

**EFFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE
SPRAY DRYING EN LA VIABILIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus casei*
ATCC 334 SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 BAJO
CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS**

**JHON FREDY CERÓN CÓRDOBA
JUAN CARLOS BOLAÑOS BOLAÑOS**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
PASTO-COLOMBIA
2022**

**EFFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA DE
SPRAY DRYING EN LA VIABILIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus casei*
ATCC 334 SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 BAJO
CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Zootecnista**

**Director
HENRY ARMANDO JURADO GÁMEZ
Zoot. Esp. M.Sc. Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
PASTO-NARIÑO
2022**

**“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son
responsabilidad exclusiva de los autores”.**

**Artículo 1° del acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del honorable
Consejo Directivo de la Universidad de Nariño**

Nota de Aceptación

HENRY JURADO GÁMEZ
Zoot. Esp. M.Sc. Ph.D.
Director

KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO
MV. M.Sc.
Jurado delegado

IVONNE CATALINA FAJARDO ARGOTI
Zoot. M.Sc.
Jurado

San Juan de Pasto noviembre de 2022

AGRADECIMIENTOS

Con el más sincero aprecio, admiración y gratitud por su colaboración, los autores agradecen a:

HENRY JURADO GÁMEZ, Zootecnista, Esp., M. Sc., Ph.D.

CATALINA FAJARDO ARGOTI. Zootecnista, M. Sc.

JHON JAIRO PARREÑO SALAS, Zootecnista.

AIDA PAULINA DAVILA SOLARTE, Zootecnista, M. Sc

ALVARO PAZOS MONCAYO, Biólogo, M. Sc, Ph.D.

EFREN GUILLERMO INSUASTY SANTACRUZ, Zootecnia, M. Sc.

MEHELI DAYANA SINSAJOA TEPUD, Zootecnista.

MÓNICA LORENA NARVÁEZ RODRÍGUEZ, Zootecnista.

YANET DEL CARMEN GÓMEZ BOLAÑOS, Química.

NATALIA ANDREA MOSQUERA QUINTANA, Química.

LUIS ALFONSO SOLARTE PORTILLA, Zootecnista, Esp. secretario Académico Facultad.

JHONATAN ALEJANDRO MORA, Zootecnista.

Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Zootecnia de la Universidad de Nariño. Laboratorio de Ciencias Pecuarias.

Grupo de Investigación - PROBIOTEC-FORAPIS.

A todas las personas que de una u otra manera nos orientaron y sirvieron de apoyo.

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de grado a mi padre, Bentura Edecio Cerón Muñoz, a mi madre, María Rosario Córdoba y a mis hermanos: Juan Carlos Cerón Córdoba, Mary Helena Cerón Córdoba, Wilmer Andrés Cerón Córdoba y Luis Miguel Cerón Córdoba, quienes, a pesar de la distancia, me han apoyado incondicionalmente. Mi familia, mi fuente de inspiración.

A mis amigos que me apoyaron en mi formación académica a pesar de las dificultades.

Jhon Fredy Cerón Córdoba

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo de grado, a mi madre María Elba Bolaños, a mi padre Segundo Ramiro Bolaños, quienes son mi principal fuente de inspiración y superación en la vida; que con su maravilloso ejemplo han infundido en mí el amor a mi profesión; su amor incondicional que me ha hecho sentir seguro y protegido; y su apoyo en cada paso para siempre hacer mi mejor esfuerzo.

A mis hermanos por siempre apoyarme incondicionalmente en cada reto de mi vida. A mis sobrinos por hacer más divertida mi existencia, en especial a Samuel Mathias España Bolaños por ser mi motivación a ser cada día mejor.

A todos mis amigos que me acompañaron y apoyaron en este hermoso proceso.

Juan Carlos Bolaños Bolaños

RESUMEN

Los probióticos corresponden como una alternativa viable al uso de los antibióticos. Por ello, se realizó la evaluación de la bacteria *Lactobacillus casei* como probiótico y agente inhibidor del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Se reconstituyeron las cepas bacterianas, posteriormente se realizaron las pruebas de producción de gas, actividad de catalasa y resistencia a diferentes niveles de temperatura; luego se estableció la cinética de fermentación teniendo en cuenta los diferentes parámetros: conteo de microorganismos, pH, % ácido láctico, producción de proteína, consumo de azúcares, evaluación de producción de biomasa y cosecha máxima; se evaluó la sensibilidad de *L. casei* y *S. aureus* a los antibióticos Gentamicina (CN) 10 µg, Florfenicol (FFC) 30 µg, Amoxicilina (AMC) 30 µg, Tetraciclina (TE) 30 µg, Cefquinona (CEQ) 30 µg, Dexociclina (D) 30 µg, Ceftazidima (CAZ) 30 µg y Penicilina (PEN) 10 µg mediante el método Kirby Bauer; se evaluó la inhibición de *S. aureus* por efecto de *L. casei*; se evaluó la producción de exopolisacáridos (EPS), resistencia a lisozima, identificación de péptidos; y finalmente se microencapsuló *L. casei* (inulina y maltodextrina 10 % p/v) y realizaron estudios de parámetros físicos del microencapsulado y su viabilidad en condiciones gastrointestinales.

La cinética de fermentación estableció la fase exponencial de *L. casei* en el medio de cultivo PRO y MRS a las 18 horas y 15 horas con $2,3 \times 10^{12}$ UFC/mL y $5,6 \times 10^9$ UFC/mL, respectivamente. Se registraron halos de inhibición superiores a 2 mm en diferentes concentraciones de sobrenadante de *L. casei*. Finalmente, el microencapsulado reportó viabilidad 100%; humedad 4 %; solubilidad 99,08 %; actividad de agua 0,673 Aw y recuentos en placa de $7,58 \times 10^9$ UFC/mL (modelo discontinuo) y $9,12 \times 10^{11}$ UFC/mL (modelo continuo) bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, Inulina, Maltodextrina, Microencapsulación, Antibióticos, Enfermedades de Transmisión Alimentaria.

ABSTRACT

Probiotics correspond as a viable alternative to the use of antibiotics. For this reason, the evaluation of the bacterium *Lactobacillus casei* as a probiotic and growth inhibitory agent of *Staphylococcus aureus* was carried out. Bacterial strains were reconstituted, then gas production, catalase activity and resistance tests at different temperature levels were performed; then, the fermentation kinetics was established, taking into account the different parameters: count of microorganisms, pH, % of lactic acid, protein production, sugar consumption, evaluation of biomass production and maximum harvest; The susceptibility of *L. casei* and *S. aureus* to antibiotics Gentamicin (CN) 10 µg, Florfenicol (FFC) 30 µg, Amoxicillin (AMC) 30 µg, Tetracycline (TE) 30 µg, Cefquinone (CEQ) 30 µg, Dexocycline (D) 30 µg, Ceftazidime (CAZ) 30 µg and Penicillin (PEN) 10 µg by the Kirby Bauer method; the inhibition of *S. aureus* by the effect of *L. casei* was evaluated; the production of exopolysaccharides (EPS), resistance to lysozyme, identification of peptides were evaluated; and finally *L. casei* was microencapsulated (inulin and maltodextrin 10% w/v) and studies of the physical parameters of microencapsulation and its viability under gastrointestinal conditions were carried out.

The fermentation kinetics established the exponential phase of *L. casei* in the PRO and MRS culture medium at 18 hours and 15 hours with $2,3 \times 10^{12}$ CFU/mL and $5,6 \times 10^9$ CFU/mL, respectively. Inhibition halos greater than 2 mm were recorded at different concentrations of *L. casei* supernatant. Finally, microencapsulation reported 100% viability; humidity 4%; solubility 99,08%; water activity 0,673 Aw and plate counts of $7,58 \times 10^9$ CFU/mL (discontinuous model) and $9,12 \times 10^{11}$ CFU/mL (continuous model) under simulated gastrointestinal conditions.

KEYWORDS: *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, Inulin, Maltodextrin, Microencapsulation, Antibiotics, Foodborne Diseases.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	20
1. OBJETIVOS	21
1.1. OBJETIVO GENERAL	21
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	22
2.2. JUSTIFICACIÓN.....	24
3. MARCO TEÓRICO.....	27
3.1. PROBIÓTICOS.....	28
3.2. PREBIÓTICOS	31
3.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	33
3.4. EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)	37
3.5. MICROENCAPSULACIÓN	39
3.6. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA (ETA).....	42
3.7. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS <i>Staphylococcus aureus</i>	43
3.8. CONDICIONES GASTROINTESTINALES	47
4. MATERIALES Y MÉTODOS	49
4.1. LOCALIZACIÓN	49
4.2. MATERIALES	49
4.3. RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA Y CONSERVACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708.....	51
4.4. RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, CONSERVACIÓN Y CULTIVO DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	51
4.5. CULTIVO DEL INÓCULO DE CEPAS <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708 Y <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	52
4.6. PRODUCCIÓN DE GAS.....	53
4.7. ACTIVIDAD DE CATALASA.....	53
4.8. RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA.....	53
4.9. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 EN MEDIO MRS Y MEDIO PRO	54
4.10. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS Y ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE <i>lactobacillus casei</i> ATCC 334 FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708	57
4.11. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EPS	58
4.12. RESISTENCIA A LISOZIMA.....	58
4.13. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DEL SOBRENADANTE POR HPLC – DAD.	58
4.14. MICROENCAPSULACIÓN DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	59
4.15. ESTUDIO DEL MICROENCAPSULADO DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.	59
4.16. EXPOSICIÓN A CONDICIONES GASTROINTESTINALES	61
5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63

5.1. DESCRIPCIÓN DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708.....	63
5.2. PRODUCCIÓN DE GAS y ACTIVIDAD DE CATALASA <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708	66
5.3. RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA.....	68
5.4. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 EN MEDIO MRS Y MEDIO PRO	71
5.5. PRUEBAS DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 Y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708 FRENTE A ANTIBIOTICOS.....	90
5.6. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)	115
5.7. RESISTENCIA A LISOZIMA.....	118
5.8. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS, ÁCIDO LÁCTICO Y AMINOÁCIDOS DEL SOBRENADANTE.	120
5.9. MICROENCAPSULACIÓN DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	122
5.10. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA Y ESTABILIDAD DE <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 MICROENCAPSULADO	123
5.11. EXPOSICIÓN A CONDICIONES GASTROINTESTINALES	130
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	135
6.1. CONCLUSIONES	135
6.2. RECOMENDACIONES.....	136
BIBLIOGRAFIA	137
ANEXOS.....	161

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características comunes de Bacterias Ácido Lácticas.....	34
Cuadro 2. Bacterias ácido Lácticas y sus propiedades.....	35
Cuadro 3. Clasificación taxonómica <i>Lactobacillus casei</i>	36
Cuadro 4. Clasificación taxonómica <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Cuadro 5. Composición de medio MRS y medio PRO.....	54
Cuadro 6. Producción de gas y actividad de catalasa	66
Cuadro 7. Determinación de EPS a diferente temperatura y tiempo	115

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño para toma de medias repetitivas durante la cinética de fermentación para medio MRS y medio PRO	55
Tabla 2. Resistencia de <i>L. casei</i> a diferentes niveles de temperatura, 37 °C y 45 °C.....	68
Tabla 3 Composición nutricional teórica del caldo MRS	72
Tabla 4. Composición nutricional teórica del medio PRO	73
Tabla 5. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> Ln UFC/mL en los medios de cultivo PRO y MRS.	76
Tabla 6. Determinación de pH de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS	79
Tabla 7. Determinación de porcentaje de ácido láctico de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS	82
Tabla 8. Determinación de producción de proteínas de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS.....	84
Tabla 9. Determinación de consumo de azúcares de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS.....	86
Tabla 10. Datos cinéticos de crecimiento bacteriano para <i>L. casei</i> en medio MRS y medio PRO.	90
Tabla 11. Interpretación de halos de inhibición según su diámetro	91
Tabla 12. Antibiograma de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 frente a antibióticos	95
Tabla 13. Antibiograma <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708	98
Tabla 14. Halos de inhibición por el Método pads impregnados de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.....	103
Tabla 15. Halos de inhibición por el método de difusión en cilindro plástico de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.....	105
Tabla 16. Halos de inhibición por el método de difusión en cilindro plástico doble capa de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708	106
Tabla 17. Resistencia de <i>L. casei</i> microencapsulado a lisozima	119
Tabla 18. Determinación de ácido láctico en sobrenadante de <i>L. casei</i>	121
Tabla 19. Identificación de aminoácidos de <i>L. casei</i> y <i>S. aureus</i>	121
Tabla 20. Viabilidad y eficiencia de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 microencapsulado.....	123
Tabla 21. Valores caracterización física de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 microencapsulado.....	125
Tabla 22. Determinación de actividad de agua Aw de <i>L. casei</i> microencapsulado	128

Tabla 23. Crecimiento bacteriano de <i>L. casei</i> microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas	131
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografía electrónica de BAL y bacterias relacionadas	35
Figura 2. a: <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 morfología macroscópica en agar MRS + Azul de anilina; b: morfología microscópica aumento 100x.	63
Figura 3. a: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708 morfología macroscópica en agar Baird Parker; b: morfología microscópica	64
Figura 4. <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 catalasa negativa; b: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708 catalasa positiva.....	67
Figura 5. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> a 37 °C durante 24 horas, caja Petri más azul de anilina.	68
Figura 6. Crecimiento bacteriano en Ln UFC/mL de <i>L. casei</i> ATCC 334 a diferentes temperaturas, 37°C y 45°C	69
Figura 7. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> Ln (UFC/mL) en los medios de cultivo PRO y MRS	76
Figura 8. Determinación de pH de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS	80
Figura 9. Determinación de porcentaje de acidez de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS.....	82
Figura 10. Determinación de producción de proteínas de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS.....	85
Figura 11. Determinación de consumo de azúcares de <i>Lactobacillus casei</i> en los medios de cultivo PRO y MRS.....	87
Figura 12. Antibiograma de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 en agar MRS con azul de anilina.	96
Figura 13. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708 frente a antibióticos en agar Mueller Hinton.....	98
Figura 14. Halo de inhibición y concentración: método disco de agar impregnado con <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708.	102
Figura 15. Disco de agar impregnado de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC BAA 1708 en agar Müller Hinton.....	103
Figura 16. Halo de inhibición en mm y concentraciones por el método pads impregnados de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.	104
Figura 17. Halo de inhibición en mm y concentraciones por el método de difusión en cilindro plástico de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.	105
Figura 18. Halo de inhibición en mm y concentraciones por el método de difusión en cilindro plástico doble capa de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.....	107
Figura 19. Halo de inhibición en mm y métodos para determinar inhibición bajo diferentes condiciones de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.....	108
Figura 20. Halo de inhibición en mm y métodos para determinar inhibición bajo diferentes concentraciones de <i>L. casei</i> ATCC 334 sobre <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708.....	109

Figura 21. Cromatograma identificación de péptidos de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.....	120
Figura 22. Determinación de actividad de agua Aw% de <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulado.....	128
Figura 23. Microfotografía por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de <i>Lactobacillus casei</i> microencapsulado.....	130
Figura 24. Crecimiento bacteriano de <i>L. casei</i> microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas.....	132

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™	162
ANEXO B. Preparación de caldo BHI	163
ANEXO C. Preparación de caldo MRS	164
ANEXO D. Cultivo de inóculo de cepas	165
ANEXO E. Estimación de concentración bacteriana mediante espectrofotómetro	167
ANEXO F. Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos	168
ANEXO G. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	169
ANEXO H. Determinación de proteínas por el método de Lowry.....	173
ANEXO I. Determinación de azúcares totales	180

GLOSARIO

BACTERIOCINA: son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas, sintetizados por algunas bacterias ácido láctico y presentan un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, generalmente patógenos.

BIOMASA: masa celular que puede ser medida o estimada mediante métodos directos e indirectos.

CATALASA: enzima del grupo de las cromo proteínas porfirínicas, cuya molécula contiene ion férrico y que interviene en la descomposición del agua oxigenada. Su acción catalítica es extraordinariamente rápida; existe en los tejidos vegetales y animales y también en algunos géneros de bacterias.

CEPA: población de organismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

COLONIA: grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio.

EFFECTOS ANTIMICROBIANOS: actividad antagonista contra patógenos por parte de una bacteria láctica, incluyendo la utilización de compuestos antimicrobianos específicos producidos por ésta.

FERMENTACIÓN: proceso bioquímico liberador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan tanto de donadores como de aceptores de electrones.

FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA: fermentación que produce ácido láctico como uno o principal producto final.

HUÉSPED: cuerpo de un organismo que aloja a otro.

HUMECTABILIDAD: tendencia que tiene un material para hacer que los líquidos se extiendan sobre su superficie.

INHIBICIÓN: disminución de la actividad biológica de un microorganismo por la acción de un agente inhibidor.

INÓCULO: crecimiento optimizado de células microbianas que va a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el material iniciador.

MICROBIOTA: población homogénea o heterogénea de microorganismos asociados con un tejido o estructura particular.

MICROENCAPSULACIÓN: método mediante el cual pequeñas partículas, gotas de líquido o gases se envuelven con un material de cobertura para dar lugar a microcápsulas o micropartículas selladas que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas.

PATÓGENO: microorganismo o material que produce un malestar enfermedad o muerte.

PROBIÓTICOS: microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino.

ruta de EMBDEN MEYERHOFF PARNAS: vía que degrada la glucosa a piruvato; en la fase de seis carbonos convierte la glucosa en fructosa 1,6 bifosfato y en la fase de tres carbonos produce ATP, transformándose el gliceraldehído 3-fosfato en piruvato.

SOLUBILIDAD: medida de la capacidad de una sustancia para disolverse en otra.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: tiempo requerido por un microorganismo o población microbiana para que duplique su número.

TINCIÓN DE GRAM: método bacteriológico que permite designar dos grupos morfológicos distintos de bacterias en (Gram negativas) y (Gram positivas). Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC): unidad de medida estimada para microorganismos la cual expresa el número de microorganismos viables que pueden duplicarse hasta formar colonias.

VIABILIDAD: en microbiología se define como la capacidad de un microorganismo para multiplicarse en un medio formando colonias.

INTRODUCCIÓN

Los crecientes problemas de salud a nivel mundial, la eficacia de los probióticos, la globalización, el aumento de la diversidad étnica e ingredientes alimentarios más nutritivos, son algunos de los factores clave para el crecimiento del mercado de probióticos, con ello, la tecnología alimentaria ha desarrollado carácter dinámico y han aumentado nuevos alimentos, entre ellos los alimentos funcionales, incluidos probióticos y prebióticos.

Por otra parte, a causa de la globalización del mercado de alimentos, dificultades en programas de saneamiento, utilización indiscriminada de antibióticos e intensificación en los parámetros zootécnicos, se han estimado más de 250 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), la mayoría de las cuales, son infecciones ocasionadas por bacterias, virus y parásitos, que ponen en riesgo la inocuidad alimentaria.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son beneficiosas para la salud, capaces de inhibir patógenos implicados en Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA), como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. De esta forma, *S. aureus* es responsable de enfermedades en humanos y animales, puede provocar infecciones severas en la piel y el tejido blando, en algunos casos septicemia y localizarse en órganos, articulaciones, huesos y otras zonas corporales. En las localidades donde se desarrolla el sector lechero bovino, caprino y ovino *S. aureus* es una de las principales causas de mastitis, que, al mismo tiempo, es la principal causa en la elevación de costos de producción.

Para fortalecer el uso de BAL se recurre a la microencapsulación, que permite la protección de probióticos mediante el empaquetado de microorganismos en pequeñas cápsulas que se liberan a velocidades controladas, dando alternativas al tratamiento de ETA y minimizando el uso de antibióticos.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la microencapsulación mediante la técnica de Spray Drying en la viabilidad probiótica de *Lactobacillus casei* ATCC 334 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer la cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei*, así como evaluar la producción de exopolisacáridos (EPS) y su resistencia a la lisozima.

Identificar el perfil de aminoácidos y péptidos de *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus*.

Determinar el efecto de la microencapsulación mediante la técnica Spray Drying sobre la viabilidad probiótica de *Lactobacillus casei*.

Reconocer el efecto de la microencapsulación de *Lactobacillus casei* mediante evaluación física y por microscopía electrónica de barrido (SEM).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

En palabras de Palomino-Camargo¹ y Moreno y Alarcón², en las últimas décadas, a causa de la globalización del mercado de alimentos, cambios en los hábitos alimenticios, dificultades en programas de saneamiento y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), utilización indiscriminada de antibióticos e intensificación en los parámetros zootécnicos, se han estimado más de 250 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA), la mayoría de las cuales, son infecciones ocasionadas por bacterias, virus y parásitos, que ponen en riesgo la inocuidad alimentaria.

Palomino-Camargo³ y Ruiz y Fernández⁴ consideran como ETA todas aquellas enfermedades causadas por la ingestión de agua o alimentos contaminados y mencionan que las bacterias generalmente implicadas en ETA corresponden a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* y *Shigella* o las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Listeria monocytogenes*.

Los autores Grace y Fetsh⁵, describen a *S. aureus* como una bacteria ubicua, y un factor de virulencia común en ETA, responsable de infecciones de la piel, sepsis en hospitales y guarderías, mastitis en animales lecheros, infecciones cutáneas en el ganado, lesiones óseas y articulares en las aves de corral. Igualmente, describen que perros, gatos y caballos, pueden transmitir *S. aureus* y ser vulnerables a las infecciones.

Masana⁶, menciona la aparición de microorganismos mejor adaptados a escenarios de mayor estrés, características obtenidas por medio de cambios evolutivos: uno de los más importantes es la Resistencia a Antimicrobiales (RAM), característico *S. aureus* Resistente a Metacilina (SARM), resistente a los antibióticos betalactámicos

¹ PALOMINO-CAMARGO, C et al. 'Delphi Methodology in Food Safety Management and Foodborne Disease Prevention. En: Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, Vol. 35 N. 3 2018, p. 483–90, disponible en: <<https://doi.org/10.17843/RPMESP.2018.353.3086>>.

² MORENO, M. y ALARCÓN, A. Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. En: Revista Médica Clínica Las Condes, Vol. 21, N 5. 2010, p. 749–55. Disponible en: <[https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70596-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70596-4)>.

³ PALOMINO-CAMARGO et al. Op. Cit., p. 484.

⁴ RUIZ, M. y FERNANDEZ, C. Efecto Inhibitorio de *Lactobacillus* Spp. Sobre Bacterias Implicadas En Enfermedades Transmitidas Por Alimentos', Revista Argentina Microbiología. Vol. 49, N. 2. 2017, p. 174–77. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>>.

⁵ FETSCH, A. *Staphylococcus Aureus* (Academic Press, 2018), p. 4.

⁶ OSCAR MASANA, M. Drivers for the Emergence of Biological Hazards in Foods', Revista Argentina de Microbiología, Vol. 47, N.1. 2015, p. 1–3. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.01.004>>.

y solamente sensible a las cefalosporinas de quinta generación⁷, de los cuales, se han reportado casos a nivel nacional en muestras de; leche⁸, queso campesino, queso costeño⁹, productos cárnicos¹⁰ y pollo¹¹.

En el trabajo realizado por Jarrín, Guzmán y Jurado¹² en el corregimiento de Catambuco municipio de Pasto (Nariño), después de aislar cepas patógenas de muestras de leche de vacas con mastitis subclínica lograron identificar *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*.

A su vez, existen los probióticos, de gran utilidad biotecnológica en la salud animal, humana y biopreservación de alimentos. Son principalmente Bacterias Ácido Lácticas (BAL), en su mayor parte del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. En los últimos años los *Lactobacillus* se han aplicado como probióticos por varios autores, Blajman y Guitierrez¹³, Romina y Guzmán¹⁴, y Domínguez et al ¹⁵, debido a su capacidad para regular microbiota intestinal, estimular el sistema inmune,

⁷ MOHAMED, A; MOHAMED, M. y NASHWA, H. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Some Meat Products. En: Alexandria Journal of Veterinary Sciences. Vol. 70.N. 1 2021, p. 96–105. Disponible en: <<https://doi.org/10.5455/ajvs.36400>>.

⁸ MARTINEZ, M. y GOMEZ, C. Calidad Composicional e Higiénica de La Leche Cruda Recibida En Industrias Lácteas de Sucre, Colombia. En: Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol. 11, N.2. 2013, p. 93–100. Disponible en: <<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/309>> [accessed 18 August 2021].

⁹ RANDER A.; RUÍZ-PÉREZ, N.; MENDO-MORALES, M. y LINDA M. Chams-Chams, 'Microbiological Evaluation of Artisan Coastal Cheese and Hygieniclocative Evaluation of Small Shops in Córdoba, Colombia. En: Revista de Salud Publica, Vol. 19, N.3 2017, p. 311–17. Disponible en: <<https://doi.org/10.15446/RSAP.V19N3.54853>>.

¹⁰ LÓPEZ GUTIERREZ, L.; BETTIN MARTINEZ, AND HÉCTOR SUÁREZ MAHECHA, Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Meat Raw in Cartagena, Colombia. En: Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, Vol. 70, N.1 2017, p. 8091–98. Disponible en: <<https://doi.org/10.15446/RFNA.V70N1.61768>>.

¹¹ MERCADO, G. y GUNTER, F. Brotes Por *Salmonella* Spp., *Staphylococcus Aureus* y *Listeria Monocytogenes* Asociados Al Consumo de Pollo. En: Biomedica, Vol. 32, N.3 2012, p. 355–64. Disponible en: <<https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V32I3.697>>.

¹² Gúzman-Insuasty, Manuel; Jarrín-Jarrín, V. and Jurado-Gámez, Henry. Determinación De La Cinética, Pruebas De Crecimiento Microbiano y Efecto de Inhibición In Vitro de *Lactobacillus Lactis* En *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Streptococcus Agalactiae* Y *Escherichia Coli*, *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62.2 (2015), 40–56 <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remezvez/article/view/51993>>.

¹³ BLAJMAN, Jesica E. y GUTIERREZ, salazar. Probióticos En Pollos Parrilleros: Una Estrategia Para Los Modelos Productivos Intensivos. En: Revista Argentina de Microbiología, Vol. 47, N.4 2015, p. 360–67 Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2015.08.002>>.

¹⁴ ROMINA ROSS, Gloria y GUZMAN, R. Fatty Acid Profile of Pig Meat after Probiotic Administration. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 60, N.23 2012, p. 5974–78. Disponible en: <<https://doi.org/10.1021/jf205360h>>.

¹⁵ DOMÍNGUEZ GONZÁLEZA, Karina N, et al. El Efecto Antihipertensivo de Las Leches Fermentadas, En: Revista Argentina de Microbiología, Vol. 46, N.1 2014, 58–65 <[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70050-1](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70050-1)>.

controlar bacterias patógenas, mejorar parámetros zootécnicos en animales, hidrolizar proteínas y conservar alimentos.

2.2. JUSTIFICACIÓN

Palomino-Camargo¹⁶ y Fetsch¹⁷ contemplan las ETA como un problema de salud pública y una causa importante de morbilidad, que ocasiona prejuicios para los consumidores y un impacto al comercio internacional de productos alimenticios, por tanto, una carga económica significativa para las naciones. Reportes en países desarrollados han indicado a *S. aureus* como la cuarta entre las 10 principales causas de ETA bacteriana, responsable anualmente de 292.000 casos en los Países Bajos, 241.000 casos en los Estados Unidos¹⁸, 25.000 casos en Canadá¹⁹ y 1.300 casos en Australia²⁰.

En Colombia a nivel nacional, hay reportes de *S. aureus* asociados a mastitis subclínica en hatos lecheros, en los municipios de Pasto (Nariño)²¹, Pamplona (Norte de Santander)²², Bogotá (Cundinamarca) y en el departamento de Antioquia²³. De las muestras aisladas y analizadas el 74,4% corresponde a *S. aureus*; 12,3% a *S. agalactiae* y 13,3% a coliformes²⁴. De igual manera, se ha identificado la presencia de *S. aureus* en gran variedad de productos para consumo humano, como lo son; queso doble crema artesanal (Norte de Santander)²⁵, queso

¹⁶ PALOMINO-CAMARGO, et al. Op. cit., p. 23.

¹⁷ FETSCH Op. cit., p. 5.

¹⁸ MANGEN, Marie-Josée et al. Cost-of-Illness and Disease Burden of Food-Related Pathogens in the Netherlands, 2011, *International Journal of Food Microbiology*, 196 (2014), 84–93 <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.022>>.

¹⁹ THOMAS, Kate et al. Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006', *Foodborne Oathogens and Disease*, 10.7 (2013) <<https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1389>>.

²⁰ KIRK, Martyn et al. Foodborne Illnes, Australia. Circa 2000 and Circa 2010', *Emerging Infectious Diseases*, 20.11 (2014), 1857–64 <<https://doi.org/10.3201/eid2011.131315>>.

²¹ JURADO-GÁMEZ, Henry; GÚZMAN-INSUASTY, Manuel AND JARRÍN-JARRÍN, Verónica, 'Determinación de La Cinética, Pruebas de Crecimiento y Efecto de Inhibición *in Vitro* de *Lactobacillus Lactis* En *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Streptococcus Agalactiae* y *Escherichia Coli*', *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62.2 (2015), 40–56 <<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v62n2.51993>>.

²² MENDOZA, A.; VERA, J; PEÑA, Luis Carlos. Prevalencia de Mastitis Subclínica, Microorganismos Asociados y Factores de Riesgo Identificados En Hatos de La Provincia de Pamplona, Norte de Santander', *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 64.2 (2017), 11–24 <<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v64n2.67209>>.

²³ RAMÍREZ, N. F. et al. Herd- and Cow-Level Risk Factors Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Farms from the High Plains of the Northern Antioquia, Colombia', *Journal of Dairy Science*, 97.7 (2014), 4141–50 <<https://doi.org/10.3168/JDS.2013-6815>>.

²⁴ JURADO-GÁMEZ, GÚZMAN-INSUASTY, and JARRÍN-JARRÍN. Et al., Op., cit. p. 51.

²⁵ HERRERA, Fanny AND SANTOS, Jesús. PRESENCIA DE *Staphylococcus Aureus* METICILINA-RESISTENTES EN QUESO DOBLE CREMA ARTESANAL', *Rev. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18.1 (2015), 29–37.

costeño (Córdoba)²⁶, leche cruda (Sucre)²⁷, carne de res (Cartagena) ²⁸, pollo²⁹, hamburguesa, pizza, arepa, jugo de naranja, piña, postre y ensalada de frutas³⁰.

Según Stewart³¹, los individuos que ingieren este tipo de alimentos sufren intoxicación estafilocócica presentando síntomas como: náuseas, vómitos, calambres abdominales, ocasionalmente diarrea, malestar general y dolor de cabeza; esta intoxicación ha llegado a presentar casos de muertes, principalmente en ancianos, niños y mujeres gestantes. Por tal razón, las actuales políticas agropecuarias para el sector lácteo colombiano, en cabeza del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR)³² establece la Resolución No. 00017 del 2012, donde la calidad higiénica para la leche se mide en términos de unidades formadoras de colonia (UFC), contenidos en un litro de leche, donde bonificaciones o descuentos se realizarán de acuerdo a los rangos establecidos en la tabla UFC, de esta forma garantizar la inocuidad y comercialización del producto.

La biotecnología y su aplicación a permitido identificar y retomar las bacterias del género *Lactobacillus* asociadas a efectos benéficos en la salud humana y animal, por la producción de sustancias (ácido láctico, ácido acético y metabolitos), y de numerosas bacteriocinas, productos en los cuales se fundamenta su importante acción probiótica, antimicrobiana y bioconservadora. Ruiz et al³³, describen el potencial alternativo de *Lactobacillus* spp. aislados para inactivar, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *S. aureus*. En el mismo sentido, los investigadores Jurado-Gámez et al³⁴, Ruiz et al³⁵ y Blajman et al³⁶, demuestran que *L. casei* es una BAL que se puede aplicar en gran variedad de procesos gracias a su liberación de péptidos, alta actividad captadora de radicales libres, capacidad antimutagénica y tratamientos frente a *Helicobacter pylori*.

²⁶ RUÍZ-PÉREZ, MENCO-MORALES, and CHAMS-CHAMS. Op. cit., p. 23.

²⁷ ARENAS, N.E. et al. Antibiotic Susceptibility of Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus Strains Isolated in Raw Cow Milk from the Sumapaz Region, Colombia', *International Journal of Infectious Diseases*, 53 (2016), 72–73 <<https://doi.org/10.1016/J.IJID.2016.11.183>>.

²⁸ LÓPEZ GUTIERREZ, BETTIN MARTINEZ, AND SUÁREZ MAHECHA.

²⁹ MERCADO AND OTHERS. Op. Cit. p. 5.

³⁰ CAMPUZANO, Silvia et al. Determinación de La Calidad Microbiológica y Sanitaria de Alimentos Preparados Vendidos En La Vía Pública de La Ciudad de Bogotá D.C.', *Nova*, 13.23 (2015), 81–92 <<https://doi.org/10.22490/24629448.1708>>.

³¹ STEWART, G C. Chapter 18 - Staphylococcal Food Poisoning. *Foodborne Diseases*, 2017, 367–80 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00018-8>>.

³² MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL MADR, 'Res. 000017 de 2012.Pdf', 2012 <https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/d.angie/Res_000017_de_2012.pdf>.

³³ RUIZ et al. Op. cit., p. 22.

³⁴ JURADO-GÁMEZ, GÚZMAN-INSUASTY, AND JARRÍN-JARRÍN. Op. Cit. p. 26.

³⁵ RUIZ. et al. Op. cit., p. 23.

³⁶ BLAJMAN et al. Op. cit., 19.

La aplicación de probióticos en animales de producción se asocia al mejoramiento de parámetros zootécnicos como lo demuestran Zambrano-Mora y Jurado-Gómez³⁷ al incluir *L. casei* en alimentación de pollos incrementando la ganancia de peso y respuesta inmunológica, además, El-Enshasy y Shang³⁸ mencionan que mejoran la inocuidad alimentaria para el consumidor final.

Sin embargo, Lira de Medeiros³⁹ y El-Enshasy y Shang⁴⁰, mencionan que la aplicación de probióticos es limitada puesto que debe enfrentar varias condiciones adversas (ambientales, Gastrointestinales, procesos industriales), que afectan la viabilidad y supervivencia. En ese orden de ideas, la microencapsulación promueve el concepto de una barrera física (envasado y sellado) que ofrece protección al probiótico y busca la viabilidad hasta la concentración mínima necesaria para entregar sus efectos beneficiosos al huésped.

Por lo anterior, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la microencapsulación mediante la técnica de spray drying en la viabilidad probiótica de *Lactobacillus casei* ATCC 334 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 bajo condiciones gastrointestinales simuladas?

³⁷ ZAMBRANO-MORA, Edward Johnny y JURADO-GÁMEZ, Henry. Efecto de *Lactobacillus Casei* Microencapsulado Sobre La Salud Intestinal y Parámetros Bioquímicos y Productivos En Pollo de Engorde TT - Effect of Microencapsulated *Lactobacillus Casei* on Intestinal Health and on Biochemical and Productive Parameters In', *Rev. Udca Actual. Divulg. Cient*, 23.2 (2020), e1480–e1480 <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&apd=S0123-42262020000200017>.

³⁸ EL-ENSHASY, Hesham Ali AND SHANG-TIAN, Yang, *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms*, *Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms*, 1st edn (CRC Press, 2021), p. 5 <<https://doi.org/10.1201/9781351027540>>.

³⁹ LIRA DE MEDEIROS, Adja Cristina et al. Structural Characterisation and Cell Viability of a Spray Dried Probiotic Yoghurt Produced with Goats Milk and *Bifidobacterium Animalis* Subsp. *Lactis* (BI-07)', *International Dairy Journal*, 39.1 (2014), 71–77 <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.008>>.

⁴⁰ EL-ENSHASY AND YANG. Op. cit. p. 29.

3. MARCO TEÓRICO

Burr et al, Kechagia et al, Sanders et al, y Lazado et al, como se citaron por El-Enshasy y Yang⁴¹, consideraron diferentes estrategias para mejorar la inmunidad, obtener un mejor crecimiento y digestión, mejorar la resistencia a enfermedades de los huéspedes en animales de producción y en los seres humanos. También describen que el uso de probióticos en diferentes complementos alimenticios se considera un enfoque moderno no solo desde el punto de vista nutricional sino también como una forma terapéutica alternativa para evitar los impactos adversos de los medicamentos. Además, contemplan que estos microorganismos pueden colonizar y multiplicarse en el intestino del huésped después de la administración, lo que produce muchos efectos beneficiosos al modular diferentes sistemas biológicos en el huésped.

GWO⁴² menciona que hace más de un siglo, Elie Metchnikoff postuló que “las bacterias ácido lácticas (BAL) eran beneficiosas para la salud, y capaces de promover la longevidad”. Metchnikoff sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y reemplazando los microbios proteolíticos por microbios útiles. Diseñó una dieta con leche fermentada con una bacteria a la que bautizó “Bacilo búlgaro”.

Como lo menciona Saisburi citado por Arenas ⁴³ “Entre las especies más utilizadas de microorganismos probióticos están las bacterias ácido lácticas (BAL) y en ella, géneros como: *Lactobacillus* sp, *Leuconostoc* sp, *Pediococcus* sp, *Lactococcus* sp y *Streptococcus* sp; entre otras”. Por otra parte, Arques et al⁴⁴., mencionan que en alimentos las BAL más utilizadas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

En el estudio realizado por Ruiz et al⁴⁵, al evaluar la capacidad inhibitoria de *Lactobacillus* spp. frente a patógenos implicados en Enfermedades de Transmisión Alimentaria (ETA), como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, infieren que “estos patógenos pueden ser el origen de diversas ETA, y la capacidad de controlarlos o disminuirlos en toda la cadena de producción porcina por un medio biológico, a través de la aplicación de cepas de *Lactobacillus*, como se plantea en este estudio, representa una alternativa beneficiosa tanto para la producción de carne y productos porcinos como para la salud pública”.

⁴¹ EL-ENSHASY AND YANG Op. cit., p. 292.

⁴² GUARNER, Francisco et al. *Probióticos y Prebióticos, Guías Mundiales de La Organización Mundial de Gastroenterología Probióticos y Prebióticos*, February 2017.

⁴³ ARENAS ARRUBLA, Juan Esteban. Determinación de Algunos Parámetros Zootécnicos En Pollos de Engorde de La Línea Ross x Ross, Suplementados Con Un Consorcio de Microorganismos Probióticos', 2014, p. 4.

⁴⁴ ARQUÉS, Juan et al. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens', *BioMed Research International*, 2015 <<https://doi.org/10.1155/2015/584183>>.

⁴⁵ RUIZ et al. Op. Cit., p. 176.

Burgain et al y Borgogna et al citados por El-Enshasy y Yang⁴⁶ definen la microencapsulación como una berrera física que ofrece una mejor protección al probiótico protegiendo así eficazmente a la célula bacteriana. En este sentido, Sinsajoa-Tepud et al⁴⁷ tras evaluar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado en condiciones gastrointestinales simuladas concluyen que “*Lactobacillus plantarum* mostró adecuado crecimiento bajo pH ácido y en condiciones de bilis y sales biliares simuladas. Los parámetros del microencapsulado demostraron ser efectivos para la viabilidad de la cepa y *L. plantarum* fue capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7”.

Por otra parte, Zambrano-Mora y Jurado-Gómez⁴⁸ evaluaron el efecto del suministro de *Lactobacillus casei* microencapsulado en los parámetros productivos y salud intestinal del pollo de engorde y lograron determinar que “la microencapsulación de *L. casei* incrementa la ganancia de peso y mejora la respuesta inmunológica; sin embargo, se encontraron lesiones con el suministro de la bacteria, lo que indicó que se debe ajustar la dosis, la frecuencia y la vía de suministro, para evitar este tipo de alteraciones”.

3.1. PROBIÓTICOS

Arribas⁴⁹ menciona que el término probiótico, etimológicamente, procede del griego pro-bios (por la vida) y se atribuye el mérito a Vergio, quien en 1954 comparó los efectos adversos que los antibióticos ejercen sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores. En el mismo sentido, Russo⁵⁰ menciona que la FAO/OMS determina los probióticos como microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped. Pereira, Maciel y Rodríguez⁵¹ Gupta y Abu-Ghannam⁵²,

⁴⁶ EL-ENSHASY AND YANG. Op. Cit. p. 32.

⁴⁷ SINSAJOA-TEPUD, Mehili; JURADO-GAMEZ, Henry y NARVÁEZ-RODRÍGUEZ, Monica. Evaluación de *Lactobacillus Plantarum* Microencapsulado y Su Viabilidad Bajo Condiciones Gastrointestinales Simuladas e Inhibición Frente a *Escherichia Coli* O157:H7, *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 66.3 (2019), 231–44 (p. 242) <<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v66n3.84260>>.

⁴⁸ ZAMBRANO-MORA AND JURADO-GÁMEZ, P. Op. Cit. p. 26.

⁴⁹ ARRIBAS ARRIBAS, maría belén. Probióticos: Una Nueva Estrategia En La Modulación Del Sistema Inmune. Granada: Universidad de Granada, 2009. <<https://digibug.ugr.es/handle/10481/2159>> [accessed 30 August 2021].

⁵⁰ RUSSO, Pasquale et al. Probiotic Lactic Acid Bacteria for the Production of Multifunctional Fresh-Cut Cantaloupe. *Food Research International*, 77 (2015), 762–72 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.033>>.

⁵¹ PEREIRA, Ana Lucia; MACIEL, Tatiane and RODRIGUES, Sueli. ‘Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice Fermented with *Lactobacillus Casei*’, *Food Research International*, 44.5 (2011), 1276–83 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>>.

⁵² GUPTA, Shilpi and ABU-GHANNAM, Nissreen. Probiotic Fermentation of Plant Based Products: Possibilities and Opportunities Probiotic Fermentation of Plant Based Products: Possibilities and

mencionan que los probióticos se utilizan ampliamente en la industria láctea para producir productos lácteos fermentados y en otras matrices alimentarias, como jugos de frutas o frutas, cárnicos, embutidos, pescados y liofilizados, asimismo, está aumentando como alternativa para las personas intolerantes a la lactosa o alérgicas a la proteína de la leche y dietas vegetarianas.

Tufarelli y Laudadio⁵³ indican los crecientes problemas de salud a nivel mundial, la eficacia de los probióticos, la globalización, el aumento de la diversidad étnica e ingredientes alimentarios más nutritivos, como algunos de los factores clave para el crecimiento del mercado de probióticos, con ello mencionan, que la tecnología alimentaria ha desarrollado carácter dinámico y han aumentado nuevos alimentos, entre ellos los alimentos funcionales, incluidos probióticos y prebióticos. El-Enshasy y Yang⁵⁴ comentan que el concepto de alimentos funcionales fue introducido por primera vez por investigadores japoneses en 1984 quienes descubrieron la correlación entre la nutrición, la calidad sensorial y la modulación del sistema fisiológico. Desde entonces, se han introducido muchos alimentos funcionales en los mercados mundiales y se han convertido en un componente importante del comercio.

Rondón et al⁵⁵ mencionan que las principales especies de probióticos que se integran en alimentos son bacterias capaces de producir ácido láctico y que pertenecen a los siguientes géneros: *Lactobacillus*; utilizados en la fermentación de alimentos y *Bifidobacterium*; gérmenes anaerobios estrictos. Sgouras⁵⁶ menciona que se emplean organismos bacterianos, como *Saccharomyces boulardii* y bacterias no patógenas como *Streptococcus*, *E. coli* Nissle y *Bacillus*. Otros autores exponen que *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* son capaces de colonizar el tracto digestivo de cerdos recién nacidos y reducir la presencia de otros microorganismos que pudieran ser potencialmente patógenos. Estas bacterias benéficas están disponibles al consumidor en forma de:

- Suplementos dietéticos y alimentos con probióticos como, algunos jugos y bebidas de soja, leche fermentada y sin fermentar, yogur, suero de leche, algunos quesos blandos, miso, kéfir y muchos encurtidos.

Opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52.2 (2012), 183–99 <<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499779>>.

⁵³ TUFARELLI, Vincenzo and LAUDADIO, Vito. AN OVERVIEW ON THE FUNCTIONAL FOOD CONCEPT: PROSPECTIVES AND APPLIED RESEARCHES IN PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYNBIOTICS. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4.3 (2016) <[https://doi.org/10.18006/2016.4\(3S\).273.278](https://doi.org/10.18006/2016.4(3S).273.278)>.

⁵⁴ El-Enshasy and Yang. Op. cit., p. 21.

⁵⁵ RONDON, Lisett; et al. Probióticos: Generalidades', *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78.4 (2015), 123–28 <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=367945817006>> [accessed 30 August 2021].

⁵⁶ SGOURAS, Dionyssios N, et al. Pathogenesis of Helicobacter Pylori Infection', *John Wiley & Sons Ltd*, 2015 <<https://doi.org/10.1111/hel.12251>>.

- Suplementos nutracéuticos, suplementos probióticos, que están disponibles en forma de cápsulas, tabletas, polvos y extractos líquidos.

3.1.1. Importancia y selección de probióticos. Pérez-Sánchez⁵⁷ contemplan el uso de probióticos en diferentes campos y se considera un enfoque moderno, no solo desde el punto de vista terapéutico para evitar los impactos adversos de los medicamentos, sino también una alternativa nutricional y conservadora de alimentos. Walsh⁵⁸ indica que después de la administración, los probióticos tienen la facultad de colonizar, multiplicarse y mediante mecanismos fisiológicos sintetizar metabolitos, amino ácidos y ácidos carboxílicos (ácido láctico, ácido butírico, ácido cítrico y ácido acético). Muchos investigadores consideraron la aplicación de microorganismos benéficos como una estrategia para modular diferentes sistemas biológicos como: la composición de la microbiota intestinal, mejorar la inmunidad⁵⁹, obtener un mayor crecimiento y digestión, aumentar la resistencia a enfermedades en varias especies pecuarias y en seres humanos⁶⁰, y la bioconservación de alimentos sustituyendo de esta manera conservadores convencionales⁶¹.

Se han realizado un gran número de investigaciones sobre la identificación y selección de microorganismos como probióticos. Para lograr este objetivo la mayoría de los estudios han seguido varios pasos para el aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos potenciales mediante el empleo de herramientas moleculares, microbiológicas, bioquímicas y tecnológicas, como los enunciados por El- Enshasy y Yang⁶²:

- Aislamiento de cepas de una fuente adecuada (las destinadas al consumo humano deben ser de origen humano).
- Identificación fenotípica y genotípica.
- Evaluación de la seguridad de las cepas identificadas.
- Conformidad de las posibles cepas probióticas con los criterios de selección preliminares.

⁵⁷ PEREZ-SANCHEZ, Tania, Et al. Probiotics in Aquaculture: A Current Assessment', *Reviews in Aquaculture*, 5 (2013), 1–14 <<https://doi.org/10.1111/raq.12033>>.

⁵⁸ WALSH, Aaron M et al. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir', *MSystems*, 1.5 (2016) <<https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00052-16>>.

⁵⁹ LAZADO, Carlo, CAIPANG, Marlowe A. AND ESTANTE, Erish G. Prospects of Host-Associated Microorganisms in Fish and Penaeids as Probiotics with Immunomodulatory Functions', *Fish Shellfish Immunol*, 45.1 (2015), 2–12 <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>>.

⁶⁰ SANDERS, M. E. et al. Probiotics for Human Use', *Nutrition Bulletin*, 43.3 (2018), 212–25 <<https://doi.org/10.1111/NBU.12334>>.

⁶¹ SORNPLANG, Pairat AND PIYADEATSOONTORN, Sudthidol. Probiotic Isolates from Unconventional Sources: A Review', *Journal of Animal Science and Technology*, 58.1 (2016) <<https://doi.org/10.1186/S40781-016-0108-2>>.

⁶² EL-ENSHASY and YANG. Op. Cit. 29.

- Justificación de propiedades saludables específicas asociadas con los probióticos mediante un modelo de prueba in vitro, in vivo y ex vivo verificable y repetible.
- Compatibilidad de posibles cepas probióticas con aplicaciones tecnológicas (es decir, fermentación, secado por aspersión o liofilización, competitividad con otras microfloras del alimento en cuestión).

WGO⁶³ define los requisitos de los probióticos comerciales y el contenido de los criterios de la siguiente manera:

- Identificación y nomenclatura de género y especie.
- Designación de cepa.
- Viabilidad de cada cepa a lo largo de la vida útil.
- Condiciones de almacenamiento recomendadas.
- Condiciones para un uso seguro.
- Nivel recomendado de ingestión para efectos sobre la salud previstos.
- Descripción del efecto fisiológico en la medida en que lo permitan las legislaciones.
- Canales de comunicación para la vigilancia después de la comercialización.

3.2. PREBIÓTICOS

Rai y Bai⁶⁴ expresan que todos los componentes de los alimentos independientemente de su naturaleza química capaces de llegar al tracto intestinal sin degradación, estimular el crecimiento de especies microbianas en el intestino y promover una composición saludable intestinal, son considerados prebióticos, se clasifican como ingredientes alimentarios funcionales en las categorías de fructanos de tipo inulina y fructooligosacáridos sintéticos (fibras no digeribles). Hutkins⁶⁵ indica que el consumo y aplicación de probióticos y prebióticos combinados, tiene mejores efectos en la salud que su consumo individual, además, mejora la viabilidad de los probióticos en el almacenamiento y durante su paso por el tracto gastrointestinal.

El-Enshasy y Yang⁶⁶, explican que normalmente, la inulina se obtiene en mayor parte de la planta achicoria (*Cichorium intybus*), y sirve en la naturaleza como un carbohidrato de reserva energética producido por más de 36.000 plantas, pertenece a la clase general de carbohidratos llamados fructanos que contienen polímeros de fructosa. Hutkins⁶⁷ asegura este prebiótico como un ingrediente alimentario

⁶³ GWO. Op. cit., p. 56.

⁶⁴ RAI, Avishankar AND BAI, Jamuna A. *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*, 2014 <<https://doi.org/10.1201/b17912>>.

⁶⁵ HUTKINS, Robert, *Microbiology and Technology of Fermented Food*, Wiley Blac (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2019), II.

⁶⁶ EL-ENSHASY and YANG. Op. cit., p. 17.

⁶⁷ HUTKINS, II. Op. cit., p. 143.

funcional natural que se encuentra como suplemento adicional en alimentos dietéticos, productos lácteos, leche, yogur, helados y cremas. Rai y Bai⁶⁸ caracterizan la inulina como prebiótico por atravesar el estómago y duodeno sin ser digerida, por tanto, está disponible para la microflora intestinal, así, favorece el crecimiento de bacterias en el intestino humano y animal, mejorando la salud del huésped y funciones metabólicas.

Por otra parte, Sierre y Guillen⁶⁹ articulan las maltodextrinas como aquellos carbohidratos derivados por hidrólisis parcial ácida y/o enzimática del almidón de papa, arroz o maíz integrados por polisacáridos nutritivos, no dulces, constituidos por una mezcla de carbohidratos con diferentes grados de polimerización, se presentan en forma de polvo blanco clasificadas como ingredientes GRAS. Tienen una gran variedad de aplicaciones principalmente en la industria alimenticia y farmacéutica, Cruz⁷⁰ señala que funcionan como: agentes estabilizantes, espesantes, extensores, reemplazadores de grasa en derezos y agentes encapsulantes y su utilización se debe a sus propiedades para controlar textura, higroscopicidad, buena solubilidad, capacidad de formar películas, bajo costo y mejorar la estabilidad del producto. Además, Rios-Aguirre y Gil-Garzón⁷¹ recomiendan la maltodextrina como material de microencapsulación de probióticos.

3.2.1. Inulina. Lara et al⁷² mencionan el origen de la obtención de la inulina en el año de 1804 cuando un científico alemán al hacer investigación en plantas, aisló por primera vez inulina a partir de *Inula helenium*, además la describe como un polisacárido tipo fructano, es decir compuesto de unidades de fructosa presente en numerosas especies vegetales como por ejemplo achicoria (*Cichorium intybus*), diente de león (*Taraxacum officinale*), dalia (*Dahlia* sp) entre otros. Además, es un agente con propiedades prebióticas.

Por su parte De Araújo et al⁷³ manifiestan que la inulina además de brindar un efecto protector a los microorganismos sometidos a altas temperaturas, secado por aspersión, los protege durante su paso por el tracto gastrointestinal y

⁶⁸ RAI and BAI. Op. cit., p. 180-181.

⁶⁹ SIERRE AMES, Paola Lisette and GUILLEN SULLCA, Jenny Margoth. EVALUACION DE LA VIABILIDAD DEL *Lactobacillus* Spp. ENCAPSULADO EN MALTODEXTRINA COMO PROBIÓTICO EN EL JUGO DE AGUAYMANTO' (Universidad Nacional del Centro del Perú, 2017) <<http://hdl.handle.net/20.500.12894/1591>> [accessed 5 September 2021].

⁷⁰ CRUZ RAMOS, Rubi. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS MICROENCAPSULADAS BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN UN SISTEMA DINÁMICO', 2015.

⁷¹ RIOS-AGUIRRE, sara AND GIL-GARZÓN, Maritza Andrea. Microencapsulación Por Secado Por Aspersión de Compuestos Bioactivos En Diversas Matrices: Una Revisión', *Tecnológicas*, 24.51 (2021), e1836 <<https://doi.org/10.22430/22565337.1836>>.

⁷² Marco Lara-Fiallos and others, 'Tecnología Química.', *Tecnología Química*, 37.2 (2017), 352–66 <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852017000200016>.

⁷³ DE ARAÚJO, Natalia; et al. Técnicas Para La Microencapsulación de Probióticos y El Impacto En Su Funcionalidad: Una Revisión', *Alimentos Hoy*, 23.36 (2015), 112–26.

adicionalmente es un prebiótico, es decir, es un carbohidrato no digerible que estimula selectivamente las cepas probióticas ayudándolas a sobrevivir e implantarse en el intestino.

3.2.2. Maltodextrina. La maltodextrina es obtenida por hidrólisis enzimática o ácida del almidón y generalmente muestra una alta solubilidad en agua, sabor neutro, bajo costo, baja viscosidad a altas concentraciones y capacidad de proteger el material encapsulado de la oxidación, las maltodextrinas se han usado ampliamente para la microencapsulación de alimentos debido a su bajo costo, alta solubilidad y baja viscosidad a altas concentraciones⁷⁴.

Por otra parte, en la microencapsulación se necesitan unos agentes protectores de microorganismos probióticos como son los oligosacáridos tipo jarabe de maíz, sacarosa y maltodextrina, donde esta última se utiliza principalmente como material pared en técnicas de secado por aspersión por su efecto protector frente a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos⁷⁵.

3.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Hutkins⁷⁶ y Jan et al⁷⁷ afirman que las cepas probióticas destinadas al consumo humano y animal deben tener el estado Presunción Calificada de Seguridad (QPS) por la EFSA Official Journal o Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) bajo las secciones 201 (s) y 409 de la Federal Food, Drug, and Cosmetic Act; Varias cepas de bacterias ácido lácticas han recibido el estatus GRAS o QPS ya que se han usado de manera segura durante mucho tiempo sin ningún informe de problemas asociados con el consumo de alimentos que contienen estas bacterias.

Nácher-Vázquez⁷⁸ se refirió a la importancia de reconocer que el término, Bacterias Ácido Lácticas, no tiene un estatus oficial en taxonomía, más bien, es un término general para describir un grupo de bacterias relacionadas funcional y genéticamente. Hutkins⁷⁹ define las bacterias ácido lácticas como un grupo de bacilos y cocos Gram-positivos, productores de ácido láctico, con bajo porcentaje de G + C, no formadores de esporas como se puede ver en el Cuadro 1 y Figura 1.

⁷⁴ RIOS-AGUIRRE and GIL-GARZÓN Op. Cit., p. 9-10.

⁷⁵ DE ARAÚJO, et al. Op. Cit., p.116.

⁷⁶ HUTKINS, II. Op. cit. p. 56

⁷⁷ JAN, Alexander; et al. Scientific Opinion on a Qualified Presumption of Safety (QPS) Approach for the Safety Assessment of Botanicals and Botanical Preparations', *EFSA Journal*, 12.3 (2014), 38 <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3593>>.

⁷⁸ NÁCHER-VÁZQUEZ, Montserrat. DEXTRANOS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES' (Universidad de Valencia, 2015) <<http://digital.csic.es/handle/10261/129967>> [accessed 3 September 2021].

⁷⁹ HUTKINS, II. Op. Cit. p. 39.

Thatoi et al⁸⁰ y Hutkins⁸¹ describen una de las principales razones para utilizar las BAL y se debe a su capacidad probiótica mediante la producción de componentes antimicrobianos, antioxidantes, péptidos, ácido láctico, exopolisacáridos y otros productos finales metabólicos a partir de las fuentes de energía en su medio, mencionan que existen dos vías fermentativas, la vía homofermentativa, donde más del 90% del sustrato se convierte exclusivamente en ácido láctico y la vía heterofermentativa, que da como resultado cuatro productos finales: ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono e infieren que la mayor parte de las BAL poseen una u otra de estas dos vías, es decir, son homofermentativas estrictas o heterofermentativas estrictas. Sin embargo, hay algunas especies del género *Lactobacillus* que tienen las dos vías metabólicas llamadas, heterofermentativas facultativas como se puede observar en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Características comunes de Bacterias Ácido Lácticas

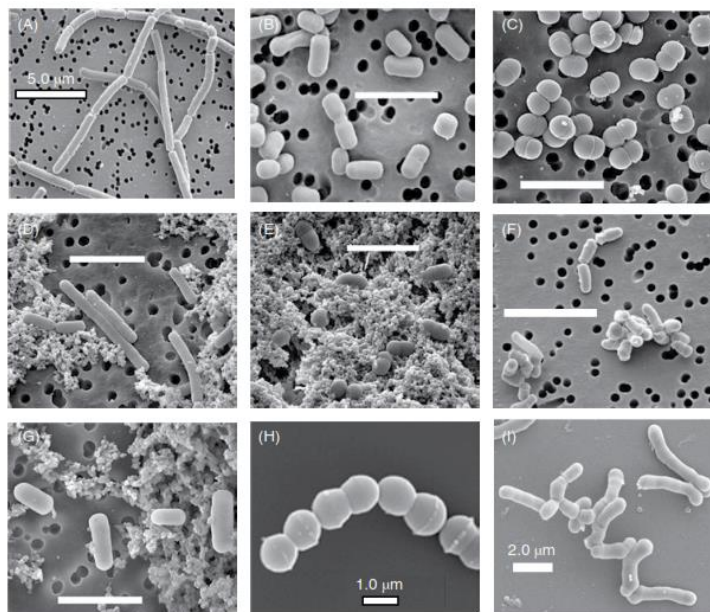
Características comunes
Gram-positivas
Fermentadoras
Catalasa negativa
Anaerobia Facultativa
No formadora de esporas
Bajo porcentaje de G+C (<i>Guanina y Citosina</i>)
Inmóvil
Tolerante al ácido

Fuente: HUTKINS, Robert, *Microbiology and Technology of Fermented Food*, Wiley Blac (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2019), II

⁸⁰ THATOI, Hrudayanath et al. *Microbial Fermentation and Enzyme Technology, Microbial Fermentation and Enzyme Technology* (CRC Press, 2020) <<https://doi.org/10.1201/9780429061257>>.

⁸¹ HUTKINS, II. Op. Cit. p. 47.

Figura 1. Microfotografía electrónica de BAL y bacterias relacionadas



A). *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; B). *L. brevis*; C). *Pediococcus pentosaceus*; D). *L. casei*; E). *Lactococcus lactis*; F). *Brevibacterium linens*; G). *L. helveticus*; H). *Streptococcus thermophilus*; I). *Bifidobacterium adolescentis*

Fuente: HUTKINS, Robert, *Microbiology and Technology of Fermented Food*, Wiley Blac (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2019).

Cuadro 2. Bacterias ácido Lácticas y sus propiedades

Género	Morfología celular	Ruta de fermentación
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	Homofermentativa/Heterofermentativa
<i>Lactococcus</i>	Coco	Homofermentativa
<i>Leuconostoc</i>	Coco	Heterofermentativa
<i>Streptococcus</i>	Coco	Homofermentativa
<i>Enterococcus</i>	Coco	Homofermentativa
<i>Carnobacterium</i>	Bacilos	Heterofermentativa

Fuente: HUTKINS, Robert, *Microbiology and Technology of Fermented Food*, Wiley Blac (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2019), II.

Korczy y Varga⁸² sostienen que las BAL tienen la capacidad de producir exopolisacáridos (EPS), cuya función es proteger las bacterias en el medio ambiente de factores como: metales tóxicos, factores inmunes, ataque de fagos, desecación, condiciones gastrointestinales, pH, sales biliares, enzimas gástricas y pancreáticas. El-Enshasy y Yang⁸³ expresan que, dentro de la industria alimentaria, se utilizan cepas productoras de EPS, debido a que los polímeros mejoran la viscosidad y la textura de los productos, además, los EPS podrían desempeñar un papel en la formación de biopelículas y la interacción con las células epiteliales intestinales, por tanto, se los considera responsables de varios beneficios atribuidos a los probióticos.

3.3.1. Clasificación taxonómica y características de *Lactobacillus casei*. Hill et al⁸⁴ mencionan la existencia de más de 250 especies y subespecies en el género *Lactobacillus* incluidas en la “List of prokaryotic names with standing in nomenclature”, se caracterizan por tener forma de bastones que van desde 1,5 µm hasta 10 µm, además, los autores describen la clasificación taxonómica (Cuadro 3). Hutkins⁸⁵ indica que las especies atribuidas a este género regularmente se aíslan de alimentos fermentados, frutas, carne, masa fermentada, verduras, vino, lácteos, tracto gastrointestinal, mucosas de humanos y animales.

Cuadro 3. Clasificación taxonómica *Lactobacillus casei*

Clasificación Taxonómica	
Reino	Bacteria
Clase	Bacilo
Orden	Lactobacillales
Familia	Lactobacillaceae
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>L. casei</i>

Fuente: NÁCHER-VÁZQUEZ, Montserrat. DEXTRANOS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES (Universidad de Valencia, 2015) <http://digital.csic.es/handle/10261/129967>

⁸² KORCZY, Evelin and VARGA, László. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Techno-Functional Application in the Food Industry', *Trends in Food Science and Technology*, 2021, 375–84 <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>>.

⁸³ El-Enshasy and Yang. Op. Cit. p. 12.

⁸⁴ HILL, Daragh et al. The *Lactobacillus Casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*, 2018 <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>>.

⁸⁵ Hutkins, II. Op. Cit. 67.

Gobbeti y Minervini⁸⁶ hablan de *Lactobacillus casei* como una bacteria Gram positiva, inmóvil, no formadora de esporas, catalasa negativa, en forma de bastones con una variación de 0,7–1,1 µm x 2,0–4,0 µm, que se presentan individualmente, en pares o en cadenas y proponen que la pared celular contiene peptidoglicano L-Lys-d-Asp y polisacáridos, determinantes en la especificidad serológica (B o C) sobre el contenido de ramnosa o glucosa-galactosa y el contenido de G + C del ADN es del 45 al 47%.

La nomenclatura aceptada actualmente y la división taxonómica del grupo *L. casei* es la siguiente: (1) *L. casei* (cepa tipo: ATCC 393 TM); (2) *L. paracasei* subsp. *paracasei* (cepa tipo: ATCC 25302 TM) y *L. paracasei* subsp. *tolerans* (cepa tipo: ATCC 25599 TM); y (3) *Lactobacillus rhamnosus* (cepa tipo: ATCC 25599 TM)⁸⁷.

Gobbeti y Minervini⁸⁸ anuncian que las especies del grupo *L. casei* pueden aislarse no solo de la leche y los productos lácteos, sino también de carne, embutidos, verduras y vinos, además de los alimentos, las cepas del grupo *L. casei* pueden aislarse del tracto reproductivo, gastrointestinal (GI) y las heces de humanos y animales, lo que explica su gran uso como probióticos. En general, Jones⁸⁹ plantea a *L. casei* como resistentes a valores bajos de pH y recomiendan el medio de cultivo MRS incubado a 37 °C o 42 °C.

Hutkins⁹⁰ y Thatoi et al⁹¹ caracterizan a *L. casei* por ser lactobacilos heterofermentativos facultativos, donde, las hexosas (galactosa, glucosa y fructosa), se convierten casi por completo en ácido láctico a través de la vía de Embden-Meyerhof bajo condiciones de limitación de carbohidratos, además del ácido láctico se producen principalmente ácido acético y etanol, seguidos de ácido butírico, diacetilo y ácido fórmico.

3.4. EXOPOLISACÁRIDOS (EPS).

Correa et al⁹² mencionan que los exopolisacáridos (polímeros de carbohidratos), pueden llegar a modificar consistencia y estructura del medio, son producidos y

⁸⁶ GOBBETTI, M and MINERVINI, F. *Lactobacillus Casei* General Characteristics of the Species. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2014, 432–38 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00180-4>>.

⁸⁷ Ibid., p. 7.

⁸⁸ Ibid., p. 56.

⁸⁹ JONES, R. M. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology The Use of *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus Paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health', in *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 2017, pp. 99–108 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9/00009-4>>.

⁹⁰ HUTKINS, II. Op. cit., p. 89.

⁹¹ THATOI et al. Op. cit., 78.

⁹² CORREA OLIVAR, Gabriela AND BATISTELA. Virginia. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN EXOPOLISACÁRIDO (EPS) DE LA CEPA AUTÓCTONA *Lactobacillus Fermentum* LF2', XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de La Universidad Nacional Del Litoral, 2017

excretados por algunas BAL, los EPS presentan propiedades emulsionantes, espesantes y gelificantes, reduce la sinéresis (separación de mezcla) y mejora las propiedades reológicas (viscosidad) del yogurt, asimismo, suelen ejercer efectos benéficos para la salud del consumidor, estos son algunos de los motivos por los cuales son utilizados dentro de las industrias lácteas.

Empleando las palabras de Vázquez⁹³, las BAL producen EPS diferentes en cuanto a su composición (diferentes tipos de enlaces y monosacáridos), estructura (ramificaciones diferenciadas por grados), masa molecular y conformación estructural, clasificados conforme a su composición en homopolisacáridos (HoPS), formados por un único tipo de monosacárido y heteropolisacáridos (HePS), formados por dos o más tipos de monosacáridos.

3.4.1. Homopolisacáridos – HoPS. Como lo expresan Rühmkorf et al⁹⁴ y Amari et al⁹⁵ los HoPS son formados por un único tipo de monosacárido repetido que pueden ser; glucosa, fructosa o galactosa, formando a su vez glucanos, fructanos o galactanos, respectivamente. Los HoPS normalmente se desarrollan mucho más molecularmente que los HePS. Los HoPS más ampliamente producidos son alfa- y beta-glucanos y han sido descritos en los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus* y *Weissella*. Zamudio⁹⁶ señala que algunas BAL tienen la capacidad de sintetizar, a partir de sacarosa, homopolisacáridos denominados dextranos, enlaces alfa-(1,6) en su cadena principal y con ramificaciones alfa-(1,3), alfa-(1,4) y/o alfa-(1,2) a base de glucosa.

3.4.2. Heteropolisacáridos HePS. Zamudio⁹⁷ caracteriza los HePS como EPS formados por algunas bacterias que están constituidos por dos o más tipos de monosacáridos, que pueden llevar unidas otras moléculas, sin olvidar que varias enzimas están implicadas en su síntesis y polimerización.

Desde la posición de Nácher-Vázquez et al⁹⁸ los HePS son: “Monosacáridos que se encuentran de forma más habitual, tanto en bacterias lácticas como en miembros

<<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1986/8.2.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [accessed 27 October 2021].

⁹³ NÁCHER-VÁZQUEZ Op. Cit., p. 10-11.

⁹⁴ RÜHMKORF, Christine. Identification of *Lactobacillus Curvatus* TMW 1.624 Dextranase and Comparative Characterization with *Lactobacillus Reuteri* TMW 1.106 and *Lactobacillus Animalis* TMW 1.971 Dextranases', *Food Microbiology*, 34.1 (2013), 52–61 <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.002>>.

⁹⁵ AMARI, Myriam et al. Characterization of a Novel Dextranase from *Weissella Confusa* Isolated from Sourdough', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97.12 (2013), 5413–22 <<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4447-8>>.

⁹⁶ ZAMUDIO MALPARTIDA, Karen Lucia, 'Lactobacilos Nativos Productores de Exopolisacáridos de Interés Biotecnológico' (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2005) <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/1277>>.

⁹⁷ Zamudio Malpartida. Ibid., p. 67.

⁹⁸ NÁCHER-VÁZQUEZ. Op. Cit. p. 29.

del género *Bifidobacterium*; son glucosa, galactosa y ramnosa. También se detectan con cierta frecuencia monosacáridos Nacetilados (N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina) y, de forma poco abundante, fructosa y manosa. Estos azúcares pueden a su vez estar modificados por otros componentes orgánicos o inorgánicos (acetilo, glicerol, fosfato, etc.).”

Jones⁹⁹ menciona como una de las características de las cepas del grupo *L. casei* aisladas de varios hábitats, la producción de colonias mucoides y viscosas conocidos como EPS. Korcz y Varga¹⁰⁰ señalan la producción de EPS como un rasgo deseable en las bacterias del ácido láctico utilizadas como iniciadores para productos lácteos fermentados. El-Enshasy y Yang¹⁰¹ mencionan que los EPS facilitan la colonización del tracto gastrointestinal por bacterias probióticas del ácido láctico y suelen estar compuestos de glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa, además, se han reportado efectos saludables por EPS, como propiedades inmunosupresoras, actividades antiproliferativas en células de carcinoma de colon humano y la capacidad de reducir la citotoxicidad de algunos agentes genotóxicos.

3.5. MICROENCAPSULACIÓN

Hutkins¹⁰² sugiere prestar atención en la viabilidad de los probióticos al momento de la aplicación y acción, no obstante, muchos factores como las condiciones alimentarias (pH, peróxido de hidrógeno, concentración de oxígeno), el sistema digestivo del huésped (condiciones muy ácidas del estómago, enzimas y sales biliares en el intestino delgado), y condiciones ambientales, pueden afectar la viabilidad. Rai y Bai¹⁰³ explican que estos microorganismos benéficos tienen una gran aplicación, pero es necesario un número mínimo de Unidades Formadoras de Colonias (1×10^7 UFC) para que se garanticen los beneficios del probiótico.

Según Rai y Bai¹⁰⁴ de todos los métodos biotecnológicos investigados, la microencapsulación es el proceso que permite la protección de probióticos mediante el empaquetado de microorganismos en pequeñas cápsulas que se liberan a velocidades controladas. El-Enshasy y Yang¹⁰⁵ anuncian la microencapsulación como el proceso que protege los probióticos contra factores ambientales adversos, mejora su capacidad de supervivencia y mantiene la viabilidad expresada en UFC al máximo correspondiente, a al menos la concentración mínima necesaria para entregar sus efectos beneficiosos al huésped.

⁹⁹ JONES. Op. Cit. p. 12.

¹⁰⁰ KORCZ and VARGA. Op. Cit. P. 34.

¹⁰¹ EL-ENSHASY and YANG. Op. Cit. p. 37.

¹⁰² HUTKINS, II. Op. Cit. p.11

¹⁰³ RAI and BAI. Op. Cit. p. 89

¹⁰⁴ Ibid., p. 27.

¹⁰⁵ EL-ENSHASY and YANG. Op. Cit. p. 19-56

Como lo mencionan los autores Murúa et al¹⁰⁶ y Mesías y Orbes¹⁰⁷ la utilización de probióticos en alimentación se ve afectado en mayor parte por el tracto digestivo, por otra parte, la microencapsulación puede llegar a proteger el material microencapsulado, dicho lo anterior, Kent y Doherty¹⁰⁸ afirman que un material encapsulante sea exitoso en probióticos, debe propiciar la viabilidad celular de los probióticos durante y después de los procesos de microencapsulación y ser compatible con el sistema alimentario al que se va a incluir. Además, Martín et al¹⁰⁹ mencionan que es necesario tener presente, los factores físicos como la temperatura, humedad y agitación que afectan su supervivencia, las condiciones de procesamiento y conservación del producto.

Shokri et al¹¹⁰ Avila Reyes et al¹¹¹ Rajam y Anandharamakrishnan¹¹² hablan acerca de la microencapsulación de probióticos donde se necesitan unos agentes protectores como son los oligosacáridos tipo jarabe de maíz, sacarosa y maltodextrina, donde esta última se utiliza principalmente como material pared en técnicas de secado por aspersión por su efecto protector frente a altas temperaturas y como agente estimulante del crecimiento de probióticos, además, Sánchez¹¹³ hace una evaluación de inulina para microencapsular *L. casei* obteniendo como

¹⁰⁶ MURUA, beneranda. Evaluación de La Supervivencia Del Probiótico Lactobacillus Casei ATCC334 En Forma Libre y Microencapsulado Adicionado a Una Crema Ácida Baja En Grasa Durante Su Almacenamiento En Refrigeración y En Condiciones Simuladas Del Tracto Gastrointestinal', *Digital Ciencia, Universidad Autónoma de Querétaro*, 2016, 1–15 (p. 13) <http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v9-n1/QUIM-2.pdf>.

¹⁰⁷ MESÍAS PANTOJA, Laura Nathaly AND ORBES VILLACORTE, Adriana Elisabeth, 'EVALUACIÓN in Vivo DE Lactobacillus Plantarum ATCC® 8014 Y Lactobacillus Casei ATCC® 334 CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS EN LA ALIMENTACIÓN DE CUYES (Cavia Porcellus) EN FASE DE LEVANTE COMO ALTERNATIVA AL USO DE ANTIBIÓTICOS' (Universidad de Nariño, 2016) <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS - RJ/RBG/RBG 1995 v57_n1.pdf%0Ahttps://periodicos.ufpe.br/revistas/rbgfe/article/view/234295>.

¹⁰⁸ ROBERT M KENT AND SINÉAD B DOHERTY, 'Probiotic Bacteria in Infant Formula and Follow-up Formula: Microencapsulation Using Milk and Pea Proteins to Improve Microbiological Quality', *FRIN*, 64 (2014), 567–76 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.029>>.

¹⁰⁹ MARÍA JOSÉ MARTÍN AND OTHERS, 'Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects', 27 (2014), 15–25 <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>>.

¹¹⁰ ZAHRA SHOKRI et al. Factors Affecting Viability of Bifidobacterium Bifidum during Spray Drying', *DARU Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 23.7 (2015).

¹¹¹ SANDRA V AVILA-REYES AND OTHERS, 'Protection of L. Rhamnosus by Spray-Drying Using Two Prebiotics Colloids to Enhance the Viability', *Carbohydrate Polymers*, 102 (2014), 423–30 <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>>.

¹¹² RAJAM AND C. ANANDHARAMAKRISHNAN, 'Microencapsulation of Lactobacillus Plantarum (MTCC 5422) with Fructooligosaccharide as Wall Material by Spray Drying', *Lwt*, 60.2 (2015), 773–80 <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>>.

¹¹³ MARIA DEL RAYO SANCHEZ HERNANDEZ, 'Evaluación de Mezclas de Inulina, Maltodextrina y Goma Arábica Para La Microencapsulación de L. Casei' (Universidad de las Americas Puebla, 2010).

resultado una estimulación en su crecimiento y teniendo una mayor producción de ácido láctico.

3.5.1. Microencapsulación por Spray Drying. Rai y Bai¹¹⁴ exponen el spray drying o secado por aspersión como un proceso de rutina en la industria alimentaria para convertir líquidos en polvos secos, el cual implica la atomización de una suspensión acuosa de probióticos y materiales de encapsulación en un recipiente con una boquilla en gas caliente, lo que resulta en la rápida evaporación del agua. Ríos-Aguirre y Gil-Garzón¹¹⁵ indican algunas de las ventajas del secado por aspersión, como la rapidez, el costo relativamente bajo del proceso y la viabilidad de los probióticos encapsulados, que se pueden lograr mediante el ajuste y el control adecuado de las condiciones de procesamiento, especialmente las temperaturas de entrada y salida del aire de secado.

Rai y Bai¹¹⁶ y Ríos-Aguirre y Gil-Garzón¹¹⁷ inciden que para mejorar la supervivencia de las BAL se pueden agregar protectores o matrices antes del secado, y recomiendan que las matrices tengan propiedades prebióticas como los son inulina y maltodextrina, su inclusión, puede mejorar la estabilidad y viabilidad del microencapsulado.

3.5.2. Microencapsulación por emulsión. Se basa en aislar una fase acuosa donde están los *Lactobacillus*, por medio de una fase oleosa que la rodea. Usando para esto aceite vegetal de soja, maíz y otros. Se homogeniza y se forma una emulsión entre agua y aceite¹¹⁸.

3.5.3. Microencapsulación por extrusión. Consiste en hacer pequeñas gotas de la suspensión bacteriana que se hacen gotear sobre una solución de endurecimiento. En esta se emplean disolventes no dañinos para las bacterias y se puede hacer en condiciones aerobias y anaerobias y se puede producir a gran escala¹¹⁹.

3.5.4. Microencapsulación spray cooling o spray chilling. En este método se emplea aire frío para solidificar la partícula y se inyecta en un recipiente a través de

¹¹⁴ RAI AND BAI Op. Cit., p. 240.

¹¹⁵ RIOS-AGUIRRE and GIL-GARZÓN.

¹¹⁶ Rai and Bai Op. Cit., p. 241. Op. Cit. 88

¹¹⁷ RIOS-AGUIRRE and GIL-GARZÓN. Op. Cit. 45

¹¹⁸ PAUL DE VOS AND et al. Encapsulation for Preservation of Functionality and Targeted Delivery of Bioactive Food Components', *International Dairy Journal*, 20.4 (2010), 292–302 (p. 295) <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>>.

¹¹⁹ CHANDRAMOULI, et al. An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect *Lactobacillus* Spp. in Simulated Gastric Conditions', *Journal of Microbiological Methods*, 56.1 (2004), 27–35 <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002>>.

una boquilla una matriz fundida. Tiene la ventaja de emplear bajas temperaturas y puede ofrecer esta ventaja en el manejo de microorganismos¹²⁰.

3.5.5. Método de liofilización. Utiliza la congelación del producto y luego separa el agua por sublimación, logrando así un producto seco. El inconveniente que se le ha encontrado es la posible pérdida de la actividad biológica de los microorganismos¹²¹.

3.5.6. Spray coating o pulverización. Aquí se usa un material liofilizado de microorganismos, luego es suspendido en el aire y la matriz de encapsulación es pulverizada sobre el mismo¹²².

3.6. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA (ETA)

Liu¹²³ se refiere a las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) o Toxiinfecciones Alimentarias como afecciones patológicas que resultan principalmente de la ingestión de alimentos crudos, preparados incorrectamente o contaminados por patógenos microbianos, toxinas u otros agentes tóxicos. Bridier¹²⁴ manifiesta que después de la ingestión de un alimento contaminado, los patógenos causan daños físicos y mecánicos directos al huésped, mientras que otros producen diversos factores de virulencia y toxinas que provocan respuestas inmunitarias del huésped. Buchanan¹²⁵ indica síntomas gastrointestinales y clínicos como: náuseas, vómitos, diarrea, calambres abdominales, hambre, dolores en las articulaciones o dolores de espalda y fatiga.

Bridier¹²⁶ y Liu¹²⁷ afirman que los factores de ETA son de origen viral, bacteriano, fúngico o parasitario que han demostrado y desarrollado la capacidad de sobrevivir y crecer en diversas matrices de alimentos, jugo de zanahoria pasteurizado, mantequilla de maní, pasteles congelados, pimientos picantes, pimienta blanca, masa para galletas, atún molido, cereales, papayas, lechuga, melón, frambuesas, lechuga, pollo, productos cárnicos y lácteos. Además, Buchanan¹²⁸ expresa las ETA

¹²⁰ DE VOS et al Op. Cit., p. 297.

¹²¹ DE VOS et al. , p.Op. Cit. 295.

¹²² CHAMPAGNE, C et al. Microencapsulation for the Improved Delivery of Bioactive Compounds into Foods, *Current Opinion in Biotechnology*, 18.2 (2007), 184–90 <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>>.

¹²³ LIU, Dongyou. *Handbook of Foodborne Diseases, Food Microbiology Series* (Boca Raton: CRC Press, 2018) <<https://doi.org/10.1201/b22030>>.

¹²⁴ BRIDIER, Arnaud. *Foodborne Bacterial Pathogens Methods*, ed. by Arnaud Bridier, Springer N (New York, NY: Springer Science, 2019) <<http://www.springer.com/series/7651>>.

¹²⁵ BUCHANAN, Robert L. *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management.*, *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management, Second Edition* (North Ryde: Springer Science, 2018) <<https://doi.org/10.1007/978-3-319-68460-4>>.

¹²⁶ BRIDIER. Op. Cit. p. 16

¹²⁷ LIU. Op. cit. p. 56

¹²⁸ BUCHANAN. Op. Cit. 12

como ubicuas, es decir, se pueden encontrar en superficies, instalaciones de procesamiento de alimentos, hospitales, polvo, tierra y agua. Tienen la capacidad de inducir cambios patológicos en el huésped humano después de la entrada a través de alimentos o aguas contaminadas.

Liu¹²⁹ y Buchanan¹³⁰ afirman que los microorganismos relacionados con ETA existen como organismos saprofitos u ubicuos (de vida libre) en el suelo, el agua y la materia orgánica, o como parásitos de plantas, animales y humanos, tales como *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella*, *Vibrio* spp., *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia* spp., *Mycobacterium bovis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *C. botulinum*, *Bacillus cereus* y *Streptococcus pyogenes*.

3.7. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* comprende actualmente más de 50 especies. Estas bacterias son ubicuas, habitantes normales de la piel y las membranas mucosas en muchas especies animales y en el humano. A pesar de su amplia distribución es un patógeno importante en las ETA, la salud humana y animal¹³¹.

Cuadro 4. Clasificación taxonómica *Staphylococcus aureus*

Clasificación Taxonómica	
Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>

Fuente: GRACE, Delia and FETSCH, Alexandra. Chapter 1 - *Staphylococcus Aureus*—A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview', in *Staphylococcus Aureus*, 2018, pp. 3–10 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809671-0.00001-2>.

El nombre de *Staphylococcus aureus* deriva de estafilo; racimo de uvas, kokkos; baya y *aureus*; oro en latín. Después de su aislamiento en humanos, se relacionó la presencia de coagulosa con su patogenicidad y junto a ello el método para diagnóstico¹³². Durante la segunda guerra mundial se descubrió la penicilina y su

¹²⁹ LIU, Op. cit., P.52.

¹³⁰ BUCHANAN, OP. CIT., P. 21.

¹³¹ FETSCH Op. cit., p.3.

¹³² LIU, Op. cit., p. 18.

uso como antibiótico de amplio espectro. La penicilina se normalizó en hospitales para usar sobre bacterias patógenas entre ellas *S. aureus*, sin embargo, el uso inadecuado de antibióticos reportó *S. aureus* resistente a metacilinas SARM (penicilinas sintéticas), ahora un problema de salud pública a nivel mundial¹³³.

Según Fetsch¹³⁴, a principios del siglo XXI se identificaron nuevas cepas de SARM en cerdos, bovinos, carne cruda, leche, derivados lácteos y humanos, las cepas identificadas fueron causas esporádicas de infecciones humanas en varios países, demostrando la capacidad evolutiva del microorganismo e incrementando su patogenicidad paralelamente al desarrollo de antibióticos.

Becker et al ¹³⁵ exponen que *S. aureus* al ser una bacteria patógena Gram-positiva, la clave está en el peptidoglicano más conocido como mureína, uno de los principales constituyentes de la pared celular. Además, el contenido de guanina-citosina (G + C), que es del 30-39% en los *Staphylococcus* y poseen ácidos teicoicos unidos al peptidoglicano.

Bustos y Salame¹³⁶ mencionan que la pared de celular *S. aureus* está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, un polímero polisacárido compuesto por cadenas con uniones de tipo beta-(1-4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido Nacetilmurámico y N-acetil glucosamina, las cadenas laterales de pentapéptidos se hallan conectadas al residuo de ácido murámico y tienen unión cruzada por un puente pentaglicina fijado a la L-lisina de una cadena y la D-Alanina de la otra cadena. El polímero polisacárido básico se halla también en muchos otros microorganismos, mientras la cadena de unión cruzada de pentaglicina parece ser específica de *S. aureus*. Tiene como función mantener la rigidez de la pared bacteriana y su resistencia osmótica. En la patogenia coadyuvará al desencadenamiento de la inflamación por activación del complemento, es capaz de atraer leucocitos polimorfonucleares (PMN), estimula la producción de anticuerpos opsonizantes y tiene actividad similar a las endotoxinas de Gram negativos. El otro componente mayor de la pared son los ácidos teicoicos, que constituyen alrededor del 40% del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces, D-alanina. Están unidos en forma covalente al peptidoglicano. Cuando están unidos a la membrana citoplasmática se les llama ácidos lipoteicoicos.

¹³³ BUCHANAN, Op. cit., p. 25.

¹³⁴ FETSCH. Op. Cit. p. 78

¹³⁵ KARSTEN BECKER, et al. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*, in *Manual Og Clinical Microbiology* (Washington DC, USA: ASM Press, 2019), xii, 367 <<https://doi.org/10.1128/9781683670438.MCM>>.

¹³⁶ BUSTOS CABRERA, ALICIA AND ORTÍZ, ANDREA SALAME. Prevalencia De *Staphylococcus Aureus* Meticilino Resistente, En Portadores Nasales En El Personal De La Salud, En Los Hospitales Públicos Y De La Seguridad Social En La Ciudad De Quito Y Su Relación Con Factores De Riesgo Individuales Y Laborales. (Universidad Central del Ecuador, 2015) <<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4730/1/T-UCE-0006-138.pdf>>.

Seija¹³⁷, afirma que “la pared celular de *S. aureus* posee una proteína característica llamada proteína A. Esta tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), y por tanto funciona como factor de virulencia, ya que interfiere con la ozonización y la ingestión de los microorganismos por los PMN, activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad inmediata y tardía. Esta proteína es inmunogénica y se hallan anticuerpos contra ella en sujetos con infecciones graves por *S. aureus*”.

3.7.1. Patogénesis de *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* causa un amplio rango de enfermedades en humanos y animales. Fetsch¹³⁸ expresa que en humanos puede provocar infecciones severas en la piel y el tejido blando, en algunos casos septicemia y localizarse en órganos, articulaciones, huesos y otras zonas corporales, en las localidades donde se desarrolla el sector lechero bovino, caprino y ovino; y manifiesta que *S. aureus* es una de las principales causas de mastitis, al mismo tiempo, es la principal causa en la elevación de costos de producción. Además, Bridier¹³⁹ anuncia a *S. aureus* como responsable de impétigo y dermatitis en vacas lecheras, ovejas y cabras y puede causar en aves de corral onfalitis, infecciones articulares y pata de gallo, en conejos se asocia con epidemias virulentas de abscesos cutáneos, mastitis y septicemia.

Los factores de virulencia de *S. aureus* incluyen antígenos patógenos y proteínas de superficie, enzimas secretadas, toxinas del síndrome de choque tóxico y proteínas que invaden o evitan el sistema inmunitario¹⁴⁰. Estas toxinas sirven principalmente para inhibir la respuesta inmune del huésped y / o producir nutrientes a partir del tejido local del huésped, además, las enterotoxinas estafilocócicas y las toxinas similares, se consideran los principales factores de virulencia, en particular en el contexto de la seguridad alimentaria¹⁴¹.

¹³⁷ VERONICA SEIJA, 'Temas de Bacteriología y Virología Médica', in *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 2012, pp. 257–72.

¹³⁸ FETSCH. Op. Cit. p. 34

¹³⁹ BRIDIER. OP. CIT. P. 56

¹⁴⁰ FETSCH. OP. CIT. 43

¹⁴¹ BUCHANAN. Op. Cit. p. 98

3.7.2. Enterotoxinas estafilocócicas (SE). Las enterotoxinas estafilocócicas son exotoxinas termoestables que pertenecen a una gran familia de superantígenos de toxinas pirogénicas (que producen fiebre). Estas potentes exotoxinas gastrointestinales son una de las principales causas de gastroenteritis después de consumir alimentos contaminados con toxinas preformadas. Las exotoxinas estafilocócicas y estreptococo pirógenas muestran similitudes estructurales y funcionales, así como homología de secuencia, y comparten una relación filogenética común. Estas toxinas son el factor de virulencia más notable de *S. aureus* y se sintetizan durante la fase logarítmica de crecimiento o cuando las bacterias hacen la transición de la fase exponencial a la estacionaria, y están implicadas con varias enfermedades alérgicas y autoinmunes además de la intoxicación alimentaria¹⁴².

Las SE funcionan como toxinas gastrointestinales y superantígenos que son capaces de causar actividad superantigénica, como inmunosupresión y proliferación masiva de células T inespecíficas. La mayoría de los genes que codifican SE se encuentran en elementos genéticos móviles, como plásmidos, bacteriófagos, transposones, región genómica variable vSaβ e islas de patogenicidad¹⁴³.

A continuación, se nombran algunas toxinas descritas por Fetsh¹⁴⁴ producidas por *S. aureus*:

3.7.2.1. Alfa toxina – alfa hemolisina. La toxina de *S. aureus* mejor caracterizada y la más potente es la toxina alfa. Se expresa como un monómero que se une a la membrana de las células susceptibles. Las subunidades luego se oligomerizan para formar anillos heptaméricos con un poro central a través del cual se filtran los contenidos celulares. En los seres humanos, las plaquetas y los monocitos son particularmente sensibles a la toxina alfa. Las células susceptibles tienen un receptor específico para la toxina alfa que permite que la toxina se una a los poros pequeños a través de los cuales pueden pasar los cationes monovalentes. El modo de acción de la alfa-hemolisina es probable por lisis osmótica.

3.7.2.2. Beta-toxina. Es una esfingomielinasa que daña las membranas ricas en este lípido. La prueba clásica para la beta-toxina es la lisis de eritrocitos de oveja. La mayoría de los aislamientos humanos de *S. aureus* no expresan beta-toxina. Se sabe que un bacteriófago lisogénico codifica la toxina.

3.7.2.3. Toxina delta. Es una toxina peptídica muy pequeña producida por la mayoría de las cepas de *S. aureus*. También es producido por *S. epidermidis*. El papel de la toxina delta en la enfermedad es desconocido.

¹⁴² LIU Op. Cit., p. 216 - 217.

¹⁴³ Ibid., p. 127.

¹⁴⁴ FETSCH OP. CIT., P. 22-23.

3.7.2.4. Leucocidina. Es una toxina proteica multicomponente producida como componentes separados que actúan conjuntamente para dañar las membranas. La leucocidina forma un poro transmembrana hetero-oligomérico compuesto por cuatro subunidades LukF y cuatro LukS, formando así un poro octamérico en la membrana afectada. La leucocidina es hemolítica, pero menos que la alfa hemolisina. Solo el 2% de todos los aislamientos de *S. aureus* expresan leucocidina, pero casi el 90% de las cepas aisladas de lesiones dermonecroticas graves expresan esta toxina, lo que sugiere que es un factor importante en las infecciones necrotizantes de la piel.

3.8. CONDICIONES GASTROINTESTINALES

Los compuestos administrados por vía oral encuentran diversas barreras en el tracto gastrointestinal antes de que se absorban y entren en el torrente sanguíneo. El tracto gastrointestinal (TGI) está integrado por las siguientes partes: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto y ano. El intestino delgado está compuesto por el duodeno, yeyuno e íleon y el intestino grueso está formado por el colon ascendente, colon transversal y colon descendente¹⁴⁵.

Es importante mencionar la composición principal de las secreciones gástrica, intestinal, biliar y pancreática del TGI. Mataix-Verdu¹⁴⁶ describe que la primera secreción está constituida principalmente de HCl, pepsina (la cual se activa a un pH óptimo de 3) y electrolitos como K^+ , Na^+ , Mg^{++} , fosfato (PO_4^{-3}) y sulfato (SO_4^{-2}). La segunda está integrada por HCO_3^- y K^+ . La tercera secreción está constituida por Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- y bilis (la cual está integrada por ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol). Por último, la secreción pancreática está compuesta mayoritariamente por Na^+ y HCO_3^- , además de enzimas como tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas, proelastasas y lipasas (Mataix-Verdú, 2009). Para poder valorar la liberación, viabilidad y resistencia de los probióticos encapsulados se han propuesto modelos gastrointestinales que simulan las condiciones del TGI, los cuales se clasifican en modelo convencional y modelos dinámicos. Estos últimos, se diferencian del primero por ser continuos¹⁴⁷.

Dichos sistemas incluyen modelos sencillos, donde las bacterias probióticas son tratadas de forma discontinua con soluciones acidas y posteriormente con soluciones de bilis hepática. Sin embargo, estos modelos simplifican el evento en el tracto gastrointestinal humano y están limitados en su capacidad para simular los aspectos dinámicos de los procesos *in vivo*. Por otra parte, sistemas más complejos

¹⁴⁵ JUAREZ-ROLDÁN, . R. AND M-T JIMENEZ-MUNGUÍA, 'Condiciones Gastrointestinales Modelo Utilizadas Para Evaluar Probióticos Encapsulados', *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7.2 (2013), 15–24.

¹⁴⁶ MATAIX VERDÚ, Francisco José. *Tratado de Nutrición y Alimentación: Situaciones Fisiológicas y Patológicas. Volumen 2*, 2nd edn (Madrid: Ergon, 2009) <<http://bibliotecadigital.unevt.edu.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=2288>> [accessed 20 October 2022].

¹⁴⁷ Ibid., p. 11

que simulan el tracto gastrointestinal humano permiten además estudiar las interacciones de las bacterias probióticas, la microbiota intestinal o determinar el efecto de las bacterias probióticas y productos simbióticos dentro del entorno microbiano intestinal¹⁴⁸.

3.8.1. Lisozima. La lisozima pertenece a la familia de las glicanhidrolasas e hidroliza los enlaces β -1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina de los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana. Se caracteriza por encontrarse en la saliva, lágrimas, suero sanguíneo, leche, jugos, vegetales, jugos de frutas y la clara de huevos en aves. También tiene actividad hidrolítica específica contra una gran variedad de bacterias y no es tóxico para los humanos, su capacidad para hidrolizar tiene efecto sobre bacterias grampositivas y tiene un efecto único en la proliferación de BAL¹⁴⁹.

3.8.2. Modelo convencional. Simula las condiciones del estómago o intestino, de manera independiente, y consiste de un sólo reactor o recipiente de vidrio con agitación y temperatura (37°C). De manera más amplia, el modelo consiste en simular las condiciones de la digestión dividiéndola en tres fases, las cuales son la gástrica, entérica y entérica final. En la primera fase, el medio que más se utiliza es NaCl, para tener un medio isotónico y así mantener la integridad y viabilidad de los microorganismos. Además de mantener un pH del fluido gástrico de 1 a 3, intervalo de pH en el estómago de los seres humanos; para el ajuste del pH se utiliza HCl 0.1 M. A este fluido se le adiciona pepsina (0.3 a 3 g/L) y ocasionalmente se adiciona lipasa (0.9 mg/L). Por último, el tiempo de exposición de los probióticos encapsulados en este medio es de hasta 120 minutos¹⁵⁰.

3.8.3. Modelo dinámico. Existen dos modelos dinámicos, los cuales son simuladores del TGI humano y consisten de un reactor para cada parte del tubo digestivo (estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente), donde la temperatura (37°C) es controlada al igual que el pH. El primer modelo consiste en tomar una alícuota de la fase gástrica y esta se adiciona a la fase entérica o se modifica el pH del vaso que contiene el fluido. En el segundo modelo, los reactores se mantienen con agitación y temperatura constante y el flujo se genera a través de una bomba peristáltica¹⁵¹.

¹⁴⁸ ARENALES SIERRA, Irene Margarita, 'Control de PH Interno de Microcápsulas Para La Protección de Probióticos Ante Condiciones Gastrointestinales Simuladas.' (Universidad Autónoma de Chapingo, 2019).

¹⁴⁹ CARRILLO, W. Lisozima: Actividad Antibacteriana y Alergenicidad', *Actual. Nutr.*, 14.4 (2013), 314–26 <http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf> [accessed 25 August 2022].

¹⁵⁰ JUAREZ-ROLDÁN and JIMENEZ-MUNGUÍA Op. Cit.

¹⁵¹ ARENALES SIERRA Op. Cit.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. LOCALIZACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS ubicado en el bloque de laboratorios de docencia y en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño sede Torobajo, Municipio de Pasto, con una temperatura promedio de 19°C, a 2540 msnm, 1084 mm de precipitación anual promedio y 76% de humedad relativa.

4.2. MATERIALES

4.2.1. Materiales. En el trabajo de campo de esta investigación se utilizaron los siguientes materiales:

- Kit de antibióticos (Cefotaxina, Penicilina, Gentamicina, Dicloxacilina, Ciprofloxacina, Cefalotina).
- Cepa de *Lactobacillus casei* ATCC 334
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708
- Agar y caldo MRS (DE MAN, ROGOSA y SHARPE).
- Agar Müeller Hinton
- Caldo BHI (Caldo Infusión Cerebro)
- Agar nutritivo
- Agua peptonada buferada
- Inulina
- Maltodextrina
- Discos papel (PADS)

4.2.2. Vidriería. En el trabajo de campo de esta investigación se utilizaron los siguientes instrumentos de vidriería:

- Erlenmeyers de 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Beakers de 25 mL, 50 mL 100 mL y 300 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL, 10 mL
- Cajas Petri desechables
- Balones aforados de 250 mL
- Tubos de ensayo tapa rosca
- Perlas de vidrio
- Probetas de 25 mL, 100 mL y 250 mL

4.2.3. Reactivos. Para la realización de las pruebas del presente trabajo se destinaron los siguientes reactivos.

- Peróxido de hidrogeno H₂O₂ 30% y 3,6%

- Sales biliares y bilis bovina sigma
- Glucosa anhidra
- Azul de anilina
- Reactivos tinción de Gram
- Fenolftaleína
- Antrona
- Hidróxido de sodio NaOH 0,2 N
- Ácido sulfúrico 95-97%
- Tartrato de sodio potasio
- Hidróxido de sodio 1 N
- Agua destilada
- Sulfato de cobre
- Reactivo de Folin Cicolteu
- Seroalbumina bovina

4.2.4. Equipos. En el trabajo de campo de esta investigación se utilizaron los siguientes equipos de laboratorio:

- Autoclave (HUANYU, 008).
- Equipo microencapsulación Spray Drying
- Balanza analítica (Metret Toledo)
- Nevera
- Incubadora MEMMERT In 55 Single Display
- Baño María
- Cámara de flujo laminar A-STWS-900 (CLE081-03).
- Espectrofotómetro (uv-vis lambda 11)
- Microscopio (Nikon, 3457)
- pH-metro
- Crio centrífuga
- Shaker – agitador magnetico
- Vórtex
- Micropipetas volumen variable de 10 - 100 μL y 100 - 1000 μL .
- Micropipetas electrónicas volumen variable de 100 - 1000 μL .

4.3. RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA Y CONSERVACIÓN DE *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708.

4.3.1. Reconstitución. Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y en un medio sólido específico para las bacterias, con el fin de optimizar su crecimiento y recuperación.

4.3.2. Siembra. Transcurridas 24 horas de reconstituida la cepa se confirmó el crecimiento, para esto se tomó 1 asada del cultivo, se inoculó en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) comercial estéril previamente preparado, y se llevó a incubar a 37 °C por 24 a 48 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar A-STWS-900 (CLE081-03), para evitar contaminaciones del medio. Al siguiente día, se revisó el crecimiento para constatar su morfología tanto macroscópica como microscópica, y se confirmó en parte su pureza mediante Tinción de Gram en forma de racimo de uvas y observación en microscopio Nikon 3457.

4.3.3. Conservación. La conservación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708, posterior a la reconstitución y siembra, se realizó cada semana, alternando entre; medio de cultivo sólido y líquido, en cajas de Petri con agar BHI y tubos de ensayo con caldo BHI respectivamente. Estos se incubaron a 37°C por 24 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display, luego se confirmó su pureza mediante Tinción de Gram y observación en microscopio Nikon, 3457, finalmente se almacenaron en nevera a 4 °C. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar A-STWS-900 (CLE081-03), para evitar contaminaciones.

Adicionalmente, las muestras fueron criopreservadas en viales a -20 °C.

4.4. RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA, CONSERVACIÓN Y CULTIVO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334.

4.4.1. Reconstitución. Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante en caldo y agar MRS para la bacteria con el fin de optimizar su crecimiento y recuperación.

4.4.2. Siembra. Transcurridas 24 horas de reconstituida la cepa se confirmó el crecimiento, se inoculó con un asa de argolla por el método de estrías en cajas de agar MRS (Man, Rogose y Sharpe) comercial estéril previamente preparado (Anexo E) y se llevó a incubar a 37 °C por 24 a 48 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar A-STWS-900 (CLE081-03), para evitar contaminaciones del medio. Al siguiente día, se revisó el crecimiento para constatar su morfología tanto macroscópica como microscópica, y se confirmó en parte su pureza mediante Tinción de Gram en forma de bastón corto y observación en microscopio Nikon, 3457.

4.4.3. Conservación. La conservación de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 334, posterior a la reconstitución y siembra, se realizó cada semana, alternado entre; medio de cultivo sólido y líquido, en cajas de agar MRS y tubos de ensayo con caldo MRS respectivamente. Estos se incubaron a 37°C por 24 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display, se confirmó su pureza mediante Tinción de Gram y observación en microscopio Nikon, 3457, finalmente se almacenó en nevera a 4 °C. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar A-STWS-900 (CLE081-03), para evitar contaminación.

Adicionalmente, las muestras fueron criopreservadas en viales a -20°C.

4.5. CULTIVO DEL INÓCULO DE CEPAS *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 Y *Lactobacillus casei* ATCC 334

El cultivo y ajuste de inóculo de cada cepa se realizó antes de iniciar una prueba. Según Crueger y Crueger¹⁵², el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10% v/v, para iniciar la fermentación.

Después se estimó el número de bacterias por mL del inóculo, para esto, se tomó 1 mL y se vertió en 9 mL de solución peptonada y se llevó a lectura en espectrofotómetro UV-2345 a 540 nm. Posteriormente se realizó el siguiente cálculo matemático de acuerdo a Guerrero et al¹⁵³ y Montes et al¹⁵⁴

M_1 = población o densidad celular que se ajusta.

M_2 = 0,125 densidad óptica equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

V_1 = 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90).

X_2 = cantidad que contiene M_2 .

V_2 = lo que se agrega a 1 mL para ajustar a $1,50 \times 10^8$ UFC/mL.

V_3 = 100 mL cantidad total del inóculo.

X_2 = cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población el valor de M_2 .

¹⁵² CRUEGER AND CRUEGER, *Industrial Microbiology Manual*. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, p.118. ISBN: 8420007439, 9788420007434 .

¹⁵³ GUERRERO MILENA et al. Efecto Inhibitorio de *Lactobacillus Acidophilus* SOBRE EL ENTEROPATOGENO *Vibrio Cholerae* 01 OGAWA, in Vitro', *Universidad y Salud*, 1.3 (2002), 8–14 <<https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/314/pdf>> [accessed 21 October 2021].

¹⁵⁴ MONTES CEBALLOS, Andrea del Rocío; SANTACRUZ BERNAL, Ayda del Pilar y SAÑUDO DIAZ, Jessie Nadenka. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo con énfasis en Microbiología. Pasto-Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2003. 146 p.

Se encuentra entonces X_1

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Se encuentra entonces V_2 ;

$$V_2 = V_1 - X_1$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2 ;

$$X_2 = \left(\frac{V_3 * V_1}{V_1} \right)$$

El valor de X_2 , es la cantidad que se debe agregar para ajustar la población.

4.6. PRODUCCIÓN DE GAS

Para verificar la presencia de gas se siguió el método de Cai et al¹⁵⁵. Se preparó caldo MRS enriquecido con 5 % de glucosa anhidra usando tubos de campana Durham, se inoculó *L. casei* ATCC 334 y se incubó a 37 °C por 24 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display. La prueba fue interpretada como negativa por la ausencia de gas en el interior del tubo Durham.

4.7. ACTIVIDAD DE CATALASA

Con un asa estéril se tomó una colonia de cultivo, *L. casei* ATCC 334 y *S. aureus* ATCC BAA 1708, se colocó sobre una lámina de porta objetos y se adicionó una gota de peróxido de hidrógeno (30 %) sobre las colonias. De acuerdo a Dahl et al¹⁵⁶, la reacción resultante se considera como catalasa positiva por la formación de burbujas.

4.8. RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

Según la metodología de Cai et al¹⁵⁷, se realizaron pruebas de crecimiento microbiano de *L. casei* ATCC 334 a diferentes temperaturas: 37°C y 45°C por 48 horas. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-12} y se seleccionaron desde 10^{-9} hasta 10^{-12} para inocular 150 µL en cajas Petri con agar MRS y azul de anilina, se

¹⁵⁵ CAI, Y, et al. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. En: J Gen Appl Microbiol. Agosto, 1999, vol. 45, no. 4, p. 177-184.

¹⁵⁶ DAHL, THOMAS; MIDDEN, ROBERT and HARTMAN, PHILIP. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive Bacteria by Pure Singlet. En: Journal of Bacteriology. Abril, 1989, vol. 171, no. p. 47.

¹⁵⁷ CAI Op. Cit., p. 177-184.

utilizaron perlas de vidrio estériles para distribuir en la superficie de las cajas Petri. Finalmente se realizó el recuento en placa donde fueron seleccionadas las cajas con conteos entre 30 y 300 UFC/mL.

4.9. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN MEDIO MRS Y MEDIO PRO.

Se utilizaron los medios de cultivo MRS y el medio de cultivo PRO (composición en Cuadro 5), basado en la metodología de Calpa et al¹⁵⁸ para verificar las mejores condiciones en producción de biomasa de la cepa láctica efectuando cinéticas de fermentación.

Cuadro 5. Composición de medio MRS y medio PRO

Medio	Composición
MRS (Man Rugosa y Sharp)	D-glucosa 20g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4g/L.
PRO	Azúcar blanco 10 g/L; leche de soya 15 g/L; leche en polvo 150 g/L; inulina 15 g/L;

Fuente: CALPA-YAMÁ, Aura; CHASPUENGAL-TULCÁN, and JURADO-GÁMEZ, Henry. Determinación de Parámetros Cinéticos de *Lactobacillus Casei* En Dos Medios Probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8.2 (2014), 15–35 (p. 18) <<https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.2>>

La cinética de fermentación para el medio de cultivo MRS se efectuó en 5 Erlenmeyer de 500 mL para un total de 2600 mL a 37°C por 24 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display y en agitación constante en shaker. La cinética de fermentación para el medio PRO se efectuó en 2 Erlenmeyer de 1000 mL para un total de 1700 mL a 37 °C por 24 horas en incubadora MEMMERT In 55 Single Display y en agitación constante en shaker. Las variables evaluadas durante las cinéticas fueron las siguientes:

- Estimación de población bacteriana por espectrofotometría a 540nm para el medio de cultivo MRS.
- Conteo de microorganismos viables en placa (UFC/mL) para medio PRO.
- Determinación de pH.
- Determinación de producción de ácido láctico.
- Determinación de producción de proteínas totales.
- Determinación de consumo de azúcares totales.

¹⁵⁸ CALPA-YAMÁ FREDY; CHASPUENGAL-TULCÁN, AURA, y HENRY JURADO-GÁMEZ, Determinación de Parámetros Cinéticos de *Lactobacillus Casei* En Dos Medios Probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8.2 (2014), 15–35 (p. 18) <<https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.2>>.

- Evaluación de producción de biomasa.
- Cosecha máxima.

El muestreo se realizó cada 3:00 horas durante 24 horas para el medio MRS y para el medio PRO. Como son mediciones que se hicieron en el tiempo, estos datos se analizaron usando un diseño experimental de medidas repetidas en el tiempo y análisis de regresión lineal. La Tabla 1 muestra los tiempos en los cuales se evaluaron la cantidad de colonias.

Para determinar el comportamiento de las variables a través del tiempo, se evaluaron tres modelos polinomiales (lineal, cuadrático y cúbico), teniendo en tiempo como la variable dependiente. De igual manera, para determinar la relación entre el crecimiento (Ln UFC/ mL) con las variables acidez, pH, azúcar y proteína se utilizó un análisis de correlación, y las variables significantes se modelaron con regresión.

Tabla 1. Diseño para toma de medias repetitivas durante la cinética de fermentación para medio MRS y medio PRO

Horas	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Medio PRO									
Medio MRS									

4.9.1. Estimación de población bacteriana por espectrofotometría. Se determinó la concentración bacteriana midiendo Densidad Óptica (D.O.) con espectrofotómetro a 540 nm Thermo Scientific UV, bajo longitud de onda de máxima absorción y se utilizó la escala de McFarland metodología descrita por Carpenter y Carpenter¹⁵⁹, Koneman et al¹⁶⁰ y Gerhard et al¹⁶¹.

Se realizó la lectura de 3 mL (cantidad que se coloca en la celdilla para llevar a espectrofotómetro) de muestra en cada tiempo. Se inició con el tiempo cero, luego se inoculó el caldo MRS con *L. casei* ATCC 334 al patrón 0,5 en la escala de McFarland, una vez la lectura sobrepasó los 0,5 nm se hicieron diluciones cada vez que fue necesario, así: 1:9, 2:8, 5:5, 8:2, 9:1. El primer dígito indica las partes de caldo y el segundo las partes de cultivo bacteriano.

4.9.2. Conteo de microorganismos viables en placa UFC/mL. La técnica de conteo en placa propicia la información del número de células viables durante el

¹⁵⁹ CARPENTER, L Carpenter, L. 1969. Microbiología. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana S.A. México DF. p. 205-215.

¹⁶⁰ KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; Dowell V. R.; , H. M. 1987. Diagnóstico microbiológico. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. p. 386

¹⁶¹ GERHARDT, R.G.; MURRAY, E.; WOOD, W.; KRIEG, L.R. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington. 50 p

proceso en términos de UFC/mL, permitiendo determinar la evolución de la producción de biomasa. Para los conteos se diluyó 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada al 0,1% y se realizó diluciones decimales; de cada dilución se transfirió a cajas de Petri con medio MRS con azul de anilina 150 µL para siembra en superficie. Las cajas se llevaron a incubación a 37°C y se observaron entre las 24 y 48 horas. Se consideraron las cajas de Petri con conteos de UFC/mL entre 30 y 300 colonias. El número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución y por 10 para obtener las UFC/mL formados de acuerdo a lo establecido por Lanara¹⁶².

4.9.3. Determinación de pH. La evolución del pH se verificó mediante la medición con un potenciómetro digital.

4.9.4. Determinación de porcentaje de ácido láctico. Se realizó aplicando el método de titulación con Hidróxido de sodio 0,1 N, método propuesto por Morales-Erazo et al¹⁶³.

4.9.5. Determinación de proteínas método de Lowry modificado. La cuantificación de la concentración de proteínas en la biomasa se realiza con el método de Lowry¹⁶⁴ modificado por Peterson. Se caracteriza por ser un método de valoración colorimétrico de las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas según la ley de Lambert-Beer. Se debe preparar una solución patrón Sero Albumina Bovina con diferentes concentraciones y llevar a lectura de Densidad Óptica a 640 nm. Se debe graficar vs la concentración en mg/L para obtener la ecuación de la recta. Finalmente se realizó el procesamiento de la muestra problema y los valores obtenidos de las muestras se calcularon por la ecuación de la recta, obtenidos en la curva patrón y multiplicados por el factor de dilución.

4.9.6. Determinación de consumo de azúcares totales. Los azúcares fueron determinados por el método de Dubois¹⁶⁵, conocido por el método de Antrona. Se preparó previamente una curva patrón con diferentes concentraciones de la solución patrón glucosa; los valores obtenidos de la lectura de densidad óptica (D.O.) a 525 nm. La dosificación de los azúcares presentes en las muestras en estudio se efectuó sobre 2,5 mL de muestra previamente diluida en agua destilada y se adicionó 5 mL de Antrona preparada en ácido sulfúrico. Los valores obtenidos

¹⁶² LANARA L. Métodos microbiológicos. 3ªed Brasilia: Ministerio de Agricultura; 1981.

¹⁶³ MORALES-ERAZO, Laur; GONZÁLEZ-CÁRDENAS, Ivonne, and ABELLA-GAMBA, Johanna. 'Técnicas de Titulación Ácido-Base: Consideraciones Metrológicas', *Revista Colombiana de Química*, 48.1 (2019), 26–37 <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?>> [accessed 26 August 2022].

¹⁶⁴ LOWRY, Oliver; et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: *Journal Biological Chemistry*. Mayo, 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-275.

¹⁶⁵ DUBOIS, Michel, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. En: *Anal Chem*. 1956, vol. 28, no. 3, p. 350-356.

de las muestras se calcularon por la ecuación de la recta, obtenidos en la curva patrón y multiplicados por el factor de dilución.

4.10. SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS Y ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708

4.10.1. Ensayos de inhibición in vitro. La selección de cepas inhibidoras de patógenos, se hizo siguiendo la metodología de Tagg y McGiven et al¹⁶⁶, y Ramírez et al¹⁶⁷.

Se aplicaron los ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a antimicrobianos: Gentamicina (CN) 10 µg, Florfenicol (FFC) 30 µg, Amoxicilina (AMC) 30 µg, Tetraciclina (TE) 30 µg, Cefquinona (CEQ) 30 µg, Dexociclina (D) 30 µg, Ceftazidina (CAZ) 30 µg y Penicilina (PEN) 10 µg. Se realizaron en *L. casei* ATCC 334 y *S. aureus* ATCC BAA 1708 mediante la metodología de Bauer et al (1966), (Anexo F). De esta manera se puntualiza la concentración mínima inhibitoria (CMI), que el define como la mínima concentración de antimicrobiano (µg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C. En esta determinación, se miden los halos de inhibición alrededor de cada disco y se comparan con los diámetros de los halos de inhibición.

La determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano natural (sobrenadante -posiblemente bacteriocinas- de *L. casei*), que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado. Este procedimiento se realizó ajustando el pH a 6.0 (para el caso de sobrenadante), y a concentraciones de: (i) 75 µL, 85 µL y 95 µL para el método de pads impregnados, (ii) 80 µL, 100 µL y 120 µL para los métodos de difusión en cilindro plástico y difusión en cilindro plástico doble capa y (iii) 50 µL, 75 µL y 100 µL con el método de discos de agar impregnados (Anexo G). La inhibición se determinó por el halo producido alrededor del disco de agar impregnado de *L. casei* ATCC 334 después de 12 horas de crecimiento en un cultivo de *S. aureus* ATCC BAA 1708.

El tamaño del halo se determinó teniendo en cuenta la distancia desde el borde del disco de agar de *L. casei* ATCC 334 hasta el extremo del halo formado por la inhibición de *S. aureus* ATCC BAA 1708. El tamaño crítico del halo para determinar si hubo inhibición fue igual o superior a 2 mm de acuerdo a lo establecido por Estrada et al¹⁶⁸.

¹⁶⁶ TAGG, J y MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. En: Applied Microbiology. Mayo, 1971. vol. 21, no. 5, p. 943.

¹⁶⁷ RAMÍREZ RAMÍREZ, José et al. Bacterias Lácticas Importancia en alimentos y efectos en la salud. En: Revista Fuente. Abril-Junio, 2011. vol. 2, no. 7. p. 1-16.

¹⁶⁸ ESTRADA MALDONADO, ANA CRISTINA; GUTIÉRREZ RAMÍREZ, LUZ ADRIANA AND MONTOYA CAMPUZANO, OLGA INÉS. EVALUACIÓN in Vitro DEL EFECTO BACTERICIDA DE

4.11. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EPS

Para esta determinación se inoculó la bacteria láctica en Caldo MRS + sacarosa (5%) por 24 h a 37°C. Posteriormente de acuerdo a lo descrito por Elinalva et al¹⁶⁹, se utilizaron discos de papel de filtro estéril (5 mm) impregnados con 5 µL de cultivo láctico en placas de Petri con agar MRS para observar la producción de EPS. El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones, diferentes niveles de temperatura (28 ± 2 °C, 35 ± 2 °C y 42 ± 2 °C), seguidamente se llevaron a incubación durante 7 días, 48 horas y 24 horas, a las temperaturas respectivas. Después de la incubación, la producción de EPS se evaluó con base a la formación de una colonia mucoide alrededor de los discos. La producción de este biopolímero por los aislados se confirmó mezclando una porción de la sustancia mucoide en 2 mL de alcohol absoluto donde la precipitación de esta porción corroboró la presencia del EPS.

4.12. RESISTENCIA A LISOZIMA.

De acuerdo a lo descrito por Rodríguez-González (2009), se sometió la cepa láctica a diferentes concentraciones de lisozima: 100 µg/mL, 200 µg/mL y 300 µg/mL, se mantuvieron a 37°C por 5, 30 y 60 minutos, transcurrido cada tiempo se realizó la estimación de población bacteriana por espectrofotometría a 540 nm y se expresa el resultado en UFC/mL según la escala de McFarland.

4.13. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DEL SOBRENADANTE POR HPLC – DAD.

Las muestras para análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se prepararon de la siguiente forma:

Se cultivó la cepa en caldo MRS por 24 horas a 37°C, posteriormente se ajustó por espectrofotometría a una densidad óptica 0.125 nm en escala McFarland patrón 0,5 equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Luego se transfirió muestras en tubos Eppendorf y se centrifugó a 18.000 r.p.m. a 4°C por 30 minutos. Por último, el sobrenadante se filtró utilizando membranas PVDF de 0,25 µm y se llevó a lectura.

4.13.1. Identificación de aminoácidos del sobrenadante de la cepa láctica y la cepa patógena por HPLC-DAD: se cultivaron las cepas en caldo MRS y BHI respectivamente por 24 horas a temperatura entre 37°C, posteriormente se ajustaron por espectrofotometría a una densidad óptica 1.00 en escala McFarland

CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus* Sp. CONTRA *Salmonella* Sp. y *Escherichia Coli*’, *Facultad Nacional de Agronomía*, 58.1 (2005), 2601–9 (p. 2603).

¹⁶⁹ ELINALVA PAULO., et al. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84 (2012): 495-508.

patrón 4 equivalente a una concentración de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL. Luego se transfirieron las muestras en tubos Eppendorf manteniéndolas a una temperatura de 4°C. Seguidamente se pasó por filtros de jeringa de PVDF, Pall de 0,25 μ m 1,0 mL de muestra y se llevó a lectura.

La lectura se realizó con las siguientes especificaciones: Equipo: Cromatógrafo Líquidos HPLC Waters- Bomba binaria 1525; Columna: C18 300Å (Júpiter, Phenomene x 150 mm x 4,6 mm); Detector: PDA 2998 a 214 y 280nm Scan (200-350nm). Inyector: Rheodyne Loop 20 μ L.

4.14. MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus casei* ATCC 334

Después se realizó el conteo de bacterias por mL, para el conteo se tomó 3 mL y se llevó a lectura directa en espectrofotómetro a 540 nm. En los casos donde la población fue mayor a la establecida, se adicionó caldo estéril mediante cálculo de proporcionalidad.

4.14.1. Microencapsulación por la técnica spray drying (secado por aspersión): de acuerdo a la metodología descrita por Rodríguez et al (2016) para la investigación se preparó para *L. casei* ATCC 334 un inóculo de 500 mL al 10 %p/v (50 g de Maltodextrina y 50 g de Inulina en 400 mL de Inoculo bacteriano previamente ajustado) en relación 1:1 p/p la cuales fueron agitadas hasta homogenizar.

Se utilizó el equipo de secado por aspersión Secador Spray Bilon 6000s®, con una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida en un rango de 65 - 67°C. Con ciclo completo de 4 horas. El material microencapsulado se empacó en recipientes metálicos esterilizados oscuros y se almacenaron durante 90 días a temperatura ambiente (13 ± 2 °C). El parámetro actividad de agua se tomaron para los días 0, 45, 70 y 90.

4.15. ESTUDIO DEL MICROENCAPSULADO DE *Lactobacillus casei* ATCC 334.

4.15.1. Estudio de Supervivencia y estabilidad de *L. casei* ATCC 334 microencapsulado. Para evaluar el efecto de los materiales microencapsulantes (Maltodextrina e Inulina) sobre la viabilidad de *L. casei* ATCC 334 microencapsulado se siguió lo establecido en la metodología de Rodríguez et al (2016), donde el número de células viables fue determinado antes y después de la microencapsulación después de un periodo de 70 días de haberse almacenado a 20 ± 2 °C. Se emplearon como criterios de estabilidad: la Viabilidad de la BAL durante el almacenamiento (mayor a 10^8 UFC/g) y eficiencia de microencapsulación.

4.15.2. Viabilidad. De acuerdo a lo propuesto por Rodríguez et al (2016), se realizó el recuento de células viables sobre 1 g de material encapsulado, rehidratado

a temperatura ambiente en 9 mL de agua de peptona tamponada al 0.1 % p/v (pH 7.2±2) homogeneizado en vórtex y se dejó reposar durante 30 minutos para favorecer la liberación del microorganismo. Se inoculó 150 µL de la dilución preparada en agar MRS con azul de anilina y se llevó a incubación a 37°C por 48 horas. Los recuentos fueron realizados por duplicado y expresados como UFC/g en base seca, para cada condición experimental de acuerdo a Semnoyov et al (2010).

El porcentaje de viabilidad para cada muestra se calculó según la ecuación:

$$\% Viabilidad = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100$$

Donde, N_0 es el número de bacterias por 150 µL de solución antes del proceso y N es el número de bacterias por 150 µL de solución después de la etapa de secado.

4.15.3. Eficiencia de la Microencapsulación de *Lactobacillus casei* ATCC 334. Según lo descrito por Gonzales et al (2015), para evaluar la eficiencia de la microencapsulación, se tomó 2 g de material microencapsulado y se diluyeron en 18 mL de agua destilada y fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. en una criocentrífuga (HERMLE 2326K, Germany) por 15 minutos con el fin de separar las células libres de *L. casei*. Posteriormente, se determinó la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculó la eficiencia de encapsulación (%EE) con la siguiente fórmula:

$$\% EE = \left(\frac{(A - B)}{A} \right) \times 100$$

Donde A es la concentración bacteriana antes de la microencapsulación y B es la concentración de la bacteria después de microencapsular encontrada en el sobrenadante.

4.15.4. Humedad. Para determinar la humedad se tomaron 2 gramos de material microencapsulado y se analizó en el Determinador de Humedad KERN DBS 60-3 (Balingen – Germany) a una temperatura de 105 °C con una Resolución: 0,001 g. (0.01%). El resultado se expresará en porcentaje base seca (% bs).

4.15.5. Actividad de agua. La actividad de agua se tomó 2 g de material microencapsulado y se determinó mediante lectura directa usando un Termohigrómetro Hygrolab Rotronic (Nürnberg-Alemania) previamente calibrado. El % se expresó en porcentaje base seca (%bs).

4.15.6. Solubilidad. La solubilidad se obtuvo al disolver 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada, esta solución se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura de 30±2°C en incubadora (Mettler, Germany). La suspensión se

centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante y se transfirió a una caja petri previamente pesada; se llevó a una estufa (Memmert, Germany) a 105°C por 5 h hasta que alcanzó peso constante hasta observarse una muestra seca.

Los sólidos recuperados se pesaron después del secado (m_f) y se calculó el porcentaje de solubilidad con la diferencia de pesos mediante la ecuación.

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{(m_i - m_f)}{m_i} \right) \times 100$$

Donde, m_i es 0,25 g (1 g/100 mL x 25 mL del líquido sobrenadante = 0,25 g).

4.15.7. Humectabilidad. El tiempo de humectación de *L. casei* ATCC 334 microencapsulado fue determinado por el método de humectación estática Freudig et al (1999) modificada por Ceballos et al (2012) y Rodríguez et al (2016) y adaptada por los autores: se pesó 1 g de microencapsulado que se colocó en una lámina portaobjetos previamente recubierta en su totalidad con papel aluminio, la lámina se ubicó sobre un beaker de 5 cm x 7 cm con 100 mL de agua destilada a 20°C. Posteriormente, se vertió suavemente el microencapsulado de la lámina en el beaker. El tiempo de humectación expresado en minutos correspondió al tiempo que se tardó la inmersión completa de un 1 g muestra de microencapsulado depositado suavemente sobre 100 mL de agua a 20°C.

4.15.8. Caracterización estructural, morfología y tamaño de las microcápsulas. En La morfología y tamaño de las microcápsulas fueron determinadas mediante un microscopio electrónico de barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA 650 FEG. Para esta determinación las muestras se enviaron al Laboratorio de Tecnología y Diseño de Materiales de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

4.16. EXPOSICIÓN A CONDICIONES GASTROINTESTINALES

4.16.1. Modelo gastrointestinal. De acuerdo a la metodología descrita por Cruz-Pacheco (2009), Cruz-Ramos (2015) y modificada por los autores. Se tomaron 2 g de microencapsulado y se adicionaron en 18 g de agua destilada, los cuales fueron sometidos a actividad de lisozima (0.01 %), manteniéndose a 37°C por 5 minutos en agitación constante a 85 rpm.

Luego, fueron sometidas a condiciones gástricas simuladas *in vitro* (pepsina 3 %; NaCl 0.5 %; ajustando el pH a 2.0 con HCl 5M), manteniéndose a 37°C por 90 minutos en agitación constante a 60 rpm.

Posteriormente, fueron sometidas a condiciones intestinales simuladas *in vitro* (pancreatina 1%; bilis 0.3%; NaCl 0.5%; ajustando el pH a 6.8 con NaOH 1.5 M), manteniéndose a 37°C por 150 minutos en agitación constante a 60 rpm.

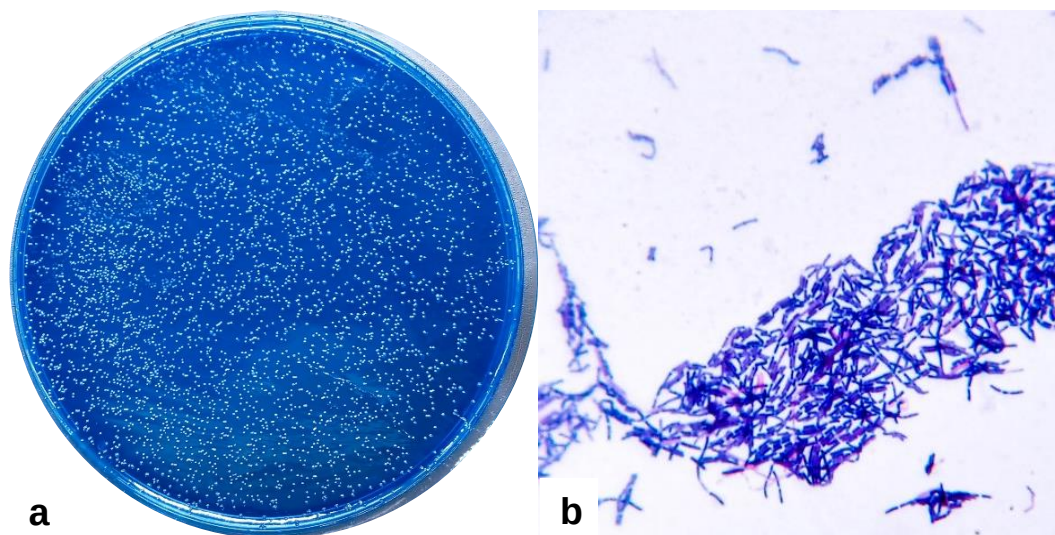
Para determinar la viabilidad bacteriana se inoculó 150 µL en cajas Petri con agar MRS y azul de anilina y se incubó a 37°C por 48 horas, se utilizaron perlas de vidrio estériles para distribuir en la superficie de las cajas Petri. Finalmente se realizó el recuento en placa donde fueron seleccionadas las cajas con conteos entre 30 y 300 UFC/mL.

5. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. DESCRIPCIÓN DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 Y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708.

5.1.1. *Lactobacillus casei* ATCC 334. Después de reconstituir y replicar la cepa láctica se realizó la tinción de Gram para verificar en parte su pureza. Se observó en microscopio bajo objetivo de 100x con el fin de caracterizar morfológicamente propiedades observables y descartar presencia de microorganismos contaminantes que afecten los resultados. La cepa probiótica evaluada se describe como Gram positiva, con forma de bastones alargados distribuidos en cadena e individuales como se muestra en la Figura 2. Dichas características son similares a las nombradas por Hutkins¹⁷⁰ y Gobetti y Minervini¹⁷¹, quienes detallan a *L. casei* como una BAL en forma de bastones Gram positivos que se presentan individualmente, en pares o en cadenas y varían de 0,7 μm – 1,1 μm x 2,0 μm - 4,0 μm .

Figura 2. a: *Lactobacillus casei* ATCC 334 morfología macroscópica en agar MRS + Azul de anilina; b: morfología microscópica aumento 100x.

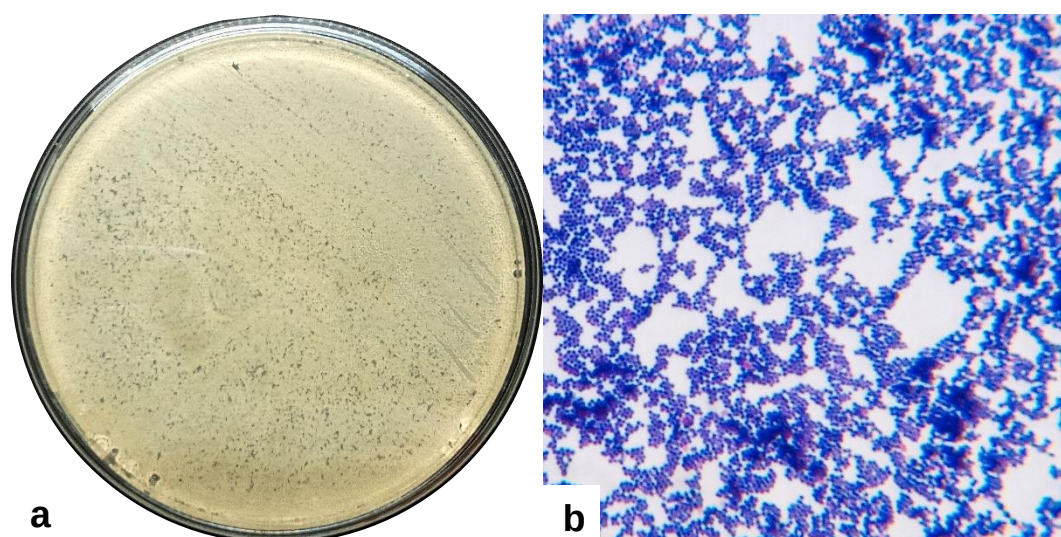


¹⁷⁰ HUTKINS, II Op. Cit., p. 34-36.

¹⁷¹ GOBBETTI AND MINERVINI Op. Cit., p. 432.

5.1.2. *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708. Después de reconstituir y replicar la cepa patógena se realizó la tinción de Gram para determinar en parte su pureza, se observó en microscopio bajo objetivo de 100x con el fin de caracterizar morfológicamente características observables y descartar presencia de microorganismos ajenos que afecten los resultados. Por tanto, la cepa patógena evaluada presenta forma de coco individual y en racimos de uvas Gram positiva, como se muestra en la Figura 3. Dichas características son similares a las nombradas por Liu¹⁷² que describe los estafilococos como anaerobios facultativos Gram positivos, inmóviles, no formadores de esporas, esféricos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, presencia de capsula y pueden presentarse como cocos únicos, en pares y/o formando racimos.

Figura 3. a: *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 morfología macroscópica en agar Baird Parker; b: morfología microscópica



Rodríguez y Arenas¹⁷³ mencionan que gracias a la tinción de Gram se diferencian las bacterias en dos grupos: Gram positivas, aquellas que se tiñen azul-violeta, y Gram negativas, que se decoloran y finalmente se tiñen rojo-rosado. Esta diferencia cromática para ambos tipos de bacterias se atribuye a la composición de las paredes celulares, donde, las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración, en cambio, las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de peptidoglucanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración, concepto utilizado para confirmar pureza y morfología bacteriana.

¹⁷² LIU Op. Cit., p. 274.

¹⁷³ RODRÍGUEZ, Patricia y ARENAS, Roberto. Hans Christian Gram y su tinción. En: *Revista Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*. Ciudad de Mexico: Hospital General Manuel Gea González, abril-junio de 2018. vol. 16, nro. 2. p. 166-167. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>

De igual forma, Rodríguez y Arenas¹⁷⁴ describen la tinción de Gram como una herramienta que proporciona información rápida para diagnósticos de infecciones, puede revelar los agentes causales incluso con una toma de muestra no adecuada. Puede ayudar a seguir o cambiar un tratamiento antibiótico inicial antes de los resultados del cultivo, y en algunos casos, es capaz de mostrar la necesidad de una atención médica urgente.

Según Lucana y Huanca¹⁷⁵ la pared celular de las Gram negativas está formada por tres estructuras: membrana citoplasmática, el espacio periplasmático o periplasma, el cual se encuentra separando dos membranas, este espacio presenta una delgada y fina capa de peptidoglucano y finalmente la membrana externa, que representa la porción más superficial en la conformación de la pared celular y se encuentra formada por lipopolisacáridos, fosfolípidos estructurales y proteínas (integrales y periféricas). Por otra parte, los mismos autores explican que en las bacterias Gram positivas el peptidoglucano se encuentra en mayor cantidad presentando múltiples capas de este componente además de ácidos teicoicos que se encuentran conformados por polímeros de ribitol-fosfato o glicerol-fosfato los cuales se unen al ácido N acetil-murámico estabilizando de esta manera la pared celular, los que además actúan como antígenos de superficie y que se unen a receptores específicos en las células que presenta el huésped. A estos antígenos se los puede observar en especies patógenas actuando como receptores para bacteriófagos además de inhibir la fagocitosis.

Así mismo, Lucana y Hunca¹⁷⁶ describen que generalmente por fuera del peptidoglucano suele existir una cubierta de proteínas, las que junto a los ácidos teicoicos varían en los diferentes grupos de bacterias Gram positivas por lo que es un elemento que permite poder clasificarlas. Cabe mencionar que existen otros compuestos denominados ácidos lipoteicoicos que por medio de su porción lipídica se unen de forma hidrófoba a la membrana y la porción glicerol-fosfato de la pared celular. Estos ácidos al igual que los ácidos teicoicos tienen la función de estabilizar la pared celular.

En la actualidad la tinción de Gram es un método eficaz y significativo en pruebas, ensayos y diagnósticos de laboratorio, además es económico y rápido, por tanto, su aplicación se debe estandarizar y regularizar con el fin de minimizar errores técnicos en experimentación.

¹⁷⁴ Ibid., p. 167.

¹⁷⁵ LUCANA NINA, Maroley Rocío y HUANCA ESPINOZA, Reyna Mayra. Estructura Bacterina. En: *Rev. Act. Clin. Med.* 2014, vol.49, pp. 2589-2593. Disponible en: <http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000001&lng=en&nrm=iso>. ISSN 2304-3768.

¹⁷⁶ Ibid., p. 2591.

5.2. PRODUCCIÓN DE GAS Y ACTIVIDAD DE CATALASA *Lactobacillus casei* ATCC 334 Y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708

La producción de gas para *L. casei* ATCC 334 fue negativa debido a la ausencia de gas en los tubos Durham, de igual forma, la actividad de catalasa para *L. casei* fue negativa al no presentar reacción con peróxido de hidrógeno. (Cuadro 6 y Figura 4).

Hutkins¹⁷⁷ y El-Enshasy y Yang¹⁷⁸ indican que las BAL comúnmente utilizadas en la producción de alimentos como probióticas son bacterias catalasas negativas, y es una característica para el género *Lactobacillus* y otras BAL. Hill et al¹⁷⁹ mencionan que la catalasa es una enzima capaz de degradar el peróxido de hidrógeno y las BAL no la poseen.

Cuadro 6. Producción de gas y actividad de catalasa

Bacteria	Producción de gas	Actividad de catalasa
<i>L. casei</i> ATCC 334	Negativo	Negativo
<i>S. aureus</i> ATCC BAA 1708	-	Positivo

El resultado negativo en producción de gas para *L. casei* indica una importante característica probiótica de las BAL que se utilizan en la alimentación humana y animal. Una cepa productora de gas es relacionada con problemas digestivos, en este sentido, la ausencia de producción de gas evita que el animal presente enfermedades como el meteorismo o timpanismo. Al respecto, Sinsajoa et al¹⁸⁰ y Fajardo et al¹⁸¹, mencionan que al utilizar un probiótico en la industria alimentaria la producción de gas es una de las propiedades a tener en cuenta, sin embargo, en algunos procesos de industria láctea, la formación de ojos y textura espumosa se expresa gracias a la producción de gas durante el proceso de fermentación. Es importante distinguir las propiedades en la aplicabilidad de una cepa bacteriana y su interacción con el sustrato que se relacione para determinar claramente su utilización y destino.

¹⁷⁷ HUTKINS, II Op. Cit., p. 234.

¹⁷⁸ EL-ENSHASY and YANG Op. Cit., p. 178.

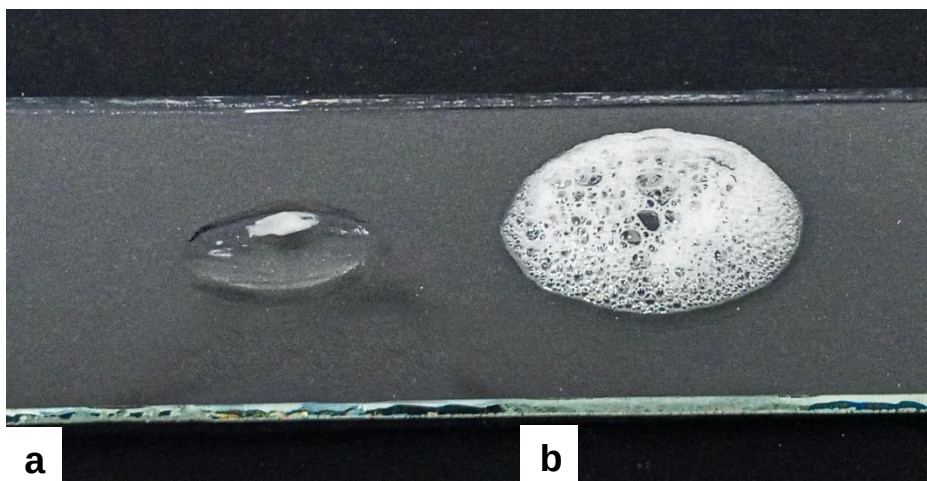
¹⁷⁹ HILL and others Op. Cit., p.11.

¹⁸⁰ SINSAJOA-TEPUD, JURADO-GAMEZ, and NARVÁEZ-RODRÍGUEZ.

¹⁸¹ JURADO-GÁMEZ, HENRY AND FAJARDO-ARGOTI, CATALINA. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO IN VITRO DE *Lactobacillus Gasseri* SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus Epidermidis*, *Biosalud*, 16.2 (2017), 53–69 (p. 64)

<<https://doi.org/10.17151/BIOSA.2017.16.2.6>>.

Figura 4. *Lactobacillus casei* ATCC 334 catalasa negativa; b: *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 catalasa positiva



Los autores Khamis et al¹⁸² y Fetsch¹⁸³ describen que *S. aureus* es una bacteria catalasa-positiva, dicha característica permite aislar e identificar apropiadamente la bacteria patógena en casos clínicos o por contaminación de alimentos en animales y humanos, los mismos autores explican que cepas de *S. aureus* catalasa-positiva aislada de diversos productos derivados de la leche presenta resistencia a antibióticos, catalogada como una de las cepas con más alto riesgo para la salud y conservación de alimentos.

Ruíz-Pérez et al¹⁸⁴ define a *S. aureus* como una bacteria productora de gas y menciona que el crecimiento y proliferación de bacterias formadoras de gas ocasiona un producto alimenticio con corto tiempo de vida útil y estimula la pérdida de características organolépticas. A pesar de la información registrada, en el 2008 Piau et al¹⁸⁵ reportaron una mutación en el gen *katA* asociado con la pérdida de actividad de catalasa en una cepa de *S. aureus* aislada en laboratorio clínico, donde el resultado a la prueba de catalasa fue negativo, su identificación se dio gracias a diversas pruebas complementarias, tinción de Gram, oxidasa y finalmente secuenciación genética.

Es importante al establecer protocolos para la caracterización bacteriana la integración y comprensión de posibles mutaciones y factores en la muestra aislada disponible para identificación, es necesario estructurar los pasos de forma secuencial y complementaria. La tinción de Gram, producción de gas y prueba de

¹⁸² KHAMIS, MOUSA, and HELMY Op. Cit., p. 96.

¹⁸³ FETSCH Op. Cit., p. 131.

¹⁸⁴ RUÍZ-PÉREZ, MENDO-MORALES, and CHAMS-CHAMS Op. Cit., p. 316.

¹⁸⁵ PIAU, C., JEHAN, J., LECLERCQ, R., y DAUREL, C. Catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain with point mutations in the *katA* gene. En *Journal of clinical microbiology*. Caen, France. June, 2008, vol. 46, nro. 6, p. 2060-2061. DOI: 10.1128/JCM.02300-07

catalasa, son pruebas fenotípicas rápidas de bajo costo económico que aún siguen vigentes y permiten resultados con versatilidad en la industria de alimentos, pruebas clínicas, salud animal y humana.

5.3. RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA.

El análisis estadístico indicó que hay diferencias entre las temperaturas 37°C y 45°C ($p < 0,05$) como se ilustra en la Figura 5. Se registró el crecimiento bacteriano para las diluciones 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} y 10^{-12} , con valores entre $1,6 \times 10^{12}$ UFC/mL y $3,6 \times 10^{14}$ UFC/mL a 37 °C y valores entre $1,6 \times 10^{12}$ UFC/mL y $1,0 \times 10^{13}$ UFC/mL a 45 °C (Tabla 2). En la Figura 6 se muestra el crecimiento de *L. casei* en caja Petri.

Tabla 2. Resistencia de *L. casei* a diferentes niveles de temperatura, 37 °C y 45 °C.

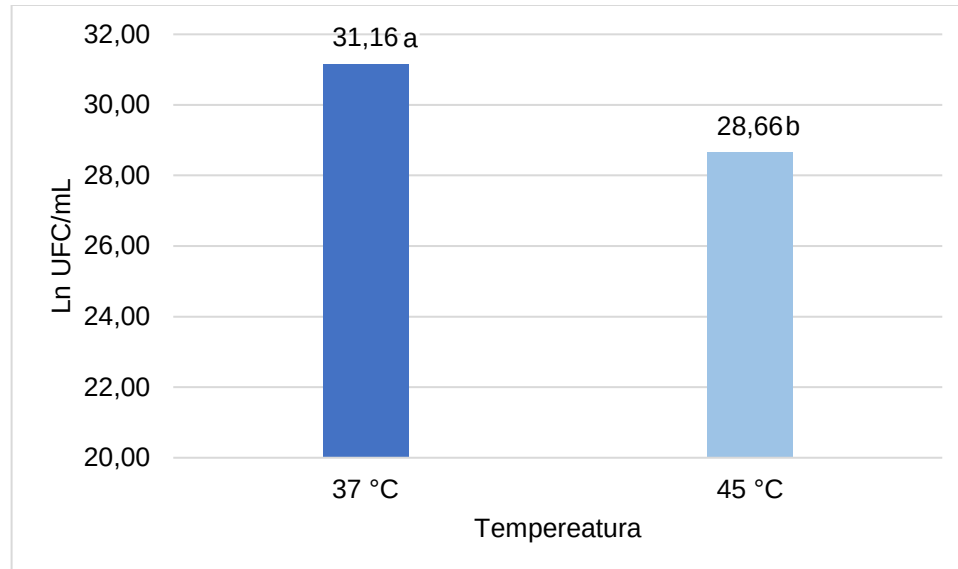
Factor de dilución	<i>Lactobacillus casei</i> UFC/mL	
	37 °C	45 °C
10^{-9}	$1,6 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^{12}$
10^{-10}	$1,6 \times 10^{13}$	$3,0 \times 10^{12}$
10^{-11}	$1,6 \times 10^{14}$	$4,3 \times 10^{12}$
10^{-12}	$3,6 \times 10^{14}$	$1,0 \times 10^{13}$

Figura 5. Crecimiento de *Lactobacillus casei* a 37 °C durante 24 horas, caja Petri más azul de anilina.



En la Figura 5 se observa la diferencia en el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334, el mayor valor se reportó a 37°C con 31,16 Ln UFC/mL ($n=20$) y el menor valor corresponde a 45°C con 28,66 Ln UFC/mL ($n=17$).

Figura 6. Crecimiento bacteriano en Ln UFC/mL de *L. casei* ATCC 334 a diferentes temperaturas, 37°C y 45°C



Letras distintas en la columna muestran diferencias estadísticas entre medios ($p < 0,05$). Letras distintas en las filas muestran diferencias en los tiempos de evaluación ($p < 0,05$)

Según Rai¹⁸⁶ y Flores¹⁸⁷, la temperatura de crecimiento óptima para *Lactobacillus casei* oscila entre 35°C y 40°C y puede tolerar temperaturas entre 2°C y 50°C. De igual forma, Flores¹⁸⁸ experimentó con el efecto de la temperatura en la producción de ácido láctico, encontrando que los valores no fueron significativos entre 29°C y 42°C para *L. casei*. Propiedades que determinan la adaptabilidad y resistencia de *L. casei* a diversos cambios de ambiente y producción de sus subproductos fermentativos, entre ellos el ácido láctico.

Calpa et al¹⁸⁹ evaluaron el crecimiento de *L. plantarum* a 37°C y 45°C, presentaron el mayor crecimiento a 45°C con $3,0 \times 10^{12}$ UFC/mL, similar al trabajo realizado por Jurado et al¹⁹⁰ para la misma BAL y reportaron el mayor crecimiento a 45°C con $3,0 \times 10^{12}$ UFC/mL. Datos menores a los obtenidos en la presente investigación,

¹⁸⁶ RAI and BAI Op. cit., p. 209.

¹⁸⁷ FLORES TIXICURO, Jessica Maribel. Optimización Estadística de La Producción de Ácido Láctico a Partir de Lactosuero Por *Lactobacillus Casei* (UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE, 2020) <<http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/11169>> [accessed 2 December 2021].

¹⁸⁸ Ibid., p. 24.

¹⁸⁹ CALPA-YAMÁ, CHASPUENGAL-TULCÁN, AND JURADO-GÁMEZ. Op. cit., p. 34.

¹⁹⁰ SINSAJOA TEPUD, Mehili Dayana and NARVÁEZ RODRÍGUEZ, Mónica Lorena. EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN *Escherichia Coli* O157:H7 ATCC 43888 (Universidad de Nariño, 2019).

además, el resultado de mayor crecimiento para *L. casei* se dio a 37°C, que algunos autores reconocen como ideal para el crecimiento de *L. casei*.

Vásquez, Suárez y Zapata¹⁹¹, aseguran que al adicionar una cepa láctica como bioprotectora de cárnicos y mantener la cadena de frío, dicha cepa mantendrá la concentración inicial, además, al presentar problemas con mantener la temperatura recomendada, la cepa crecerá junto a posibles bacterias patógenas, inhibiendo los microorganismos contaminantes por competición o subproductos de la BAL.

Harisha¹⁹² indicó que los microorganismos tienen una temperatura mínima, óptima y máxima para su crecimiento, las temperaturas por debajo de la mínima tienen una acción estática sobre los microorganismos, inhiben el crecimiento microbiano al ralentizar el metabolismo, pero no necesariamente matan al organismo, por ejemplo, la refrigeración a 4°C ralentiza el crecimiento de microorganismos y mantiene los alimentos frescos durante unos días, y la congelación a -10 °C detiene el crecimiento microbiano, pero generalmente no mata los microorganismos y mantiene los alimentos frescos durante varios meses. Finalmente, la misma autora menciona que las temperaturas superiores a la máxima suelen tener una acción de inhibición bacteriana, ya que desnaturalizan las enzimas microbianas y otras proteínas.

Parker et al¹⁹³ hacen referencia al efecto de las diferentes temperaturas sobre microorganismos, donde manifiestan que las temperaturas muy bajas afectan a las células de muchas maneras, las membranas pierden su fluidez y se dañan por la formación de cristales de hielo, las reacciones químicas y la difusión se ralentizan considerablemente, las proteínas se vuelven demasiado rígidas para catalizar reacciones y pueden sufrir desnaturalización. En el extremo opuesto, la investigadora menciona que el calor desnaturaliza las proteínas y los ácidos nucleicos y el aumento de la fluidez perjudica los procesos metabólicos en las membranas, algunas de las aplicaciones prácticas de los efectos destructivos del calor son la esterilización por vapor, la pasteurización y la incineración de asas de inoculación.

De esta forma, la temperatura es una forma muy común y eficaz de controlar los microorganismos, razón por lo cual, es importante conocer las temperaturas de crecimiento bacteriano, es recomendable realizar experimentación con rangos de temperatura bajos para garantizar con certeza la expresión de características probióticas y bioconservantes a temperaturas de conservación alimentaria.

¹⁹¹ VÁSQUEZ, SUÁREZ y ZAPATA. Op. cit., p. 65.

¹⁹² HARISHA, Sharma, *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook* (India: Laxmi Publications Pvt. Ltd, 2007).

¹⁹³ PARKER et al, Op. cit., p. 355.

Los resultados encontrados indican que el crecimiento de *L. casei* es mayor a 37 °C, temperatura adecuada para la producción de subproductos propios de *L. casei*, con ello, una mayor expresión de características probióticos y actividad antimicrobiana. El crecimiento de *L. casei* a 45 °C/24 horas es un indicador sobre los procesos industriales a los que se puede someter la BAL, garantizando el crecimiento de la cepa probiótica.

5.4. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 EN MEDIO MRS Y MEDIO PRO

Según el análisis estadístico, los resultados para el crecimiento, Ln UFC/mL de *L. casei* indican diferencias significativas entre los medios de cultivo (PRO y MRS) ($p < 0,05$) y diferencias entre tiempos muestreados para el medio PRO (9 tiempos) ($p < 5$). El medio MRS no presentó diferencias significativas entre tiempos ($p > 9$) (Tabla 5).

En las tablas 3 y 4 se detalla la composición teórica aproximada de los medios MRS y PRO. Se logra diferenciar que los aportes nutricionales del medio PRO son mayores a los aportes nutricionales del medio MRS. La cinética de fermentación permitió reconocer el tiempo en el que *L. casei* obtiene el máximo crecimiento en los dos medios de cultivo evaluados. Se observó a lo largo de las 24 horas la disminución del pH, acidificación del medio y la reducción de la fuente de carbono.

Parker et al¹⁹⁴ manifestaron que el estudio de los microorganismos se facilita cuando es posible mantener vivas las poblaciones bacterianas bajo condiciones de laboratorio, para esto, la cepa evaluada debe mantenerse estable y se deben suplir los requisitos nutricionales y ambientales, que, para algunos microorganismos, son altamente específicos y la diversidad de estos requisitos son elevados. El medio de cultivo MRS utilizado es considerado como medio de cultivo específico para el crecimiento de *Lactobacilos* bajo condiciones de laboratorio, gracias a su composición en macroelementos y microelementos específicos tales como extracto enzimáticamente digerido de carne y concentraciones específicas de sales como el citrato de amonio¹⁹⁵, sin embargo, su costo se eleva cuando se produce a una escala mayor para obtener grandes cantidades y producir un probiótico comercial¹⁹⁶. Es necesario evaluar alternativas como medio de cultivo bacteriano que estimulen la manifestación de las propiedades probióticas de las BAL, sean de fácil acceso y bajo costo económico, de esa manera, identificar posibles materias primas con importancia en las industrias biotecnológica microbiana, alimentaria y en

¹⁹⁴ PARKER et al, Op. cit., p. 358.

¹⁹⁵ DEMAN, J., ROGOSA, M. y SCHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. Journal of Applied Bacteriology, 23, 1972. 130–135.

¹⁹⁶ VERA MEJÍA Ronald et al. Obtención de Un Candidato a Probiótico de *Lactobacillus Plantarum* 22 LMC a Partir de Un Medio de Cultivo Natural Con Materias Primas Agroindustriales', *Revista de Salud Animal*, 43.3 (2021) <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2021000300003&script=sci_arttext&tlng=en> [accessed 21 August 2022].

la biomedicina animal y humana. Para las especies del género *Lactobacillus*, los autores González, Domínguez-Espinosa y Alcocer¹⁹⁷, referencian que el aporte nutricional de nitrógeno debe ser orgánico en forma de aminoácidos o péptidos, dentro de los cuales, el ácido glutámico, isoleucina y valina son considerados factores de crecimiento y deben estar presentes en el alimento o medio de cultivo.

Tabla 3 Composición nutricional teórica del caldo MRS

Nutriente	Extracto de carne (8 g)	Extracto de levadura (4 g)	D-glucosa (20g)	Aportes totales
Agua %	3	1,64	-	4,64
Energía Kcal	16,6	7,4	75,8	99,80
Proteína g	3,1	0,96	-	4,06
Grasa Total g	0,1	0,04	-	0,14
Carbohidratos g	0,5	0,82	20	21,32
Fibra Diet. Total, g	0	0,26	-	0,26
Ceniza g	1,2	0	-	1,20
Calcio mg	6,5	2,68	-	9,18
Fósforo mg	58,9	4,16	-	63,06
Hierro mg	-	0,16	-	0,16
Potasio mg	-	84	-	84,00
Sodio mg	-	135,2	-	135,20
Zinc mg	-	0,17	-	0,17
Magnesio mg	-	7,2	-	7,20
Tiamina mg	-	0,93	-	0,93
Riboflavina mg	-	0,7	-	0,70
Niacina mg	1,9	5,1	-	7,00
Vit. C mg	-	-	-	0,00
Vit. B6 mg	-	-	-	0,00
Vit. B12 µg	-	0,02	-	0,02

Fuente. JURADO, HD., AGUIRRE, D., RAMÍREZ, C. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: *Revista MVZ Córdoba* 14(2). 2010. Disponible en: 1723-1735. <https://doi.org/10.21897/rmvz.356>

¹⁹⁷ GONZÁLEZ, B. A; DOMÍNGUEZ-ESPINOSA R, and ALCOCER, B. R. USE OF Aloe Vera JUICE AS SUBSTRATE FOR GROWTH OF *Lactobacillus Plantarum* and *L. Casei*, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6.2 (2007), 152–57 <www.somenta.org/journal> [accessed 21 August 2022].

Tabla 4. Composición nutricional teórica del medio PRO

Nutriente	Leche de soya (15 g)	Leche en polvo (150 g)	Azúcar blanco (10 g)	Inulina (15 g)	Aportes totales
Agua %	13,21	7,35	0,13	7,12	27,81
Energía Kcal	8,1	531	38	240	817,10
Proteína g	0,49	53,25	0,01	-	53,75
Grasa Total g	0,26	0,3	-	-	0,56
Carbohidratos g	0,94	77,7	9,81	14,55	103,00
Fibra Diet. Total g	0,09	-	-	13,5	13,59
Ceniza g	-	11,4	-	-	11,40
Calcio mg	3,75	420	8,3	-	432,05
Fósforo mg	7,8	1516,5	0,4	-	1524,70
Hierro mg	0,1	0,48	0,07	-	0,65
Potasio mg	17,7	1020	13,3	-	1051,00
Sodio mg	7,65	3420	2,8	-	3430,45
Zinc mg	0,02	6,05	--	-	6,07
Magnesio mg	3,75	90	0,9	-	94,65
Tiamina mg	0,01	0,24	-	-	0,25
Riboflavina mg	0,01	2463	-	-	2463,01
Niacina mg	0,08	1	0,01	-	1,09
Vit. C mg	-	10,05	-	-	10,05
Vit. B6 mg	0,01	0,45	-	-	0,46
Vit. B12 µg	-	5,97	-	-	5,97

Fuente. JURADO, HD., AGUIRRE, D., RAMÍREZ, C. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: *Revista MVZ Córdoba* 14(2). 2010. Disponible en: 1723-1735. <https://doi.org/10.21897/rmvz.356>

Para la formulación del medio PRO se utilizaron como materias primas leche de soya, leche en polvo, azúcar blanca e inulina. La leche de soya proporciona una gama completa de aminoácidos esenciales (Valina, Leucina, Isoleucina, Treonina, lisina), vitaminas del grupo A, B, D y E, proteínas, carbohidratos (sacarosa, rafinosa y estaquiosa), lípidos, sales minerales, magnesio, calcio, hierro y fósforo¹⁹⁸. En la composición de la leche bovina, entran a formar parte prácticamente todos los nutrientes en cantidades relativamente elevadas, es una excelente fuente de

¹⁹⁸ BARCO LÓPEZ, Sandra Ines and PAREDES OCAMPO, Paula Andrea. Elaboración de Panelitas de Leche de Soya' (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 2004) <<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/20134>> [accessed 22 August 2022].

proteínas de elevado valor biológico y de otros nutrientes como calcio, magnesio, fósforo, zinc, yodo, selenio y de vitaminas del complejo B, así como de vitaminas A y D, pH adecuado, y una forma coloidal que hace disponible todo tipo de nutrientes. La inulina es un fructooligosacárido compuesto por una cadena lineal de fructosas unida por enlaces beta 1-2; en su extremo reductor se encuentra vinculada una molécula de glucosa por enlaces alfa 1-2, Dicho azúcar posee funciones prebióticas las BAL generando efectos protectores inmunológicos; esto se da mediante el metabolismo de la molécula y su almacenamiento final en la célula¹⁹⁹. La inulina posee importantes beneficios, principalmente en las industrias alimenticia y farmacéutica, en formulaciones de alimentos mejora las propiedades organolépticas y es un buen sustituto de grasas sin modificar texturas, además, estimula el crecimiento de la microbiota intestinal ya que no sufre cambios al pasar por el tracto gástrico y estará disponible para ser metabolizada por algunos de los microorganismos intestinales, como las *bifidobacterias* y los *lactobacilos*²⁰⁰. La inulina es el mejor prebiótico para la obtención en masa de especies de *Lactobacillus*, su grado de aprovechamiento por *L. casei* es superior frente a otras bacterias del mismo género, debido a la producción de inulinasa, demostrando una mejor capacidad en metabolizar este fructooligosacárido²⁰¹.

Vallejo et al²⁰² aislaron la cepa láctica *Enterococcus mundtii* del contenido intestinal de (*Odontesthes sp.*), evaluaron el efecto de la composición de medios de cultivo en la producción de biomasa y bacteriocina. De esta forma, diseñaron varios medios de cultivo bajo la fórmula del agar MRS comercial. Encontraron que la mayor actividad de las bacteriocinas se expresó cuando utilizaron el extracto de carne como fuente única de nitrógeno y que la mayor actividad en la producción de biomasa se logró cuando se incluyó en la formulación fructosa o maltosa, resultados comparables con la glucosa, azúcar empleado en el medio original, mientras que la inclusión de sacarosa en el medio de cultivo mostró, no sólo una baja producción de bacteriocinas sino también un bajo nivel poblacional final.

¹⁹⁹ JAMES, M; VELASTEGUI, E; and CRUZ, M. A. Evaluation of Culture Conditions of *Lactobacillus Acidophilus* y *Lactobacillus Casei* on Laboratory Scale, with Inulin as Carbon Source', *Bionatura*, 2.1 (2017), 235–40 <<https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.01.4>>.

²⁰⁰ LARA-FIALLOS, Op. cit., p. 359.

²⁰¹ KUNOVÁ Gabriela et al. In Vitro Fermentability of Prebiotic Oligosaccharides by *Lactobacilli*', *Czech J. Food Sci*, 29 (2011), 49–54.

²⁰² VALLEJO; et al. Efecto de Las Condiciones de Crecimiento y Composición Del Medio de Cultivo Sobre La Producción de Bacteriocina de *Enterococcus Mundtii* Tw56 Effect of Growth Conditions and Culture Medium Composition on Bacteriocin Production by *Enterococcus Mundtii* Tw56, Rev. Colomb. Biotecnol, 2014, xvi.

Vallejo et al²⁰³, Settanni²⁰⁴ y Todorov y Dicks²⁰⁵ inciden en que las propiedades de las bacterias ácido lácticas se expresan bajo condiciones de cultivo subóptimas, de tal forma que, una buena fuente de carbono afectará la velocidad de duplicación celular para alcanzar una población elevada y sintetizar altos niveles de bacteriocinas, y una mayor concentración de nitrógeno maximizará la producción de biocinas y su actividad inhibitoria.

Es necesario nombrar que la fuente y naturaleza de cada uno de los nutrientes incluidos en la formulación del medio MRS, varía con respecto al medio PRO. En donde, como fuente de nitrógeno se utilizó leche en polvo y leche de soya, y como fuente de carbono se utilizó inulina, leche en polvo y azúcar blanco, medio de cultivo descrito, propuesto y evaluado por Jurado, Aguirre y Ramírez²⁰⁶.

5.4.1. Cuento de microorganismos y estimación de población bacteriana en Ln UFC/ mL. Los resultados cinéticos de crecimiento indicaron que para el medio PRO la fase exponencial se observó a las 18 horas con 28,48 Ln UFC/ML ($2,3 \times 10^{12}$ UFC/mL), en contraste, el medio MRS indicó la fase exponencial a las 15 horas con 22,58 Ln UFC/ml ($5,6 \times 10^9$ UFC/mL), tal como se indica en la Figura 7, donde se relaciona el crecimiento de *L. casei* en el medio PRO y el medio MRS durante un periodo de 24 horas, tal como se indica en la Tabla 5 y Figura 7. El análisis estadístico reveló diferencias estadísticas entre los medios de cultivo utilizados ($P < 0,05$).

La determinación de población bacteriana se determinó mediante dos métodos diferentes, para el cultivo bacteriano en medio PRO se utilizó la técnica de recuento en placa y para el cultivo en medio MRS espectrofotometría mencionado por Carpenter²⁰⁷, Koneman et al²⁰⁸ y Gerhard et al²⁰⁹. El recuento en placa permite determinar el número de células viables sobre el medio sólido, por otra parte, la espectrofotometría permite relacionar la biomasa bacteriana con una magnitud

²⁰³ Ibid., p. 25.

²⁰⁴ SETTANNI, Luca; et al. The Role of Environmental Factors and Medium Composition on Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) Production by *Enterococcus Mundtii* Strains', *Food Microbiology*, 25.5 (2008), 722–28 <<https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.01.011>>.

²⁰⁵ SVETOSLAV, D.; TODOROV Y LEON, M.T. Dicks, 'Effect of Modified MRS Medium on Production and Purification of Antimicrobial Peptide ST4SA Produced by *Enterococcus Mundtii*', *Anaerobe*, 15.3 (2009), 65–73 <<https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2008.11.002>>.

²⁰⁶ JURADO, H ; AGUIRRE, D y RAMÍREZ, C. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: *Revista MVZ Córdoba*. 14(2). 2010. Disponible en: 1723-1735. <https://doi.org/10.21897/rmvz.356>.

²⁰⁷ CARPENTER, L Carpenter, L. 1969. Microbiología. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana S.A. México DF. p. 205-215.

²⁰⁸ KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; Dowell V. R.; , H. M. 1987. Diagnóstico microbiológico. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. p. 386

²⁰⁹ GERHARDT, R.G.; MURRAY, E.; WOOD, W.; KRIEG, L.R. 1994. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington. 50 p

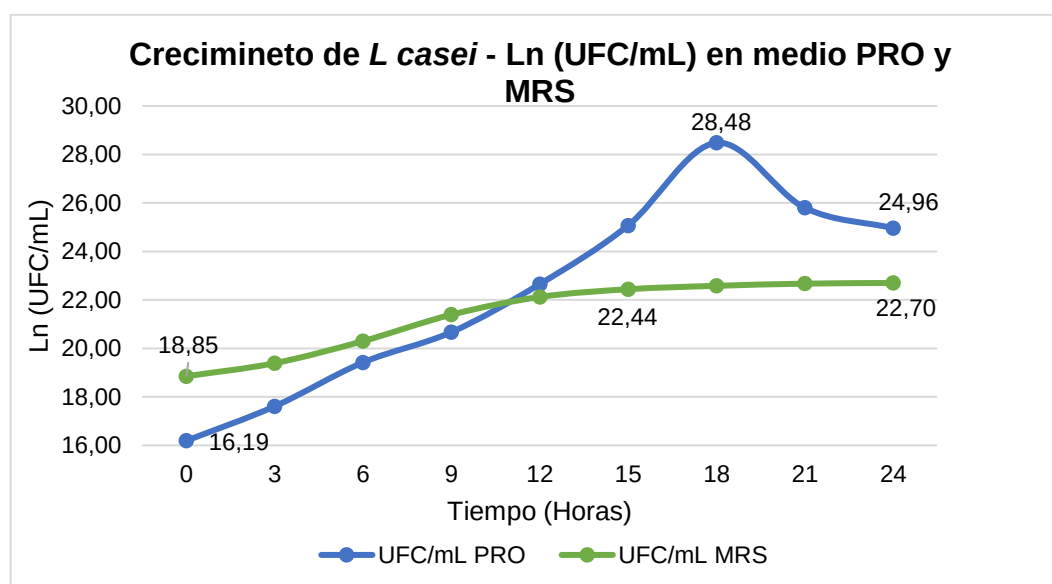
física como la absorbancia de luz, que con el apoyo de la escala de McFarland se determina las UFC/mL según el patrón de absorbancia.

Tabla 5. Crecimiento de *Lactobacillus casei* Ln UFC/mL en los medios de cultivo PRO y MRS.

Tiempo	0	3	6	9	12	15	18	21	24
PRO	16,19 ^c A	17,61 ^c A	19,42 ^{bc} A	20,67 ^b A	22,65 ^b A	25,07 ^b A	28,48 ^a A	25,80 ^b A	24,96 ^b A
MRS	18,85 ^a A	19,39 ^a A	20,30 ^{aA}	21,39 ^a A	22,12 ^a A	22,44 ^a A	22,58 ^a B	22,67 ^a A	22,70 ^a A

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios (p<0,05). Letras distintas en las filas muestran diferencias en los tiempos de evaluación (p<0,05).

Figura 7. Crecimiento de *Lactobacillus casei* Ln (UFC/mL) en los medios de cultivo PRO y MRS



La determinación entre los dos métodos radica en que el recuento en placa permite conocer células viables y la espectrofotometría no diferencia entre bacterias viables o muertas, sin embargo, permite establecer si la cantidad de bacterias presente en el medio crece o es estable. Bajo esta premisa, en la figura 7, permite establecer la fase exponencial de crecimiento para el medio PRO a las 18 horas y para el medio MRS a 15 horas. Para el tiempo inicial la población bacteriana es menor para el medio PRO con 16,19 Ln UFC/mL ($1,1 \times 10^7$ UFC/mL) y para el medio MRS es 18,85 Ln UFC/mL ($1,5 \times 10^8$), sin embargo, en la fase exponencial, *L. casei* en el medio PRO tiene una mayor cantidad de UFC/mL, medio en el cual también es mayor la población bacteriana a las 24 horas (p<0,05).

Los resultados descritos permiten establecer que el medio PRO tiene aportes óptimos para el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 334, manteniendo la población bacteriana superior a 1×10^7 UFC/mL recomendada como concentración mínima en productos probióticos, ya que la concentración de bacterias durante su paso por el tracto gastrointestinal puede disminuir considerablemente²¹⁰.

El tiempo de duplicación celular para *L. casei* en el medio MRS corresponde a 2,63 horas y en medio PRO 0,993 horas. Los valores para duplicación celular en la presente investigación son elevados a comparación con los obtenidos por Fajardo et al²¹¹ con 14,47 min para *L. plantarum*, sin embargo, Jurado et al²¹² reportaron valores de 0,98 horas y 42,42 min para la misma BAL, similares a los valores compartidos por Romero-Benavides²¹³ que registraron valores de 64,38 min y 48,41 min para *L. gasseri* evaluada en medio MRS y medio PRO, los últimos autores referenciados, enuncian valores cercanos a los obtenidos en el medio PRO en esta investigación y menores al tiempo de duplicación celular para el medio MRS.

La velocidad específica de crecimiento para *L. casei* en el medio MRS corresponde a $0,264 \mu\text{max h}^{-1}$ y en medio PRO $0,698 \mu\text{max h}^{-1}$. Vera et al²¹⁴ evaluaron *L. plantarum* en dos medios de cultivo, MRS y MSL (melaza, suero de leche y levadura) y reportan valores para velocidad específica de $0,61 \mu\text{max (h}^{-1})$ $0,56 \mu\text{max (h}^{-1})$ respectivamente, Agudelo et al²¹⁵ en sus ensayos con *L. plantarum* encontraron valores de velocidad específica de $0,53 \mu\text{max (h}^{-1})$ y Jurado-Gámez²¹⁶ encontraron para *L. gasseri* en medio MRS y medio PRO una velocidad específica de $0,5943 \mu\text{max (h}^{-1})$ y $0,7348 \mu\text{max (h}^{-1})$. En específico, Gonzáles, Domínguez-Espinosa y Alcocer, reportan una velocidad específica para *L. casei* de $2,7 \mu\text{max (h}^{-1})$ en aloe vera, y $2,9 \mu\text{max (h}^{-1})$ en medio MRS, por su parte, James y Velastegui²¹⁷ evaluaron inulina como medio de cultivo en *L. acidophilus* y *L. casei* obteniendo valores de

²¹⁰ EL-ENSHASY et al. Op. cit., p. 325.

²¹¹ FAJARDO-ARGOTI, Catalina; JURADO-GÁMEZ Henry, and PARRA-SUESCÚN, Jaime. Viabilidad de Lactobacillus Plantarum Microencapsulado Bajo Condiciones Gastrointestinales Simuladas e Inhibición Sobre Escherichia Coli O157:H7 Viability of Microencapsulated Lactobacillus Plantarum under Simulated Gastrointestinal Conditions and Inhibit', *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 24 (2021) <<https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733>>.

²¹² JURADO-GÁMEZ, GÚZMAN-INSUASTY, and JARRÍN-JARRÍN. Op. cit., p. 57.

²¹³ JURADO-GÁMEZ, Henry; et al. Cinética de Fermentación, Pruebas de Desafío in Vitro y Efecto de Inhibición de Lactobacillus Gasseri ATCC 19992, *Veterinaria y Zootecnia*, 10.2 (2016), 72–89 <<http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v10n2a07.pdf>> [accessed 22 August 2022].

²¹⁴ VERA MEJÍA et al., Op. cit., p. 2-3.

²¹⁵ AGUDELO, Claudia et al. DETERMINARON OF KINETIC PARAMETERS OF TWO LACTIC INOCULUMS: Lactobacillus Plantarum A6 AND LACTIC ACID BACTERIAS OF YOGURT', *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8.2 (2010), 8 <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000200002&lng=en&nrm=iso&tling=es> [accessed 22 August 2022].

²¹⁶ JURADO-GÁMEZ et al. Op. cit., p. 74.

²¹⁷ JAMES y VELASTEGUI. Op. cit., p. 238.

0,79 μmax (h^{-1}) y 0,307 μmax (h^{-1}) respectivamente, datos cercanos a los valores obtenidos en la presente investigación.

Se debe tomar en cuenta que en el estudio se comparó la utilización de diversas fuentes de carbono y por lo tanto la velocidad específica se vio afectada, Kunova²¹⁸ y James²¹⁹ sugieren que procesos energéticos influyen en el metabolismo de moléculas complejas como la inulina, es decir el microorganismo consume inicialmente las moléculas más simples para dar paso al consumo de azúcares más complejos como la inulina. Los autores indican que el sistema de degradación de inulina es complejo, inició con la conversión del FOS en monómeros de fructosa y glucosa hasta obtener productos finales como succinato, acetato y etanol, este gasto energético es representativo e influye en la producción de biomasa incluyendo su velocidad de crecimiento. Sin embargo, al complementar el medio PRO con diferentes fuentes de carbono, la BAL tiene disponibilidad de este nutriente e incrementar la población bacteriana. Además, los autores mencionan que niveles adecuados de pH incide en el rendimiento de *L. casei*, de esa forma sugieren que un pH de 6,5 a 7 promueve un mayor aprovechamiento de sustrato por la bacteria.

Los autores Xiang et al²²⁰ y James²²¹, anuncian investigaciones previas indicando que la acción de la inulinasa (enzima que sintetizan bacterias del género *Lactobacillus* y degrada inulina), sobre la inulina varía según el pH; la enzima degrada una molécula de inulina de manera completa a pH 5-7, mientras que a pH bajos la inulinasa degrada moléculas mediante el rompimiento de enlaces de manera aleatoria. Esto sugiere (según las condiciones de cultivo del presente estudio) que el método de acción de la inulinasa combinada con el pH, contribuyó en el crecimiento bacteriano, debido al rompimiento del fructooligosacárido en monómeros, facilitando procesos metabólicos, además, la disponibilidad de carbonos de leche de soya y leche en polvo hacen que la bacteria acceda a nutrientes de un gran valor biológico, permitiendo de esta manera un óptimo desarrollo y formación de biomasa. Condiciones que acogen al medio de cultivo PRO.

Castañeda²²², expresó que el efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento es complejo ya que depende exclusivamente del metabolismo microbiano y, por ende, varía de microorganismo a microorganismo. Estas

²¹⁸ KUNOVÁ et al. Op. cit., p. 52.

²¹⁹ JAMES, VELASTEGUI y CRUZ. Op. cit., p. 238.

²²⁰ XIANG, Ge Yang; QIAN, He and ZHANG, Wei Guo. Enhancement of L-Lactic Acid Production in *Lactobacillus Casei* from Jerusalem Artichoke Tubers by Kinetic Optimization and Citrate Metabolism', *J Microbiol Biotechnol*, 20.1 (2010), 101–9
<<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.049>>.

²²¹ JAMES, VELASTEGUI y CRUZ. Op. cit., p. 239.

²²² CASTAÑEDA, María Teresita, *Estequiometría y Cinética Del Crecimiento Microbiano*, 2019, II
<<http://www.latextemplates.com>> [accessed 22 August 2022].

reacciones metabólicas están en su mayoría catalizadas por enzimas que dependen de la temperatura dada su naturaleza proteica. La misma autora menciona que al incrementar la temperatura, μ_{max} se incrementa ya que la velocidad global de las reacciones que componen el metabolismo aumenta, sin embargo, a partir de una determinada temperatura, causa lisis celular. Desde el punto de vista productivo, conviene conocer la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo que se cultiva con propósito biotecnológico y cultivar a los microorganismos a una temperatura cercana a la adecuada.

El número de generaciones por hora para *L. casei* fue de 0,38 en el medio MRS y 1,01 en el medio PRO, y se obtuvo una cosecha máxima igual a 3,73 Ln UFC/mL en el medio MRS y 9,61 Ln UFC/mL en el medio PRO. Fajardo et al²²³ tras evaluar *L. plantarum* en medio MRS presentó datos para número de generaciones por hora de 4,62 y una cosecha máxima de 10,3 Ln UFC/150 μ L, a pesar de ser bacterias del mismo género, *Lactobacillus*, los resultados son variables, tanto para el medio MRS como para el medio PRO. Existen varios factores que pueden afectar los resultados mencionados anteriormente, la composición del medio de cultivo, el pH, la temperatura y especies bacterianas del mismo género, estas son variables que inciden directamente sobre cada parámetro a tener en cuenta en la cinética de fermentación.

5.4.2. Determinación de pH. La actividad de pH para cada medio se presenta en la Tabla 6 y Figura 8. La medida de pH en los dos medios presentó diferencia en los tiempos 6 y 12 ($p < 5$). La evaluación de pH, para ambos medios, indicó un descenso a medida que la población de *L. casei* se incrementa mostrando diferencias significativas para los tiempos 6 y 12 ($p < 5$) entre medios.

Los resultados en la determinación de pH correspondientes en la presente investigación permiten enunciar que, la composición del medio de cultivo inoculado (PRO o MRS) y la concentración bacteriana no tienen diferencias estadísticas sobre el pH para cada tiempo evaluado y mantienen un descenso gradual del mismo en el tiempo de evaluación, obteniendo una variación de pH desde 5,82 y 5,84 hasta 3,74 y 3,81 para los medios de cultivo PRO y MRS respectivamente.

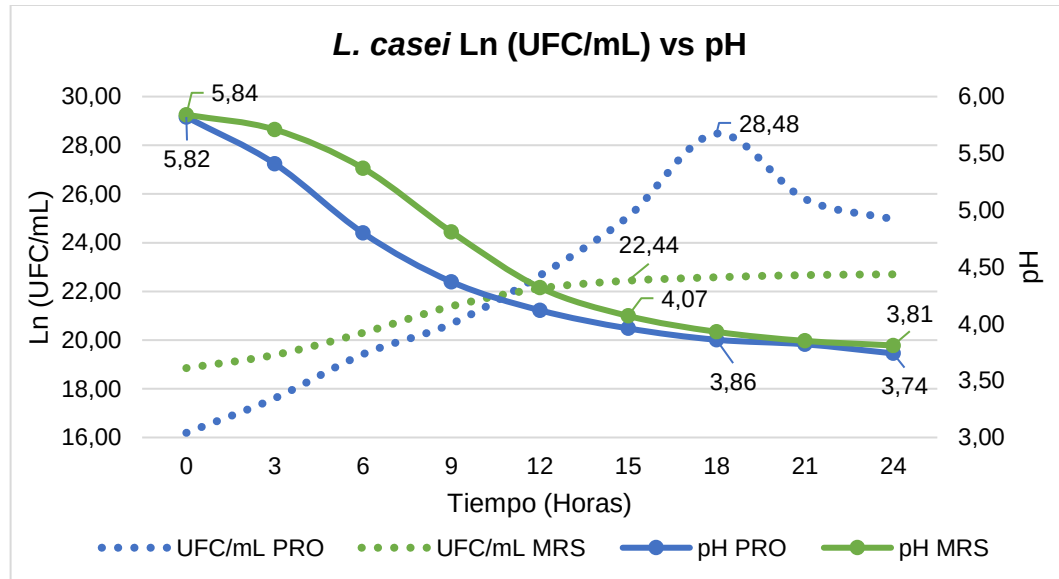
Tabla 6. Determinación de pH de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS

Tiempo	0	3	6	9	12	15	18	21	24
PRO	5,82 ^{aA}	5,41 ^{aA}	4,80 ^{abA}	4,37 ^{abA}	4,12 ^{abA}	3,96 ^{bA}	3,86 ^{bA}	3,82 ^{bA}	3,74 ^{bA}
MRS	5,84 ^{aA}	5,71 ^{aA}	5,37 ^{aA}	4,81 ^{abA}	4,32 ^{bA}	4,07 ^{bA}	3,93 ^{bA}	3,85 ^{bA}	3,81 ^{bA}

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios ($p < 0,05$). Letras distintas en las filas muestran diferencias en los tiempos de evaluación ($p < 0,05$).

²²³ FAJARDO-ARGOTI, JURADO-GÁMEZ, and PARRA-SUESCÚN. Op. cit., p. 4.

Figura 8. Determinación de pH de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS



De acuerdo con Wong-Villareal et al²²⁴, este comportamiento se debe a los procesos bioquímicos realizados por las BAL, que transforma los azúcares presentes en el sustrato, en ácido láctico, que ejerce la mayor parte de la capacidad inhibidora contra los microorganismos. Cuando se produce ácido láctico, el pH del medio disminuye y, en consecuencia, los ácidos orgánicos no se disocian, propiedad que permite penetrar en las membranas bacterianas, lo que hace que los aniones ácidos débiles se acumulen en el citoplasma, afecta los procesos metabólicos, produciendo la inhibición y finalmente la muerte, interacciones explicadas por Dekker²²⁵. Fang²²⁶ considera que el pH óptimo de crecimiento ronda un valor de 5,5, a pesar de que, como muchas otras BAL, es capaz de tolerar un pH de hasta 2,0; no sintetiza porfirinas y posee un metabolismo estrictamente fermentativo, con ácido láctico como producto mayoritario.

Se encontró valores de pH iguales a 3,74 y 3,81 para los medios de cultivo PRO y MRS, lo que indica que el proceso de fermentación es una alternativa para el control de otros microorganismos que no poseen la capacidad de crecer en ambientes ácidos, siendo esta una barrera adecuada para evitar la proliferación de bacterias

²²⁴ WONG-VILLARREAL, A.; CORZO-GONZÁLEZ, H.; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; GIACOMÁN-VALLEJOS, G. Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México. CienciaUAT, 2021, Vol. 15 n 2, p. 144-155.

²²⁵ DEKKER, Marcel. MICROBIOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASPECTS Third Edition, 4th edn, 2012.

²²⁶ FANG, Op. cit., p. 190.

patógenas. El antagonismo hacia las bacterias patógenas también es una característica deseable para ser considerado como un probiótico²²⁷.

Es importante mencionar la acción que presenta el pH sobre la producción y estabilidad de bacteriocinas formadas por BAL. De tal forma que Wang²²⁸ declaró la relación entre la estabilidad de algunas bacteriocinas con la disminución del pH, llegando a presentar rangos de estabilidad de 2 a 10 pH, para el caso de la nisina, que además es estable tras someterse a un tratamiento de temperatura elevado (121°C/30min), por otra parte, los diferentes tipos de bacteriocinas tienen diferentes requisitos de pH y se forman variando la fase de crecimiento, por ejemplo, la pediocina AcH se produce en grandes cantidades a un pH de 5,0 o inferior a 5,0 después de entrar en una etapa de crecimiento estable. Por el contrario, la nisina y la leuconocina se forman en grandes cantidades durante el período de crecimiento logarítmico con un valor de pH elevado, explicado por Chen²²⁹.

Como mencionan Martínez et al²³⁰, los pH encontrados durante la cinética indican que la cepa posee características adecuadas para resistir ambientes con niveles bajos de pH; esta capacidad es importante para un probiótico, dado que le permitirá sobrevivir con crecimientos adecuados. En el mismo sentido, Mora-Villalobos²³¹ mencionan que la evaluación de los probióticos se basa en la capacidad de la cepa para sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal, como pH bajo, resistencia a la lisozima, resistencia a bilis y la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, a las células epiteliales humanas o a diferentes líneas celulares también, características que se utilizan para analizar e identificar probióticos.

5.4.3. Determinación de porcentaje de ácido láctico. En cuanto a la acidez, se encontró un incremento de la misma con el pasar del tiempo, efecto observado en ambos medios. Por otra parte, la comparación entre medios muestra un incremento de acidez similar hasta la hora 5, mientras que a partir de la hora 9, hay una mayor producción de ácido láctico por parte de la bacteria en el medio PRO. Existe diferencia en los tiempos 6, 9, 15, 18 y 24. ($p < 5$). Ver Tabla 7 y Figura 9.

El valor inicial de porcentaje de acidez para el medio MRS y medio PRO equivale a 0,4 % y 0,46 %, en la fase exponencial los medios de cultivo alcanzaron 1,32 % en

²²⁷ MORA-VILLALOBOS, José Aníbal; et al. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review', *Fermentation*, 6.23 (2020), 21 <<https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>>.

²²⁸ WANG, Ji et al. Op. cit., p. 154.

²²⁹ CHEN, Wei. *Lactic Acid Bacteria and Fermented Meat Products, Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications* (Singapore: Springer, 2019) <<https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4>>.

²³⁰ MARTÍNEZ BENAVIDEZ, et al. "Determinación de la cinética de fermentación en dos medios probióticos, pruebas de desempeño in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus plantarum*." *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)* 10.1 (2016): 23-41.

²³¹ MORA-VILLALOBOS et al. Op. cit., p. 8.

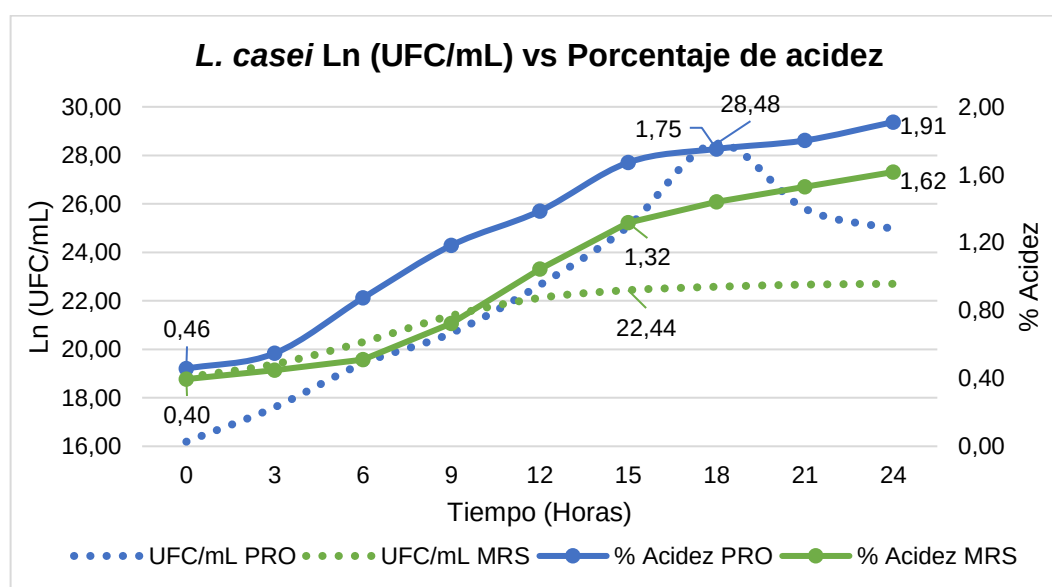
MRS y 1,75 % en PRO, finalmente, el parámetro alcanzo 1,62 % de acidez para el medio MRS y 1,91 % de acidez para el medio PRO, con diferencia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 7. Determinación de porcentaje de ácido láctico de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS

Tiempo	0	3	6	9	12	15	18	21	24
PRO	0,458 ^a A	0,548 ^a A	0,874 ^a bA	1,184 ^b A	1,386 ^b A	1,672 ^b cA	1,752 ^c A	1,802 ^c A	1,910 ^c A
MRS	0,396 ^a A	0,448 ^a A	0,510 ^a A	0,724 ^a bB	1,044 ^b B	1,317 ^b cB	1,440 ^c B	1,528 ^c A	1,616 ^c B

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios ($p < 0,05$). Letras distintas en las filas muestran diferencias en los tiempos de evaluación ($p < 0,05$).

Figura 9. Determinación de porcentaje de acidez de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS



Al respecto, Sinsajoa et al²³², reportan datos para *L. platarum* evaluado en medio MRS que van desde 0,17% en la hora cero hasta 0,41% en la hora 24. Valores lejanos a los obtenidos en el estudio, sin embargo, se evidencia el incremento de ácido láctico. El ácido láctico es un ácido orgánico natural que puede ser producido por fermentación o síntesis química, se encuentra presente en muchos alimentos, tanto de forma natural o como producto de la fermentación microbiana en varios

²³² SINSAJOA-TEPUD y NARVÁEZ RODRÍGUEZ. Op. cit., p. 90.

alimentos fermentados²³³. De acuerdo a Ghaffar et al²³⁴ el ácido láctico puede ser obtenido por procesos químicos y por la fermentación microbiana; sin embargo, el método de obtención con bacterias ácido lácticas tiene ventaja sobre el otro método, debido a que de él se puede extraer ácido láctico puro, mientras que por la síntesis química siempre quedarán elementos contaminantes. El mismo autor anuncia que con la polimerización del ácido láctico se obtiene el ácido poliláctico (PLA), un polímero de gran interés porque reemplaza muchos productos derivados del petróleo.

Fang²³⁵ y Gobbeti y Minervini²³⁶ señalan que *L. casei* forma parte del grupo de especies heterofermentativas facultativas, el cual produce ácido láctico a partir de hexosas (galactosa, fructosa y glucosa), por medio de la vía Embden-Meyerhoff, y, a partir de pentosas (ribosa y arabinosa), por la ruta del 6 – fosfogluconato/fosfocetolasa, o, bajo ciertas condiciones, pueden generar una mezcla de sustancias como el ácido láctico, acético, etanol y ácido fórmico, sin presencia de gas. Por lo general, solo se sintetiza el isómero L (+) del ácido láctico.

En la presente investigación se pudo evidenciar que la producción de ácido láctico se incrementa simultáneamente mientras que el pH disminuye, su aumento se puede dar hasta el agotamiento de las fuentes de carbono ya que existe una relación inversa entre la acidez y el pH. Además, el uso de carbohidratos fermentables y alcoholes son empleados como fuentes de energía para formar principalmente ácido láctico similar a lo explicado por Kanauchi²³⁷.

Kanauchi²³⁸ anuncia que muchos de los efectos antimicrobianos de las BAL se han asociado a la producción de ácido láctico y ácido acético, como producto del metabolismo de carbohidratos, además, menciona que el incremento en la concentración de estas sustancias genera una disminución del pH del medio, ocasiona una inhibición en el crecimiento de diversos microorganismos patógenos y disminuye la probabilidad de deterioro de los alimentos. El autor Chen²³⁹, sugiere que el ácido láctico se puede utilizar en una variedad de aplicaciones y, debido a su amplio espectro de actividad y su estado GRAS, es especialmente adecuado para la industria alimentaria. Las soluciones que contienen ácidos orgánicos se utilizan en la industria de procesamiento de carne en los Estados Unidos y Canadá para la

²³³ FLORES TIXICURO, p. 18.

²³⁴ TAYYBA GHAFAR, et al. Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification', *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7.2 (2014), 222–29 <<https://doi.org/10.1016/J.JRRAS.2014.03.002>>.

²³⁵ FANG WU WU, p. 20.

²³⁶ GOBBETTI y MINERVINI, Op. cit., p. 1.

²³⁷ KANAUCHI, Makoto. *Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols*, 2019, MDCCCLXXXVII <<http://www.springer.com/series/7651%0Ahttp://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8907-2>>.

²³⁸ Ibid., p. 102.

²³⁹ CHEN, Op. cit., p. 234.

descontaminación de canales. Flores²⁴⁰ describió propiedades antimicrobianas, potenciador del sabor, control de pH, disolvente, humectante, hidratante, exfoliante suave, renovación celular, limpiador, quelante, desincrustante, ayuda para la desoxidación y desengrasante.

5.4.4. Determinación de producción de proteínas. El consumo de proteína para el medio PRO muestra un decrecimiento durante toda la fase de evaluación. Este mismo comportamiento se puede encontrar en el medio MRS. Se observa un menor contenido de proteína en el medio MRS al inicio de la fase exponencial, factor que hace que en todos los tiempos este medio tenga niveles bajos como se observa en la Tabla 8 y Figura 10. El análisis estadístico reporta diferencias entre los medios ($p < 5$).

Tabla 8. Determinación de producción de proteínas de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS

Tiem po	0	3	6	9	12	15	18	21	24
PRO	1307,8 ^{aA}	1206,3 ^{bA}	1002,7 ^{cA}	846,0 ^{dA}	549,41 ^{eA}	499,71 ^{eA}	486,38 ^{deA}	476,98 ^{eA}	459,41 ^{Fa}
MRS	489,8 ^{6aB}	378,50 ^b	334,71 ^{bB}	284,5 ^{6cB}	275,02 ^{cB}	243,05 ^{cdB}	221,38 ^{dB}	225,47 ^{dB}	214,71 ^{dB}

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios ($p < 0,05$). Letras distintas en las filas muestran diferencias en los tiempos de evaluación ($p < 0,05$).

Después de graficar los datos registrados en los medios PRO y MRS, se logra observar la reducción bien prolongada que inicia desde el tiempo cero hasta la hora doce, en los dos medios y finalmente una reducción controlada hasta la hora 24. En el medio PRO, la concentración de proteína corresponde a 4,89mg/L al final de la fase exponencial (hora 15), y para el medio MRS la concentración al final de la fase exponencial corresponde a 2,43 mg/L, ($p < 5$). Se puede determinar una mayor cantidad de proteína en el medio PRO desde la hora cero, y una reducción con mayor velocidad, a comparación el medio MRS reportó una menor cantidad de proteína inicial y su descenso se dio con menor velocidad.

Romero y Morillo²⁴¹ obtuvieron para *L. gasseri* valores de proteína en los medios MRS y PRO de 0,66 mg/L a las 20 h y 3,12 mg/L a las 16 h, por otra parte, Mesías y Orbes²⁴² encontraron para *L. plantarum* valores de proteína en los medios MRS y PRO de 1,61 y 1,47 mg/L a las 16 horas y Sinsajoa y Narváez²⁴³ para *L. planarum*

²⁴⁰ FLORES TIXICURO, p. 20.

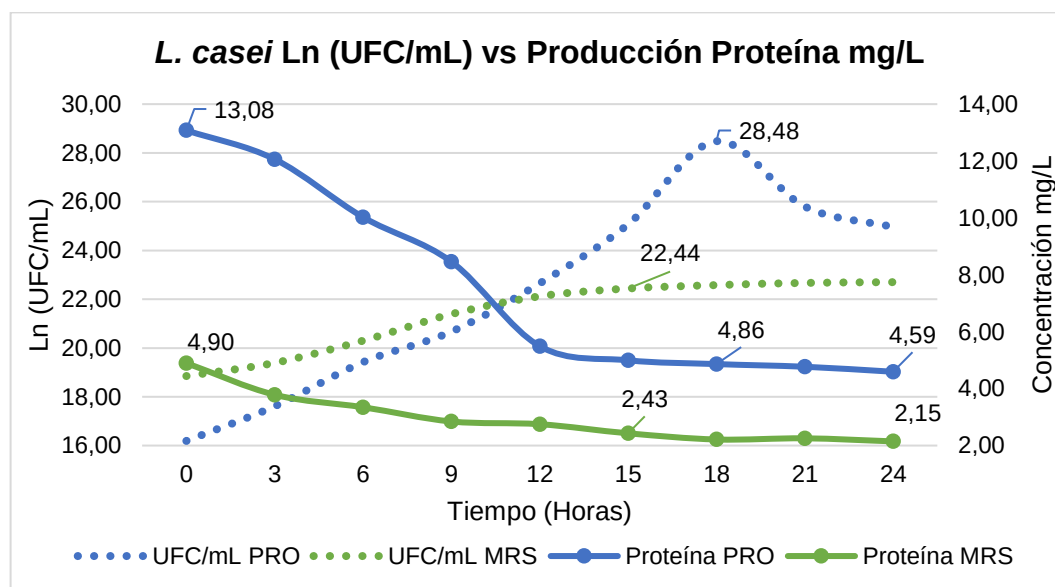
²⁴¹ JURADO-GÁMEZ et al., Op. cit., p. 21.

²⁴² MESÍAS PANTOJA and ORBES VILLACORTE. Op.cit., p. 24.

²⁴³ SINSAJOA Y NARVÁEZ, Op. cit., p. 101.

valores de 4,9 mg/L en cultivo MRS. Los datos referenciados varían dependiendo del medio de cultivo y entre la misma especie, factores que determinan la concentración de consumo de proteína en cada estudio citado

Figura 10. Determinación de producción de proteínas de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS



Muchas bacterias ácido lácticas parecen tener solo una capacidad muy limitada para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico y, por lo tanto, dependen de los aminoácidos preformados presentes en el medio de crecimiento, especialmente, las BAL lácteas se basan en la degradación proteolítica de las proteínas externas y en la absorción de los péptidos y aminoácidos resultantes²⁴⁴. Las especies que pertenecen al género *Lactobacillus* requieren al menos algunos aminoácidos dependiendo de la especie o cepa específica, algunas especies, como *L. plantarum*, requieren solo 3 aminoácidos, mientras que otras, como *L. acidophilus*, requieren 14 aminoácidos, en consecuencia, tienen un sistema proteolítico específico y en funcionamiento para adquirir sus aminoácidos del medio de crecimiento o de sus hábitats naturales. El sistema proteolítico es esencial para el crecimiento bacteriano, consiste en proteinasas, sistemas de transporte y peptidasas y se considera que la actividad proteolítica de algunas cepas de puede ayudar en el desarrollo de productos lácteos hipoalergénicos, ya que tienen la capacidad de degradar la proteína de suero de leche β -lactoglobulina manifestado por Dekker²⁴⁵.

²⁴⁴ CHEN, Op. cit., p. 89.

²⁴⁵ DEKKER, Op. cit., p. 81.

El mismo autor, Dekker²⁴⁶ describe las proteinasas que se secretan extracelularmente para hidrolizar las proteínas en oligopéptidos, que luego son absorbidos por la célula por los transportadores, para ser degradados aún más por las peptidasas intercelulares, el nivel y especificidad de la actividad proteolítica difiere entre especies de *Lactobacillus* y varía incluso entre cepas de la misma especie, algunas cepas pueden tener una actividad incluso 15 veces mayor que otras, además, se menciona a principales factores que afectan la actividad proteolítica de las cepas de *Lactobacillus* como el pH, la temperatura, los iones metálicos y la presencia de inhibidores.

Los sistemas proteolíticos contribuyen a los cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración de varios productos alimenticios lácteos y no lácteos fermentados, lo que lleva a la producción de péptidos bioactivos con efectos inmunológicos y de salud, y son responsables de las propiedades organolépticas de los productos finales. Se menciona que las propiedades funcionales (cuerpo, textura, fusión y elasticidad) de diversos alimentos fermentados en el mercado y desarrollados culturalmente dependen del sistema proteolítico²⁴⁷.

5.4.5. Determinación de consumo de azúcares totales. Los resultados para la variable azúcar en la cinética de fermentación indicaron que el consumo es significativamente diferente a las 9 horas ($p < 5$) para el medio PRO. En el medio MRS las diferencias son significativas para el mismo tiempo ($p < 5$). Por otra parte, se observa diferencias entre los distintos medios, hay un consumo mayor en el medio MRS durante las seis primeras horas. (Ver Tabla 9 y Figura 11).

Tabla 9. Determinación de consumo de azúcares de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS

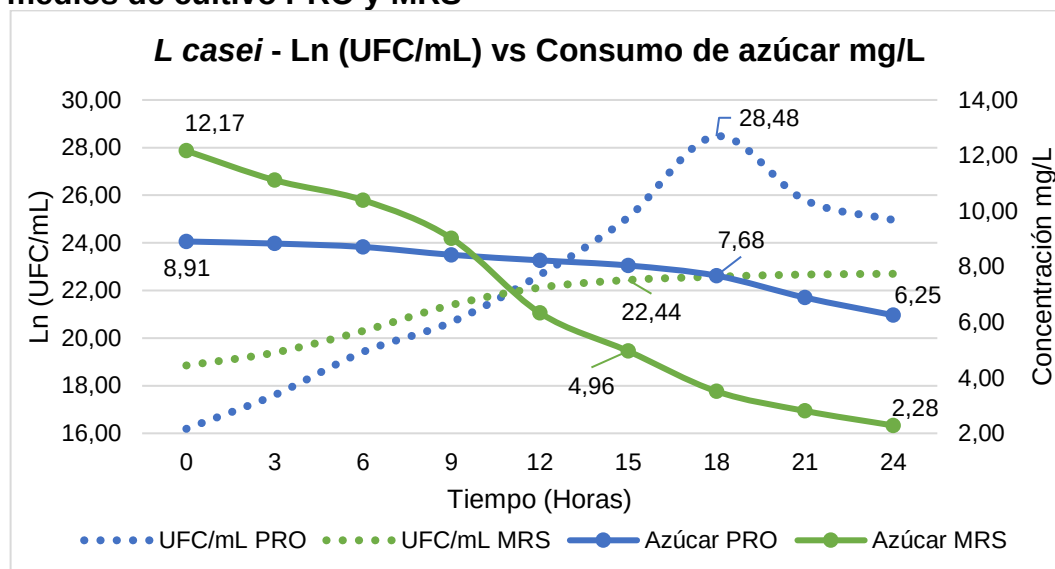
Tiempo	0	3	6	9	12	15	18	21	24
PRO	89,06 ^a B	88,31 ^a B	87,09 ^{aB}	84,26 bA	82,28 ^b cA	80,42 cA	76,76 cA	68,89 dA	62,53 eA
MRS	121,71 aA	111,14 aA	103,94 ^a bA	90,21 bA	63,39 ^c B	49,61 dB	35,13 eB	28,09 eB	22,83 ^f B

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios ($p < 0,05$). Letras distintas en las filas muestran diferencias en los tiempos de evaluación ($p < 0,05$)

²⁴⁶ Ibid., p. 82.

²⁴⁷ KANAUCHI, Op. cit., p. 69.

Figura 11. Determinación de consumo de azúcares de *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo PRO y MRS



Con respecto al consumo de azúcares reportado en la presente investigación, se estableció una constante disminución de la fuente de carbono en los dos medios de cultivo (PRO y MRS). La variación se da desde 8,91 mg/L (tiempo inicial) a 6,25mg/L (tiempo final) con 4,96mg/L en la fase exponencial (18 horas) para el medio PRO, y de 12,17 mg/L (tiempo inicial) a 2,28 mg/L (tiempo final) con 4,96 mg/L en la fase exponencial (15 horas) para el medio MRS. Dados los resultados registrados, se infiere que *L. casei* consumió con mayor facilidad los azúcares derivados del medio de cultivo MRS, sin embargo, el mayor crecimiento bacteriano se dio en el medio de cultivo PRO. La concentración de azúcares en los dos medios de cultivo disminuye a medida que se evidencia una mayor población bacteriana.

Fajardo et al²⁴⁸ reportan un consumo de azúcares de 6,98mg/L en la fase exponencial (11:50 horas) de *L. plantarum* en medio MRS, cercano al reportado por Sinsajoa y Narváez²⁴⁹ con 6,89 mg/L en medio MRS (12 horas), por otra parte, Jurado et al²⁵⁰ obtienen un valor en consumo de azúcar para *L. gasseri* igual a 2,032 mg/L (12 horas).

Las especies que componen el género *Lactobacillus* son quimioheterótrofas, lo que significa que obtienen su energía para el mantenimiento y la síntesis de macromoléculas únicamente a partir de la fosforilación a nivel de sustrato, es decir, fermentación. La glucólisis es la vía más común, pero la vía de las pentosas-fosfato también se utiliza en especies del género²⁵¹. De esta forma se describe la vía

²⁴⁸ FAJARDO-ARGOTI; JURADO-GÁMEZ y PARRA-SUESCÚN, Op. cit., p. 2.

²⁴⁹ SINSAJOA y NARVÁEZ, Op. cit., p. 82.

²⁵⁰ JURADO-GÁMEZ and FAJARDO-ARGOTI, Op. cit., p. 1.

²⁵¹ CHEN, Op. cit., p. 25.

homofermentativa que se basa en la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas) y produce prácticamente solo ácido láctico, por otra parte, la fermentación heterofermentativa (vía de las pentosas-fosfato) produce, además de ácido láctico, cantidades significativas de CO₂ y etanol o acetato. Como regla general, las pentosas solo se pueden fermentar de forma heterofermentativa entrando en la vía fermentativa como ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato, pero luego CO₂ no se produce²⁵².

Los azúcares libres pueden transportarse a través de sistemas de permeasa o un sistema de fosfotransferasa específico inducible o sus siglas en inglés PTS. El transporte de glucosa, fructosa y galactosa puede ocurrir a través del sistema PTS después de diversos pasos de isomerización y fosforilación para terminar como glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, galactosa-6-fosfato²⁵³. En el mismo sentido, las pentosas libres son absorbidas por permeasas específicas entrando en la ruta pentosa-fosfato como ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato y terminar con la fermentación heterofermentativa²⁵⁴. Monedero et al²⁵⁵ mencionan que en una cepa de *L. casei*, el PTS parece ser el principal mecanismo de transporte de fructosa, manosa, manitol, sorbosa, sorbitol, celobiosa y lactosa.

Las especies homofermentativas obligatorias, fermentan las hexosas (glucosa, manosa, galactosa, fructosa) a través de la glucólisis para producir ácido láctico como producto final. Las especies heterofermentativas facultativas, fermentan las pentosas a través de la ruta pentosas-fosfato y homofermentativamente las hexosas, para producir ácido láctico como producto principal y ácidos orgánicos en menor concentración²⁵⁶. Finalmente, las especies heterofermentativas obligatorias, que pueden utilizar tanto la glucólisis como la ruta de las pentosas fosfato²⁵⁷.

La lactosa puede ingresar a la célula por medio de una permeasa específica o como lactosa fosfato mediante un sistema específico de la lactosa, si no existe este mecanismo en la cepa láctica, por acción enzimática, la lactosa se debe romper en glucosa y galactosa para que ambos monosacáridos pueden entrar posteriormente en las principales vías de fermentación²⁵⁸. Debido a la presencia de disacáridos (lactosa, sacarosa y maltosa) en varios alimentos que se someten a procesos fermentativos y para efectos de esta investigación, la presencia de sacarosa y lactosa en el medio de cultivo formulado, seguramente, los disacáridos disponibles inducen a que la cepa estudiada realice procesos adicionales en el medio PRO a

²⁵² KANAUCHI, Op. cit., p. 34.

²⁵³ DEKKER, Op. cit., p. 19.

²⁵⁴ PARKER, et al., Op. cit., p. 42.

²⁵⁵ MONEDERO, Vicente et al. The Phosphotransferase System of *Lactobacillus Casei* : Regulation of Carbon Metabolism and Connection to Cold Shock Response. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12 (2007), 20–32 <<https://doi.org/10.1159/000096456>>.

²⁵⁶ DEKKER, Op. cit., p. 78.

²⁵⁷ KANAUCHI, Op. cit., p. 33.

²⁵⁸ MONEDERO, et al., Op. cit., p. 23.

diferencia del medio MRS, razón posible, por la cual el consumo de azúcares en el medio PRO es menor a comparación del medio comercial, a pesar de ello, los parámetros indican mayor cantidad de UFC/mL en el medio formulado.

Entendiendo las rutas mediante las cuales las BAL metabolizan nutrientes, se puede diferir que evidentemente la composición del medio de cultivo y disposición de fuentes de carbono y nitrógeno, inciden directamente en la absorción de los mismos, en algunos casos generando un mayor desgaste energético, por lo tanto, es de gran importancia garantizar nutrientes de fácil metabolismo o de diferente composición y disponibilidad, con el fin de mejorar el rendimiento en los parámetros y reducir precios en caso de sugerir la producción de *L. casei* como probiótico a gran escala.

5.4.6. Evaluación de producción de biomasa. Los resultados obtenidos permitieron determinar si las cepas resultaron ser las más adecuadas en términos tiempo-tasa de crecimiento durante el proceso de fermentación para establecer el tiempo de duración en la producción de biomasa. En la Tabla 10 se reportan como resumen los resultados correspondientes a fase de latencia, velocidad específica de crecimiento, fin fase logarítmica, tiempo duplicación celular, tiempo duplicación celular, número generaciones por hora, cosecha máxima, incremento celular, fin fase logarítmica, incremento celular total, % azúcares consumidos fin fase logarítmica, % azúcares consumidos totales, % proteína producida fin fase logarítmica, % proteína consumida total, R² fin fase logarítmica, pH fase logarítmica, acidez fase logarítmica, consumo azúcares fase logarítmica, producción proteínas fase logarítmica, de *L. casei* en medio de cultivo PRO y MRS.

Tabla 10. Datos cinéticos de crecimiento bacteriano para *L. casei* en medio MRS y medio PRO.

Medio de cultivo	MRS	PRO	Unidad/sigla
Fase de Latencia	<3	<3	Hora
Velocidad Especifica de Crecimiento	0,264	0,698	$\mu_{\max} \text{ h}^{-1}$
Fin Fase Logarítmica	14:59	17:59	Horas
Tiempo Duplicación Celular	2,625	0,993	Horas
Tiempo Duplicación Celular	157,500	59,579	Minutos
Numero Generaciones Por Hora	0,381	1,007	-
Cosecha Máxima	3,73	9,61	Ln UFC/mL
Incremento Celular Fin Fase Logarítmica	$5,57 \times 10^9$	$2,34 \times 10^{12}$	UFC/mL
Incremento Celular Total	$7,22 \times 10^9$	$6,92 \times 10^{10}$	UFC/mL
% Azúcares Consumidos Fin Fase Logarítmica	59,239	13,811	%
% Azúcares Consumidos Totales	81,242	29,789	%
% Proteína Producida Fin Fase Logarítmica	50,384	62,812	%
% Proteína Consumida Total	56,169	64,874	%
R ² Fin Fase Logarítmica	0,968	0,972	R ²
pH Fase Logarítmica	4,07	3,86	pH
Acidez Fase Logarítmica	1,317	1,752	%
Consumo Azúcares Fase Logarítmica	4,961	7,676	mg/L
Producción Proteínas Fase Logarítmica	2,431	4,864	mg/L

5.5. PRUEBAS DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 Y *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 FRENTE A ANTIBIOTICOS.

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos, se presenta la Tabla 11, que muestra los valores de referencia usados para determinar el tamaño de halo necesario para concluir si una cepa es resistente, intermedio o sensible frente a un antibiótico.

Según May-Turrucó et al.²⁵⁹ los antibióticos son agentes antimicrobianos altamente eficaces en el tratamiento y erradicación de las infecciones bacterianas, sin embargo, su efectividad se ha visto reducida debido a que las bacterias son microorganismos adaptables y capaces de desarrollar mecanismos de resistencia, que se presenta cuando un microorganismo es capaz de adaptarse y sobrevivir a las concentraciones de un antibiótico que originalmente inhibía su crecimiento.

²⁵⁹ MAY-TORRUCO, Ana Luisa; et al. Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas Probióticas Empleadas En Productos Comerciales. En *European Scientific Journal ESJ*, 16.18 (2020), 43–60 (p. 49) <<https://doi.org/10.19044/esj.2020.v16n18p43>>.

Tabla 11. Interpretación de halos de inhibición según su diámetro

Antibiótico	Halo de inhibición mm		
	Resistente: R	Intermedio I	Sensible: S
Gentamicina (GEN) 10 µg	<4	5-15	≥16
<i>Staphylococcus</i> sp	≤12	13-14	≥15
Florfenicol (FFC) 30 µg	≤8	9-15	≥16
Amoxicilina (AMC) 20 µg	≤13	14-17	≥18
<i>Staphylococcus</i> sp	≤4	5-7	≥8
Tetraciclina (TE) 30 µg	≤14	15-18	≥19
<i>Staphylococcus</i> sp	≤14	15-18	≥19
Cefquinona (CEQ) 30 µg	≤14	15-17	≥18
Doxiciclina (D) 30 µg	≤4	5-15	≥16
<i>Staphylococcus</i> sp	≤12	13-15	≥16
Ceftazidima (CAZ) 30 µg	≤8	9-15	≥16
Ciprofloxacina (CIP) 5 µg	≤13	14-18	≥19
<i>Staphylococcus</i> sp	≤15	16-20	≥21
Cefotaxima (CTX) 30 µg	≤14	15-22	≥23
Ampicilina (AM) 10 µg	≤8	9-15	≥16
Penicilina (PEN) 10 µg	≤19	20-27	≥28
<i>Staphylococcus</i> sp	≤28	--	≥29
Resistente (R), Intermedio (I), Sensible (S).			

Fuentes: CHARTERIS WP et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J Food Prot. 1998 Dec;61(12):1636-43. doi: 10.4315/0362-028x-61.12.1636. PMID: 9874341.

BERNAL, Maye y GUZMAN, Miguel. El antibiograma de discos normalización de la técnica Kirby Bauer. En: Rev. Biomedica.1984. vol. 4, no. 3, p. 112-121.

CAVALIERI, S. Manual de susceptibilidad antimicrobiana. University of Washington Seattle, Washington.2005.

Laboratorios de Referencia IDEXX, *Guía Microbiológica Para Interpretar La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*, June 2022 <<https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>>

Álvarez-Cisneros²⁶⁰ menciona dos tipos de resistencia: resistencia extrínseca o adquirida, es aquella en la que las bacterias pueden incorporar a su estructura celular material genético (plásmidos y/o transposones) capaz de conferir resistencia a determinados antibióticos, la propagación de genes puede ocurrir entre bacterias de diferentes géneros. Los mismos autores mencionan que la resistencia intrínseca es la capacidad natural de una bacteria para sobrevivir al efecto de los antibióticos, como resultado de mutaciones derivadas de cambios en el estado fisiológico bacteriano o por la exposición descontrolada a los antibióticos, tiene un potencial de propagación mínimo entre géneros bacterianos, ya que los genes de resistencia se localizan en el cromosoma con una transferencia limitada, lo que representa un riesgo bajo.

El antibiótico ciprofloxacina, es un miembro de la familia de las fluoroquinolonas, inhibe selectivamente la actividad de la ADN girasa bacteriana, bloqueando la replicación del ADN y matando a la célula, es un antibiótico de amplio espectro, inhibe bacterias grampositivas y/o gramnegativas, se encuentran entre los más recetados para tratar infecciones del tracto urinario, infecciones respiratorias, infecciones abdominales e infecciones de la piel. Sin embargo, a pesar de su toxicidad selectiva contra el ADN girasa bacteriana, los efectos secundarios asociados con diferentes fluoroquinolonas incluyen fototoxicidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, disfunción del metabolismo de la glucosa y mayor riesgo de ruptura del tendón²⁶¹.

Los aminoglucósidos son fármacos antibacterianos grandes y altamente polares que se unen a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, lo que afecta la capacidad de corrección del complejo ribosómico. Este deterioro provoca desajustes entre codones y anticodones, lo que da como resultado la producción de proteínas con aminoácidos incorrectos y proteínas acortadas que se insertan en la membrana citoplasmática y finalmente mata las células bacterianas. En este grupo se incluye la gentamicina, son potentes antibacterianos de amplio espectro. Sin embargo, se ha demostrado que los aminoglucósidos son nefrotóxicos (perjudiciales para los riñones), neurotóxicos (perjudiciales para el sistema nervioso) y ototóxicos (perjudiciales para los oídos)²⁶².

²⁶⁰ ÁLVAREZ-CISNEROS Yenizey M. and PONCE-ALQUICIRA, Edith. Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria', *Antimicrobial Resistance - A Global Threat*, 2018, 53–73 <<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.80624>>.

²⁶¹ PARKER Nina; et al. *Microbiology*, 1st edn (Houston, Texas: Openstax, 2019).

²⁶² Ibid., p. 571.

Finalmente, Gaviria-Mendoza et al²⁶³ y Dell'elce²⁶⁴ mencionan las cefalosporinas ceftazidima y cefotaxima de tercera generación y cefquinona de cuarta generación, de las cuales las cefalosporinas de tercera generación tienen un amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas, incluyendo algunos productores de β -lactamasa, y las cefalosporinas de cuarta generación presentan un amplio espectro contra bacterias grampositivas y gramnegativas, incluido SARM.

Otra clase de compuestos antibióticos que se unen a la subunidad 30S son las tetraciclinas, fármacos que inhiben la síntesis de proteínas al bloquear la asociación de los tRNA con el ribosoma durante la traducción, a este grupo se incluye la doxiciclina. Aunque las tetraciclinas son de amplio espectro, los efectos secundarios que pueden limitar su uso incluyen fototoxicidad, decoloración permanente de los dientes en desarrollo y toxicidad hepática con dosis altas o en pacientes con insuficiencia renal, como lo señalan Parker et al²⁶⁵.

Merck²⁶⁶ y Pokrant²⁶⁷ describen los fenicoles correspondientes a los derivados del cloranfenicol como una familia de antibióticos de amplio espectro que se unen al ribosoma 50S, inhiben la formación de enlaces peptídicos y finalmente penetran en los tejidos de manera eficiente, e infieren que el cloranfenicol pertenece a este grupo y puede causar, tanto en el ser humano como en los animales, depresión reversible de la médula ósea y anemia aplásica irreversible. Además, los autores mencionan que dicho efecto es la principal causa por la cual la Food and Drug Administration (FDA) prohibió su uso en las especies animales destinados a consumo humano. De este modo se desarrolló el florfenicol, herramienta eficaz en el tratamiento de patologías, especialmente en enfermedades respiratorias. Los efectos secundarios tras exposiciones prolongadas o repetidas pueden perjudicar la fertilidad, dañar al feto, provocar daños en los órganos (Hígado, cerebro, testículos, médula espinal, sangre y vesícula biliar).

²⁶³ GAVIRIA-MENDOZA, Andrés; et al. Uso Ambulatorio de Cefalosporinas En Una Población Colombiana: Estudio de Prescripción-Indicación. En: *Revista Chilena de Infectología*, 38.6 (2021), 737–44 <<https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000600737>>.

²⁶⁴ DELL'ELCE, A; et al. Actividad Bactericida in Vitro de Miel Sobre Escherichia Coli y Staphylococcus Aureus. Comparación Con La Actividad de Cefalosporinas. En: *Revista FAVE- Sección Ciencias Veterinarias*, 17 (2018), 12–17 <<https://doi.org/10.14409/favecv.v17i1.7160>>.

²⁶⁵ PARKER et al., p. 571-572.

²⁶⁶ MERK, *HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD Florfenicol Solid Formulation*, 3.7, 2022 <https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/ah-sds/Florfenicol_Solid_Formulation_AH_US_1X.pdf> [accessed 12 August 2022].

²⁶⁷ POKRANT HUERTA, Ekaterina Valerievna. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL Y SU METABOLITO ACTIVO FLORFENICOL AMINA EN TEJIDOS COMESTIBLES Y PLUMAS DE POLLO BROILER MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS)' (Universidad de Chile, 2017) <<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/144994/Evaluacion-de-las-concentraciones-de-florfenicol-y-su-metabolito-activo-florfenicol-amina-en-tejidos-comestibles-y-plumas-de-pollo-broiler-mediante-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-masas-%28LC-MSMS%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [accessed 12 August 2022].

En palabras de Parker et al²⁶⁸, la clase de antibióticos llamada β -lactámicos, incluye las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, y se caracteriza por la presencia de un anillo β -lactámico que se encuentra dentro de la estructura central de la molécula del fármaco, de igual manera mencionan que los β -lactámicos bloquean el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas durante la biosíntesis de nuevos peptidoglicanos en la pared celular bacteriana, aunque el anillo β -lactámico debe permanecer sin cambios para que estos fármacos conserven su actividad antibacteriana, los cambios químicos estratégicos en los grupos R han permitido el desarrollo de una amplia variedad de fármacos β -lactámicos, de esta forma, al agregar un grupo amino (-NH₂) a la penicilina G se creó las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina) que tienen un mayor espectro de actividad contra patógenos gramnegativos y un menor poder de inhibición con grampositivos.

Para evaluar la resistencia frente a antibióticos, los Laboratorios de Referencia IDEXX²⁶⁹, explican que la CMI, es la concentración más baja (en $\mu\text{g/mL}$) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana, para esto se utilizan tres términos: sensible, el crecimiento del microorganismo está inhibido a la concentración del fármaco que se alcanza utilizando la dosis habitual. Intermedia: el crecimiento del microorganismo está inhibido solamente a la dosis máxima recomendada. Resistente: el microorganismo es resistente a los niveles del fármaco que se alcanzan normalmente, rangos establecidos de acuerdo a las normas de interpretación establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

5.5.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *Lactobacillus casei* ATCC 334 frente a antibióticos. Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) indicaron que *L. casei* presentó resistencia frente a Ampicilina (AM 20 μg), Florfenicol (FFC 30 μg) y Penicilina (P 10 μg), sensibilidad frente a Ciprofloxacina (CIP 5 μg), Gentamicina (CN 10 μg) y Tetraciclina (TE 30 μg), como se puede observar en la Tabla 12 y la formación de los halos de inhibición en la Figura 12.

Fraqueza²⁷⁰, ha evidenciado un gran interés en las bacterias del género *Lactobacillus* debido a su susceptibilidad frente a antimicrobianos y su amplia distribución en los ambientes, ya que se han manifestado resistencias enlazadas a una exposición ambiental que estimula la expresión de resistencias intrínsecas y extrínsecas que, en algunos casos pueden ser transferibles.

²⁶⁸ PARKER et al., p. 568-569.

²⁶⁹ Laboratorios de Referencia IDEXX, *Guía Microbiológica Para Interpretar La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*, June 2022 <<https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>> [accessed 10 August 2022].

²⁷⁰ FRAQUEZA, Maria João. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dry-Fermented Sausages. En: *International Journal of Food Microbiology*, 212 (2015), 76–88 <<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.04.035>>.

Tabla 12. Antibiograma de *Lactobacillus casei* ATCC 334 frente a antibióticos

Antibióticos	Diámetro (x) halo de inhibición mm	Nivel de sensibilidad
Ampicilina AM 10 µg	6,0	R
Ciprofloxacina CIP 5 µg	29,0	S
Gentamicina CN 10 µg	19,5	S
Cefotaxima CTX	20	I
Florfenicol FFC 30 µg	6,5	R
Penicilina PEN 10 µg	10,5	R
Tetraciclina TE 30 µg	37,50	S
S: sensible I: intermedio R: resistente		

Estudios recientes, realizados por May-Torruco et al²⁷¹; Cueto-Vigil, Acuña-Monsalve y Valenzuela-Riaño ²⁷², afirman que los microorganismos, incluyendo algunas cepas de las BAL, pueden actuar como reservorios de genes de resistencia antimicrobiana y transferirlos a bacterias patógenas, de esta forma, las BAL pueden llegar a transmitir la resistencia al ecosistema o nicho destino mediante elementos móviles (transposones o plásmidos), motivos por el cual se debe evaluar el comportamiento frente a antibióticos, determinar si la resistencia es adquirida y si se expresa por elementos móviles o en caso contrario por factores cromosómicos, que no representa riesgo.

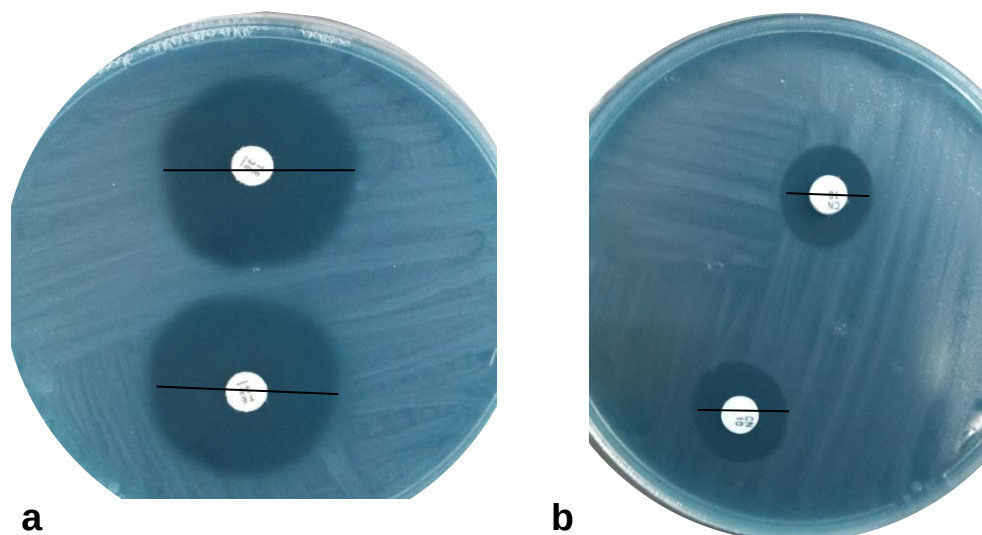
En palabras de Mathur y Singh²⁷³ las bacterias ácido lácticas son microorganismos de alta adaptabilidad y gran variedad de especies de los géneros *Enterococci* y *Lactobacillus* son reconocidas por presentar resistencia intrínseca a antibióticos. Los mismos autores reportaron a *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leishmannii* y *L. acidophilus*, aisladas de alimentos fermentados, como resistentes a eritromicina, vancomicina y tetraciclina, en la presente investigación *L. casei* presentó sensibilidad frente a tetraciclina.

²⁷¹ MAY-TORRUCO, Op. cit., p. 46.

²⁷² CUETO-VIGIL, María C; ACUÑA-MONSALVE, Yuditanduly and VALENZUELA-RIAÑO, Jacqueline. EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE SUERO COSTEÑO', *Actualidades Biológicas*, 32.93 (2010), 129–38 <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842010000200001> [accessed 10 August 2022].

²⁷³ MATHUR, Shalini y SINGH, Rameshwar. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria - a Review. En: *International Journal of Food Microbiology*, 105.3 (2005), 281–95 <<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.03.008>>.

Figura 12. Antibiograma de *Lactobacillus casei* ATCC 334 en agar MRS con azul de anilina.



a. Tetraciclina 37,5 mm (sensible); b. Gentamicina 19,5 mm (sensible).

Sánchez et al²⁷⁴ analizaron seis cepas de *Lactobacillus* con capacidad probiótica aisladas de duodeno, yeyuno y colon de terneros neonatos; cinco presentaron resistencia a sulfonamida y vancomicina. De igual manera, Cueto y Aragón²⁷⁵ al evaluar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro* determinaron que, de 26 cepas analizadas, 20 resultaron resistentes a antimicrobianos. Erginkaya et al²⁷⁶, en aislamientos obtenidos de productos lácteos fermentados encontraron una alta incidencia de *Lactobacillus* resistentes a la vancomicina, eritromicina, gentamicina y ciprofloxacina. Para el caso de los 2 últimos antibióticos, gentamicina y ciprofloxacina, la cepa evaluada en este estudio presentó sensibilidad.

²⁷⁴ SÁNCHEZ, Lilian; et al. Cepas de *Lactobacillus* Spp. Con Capacidades Probióticas Aisladas Del Tracto Intestinal de Terneros Neonatos. En *Rev. Salud Animal*, 37.2 (2015), 94–104 <<http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa04215.pdf>> [accessed 11 August 2022].

²⁷⁵ CUETO, Clementina y ARAGÓN, Stephania. Evaluación Del Potencial Probiótico de Bacterias Ácido Lácticas Para Reducir El Colesterol *in Vitro* Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria to Reduce *in Vitro* Cholesterol. En *Revista Scientia Agropecuaria*, 3.1 (2012), 50 <www.sci-agropecu.unitru.edu.pe> [accessed 11 August 2022].

²⁷⁶ ERGINKAYA, Z; TURHAN, E. U. y TATLI, D. Determination of Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Turkish Fermented Dairy Products. En *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19.1 (2018), 56 <<https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4769>>.

Los resultados de Guo et al²⁷⁷ revelaron bacterias resistentes, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. helveticus*, a ciprofloxacina, tetraciclina y eritromicina, portaban los genes cromosómicos que confieren resistencia *gyrA*, *tetM* y *ermB* respectivamente. Sin embargo, estudios posteriores llevados a cabo por Flórez y Mayo²⁷⁸; Álvarez-Cisneros y Ponce-Alquicira²⁷⁹ sugieren que dichos genes de resistencia no son transferibles, ya que se encuentran a nivel de cromosoma.

En la investigación realizadas por Flórez y Mayo²⁸⁰; se menciona que la ausencia de resistencia adquirida a antibióticos es uno de los criterios que se deben vigilar en los candidatos a probióticos, si la bacteria tiene resistencia intrínseca, se considera aceptable para su uso en alimentos, en caso contrario coincide con Neethu, Craig y Malik²⁸¹, y establecen que se debe demostrar si la resistencia adquirida está en material genético móvil o fue adquirida en el proceso de mutación en el cromosoma bacteriano (también aceptable para uso en alimentos). Finalmente, Sánchez²⁸² indica que las bacterias no son aceptadas por ningún organismo regulador para su aplicación en alimentos si se demuestra que la resistencia es exógena y fácilmente transmisible.

Se debe profundizar en el mecanismo de resistencia de *L. casei* frente a antibióticos, si la resistencia a antibióticos alberga genes transmisibles que pueden poner en riesgo la industria alimentaria, cosmética y la salud humana y animal.

5.5.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 frente a antibióticos. Los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) indicaron que *S. aureus* es resistente frente a Cefquinona (CEQ 30 µg) y Penicilina (PEN 10 µg) y sensible a Amoxicilina (AMC 30 µg), Gentamicina (CN 10 µg), Doxiciclina (D 30 µg), Florfenicol (FFC 30 µg), y Tetraciclina (TE 30 µg) como se indica en la Tabla 13. Algunos halos de inhibición se pueden apreciar en la Figura 13.

²⁷⁷ GUO, Huiling; et al. Characterization of Antibiotic Resistance Genes from Lactobacillus Isolated from Traditional Dairy Products. *Journal of Food Science*, 82.3 (2017), 724–30
<<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>>.

²⁷⁸ FLÓREZ, Ana B. y MAYO, Baltasar. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus Thermophilus* Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances. En *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017), 1–12
<<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02608/BIBTEX>>.

²⁷⁹ ÁLVAREZ-CISNEROS y PONCE-ALQUICIRA, Op. cit., p. 68.

²⁸⁰ FLÓREZ, Ana B. y MAYO, Op. cit., p. 11-10.

²⁸¹ NEETHU, M; CRAIG, R. y MALIK, A. Implications of antibiotic resistance in probiotics. *Journal Food Reviews International*. 31.1 (2014):52-62. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961075>

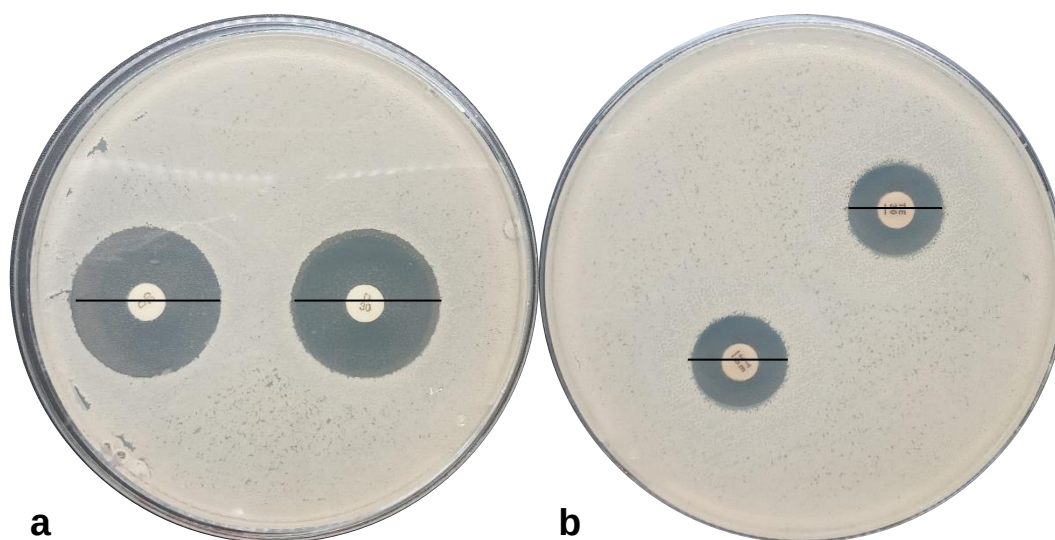
²⁸² Sánchez et al, Op. cit., p.101.

Tabla 13. Antibiógrama *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708

Antibióticos	Diámetro halo de inhibición mm	Nivel de sensibilidad
Amoxicilina AMC 30 µg	13,3	S
Cefquinona CEQ 30 µg	12,3	R
Gentamicina CN 10 µg	16,5	S
Doxiciclina D 30 µg	27,0	S
Florfenicol FFC 30 µg	26,8	S
Penicilina PEN 10 µg	25,0	R
Tetraciclina TE 30 µg	19,0	S

S: sensible I: intermedio R: resistente

Figura 13. *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 frente a antibióticos en agar Mueller Hinton.



a. Doxiciclina 28 mm (Sensible); **b.** Tetraciclina 19 mm (Sensible).

Acosta²⁸³ aisló cepas de *S. aureus* de queso costeño y encontró resistencia a los antibióticos tetraciclina, cloranfenicol, penicilina y eritromicina. Gao et al²⁸⁴ y Zhang

²⁸³ ACOSTA NIEVES, Ivonne Patricia. Staphylococcus Aureus Procedentes de Quesos Costeños de Valledupar; Susceptibilidad a Antibióticos y Perfil Plasmídico. *Rev. Méd. Risaralda*, 25.1 (2019), 10–14 <www.ebay.com>.

²⁸⁴ GAO, Linglin et al, 'Antibacterial Pathway of Cefquinome against Staphylococcus Aureus Based on Label-Free Quantitative Proteomics Analysis', *Journal of Microbiology*, 59.12 (2021), 1112–24 <https://doi.org/10.1007/S12275-021-1201-X>.

et al²⁸⁵ reportaron una alta sensibilidad de *S. aureus* aisladas frente a cefquinona, sin embargo, Zhang et al²⁸⁶ encontraron indicios de resistencia al fármaco. Por otro lado, Wei et al²⁸⁷ probaron el sinergismo florfenicol/thiamphenicol tanto *in vitro* como *in vivo* contra aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* de pollos, vacas y cerdos, dicha combinación inhibió el 80 % de los *S. aureus* susceptibles a la meticilina y el 82 % de los *S. aureus* resistentes a metacilin (SARM). Los antibióticos pierden acción inhibitoria gradualmente frente a cepas aisladas de *S aureus*, a la par, se generan nuevas estrategias para contrarrestar y controlar la multiplicación de la bacteria patógena.

Hriouech et al²⁸⁸ evaluaron el efecto antiestafilocócico de un aceite esencial 1,8-cineol y dos antibióticos amoxicilina y gentamicina, por separado y en combinación, sobre cepas de *S. aureus* resistentes a metacilin aisladas de conejos con osteomielitis, demostrando inhibición cuando se combina el aceite esencial con cada uno de los antibióticos utilizados en la experimentación, caso contrario cuando utilizaron amoxicilina y gentamicina agrupados. Los autores resaltan la sinéresis positiva entre el aceite esencial y los antibióticos contra SARM responsable de osteomielitis.

Gan et al²⁸⁹ mencionan que después del descubrimiento de la penicilina por Fleming y el posterior uso generalizado, surgió *S. aureus* resistente a la penicilina, productora de penicilinasa, que puede hidrolizar el anillo β -lactámico de la penicilina y genera dicha resistencia. Posteriormente, se sintetizó la metacilina, sin embargo, al poco tiempo se reportó una cepa *S. aureus* resistente a metacilina, característica producida por el gen *mecA* integrado al cromosoma, tal como lo señalan Rayner y

²⁸⁵ ZHANG, Hui lin et al. Susceptibility Breakpoint for Cefquinome against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus from Pigs', *Journal of Integrative Agriculture*, 20.7 (2021), 1921–32 <[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63572-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63572-9)>.

²⁸⁶ Ibid., p. 1926.

²⁸⁷ WEI, C. F. et al. Synergism between Two Amphenicol of Antibiotics, Florfenicol and Thiamphenicol, against Staphylococcus Aureus', *The Veterinary Record*, 178.13 (2016), 319 <<https://doi.org/10.1136/VR.103554>>.

²⁸⁸ HRIOUECH, Soukayna et al. The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, and 1,8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Osteomyelitis', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020 (2020), 1–9 <<https://doi.org/10.1155/2020/4271017>>.

²⁸⁹ REN-YOU Gan, et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus Aureus', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* | *Www.Frontiersin.Org*, 10 (2020), 107 <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>>.

Munckhof ²⁹⁰ y Schulte y Munson²⁹¹. Guo et al²⁹² afirman que *S. aureus* ha presentado resistencia a los antibióticos de manera gradual, de manera especial, a las metacilinas, por lo que se ha incrementado los cuadros de infección de este microorganismo en la población.

Investigadores hacen referencia a dos mecanismos para obtener resistencia microbiana. Vestergaard et al²⁹³ manifiestan que uno de los mecanismos de la resistencia a MRSA se debe principalmente a que los plásmidos, o la transmisión de genes resistentes a los medicamentos mediada por plásmidos, pueden expandir el genoma y los genes de resistencia pueden transferirse entre *S. aureus* y otras bacterias. En adición, Gan²⁹⁴ da a conocer que la gran mayoría de las bacterias en la naturaleza existen en forma de biopelículas, y la característica más destacada de la biopelícula bacteriana es su fuerte adhesión y resistencia a los medicamentos, lo que permite que las bacterias resistan las respuestas inmunitarias del huésped y evadan la acción de los antibióticos.

En la revisión realizada por Fetch²⁹⁵ se detectaron biopelículas formadas por *S. aureus* en diversas superficies bióticas y abióticas, incluidos tejidos humanos, dispositivos médicos, productos alimenticios e instalaciones de procesamiento de alimentos, además, la formación de biofilms permite la transmisión de elementos genéticos móviles entre bacterias de biopelículas cercanas, esta relación de intercambio estimula la adquisición de nuevos factores de virulencia o resistencia a los antimicrobianos y capacidades de supervivencia ambiental.

Staphylococcus aureus causa una amplia gama de infecciones, intoxicación alimentaria y síndrome de shock tóxico (TSS). Para la mayoría de las enfermedades causadas por *S. aureus*, la patogenia es multifactorial, es decir, está relacionada con una serie de factores de virulencia. Fetch²⁹⁶ declara que los factores de virulencia de *S. aureus* incluyen antígenos patógenos, proteínas de superficie, enzimas secretadas, toxinas que dañan la membrana, toxinas del síndrome de shock tóxico (TSST) y proteínas que invaden o evitan el sistema inmune. Además,

²⁹⁰ RAYNER C. and MUNCKHOF W. J., 'Antibiotics Currently Used in the Treatment of Infections Caused by *Staphylococcus Aureus*', *Internal Medicine Journal*, 35.SUPPL. 2 (2005), 3–16 <<https://doi.org/10.1111/J.1444-0903.2005.00976.X>>.

²⁹¹ REBECCA H. SCHULTE and MUNSON, Erick. *Staphylococcus Aureus* Resistance Patterns in Wisconsin: 2018 Surveillance of Wisconsin Organisms for Trends in Antimicrobial Resistance and Epidemiology (SWOTARE) Program Report', *Clinical Medicine & Research*, 17.3–4 (2019), 72–81 <<https://doi.org/10.3121/CMR.2019.1503>>.

²⁹² GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 107.

²⁹³ VESTERGAARD Martin, et al. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem', *Microbiology Spectrum*, 7.2 (2019) <<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0057-2018>>.

²⁹⁴ GAN et al, Op. cit., p. 3.

²⁹⁵ FETSH Op. cit., p. 88.

²⁹⁶ Ibid., p. 39.

las enterotoxinas estafilocócicas (SE) y las toxinas similares a SE (SEI) se consideran los principales factores de virulencia de *S. aureus*, en particular en el contexto de la seguridad alimentaria y animales de interés zootécnico.

En el mismo sentido Fetch²⁹⁷, manifiesta que las SE y SEI son proteínas termoestables y multifuncionales que desencadenan brotes de intoxicación alimentaria, pirogenicidad, superantigenicidad y la capacidad de inducir hipersensibilidad letal a la endotoxina, las SE son toxinas importantes que estimulan las náuseas, los vómitos y los cúmulos abdominales en humanos y animales, y considera las SEI como toxinas recientemente identificadas con propiedades fisicoquímicas muy similares a las de las SE, pero que no inducen ninguna actividad emética.

Brouillette y Malouin²⁹⁸ anuncian en el sector pecuario afectaciones por *S. aureus*, especialmente la industria láctea, dado que es uno de los agentes etiológicos con mayor importancia en la mastitis subclínica, enfermedad que afecta la calidad de la leche producida y la rentabilidad del sistema, este es un factor importante a tener en cuenta, dado que el tratamiento de las enfermedades transmitidas por este microorganismo requiere la aplicación de antibióticos y la resistencia es un problema no solo de la industria, sino también de salud pública.

Los estudios realizados por Ubakata et al²⁹⁹ en cepas bacterianas muestran una tendencia al incremento de cepas resistentes a los antibióticos como consecuencia de un mal manejo de los mismos, entre estos tenemos: tratamientos incompletos, utilización excesiva del mismo antibiótico sin su rotación con otros antibióticos y no respetar el tiempo de retiro en los alimentos de origen animal.

5.5.3. Concentración Mínima Bactericida (CMB) de *Lactobacillus casei* ATCC 334 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708.

5.5.3.1. Método disco de agar impregnado. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre las concentraciones 75 µL, 95 µL y 115 µL ($p < 0,05$), utilizadas en el método disco de agar impregnado (Figura 14).

Los resultados señalan una interacción creciente entre la concentración de *L. casei* y el halo de inhibición, es decir, el tamaño del halo de inhibición es mayor a medida que se incrementa la concentración de la bacteria ácido láctica. Los halos formados por las concentraciones 75 µL, 95 µL y 115 µL corresponden a 3,21 mm; 4,17 mm

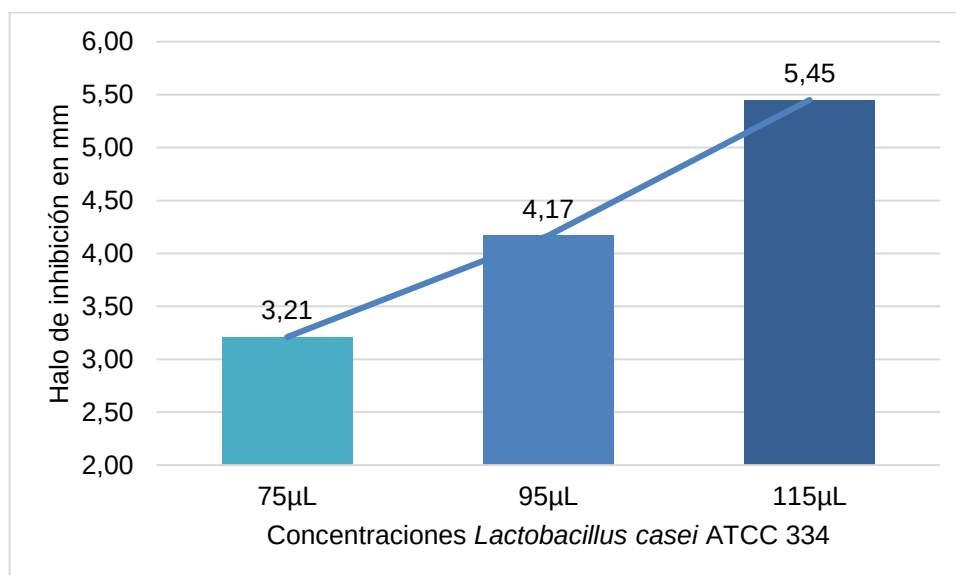
²⁹⁷ Ibid., p. 39.

²⁹⁸ BROUILLETTE, E., & MALOUIN, F. (2005). The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and infection*, 7(3), 560-568.

²⁹⁹ UBUKATA, K; TAKATA, M; MOROZUMI, M; CHIBA, N; WAJIMA, T y HANADA, S. Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group. (2018). Effects of pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010–2017. *Emerging infectious diseases*, 24(11), 2010.

y 5,45 mm respectivamente (Figura 14), valores superiores a 2 mm indicado por Estrada et al³⁰⁰ como indicio de inhibición efectiva contra otras bacterias.

Figura 14. Halo de inhibición y concentración: método disco de agar impregnado con *Lactobacillus casei* ATCC 334 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708.



Sánchez y Peña³⁰¹ definen un halo de inhibición como zonas transparentes que se forman alrededor de colonias y se mide en mm, indicando un crecimiento bacteriano muy bajo y/o el control biológico de un microorganismo. En este estudio, la relación antagonista de *L. casei* sobre *S.aureus*, permite inferir que las concentraciones evaluadas de *Lactobacillus casei* ATCC 334 tienen un efecto inhibitorio sobre la bacteria patógena *S. aureus* ATCC BAA 1708. Ver Figura 15.

³⁰⁰ ESTRADA, et al., Op. cit., p. 2603.

³⁰¹ SÁNCHEZ MIRANDA Lilian and PEÑA RODRÍGUEZ, Joan. Actividad Antimicrobiana de Cepas de *Lactobacillus* Spp. Contra Patógenos Causantes de Mastitis Bovina Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Spp. Strains against Pathogens Causing Bovine Mastitis', *Rev. Salud Anim*, 38.2 (2016), 85–92.

Figura 15. Disco de agar impregnado de *Lactobacillus casei* ATCC 334 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708 en agar Müeller Hinton.



115 µL- 5,45 mm (Sensible)

5.5.3.2. Método por sobrenadante de *Lactobacillus casei* ATCC 334.

- **Método Pads impregnados.** El análisis estadístico indicó que hay diferencias entre las condiciones (temperatura y filtrado) ($p < 0,05$) y diferencias entre las concentraciones (40 µl, 75 µl, 100 µl) ($p < 0,05$), pero no hubo interacción entre ambos niveles (condiciones y concentraciones) (Tabla 14) ($p > 0,05$).

Tabla 14. Halos de inhibición por el Método pads impregnados de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708.

Método	Condición	Concentración µL y media del halo mm			EE media	
		40 µL	75 µL	100 µL		
Pads impregnados	Filtrado (F)	pH 6	2,98 ^{Ac}	3,61 ^{Aab}	4,87 ^{Aa}	0,12
		pH 6 – 80°C	3,6 ^{Ab}	3,81 ^{Ab}	4,71 ^{Aa}	
	Sin Filtrar (SF)	pH 6	2,67 ^{Ab}	2,77 ^{Bb}	4,20 ^{Aa}	
		pH 6 – 80°C	3,15 ^{Ab}	3,22 ^{Bb}	4,35 ^{Aa}	
EE media			0,06			

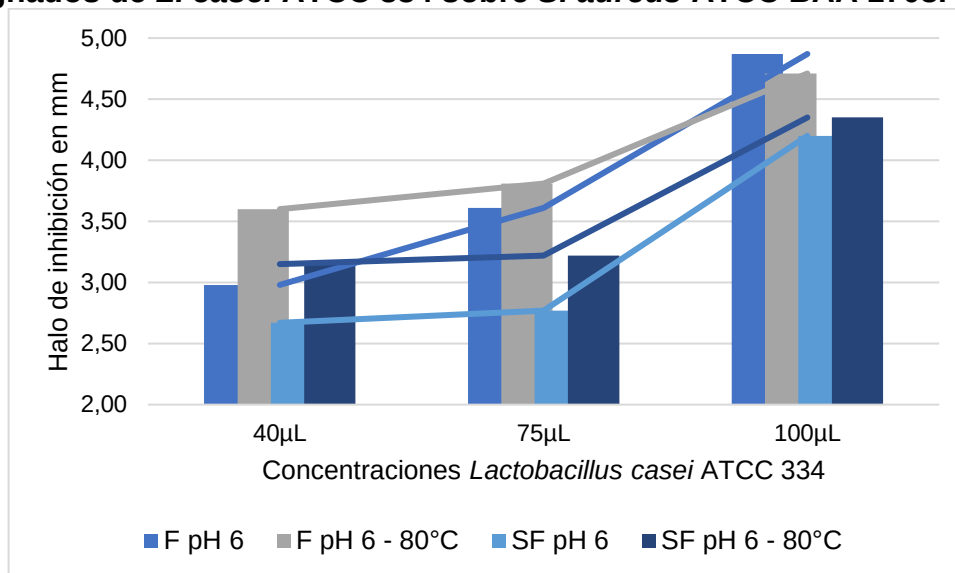
*Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre columnas ($p < 0,05$), letras minúsculas muestran diferencias entre filas.

Los resultados indican una interacción creciente entre la concentración de *L. casei* y el halo de inhibición, igual al método “Disco de agar impregnado”, es decir, el

tamaño del halo de inhibición es mayor a medida que se incrementa la concentración de la bacteria ácido láctica (Figura 16). Los halos de inhibición formados por las concentraciones 40 μ l, 75 μ l y 100 μ l son superiores a 2 mm indicado por Estrada et al.³⁰² como indicio de inhibición efectiva contra otras bacterias.

En la figura 16 se puede observar que, para las tres concentraciones evaluadas el sobrenadante SF pH 6 presentó el 100 % de los halos de menor dimensión siendo el halo de inhibición de menor medida 2,65 mm a 40 μ L. En contraste, para las concentraciones 40 μ l y 75 μ l el sobrenadante F pH 6 – 80°C estableció los halos de mayor tamaño y para 100 μ L el sobrenadante SF pH 6 formó el halo de mayor magnitud con 4,87 mm.

Figura 16. Halo de inhibición en mm y concentraciones por el método pads impregnados de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708.



El método pads impregnados denotó que el sobrenadante de *L. casei* ATCC 334 tiene potencial inhibitorio sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708, acción inhibitoria que presentó diferencias entre concentraciones y entre condiciones, a las cuales se sometió el sobrenadante, posiblemente acción de los productos sintetizados por la bacteria ácido láctica

- **Método de difusión en cilindro plástico.** El análisis estadístico indicó que no hay diferencias entre las condiciones (temperatura y filtrado) ($p > 0,05$) y concentraciones (90 μ L, 125 μ L y 150 μ L) ($p > 0,05$), tampoco se presentaron diferencias entre ambos niveles (condiciones y concentraciones) (Tabla 15) ($p > 0,05$).

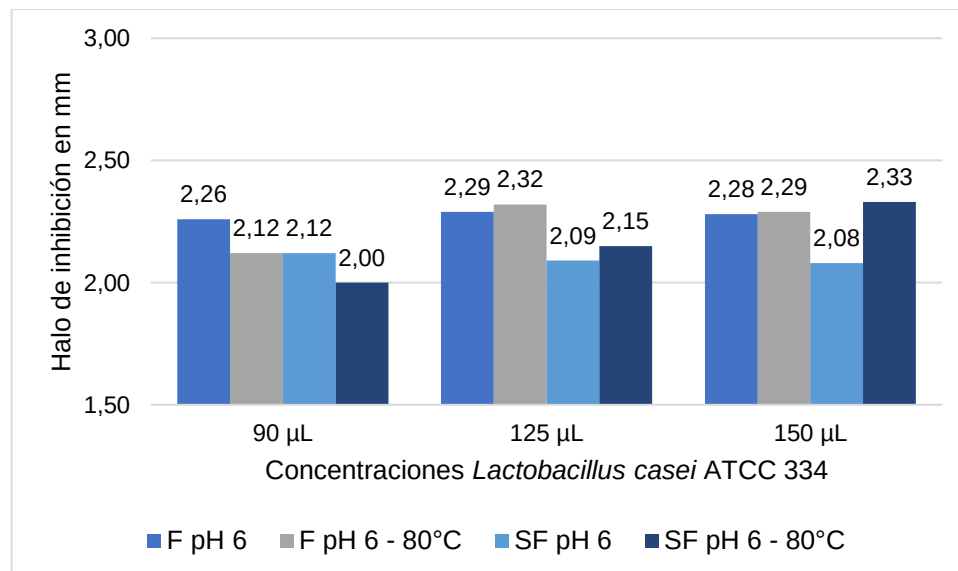
³⁰² ESTRADA, et al., Op. cit., p. 2603.

Tabla 15. Halos de inhibición por el método de difusión en cilindro plástico de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708

Método	Condición	Concentración μL y media del halo mm			EE media	
		90 μl	125 μl	150 μl		
Difusión en cilindro plástico	Filtrado	pH 6	2,26 ^{Aa}	2,29 ^{Aa}	2,28 ^{Aa}	0,09
		pH 6 – 80°C	2,12 ^{Aa}	2,32 ^{Aa}	2,29Aa	
	Sin filtrar	pH 6	2,12 ^{Aa}	2,09 ^{Aa}	2,08 ^{Aa}	
		pH 6 – 80°C	2,00 ^{Aa}	2,15 ^{Aa}	2,33 ^{Aa}	
	EE media			0,05		
	Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre columnas (p<0,05), letras minúsculas muestran diferencias entre filas.					

En la figura 17 se puede observar que, el sobrenadante SF pH 6 – 80°C presentó el menor halo de inhibición con una dimensión de 2,00 mm a 90 μL . Sin embargo, el sobrenadante anteriormente mencionado, estableció el mayor halo de inhibición con 2,33 mm a 150 μL . Los halos de inhibición formados por las concentraciones 90 μL , 125 μL y 150 μL (Tabla 15), son valores superiores o iguales a 2 mm indicado por Estrada et al³⁰³ como indicio de inhibición efectiva contra otras bacterias.

Figura 17. Halo de inhibición en mm y concentraciones por el método de difusión en cilindro plástico de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708.



³⁰³ Ibid., p. 2603.

De esta forma, el método de difusión en cilindro plástico indica que el sobrenadante de *L. casei* ATCC 334 tiene potencial inhibitorio sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708 sin diferencias entre concentraciones o condiciones, a las cuales se sometió el sobrenadante. Acción expresada posiblemente por bacteriocinas producidas por la bacteria ácido láctica.

Método de difusión en cilindro plástico doble capa. El análisis estadístico indicó que no hay diferencias entre las condiciones (temperatura y filtrado) ($p>0,05$) y concentraciones (90 μ L, 125 μ L y 150 μ L) ($p>0,05$), tampoco se presentaron diferencias entre ambos niveles (condiciones y concentraciones) (Tabla 16) ($p>0,05$).

Tabla 16. Halos de inhibición por el método de difusión en cilindro plástico doble capa de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708

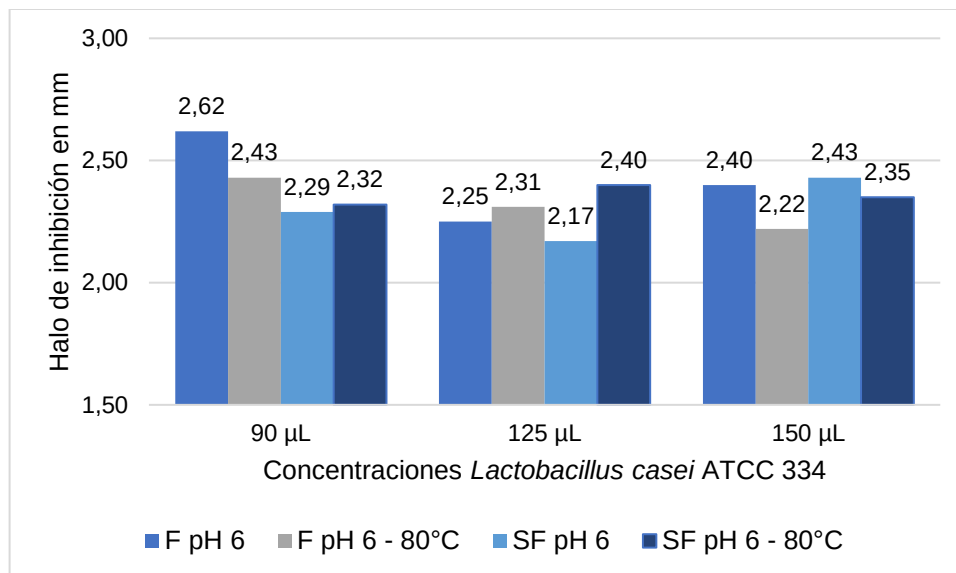
Método	Condición	Concentración μ L y media del halo mm			EE media	
		90 μ L	125 μ L	150 μ L		
Difusión en cilindro plástico doble capa	Filtrado	pH 6	2,62 ^{Aa}	2,25 ^{Aa}	2,40 ^{Aa}	0,067
		pH 6 - 80°C	2,43 ^{Aa}	2,31 ^{Aa}	2,22 ^{Aa}	
	Sin filtrar	pH 6	2,29 ^{Aa}	2,17 ^{Aa}	2,43 ^{Aa}	
		pH 6 - 80°C	2,32 ^{Aa}	2,40 ^{Aa}	2,35 ^{Aa}	
	EE media			0,051		
	Letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre columnas (p<0,05), letras minúsculas muestran diferencias entre filas.					

En la figura 18 se puede observar que, el sobrenadante SF pH 6 presentó el menor halo de inhibición con una dimensión de 2,17 mm a 125 μ L. En contraste, el sobrenadante F pH 6, estableció el mayor halo de inhibición con 2,62 mm a 90 μ L. Los halos de inhibición formados por las concentraciones 90 μ L, 125 μ L y 150 μ L (Tabla 16), son superiores a 2 mm indicado por Estrada et al³⁰⁴ como indicio de inhibición efectiva contra otras bacterias.

El método de difusión en cilindro plástico doble muestra que el sobrenadante de *L. casei* ATCC 334 tiene potencial inhibitorio sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708 sin diferencias entre concentraciones o condiciones (Tabla 16), a las cuales se sometió el sobrenadante de la bacteria ácido láctica. Acción expresada posiblemente por bacteriocinas producidas por la cepa probiótica.

³⁰⁴ ESTRADA, et al., Op. cit., p. 2603.

Figura 18. Halo de inhibición en mm y concentraciones por el método de difusión en cilindro plástico doble capa de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708

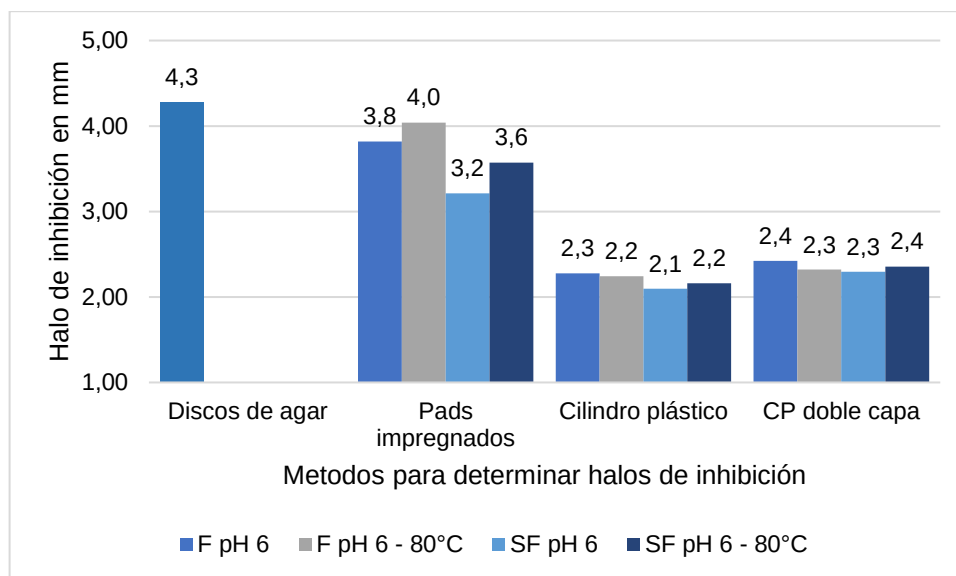


En la figura 19 se relacionan los halos de inhibición y los métodos usados para determinar los halos bajo las diferentes condiciones a las cuales se sometió el sobrenadante, a excepción del método Discos de agar, el cual no se trabajó con sobrenadante.

Los halos de mayor inhibición se obtuvieron por el método Discos de agar, con 4,3 mm, seguido del método Pads impregnados con 3,8 mm; 4,0 mm; 3,2 mm y 3,6 mm, bajo las condiciones F pH 6; F pH 6 – 80°C; SF pH 6 y SF pH 6 – 80°C respectivamente. Los métodos Cilindro plástico y CP doble capa, presentaron valores entre 2,1 mm y 2,4 mm para las diferentes condiciones.

Los resultados descritos permiten inferir que, el sobrenadante de la cepa probiótica con los métodos y condiciones evaluadas presenta actividad antimicrobiana, sin embargo, bajo la condición F pH 6 – 80°C, el sobrenadante de *L. casei* ATCC 334 presentó una mayor respuesta inhibitoria frente a *S. aureus* ATCC BAA 1708.

Figura 19. Halo de inhibición en mm y métodos para determinar inhibición bajo diferentes condiciones de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708

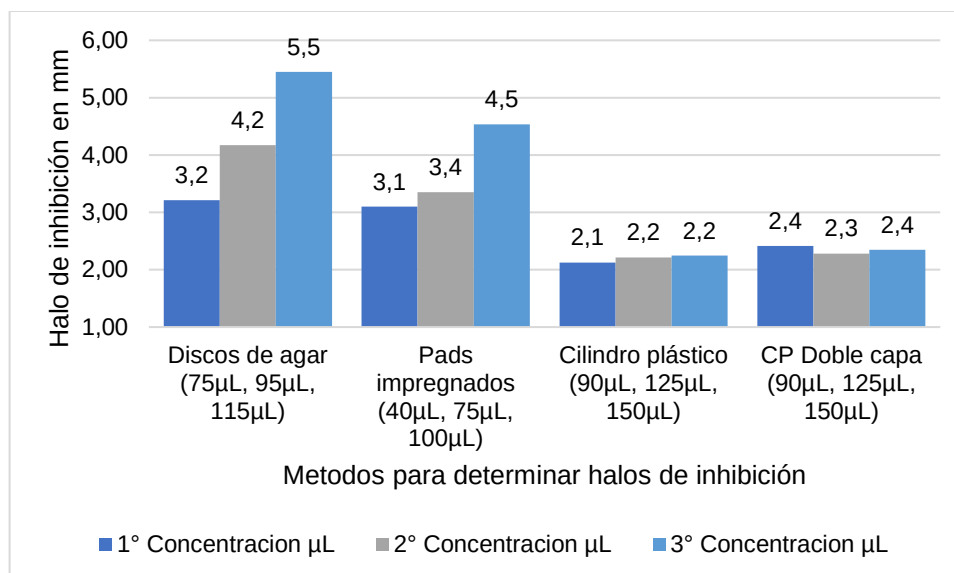


En la Figura 20 se relacionan halos de inhibición y los métodos usados para determinar los halos bajo las diferentes concentraciones del sobrenadante, a excepción del método Discos de agar, en el cual no se trabajó con sobrenadante.

Los halos de mayor inhibición se obtuvieron por el método Discos de agar con 5,5 mm; 4,2 mm y 3,2 mm para las concentraciones 115 μ L; 95 μ L y 75 μ L, seguido por el método Pads impregnados con 4,5 mm; 3,4 mm y 3,1 mm para las concentraciones 100 μ L; 75 μ L y 40 μ L respectivamente. Para los métodos Cilindro plástico y CP doble capa, se utilizaron concentraciones iguales de sobrenadante, presentaron valores entre 2,4 mm y 2,1 mm.

Los resultados puntualizados permiten deducir que, el sobrenadante de la cepa probiótica con los métodos y concentraciones evaluadas muestra actividad antimicrobiana, a pesar de ello, bajo las concentraciones más elevadas, el sobrenadante de *L. casei* ATCC 334 presentó una mayor respuesta inhibitoria frente a *S. aureus* ATCC BAA 1708

Figura 20. Halo de inhibición en mm y métodos para determinar inhibición bajo diferentes concentraciones de *L. casei* ATCC 334 sobre *S. aureus* ATCC BAA 1708



Los valores producto de los métodos, condiciones y concentraciones de *L. casei* y el sobrenadante, expresan el potencial inhibitorio de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 334 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1708. Según Roldán et al.³⁰⁵ la actividad antibacteriana del género *Lactobacillus* ha sido atribuida a un heterogéneo grupo de sustancias resultado del proceso de fermentación, entre ellas se encuentran péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular y metabolitos secundarios ácidos orgánicos (lactato y acetato), ácidos grasos, peróxido de hidrógeno y EPS, estos autores concluyen que los resultados obtenidos en sus estudios demostraron que la cepa de *L. casei* podría ser utilizada como herramienta biotecnológica útil para impedir el desarrollo de *S. aureus* en caso de contaminación de un producto alimentario.

Sánchez y Peña³⁰⁶ expresan que algunas especies aisladas del género *Lactobacillus* procedentes de terneros neonatos, manifiestan potencial inhibitorio ante las cepas *S. aureus* ATCC 6538 y *S. aureus* ATCC 25923 (cepas referencia) y *Streptococcus agalactiae* 345, *S. chromogenes* 18.1, *S. chromogenes* 16.1 y *S. hyicus* aisladas de muestras positivas para mastitis subclínica en bovinos de leche, los autores reportaron halos de inhibición de hasta 65,5 mm, pero no dan a conocer las concentraciones de las BAL utilizadas.

³⁰⁵ ROLDÁN, María Liliana et al. Efecto Inhibidor de *Lactobacillus Casei* 206/1 Contra *Escherichia Coli* O157:H7', *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31.1 (2011), 37–41
<http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es> [accessed 1 December 2021].

³⁰⁶ SÁNCHEZ y PEÑA, Op. cit., p. 86 y 88.

Por otra parte, Sánchez y Peña³⁰⁷, sometieron el sobrenadante de cepas lácticas aisladas a diferentes condiciones: 115°C, pH neutro y 2mg/mL de tripsina, y obtuvieron halos de inhibición de 29,3 mm. Los resultados obtenidos por estos autores son mayores a los expuestos en el presente estudio, sin embargo, se mantiene la relación en la disminución del halo de inhibición cuando el sobrenadante se somete a condiciones de temperatura y pH.

Karska-Wysocki et al³⁰⁸ aislaron 10 cepas de *S. aureus* resistente a metacilina (SARM) de casos clínicos humanos, y evaluaron la capacidad inhibitoria de *L. casei* y *L. acidophilus* reportando halos de inhibición de 1,7 a 2,9 cm para *L. acidophilus* y de 1,4 a 2,9 cm para *L. casei*. Valores cercanos a los obtenidos en la presente investigación. No obstante, la concentración utilizada por los autores fue de 3 µL.

Fang³⁰⁹ en su estudio determinó que el sobrenadante de la cepa *L. casei* 6714 aislada de ensilado de piña presentó actividad inhibitoria contra *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*, con halos de inhibición de 6 mm a concentraciones de 20 µL para *Salmonella* sp y 50 µL para *L. monocytogenes*. El sobrenadante utilizado por la autora fue centrifugado, filtrado y sometido a neutralización de pH, en complemento, se debe mencionar que los dos patógenos analizados representan bacterias Gram negativa (*Salmonella*) y Gram positiva (*L. monocytogenes*), importante por la variabilidad en la estructura de la célula. El mismo autor, menciona que las bacterias Gram negativas presentan una membrana celular de tres capas compuestas de fosfolípidos y lipopolisacáridos, tienen una permeabilidad regulada, mientras que las bacterias Gram positivas presentan una capa gruesa de peptidoglicano; la presencia de la capa de peptidoglicano confiere a la bacteria una barrera de exposición ante los agentes antimicrobianos, y por lo general, van a hacer de estos organismos un poco más resistentes.

En la publicación realizada por Koohestani et al³¹⁰ evaluaron el potencial antibacteriano de *Lactobacillus acidophilus* LA5 y *Lactobacillus casei* 431 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, para ello utilizaron alícuotas de 10 µl,

³⁰⁷ Ibid., p.89.

³⁰⁸ KARSKA-WYSOCKI Barbara; BAZO Mari, and SMORAGIEWICZ, Wanda. Antibacterial Activity of *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus Casei* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA)', *Microbiological Research*, 165 (2010), 674–86
<<https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008>>.

³⁰⁹ FANG WU WU, Annette Wen. 'CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE ENSILADOS DE PIÑA COMO MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO Y DETERMINACIÓN DE SU APLICABILIDAD COMO CULTIVO BIOPROTECTOR EN LECHE AGRIA' (Universidad de Costa Rica, 2020)
<[http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/82704/Trabajo final de graduación completo Jannette Wu con firmas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/82704/Trabajo%20final%20de%20graduaci3n%20completo%20Jannette%20Wu%20con%20firmas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> [accessed 12 August 2022].

³¹⁰ KOOHESTANI, Mobin; et al. 'Effects of Cell-Free Supernatant of *Lactobacillus Acidophilus* LA5 and *Lactobacillus Casei* 431 against Planktonic Form and Biofilm of *Staphylococcus Aureus*', *Veterinary Research Forum*, 9.4 (2018), 306 <<https://doi.org/10.30466/VRF.2018.33086>>.

obteniendo diámetros de 50,26 mm para *L. acidophilus* y 37,06 mm para *L. casei*, de igual forma, evaluaron sobrenadante de las BAL frente a la misma cepa patógena, los cuales formaron halos de inhibición con diámetros de 16 mm y 13 mm respectivamente, determinando de esta forma la capacidad inhibitoria de *L. casei* frente a *S. aureus*, inferencia que concuerda con esta investigación.

Xu et al³¹¹ mostraron la efectividad inhibitoria de *L. casei* NA-2, aislada de un encurtido tradicional de repollo chino, en cocultivo con cuatro cepas patógenas y reportaron tasas de supervivencia para *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* O157:H7 del 0,40 %; 0,35 %; 0,02 % y 0,02 %, respectivamente.

Jurado et al³¹² encontraron resultados de acción inhibitoria en un estudio *in vitro* de *Lactobacillus casei* contra *S. aureus*, demostrando la efectividad de la BAL para el control del microorganismo patógeno, indicando que la inhibición que producen las cepas lácticas responde a diversos mecanismos de supervivencia de los BAL; los estudios han demostrado que las bacteriocinas son un factor importante en la regulación del ambiente circundante de las bacterias lácticas, aunado a su capacidad de reducir el pH del medio a valores que son inviables para otro tipo de bacteria.

Rajkovic et al³¹³ explican que el mecanismo de inhibición por ácidos orgánicos (a. láctico y a. acético) se basa en la capacidad de la forma no disociada de ácido orgánico para penetrar a través de la membrana celular y disociarse dentro de la célula, lo que resulta en una disminución del valor del pH intracelular, esencial para el control de la síntesis de ATP, la síntesis de ARN y proteínas, la replicación del ADN y el crecimiento celular. Así mismo, describen que las bacterias Gram-negativas son más resistentes al ácido láctico que las Gram-positivas, debido a la susceptibilidad de los compuestos que interfieren con el transporte de iones a través de la membrana celular, efecto que se pronuncia con mayor intensidad en *S. aureus* y *C. perfringens* que en cultivos de *E. coli* y *Salmonella*.

Fang³¹⁴ infiere que las bacteriocinas son un grupo de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias del género *Lactobacillus*, por lo general, se producen cuando hay otros organismos activos, son sintetizadas por el ribosoma y se

³¹¹ XU, Xiaoqing et al. Antibacterial Potential of a Novel Lactobacillus Casei Strain Isolated from Chinese Northeast Sauerkraut and the Antibiofilm Activity of Its Exopolysaccharides', *Food & Function*, 11.5 (2020), 4697–4706 <<https://doi.org/10.1039/D0FO00905A>>.

³¹² JURADO-GÁMEZ, H., y Gúzman-Insuasty, M. (2015). Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(2), 23-39.

³¹³ RAJKOVIC, A; SMIGIC Nada, and DEVLIEGHERE Frank, 'Contemporary Strategies in Combating Microbial Contamination in Food Chain', *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl.SUPPL. (2010) <<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.12.019>>.

³¹⁴ FANG, Op. cit., p. 23.

caracterizan por ser moléculas catiónicas pequeñas compuestas por alrededor de 30 - 60 unidades de aminoácidos que forman hélices anfipáticas, estables a altas temperaturas (100 °C, por 10 min), y tienen una amplia variabilidad de espectro de actividad, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas.

Vázquez, Suarez y Zapata³¹⁵ dan a conocer que la producción de bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la curva de crecimiento, guardando relación directa con la biomasa producida. Por otra parte, los autores Heredia-Castro et al³¹⁶ mencionan que las bacteriocinas se sintetizan en el ribosoma de las BAL junto a una molécula que inmuniza la célula productora de la bacteriocina, además, hacen referencia a que las bacteriocinas de BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro debido a los residuos de lisina, arginina e histidina que las estructuran, en el mismo sentido, tienen carácter hidrófobo por el remanente de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen.

Autores como Sánchez y Peña³¹⁷ sugieren que las bacteriocinas ejercen actividad antimicrobiana por diferentes mecanismos que incluyen desestabilización de membrana, lisis celular, degradación de macromoléculas como ácidos nucleicos e inhibición de procesos biológicos como síntesis de proteínas, ADN, ARN y peptidoglucano y mencionan que es una molécula con gran capacidad antagonista y con un poder de acción sobre una gran variedad de microorganismos, afirmación que coincide con López-Meza et al³¹⁸. La acción inhibitoria de las bacteriocinas en la membrana citoplasmática tiene como objetivo las vesículas energizadas de la membrana, con lo que pueden intervenir en la fuerza protón motriz, mencionado por Fang³¹⁹ en su investigación.

Gutierrez et al³²⁰ evaluaron la estabilidad de extractos (sobrenadante y precipitado) obtenidos de cepas aisladas, *L. plantarum* y *L. brevis*, de productos fermentados,

³¹⁵ VÁSQUEZ, Sandra Milena; SUÁREZ, M, Héctor and ZAPATA Sandra. UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE', *Rev Chil Nutr*, 36.1 (2009), 64–71
<<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>>

³¹⁶ HEREDIA-CASTRO, Priscila, et al (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.

< <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33951621002>>

³¹⁷ SÁNCHEZ y PEÑA, Op. cit., p. 90.

³¹⁸ LÓPEZ-MEZA, Joel et al. Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application', *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, 2011, 275–304 <<https://doi.org/10.5772/13058>>.

³¹⁹ FANG, Op. cit., p. 23.

³²⁰ GUTIERREZ RAMÍREZ, Luz Adriana; MONTOYA CAMPUZANO, Olga Ines y RUIZ VILLADIEGO, Orlando. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido

extractos que fueron sometidos por los autores a diferentes condiciones como: pH (3,5; 4,5; 5,5), temperatura de almacenamiento (0 °C, 4 °C, 25 °C), tiempo (8 días, 18 días, 30 días), y finalmente, a temperaturas elevadas por un periodo de tiempo (50 °C/30 min; 80 °C/10 min), demostrando, estabilidad frente a las condiciones expuestas y acción antimicrobiana del sobrenadante y precipitado sobre *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* y *E. coli*. En el mismo sentido, Heredia-Castro et al³²¹ dan a conocer la tolerancia de bacteriocinas a temperaturas de 100 °C – 121 °C durante 15 min a 30 min y pH entre 3,0 – 9,0, propiedades importantes para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria y farmacéutica.

Los autores Ullah et al³²² aislaron *L. casei* de un alimento fermentado chino y purificaron la bacteriocina LiN333, que presentó inhibición frente a *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, los resultados obtenidos indicaron pérdida de sustancias citoplasmáticas en *S. aureus* y *E. coli*, acorde a ello, la bacteriocina LiN333 podría presentar un modo de acción mediante la formación de poros. Por otra parte, Chen et al³²³ mencionan la identificación de la bacteriocina caseicina obtenida de *L. casei*, que afecta la biosíntesis de proteínas y ADN mediante la inhibición parcial de la formación de timidina. Estas investigaciones permiten mencionar que las bacteriocinas producidas por una cepa bacteriana pueden ser heterogéneas, formar diferentes tamaños de poros y tener mecanismos de acción diferentes, mecanismos que posiblemente se presenten en la cepa evaluada y mediante los cuales se obtuvieron los resultados en el presente estudio.

Par y Meilin³²⁴ mencionan la importancia de tratamientos térmicos en la producción de alimentos para asegurar su conservación en el tiempo, entre ellos se destacan: el escaldado, en este método se alcanza entre los 70 °C a 100 °C durante 3 minutos, la pasteurización, en este método se alcanza temperaturas de 85 °C durante 15 segundos a 20 segundos, o temperaturas entre 62 °C a 68 °C durante 30 min, condiciones bajo las cuales según lo reportado por Heredia-Castro et al³²⁵ las

lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 36, 2005." Revista CENIC. Ciencias Biológicas 36 (2005). < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525062>>

³²¹ HEREDIA-CASTRO Op cit., p. 341.

³²² NIAMAT Ullah, XUEJIAO Wang, JIN Wu, YAN Guo, HANJING Ge, TENG YU Li, SALEEM Khan, ZHIXi Li, XIANCHAO Feng. (2017). Purification and primary characterization of a novel bacteriocin, LiN333, from *Lactobacillus casei*, an isolate from a Chinese fermented food. *LWT*, 84, 867-875. <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.056>>

³²³ CHEN Lin, et al. (2020). Application of bacteriocins produced from lactic acid bacteria for microbiological food safety. *Current Topics in Lactic Acid Bacteria and Probiotics*, 6(1), 1-8. <<https://doi.org/10.35732/ctlabp.2020.6.1.1>>

³²⁴ PAR GRAMAJO, Meylin Gabriela. (2019). Aplicación de los métodos de conservación de alimentos. *Revista Ingeniería y Ciencia*, 1(15). < <https://core.ac.uk/download/pdf/228879718.pdf>>

³²⁵ HEREDIA-CASTRO, et al., Op. Cit., p. 344.

bacteriocinas permanecen estables, característica deseable para la utilización de estos péptidos de bajo peso molecular en la bioconservación de alimentos.

Londoño et al³²⁶ mencionan que la inocuidad alimentaria ha desarrollado una creciente preocupación para el desarrollo de alternativas con el objetivo de obtener compuestos que favorezcan la conservación de alimentos, una de ellas son las BAL debido a la producción de varios compuestos bioactivos, entre ellos las bacteriocinas; con capacidad para inhibir microorganismos encontrados en materias primas que pueden poner en riesgo la calidad del alimento y la salud animal y/o humana al ser ingeridas, estas alternativas han permitido preservar alimentos sin afectar la calidad y mejorando las características sanitarias del producto final.

Fang³²⁷, propuso que *L. casei* presenta características para biopreservación gracias a su amplio espectro inhibitorio frente a microorganismos de deterioro como bacterias patógenas, mohos y levaduras, potencial expresado por mecanismos de competencia, producción de bacteriocinas como la caseicina y con ellos la extensión de la vida útil y aseguramiento de la inocuidad de un alimento mediante el uso de microbiota controlada y/o compuestos antimicrobianos.

Vásquez, Suárez y Zapata³²⁸, propusieron para la aplicación de cepas bioprotectoras en carnes y sus derivados, que los cultivos microbianos deben cumplir características importantes como mantener su efecto inhibitorio a bajas temperaturas y causar un efecto mínimo en el pH del producto, bajo este concepto, se sugiere el uso de sobrenadantes o bacteriocinas purificadas sobre el material objetivo, así, evitar posibles efectos secundarios de la biopreservación.

Catagña³²⁹ indicó la utilización de bacteriocinas como bioconservante, se ha ampliado a diferentes productos incluyendo, derivados lácteos, cárnicos, bebidas y enlatados, su aplicación puede presentarse como ingredientes bioactivos en polvo para alimentos, como péptidos purificados, semipurificados o a través de cultivos lácticos productores de bacteriocinas. Londoño et al³³⁰ describen 3 métodos como son: Inoculación del alimento con cultivos iniciadores que producen bacteriocinas en el producto, adición de bacteriocinas purificadas o semipurificadas como preservativo alimenticio y el uso de un producto previamente fermentado con un

³²⁶ LONDOÑO, N. A., TABORDA, M. T., LÓPEZ, C. A., & ACOSTA, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. *Alimentos hoy*, 23(36), 186-205. < https://acta.org.co/acta_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/356/306>

³²⁷ FANG, Op. cit., p. 24.

³²⁸ VÁSQUEZ, SUÁREZ y ZAPATA. Op, cit., p. 68.

³²⁹ CATAGÑA RODRÍGUEZ, Robinson Patricio (2022). Revisión bibliográfica sobre las bacteriocinas y su aplicación como bioconservante dentro de la industria alimentaria (Bachelor's thesis, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo)
<<http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/8643>>

³³⁰ LONDOÑO et al., Op. cit., p. 196-197.

cultivo productor de bacteriocina, como ingrediente dentro del procesamiento de un alimento.

Los ensayos de inhibición permiten inferir en el potencial antimicrobiano de *Lactobacillus casei* sobre *Staphylococcus aureus*. La actividad inhibitoria de la cepa láctica se expresó a diferentes concentraciones, condiciones de temperatura, filtrado y neutralización de pH, demostrando la efectividad de la cepa láctica y sus subproductos para el control de *S. aureus*. Gracias a los diversos mecanismos antibacterianos, ácido láctico, bacteriocinas, EPS y subproductos fermentativos, a *L. casei* se le atribuye gran versatilidad y un amplio perfil para inhibición de bacterias patógenas, características que abren puertas a posibles aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y salud tanto humana como animal.

5.6. PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)

La producción de exopolisacáridos de *L. casei* en medio MRS a diferente temperatura y tiempo fue positiva, se determinó por la presencia de precipitado en las muestras evaluados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Determinación de EPS a diferente temperatura y tiempo

Temperatura / tiempo	28°C / 7 días	35°C / 48 horas	42°C / 24 horas
Producción EPS	Positiva	Positiva	Positiva

Entre los microorganismos productores de EPS, las bacterias ácido lácticas cobran gran interés por la extraordinaria propiedad de los biopolímeros que producen, no conllevan ningún peligro para la salud, son generalmente reconocidos como seguros (GRAS), tienen actividad antioxidante, actividad antibiopelícula y actividad antitumoral según lo mencionan Rojaka et al³³¹.

El-Enshasy y Yang³³² describen que las BAL tienen la capacidad de producir EPS, cuya función es proteger las bacterias de factores como el medio ambiente y condiciones gastrointestinales. Korcz y Varga³³³ por su parte, resaltan la importancia de cepas productoras de EPS en la industria alimentaria al ser polímeros que mejoran la viscosidad y la textura de los productos, también desempeñan un papel en la formación de biopelículas, interactúan con las células epiteliales intestinales y se los considera responsables de varias propiedades atribuidas a los probióticos gracias a la actividad antimicrobiana, antiviral,

³³¹ RAJOKA, M. S. R; MEHWISH, H. M; HAYAT, H. F; HUSSAIN, N; SARWAR, S; ASLAM, H; NADEEM, A y SHI, J. (2019). Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1132–1142. DOI: 10.1007/S12602-018-9494-8

³³² EL-ENSHASY and YANG Op. Cit., p. 263-264.

³³³ KORCZ and VARGA Op. Cit., p. 375.

antiinflamatoria, inmunoreguladora y reducción de colesterol en la sangre por acción de EPS.

Como lo menciona Rojas³³⁴ los EPS son estructuras hidratadas, tienen la función de conferir protección a las células frente a la deshidratación, es un gran reservorio de agua que facilita la dispersión de los nutrientes, también permiten a las células adherirse a diferentes superficies, por uniones tanto hidrofóbicas como electrostática, forman los conocidos “biopelículas”, donde las células crecen y se desarrollan formando microcolonias, con la posibilidad de colonizar diferentes ambientes gracias al biofilm.

Según Nácher-Vázquez³³⁵ la producción de EPS por BAL se puede detectar en cultivos sólidos con el uso de un asa estéril, que, al entrar en contacto se diferencia una capa viscosa con la capacidad de formar filamentos. La identificación de producción de EPS por *L. casei* a diferentes temperaturas, es un índice de su grado de aplicabilidad en diversos procesos en la industria alimentaria para la elaboración de alimentos funcionales y alimentos balanceados para animales y humanos. La aplicación de EPS en matrices alimentarias puede generar cambios reológicos y estabilizantes deseables en la matriz, con ello, reducir el uso de aditivos y satisfacer las necesidades del consumidor contemporáneo. Sin embargo, se debe tener en cuenta la identificación y caracterización del tipo de EPS producido por la cepa y las matrices alimentarias adecuadas, factores que convergen con la investigación de Korcz y Varga³³⁶.

En palabras de Hu et al³³⁷ y Min et al³³⁸ los EPS se clasifican en dos grupos según la variedad de monosacáridos que lo componen: homopolisacáridos (HoPS), monosacáridos idénticos y heteropolisacáridos (HePS), monosacáridos son de 2 a 8 unidades diferentes. Los polisacáridos comprenden proporciones variables de azúcares y sus derivados como lo son galactosa, glucosa, manosa, ramnosa, ribosa, xilosa, fructosa, arabinosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico, glucosamina y galatosamina. Sin embargo, HoPS y HePS pueden diferenciarse en las subunidades constituyentes, estructura, largo de cadena, grado de ramificación y enlaces glucósidos.

³³⁴ ROJAS ARMOA, Jissel Mariana . Produccion de Exopolisacaridos a Partir de Bacterias Ácido Lácticas Utilizando Tusa de Maíz Como Fuente de Carbono (Universidad Nacional de Asunción, 2020) <https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/BECA02-38_Jissel_Armoa.pdf> [accessed 9 August 2022].

³³⁵ NÁCHER-VÁZQUEZ Op. Cit., p. 10.

³³⁶ KORCZ AND VARGA. Op. Cit. p. 209

³³⁷ TONG HU AND OTHERS, 'Genome Analysis and Physiological Characterization of Four *Streptococcus Thermophilus* Strains Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk', *Frontiers in Microbiology*, 11 (2020), 184 <<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00184/BIBTEX>>.

³³⁸ WEI HONG MIN AND OTHERS, 'Characterization and Antioxidant Activity of an Acidic Exopolysaccharide from *Lactobacillus Plantarum* JLAU103', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127.6 (2019), 758–66 <<https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2018.12.004>>.

En el mismo sentido Rayn et al³³⁹, Torino et al³⁴⁰ y Zheng et al³⁴¹ mencionan que los HoPS están compuestos generalmente por unidades de glucosa y fructosa, los cuales forman glucanos o fructanos respectivamente, el más común son los alfa-glucanos que pueden ser divididos en cuatro grupos, dextranos, mutanos, reuteranos y alteranos. No obstante, los EPS más producidos por BAL son los HePS constituidos por unidades repetitivas de D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y en algunos casos N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina o ácido úrico, además, los HePS son característicos por acetilaciones, piruvilaciones y fosforilaciones. Por otra parte, la producción de EPS y sus características estructurales varían de acuerdo a estímulos ambientales y condiciones de crecimiento, llegando a sintetizar dos tipos de EPS con diferente composición y pesos molecular por la misma cepa, descripción realizada por Pérez-Ramos et al³⁴²

Según Rojas³⁴³ la mayoría de los EPS se secretan o permanecen débilmente unidos a la pared celular por interacciones electrostáticas (iones, enlaces de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas), y menciona la relación entre la producción de EPS, las condiciones ambientales, la regulación de la producción de EPS y la longitud de la cadena que se produce.

Ciszek-Lenda et al³⁴⁴ experimentaron el efecto de los EPS aislados de *L. reuteri* 115, *L. johnsonii* 142, y *L. animalis/murinus* 148, detectando que los EPS de las cepas estudiadas poseen un efecto inmunorregulador en los macrófagos y el perfil de citoquinas incitado por los EPS dependió de la bacteria, por lo tanto, los mismos autores, exponen que la diversidad en la estructura de los heteropolisacáridos producto de las BAL se puede traducir en diferentes mecanismos de acción.

³³⁹ RYAN P. M. et al. Sugar-Coated: Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria for Food and Human Health Applications', *Food & Function*, 6.3 (2015), 679–93 <<https://doi.org/10.1039/C4FO00529E>>.

³⁴⁰ TORINO, MARÍA INÉS; FONT DE VALDEZ, GRACIELA, AND MOZZI FERNANDA, 'Biopolymers from Lactic Acid Bacteria. Novel Applications in Foods and Beverages', *Frontiers in Microbiology*, 6 (2015), 834 <<https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00834/BIBTEX>>.

³⁴¹ JINSHUI ZHENG et al. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70.4 (2020), 2782–2858 <<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107/CITE/REFWORKS>>.

³⁴² PÉREZ-RAMOS, Adrian; NÁCHER-VÁZQUEZ, Montserrat; NOTARARIGO, Sara; LÓPEZ, Paloma y MOHEDANO, Luz, 'Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides', *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, 2016, 329–44 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00022-8>>.

³⁴³ ROJAS ARMOA, Op. cit., p. 27.

³⁴⁴ CISZEK-LENDA Marta et al. Strain Specific Immunostimulatory Potential of *Lactobacilli*-Derived Exopolysaccharides', *Central European Journal of Immunology*, 36.3 (2011), 121–29 <<http://www.termedia.pl/-Experimental-immunology-Strain-specific-immunostimulatory-potential-of-lactobacilli-derived-exopolysaccharides,10,17497,1,1.html>> [accessed 10 August 2022].

Los investigadores Rojaka et al³⁴⁵ aislaron *L. casei* SHA101 y *L. vaginalis* SHA110 y evaluaron el potencial de EPS contra microorganismos patógenos (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus petrasii* y *E. coli*). Además, reportaron actividad anticancerígena contra las células cancerosas Caco-2. Estas características indican que los EPS de BAL tiene un potencial prometedor para aplicarse de forma segura en las industrias biomédica, cosmética y alimentaria.

Liu et al³⁴⁶ y Wang et al³⁴⁷ indicaron que los EPS de *L. plantarum* han expresado la capacidad de inhibir la adhesión de *E. coli* O157:H7 a las células HT-29, y mostraron actividad probiótica en la actividad antibiofilm en diversas bacterias patógenas como *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, y actividad antitumoral contra las células HT-29, además, Ayyash et al³⁴⁸ demostraron que los EPS producidos por *L. plantarum* tienen actividad citotóxica contra el cáncer de colon y las líneas de cáncer de mama, 88,1% y el 73,1% a una concentración de 10 mg/mL, respectivamente.

Se deben considerar los diversos parámetros en la producción y utilización de EPS, debido a que pueden alterar la cepa bacteriana, con ello generar estructuras y composiciones variables de un mismo exopolisacáridos y probablemente cambiará el modo de acción del EPS estudiado.

5.7. RESISTENCIA A LISOZIMA

Los resultados en densidad optica se observan en la Tabla 17. Se encontró que hay diferencias entre los tiempo de evaluación ($p < 0,05$), al igual que el efeco de las concentraciones ($p < 0,05$). De igual manera, se encontró que hubo interacción entre la concentración y el tiempo ($p < 0,05$).

A pesar de existir diferencias en la lectura de densidad óptica (DO), al expresar cada valor en UFC/mL, las cifras no presentan diferencias estadísticas, ya que su equivalencia está sobre la concentración máxima bacteriana en la escala de McFarland, es decir, los valores registrados en DO para los tiempos 0, 30 y 60 minutos frente a las diferentes concentraciones de lisozima, son iguales a $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, valor superior a 1×10^7 UFC/mL recomendado como concentración mínima en productos probióticos³⁴⁹, indicando que *L. casei* microencapsulado fue

³⁴⁵ ROJAKA, Op. cit., p. 1141.

³⁴⁶ LIU, Zhengqi; et al. Characterization and Bioactivities of the Exopolysaccharide from a Probiotic Strain of *Lactobacillus Plantarum* WLPL04. En *Journal of Dairy Science*, 100.9 (2017), 6895–6905 <<https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11944>>.

³⁴⁷ WANG, Ji et al., Op. cit., p. 35.

³⁴⁸ AYYASH, Mutamed et al. Characterization, Bioactivities, and Rheological Properties of Exopolysaccharide Produced by Novel Probiotic *Lactobacillus Plantarum* C70 Isolated from Camel Milk, *International Journal of Biological Macromolecules*, 144 (2020), 938–46 <<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.09.171>>.

³⁴⁹ EL-ENSHASY et al. Op. cit., p. 325.

resistente frente a lisozima en los tiempos y concentraciones evaluadas. Al respecto, Fajardo-Argoti et al³⁵⁰ evaluaron la resistencia de *L. plantarum* microencapsulado a diferentes concentraciones de lisozima (0,60 µg; 120 µg; 180 µg) en incubación por 24 horas, con una carga bacteriana final entre $2,0 \times 10^9$ UFC/150mL y $3,0 \times 10^{12}$ UFC/150µL, valores cercanos a los obtenidos por Rodríguez et al³⁵¹, que al someter un microencapsulado de *L. plantarum* obtuvieron una concentración bacteriana entre $2,7 \times 10^9$ UFC/150mL hasta $3,0 \times 10^{12}$ UFC/150µl

Tabla 17. Resistencia de *L. casei* microencapsulado a lisozima

Concentración	Minutos			EEM
	0	30	60	
6	1,269 ^{Bb}	1,351 ^{Aa}	1,248 ^{Cc}	0,001
12	1,276 ^{Ca}	1,325 ^{Ab}	1,291 ^{Bb}	0,001
18	1,264 ^{Cb}	1,283 ^{Bc}	1,305 ^{Aa}	0,001
EEM	0,001	0,001	0,001	

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios (p<0,05).

La lisozima se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, produciéndose en multitud de tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, leche humana, lágrimas, saliva y es además secretada por leucocitos polimorfonucleares³⁵². Carrillo³⁵³ explica que la lisozima se encuentra en mayor cantidad en la leche humana que en la leche de vaca y que atraviesa el tracto intestinal, sin ser destruida por el jugo gástrico ni por las secreciones intestinales ya que encontró gran cantidad de lisozima en las deposiciones de los niños alimentados con leche materna.

Munera³⁵⁴ describe la lisozima o muramidasa, como una proteína que se puede encontrar libremente de forma soluble o dentro de leucocitos y lisosomas con propiedades bactericidas y antiviral, capaz de producir efectos sinérgicos con otras proteínas e inhibe una amplia variedad de microorganismos, siendo efectiva principalmente contra gram positivas. El mismo autor explica el mecanismo de

³⁵⁰ FAJARDO-ARGOTI, JURADO-GÁMEZ, and PARRA-SUESCÚN, p. 4.

³⁵¹ SINSAJOA-TEPUD, JURADO-GAMEZ, and NARVÁEZ-RODRÍGUEZ, p. 241.

³⁵² CARRILLO, Wilman. Lisozima: Actividad Antibacteriana y Alergenicidad', *Actual. Nutr*, 14.4 (2013), 314–26 http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf [accessed 25 August 2022].

³⁵³ CARRILLO, Op. cit., p. 223.

³⁵⁴ MUNERA CABAL, Gloria. ENCAPSULACIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES EN SISTEMAS NANO Y MICROESTRUCTURADOS: TÉCNICAS Y APLICACIONES EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS' (Universidad Politécnica de Valencia, 2020) <[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/148962/Munera - Encapsulación de antimicrobianos naturales en sistemas nano y microestructurados: técnic....pdf?sequence=2](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/148962/Munera_-_Encapsulaci3n_de_antimicrobianos_naturales_en_sistemas_nano_y_microestructurados:_t3cnic....pdf?sequence=2)> [accessed 8 December 2021].

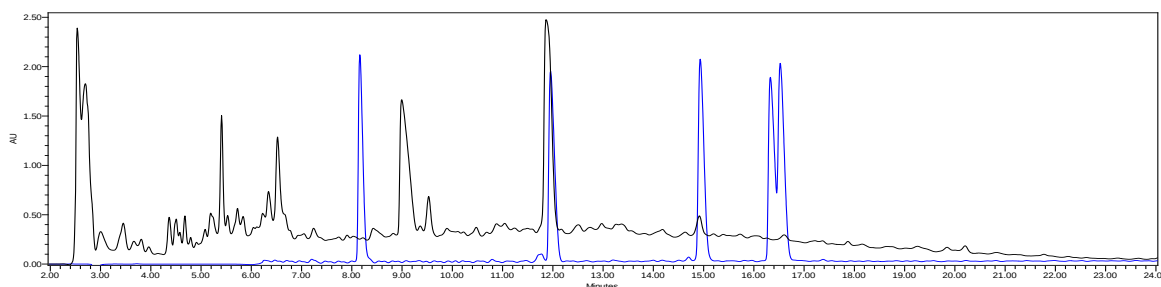
acción de la lisozima, el cual consiste en hidrolizar enlaces beta-1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos de 2-acetil-amino-2-desoxi-D-glucosa del peptidoglucano de la pared celular bacteriana, provocando la lisis de la pared celular.

5.8. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS, ÁCIDO LÁCTICO Y AMINOÁCIDOS DEL SOBRENADANTE.

5.8.1. Identificación de Péptidos por HPLC – DAD. Se detectaron 4 picos que corresponden a la presencia de péptidos en la muestra de *L. casei*, de acuerdo a los espectros UV obtenidos de 200 a 290 nm, longitudes de onda de referencia para la identificación de estos compuestos. La comparación de los 4 picos detectados en el sobrenadante de *L. casei* frente al patrón estándar, indicó que durante el tiempo 11,866 min correspondiente al pico número 2, fue similar a un péptido conformado por una cadena de aminoácidos VAL-TIR-VAL, con una concentración de 0,56 mg/mL (Figura 21).

En cuanto a la identificación del perfil de péptidos para la cepa láctica, Fajardo-Argoti et al³⁵⁵, detectaron al péptido de composición VAL-TIR-VAL con una concentración 0,52mg/mL en sobrenadante de *L. platarum*, por su parte, Calpa-Yama et al³⁵⁶, obtuvieron el péptido con la composición similar a la mencionada anteriormente en sobrenadante de *L. casei*.

Figura 21. Cromatograma identificación de péptidos de *Lactobacillus casei* ATCC 334



5.8.2. Determinación de ácido láctico en el sobrenadante de *Lactobacillus casei*. En la Tabla 18 se registraron los valores de ácido láctico en el sobrenadante con valores de 27,7 g/L y 29,62 g/L. Calpa-Yama et al³⁵⁷ indicaron para sobrenadante de *L. casei* valores de 30,21 g/L, valores cercanos a los anunciados en la presente investigación.

³⁵⁵ FAJARDO-ARGOTI, JURADO-GÁMEZ, y PARRA-SUESCÚN, Op.cit., p. 5.

³⁵⁶ CALPA-YAMÁ, CHASPUENGAL-TULCÁN, y JURADO-GÁMEZ, Op.cit., p. 31.

³⁵⁷ Ibid., p. 7.

Tabla 18. Determinación de ácido láctico en sobrenadante de *L. casei*

<i>Lactobacillus casei</i>	Muestra 1 g/L	Duplicado g/L
	27,7	29,62

5.8.3. Identificación de aminoácidos en el sobrenadante de la cepa láctica *L. casei* y de la cepa patógena *S. aureus*. Los aminoácidos identificados se presentan en la Tabla 19. Fajardo-Argoti³⁵⁸ indicaron un perfil de aminoácidos para *L. plantarum* de la siguiente manera: cantidad relativa porcentual %: A. aspártico: 5,1; Serina: 9,7; Arginina: 7,6; Tirosina: 4,5; Valina: 10,4.

Rosales-Bravo et al³⁵⁹ expresaron que la disponibilidad de aminoácidos favorece la formación de alfa-cetoácidos, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y ésteres, cuyo perfil cualitativo y cuantitativo impactan las características distintivas a los productos lácteos fermentados, además, explica que la cantidad de aminoácidos producidos durante la fermentación podría explicarse por variaciones en los componentes de su metabolismo proteolítico, donde el tipo peptidasas intracelulares y sus mecanismos de regulación, así como las necesidades nutricionales para los diferentes aminoácidos propios de cada cepa influyen en su liberación al medio.

Tabla 19. Identificación de aminoácidos de *L. casei* y *S. aureus*

Nº	Aminoácidos %	<i>L. casei</i>	<i>S. aureus</i>
1	Ácido aspártico	4,3	-
2	Serina	7,8	4,2
3	Arginina	8,1	6,1
4	Tirosina	55,1	43,3
5	Valina	7,5	2,2
6	Prolina	2,8	
7	Cisteína	4,2	2,9
8	Glicina	-	3,1
9	Treonina	2,1	-

La capacidad hidrolítica de la proteína LAB juega un papel muy importante en la fermentación de la leche y diferentes sustratos, principalmente al descomponer las proteínas en péptidos y aminoácidos libres; Algunos de estos péptidos se

³⁵⁸ FAJARDO-ARGOTI, JURADO-GÁMEZ y PARRA-SUESCÚN, Op.cit., p. 4.

³⁵⁹ ROSALES-BRAVO, et al. Evaluación de Propiedades Tecno-Funcionales de Cepas Probióticas Comerciales Del Género *Lactobacillus*, *RIIIT. Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*, 8.45 (2020) <https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-97532020000400001> [accessed 24 August 2022].

consideran biológicamente activos con propiedades inmunorreguladoras, antitumorales, reductoras del colesterol, antibacterianas, intestinales, nerviosas y antioxidantes³⁶⁰. De esta forma, las propiedades características de los probióticos se adjuntan a las bacteriocinas que son proteínas o péptidos bactericidas sintetizados en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida³⁶¹.

Vásquez, Suárez y Zapata³⁶² y Mondragón et al³⁶³ mencionan que las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una enzima proteolítica, entre las que conviene citar las de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina), característica que hace de estos metabolitos bacterianos, sustancias seguras para ser incluidas como biopreservantes de los alimentos, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos.

5.9. MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus casei* ATCC 334

Según Gonzales, Perez y Morón³⁶⁴, las bacterias probióticas son microorganismos vivos que al situarse en el tracto gastrointestinal pueden ejercer efectos benéficos en la salud. Cada una de estas propiedades dependen de la habilidad que presentan los probióticos de multiplicarse al interior del huésped, ya que para conferir los efectos benéficos deben primero sobrevivir su paso a través del tracto gastrointestinal, dicha sobrevivencia se ve afectada por diversos factores: como la presencia o ausencia de oxígeno, el medio ambiente ácido, la interacción entre especies, las condiciones del cultivo, la producción de peróxido de hidrógeno por metabolismo microbiano, la disponibilidad de nutrientes y la presencia de inhibidores de crecimiento. Como alternativa, Rodrigues³⁶⁵ propone la microencapsulación, que básicamente es un proceso mediante el cual ciertas

³⁶⁰ GONZÁLEZ-OLIVARES, G. Liberación de Péptidos Bioactivos Por Bacterias Lácticas En Leches Fermentadas Comerciales', *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10.2 (2011), 179–88 <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es> [accessed 24 August 2022].

³⁶¹ VÁSQUEZ M, SUÁREZ M, y ZAPATA, Op. cit., p. 67.

³⁶² Ibid., p. 68.

³⁶³ MONDRAGÓN PRECIADO, Guadalupe et al. Bacteriocinas: Características y Aplicación En Alimentos', *Investigacion y Ciencia*, 59 (2013), 64–70 (p. 32) <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67430113008>> [accessed 30 November 2021].

³⁶⁴ GONZALES CUELLO, Rafael; PEREZ MENDOZA, Jaime and MORÓN ALCAZAR, Lena. Efecto de La Microencapsulación Sobre La Viabilidad de *Lactobacillus Delbrueckii* Sometido a Jugos Gástricos Simulados', *Información Tecnológica*, 26.5 (2015), 11–16 <<https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003>>.

³⁶⁵ RODRIGUES, F. J. et al. Encapsulated Probiotic Cells: Relevant Techniques, Natural Sources as Encapsulating Materials and Food Applications – A Narrative Review', *Food Research International*, 137 (2020), 109682 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>>.

sustancias bioactivas (bacterias ácido lácticas) son retenidas dentro de una matriz o sistema pared con el propósito de protegerlos frente a condiciones ambientales deletéreas. Una microcápsula consiste de una membrana fuerte, delgada, semipermeable y esférica que rodea un núcleo sólido o líquido con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm.

En la presente investigación se utilizó una matriz binaria, inulina más maltodextrina, al 10 % p/v, con el equipo de microencapsulación a una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida en un rango de 65 - 67°C, se almacenó a temperatura ambiente (19 ± 2 °C) en un empaque metalizado ziploc. A los 90 días se realizaron los estudios de: % viabilidad, % eficiencia, % humedad, % solubilidad, humectabilidad (min). La evaluación de Aw% se realizó de manera periódica en los días 0, 45, 70 y 90.

5.10. ESTUDIO DE SUPERVIVENCIA Y ESTABILIDAD DE *Lactobacillus casei* ATCC 334 MICROENCAPSULADO

5.10.1. Viabilidad. La viabilidad de *L. casei* microencapsulado con inulina y maltodextrina al 10% p/v mediante la técnica de spray drying y almacenado durante 90 días a una temperatura ambiente (19 ± 2 °C) fue de 100% (Tabla 20), resultado que se atribuyó a los materiales microencapsulantes y al empaque ziploc metalizado en el cual se almacenó el microencapsulado.

Tabla 20. Viabilidad y eficiencia de *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulado

Parámetro evaluado	Valor obtenido %	Tiempo días
Viabilidad	100	90
Eficiencia	84,64	90

La conservación de una bacteria ácido láctica mediante la microencapsulación, es un factor importante que incide en el buen estado de los microorganismos al momento de suministrarlo en la alimentación animal o humana, ya que permite expresar las características probióticas al momento de ser utilizado³⁶⁶.

Gonzales, Cuello y Morón³⁶⁷, microencapsularon *L. delbrueckii* utilizando la mezcla binaria de alginato de sodio (AS) y gelana de alto acilo (GAA) con un 0.2 % (v/v) y presentaron una eficiencia en la microencapsulación del 98.7 %, estos porcentajes son similares a los expuestos por Rajam y Anandharamakrishnan³⁶⁸, en la microencapsulación de *L. plantarum* utilizando la técnica de secado por aspersión y proteína de suero lácteo en combinación con fructooligosacáridos como material

³⁶⁶ GONZALES, PEREZ y MORÓN, Op. cit., p. 12.

³⁶⁷ Ibid., p. 15.

³⁶⁸ RAJAM and ANANDHARAMAKRISHNAN, Op. cit., p. 776.

pared, estos autores encontraron eficiencias cercanas al 98.63 %. Sinsajoa-Tepud et al³⁶⁹ muestran una viabilidad de 83,3% para *L. platarum* microencapsulado por el método de secado por aspersión en la matriz inulina-maltodextrina (15% p/v) con un periodo de almacenamiento de 45 días. Zambrano-Mora³⁷⁰ da a conocer una viabilidad de 94% para *L. casei* microencapsulado por el método de secado por aspersión en la matriz inulina-maltodextrina (15% p/v), con un periodo de almacenamiento de 20 días.

Al comparar los datos de los estudios referenciados con el resultado obtenido en esta investigación, se encuentra que la viabilidad es aceptable, pero se debe tener en cuenta que la viabilidad difirió en cada bacteria microencapsulada, razón que se atribuye a los diferentes parámetros de microencapsulación aplicados por cada autor, pH, temperatura, tipo de material encapsulante y cantidad y condiciones de almacenamiento.

5.10.2. Eficiencia. La eficiencia de *L. casei* microencapsulado bajo los parámetros mencionados anteriormente, fue de 84,64%, el cual se evaluó después de 90 días de almacenamiento.

La investigación realizada por Zambrano-Mora y Jurado-Gómez³⁷¹ reveló una eficiencia de 89,36% para *L. casei* microencapsulado por el método de secado por aspersión (inulina-maltodextrina 15% p/v) con 22 días almacenamiento. Sinsajoa-Tepud y Narváez-Rodríguez³⁷² reportaron 88,4% de eficiencia para *L. plantarum* microencapsulado con inulina y maltodextrina por el método de secado por aspersión después de 45 días de almacenamiento. Los autores Cerón-Córdoba, Jurado-Gómez y Bolaños-Bolaños³⁷³, reportaron una eficiencia del 90,6% de *L. reuteri* microencapsulado por spray drying (inulina-maltodextrina 5 % p/v) después de 50 días de almacén. Valores cercanos obtenidos en la presente investigación, que demuestran la preservación de la cepa mediante el método de microencapsulación usado.

De Araujo³⁷⁴, expresa que el método de secado por aspersión alcanza una elevada eficiencia a comparación de otros métodos y que se encuentra entre el 96% y el 100%, además, menciona que dentro de los parámetros a monitorear y controlar

³⁶⁹ SINSAJOA-TEPUD, JURADO-GAMEZ, y NARVÁEZ-RODRÍGUEZ Op. cit., p. 4.

³⁷⁰ ZAMBRANO-MORA and JURADO-GÁMEZ Op. cit., p. 3.

³⁷¹ Ibid., p. 3.

³⁷² SINSAJOA TEPUD y NARVÁEZ RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 100.

³⁷³ CERON-CORDOBA, Jhon Fredy, JURADO-GÁMEZ, Henry y BOLAÑOS-BOLAÑOS, Juan Carlos. APLICACIÓN DE UN PROBIÓTICO (LACTOBACILLUS REUTERI ATCC 53608) MICROENCAPSULADO EN UNA BEBIDA TIPO SORBETE A BASE DE PULPA DE FRUTA (BANANO Y MANGO) COMO ALIMENTO FUNCIONAL Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA', AGLALA, 12.2 (2021), 249–63.

³⁷⁴ ARAUJO URIBE, Natalia. Viabilidad de Los Probióticos Bacillus Polymyxa, Bacillus Megaterium y Lactobacillus Delbruekii Subsp. Bulgaricus Microencapsulados Bajo La Técnica de Secado Por Aspersión' (Universidad Nacional de Colombia, 2016).

durante el proceso de microencapsulación se encuentran, temperatura de entrada y de salida, flujo de alimentación del producto a secar, flujo de aire y la materia prima utilizada. Además, hace énfasis en los factores que estimulan el microencapsulado para lograr una correcta liberación, entre los cuales menciona, temperatura, agua, reacciones enzimáticas, reacciones químicas, y cambios en la presión osmótica.

De acuerdo a los autores citados, la eficiencia del microencapsulado en la presente investigación es aceptable. Se debe ajustar las diversas variables en el proceso de microencapsulado que pudieron afectar la eficiencia, sin olvidar que se almacenó *L. casei* microencapsulado por un periodo de 90 días

5.10.3. Humedad. El resultado de humedad de *L. casei* microencapsulado bajo las condiciones anteriormente mencionadas y tras un periodo de almacenamiento de 90 días es de 4,0 % (Tabla 21). Este valor está dentro de lo recomendado por Páez³⁷⁵, quien reporta porcentajes de 3,5 % a 4 % como viables para materiales microencapsulados obtenido a partir del secado por aspersión. El mismo autor menciona que la humedad en los productos deshidratados juega un rol clave en el mantenimiento de la actividad celular, siendo los niveles elevados los más perjudiciales, existiendo una estrecha relación entre la humedad del microencapsulado y la estabilidad y conservación de los probióticos.

Tabla 21. Valores caracterización física de *Lactobacillus casei* ATCC 334 microencapsulado

Parámetro evaluado	Valor obtenido	Tiempo días
Humedad	4,00 %	90
Solubilidad	99,08 %	90
Humectabilidad	2 min: 22 seg	90

Sinsajoa-Tepud y Narváez-Rodríguez³⁷⁶ reportaron un valor de 7,97% de humedad para *L. plantarum* microencapsulado en una matriz inulina-maltodextrina (15% p/v) con un periodo de almacenamiento de 45 días. Zambrano-Mora y Jurado-Gámez obtuvieron una humedad de 5,23% y 13,85% a 22 y 35 días de almacenar el microencapsulado (inulina-maltodextrina 15% p/v). Los autores Ceron-Cordoba, Jurado-Gamez y Bolaños-Bolaños³⁷⁷, presentaron una humedad de 4,6% de *L. reuteri* microencapsulado por spray drying (inulina-maltodextrina 5 % p/v) después

³⁷⁵ BEATRIZ PAEZ, Roxana. Desarrollo de Cultivos Probióticos Deshidratados Por Secado Spray Para Aplicación En Alimentos. Estudios Microbiológicos y Tecnológicos.' (Universidad Nacional de la Plata, 2013)

<http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38116/Documento_completo_.pdf?sequence=1>

³⁷⁶ SINSAJOA-TEPUD y NARVÁEZ-RODRÍGUEZ. Op Cit., p. 100.

³⁷⁷ CERON CORDOBA; JURADO-GÁMEZ y BOLAÑOS-BOLAÑOS. Op. cit., p. 256.

de 50 días de almacén. Mishra y Athmaselvi³⁷⁸ anunciaron que el contenido de humedad del microencapsulado de *L. rhamnosus* fue de 6,51 a 7,72% comprobando que la humedad del microencapsulado se afecta por la temperatura de entrada.

En general, Paez³⁷⁹ menciona que la humedad de los productos deshidratados obtenidos está relacionada con las condiciones de proceso, temperatura de entrada al spray, velocidad de alimentación y con la composición de los materiales encapsulantes. Además, resalta que el uso de un material de envasado a base de aluminio protege al polvo de la exposición a la luz, la humedad y el oxígeno, respaldando la estabilidad de la BAL microencapsulada.

A pesar de utilizar el mismo método y materiales encapsulantes a una similar concentración, los valores referenciados son variables, y a comparación con los datos obtenidos en el presente trabajo, son elevados. De esta manera, se puede inferir que el método de microencapsulación, el recipiente para almacenar y los porcentajes de inulina y maltodextrina que componen el microencapsulado, generaron para este parámetro resultados dentro de rangos aceptables y con un alto potencial de aplicación en futuros procesos.

5.10.4. Solubilidad. El resultado de solubilidad para *L. casei* microencapsulado bajo las condiciones mencionadas anteriormente fue de 99,08. Zambrano-mora y Jurado-Gámez³⁸⁰ consideran que la solubilidad es el parámetro que mide la capacidad del microencapsulado para disolverse en el agua y tiene repercusión sobre la viabilidad de la BAL microencapsulada, factor importante para una correcta liberación del microorganismo en el tracto gastrointestinal, los mismos autores obtuvieron 96% de solubilidad en la microencapsulación de *L. casei* mediante el método de secado por aspersión (inulina-maltodextrina 15% p/v), valor similar al obtenido en la presente investigación. Los autores Ceron-Cordoba, Jurado-Gamez y Bolaños-Bolaños³⁸¹, registraron un valor de solubilidad de 99,1% para *L. reuteri* microencapsulado por spray drying (inulina-maltodextrina 5 % p/v) con un periodo de 50 días de almacén.

³⁷⁸ MISHRA Ambuj and ATHMASELVI K. A. Stress Tolerance and Physicochemical Properties of Encapsulation Processes for Lactobacillus Rhamnosus in Pomegranate (Punica Granatum L.) Fruit Juice', *Food Science and Biotechnology* 2016 25:1, 25.1 (2016), 125–29
<<https://doi.org/10.1007/S10068-016-0019-5>>.

³⁷⁹ PAEZ. Op. cit., p. 154.

³⁸⁰ ZAMBRANO-MORA and JURADO-GÁMEZ Op. cit., p. 4.

³⁸¹ CERON-CORDOBA, JURADO-GÁMEZ, and BOLAÑOS-BOLAÑOS, Op. cit., p. 257.

Rodríguez, Rojas y Rodríguez³⁸² y Rios-Aguirre and Gil-Garzón³⁸³ coinciden en que la solubilidad del microencapsulado depende en mayor parte del agente protector, para este caso maltodextrina e inulina, en específico la maltodextrina es obtenida por hidrólisis enzimática o ácida del almidón y generalmente muestra una alta solubilidad en agua, sabor neutro, bajo costo, baja viscosidad a altas concentraciones y capacidad de proteger el material encapsulado de la oxidación, características que se reflejan en esta investigación con una solubilidad del 99,08%, debido a esto, se han usado ampliamente para la microencapsulación de alimentos y se recomienda maltodextrina para la microencapsulación de microorganismos. Sin embargo, la mayor desventaja de este agente de encapsulación es su falta de propiedades emulsionantes debido a su afinidad limitada por los componentes hidrófobos. Por lo tanto, el uso de inulina combinada con maltodextrina puede ofrecer un buen microencapsulado.

5.10.5. Humectabilidad. La humectabilidad de *L. casei* microencapsulado con inulina y maltodextrina fue de 2 minutos con 22 segundos (Tabla 21). Tiempo que tomo 1g de polvo en sumergirse bajo la superficie de un volumen de 100 mL de agua destilada.

Páez³⁸⁴ habla sobre la humectabilidad de un polvo como la capacidad de absorber agua a una determinada temperatura. Es el tiempo en que el polvo desaparece bajo la superficie del agua, o bien cuando el agua penetra en la capa del microencapsulado. Zambrano-Mora y Jurado Gámez³⁸⁵ se refieren a una adecuada humectabilidad como el proceso de liberación de la bacteria, ya que permite mejorar la sobrevivencia y reportan un tiempo de humectabilidad de 2 minutos con 24 segundos para el microencapsulado de *L. casei* por el método de secado por aspersión con inulina y maltodextrina. Ceron-Cordoba, Jurado-Gámez y Bolaños-Bolaños³⁸⁶, registraron un valor de humectabilidad de 2 minutos con 45 segundos para *L. reuteri* microencapsulado por spray drying (inulina-maltodextrina 5 % p/v) con un periodo de 50 días de almacén. Fajardo et al³⁸⁷ registran una humectabilidad igual a 1 minuto con 56 segundos para *L. plantarum* microencapsulado en una matriz de inulina más maltodextrina (15% p/v).

Los resultados citados son similares al reportado en la presente investigación. Con los valores anteriores se puede determinar que la metodología de microencapsulación y los materiales encapsulantes tienen buenos resultados para este parámetro.

³⁸² RODRÍGUEZ, Yeimy Alejandra; ROJAS, Andrés Felipe and RODRÍGUEZ, Sneyder. ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS PARA APLICACIONES ALIMENTICIAS', *Revista Biosalud*, 15.2 (2016) <<https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>>.

³⁸³ RIOS-AGUIRRE and GIL-GARZÓN Op. Cit.

³⁸⁴ PAEZ Op. Cit., p. 120.

³⁸⁵ ZAMBRANO-MORA and JURADO-GÁMEZ Op. Cit., p. 4.

³⁸⁶ CERON-CORDOBA, JURADO-GÁMEZ, and BOLAÑOS-BOLAÑOS, p. 257.

³⁸⁷ FAJARDO-ARGOTI, JURADO-GÁMEZ, and PARRA-SUESCÚN, Op. cit., p. 3.

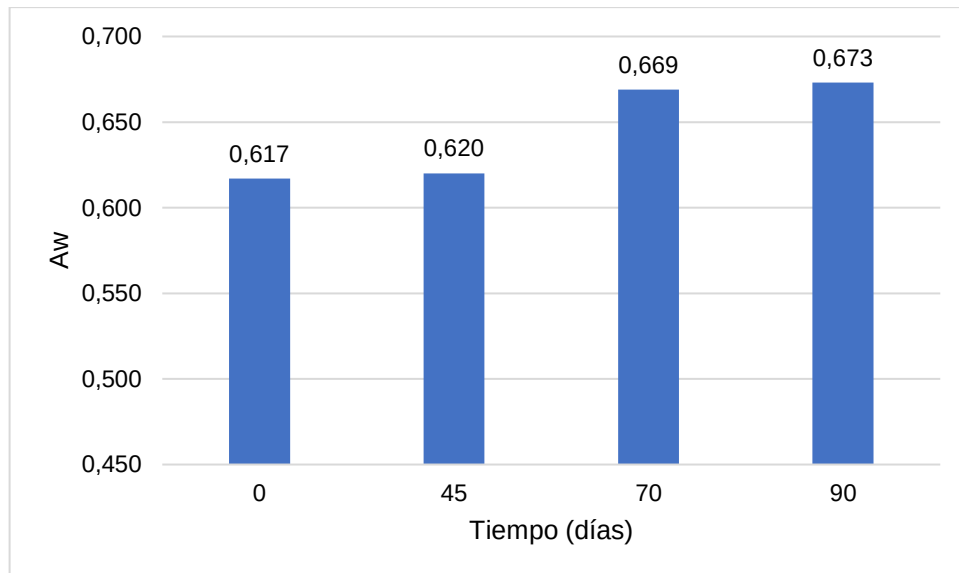
5.10.6. Actividad de agua (Aw). El resultado de Aw para *L. casei* microencapsulado bajo las condiciones mencionadas anteriormente, se evaluó para los días 0, 45, 70 y 90 (Tabla 22 y Figura 22). La actividad de agua para el día cero corresponde a 0,617 Aw y se incrementa al día 90 a 0,673 Aw, con diferencias en cada tiempo evaluado ($p < 5$). Indicando que a media que pasa el tiempo, se incrementa la actividad de agua del microencapsulado.

Tabla 22. Determinación de actividad de agua Aw de *L. casei* microencapsulado

Tiempo días	0	45	70	90
% Aw	0,617 ^d	0,620 ^c	0,669 ^b	0,673 ^a

Letras distintas en la columna muestra diferencias estadísticas entre medios ($p < 0,05$).

Figura 22. Determinación de actividad de agua Aw% de *Lactobacillus casei* microencapsulado



La evaluación realizada por Sinsajoa-Tepud y Narváez-Rodríguez³⁸⁸ encontró que *L. platarum* tuvo un valor de 0,4 de Aw, dato cercano al reportado por Zambrano-Mora et al³⁸⁹, quienes microencapsularon *L. casei* en una matriz inulina y maltodextrina al 10% p/v mediante la técnica de spray drying, con una actividad de agua de 0,353 a 22 días y 0,407 para 35 días de almacenaje e indica un aumento

³⁸⁸ SINSAJOA TEPUD and NARVÁEZ RODRÍGUEZ Op. Cit., p. 100.

³⁸⁹ ZAMBRANO-MORA and JURADO-GÁMEZ, p. 3.

en la Aw en a medida que avanza el tiempo. Yoha et al³⁹⁰ encontraron para microencapsulados de *L. plantarum* actividad de agua de 0,49 y 0,47.

Los resultados de Aw citados son menores a los encontrados en la presente investigación, esto corrobora la existencia de dificultades en este parámetro para la correcta encapsulación de la bacteria ácido láctica. A pesar de ello, las pruebas de estudio para el análisis del material microencapsulado demuestran un proceso de microencapsulación aceptable.

Makinen et al³⁹¹ menciona que la Aw de alimentos deshidratados como: cereales, galletas, snacks, alimento balanceado, leche en polvo, fórmulas infantiles y suplementos dietarios, oscilan entre 0,1 a 0,5. Por otro lado, Páez³⁹² recomienda una Aw% para microencapsulado por el método de secado por aspersión menor a 0,3, para garantizar la estabilidad del producto durante su almacenamiento. Del mismo modo, Valero-Cases y Frutos³⁹³ aluden que valores de Aw por encima de los 0,60 tienen susceptibilidad a contaminarse con bacterias, mohos y levaduras, lo que evidencia dificultades para el método utilizado en esta investigación.

5.10.7. Morfología estructural. El tamaño y la forma de partícula del microencapsulado se puede observar en la Figura 23, la partícula de menor tamaño corresponde a 2,10 µm y el mayor tamaño 5,28 µm con un promedio de 3,99 µm. Se observan partículas, sin grietas, simples, circulares y aglomeraciones, las ultimas, posiblemente formadas por las condiciones de transporte hasta el lugar donde la muestra fue procesada por microscopia electrónica de barrido (MEB) o Scanning Electron Microscope (SEM).

Zambrano-Mora y Jurado-Gámez³⁹⁴ obtuvieron tamaños de 3,47 µm a 17,81µm, para el microencapsulado de *L. casei* mediante secado por aspersión, Wang et al³⁹⁵, con 7 µm a 15 µm, en *L. delbruekii* sub. *bulgaricus*; por otra parte, Muhammad et

³⁹⁰ YOHA K. S.; MOSES, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of Encapsulation Methods on the Physicochemical Properties and the Stability of Lactobacillus Plantarum (NCIM 2083) in Synbiotic Powders and in-Vitro Digestion Conditions', *Journal of Food Engineering*, 283 (2020), 110033 <<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110033>>.

³⁹¹ MAKINEN K, et al. Science and Technology for the Mastership of Probiotic Applications in Food Products', *Journal of Biotechnology*, 162 (2012), 356–65 <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006>>.

³⁹² PAEZ Op. Cit., p.72.

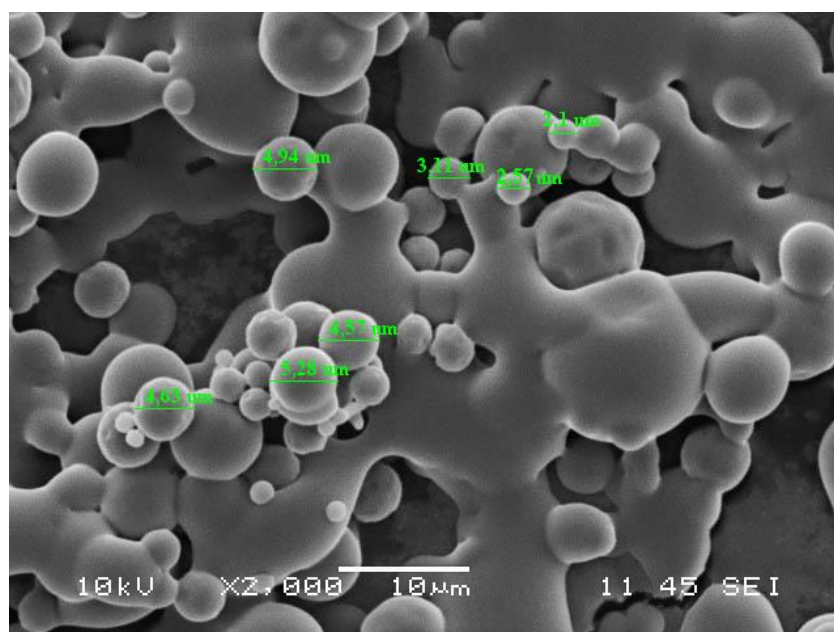
³⁹³ VALERO-CASES, Estefanía and FRUTOS, María José. Effect of Different Types of Encapsulation on the Survival of Lactobacillus Plantarum during Storage with Inulin and In Vitro Digestion', *Food Science and Tecnology*, 64 (2015), 824–28 <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049>>.

³⁹⁴ Ibid., p. 4.

³⁹⁵ WANG, Weiwei, et al. Effects of Microencapsulated Lactobacillus Plantarum and Fructooligosaccharide on Growth Performance, Blood Immune Parameters, and Intestinal Morphology in Weaned Piglets', *Food and Agricultural Immunology*, 29.1 (2017), 84–94 <<https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1360254>>.

al³⁹⁶ observó tamaños de 6,33 μm en microencapsulado de *L. plantarum*. Ceron-Cordoba, Jurado-Gómez y Bolaños-Bolaños³⁹⁷ encontraron tamaños de partícula de 3,07 μm a 7,04 μm de diámetro con morfología circular e irregular para *L. reuteri* microencapsulado por Spray Drying con el 5 % de prebióticos como matriz encapsulante (25 g Inulina + 25 g Maltodextrina). Lo anterior demuestra que el tamaño se encuentra cercano a lo reportado por la literatura. Es importante el tamaño de las partículas ya que afecta la capacidad de la rehidratación, el flujo del polvo, la dispersabilidad, la solubilidad, la segregación y la compactación de una mezcla de compuestos, como lo mencionaron Fajardo-Argoti, Jurado-Gómez y Parra-Suescún³⁹⁸.

Figura 23. Microfotografía por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) de *Lactobacillus casei* microencapsulado.



5.11. EXPOSICIÓN A CONDICIONES GASTROINTESTINALES

Los resultados de las condiciones gastrointestinales in vitro, modelos gastrointestinales, se presentan a continuación. Ensayos que se realizaron al microencapsulado de *L. casei* transcurrido 90 días.

³⁹⁶ MUHAMMAD, Zafarullah et al. Integration of Polysaccharide-Thermoprotectant Formulations for Microencapsulation of Lactobacillus Plantarum, Appraisal of Survivability and Physico-Biochemical Properties during Storage of Spray Dried Powders', *Food Hydrocolloids*, 66 (2017), 286–285 <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040>>.

³⁹⁷ CERON-CORDOBA, JURADO-GÓMEZ, AND BOLAÑOS-BOLAÑOS, Op. cit., p. 255.

³⁹⁸ FAJARDO-ARGOTI, JURADO-GÓMEZ, AND PARRA-SUESCÚN, Op. cit., p. 4.

5.11.1. Modelo gastrointestinal convencional discontinuo y continuo.

Los resultados se muestran en la Tabla 23. Se presentó una menor población bacteriana en el modelo convencional con $9,12 \times 10^{11}$ UFC/mL. Se puede observar que la población bacteriana en el modelo discontinuo disminuye con cada paso, con una población bacteriana inicial igual a $1,6 \times 10^{12}$ UFC/mL, y una población bacteriana final igual a $7,58 \times 10^{11}$ UFC/mL. En la Figura 24 se presenta una caja petri para recuento bacteriano después de someter *L. casei* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas con el modelo convencional continuo.

Tabla 23. Crecimiento bacteriano de *L. casei* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas

Convencional continuo	Convencional discontinuo		
	Lisozima - 10 min	Pepsina+NaCl+ HCl 90 min	Pancreatina+bilis+sales biliares +NaCl+NaOH 150 min
$9,12 \times 10^{11}$ UFC/mL	$1,6 \times 10^{12}$ UFC/mL	$1,33 \times 10^{12}$ UFC/mL	$7,58 \times 10^{11}$ UFC/mL

Ceron-Cordoba, Jurado-Gómez y Bolaños-Bolaños³⁹⁹ sometieron un microencapsulado de *L. reuteri* a condiciones gastrointestinales simuladas, para ello utilizaron los siguientes factores: lisozima (10min), pepsina 3 %; NaCl 0,5 %; HCl para ajuste de pH (90 min), pancreatina 1 %; bilis 0,3 %; NaCl 0,5 %; NaOH para ajuste de pH (150 min) en agitación constante, y obtuvieron una población bacteriana igual a $2,2 \times 10^{11}$ UFC/mL. De Araújo⁴⁰⁰ evaluó el efecto del pH 2.5 y sales biliares al 0,3 % p/v durante 4 horas, sobre *B. polymyxa*, *B. megaterium* y *L. delbruekii* microencapsulado, los resultados de recuento en placa indicaron una población bacteriana de $6,77 \pm 0,7 \log_{10}$ UFC/g. Sinsajoa-Tepud y Narváez-Rodríguez⁴⁰¹, evaluaron pH (1, 2 y 3), sales biliares (0,3% y 1%) y bilis bovina (0,5%), frente a *L. plantarum* microencapsulado e indicaron crecimientos en el rango de 3×10^7 a $6,4 \times 10^9$ UFC/mL. Los valores referenciados, al igual que los valores obtenidos en la presente investigación, superan el mínimo recomendado para productos probióticos, después de someterse a pruebas gastrointestinales simuladas.

La comparación con los anteriores estudios indicó que *L. casei* evidenció un adecuado crecimiento y desarrollo en las condiciones *in vitro* evaluadas y con ello, la pertinencia del uso del microencapsulante para su conservación durante el tránsito por el tracto digestivo de los animales. Además, se debe tener en cuenta que los valores de UFC/mL que debe tener un microorganismo para una correcta

³⁹⁹ CERON-CORDOBA, JURADO-GÁMEZ, AND BOLAÑOS-BOLAÑOS, Op. cit., p. 254.

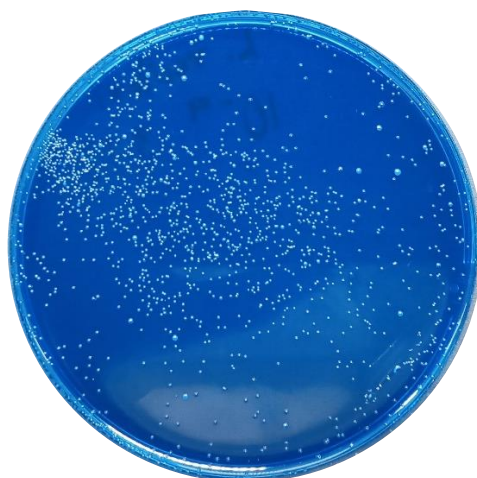
⁴⁰⁰ DE ARAUJO URIBE. Op. cit., p. 36.

⁴⁰¹ SINSAJOA-TEPUD y NARVÁEZ-RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 108.

sobrevivencia y colonización del tracto gastrointestinal deben ser iguales o superiores 1×10^7 UFC/mL, valor que fue superado en ambos modelos evaluados.

Fang⁴⁰² y López⁴⁰³ recomiendan para pruebas realizadas en la categoría gastrointestinal tener en cuenta la especie animal y su fisiología, debido a que la gran mayoría de los probióticos deben de sobrevivir el tránsito digestivo en la vía boca-colon (en la mayoría de especies animales), esto implica que las cepas en estudio deben de ser evaluadas en sistemas simulados del tránsito intestinal para poder determinar su capacidad de tolerancia a enzimas antimicrobianas como las lisozimas y la tolerancia a pH muy bajos como las del ambiente gástrico y la bilis.

Figura 24. Crecimiento bacteriano de *L. casei* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas.



La técnica de microencapsulación por secado por aspersión se caracteriza por sus bajos costos comparados con otros métodos de secado empleados, de allí que existan una amplia diversidad de aplicaciones, entre las que se encuentran la encapsulación de esencias, bebidas en polvo, sabores y probióticos. Debido a su amplia diversidad de aplicaciones, la microencapsulación actúa como un mecanismo de protección, de acuerdo a la composición química, polaridad, solubilidad, propiedades físicas y funcionales de cada matriz, mejorando aspectos como vida útil, prolongando la estabilidad y actividad funcional de compuestos, facilitando la incorporación de compuestos insolubles y la biodisponibilidad de nutrientes y microorganismo al facilitar la liberación controlada en los sitios requeridos de interacción, argumentos descritos por Ríos-Aguirre y Gil-Garzón⁴⁰⁴.

⁴⁰² FANG WU WU, p. 9.

⁴⁰³ LÓPEZ VÁZQUEZ, Diana Edith. "Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* entrampado empleando fructanos de agave, bajo condiciones gastrointestinales simuladas." (2019).

⁴⁰⁴ RÍOS-AGUIRRE and GIL-GARZÓN, p. 4.

Munera⁴⁰⁵ expresa que los prebióticos son sustancias de la dieta (que fundamentalmente consisten en polisacáridos y oligosacáridos no almidón) como la maltodextrina e inulina. La mayoría de los prebióticos se utilizan como ingredientes alimentarios en galletitas, cereales, chocolate, cremas untables, y productos lácteos. La maltodextrina, en palabras de Quirino⁴⁰⁶, es una matriz microencapsulante que se obtiene por hidrólisis enzimática o ácida del almidón y generalmente muestra alta solubilidad en agua, baja viscosidad y bajo costo, su baja capacidad emulsionante puede ser superada mediante el uso de almidones modificados, otro carbohidrato usado para la encapsulación es la inulina, un fructooligosacárido compuesto por unidades de fructosa unidas por enlaces beta-(2,1) y que contiene una unidad de glucosa. La inulina se puede obtener comercialmente de la achicoria (*Cichorium intybus*) y tiene efectos prebióticos, acciones de fibra dietética, entre otros beneficios relacionados con la salud. Al respecto, De Araújo et al⁴⁰⁷ describen que la inulina estimula selectivamente las cepas probióticas ayudándolas a implantarse en el colon y se reconoce como agente termoprotector que aumenta la supervivencia de los microorganismos después del secado y durante el almacenamiento debido a que minimizan el estrés mecánico, oxidativo y osmótico al que pueden ser sometidos.

González et al⁴⁰⁸, mencionan que las maltodextrinas de diferentes equivalentes de dextrosa se usan comúnmente como agentes encapsulantes debido a su alta solubilidad en agua, baja viscosidad y soluciones incoloras, e indican que este es un polímero digerible y los compuestos bioactivos encapsulados pueden liberarse rápidamente durante la digestión gástrica y enzimática, dejándolos expuestos a las condiciones gastrointestinales, sin embargo, la inulina es moderadamente soluble en agua y sus enlaces glucosídicos la hacen indigerible para los humanos o condiciones gástricas de pH y acción enzimática, a diferencia de la maltodextrina, pero en gran medida digerible para ciertos microorganismos en el intestino. Por lo tanto, la inulina ha sido reportada como un biopolímero de liberación colónica, ya que puede pasar relativamente intacta por la parte superior del tracto gástrico, llegando al colon donde se pueden liberar los compuestos bioactivos mediante la acción bacteriana⁴⁰⁹.

Una vez suministrado el probiótico, la interacción normal entre las bacterias intestinales y su huésped constituye una relación simbiótica. La presencia de un gran número de estructuras linfoides organizadas en la mucosa del intestino

⁴⁰⁵ MUNERA CABAL, p. 2.

⁴⁰⁶ QUIRINO LACERDA, Ellen Cristina Et al. Starch, Inulin and Maltodextrin as Encapsulating Agents Affect the Quality and Stability of Jussara Pulp Microparticles', *Carbohydrate Polymers*, 151 (2016), 500–510 <<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.093>>.

⁴⁰⁷ DE ARAÚJO et al. Op. cit., p. 37.

⁴⁰⁸ GONZÁLEZ, Estefanía et al. Role of Maltodextrin and Inulin as Encapsulating Agents on the Protection of Oleuropein during in Vitro Gastrointestinal Digestion', *Food Chemistry*, 310 (2020), 125976 <<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125976>>.

⁴⁰⁹ LACERDA et al., Op. cit., p. 502.

delgado (placas de Peyer) e intestino grueso (folículos linfoides aislados) refleja la importante influencia de las bacterias intestinales en la función inmunitaria. El epitelio que recubre estas estructuras está especializado en captar y hacer un muestreo de los antígenos, y contiene centros germinales linfoides que inducen respuestas inmunes adaptativas o adquiridas⁴¹⁰. Los microorganismos proliferan fermentando los sustratos disponibles de la dieta o a partir de secreciones endógenas y contribuyen a la nutrición del huésped

Rodríguez, Rojas Y Rodríguez⁴¹¹ en su revisión, mencionan que el mercado de los alimentos probióticos representa el mayor eslabón de ingresos en el área de los alimentos funcionales, pues los consumidores son cada vez más conscientes de los beneficios de la ingesta de alimentos con microorganismos saludables. Tradicionalmente, los alimentos lácteos han sido empleados como matrices para los microorganismos probióticos gracias a su habilidad para crecer en este sustrato con el fin de bioconservar alimentos. La búsqueda de diversidad e innovación de nuevos productos ha llevado a la industria alimentaria a investigar en formas de favorecer la viabilidad de los probióticos frente a factores adversos que reducen su estabilidad durante el procesamiento, almacenamiento y consumo. En este caso, la microencapsulación se ha convertido en la alternativa más viable para incorporar microorganismos en matrices que finalmente servirán como vehículos de bacterias probióticas. Entre estas nuevas matrices se tienen productos vegetales, carnes maduradas, chocolates, harinas instantáneas, coberturas y rellenos de golosinas, como lo indican Ceron-Cordoba, Jurado-Gámez y Bolaños-Bolaños⁴¹², autores que diseñaron una bebida tipo sorbete, mango y banano, con la inclusión de *Lactobacillus reuteri* microencapsulado. Producto que presentó aceptación y generó gran interés por parte del público encuestado.

Lo anterior permite afirmar que el microencapsulado con una matriz binaria, inulina más maltodextrina (10% p/v), es viable para la conservación de *Lactobacillus casei*, siendo una alternativa para el manejo de esta cepa bajo distintas condiciones, y posibles aplicaciones como aditivo en alimentos o bioconservante en productos altamente perecederos.

⁴¹⁰ GUARNER et al. Op. Cit., p. 7.

⁴¹¹ RODRÍGUEZ, ROJAS, AND RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 115.

⁴¹² CERON-CORDOBA, JURADO-GÁMEZ, AND BOLAÑOS-BOLAÑOS, Op. cit., p. 260–61.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

Mediante la cinética de fermentación se encontró que la fase exponencial de *Lactobacillus casei* en el medio de cultivo PRO y MRS se dio a las 18 horas y 15 horas con $2,3 \times 10^{12}$ UFC/mL y $5,6 \times 10^9$ UFC/mL, respectivamente.

Lactobacillus casei presentó acción inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus* mediante los métodos discos de agar impregnados y pads impregnados a partir de las concentraciones 75 µL y 40 µL, respectivamente.

El aminoácido con mayor cantidad relativa porcentual para *Lactobacillus casei* y *Staphylococcus aureus* fue tirosina, con 55,1 % para la bacteria láctica y 43,3 % para la bacteria patógena.

La microencapsulación de *Lactobacillus casei* con inulina y maltodextrina (10 % p/v) presentó buenas propiedades después de almacenarse por 90 días, viabilidad 100%; humedad 4 %; solubilidad 99,08 %; actividad de agua 0,673 Aw y recuentos en placa de $7,58 \times 10^9$ UFC/mL (modelo discontinuo) y $9,12 \times 10^{11}$ UFC/mL (modelo continuo) bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

El método de microencapsulación (Spray Drying), formó microcápsulas de *L. casei* en una matriz binaria de forma circular con diámetros entre 2,10 µm y 5,28 µm.

6.2. RECOMENDACIONES

Ampliar el estudio entorno a las bacteriocinas producidas por *L. casei*, y la composición de EPS.

Valorar menores concentraciones de *Lactobacillus casei* para verificar inhibición sobre *S. aureus*, en los diferentes métodos aplicados

Evaluar diferentes materiales prebióticos como matriz microencapsulante con el fin de maximizar la producción del microencapsulado.

Optimizar la composición nutricional del medio PRO.

Examinar la estructura interna de la microcápsula creada en torno a la BAL con las materias mediante el Microscopia Electrónica de Transmisión.

Evaluar el microencapsulado de *L. casei* en la bioconservación de alimentos y en la inclusión de alimentos balanceados y funcionales.

Realizar estudios en cultivos celulares intestinales con el fin de observar la interacción de *Lactobacillus casei* microencapsulada y sin microencapsular.

BIBLIOGRAFIA

ACOSTA NIEVES, Ivonne Patricia. Staphylococcus Aureus Procedentes de Quesos Costeños de Valledupar; Susceptibilidad a Antibióticos y Perfil Plasmídico. Rev. Méd. Risaralda, 25.1 (2019), 10–14 <www.ebay.com>.

AGUDELO, Claudia et al. DETERMINARON OF KINETIC PARAMETERS OF TWO LACTIC INOCULUMS: Lactobacillus Plantarum A6 AND LACTIC ACID BACTERIAS OF YOGURT', Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial, 8.2 (2010), 8 <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=es> [accessed 22 August 2022].

ÁLVAREZ-CISNEROS Yenizey M. and PONCE-ALQUICIRA, Edith. Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria', Antimicrobial Resistance - A Global Threat, 2018, 53–73 <<https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.80624>>.

AMARI, Myriam et al. Characterization of a Novel Dextranase from Weissella Confusa Isolated from Sourdough', Applied Microbiology and Biotechnology, 97.12 (2013), 5413–22 <<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4447-8>>.

ANARA L. Métodos microbiológicos. 3ªed Brasilia: Ministerio de Agricultura; 1981. ARAUJO URIBE, Natalia. Viabilidad de Los Probióticos Bacillus Polymyxa, Bacillus Megaterium y Lactobacillus Delbrueckii Subsp. Bulgaricus Microencapsulados Bajo La Técnica de Secado Por Aspersión' (Universidad Nacional de Colombia, 2016).

ARENALES SIERRA, Irene Margarita, 'Control de PH Interno de Microcápsulas Para La Protección de Probióticos Ante Condiciones Gastrointestinales Simuladas.' (Universidad Autónoma de Chapingo, 2019).

ARENAS ARRUBLA, Juan Esteban. Determinación de Algunos Parámetros Zootécnicos En Pollos de Engorde de La Línea Ross x Ross, Suplementados Con Un Consorcio de Microorganismos Probióticos', 2014, p. 4.

ARENAS, N.E. et al. Antibiotic Susceptibility of Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus Strains Isolated in Raw Cow Milk from the Sumapaz Region, Colombia', International Journal of Infectious Diseases, 53 (2016), 72–73 <<https://doi.org/10.1016/J.IJID.2016.11.183>>.

ARQUÉS, Juan et al. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens', BioMed Research International, 2015 <<https://doi.org/10.1155/2015/584183>>.

ARRIBAS ARRIBAS, maría belén. Probióticos: Una Nueva Estrategia En La Modulación Del Sistema Inmune. Granada: Universidad de Granada, 2009. <<https://digibug.ugr.es/handle/10481/2159>> [accessed 30 August 2021].

AYYASH, Mutamed et al. Characterization, Bioactivities, and Rheological Properties of Exopolysaccharide Produced by Novel Probiotic *Lactobacillus Plantarum* C70 Isolated from Camel Milk, *International Journal of Biological Macromolecules*, 144 (2020), 938–46 <<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.09.171>>.

BARCO LÓPEZ, Sandra Ines and PAREDES OCAMPO, Paula Andrea. *Elaboración de Panelitas de Leche de Soya* (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 2004) <<https://repository.unad.edu.co/handle/10596/20134>> [accessed 22 August 2022].

BEATRIZ PAEZ, Roxana. *Desarrollo de Cultivos Probióticos Deshidratados Por Secado Spray Para Aplicación En Alimentos. Estudios Microbiológicos y Tecnológicos.* (Universidad Nacional de la Plata, 2013) <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38116/Documento_completo_.pdf?sequence=1>.

BLAJMAN, Jesica E. y GUTIERREZ, salazar. Probióticos En Pollos Parrilleros: Una Estrategia Para Los Modelos Productivos Intensivos. En: *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 47, N.4 2015, p. 360–67 Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/J.RAM.2015.08.002>>.

BRIDIER, Arnaud. *Foodborne Bacterial Pathogens Methods*, ed. by Arnaud Bridier, Springer N (New York, NY: Springer Science, 2019) <<http://www.springer.com/series/7651>>.

BROUILLETTE, E., & MALOUIN, F. (2005). The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. *Microbes and infection*, 7(3), 560-568.

BUCHANAN, Robert L. *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management.*, *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*, Second Edition (North Ryde: Springer Science, 2018) <<https://doi.org/10.1007/978-3-319-68460-4>>.

BUSTOS CABRERA, ALICIA AND ORTÍZ, ANDREA SALAME. Prevalencia De *Staphylococcus Aureus* Meticilino Resistente, En Portadores Nasales En El Personal De La Salud, En Los Hospitales Públicos Y De La Seguridad Social En La Ciudad De Quito Y Su Relación Con Factores De Riesgo Individuales Y Laborales. (Universidad Central del Ecuador, 2015) <<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4730/1/T-UCE-0006-138.pdf>>.

CAI, Y, et al. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. En: *J Gen Appl Microbiol*. Agosto, 1999, vol. 45, no. 4, p. 177-184.

CALPA-YAMÁ FREDY; CHASPUENGAL-TULCÁN, AURA, y HENRY JURADO-GÁMEZ, Determinación de Parámetros Cinéticos de *Lactobacillus Casei* En Dos Medios Probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8.2 (2014), 15–35 (p. 18) <<https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.2>>.

CAMPUZANO, Silvia et al. Determinación de La Calidad Microbiológica y Sanitaria de Alimentos Preparados Vendidos En La Vía Pública de La Ciudad de Bogotá D.C., *Nova*, 13.23 (2015), 81–92 <<https://doi.org/10.22490/24629448.1708>>.

CARPENTER, L Carpenter, L. 1969. *Microbiología*. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana S.A. México DF. p. 205-215.

CARRILLO, W. Lisozima: Actividad Antibacteriana y Alergenicidad', *Actual. Nutr*, 14.4 (2013), 314–26 <http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf> [accessed 25 August 2022].

CARRILLO, Wilman. Lisozima: Actividad Antibacteriana y Alergenicidad', *Actual. Nutr*, 14.4 (2013), 314–26 <http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_314.pdf> [accessed 25 August 2022].

CASTAÑEDA, María Teresita, *Estequiometría y Cinética Del Crecimiento Microbiano*, 2019, ii <<http://www.latextemplates.com>> [accessed 22 August 2022].

CATAGÑA RODRÍGUEZ, Robinson Patricio (2022). *Revisión bibliográfica sobre las bacteriocinas y su aplicación como bioconservante dentro de la industria alimentaria* (Bachelor's thesis, Riobamba, Universidad Nacional de Chimborazo) <<http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/8643>>

CERON-CORDOBA, Jhon Fredy, JURADO-GÁMEZ, Henry y BOLAÑOS-BOLAÑOS, Juan Carlos. APLICACIÓN DE UN PROBIÓTICO (*LACTOBACILLUS REUTERI* ATCC 53608) MICROENCAPSULADO EN UNA BEBIDA TIPO SORBETE A BASE DE PULPA DE FRUTA (BANANO Y MANGO) COMO ALIMENTO FUNCIONAL Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA', *AGLALA*, 12.2 (2021), 249–63.

CHAMPAGNE, C et al. Microencapsulation for the Improved Delivery of Bioactive Compounds into Foods, *Current Opinion in Biotechnology*, 18.2 (2007), 184–90 <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>>.

CHANDRAMOULI, et al. An Improved Method of Microencapsulation and Its Evaluation to Protect *Lactobacillus* Spp. in Simulated Gastric Conditions', *Journal of Microbiological Methods*, 56.1 (2004), 27–35 <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002>>.

CHEN Lin, et al. (2020). Application of bacteriocins produced from lactic acid bacteria for microbiological food safety. *Current Topics in Lactic Acid Bacteria and Probiotics*, 6(1), 1-8. <<https://doi.org/10.35732/ctlabp.2020.6.1.1>>

CHEN, Wei. Lactic Acid Bacteria and Fermented Meat Products, Lactic Acid Bacteria Bioengineering and Industrial Applications (Singapore: Springer, 2019) <<https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4>>.

CISZEK-LENDIA Marta et al. Strain Specific Immunostimulatory Potential of Lactobacilli-Derived Exopolysaccharides', Central European Journal of Immunology, 36.3 (2011), 121–29 <<http://www.termia.pl/-Experimental-immunology-Strain-specific-immunostimulatory-potential-of-lactobacilli-derived-exopolysaccharides,10,17497,1,1.html>> [accessed 10 August 2022].

CORREA OLIVAR, Gabriela AND BATISTELA. Virginia. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UN EXOPOLISACÁRIDO (EPS) DE LA CEPA AUTÓCTONA Lactobacillus Fermentum LF2', XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de La Universidad Nacional Del Litoral, 2017 <<https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/1986/8.2.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [accessed 27 October 2021].

CRUEGER AND CRUEGER, Industrial Microbiology Manual. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, p.118. ISBN: 8420007439, 9788420007434 .

CRUZ RAMOS, Rubi. ESTUDIO DE LA SUPERVIVENCIA DE BACTERIAS PROBIÓTICAS MICROENCAPSULADAS BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN UN SISTEMA DINÁMICO', 2015.

CUETO, Clementina y ARAGÓN, Stephania. Evaluación Del Potencial Probiótico de Bacterias Ácido Lácticas Para Reducir El Colesterol in Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria to Reduce in Vitro Cholesterol. En Revista Scientia Agropecuaria, 3.1 (2012), 50 <www.sci-agropecu.unitru.edu.pe> [accessed 11 August 2022].

CUETO-VIGIL, María C; ACUÑA-MONSALVE, Yuditanduly and VALENZUELA-RIÑO, Jacqueline. EVALUACIÓN IN VITRO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE SUERO COSTEÑO', Actualidades Biológicas, 32.93 (2010), 129–38 <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842010000200001> [accessed 10 August 2022].

DAHL, THOMAS; MIDDEN, ROBERT and HARTMAN, PHILIP. Comparison of killing of gram- negative and gram-positive Bacteria by Pure Singlet. En: Journal of Bacteriology. Abril, 1989, vol, 171, no. p. 47.

DE ARAÚJO, Natalia; et al. Técnicas Para La Microencapsulación de Probióticos y El Impacto En Su Funcionalidad: Una Revisión', Alimentos Hoy, 23.36 (2015), 112–26.

DEKKER, Marcel. MICROBIOLOGICAL AND FUNCTIONAL ASPECTS Third Edition, 4th edn, 2012.

DEMAN, J., ROGOSA, M. y SCHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 1972. 130–135.

DOMÍNGUEZ GONZÁLEZA, Karina N, et al. El Efecto Antihipertensivo de Las Leches Fermentadas, En: *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 46, N.1 2014, 58–65 <[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70050-1](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70050-1)>.

DUBOIS, Michel, et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. En: *Anal Chem.* 1956, vol. 28, no. 3, p. 350-356.

EL-ENSHASY, Hesham Ali AND SHANG-TIAN, Yang, Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms, Probiotics, the Natural Microbiota in Living Organisms, 1st edn (CRC Press, 2021), p. 5 <<https://doi.org/10.1201/9781351027540>>.

ELINALVA PAULO., et al. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84 (2012): 495-508.

ELL'ELCE, A; et al. Actividad Bactericida in Vitro de Miel Sobre *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus*. Comparación Con La Actividad de Cefalosporinas. En: *Revista FAVE-Sección Ciencias Veterinarias*, 17 (2018), 12–17 <<https://doi.org/10.14409/favecv.v17i1.7160>>.

ERGINKAYA, Z; TURHAN, E. U. y TATLI, D. Determination of Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Turkish Fermented Dairy Products. En *Iranian Journal of Veterinary Research*, 19.1 (2018), 56 <<https://doi.org/10.22099/ijvr.2018.4769>>.

ESTRADA MALDONADO, ANA CRISTINA; GUTIÉRREZ RAMÍREZ, LUZ ADRIANA AND MONTOYA CAMPUZANO, OLGA INÉS. EVALUACIÓN in Vitro DEL EFECTO BACTERICIDA DE CEPAS NATIVAS DE *Lactobacillus* Sp. CONTRA *Salmonella* Sp. y *Escherichia Coli*, *Facultad Nacional de Agronomía* , 58.1 (2005), 2601–9 (p. 2603).

FAJARDO-ARGOTI, Catalina; JURADO-GÁMEZ Henry, and PARRA-SUESCÚN, Jaime. Viabilidad de *Lactobacillus Plantarum* Microencapsulado Bajo Condiciones Gastrointestinales Simuladas e Inhibición Sobre *Escherichia Coli* O157:H7 Viability of Microencapsulated *Lactobacillus Plantarum* under Simulated Gastrointestinal Conditions and Inhibit', *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 24 (2021) <<https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733>>.

FANG WU WU, Annette Wen. 'CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE ENSILADOS DE PIÑA COMO MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO Y DETERMINACIÓN DE SU APLICABILIDAD COMO CULTIVO BIOPROTECTOR EN LECHE AGRIA' (Universidad de Costa Rica, 2020) <[http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/82704/Trabajo final de graduación completo Jannette Wu con firmas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/82704/Trabajo_final_de_graduación_completo_Jannette_Wu_con_firmas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> [accessed 12 August 2022].

FETSCH, A. *Staphylococcus Aureus* (Academic Press, 2018), p. 4.

FLORES TIXICURO, Jessica Maribel. 'Optimización Estadística de La Producción de Ácido Láctico a Partir de Lactosuero Por Lactobacillus Casei' (UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE, 2020) <<http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/11169>> [accessed 2 December 2021].

FLÓREZ, Ana B. y MAYO, Baltasar. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus Thermophilus* Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances. En *Frontiers in Microbiology*, 8 (2017), 1–12 <<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02608/BIBTEX>>.

FRAQUEZA, Maria João. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dry-Fermented Sausages. En: *International Journal of Food Microbiology*, 212 (2015), 76–88 <<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.04.035>>.

GAO, Linglin et al, 'Antibacterial Pathway of Cefquinome against *Staphylococcus Aureus* Based on Label-Free Quantitative Proteomics Analysis', *Journal of Microbiology*, 59.12 (2021), 1112–24 <<https://doi.org/10.1007/S12275-021-1201-X>>.

GAVIRIA-MENDOZA, Andrés; et al. Uso Ambulatorio de Cefalosporinas En Una Población Colombiana: Estudio de Prescripción-Indicación. En: *Revista Chilena de Infectología*, 38.6 (2021), 737–44 <<https://doi.org/10.4067/S0716-10182021000600737>>.

GERHARDT, R.G.; MURRAY, E.; WOOD, W.; KRIEG, L.R. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington. 50 p

GOBBETTI, M and MINERVINI, F. Lactobacillus Casei General Characteristics of the Species. Encyclopedia of Food Microbiology, 2014, 432–38 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00180-4>>.

GONZALES CUELLO, Rafael; PEREZ MENDOZA, Jaime and MORÓN ALCAZAR, Lena. Efecto de La Microencapsulación Sobre La Viabilidad de Lactobacillus Delbrueckii Sometido a Jugos Gástricos Simulados', Información Tecnológica, 26.5 (2015), 11–16 <<https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003>>.

GONZÁLEZ, B. A; DOMÍNGUEZ-ESPINOSA R, and ALCOCER, B. R. USE OF Aloe Vera JUICE AS SUBSTRATE FOR GROWTH OF Lactobacillus Plantarum and L. Casei', Ciencia y Tecnología Alimentaria, 6.2 (2007), 152–57 <www.somenta.org/journal> [accessed 21 August 2022].

GONZÁLEZ, Estefanía et al. Role of Maltodextrin and Inulin as Encapsulating Agents on the Protection of Oleuropein during in Vitro Gastrointestinal Digestion', Food Chemistry, 310 (2020), 125976 <<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125976>>.

GONZÁLEZ-OLIVARES, G. Liberación de Péptidos Bioactivos Por Bacterias Lácticas En Leches Fermentadas Comerciales', Revista Mexicana de Ingeniería Química, 10.2 (2011), 179–88 <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es> [accessed 24 August 2022].

GUARNER, Francisco et al. Probióticos y Prebióticos, Guías Mundiales de La Organización Mundial de Gastroenterología Probióticos y Prebióticos, February 2017.

GUERRERO MILENA et al. Efecto Inhibitorio de Lactobacillus Acidophilus SOBRE EL ENTEROPATOGENO Vibrio Cholerae 01 OGAWA, in Vitro', Universidad y Salud, 1.3 (2002), 8–14 <<https://revistas.udenar.edu.co/index.php/usalud/article/view/314/pdf>> [accessed 21 October 2021].

GUO, Huiling; et al. Characterization of Antibiotic Resistance Genes from Lactobacillus Isolated from Traditional Dairy Products. Journal of Food Science, 82.3 (2017), 724–30 <<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13645>>.

GUO, Y.; SONG, G.; SUN, M.; WANG, J.; WANG, Y. (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in Staphylococcus aureus. Frontiers in cellular and infection microbiology, 10, 107.

GUPTA, Shilpi and ABU-GHANNAM, Nissreen. Probiotic Fermentation of Plant Based Products: Possibilities and Opportunities Probiotic Fermentation of Plant Based Products: Possibilities and Opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52.2 (2012), 183–99 <<https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499779>>.

GUTIERREZ RAMÍREZ, Luz Adriana; MONTOYA CAMPUZANO, Olga Ines y RUIZ VILLADIEGO, Orlando. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 36, 2005." *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 36 (2005).

GÚZMAN-INSUASTY, Manuel; JARRÍN-JARRÍN, V. and JURADO-GÁMEZ, Henry. Determinación De La Cinética, Pruebas De Crecimiento Microbiano y Efecto de Inhibición In Vitro de *Lactobacillus Lactis* En *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Streptococcus Agalactiae* Y *Escherichia Coli*, *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62.2 (2015), 40–56 <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remez/article/view/51993>>.

HARISHA, Sharma, *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook* (India: Laxmi Publications Pvt. Ltd, 2007).

HEREDIA-CASTRO, Priscila, et al (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.

HERRERA, Fanny AND SANTOS, Jesús. PRESENCIA DE *Staphylococcus Aureus* METICILINA-RESISTENTES EN QUESO DOBLE CREMA ARTESANAL', *Rev. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 18.1 (2015), 29–37.

HILL, Daragh et al. The *Lactobacillus Casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*, 2018 <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>>.

HRIOUECH, Soukayna et al. The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, and 1,8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Osteomyelitis', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020 (2020), 1–9 <<https://doi.org/10.1155/2020/4271017>>.

HUTKINS, Robert, *Microbiology and Technology of Fermented Food*, Wiley Blac (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 2019), ii.

JAMES, M; VELASTEGUI, E; and CRUZ, M. A. Evaluation of Culture Conditions of *Lactobacillus Acidophilus* y *Lactobacillus Casei* on Laboratory Scale, with Inulin as

Carbon Source', *Bionatura*, 2.1 (2017), 235–40
<<https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.01.4>>.

JAN, Alexander; et al. Scientific Opinion on a Qualified Presumption of Safety (QPS) Approach for the Safety Assessment of Botanicals and Botanical Preparations', *EFSA Journal*, 12.3 (2014), 38 <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3593>>.

JINSHUI ZHENG et al. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70.4 (2020), 2782–2858 <<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107/CITE/REFWORKS>>.

JONES, R. M. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology The Use of *Lactobacillus Casei* and *Lactobacillus Paracasei* in Clinical Trials for the Improvement of Human Health', in *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, 2017, pp. 99–108 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9/00009-4>>.

JUAREZ-ROLDÁN, . R. AND M-T JIMENEZ-MUNGUÍA, 'Condiciones Gastrointestinales Modelo Utilizadas Para Evaluar Probióticos Encapsulados', *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7.2 (2013), 15–24.

JURADO, H ; AGUIRRE, D y RAMÍREZ, C. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: *Revista MVZ Córdoba*. 14(2). 2010. Disponible en: 1723-1735. <https://doi.org/10.21897/rmvz.356>.

JURADO-GÁMEZ, H., y Gúzman-Insuasty, M. (2015). Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(2), 23-39.

JURADO-GÁMEZ, HENRY AND FAJARDO-ARGOTI, CATALINA. DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO IN VITRO DE *Lactobacillus Gasseri* SOBRE UNA CEPA DE *Staphylococcus Epidermidis*', *Biosalud*, 16.2 (2017), 53–69 (p. 64) <<https://doi.org/10.17151/BIOSA.2017.16.2.6>>.

JURADO-GÁMEZ, Henry; et al. Cinética de Fermentación, Pruebas de Desafío in Vitro y Efecto de Inhibición de *Lactobacillus Gasseri* ATCC 19992, *Veterinaria y Zootecnia*, 10.2 (2016), 72–89 <<http://vip.ucaldas.edu.co/vetzootec/downloads/v10n2a07.pdf>> [accessed 22 August 2022].

JURADO-GÁMEZ, Henry; GÚZMAN-INSUASTY, Manuel AND JARRÍN-JARRÍN, Verónica, 'Determinación de La Cinética, Pruebas de Crecimiento y Efecto de Inhibición in Vitro de Lactobacillus Lactis En Staphylococcus Aureus, Staphylococcus Epidermidis, Streptococcus Agalactiae y Escherichia Coli', Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 62.2 (2015), 40–56 <<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v62n2.51993>>.

KANAUCHI, Makoto. Lactic Acid Bacteria: Methods and Protocols, 2019, mdccclxxxvii
<<http://www.springer.com/series/7651><http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8907-2>>.

KARSKA-WYSOCKI Barbara; BAZO Mari, and SMORAGIEWICZ, Wanda. Antibacterial Activity of Lactobacillus Acidophilus and Lactobacillus Casei against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)', Microbiological Research, 165 (2010), 674–86 <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.11.008>>.

KARSTEN BECKER, et al. Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci', in Manual Og Clinical Microbiology (Washington DC, USA: ASM Press, 2019), xii, 367 <<https://doi.org/10.1128/9781683670438.MCM>>.

KIRK, Martyn et al. Foodborne Illnes, Australia. Circa 2000 and Circa 2010', Emerging Infectious Diseases, 20.11 (2014), 1857–64 <<https://doi.org/10.3201/eid2011.131315>>.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; Dowell V. R.; , H. M. 1987. Diagnóstico microbiológico. J.B. Lippincott Company. Philadelphia. p. 386

KOOHESTANI, Mobin; et al. 'Effects of Cell-Free Supernatant of Lactobacillus Acidophilus LA5 and Lactobacillus Casei 431 against Planktonic Form and Biofilm of Staphylococcus Aureus', Veterinary Research Forum, 9.4 (2018), 306 <<https://doi.org/10.30466/VRF.2018.33086>>.

KORCZ, Evelin and VARGA, László. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Techno-Functional Application in the Food Industry', Trends in Food Science and Technology, 2021, 375–84 <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>>.

Laboratorios de Referencia IDEXX, Guía Microbiológica Para Interpretar La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), June 2022 <<https://www.idexx.es/files/mic-guía-microbiológica-es.pdf>> [accessed 10 August 2022].

LAZADO, Carlo, CAIPANG, Marlowe A. AND ESTANTE, Erish G. Prospects of Host-Associated Microorganisms in Fish and Penaeids as Probiotics with Immunomodulatory Functions', Fish Shellfish Immunol, 45.1 (2015), 2–12 <<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.023>>.

LIRA DE MEDEIROS, Adja Cristina et al. Structural Characterisation and Cell Viability of a Spray Dried Probiotic Yoghurt Produced with Goats Milk and Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis (BI-07)', International Dairy Journal, 39.1 (2014), 71–77 <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.05.008>>.

LIU, Dongyou. Handbook of Foodborne Diseases, Food Microbiology Series (Boca Raton: CRC Press, 2018) <<https://doi.org/10.1201/b22030>>.

LIU, Zhengqi; et al. Characterization and Bioactivities of the Exopolysaccharide from a Probiotic Strain of Lactobacillus Plantarum WLPL04. En Journal of Dairy Science, 100.9 (2017), 6895–6905 <<https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11944>>.

LONDOÑO, N. A., TABORDA, M. T., LÓPEZ, C. A., & ACOSTA, L. V. (2015). Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos. Alimentos hoy, 23(36), 186-205. <https://acta.org.co/acta_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/356/306>

LÓPEZ GUTIERREZ, L.; BETTIN MARTINEZ, AND HÉCTOR SUÁREZ MAHECHA, Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Isolated from Meat Raw in Cartagena, Colombia. En: Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, Vol. 70, N.1 2017, p. 8091–98. Disponible en: <<https://doi.org/10.15446/RFNA.V70N1.61768>>.

LÓPEZ VÁZQUEZ, Diana Edith. "Viabilidad de Lactobacillus plantarum entrampado empleando fructanos de agave, bajo condiciones gastrointestinales simuladas." (2019).

LÓPEZ-MEZA, Joel et al. Antimicrobial Peptides: Diversity and Perspectives for Their Biomedical Application', Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies, 2011, 275–304 <<https://doi.org/10.5772/13058>>.

LOWRY, Oliver; et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: Journal Biological Chemistry. Mayo, 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-275.

LUCANA NINA, Maroley Rocío y HUANCA ESPINOZA, Reyna Mayra. Estructura Bacterina. En: Rev. Act. Clin. Med. 2014, vol.49, pp. 2589-2593. Disponible en: <http://www.revistasbolivianas.ciencia.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000001&lng=en&nrm=iso>. ISSN 2304-3768.

MAKINEN K, et al. Science and Technology for the Mastership of Probiotic Applications in Food Products', Journal of Biotechnology, 162 (2012), 356–65 <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006>>.

MANGEN, Marie-Josée et al. Cost-of-Illness and Disease Burden of Food-Related

Pathogens in the Netherlands, 2011, International Journal of Food Microbiology, 196 (2014), 84–93 <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.022>>.

LARA-FIALLOS, Marco et al. Tecnología Química. Tecnología Química, 37.2 (2017), 352–66 <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852017000200016>.

MARIA DEL RAYO SANCHEZ HERNANDEZ, 'Evaluación de Mezclas de Inulina, Maltodextrina y Goma Arábica Para La Microencapsulación de L. Casei' (Universidad de las Americas Puebla, 2010).

MARÍA JOSÉ MARTÍN AND OTHERS, 'Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects Microencapsulation of Bacteria: A Review of Different Technologies and Their Impact on the Probiotic Effects', 27 (2014), 15–25 <<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>>.

MARTÍNEZ BENAVIDEZ, et al. "Determinación de la cinética de fermentación en dos medios probióticos, pruebas de desempeño in vitro y efecto de inhibición de Lactobacillus plantarum." Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line) 10.1 (2016): 23-41.

MARTINEZ, M. y GOMEZ, C. Calidad Composicional e Higiénica de La Leche Cruda Recibida En Industrias Lácteas de Sucre, Colombia. En: Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial. Vol. 11, N.2. 2013, p. 93–100. Disponible en: <<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/309>> [accessed 18 August 2021].

MATAIX VERDÚ, Francisco José. Tratado de Nutrición y Alimentación: Situaciones Fisiológicas y Patológicas. Volumen 2, 2nd edn (Madrid: Ergon, 2009) <<http://bibliotecadigital.unevt.edu.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=2288>> [accessed 20 October 2022].

MATHUR, Shalini y SINGH, Rameshwar. Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria - a Review. En: International Journal of Food Microbiology, 105.3 (2005), 281–95 <<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2005.03.008>>.

MAY-TORRUCO, Ana Luisa; et al. Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas Probióticas Empleadas En Productos Comerciales. En European Scientific Journal ESJ, 16.18 (2020), 43–60 (p. 49) <<https://doi.org/10.19044/esj.2020.v16n18p43>>.

MENDOZA, A.; VERA, J; PEÑA, Luis Carlos. Prevalencia de Mastitis Subclínica, Microorganismos Asociados y Factores de Riesgo Identificados En Hatos de La Provincia de Pamplona, Norte de Santander', Revista de La Facultad de Medicina

Veterinaria y de Zootecnia, 64.2 (2017), 11–24
<<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v64n2.67209>>.

MERCADO, G. y GUNTER, F. Brotes Por Salmonella Spp., Staphylococcus Aureus y Listeria Monocytogenes Asociados Al Consumo de Pollo. En: Biomedica, Vol. 32, N.3 2012,p. 355–64. Disponible en:
<<https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.V32I3.697>>.

MERK, HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD Florfenicol Solid Formulation, 3.7, 2022
<[https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/ah-sds/Florfenicol Solid Formulation_AH_US_1X.pdf](https://www.merck.com/docs/product/safety-data-sheets/ah-sds/Florfenicol_Solid_Formulation_AH_US_1X.pdf)> [accessed 12 August 2022].

MESÍAS PANTOJA, Laura Nathaly AND ORBES VILLACORTE, Adriana Elisabeth, 'EVALUACIÓN in Vivo DE Lactobacillus Plantarum ATCC® 8014 Y Lactobacillus Casei ATCC® 334 CON CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS EN LA ALIMENTACIÓN DE CUYES (Cavia Porcellus) EN FASE DE LEVANTE COMO ALTERNATIVA AL USO DE ANTIBIÓTICOS' (Universidad de Nariño, 2016)
<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS - RJ/RBG/RBG_1995_v57_n1.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS-RJ/RBG/RBG_1995_v57_n1.pdf)><<https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbgfe/article/view/234295>>.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAI MADR, 'Res. 000017 de 2012.Pdf', 2012
<[https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/d.angie/Res_000017 de 2012.pdf](https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/d.angie/Res_000017_de_2012.pdf)>.

MISHRA Ambuj and ATHMASELVI K. A. Stress Tolerance and Physicochemical Properties of Encapsulation Processes for Lactobacillus Rhamnosus in Pomegranate (Punica Granatum L.) Fruit Juice', Food Science and Biotechnology 2016 25:1, 25.1 (2016), 125–29 <<https://doi.org/10.1007/S10068-016-0019-5>>.

MOHAMED, A; MOHAMED, M. y NASHWA, H. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) in Some Meat Products. En: Alexandria Journal of Veterinary Sciences. Vol. 70.N. 1 2021, p. 96–105. Disponible en:
<<https://doi.org/10.5455/ajvs.36400>>.

MONDRAGÓN PRECIADO, Guadalupe et al. Bacteriocinas: Características y Aplicación En Alimentos', Investigacion y Ciencia, 59 (2013), 64–70 (p. 32)
<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67430113008>> [accessed 30 November 2021].

MONEDERO, Vicente et al. The Phosphotransferase System of Lactobacillus Casei : Regulation of Carbon Metabolism and Connection to Cold Shock Response. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 12 (2007), 20–32
<<https://doi.org/10.1159/000096456>>.

MONTES CEBALLOS, Andrea del Roció; SANTACRUZ BERNAL, Ayda del Pilar y SAÑUDO DIAZ, Jessie Nadenka. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo con énfasis en Microbiología. Pasto-Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2003. 146 p.

MORALES-ERAZO, Laur; GONZÁLEZ-CÁRDENAS, Ivonne, and ABELLA-GAMBA, Johanna. 'Técnicas de Titulación Ácido-Base: Consideraciones Metrológicas', *Revista Colombiana de Química*, 48.1 (2019), 26–37 <<https://www.redalyc.org/articulo.oa?>> [accessed 26 August 2022].

MORA-VILLALOBOS, José Aníbal; et al. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review', *Fermentation*, 6.23 (2020), 21 <<https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>>.

MORENO, M. y ALARCÓN, A. Higiene alimentaria para la prevención de trastornos digestivos infecciosos y por toxinas. En; *Revista Médica Clínica Las Condes*, Vol. 21, N 5. 2010, p. 749–55. Disponible en: <[https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70596-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70596-4)>.

MUHAMMAD, Zafarullah et al. Integration of Polysaccharide-Thermoprotectant Formulations for Microencapsulation of *Lactobacillus Plantarum*, Appraisal of Survivability and Physico-Biochemical Properties during Storage of Spray Dried Powders', *Food Hydrocolloids*, 66 (2017), 286–285 <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040>>.

MUNERA CABAL, Gloria. ENCAPSULACIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES EN SISTEMAS NANO Y MICROESTRUCTURADOS: TÉCNICAS Y APLICACIONES EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS' (Universidad Politécnica de Valencia, 2020) <[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/148962/Munera - Encapsulación de antimicrobianos naturales en sistemas nano y microestructurados: técnic....pdf?sequence=2](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/148962/Munera_-_Encapsulaci%C3%B3n_de_antimicrobianos_naturales_en_sistemas_nano_y_microestructurados_t%C3%A9cnicas_y_aplicaciones_en_tecnolog%C3%ADa_de_alimentos.pdf?sequence=2)> [accessed 8 December 2021].

MURUA, benerranda. Evaluación de La Sobrevivencia Del Probiótico *Lactobacillus Casei* ATCC334 En Forma Libre y Microencapsulado Adicionado a Una Crema Ácida Baja En Grasa Durante Su Almacenamiento En Refrigeración y En Condiciones Simuladas Del Tracto Gastrointestinal', *Digital Ciencia*, Universidad Autónoma de Querétaro, 2016, 1–15 (p. 13) <http://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v9-n1/QUIM-2.pdf>.

NÁCHER-VÁZQUEZ, Montserrat. DEXTRANOS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES' (Universidad de Valencia, 2015) <<http://digital.csic.es/handle/10261/129967>> [accessed 3 September 2021].

NEETHU, M; CRAIG, R. y MALIK, A. Implications of antibiotic resistance in probiotics. *Journal Food Reviews International*. 31.1 (2014):52-62. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961075>

NIAMAT Ullah, XUEJIAO Wang, JIN Wu, YAN Guo, HANJING Ge, TENG YU Li, SALEEM Khan, ZHIXi Li, XIANCHAO Feng. (2017). Purification and primary characterization of a novel bacteriocin, LiN333, from *Lactobacillus casei*, an isolate from a Chinese fermented food. *LWT*, 84, 867-875.

OSCAR MASANA, M. Drivers for the Emergence of Biological Hazards in Foods', *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 47, N.1. 2015, p. 1–3. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.01.004>.

PALOMINO-CAMARGO, C et al. 'Delphi Methodology in Food Safety Management and Foodborne Disease Prevention. En: *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, Vol. 35 N. 3 2018, p. 483–90, disponible en: <https://doi.org/10.17843/RPMESP.2018.353.3086>.

PAR GRAMAJO, Meylin Gabriela. (2019). Aplicación de los métodos de conservación de alimentos. *Revista Ingeniería y Ciencia*, 1(15). <<https://core.ac.uk/download/pdf/228879718.pdf>>

PARKER Nina; et al. *Microbiology*, 1st edn (Houston, Texas: Openstax, 2019).

PAUL DE VOS AND et al. Encapsulation for Preservation of Functionality and Targeted Delivery of Bioactive Food Components', *International Dairy Journal*, 20.4 (2010), 292–302 (p. 295) <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>>.

PEREIRA, Ana Lucia; MACIEL, Tatiane and RODRIGUES, Sueli. 'Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice Fermented with *Lactobacillus Casei*', *Food Research International*, 44.5 (2011), 1276–83 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>>.

PÉREZ-RAMOS, Adrian; NÁCHER-VÁZQUEZ, Montserrat; NOTARARIGO, Sara; LÓPEZ, Paloma y MOHEDANO, Luz, 'Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides', *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*, 2016, 329–44 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00022-8>>.

PEREZ-SANCHEZ, Tania, Et al. Probiotics in Aquaculture: A Current Assessment', *Reviews in Aquaculture*, 5 (2013), 1–14 <<https://doi.org/10.1111/raq.12033>>.

PIAU, C., JEHAN, J., LECLERCQ, R., y DAUREL, C. Catalase-negative *Staphylococcus aureus* strain with point mutations in the *katA* gene. En *Journal of*

clinical microbiology. Caen, France. June, 2008, vol. 46, nro. 6, p. 2060-2061. DOI: 10.1128/JCM.02300-07

POKRANT HUERTA, Ekaterina Valerievna. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FLORFENICOL Y SU METABOLITO ACTIVO FLORFENICOL AMINA EN TEJIDOS COMESTIBLES Y PLUMAS DE POLLO BROILER MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS)' (Universidad de Chile, 2017) <<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/144994/Evaluacion-de-las-concentraciones-de-florfenicol-y-su-metabolito-activo-florfenicol-amina-en-tejidos-comestibles-y-plumas-de-pollo-broiler-mediante-cromatografia-liquida-acoplada-a-espectrometria-de-masas-%28LC-MSMS%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> [accessed 12 August 2022].

QUIRINO LACERDA, Ellen Cristina Et al. Starch, Inulin and Maltodextrin as Encapsulating Agents Affect the Quality and Stability of Jussara Pulp Microparticles', Carbohydrate Polymers, 151 (2016), 500–510 <<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2016.05.093>>.

RAI, Avishankar AND BAI, Jamuna A. Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods, Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods, 2014 <<https://doi.org/10.1201/b17912>>.

RAJAM AND C. ANANDHARAMAKRISHNAN, 'Microencapsulation of Lactobacillus Plantarum (MTCC 5422) with Fructooligosaccharide as Wall Material by Spray Drying', Lwt, 60.2 (2015), 773–80 <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>>.

RAJKOVIC, A; SMIGIC Nada, and DEVLIEGHIERE Frank, 'Contemporary Strategies in Combating Microbial Contamination in Food Chain', International Journal of Food Microbiology, 141 Suppl.SUPPL. (2010) <<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2009.12.019>>.

RAJOKA, M. S. R; MEHWISH, H. M; HAYAT, H. F; HUSSAIN, N; SARWAR, S; ASLAM, H; NADEEM, A y SHI, J. (2019). Characterization, the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Exopolysaccharide Isolated from Poultry Origin Lactobacilli. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 11(4), 1132–1142. DOI: 10.1007/S12602-018-9494-8

RAMÍREZ RAMÍREZ, José et al. Bacterias Lácticas Importancia en alimentos y efectos en la salud. En: Revista Fuente. Abril-Junio, 2011. vol. 2, no. 7. p. 1-16.

RAMÍREZ, N. F. et al. Herd- and Cow-Level Risk Factors Associated with Subclinical Mastitis in Dairy Farms from the High Plains of the Northern Antioquia, Colombia', Journal of Dairy Science, 97.7 (2014), 4141–50 <<https://doi.org/10.3168/JDS.2013-6815>>.

RANDER A.; RUÍZ-PÉREZ, N.; Menco-MORALES, M. y LINDA M. Chams-Chams, 'Microbiological Evaluation of Artisan Coastal Cheese and Hygieniclocative Evaluation of Small Shops in Córdoba, Colombia. En: Revista de Salud Publica, Vol. 19, N.3 2017, p. 311–17. Disponible en: <<https://doi.org/10.15446/RSAP.V19N3.54853>>.

RAYNER C. and MUNCKHOF W. J., 'Antibiotics Currently Used in the Treatment of Infections Caused by Staphylococcus Aureus', Internal Medicine Journal, 35.SUPPL. 2 (2005), 3–16 <<https://doi.org/10.1111/J.1444-0903.2005.00976.X>>.

REBECCA H. SCHULTE and MUNSON, Erick. Staphylococcus Aureus Resistance Patterns in Wisconsin: 2018 Surveillance of Wisconsin Organisms for Trends in Antimicrobial Resistance and Epidemiology (SWOTARE) Program Report', Clinical Medicine & Research, 17.3–4 (2019), 72–81 <<https://doi.org/10.3121/CMR.2019.1503>>.

REN-YOU Gan, et al. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus Aureus', Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | Www.Frontiersin.Org, 10 (2020), 107 <<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>>.

RIOS-AGUIRRE, sara AND GIL-GARZÓN, Maritza Andrea. Microencapsulación Por Secado Por Aspersión de Compuestos Bioactivos En Diversas Matrices: Una Revisión', Tecnológicas, 24.51 (2021), e1836 <<https://doi.org/10.22430/22565337.1836>>.

ROBERT M KENT AND SINÉAD B DOHERTY, 'Probiotic Bacteria in Infant Formula and Follow-up Formula: Microencapsulation Using Milk and Pea Proteins to Improve Microbiological Quality', FRIN, 64 (2014), 567–76 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.029>>.

RODRIGUES, F. J. et al. Encapsulated Probiotic Cells: Relevant Techniques, Natural Sources as Encapsulating Materials and Food Applications – A Narrative Review', Food Research International, 137 (2020), 109682 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>>.

RODRÍGUEZ, Patricia y ARENAS, Roberto. Hans Christian Gram y su tinción. En: Revista Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. Ciudad de Mexico: Hospital General Manuel Gea González, abril-junio de 2018. vol. 16, nro. 2. p. 166-167. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>

RODRÍGUEZ, Yeimy Alejandra; ROJAS, Andrés Felipe and RODRÍGUEZ, Sneyder. ENCAPSULACIÓN DE PROBIÓTICOS PARA APLICACIONES ALIMENTICIAS', Revista Biosalud, 15.2 (2016) <<https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>>.

ROJAS ARMOA, Jissel Mariana . Produccion de Exopolisacaridos a Partir de Bacterias Ácido Lácticas Utilizando Tusa de Maíz Como Fuente de Carbono (Universidad Nacional de Asunción, 2020) <https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/BECA02-38_Jissel_Armoa.pdf> [accessed 9 August 2022].

ROLDÁN, María Liliana et al. Efecto Inhibidor de Lactobacillus Casei 206/1 Contra Escherichia Coli O157:H7', Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología, 31.1 (2011), 37–41 <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es> [accessed 1 December 2021].

ROMINA ROSS, Gloria y GUZMAN, R. Fatty Acid Profile of Pig Meat after Probiotic Administration. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 60, N.23 2012,p. 5974–78. Disponible en: <<https://doi.org/10.1021/jf205360h>>.

RONDON, Lisett; et al. Probióticos: Generalidades', Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría, 78.4 (2015), 123–28 <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=367945817006>> [accessed 30 August 2021].

ROSALES-BRAVO, et al. Evaluación de Propiedades Tecno-Funcionales de Cepas Probióticas Comerciales Del Género Lactobacillus', RIIIT. Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica, 8.45 (2020) <https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-97532020000400001> [accessed 24 August 2022].

RÜHMKORF, Christine. Identification of Lactobacillus Curvatus TMW 1.624 Dextranucrase and Comparative Characterization with Lactobacillus Reuteri TMW 1.106 and Lactobacillus Animalis TMW 1.971 Dextranucrases', Food Microbiology, 34.1 (2013), 52–61 <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.002>>.

RUIZ, M. y FERNANDEZ, C. Efecto Inhibitorio de Lactobacillus Spp. Sobre Bacterias Implicadas En Enfermedades Transmitidas Por Alimentos', Revista Argentina Microbiologia. Vol. 49, N. 2. 2017, p. 174–77. Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>>.

RUSSO, Pasquale et al. Probiotic Lactic Acid Bacteria for the Production of Multifunctional Fresh-Cut Cantaloupe. Food Research International, 77 (2015), 762–72 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.033>>.

RYAN P. M. et al. Sugar-Coated: Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria for Food and Human Health Applications', Food & Function, 6.3 (2015), 679–93 <<https://doi.org/10.1039/C4FO00529E>>.

SÁNCHEZ MIRANDA Lilian and PEÑA RODRÍGUEZ, Joan. Actividad Antimicrobiana de Cepas de *Lactobacillus* Spp. Contra Patógenos Causantes de Mastitis Bovina Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Spp. Strains against Pathogens Causing Bovine Mastitis', *Rev. Salud Anim*, 38.2 (2016), 85–92.

SÁNCHEZ, Lilian; et al. Cepas de *Lactobacillus* Spp. Con Capacidades Probióticas Aisladas Del Tracto Intestinal de Terneros Neonatos. En *Rev. Salud Animal*, 37.2 (2015), 94–104 <<http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v37n2/rsa04215.pdf>> [accessed 11 August 2022].

SANDERS, M. E. et al. Probiotics for Human Use', *Nutrition Bulletin*, 43.3 (2018), 212–25 <<https://doi.org/10.1111/NBU.12334>>.

SANDRA V AVILA-REYES AND OTHERS, 'Protection of *L. Rhamnosus* by Spray-Drying Using Two Prebiotics Colloids to Enhance the Viability', *Carbohydrate Polymers*, 102 (2014), 423–30 <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>>.

SETTANNI, Luca; et al. The Role of Environmental Factors and Medium Composition on Bacteriocin-like Inhibitory Substances (BLIS) Production by *Enterococcus Mundtii* Strains', *Food Microbiology*, 25.5 (2008), 722–28 <<https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.01.011>>.

SGOURAS, Dionyssios N, et al. Pathogenesis of *Helicobacter Pylori* Infection', John Wiley & Sons Ltd, 2015 <<https://doi.org/10.1111/hel.12251>>.

SIERRE AMES, Paola Lisette and GUILLEN SULLCA, Jenny Margoth. EVALUACION DE LA VIABILIDAD DEL *Lactobacillus* Spp. ENCAPSULADO EN MALTODEXTRINA COMO PROBIÓTICO EN EL JUGO DE AGUAYMANTO' (Universidad Nacional del Centro del Perú, 2017) <<http://hdl.handle.net/20.500.12894/1591>> [accessed 5 September 2021].

SINSAJOA TEPUD, Mehili Dayana and NARVÁEZ RODRÍGUEZ, Mónica Lorena. EFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD PROBIÓTICA DE *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN *Escherichia Coli* O157:H7 ATCC 43888' (Universidad de Nariño, 2019).

SINSAJOA-TEPUD, Mehili; JURADO-GAMEZ, Henry y NARVÁEZ-RODRÍGUEZ, Monica. Evaluación de *Lactobacillus Plantarum* Microencapsulado y Su Viabilidad Bajo Condiciones Gastrointestinales Simuladas e Inhibición Frente a *Escherichia Coli* O157:H7', *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 66.3 (2019), 231–44 (p. 242) <<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v66n3.84260>>.

SORNPLANG, Pairat AND PIYADEATSOONTORN, Sudthidol. Probiotic Isolates from Unconventional Sources: A Review', Journal of Animal Science and Technology, 58.1 (2016) <<https://doi.org/10.1186/S40781-016-0108-2>>.

STEWART, G C. Chapter 18 - Staphylococcal Food Poisoning. Foodborne Diseases, 2017, 367–80 <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00018-8>>.

SVETOSLAV, D.; TODOROV Y LEON, M.T. Dicks, 'Effect of Modified MRS Medium on Production and Purification of Antimicrobial Peptide ST4SA Produced by Enterococcus Mundtii', Anaerobe, 15.3 (2009), 65–73 <<https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2008.11.002>>.

TAGG, J y MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. En: Applied Microbiology. Mayo, 1971.

TAYYBA GHAFAR, et al. Recent Trends in Lactic Acid Biotechnology: A Brief Review on Production to Purification', Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 7.2 (2014), 222–29 <<https://doi.org/10.1016/J.JRRAS.2014.03.002>>.

THATOI, Hrudayanath et al. Microbial Fermentation and Enzyme Technology, Microbial Fermentation and Enzyme Technology (CRC Press, 2020) <<https://doi.org/10.1201/9780429061257>>.

THOMAS, Kate et al. Estimates of the Burden of Foodborne Illness in Canada for 30 Specified Pathogens and Unspecified Agents, Circa 2006', Foodborne Oathogens and Disease, 10.7 (2013) <<https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1389>>.

TONG HU AND OTHERS, 'Genome Analysis and Physiological Characterization of Four Streptococcus Thermophilus Strains Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk', Frontiers in Microbiology, 11 (2020), 184 <<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.00184/BIBTEX>>.

TORINO, MARÍA INÉS; FONT DE VALDEZ, GRACIELA, AND MOZZI FERNANDA, 'Biopolymers from Lactic Acid Bacteria. Novel Applications in Foods and Beverages', Frontiers in Microbiology, 6 (2015), 834 <<https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.00834/BIBTEX>>.

TUFARELLI, Vincenzo and LAUDADIO, Vito. AN OVERVIEW ON THE FUNCTIONAL FOOD CONCEPT: PROSPECTIVES AND APPLIED RESEARCHES IN PROBIOTICS, PREBIOTICS AND SYNBIOTICS. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 4.3 (2016) <[https://doi.org/10.18006/2016.4\(3S\).273.278](https://doi.org/10.18006/2016.4(3S).273.278)>.

UBUKATA, K; TAKATA, M; MOROZUMI, M; CHIBA, N; WAJIMA, T y HANADA, S. Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group. (2018). Effects of

pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010–2017. *Emerging infectious diseases*, 24(11), 2010.

UNOVÁ Gabriela et al. In Vitro Fermentability of Prebiotic Oligosaccharides by *Lactobacilli*, *Czech J. Food Sci*, 29 (2011), 49–54.

VALERO-CASES, Estefanía and FRUTOS, María José. Effect of Different Types of Encapsulation on the Survival of *Lactobacillus Plantarum* during Storage with Inulin and In Vitro Digestion', *Food Science and Technology*, 64 (2015), 824–28 <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049>>.

VALLEJO; et al. Efecto de Las Condiciones de Crecimiento y Composición Del Medio de Cultivo Sobre La Producción de Bacteriocina de *Enterococcus Mundtii* Tw56 Effect of Growth Conditions and Culture Medium Composition on Bacteriocin Production by *Enterococcus Mundtii* Tw56, *Rev. Colomb. Biotecnol*, 2014, xvi.

VÁSQUEZ, Sandra Milena; SUÁREZ, M, Héctor and ZAPATA Sandra. UTILIZACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA CARNE', *Rev Chil Nutr*, 36.1 (2009), 64–71 <<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182009000100007>>

VERA MEJÍA Ronald et al. Obtención de Un Candidato a Probiótico de *Lactobacillus Plantarum* 22 LMC a Partir de Un Medio de Cultivo Natural Con Materias Primas Agroindustriales', *Revista de Salud Animal*, 43.3 (2021) <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2021000300003&script=sci_arttext&lng=en> [accessed 21 August 2022].

VERONICA SEIJA, 'Temas de Bacteriología y Virología Medica', in *Temas de Bacteriología y Virología Medica*, 2012, pp. 257–72.

VESTERGAARD Martin, et al. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem', *Microbiology Spectrum*, 7.2 (2019) <<https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0057-2018>>.

WALSH, Aaron M et al. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir', *MSystems*, 1.5 (2016) <<https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00052-16>>.

WANG, Weiwei, et al. Effects of Microencapsulated *Lactobacillus Plantarum* and on Growth Performance, Blood Immune Parameters, and Intestinal Morphology in Weaned Piglets', *Food and Agricultural Immunology*, 29.1 (2017), 84–94 <<https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1360254>>.

WEI HONG MIN AND OTHERS, 'Characterization and Antioxidant Activity of an Acidic Exopolysaccharide from *Lactobacillus Plantarum* JLAU103', *Journal of*

Bioscience and Bioengineering, 127.6 (2019), 758–66
<<https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2018.12.004>>.

WEI, C. F. et al. Synergism between Two Amphenicol of Antibiotics, Florfenicol and Thiamphenicol, against Staphylococcus Aureus', The Veterinary Record, 178.13 (2016), 319 <<https://doi.org/10.1136/VR.103554>>.

WONG-VILLARREAL, A.; CORZO-GONZÁLEZ, H.; HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E.; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, A.; GIACOMÁN-VALLEJOS, G. Caracterización de bacterias ácido lácticas con actividad antimicrobiana aisladas del queso crema de Chiapas, México. CienciaUAT, 2021, Vol. 15 n 2, p. 144-155.

XIANG, Ge Yang; QIAN, He and ZHANG, Wei Guo. Enhancement of L-Lactic Acid Production in Lactobacillus Casei from Jerusalem Artichoke Tubers by Kinetic Optimization and Citrate Metabolism', J Microbiol Biotechnol, 20.1 (2010), 101–9 <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.049>>.

XU, Xiaoqing et al. Antibacterial Potential of a Novel Lactobacillus Casei Strain Isolated from Chinese Northeast Sauerkraut and the Antibiofilm Activity of Its Exopolysaccharides', Food & Function, 11.5 (2020), 4697–4706 <<https://doi.org/10.1039/D0FO00905A>>.

YOHA K. S.; MOSES, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of Encapsulation Methods on the Physicochemical Properties and the Stability of Lactobacillus Plantarum (NCIM 2083) in Synbiotic Powders and in-Vitro Digestion Conditions', Journal of Food Engineering, 283 (2020), 110033 <<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110033>>.

ZAHRA SHOKRI et al. Factors Affecting Viability of Bifidobacterium Bifidum during Spray Drying', DARU Journal Of Pharmaceutical Sciences, 23.7 (2015).

ZAMBRANO-MORA, Edward Johnny y JURADO-GÁMEZ, Henry. Efecto de Lactobacillus Casei Microencapsulado Sobre La Salud Intestinal y Parámetros Bioquímicos y Productivos En Pollo de Engorde TT - Effect of Microencapsulated Lactobacillus Casei on Intestinal Health and on Biochemical and Productive Parameters In', Rev. Udca Actual. Divulg. Cient, 23.2 (2020), e1480–e1480 <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&apd=S0123-42262020000200017>.

ZAMUDIO MALPARTIDA, Karen Lucia, 'Lactobacilos Nativos Productores de Exopolisacáridos de Interés Biotecnológico' (Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2005) <<https://hdl.handle.net/20.500.12672/1277>>.

ZHANG, Hui lin et al. Susceptibility Breakpoint for Cefquinome against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* from Pigs', *Journal of Integrative Agriculture*, 20.7 (2021), 1921–32 <[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63572-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63572-9)>.

ANEXOS

ANEXO A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™

- En cámara de flujo laminar tipo II, junto al mechero, y después de dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre temperatura ambiente, abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
- Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocar en la placa del cultivo principal el registro de control de calidad.
- Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el líquido hidratante.
- Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Dejar que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.
- Apretar en la parte inferior de la unidad, triturando el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
- De Inmediato, saturar bien el hisopo en el material hidratado y transferir a las cajas Petri con el agar nutritivo.
- Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
- Utilizando un asa estéril, crear vetas para facilitar el aislamiento de colonias.
- De Inmediato, llevar a incubar las cajas Petri con el cultivo principal inoculado a 37°C por 24 horas.

ANEXO B. Preparación de caldo BHI

- Suspender 37 gramos del medio en un litro de agua destilada en un Erlenmeyer.
- Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente.
- Hervir durante un minuto hasta disolver por completo.
- Dispensar en tubos de ensayo o recipientes de vidrio y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- El medio preparado debe almacenarse a -4 °C.
- Esterilizar por 10 minutos en cámara de flujo laminar y esperar 30 minutos para su uso.
- Para obtener mejores resultados el medio debe usarse el mismo día.

Preparación de agar BHI

- Suspender 52 gramos del medio en un litro de agua destilada en un Erlenmeyer. (Erlenmeyer de 500 mL para evitar solidificación).
- Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente.
- Hervir durante un minuto hasta disolver por completo.
- Sellar la boca del Erlenmeyer con papel aluminio.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Dejar reposar.
- Dispensar en cajas Petri estériles, aproximadamente 20 mL por caja.
- Esterilizar por 10 minutos en cámara de flujo laminar y esperar 30 minutos para su uso.

ANEXO C. Preparación de caldo MRS

- Suspender 52,25 gramos del medio en un litro de agua destilada en un Erlenmeyer.
- Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente.
- Hervir durante un minuto hasta disolver por completo.
- Dispensar en tubos de ensayo o recipientes de vidrio y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- El medio preparado debe almacenarse a -4 °C.
- Esterilizar por 10 minutos en cámara de flujo laminar y esperar 30 minutos para su uso.
- Para obtener mejores resultados el medio debe usarse el mismo día.

Preparación de agar MRS

- Suspender 68,25 g del medio en 1 litro de agua destilada en un Erlenmeyer. (Erlenmeyer de 500 mL).
- Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente.
- Hervir durante un minuto hasta disolver por completo.
- Sellar la boca del Erlenmeyer con papel aluminio.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- Dejar reposar hasta 40 °C.
- Dispensar en cajas Petri estériles, aproximadamente 20 mL por caja.
- Esterilizar por 10 minutos en cámara de flujo laminar y esperar 30 minutos para su uso.

ANEXO D. Cultivo de inóculo de cepas

El cultivo y ajuste de inóculo se realiza antes de iniciar una prueba con el fin de conocer la concentración bacteriana para obtener mejores resultados. Este proceso se realiza para bacterias patógenas y bacterias lácticas.

- Se debe preparar medio de cultivo, caldo BHI o MRS según corresponda y distribuir por duplicado en recipientes de vidrio de la siguiente manera:

Recipiente	Cantidad mL
1	40
2	40
3	90

- Rotular debidamente los recipientes (numero, medio de cultivo, bacteria, fecha).
- Seleccionar los cultivos en conservación y tomar 4 asadas del cultivo en medio solido o 4 mL del cultivo en medio líquido.
- Inocular en los recipientes rotulados con el número 1 correspondiente a 40 mL de caldo MRS o BHI.
- Cubrir la boca del recipiente con papel aluminio, sellar con cinta y forrar todo el recipiente con vinipel.
- Agitar cuidadosamente durante 30 segundos aproximadamente.
- Llevar a incubar a 37°C por 24 horas.
- Transcurridas 24 horas inocular 4 mL del recipiente 1 en los recipientes rotulados con el número 2 correspondiente a 40 mL de caldo MRS o BHI.
- Cubrir la boca del recipiente con papel aluminio, sellar con cinta y forrar todo el recipiente con vinipel.
- Agitar cuidadosamente durante 30 segundos aproximadamente.
- Llevar a incubar a 37°C por 24 horas.
- Transcurridas 24 horas inocular 9 mL del recipiente 2 en los recipientes rotulados con el número 3 correspondiente a 90 mL de caldo MRS o BHI.

- Cubrir la boca del recipiente con papel aluminio, sellar con cinta y forrar todo el recipiente con vinipel.
- Agitar cuidadosamente durante 30 segundos aproximadamente.
- Llevar a incubar a 37°C por 24 horas.
- Transcurridas 24 horas se estima la concentración bacteriana mediante espectrofotómetro como se indica en el Anexo E.
- Finalmente se ajusta según a la escala de McFarland adicionando caldo.

ANEXO E. Estimación de concentración bacteriana mediante espectrofotómetro

- Se estima la concentración bacteriana midiendo Densidad Óptica (D.O.) con espectrofotómetro bajo longitud de onda de máxima absorción correspondiente a 540 nm.
- Ajustar blanco con 3 mL del medio donde se encuentren las bacterias en suspensión (Agua peptonada, caldo MRS o caldo BHI).
- Adicionar 3 mL de la muestra a la celdilla y leer.
- Finalmente, la lectura se compara con la escala de McFarland.

ANEXO F. Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos

- ANTIBIOTIC DISC son discos de papel, con características especiales, impregnadas con antibiótico, utilizados para el test de susceptibilidad según el test de antibióticos de Kirby –Bauer. Los ANTIBIOTIC DISC están previstos en una ancha variedad de configuraciones, para este caso disponible en la variante de 50 test.
- La variante de 50 test contiene: 1 cartucho con 50 discos empaquetado en un “blíster” en presencia de un desecador.
- Los discos se aplican en la superficie de cultivo inoculado con el ajuste del inóculo preparado con colonias puras del microorganismo en examen.
- Después de la incubación, se examinan las placas, se miden los halos de inhibición alrededor de cada disco y se comparan con los diámetros de los halos de inhibición estándar: de esta manera los microorganismos se definen sensibles, intermedios o resistentes a los agentes antimicrobianos testados.
- Antibióticos sigla y cantidad:

Antibiótico	Sigla	Cantidad
Gentamicina	CN	10 µg
Florfenicol	FFC	30 µg
Amoxicilina	AMC	30 µg
Tetraciclina	TE	30 µg
Cefquinona	CEQ	30 µg
Dexociclina	D	30 µg
Ceftazidina	CAX	30 µg
Penicilina	PEN	10 µg

ANEXO G. Ensayos de inhibición *in vitro*

Discos de agar impregnados:

Previo a la realización de la prueba se inocula y verifica la pureza de la bacteria a utilizar.

- Se realiza el proceso de cultivo de inóculo de *L. casei* ATCC 334 según lo indica el anexo D.
- Se estima la carga bacteriana (Anexo E) y se ajusta de inóculo según la escala McFarland a una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, correspondiente al 5 en la escala de McFarland.
- Posteriormente se inocula en cajas Petri con agar MRS y azul de anilina, a concentraciones de 50 μ L, 75 μ L y 100 μ L y se lleva a incubar por 24 horas a 37°C.
- Se realiza el cultivo de inóculo de *S. aureus* ATCC BAA 1708 (anexo D), ajustar la bacteria patógena al patrón McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e inocular en cajas Petri con agar Mueller Hinton.
- De las muestras de *L. casei* ATCC 334 inoculadas a diferentes concentraciones se procede a formar discos de agar con puntas de 1 mL invertidas.
- Se toma con un asa de ojo estéril los discos de agar impregnados con *L. casei* ATCC 334 y se colocan en el agar Mueller Hinton previamente impregnado con la bacteria patógena.
- El disco de agar impregnado se ubica de forma en que la biomasa de la BAL entre en contacto con la superficie del agar Mueller Hinton.
- Se lleva las cajas de Petri sembradas con la bacteria patógena y los discos de agar impregnados con la bacteria láctica a incubar a 37°C por 12 horas
- Trascurridas las 12 horas se procede a medir los halos formados. La distancia se midió desde el borde de la bacteria láctica hasta el borde o extremos del halo.
- Un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena.

Obtención de sobrenadante de *Lactobacillus casei* ATCC 334.

A partir de la bacteria láctica en estudio, se procede a realizar la obtención del sobrenadante de la siguiente manera;

- Se realiza el proceso de cultivo de inóculo según lo indica el anexo D.
- Se estima la carga bacteriana (Anexo E) y se ajusta de inóculo según la escala McFarland a una concentración de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL, correspondiente al 5 en la escala de McFarland.
- A partir de la bacteria láctica previamente sembrada y ajustada, tomar 1,5 mL de la muestra y depositar en tubos eppendorf de 2 mL.
- Llevar las muestras a centrifugar en una criocentrífuga con una temperatura controlada de 4°C, y velocidad de 13.500 rpm por 15 minutos.
- Después de este procedimiento la bacteria láctica se separa en dos fases la primera con el sobrenadante y la segunda el precipitado (biomasa de la bacteria láctica).

Se procede inmediatamente tomar una muestra cruda del sobrenadante, es decir sin filtrarlo, y otras se procedieron a filtrarlas de la siguiente manera:

- Con una jeringa de 5 mL, se extrae el sobrenadante y se procede a filtrar la muestra usando membranas de 0,2 µL en tubos eppendorf previamente estériles.
- Una vez filtrado los sobrenadantes se neutralizan a pH 6,0 para eliminar el efecto de los ácidos, otra muestra se somete a calentamiento a 80°C por 10 minutos para eliminar el efecto enzimático y finalmente una muestra que se neutraliza y se llevó a 80°C.
- Para las muestras sin filtrar se tomó el mismo número de ejemplares y se les hizo el mismo tratamiento.

Método de difusión en cilindro plástico

- Este método consiste en realizar una serie de pozos o hendiduras con la bacteria patógena ajustada al patrón 0.5 McFarland y sembrada en cajas Petri con agar Mueller Hinton, empleando un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro.

- En las cajas Petri preparadas con agar Mueller Hinton se realizaron 2 pozos empleándose una punta estéril para micropipeta.
- El número de pozos depende del halo de inhibición esperado.
- La base de cada pozo se sella con 0,1 mL (100 μ L) de agar nutritivo derretido.
- En seguida se procede a depositar sobre estos cilindros plásticos diferentes cantidades del sobrenadante a razón de 80 μ L, 100 μ L y 120 μ L de las muestras filtradas y sin filtrar con los tratamientos ya mencionados.
- Finalmente, y sin invertir las cajas se dejaron incubar por 12 horas a 37°C para realizar la lectura, la cual se basa por el tamaño del halo de inhibición formado.

Método de difusión en cilindro plástico doble capa

- Este método consiste en realizar una serie de pozos o hendiduras con la bacteria patógena ajustada al patrón 0.5 McFarland y sembrada en cajas Petri con agar Mueller Hinton, empleando un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro.
- En cajas preparadas con agar Mueller Hinton se realizaron 2 pozos empleándose la boca de una punta estéril de 8 mm de diámetro.
- En la base de cada pozo se selló con 0,1mL (100 μ L) de agar nutritivo derretido.
- En seguida se procede a depositar sobre estos cilindros plásticos diferentes cantidades del sobrenadante a razón de 80 μ L, 100 μ L y 120 μ L de las muestras filtradas y sin filtrar con los tratamientos ya mencionados.
- Se vertió agar nutritivo derretido en los cilindros plásticos con el sobrenadante, formándose una doble capa
- Aparte se ajustó la bacteria patógena a escala 0,5 McFarland, y se inculó en la caja Petri .
- Las cajas se llevaron a incubar 37°C por 12 horas, tiempo transcurrido donde se midió el halo formado en milímetros.

Método pads impregnados

- Cortar una serie de sensidiscos (sacabocado), su diámetro depende de la concentración de sobrenadante a adicionar.
- Impregnar con las muestras filtradas y sin filtrar con los tratamientos ya mencionadas en las concentraciones de 80 μ L, 100 μ L y 120 μ L.
- La bacteria patógena se debe ajustar al patrón 0.5 McFarland y sembrada en cajas Petri con agar Mueller Hinton.
- Los sensidiscos impregnados se dejan reposar por unos minutos y se colocan con ayuda de pinzas o asa de ojo sobre el cultivo de bacteria patógena.
- Las cajas se llevaron a incubar 37°C por 12 horas, tiempo transcurrido donde se midió el halo formado en milímetros.

ANEXO H. Determinación de proteínas por el método de Lowry

Reactivos:

- Reactivo A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 M (pesar 2 g de carbonato y adicionar 0,4 g de hidróxido de sodio y diluir a 100 mL con agua destilada)
- Reactivo B1: $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% (1 g en 100 mL de agua destilada).
- Reactivo B2: tartrato sódico-potásico al 2% (2 g en 100 mL de agua).
- Reactivo C (reactivo de Lowry): se prepara mezclando los reactivos: A, B1 y B2 en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu de fenol: reactivo comercial diluido 1:4 en agua, 10 mL de reactivo comercial y 40 mL de agua destilada.
- Solución patrón de seroalbúmina bovina: Disolver 15 mg en 50 mL de agua destilada, almacenar en refrigeración (concentración final 0,3 mg/L).
- Muestra problema.

Procedimiento:

- Extracción de proteínas: tomar 5 mL de la muestra de suspensión celular y adicionar 5 mL de NaOH 1N, agitar y llevar a baño maría a 100 °C por 5 minutos. Luego tomar 1 mL y realizar el análisis. El factor de dilución corresponde a 2, por lo tanto, el resultado se multiplica por 2.
- Tomar 1 mL de la muestra y añadirlo a un tubo.
- Añadir 5 mL de reactivo de Lowry y agitar vigorosamente durante 30 segundos en vórtex.
- Esperar 10 minutos.
- Añadir 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu de fenol mientras se agita la muestra.
- Proteger las muestras de la luz durante 30 minutos.
- Medir la absorbancia a 740 nm empleando como blanco una muestra con agua destilada a la que se aplicó el mismo procedimiento que a las muestras.

Para la determinación de proteínas se construye una curva estándar:

- La curva estándar se determina usando un patrón de sero albuminabovina.
- Disolver 15 mg en 50 mL de agua destilada que se diluye para obtener concentraciones hasta 0,3 mg/L.
- Para calcular la cantidad de solución estándar (SE) y agua destilada (A) en cada tiempo se debe dividir la cantidad total de solución estándar y agua (1 mL) entre el número de tiempos y así ubicarlos en orden ascendente para la solución estándar y descendente para el agua destilada. Como se indica en la siguiente tabla.

Ejemplo: curva patrón proteínas medio PRO

1 mL de SE/8 tiempos = 0,125 mL.

Tiempo	Hora	Solución Estándar (SE) mL	Agua (A) mL	SE + A
0	00:00	0,000	1,000	1
1	3:00	0,125	0,875	1
2	6:00	0,250	0,750	1
3	9:00	0,375	0,625	1
4	12:00	0,500	0,500	1
5	15:00	0,625	0,375	1
6	18:00	0,750	0,250	1
7	21:00	0,875	0,125	1
8	24:00	1,000	0,000	1

Ejemplo: curva patrón proteínas medio MRS

1 mL de SE/12 tiempos = 0,084 mL

Tiempo	Hora	Solución Estándar (SE) mL	Agua (A) mL	SE + A
0	00:00	0,000	1,000	1
1	2:00	0,084	0,924	1
2	4:00	0,168	0,840	1
3	6:00	0,252	0,756	1
4	8:00	0,336	0,672	1
5	10:00	0,420	0,588	1
6	12:00	0,504	0,504	1
7	14:00	0,588	0,420	1
8	16:00	0,672	0,336	1
9	18:00	0,756	0,252	1
10	20:00	0,840	0,168	1
11	22:00	0,924	0,084	1
12	24:00	1,000	0,000	1

- El tiempo cero (0), que solo contiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste de espectrofotometría a cero de absorbancia
- Se aplica regresión lineal donde se representa la función exponencial de los valores de absorbancia obtenidos frente a la concentración de proteína en mg/L.

Se parte del siguiente calculo:

$$0,15 \text{ g} / 50 \text{ mL} = 0,003 \text{ g/mL}$$

$$(0,003 \text{ g/mL} \times 5 \text{ mL}) / 50 \text{ mL} = 0,0003 \text{ g/mL (Concentración 1).}$$

$$0,0003 \text{ g/mL} \times (1000 \text{ mg/1g}) \times (1000 \text{ mL/ 1 L}) = 300 \text{ mg/L}$$

Una vez encontrada la concentración 1, se pasa a encontrar las concentraciones de cada tiempo, con la siguiente ecuación.

$$\text{Volumen 1} \times \text{Concentración 1} = \text{Volumen 2} \times \text{Concentración 2}$$

Medio PRO

$$\begin{aligned}0,125 \text{ mL (SE)} \times 0,0003 \text{ g/mL (C1)} &= 1 \text{ mL (SE+A)} \times C2 \\C2 &= (0,125 \text{ mL} \times 0,0003 \text{ g/mL}) / 1 \text{ mL} \\C2 &= 0,0000375 \text{ g/mL} \\C2 &= 0,0000375 \text{ g/mL} \times (1000 \text{ mg/1g}) \times (1000 \text{ mL/1L}) \\C2 &= 37,5 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

Medio MRS

$$\begin{aligned}0,084 \text{ mL (SE)} \times 0,0003 \text{ g/mL (C1)} &= 1 \text{ mL (SE+A)} \times C2 \\C2 &= (0,084 \text{ mL} \times 0,0003 \text{ g/mL}) / 1 \text{ mL} \\C2 &= 0,0000 \text{ g/mL} \\C2 &= 0,0000375 \text{ g/mL} \times (1000 \text{ mg/1g}) \times (1000 \text{ mL/1L}) \\C2 &= 37,5 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

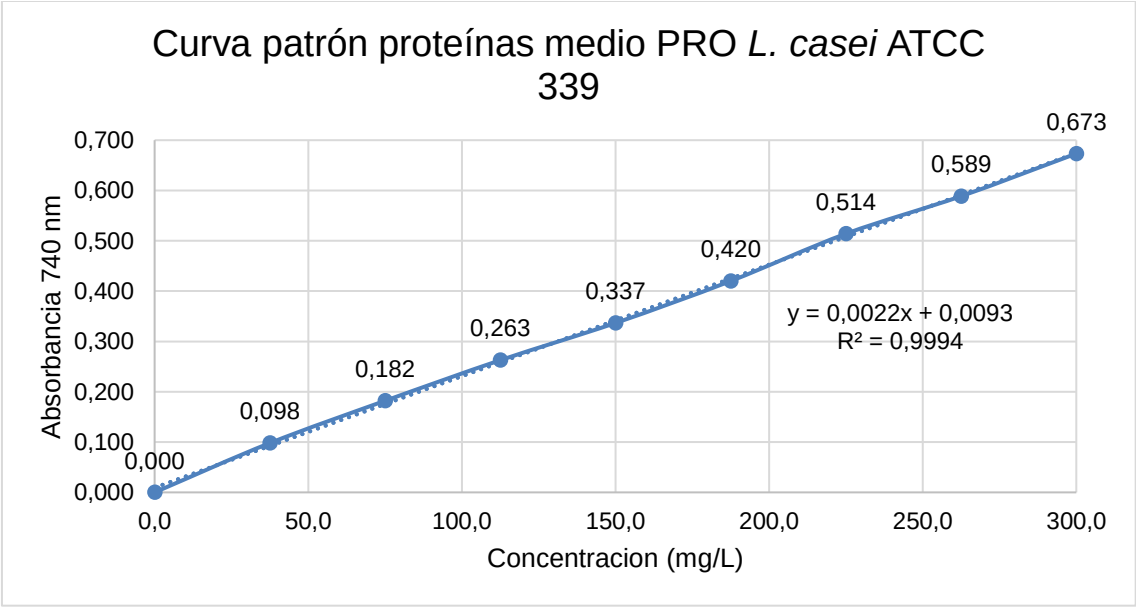
Este procedimiento se repite para todos los tiempos de la tabla para encontrar la concentración 2, que permite junto con las absorbancias obtenidas realizar la curva patrón y obtener posteriormente la ecuación de la recta

$$Y = mx + b$$

Ejemplo: curva patrón proteínas medio PRO

Tiempo	Concentración mg/L	Absorbancia 740 nm
0	0,0	0,000
1	37,5	0,098
2	75,0	0,182
3	112,5	0,263
4	150,0	0,337
5	187,5	0,420
6	225,0	0,514
7	262,5	0,589
8	300,0	0,673

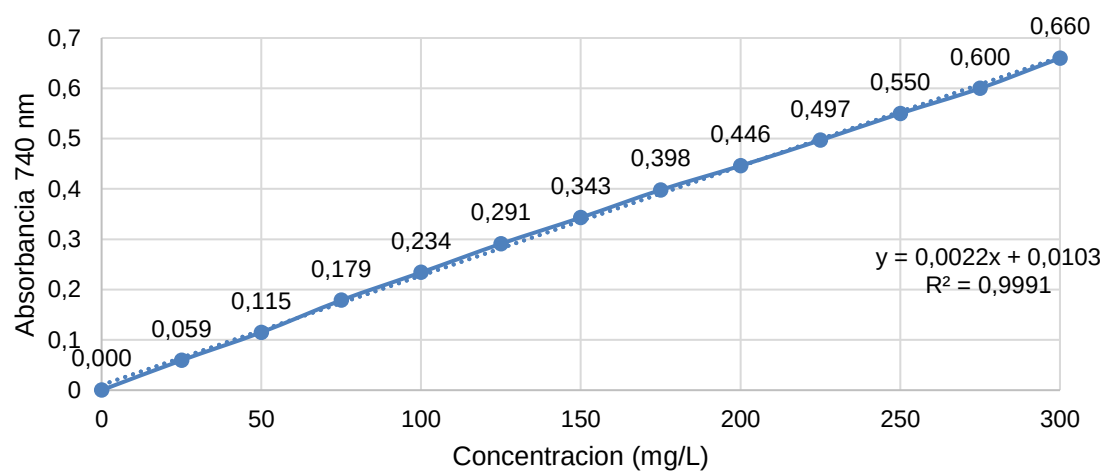
Posteriormente se debe ingresar a Microsoft Excel la tabla anterior y graficar la ecuación de la recta para obtener la curva patrón y el valor de R² debe aproximarse a 1.



Ejemplo: curva patrón proteínas medio MRS

Tiempo	Concentración mg/L	Absorbancia 740 nm
0	0,0	0,0
1	25,2	0,059
2	50,4	0,115
3	75,6	0,179
4	100,8	0,234
5	126,0	0,291
6	151,2	0,343
7	176,4	0,398
8	201,6	0,446
9	226,8	0,497
10	252,0	0,550
11	277,2	0,600
12	300,0	0,660

Curva patron proteinas medio MRS L. casei ATCC
339



Determinación de la producción de proteínas Curva Producción de proteínas

Para esta determinación se debe hallar la concentración mg/L de cada tiempo, despejando la ecuación R^2 que se obtuvo en el anterior procedimiento. De la siguiente manera:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia (nm)

x = Concentración (mg/L)

m = pendiente

b = ordenada de origen

Posteriormente se debe reordenar la ecuación para encontrar la concentración (mg/L) de cada tiempo, así:

$$x = \frac{(y - b)}{m}$$

Se obtiene la ecuación de la curva patrón medio PRO:

$$y = 0,0022x + 0,0093$$
$$y = mx + b$$

Se obtiene la ecuación de la curva patrón medio MRS:

$$y = 0,0022x + 0,0103$$
$$y = mx + b$$

Se reemplaza en la ecuación el valor de las absorbancias de las lecturas D.O obtenidas en cada tiempo, así:

Para la determinar la absorbancia se deben seguir los pasos:

- Pipetear las cantidades de agua obtenidas en el paso anterior de agua destilada y solución patrón o muestra problema.
- Pipetear el reactivo C a todos los tubos. Mezclar el contenido de cada tubo y dejarlo reposar por 10 minutos en la oscuridad.
- Añadir a todos los tubos el reactivo de Folin (diluida 1:4) mezclando bien por agitación. Dejar reposar 30 minutos en la oscuridad.

ANEXO I. Determinación de azúcares totales

Reactivos:

- Antrona
- Ácido sulfúrico a 10% y 96%
- Glucosa anhidra.
- Agua destilada y esterilizada.

Procedimiento:

Preparación de vidriería

- La vidriería para dosificación y dilución debe estar previamente lavada y desinfecta.
- Se deja secar y posteriormente se sumerge en H_2SO_4 al 10% y se deja en remojo por 24 horas.
- Luego se enjuagan con agua destilada y se dejan invertidos para su secado.
- Para 40 tubos de ensayo con sus respectivas tapas y un Erlenmeyer de 500 mL son necesarios 4 litros de H_2SO_4 al 10%.

Reactivo de Antrona

- Disolver 200mg (0,2 g) de Antrona en 100 mL de H_2SO_4 al 96% en un balón aforado y conservarlo cubierto con papel aluminio.

Solución Madre

- Disolver 1,25 g de glucosa anhidra en un balón aforado de 250 mL hasta completar su volumen con agua destilada.

Solución estándar

- De la solución madre transferir 1 mL en un balón aforado de 100 mL, hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.
- Para calcular la cantidad de solución estándar y agua en cada tiempo se debe dividir la cantidad total de solución estándar y agua (2,5 mL), entre el número de tiempos y así ubicarlos en orden ascendente para la solución estándar y descendente para el agua en la tabla de distribución.

Ejemplo: 2,5 mL solución estándar/ 10 tiempos= 0,25 mL

Tiempos	Solución Estándar (SE) mL	Agua (A) mL	SE + A
0	0	2,5	2,5
1	0,25	2,25	2,5
2	0,50	2,00	2,5
3	0,75	1,75	2,5
4	1,00	1,5	2,5
5	1,25	1,25	2,5
6	1,50	1,00	2,5
7	1,75	0,75	2,5
8	2,00	0,5	2,5
9	2,25	0,25	2,5
10	2,5	0	2,5

Ejemplo: curva patrón proteínas medio PRO

Tiempo	Concentración mg/L	Absorbancia 740 nm
0	0,000	0,00
1	0,084	6,25
2	0,154	12,50
3	0,235	18,75
4	0,295	25,00
5	0,385	31,25
6	0,448	37,50
7	0,523	43,75
8	0,612	50,00

Posteriormente se debe ingresar a Microsoft Excel la tabla anterior y graficar la ecuación de la recta para obtener la curva patrón y el valor de R^2 debe aproximarse a 1.

