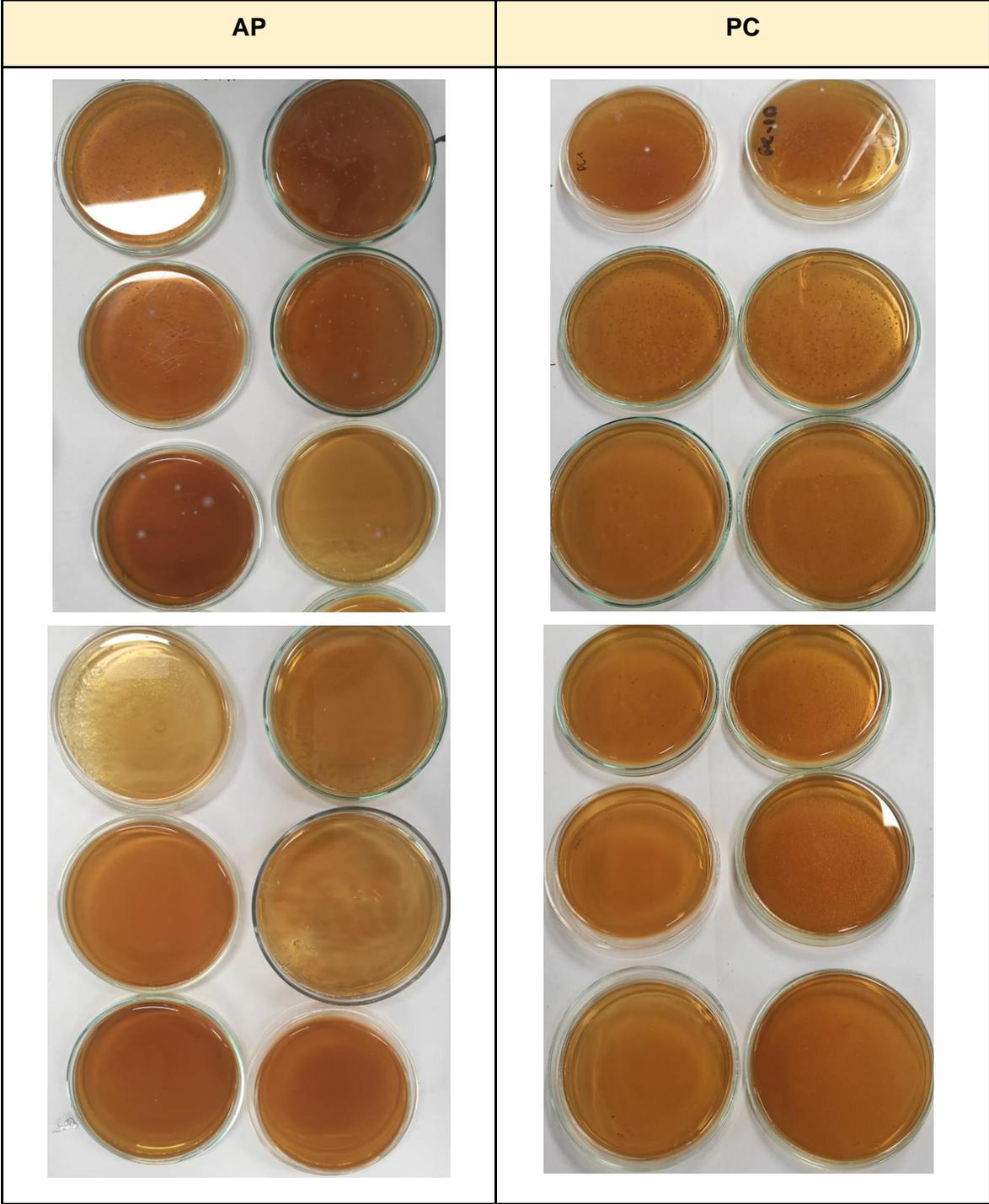
- Watthanasakphuban, N.; Tani, A.; Benjakul, S.; Maneerat, S. (2016). Detección y caracterización preliminar de una bacteriocina de espectro estrecho producida por *Lactobacillus pentosus* K2N7 a partir de camarones fermentados tradicionales tailandeses (Kung-Som). *J. Ciencia. Tecnología*, 38 , 47–55.
- Widyastuti, Y., Febrisiantosa, A., & Tidona, F. (2021). Health-Promoting Properties of Lactobacilli in Fermented Dairy Products. *Frontiers in microbiology*, 12, 673890. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673890>
- Yamamoto, Y.; Togawa, Y.; Shimosaka, M.; Okazaki, M. (2016). Purificación y caracterización de una nueva bacteriocina producida por *Lactobacillus crustorum* MN047 aislado de koumiss de Xinjiang, China. *J. Ciencias de la leche*, 99, 7002–7015
- Yordshasi, A., Moradi, M., Tajik, H., & Molaei, R. (2020). Design and preparation of antimicrobial meat wrapping nanopaper with bacterial cellulose and postbiotics of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108561. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108561>
- Zamani, H. (2016). Aislamiento de un *Lactobacillus plantarum* potencialmente probiótico del queso Siahmezgi y su caracterización como un probiótico potencial. *Revista Biológica de Microorganismos (BJM)*; 4 (16): 97-108.
- Zamani, M., Sasanfar, S., Chalipour, A., Pirhadi, E., Yahyapour, G., Mohammadi, A., Rostami, A., Amini, M., & Hajimahmoodi, M. (2017). Simultaneous Determination of Preservatives in Dairy Products by HPLC and Chemometric Analysis. *International journal of analytical chemistry*, 2017, 3084359. <https://doi.org/10.1155/2017/3084359>
- Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>
- Zhang, H., Liu, L., Hao, Y., Zhong, S., Liu, H., Han, T., et al. (2013). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* BM-1 aislada de un producto cárnico chino fermentado tradicionalmente. *Microbiol. inmunol.* 57, 746–755. doi: 10.1111/1348-0421.12091
- Zhang, T., Wang, J., Wang, A. (2011). Avances en el mecanismo molecular antimicrobiano de los ácidos orgánicos *J. Anim. Veterinario. Sci* , 42, págs. 323 – 328

- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., et al. (2020). Una nota taxonómica sobre el género *Lactobacillus*: descripción de 23 géneros nuevos, descripción modificada del género *Lactobacillus Beijerinck* 1901 y unión de Lactobacillaceae y Leuconostocaceae. En t. Sistema J. Evol. Microbiol. 70, 2782–2858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107
- Zheng, Z., Liao, P., Luo, Y., Li, Z. (2013). Efectos de la fermentación por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, refrigeración y digestión gastrointestinal simulada sobre la antigenicidad de cuatro proteínas de la leche. J. Proceso de Alimentos. Preservar 38 1106–1112. 10.1111/jfpp.12069
- Zimmerman, T., Siddiqui, S., Bischoff, W., Ibrahim, S. (2021). Abordar las amenazas de virus en el aire en la industria alimentaria: un enfoque proactivo. En t. J. Medio Ambiente. Res. Salud pública; 18 :4335.

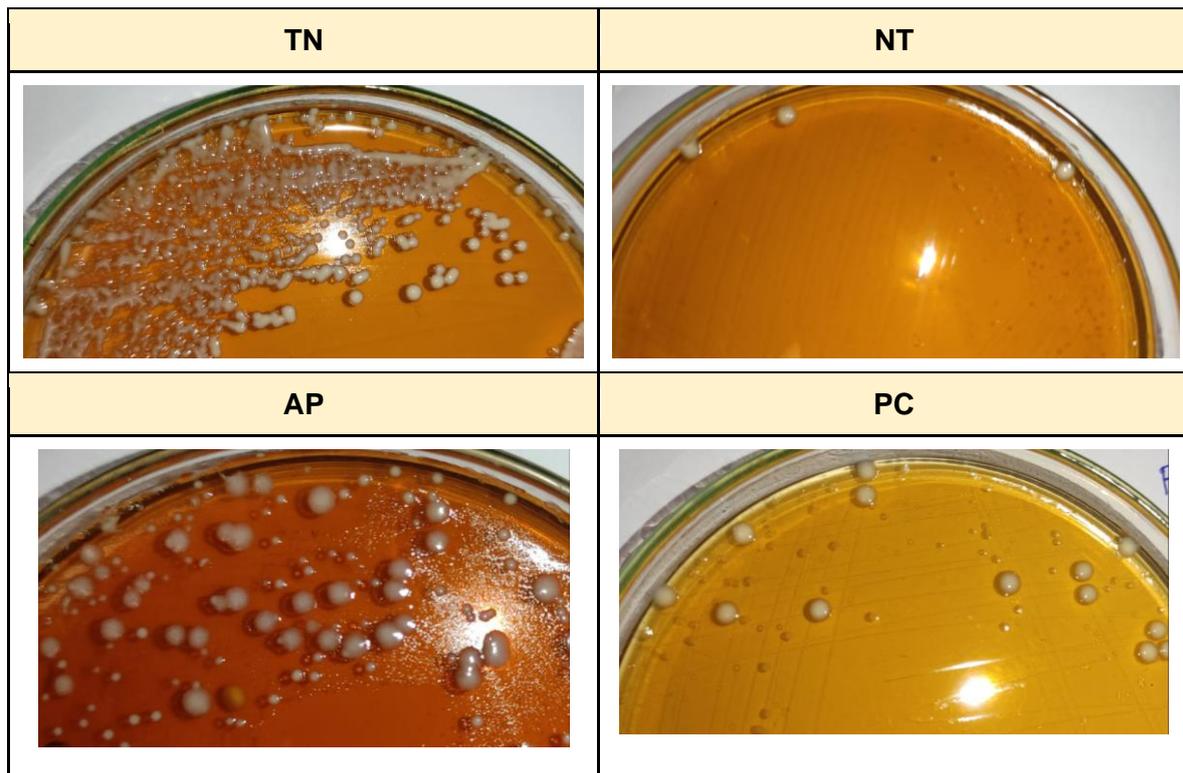
Anexos

Anexo A. Recuento de *Lactobacillus* spp por siembra en profundidad en agar MRS

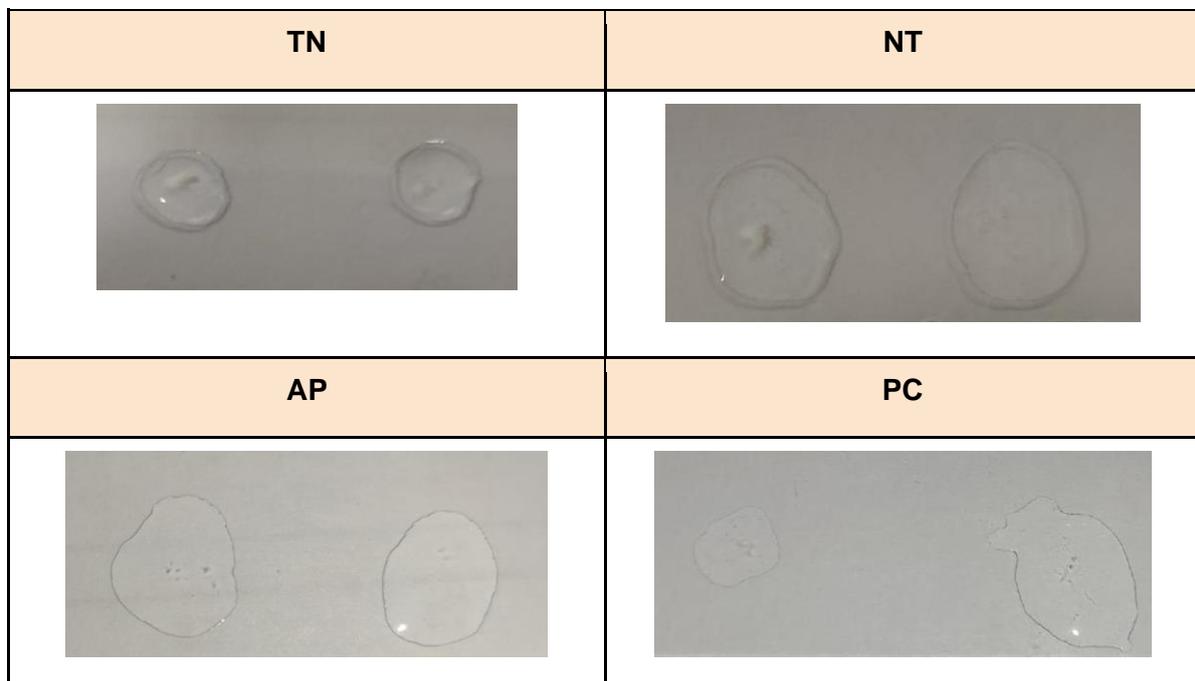




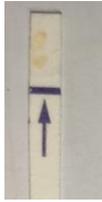
Anexo B. Colonias de *Lactobacillus* spp. aisladas de las diferentes marcas de yogures



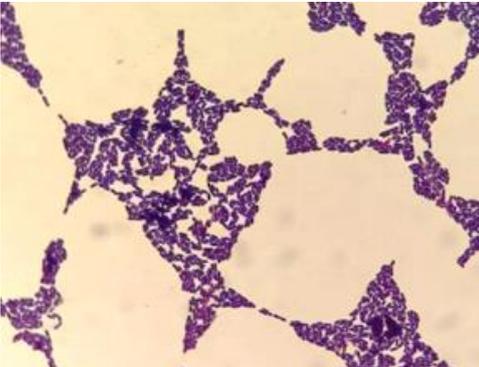
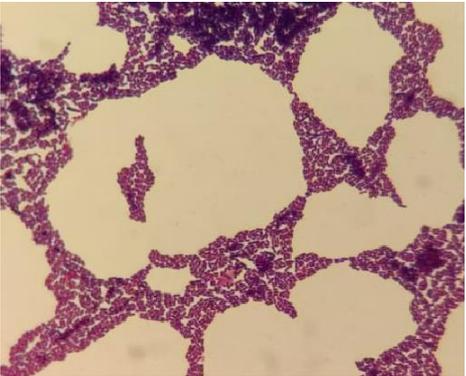
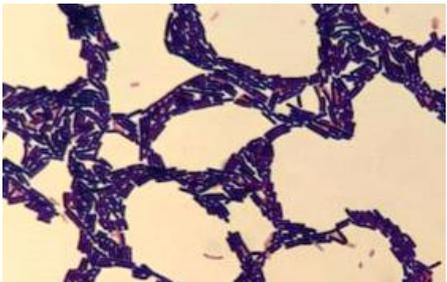
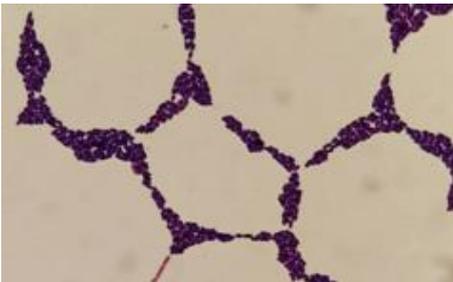
Anexo C. Prueba de la catalasa



Anexo D. Prueba de la oxidasa

TN	NT	AP	PC
			

Anexo E. Tinción de Gram de colonias de *Lactobacillus* spp. aisladas de agar MRS

TN	NT
	
AP	PC
	

Anexo F. Resultados cualitativos de la placa 1 de microdilución del día 1 frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo G. Resultados cualitativos de la placa 2 de microdilución del día 1 frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo H. Resultados cualitativos de la placa 1 de microdilución del día 2 frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo I. Resultados cualitativos de la placa 2 de microdilución del día 2 frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo J. Resultados cualitativos de la placa 1 de microdilución del día 3 frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo K. Resultados cualitativos de la placa 2 de microdilución del día 3 frente a *S. aureus* ATCC 29213.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo L. Resultados cualitativos de la placa 1 de microdilución del día 1 frente a *E. coli* ATCC 25922.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo M. Resultados cualitativos de la placa 2 de microdilución del día 1 frente a *E. coli* ATCC 25922.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo N. Resultados cualitativos de la placa 1 de microdilución del día 2 frente a *E. coli* ATCC 25922.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++) : turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo Ñ. Resultados cualitativos de la placa 2 de microdilución del día 2 frente a *E. coli* ATCC 25922.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++) : turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo O. Resultados cualitativos de la placa 1 de microdilución del día 3 frente a *E. coli* ATCC 25922.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo P. Resultados cualitativos de la placa 2 de microdilución del día 3 frente a *E. coli* ATCC 25922.

Marca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TN	A	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
TN	B	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	C	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
NT	D	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	E	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
AP	F	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	G	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
PC	H	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

(+++): muy turbio; (++): turbio; (+): levemente turbio; (-): no hay turbiedad

Anexo Q. Resultados del recuento en agar MH de *S. aureus* ATCC 29213 en el día 1.

Marca		Placa 1			Placa 2		
		1	2	3	1	2	3
TN	A	N	N	12	N	N	8
TN	B	N	N	15	N	N	16
NT	C	N	48	IN	N	62	IN
NT	D	N	53	IN	N	70	IN
AP	E	12	IN	IN	7	IN	IN
AP	F	1	IN	IN	4	IN	IN
PC	G	N	N	10	N	N	16
PC	H	N	N	2	N	N	7

N: Negativo para el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213

IN: Incontable

Anexo R. Resultados del recuento en agar MH de *S. aureus* ATCC 29213 en el día 2.

Marca		Placa 1			Placa 2		
		1	2	3	1	2	3
TN	A	N	N	3	N	N	2
TN	B	N	N	1	N	N	2
NT	C	N	4	IN	N	3	IN
NT	D	N	10	IN	N	22	IN
AP	E	3	IN	IN	5	IN	IN
AP	F	6	IN	IN	5	IN	IN
PC	G	N	N	5	N	N	6
PC	H	N	N	22	N	N	20

N: Negativo para el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213

IN: Incontable

Anexo S. Resultados del recuento en agar MH de *S. aureus* ATCC 29213 en el día 3.

Marca		Placa 1			Placa 2		
		1	2	3	1	2	3
TN	A	N	N	22	N	N	14
TN	B	N	N	23	N	N	21
NT	C	N	9	IN	N	10	IN
NT	D	N	17	IN	N	6	IN
AP	E	4	IN	IN	5	IN	IN
AP	F	6	IN	IN	3	IN	IN
PC	G	N	N	11	N	N	8
PC	H	N	N	3	N	N	1

N: Negativo para el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213

IN: Incontable

Anexo T. Resultados del recuento en agar MH de *E.coli* ATCC 25922 en el día 1.

Marca		Placa 1			Placa 2		
		1	2	3	1	2	3
TN	A	N	N	64	N	N	70
TN	B	N	N	56	N	N	68
NT	C	N	N	28	N	N	23
NT	D	N	N	40	N	N	30
AP	E	N	15	IN	N	6	IN
AP	F	N	12	IN	N	5	IN
PC	G	N	N	3	N	N	2
PC	H	N	N	12	N	N	8

N: Negativo para el crecimiento de *E.coli* ATCC 25922

IN: Incontable

Anexo U. Resultados del recuento en agar MH de *E.coli* ATCC 25922 en el día 2.

Marca		Placa 1			Placa 2		
		1	2	3	1	2	3
TN	A	N	N	59	N	N	67
TN	B	N	N	50	N	N	72
NT	C	N	N	31	N	N	30
NT	D	N	N	27	N	N	33
AP	E	N	4	IN	N	10	IN
AP	F	N	2	IN	N	3	IN
PC	G	N	N	9	N	N	8
PC	H	N	N	14	N	N	10

N: Negativo para el crecimiento de *E.coli* ATCC 25922

IN: Incontable

Anexo V. Resultados del recuento en agar MH de *E.coli* ATCC 25922 en el día 3.

Marca		Placa 1			Placa 2		
		1	2	3	1	2	3
TN	A	N	N	56	N	N	50
TN	B	N	N	45	N	N	63
NT	C	N	N	17	N	N	24
NT	D	N	N	32	N	N	22
AP	E	N	16	IN	N	19	IN
AP	F	N	10	IN	N	12	IN
PC	G	N	N	8	N	N	8
PC	H	N	N	19	N	N	10

N: Negativo para el crecimiento de *E.coli* ATCC 25922

IN: Incontable