

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR/A

DOCTORADO EN INGENIERÍA DE PRODUCTOS Y PROCESOS DE LA
INDUSTRIA ALIMENTARIA – RES. MIN. 1629/2020

TEMA:

Uso de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* encapsulados con diferentes sustratos para el control de *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* en queso de leche de vaca fresca

Doctorando:

Mg. Ing. YESSENIA MARIBEL GARCÍA MONTES

Director: Stalin Santacruz Terán PhD

Co-Director/a: Dra. Ing. Silvia Cristina Clavijo Velázquez

Lugar y Año de Aprobación: San Rafael, Mendoza – Argentina, -2025

AGRADECIMIENTO

YESSENIA MARIBEL GARCIA MONTES

DEDICATORIA

YESSENIA MARIBEL GARCÍA MONTES

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
CONTENIDO	iv
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
ANTECEDENTES	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	5
1.3. OBJETIVOS	8
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	8
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.4. HIPÓTESIS	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. Queso	10
2.2. Probióticos	10
2.2.1	12
2.2.2	13
2.3. Prebióticos	17
2.3.1. Inulina	17
2.3.2. Fructosa	20
2.4. Ácido gálico	21
2.5. Encapsulación	22
CAPITULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	27
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.2. DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.3. FACTORES EN ESTUDIO	27
3.4. TRATAMIENTOS	28
3.5. DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL	28
3.5.1 Estudio de la cinética de crecimiento microbiano	28
Selección de cepas bacterianas, prebióticos y condiciones de crecimiento	28
Conservación de las cepas bacterianas	29
Actividad antibacteriana: métodos de ensayo de difusión con disco-placa	29
Curva de calibración para determinar la concentración de células estimadas	31
Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) en medio líquido	32
Microencapsulación y actividad antimicrobiana de microorganismos BAL	37

Evaluación de la supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas in vitro de BAL	40
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
BIBLIOGRAFÍA	94

CONTENIDO DE CUADROS Y GRÁFICOS

Cuadros:

3.1. Detalle de los tratamientos.....	36
4.1. Actividad antimicrobiana de cepas <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> combinada con inulina y fructosa en bacterias patógenas del queso.....	52
4.2. Valores de densidad (DO 600nm) y concentración celular (células/mL) de acuerdo con los Estándares de patrones McFarland.....	56
4.3. Valores promedios de crecimiento en Ln N (de <i>L. lactis</i> y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa.....	58
4.4. Valores promedios de crecimiento de células estimadas en Ln N (células/mL) y determinados en la ecuación de la regresión lineal de la curva estándar de patrones McFarland en un tiempo de 6 horas para <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa.....	59
4.5. Coeficientes de función sigmoideal y parámetros encontrados del modelo de curva de crecimiento en densidad óptica expresados en Ln N (DO 600nm) de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa.....	72
4.6. Coeficientes de función sigmoideal y parámetros encontrados del modelo de curva de crecimiento celular estimado expresados en Ln N (Células/mL) de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa.....	72
4.7. Criterios estadísticos y ajustes que se calculó con la concentración de biomasa en densidad óptica (DO 600 nm) de acuerdo con el modelo matemático de Gompertz en la cinética de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa.....	73
4.8. Criterios estadísticos y ajustes que se calculó con la concentración de células estimadas (células/mL) de acuerdo con el modelo matemático de Gompertz en la cinética de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa.....	74
4.9. Viabilidad de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> encapsulados en combinación con fructosa e inulina almacenados a 25 ± 2 °C.....	80
4.10. Actividad antimicrobiana in vitro de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> combinadas con inulina y fructosa contra bacterias patógenas.....	82
4.11. Actividad antimicrobiana in vivo de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> combinadas con inulina y fructosa contra <i>E. coli</i> inoculadas en muestras de queso fresco de manaba.....	84
4.12. Actividad antimicrobiana in vivo de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> combinadas con inulina y fructosa contra <i>Salmonella</i> inoculadas en muestras de queso fresco de manaba.....	84
4.13. Actividad antimicrobiana in vivo de cepas de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> combinadas con inulina y fructosa contra <i>Listeria</i> inoculadas en muestras de queso fresco de manaba.....	85
4.14. Viabilidad antes y después de la encapsulación de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> en combinación con fructosa e inulina almacenados a 25 ± 2 °C.....	90

4.15. Viabilidad de células libres de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> , no encapsuladas en condiciones gastrointestinales in vitro (n = 3).....	94
4.16. Viabilidad de células de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Lacticaseibacillus casei</i> , encapsuladas en condiciones gastrointestinales in vitro (n = 3).....	94

Gráficos:

4.1. Curva de calibración de estándar de patrones McFarland para cuantificar la concentración celular estimada (10^8 células/mL).....	56
4.2. Curva de crecimiento de biomasa expresada en Ln N (DO 600nm) de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa: (T1) A1B1 = <i>Lactococcus lactis</i> + Fructosa, (T2) A1B2= <i>Lactococcus lactis</i> + Inulina, (T3) A2B1 = <i>Lactobacillus casei</i> + Fructosa, (T4) A2B2 = <i>Lactobacillus casei</i> + Inulina.....	66
4.3. Curva de crecimiento de células estimadas en Ln N (células/mL) de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa: (T1) A1B1 = <i>Lactococcus lactis</i> + Fructosa, (T2) A1B2= <i>Lactococcus lactis</i> + Inulina, (T3) A2B1 = <i>Lactobacillus casei</i> + Fructosa, (T4) A2B2 = <i>Lactobacillus casei</i> + Inulina.....	67
4.4. Valor normal esperado expresados Ln N (DO 600nm) sobre el crecimiento de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa: (T1) A1B1 = <i>Lactococcus lactis</i> + Fructosa, (T2) A1B2= <i>Lactococcus lactis</i> + Inulina, (T3) A2B1 = <i>Lactobacillus casei</i> + Fructosa, (T4) A2B2 = <i>Lactobacillus casei</i> + Inulina.....	75
4.5. Valor normal esperado expresados en Ln N (células/mL-1) sobre el crecimiento de <i>L. lactis</i> (CU-R-704) y <i>L. casei</i> (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa: (T1) A1B1= <i>Lactococcus lactis</i> + Fructosa, (T2) A1B2= <i>Lactococcus lactis</i> + Inulina, (T3) A2B1 = <i>Lactobacillus casei</i> + Fructosa, (T4) A2B2 = <i>Lactobacillus casei</i> + Inulina.....	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BAL: Bacterias ácido lácticas
EE: Eficiencia de encapsulación
UFC: Unidades formadoras de colonias
NTE: Norma técnica ecuatoriana
INEN: Servicio ecuatoriano de normalización
GRAS: Generalmente reconocido como seguro
FDA: Administración de alimentos y medicamentos
TGI: Tracto gastro intestinal
ESFA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
GP: Grado de polimerización
AG: Ácido gálico
ATCC®: (American Type Culture Collection)
TSB: Caldo Soja Trypticaseína
BHI: Brain Heart Broth
BN: Nutrient Broth
Abs: Absorbancia
MRS: de Man, Rogosa y Sharpe
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
UFC: Unidades formadoras de colonia
PBS: Solución salina tamponada
DE: Desviación estándar
Ln: Logaritmo natural

RESUMEN

La producción de queso fresco en el Ecuador es muy distinguida debido a la alta demanda de los consumidores y la elevada producción láctea en las zonas ganaderas ubicadas en las regiones costera y serrana del país. Por los componentes nutricionales necesarios para el hombre, el queso representa un alimento importante; sin embargo, la contaminación a pocos días de su producción es un problema, más aún en los quesos crudos frescos, ya que pueden haber sido elaborados con leche no pasteurizada. Es por esta razón que en esta tesis se pretende dar una solución alternativa a esta problemática al implementar la aplicación de bacterias lácticas probióticas (BAL) con sustratos prebióticos en el queso fresco artesanal de leche cruda, buscando la inhibición de las bacterias patógenas (*Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes*). Las BAL se añadieron mediante el uso de un recubrimiento comestible a base de alginato. Este recubrimiento contiene un antioxidante que podría también mejorar las características del producto lácteo y contribuir a la salud del consumidor.

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* encapsulados con diferentes sustratos para el control de *Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes* en el queso fresco de leche de vaca.

Se evaluó la influencia de inulina y fructosa en el crecimiento de las cepas bacterianas *L. lactis* y *L. casei* y se valoró la cinética de crecimiento; posteriormente se estudió el uso de *L. lactis*, *L. casei* encapsulados como control microbiológico contra *Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes* a través de la evaluación *in vitro* (laboratorio).

Se analizó el crecimiento de *L. lactis* y *L. casei* combinado con inulina y fructosa, para lo cual se obtuvieron y graficaron las funciones de crecimiento sigmoideal de Gompertz utilizando los datos obtenidos del cultivo discontinuo en relación con la biomasa y la concentración celular, en función del tiempo.

Se realizó un proceso de encapsulado aplicando la técnica de secado por aspersion, utilizando diferentes mezclas de bacterias ácido lácticas con presencia de fructosa e inulina. La

encapsulación se realizó con alginato de sodio como material de pared, para evaluar el efecto sobre la eficiencia de encapsulación (EE) y caracterizar las microcápsulas resultantes. El tamaño de partícula de las microcápsulas se determinó midiendo diámetros de 300 microesferas. Se analizó la actividad antibacteriana por difusión en discos-placas y enumeración de *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* (evaluadas en queso fresco manaba) conservadas a 4 °C. La viabilidad de *L. lactis* y *L. casei* libres y encapsuladas se analizó en condiciones gastrointestinales simuladas.

Los resultados del modelado cinético indicaron que *L. lactis* + Fructosa y *L. casei* + Inulina presentaron el mejor coeficiente de función y un mejor ajuste en la mayoría de los casos presentados, en comparación a los restantes, la tasa máxima de crecimiento específico de aceleración (μ_A), fue de 0.364 a 0.473 h⁻¹ y 0.100 a 0.129 h⁻¹, la concentración celular bacteriana (A) fue de 0.556 a 0.713 y 0.425 a 0.548 respectivamente, el tiempo donde (μ) se presenta con mayor magnitud (L) fluctuó entre 0.854 a 0.802 y cuando este tiempo en (L) es muy rápido, presenta valores de $0.072 \leq a \leq 0.092$. El coeficiente de determinación y/o de regresión múltiple (R^2) obtenidos en los dos ajustes fue de 0.97. Los resultados mostraron que se logró el desarrollo de cápsulas de 90 μm con una eficiencia de encapsulación de 89.5 %. La viabilidad de las BAL fue mayor en los conteos de *L. lactis* + fructosa con valores de 9.87 ± 0.03 log UFC/g en el día 30 de almacenamiento, el análisis *in vitro* mostró que *L. lactis* + inulina presentó la mayor inhibición contra *Salmonella*, *E. coli* y *Listeria* con valores de diámetro del halo de inhibición de 12.33 mm, y para el conteo en las muestras de queso fue *L. lactis* + fructosa evidenciando el recuento de UFC más bajo.

La viabilidad celular después de la encapsulación fue del 82 %. El tamaño de las cápsulas obtenidas osciló entre 85 a 90 μm . Al final de la evaluación gastrointestinal *in vitro*, las células probióticas no encapsuladas mostraron una muy baja viabilidad con valores entre 3,20 y 12,90 %, mientras que las encapsuladas mantuvieron entre 63,75 y 81,30 % su viabilidad.

ABSTRACT

The production of fresh cheese in Ecuador is very distinguished due to the high consumer demand and the high dairy production in the livestock areas located in the coastal and mountain regions of the country. Due to nutritional components necessary for people, cheese represents an important food; However, contamination a few days after production is a problem, even more so in fresh raw cheeses, since they may have been made with unpasteurized milk. It is for this reason that this thesis aims to provide an alternative solution to this problem by implementing the superficial application of probiotic lactic acid bacteria (LAB) with prebiotic substrates in artisanal fresh raw milk cheese, seeking the inhibition of pathogenic bacteria (*Salmonella spp.*, *E. coli* and *L. monocytogenes*). LAB will be added through the use of a starch-based edible coating. This coating will contain an antioxidant that could also improve the characteristics of the dairy product and contribute to the health of the consumer.

Lactic acid bacteria (LAB) constitute a group of microorganisms that are present in different niches (plants, milk, human and animal intestine). They are characterized by presenting different properties beneficial to the health of the host, which enhance them to be used in functional foods or as probiotics. They have various applications, one of the main ones being the fermentation of foods such as milk, meat and vegetables, to obtain products such as yogurt, cheeses, pickles, sausages, etc. However, studies have shown that LAB are sensitive to harsh environmental conditions. Therefore, encapsulation can be used to protect LAB under adverse environmental conditions.

The objective of this research was to study the use of *Lactococcus lactis* and *Lacticaseibacillus casei* encapsulated with different substrates for the control of *Salmonella spp.*, *E. coli* and *L. monocytogenes* in fresh raw milk cheese.

The influence of inulin and fructose on the growth of the bacterial strains *L. lactis* and *L. casei* was evaluated and the growth kinetics were assessed; Subsequently, the use of encapsulated

L. lactis, *L. casei* and gallic acid as a microbiological control against *Salmonella spp.*, *E. coli* and *L. monocytogenes* was studied through *in vitro* (laboratory) and *in vivo* evaluation.

The growth of *L. lactis* and *L. casei* combined with inulin and fructose was analyzed, for which the Gompertz sigmoidal growth functions were obtained and graphed using the data obtained from the batch culture in relation to biomass and cell concentration, estimates expressed in $\ln N$ (OD 600nm and cells/mL) as a function of time.

An encapsulation process was carried out applying the spray drying technique, using different mixtures of lactic acid bacteria with the presence of fructose and inulin and gallic acid. Encapsulation was performed with sodium alginate as wall material, to evaluate the effect on encapsulation efficiency (EE) and characterize the resulting microcapsules. The particle size of the microcapsules was determined by measuring diameters of 300 microspheres. The antibacterial activity was analyzed by diffusion in disc-plates and enumeration of *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria* (evaluated in fresh manaba cheese) preserved at 25 °C. The viability of free and encapsulated *L. lactis* and *L. casei* was analyzed under simulated gastrointestinal conditions.

The results of the kinetic modeling indicated that *L. lactis* + fructose and *L. casei* + inulin presented the best function coefficients and a good fit in the majority of the cases presented, compared to the rest, the maximum specific growth rate of acceleration (μ_A), was from 0.364 to 0.473 h⁻¹ and 0.100 to 0.129 h⁻¹, the bacterial cell concentration (A) was from 0.556 to 0.713 and 0.425 to 0.548 respectively and the time where (μ) is presented with highest magnitude (L) fluctuated between 0.854 to 0.802 and when this time in (L) is very fast, it presents values of $0.072 \leq a \leq 0.092$. The coefficient of determination and/or multiple regression (R^2) obtained in the two adjustments was 0.97. The results showed that the development of 90 μm capsules was achieved for an encapsulation efficiency of 89.5%. The viability of the LAB was higher in the counts of *L. lactis* + fructose with values of 9.87 ± 0.03 Log CFU/g on day 30 of storage, the *in*

vitro analysis showed that *L. lactis* + inulin presented the greatest inhibition against *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria* with values of 12.33 mm, and for the count in the cheese samples it was *L. lactis* + fructose showing the lowest CFU count.

Cell viability after encapsulation was 82 %. The size of the capsules obtained ranged between 56 and 59 μm . At the end of the *in vitro* gastrointestinal evaluation, the non-encapsulated probiotic cells showed a very low viability with values between 3.20 and 12.90 %, while the encapsulated ones maintained their viability between 63.75 and 81.30 %.

Introducción

El queso blanco fresco Manaba (Queso Manaba) es un queso artesanal ecuatoriano con buena aceptación entre los consumidores, tiene un contenido de 37 % de humedad. Los microorganismos presentes en este tipo de alimento, unido al proceso de almacenamiento a temperaturas inadecuadas, pueden perjudicar la salud de los consumidores. Adicionalmente, las condiciones de procesamiento y comercialización no cumplen con la normativa alimentaria ecuatoriana, debido a que se ha reportado la presencia de microorganismos patógenos en este tipo de productos artesanales.

Las bacterias del ácido láctico (BAL) constituyen un grupo de microorganismos que están presentes en diferentes nichos (vegetales, leche, intestino humano y animal). Se caracterizan por presentar diferentes propiedades beneficiosas para la salud del huésped, las cuales las potencian para ser utilizadas en alimentos funcionales o como probióticos. Tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales, para obtener productos como yogurt, quesos, encurtidos, embutidos, etc. Sin embargo, los estudios han demostrado que las BAL son sensibles a las duras condiciones ambientales. Por lo tanto, se propone utilizar la encapsulación para proteger las BAL bajo condiciones ambientales adversas.

Por los componentes nutricionales necesarios para el hombre, el queso representa un alimento importante; sin embargo, la contaminación a pocos días de su producción es un problema, más aún en los quesos crudos frescos, ya que pueden haber sido elaborados con leche no pasteurizada. Es por esta razón que en la presente tesis se pretende dar una solución alternativa a esta problemática al implementar la aplicación superficial de bacterias lácticas probióticas (BAL) con sustratos prebióticos en el queso fresco artesanal de leche cruda, buscando la inhibición de las bacterias patógenas (*Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes*). Las BAL se añadirán mediante el uso de un recubrimiento comestible a base de alginato. Este recubrimiento contendrá además un antioxidante que podría también mejorar las características del producto lácteo y contribuir a la salud del consumidor. Con los resultados obtenidos se

espera obtener derivados lácteos que no afecten a la salud del consumidor, con actividad probiótica, y prebiótica.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El queso es un alimento de amplio consumo en el mundo, el queso fresco de producción artesanal ha constituido, durante décadas, una de las bases de la alimentación de la población ecuatoriana. En Ecuador el 35 % de la leche producida en la ganadería se destina a la elaboración de queso artesanal. Dicha actividad de manufactura se realiza en áreas rurales donde las condiciones higiénico-sanitarias carecen del seguimiento y control requeridos para asegurar la obtención de productos de calidad comercial (Vásquez et al., 2018; Pérez, Morales y Chams, 2017). El sector agropecuario tiene un rol importante en la economía de Ecuador, ya que aporta el 17,5 % del producto interno bruto y dentro de este la actividad pecuaria representa el 27,3 % destacándose los productos lácteos, carnes bovinas, porcinas, de pollo y huevos (Vásquez et al., 2018).

En la provincia Manabí, Ecuador, perteneciente a la Zona de Planificación No. 4, la producción de leche se concentra en los cantones Chone, Flavio Alfaro, El Carmen y Pedernales y su aporte a la producción de leche del país representa el 13,44 %. En el norte de Manabí, el sistema económico es más de tipo familiar que empresarial-corporativo (Villegas-Soto et al., 2018). Se estima que el 70 % de la producción diaria de leche se destina a la elaboración de queso de forma artesanal (Arteaga-Solórzano et al., 2021^a).

El queso fresco es un alimento importante en la dieta de la población ecuatoriana, ya que es fuente de proteína, grasas, calcio y vitaminas A y D (Barragán, 2023). En el país alrededor

de un tercio de la leche que se produce es destinada a la industria quesera, señalando que en Ecuador dicha industria es la categoría láctea que requiere de mayor cantidad de litros de leche para su elaboración, considerando que el consumo per cápita de queso en Ecuador es 1.7 kg al año (Arguello et al., 2015; León, 2022; Zambrano, 2021).

1.1.1 Antecedentes

El queso fresco de producción artesanal ha constituido, durante décadas, una de las bases de la alimentación de la población ecuatoriana. En el Ecuador, el 35% de la leche generada es destinada a la industria quesera artesanal. Dicha actividad de manufactura se realiza en áreas rurales, donde las condiciones higiénico-sanitarias han carecido del seguimiento y control requeridos para asegurar la obtención de productos de calidad comercial. La composición química y el grado de hidratación de este tipo de productos son factores que van a propiciar el desarrollo de patógenos de importancia sanitaria por su impacto en la salud pública (Mercado, 2007 y Martínez *et al.*, 2013).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son microorganismos que han sido utilizados durante décadas por la industria alimentaria porque confieren características sensoriales y reológicas deseables a los productos lácteos. Además, pueden conservar estos productos (Heredia-Castro, Hernández-Mendoza, González-Córdova, & Vallejo-Córdoba, 2017), aportar beneficios para la salud del huésped, como la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas (Rokka & Rantamäki, 2010). Sin embargo, las BAL muestran una baja supervivencia en productos alimenticios (Ashraf & Smith, 2016; Husmaini *et al.*, 2011) y, por lo tanto, la encapsulación puede ayudar a preservar su viabilidad (Santacruz & Castro, 2018; Mirzaei *et al.*, 2012).

Muchos autores han estudiado el control de bacterias patógenas en diferentes tipos de quesos, por ejemplo el control de *E. coli*, *S. enterica*, *B. cereus*, *C. scuri* y *P. aeruginosa* utilizando bacterias ácido lácticas (BAL) (Sharaf, 2019); la inoculación de *L. rhamnosus* en queso de cabra semiduro como inhibidor del crecimiento de bacterias patógenas (Rodrigues *et al.*, 2015) y la aplicación de *L. acidophilus* para controlar el crecimiento de *Salmonella* y bacterias aerobias termófilas en quesos frescos (Santacruz & Castro, 2018).

En las últimas décadas se ha explorado el potencial de las bacterias ácidas lácticas (BAL) como bioconservantes naturales de productos lácteos, debido a la producción de diversos metabolitos

como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono (CO₂) y las bacteriocinas *per se* (Siamansouri *et al.*, 2013 y O'Bryan *et al.*, 2015b); siendo estas últimas las que han despertado mayor interés.

El potencial antimicrobiano de las bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocina en el almacenamiento de queso es un tema muy importante en la industria alimentaria (Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008; Favaro *et al.*, 2015). Varios estudios han demostrado que el uso de materiales productores de bacteriocina (LAB) es eficaz para reducir los niveles de *Listeria innocua* y *L. monocytogenes* en queso manchego, queso curado (Rodríguez *et al.*, 2005; O'sullivan *et al.*, 2006; Dal Bello *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2012) y *Lactobacillus acidophilus* aplicado a queso fresco queso manaba contra microorganismos mesófilos aeróbicos (Santacruz & Castro, 2018; Santacruz & Medrano, 2021).

Las BAL aisladas de quesos artesanales pueden poseer potencial probiótico, el cual ha sido investigado *in vitro* (Mandal *et al.*, 2016 y Paulo Farias *et al.*, 2019); además, otros autores han reportado el potencial probiótico de un gran conjunto de bacterias del ácido láctico (Margalho *et al.*, 2021).

Los prebióticos son definidos como ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónicas (Rodríguez *et al.*, 2017). Por otra parte, son ingredientes funcionales que se encuentran naturalmente en algunos alimentos vegetales y animales que han recibido una atención considerable por parte de las industrias farmacéutica y alimentaria debido a sus efectos positivos para la salud (Paulo Farias *et al.*, 2019).

Según Guimarães *et al.* (2020), los probióticos, tales como *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., entre otros., y los prebióticos, tales como inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, etc. son ingredientes funcionales que pueden cambiar la textura de los alimentos, mejorándola o no; además, del efecto inhibitor en el crecimiento de bacterias patógenas, según Margalho *et al.* (2021).

La microencapsulación es un proceso mediante el cual una sustancia activa queda rodeada por una pared porosa que la protege, esto mejora la funcionalidad y estabilidad oxidativa de los alimentos y extractos e ingredientes alimentarios. También protege a los microorganismos probióticos (Shinde *et al.*, 2014) y sustancias bioactivas como los compuestos fenólicos

extraídos de las plantas, que inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y actúan como agentes antiinflamatorios (Boonchu & Utama-Ang, 2015). Entre sus principales ventajas se encuentran: enmascarar sabores y olores desagradables de productos encapsulados, proteger los compuestos bioactivos de la oxidación y reacciones indeseables, así como de condiciones adversas de luz, calor y gases, además de alargar su vida útil (Rutiaga-Quiñones *et al.*, 2015).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y representativos de metabolitos secundarios de las plantas y su relevancia radica en su participación en la fisiología y el metabolismo celular como la morfología, el crecimiento, la reproducción, la defensa contra plagas y depredadores, y los procesos germinativos, entre otros (Jurado *et al.*, 2016). Estos compuestos están presentes en la mayoría de los productos naturales consumidos por el hombre y estudios recientes han demostrado una importante actividad antioxidante, lo que demuestra su potencial beneficioso para la salud humana (Novoa *et al.*, 2001).

Entre los compuestos que presentan actividad antioxidante, los polifenoles actúan a través de mecanismos antirradicales o como quelantes de metales, siendo el ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) un excelente representante (Nobre *et al.*, 2019). Es un ácido fenólico presente en diversas fuentes naturales como: a) plantas: *Larrea tridentata* (gobernadora) y *Turnera diffusa* (damiana), b) frutas: uva, granada, nueces, plátano, fresa, limón, arándano, cáscara de manzana y mango, c) verduras: acelgas y espinacas y d) bebidas: café, vino tinto y té verde, entre otros (Taitzoglou *et al.*, 2001). Diferentes investigaciones en la industria farmacéutica y alimentaria muestran que el ácido gálico exhibe capacidad antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica y reduce el daño de los ácidos nucleicos (Prince, 2009; Verna *et al.*, 2013; Choubey *et al.*, 2019; Yao *et al.*, 2017).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Utilizar *L. lactis*, y *L. casei* encapsulados con sustratos de inulina y fructosa en queso fresco de leche de vaca, como técnica para proteger y mejorar la viabilidad de las bacterias lácticas y su actividad inhibidora de bacterias patógenas.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto inhibitor de BAL encapsuladas sobre bacterias patógenas (*Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes*).
- Evaluar la encapsulación de BAL con presencia de prebióticos.
- Evaluar la vida útil del queso con la preparación de prebióticos y probióticos encapsulados.
- Determinar la digestibilidad *in vitro* de las BAL encapsuladas presentes en quesos de leche cruda.

1.4. HIPÓTESIS

Con la aplicación de encapsulados de *L. lactis*, y *L. casei*, se puede mejorar la calidad microbiológica y el tiempo de vida útil de los quesos artesanales de leche de vaca.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Queso

Según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1528:2012 y según el Código Alimentario Argentino (CAA). Se entiende por queso el producto blando, semiduro, duro y extra duro, madurado o no madurado, y que puede estar recubierto, en el que la proporción entre las proteínas de suero y la caseína no sea superior a la de la leche, obtenido mediante: a) coagulación total o parcial de la proteína de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o leche, de mantequilla o de cualquier combinación de estos ingredientes, por acción del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial del suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación, respetando el principio de que la elaboración del queso resulta en una concentración de proteína láctea (especialmente la porción de caseína) y que por consiguiente, el contenido de proteína del queso deberá ser evidentemente más alto que el de la mezcla de los ingredientes lácteos ya mencionados en base a la cual se elaboró el queso; y/o b) técnicas de elaboración que comportan la coagulación de la proteína de la leche y/o de productos obtenidos de la leche que dan un producto final que posee las mismas características físicas, químicas y organolépticas que el producto definido en el apartado a). Se entiende por queso Manaba al queso no madurado obtenido a partir de leche, acidificado de forma natural en presencia de bacterias mesófilas nativas de la zona manabita, salado con sal en grano y colocado en moldes sin fondo para su prensado.

El queso fresco de producción artesanal constituye una de las principales bases de alimentación de la población ecuatoriana, desde hace décadas, el cual se obtiene del 35 % de la leche generada en el país (Arguello, 2015; Vásquez *et al.*, 2018). El queso blanco fresco Manaba (Queso Manaba) es un queso ecuatoriano de origen artesanal con 37 % de humedad (Espinoza, 2012) y buena aceptación entre los consumidores, especialmente en la provincia de Manabí (costa ecuatoriana) (Santacruz & Medrano, 2021). Sin embargo, las condiciones de procesamiento y comercialización no cumplen con la normativa ecuatoriana, lo que genera la presencia de microorganismos patógenos (Zambrano, 2014).

El queso artesanal se encuentra entre los alimentos que pueden transmitir agentes etiológicos que producen enfermedades o intoxicaciones alimentarias y que con leche no pasteurizada

constituye un riesgo de contaminación con bacterias patógenas (Gutiérrez *et al.*, 2017; Urbano *et al.*, 2017). Por su parte, los productos elaborados con leche cruda, como el queso, deben utilizar una materia prima obtenida de lecherías que cumplan con códigos de higiene y buenas prácticas (Martínez *et al.*, 2016). Los quesos involucrados en brotes de enfermedades gastrointestinales tienen un alto contenido de humedad y poca o nula maduración, lo que favorece el crecimiento de bacterias con potencial patógeno (Cervantes *et al.*, 2019). Argüello (2015); Ruíz *et al.*, 2017; Idárraga *et al.* (2018), reportaron patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y en algunos casos *Listeria monocytogenes* en algunas regiones del Ecuador y varios países de América Latina.

2.2. Probióticos

Los probióticos han existido en la humanidad desde que la gente empezó a consumir leche y alimentos fermentados. Sin embargo, sus efectos beneficiosos permanecieron inexplorados hasta el siglo pasado. Durante este tiempo, el significado de la palabra ha cambiado varias veces; sin embargo, siempre se ha equiparado con beneficios para la salud (Castañeda, 2018). Actualmente la FAO/OMS recomienda utilizar la palabra probiótico en el contexto de “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped” (FAO/OMS, 2002). La eficacia de la acción de los microorganismos probióticos depende del tamaño de sus poblaciones, que la definición no especifica. Se supone que los productos alimenticios probióticos deben contener más de 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo para que el consumidor pueda consumir fácilmente 10^9 UFC por día (Santacroce *et al.*, 2019; Fenster *et al.*, 2019). Durante la producción de alimentos, para acelerar o iniciar el proceso de fermentación, además de probióticos, se añaden cultivos iniciadores a los productos crudos. Debido a que exhiben actividad enzimática, tanto los probióticos como los cultivos iniciadores permiten obtener las propiedades deseadas en el producto final (p. ej., sabor y textura) (Maślak *et al.*, 2022).

Los principales microorganismos utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo ésta una característica de cepa y no de especie. Para ser considerados probióticos, los microorganismos deben reunir las siguientes características:

- No ser patógenas, especialmente para personas inmunocomprometidas.
- No ser sensible a las enzimas proteolíticas.
- Ser capaces de sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal.
- Tener capacidad para adherirse a las superficies epiteliales.
- Ser capaces de producir componentes antimicrobianos.
- Permanecer vivas y estables durante su empleo.
- Tener un mecanismo específico de adhesión al intestino humano.
- Ser capaces de un crecimiento rápido en las condiciones del tracto gastrointestinal
- Ser capaces de inmunoestimular, aunque sin efectos proinflamatorios.

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos:

- a) los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen principalmente con fines nutritivos (yogures, leche, quesos, etc.);
- b) las leches cultivadas y fermentadas, quesos probióticos utilizados básicamente como vehículos de bacterias probióticas.
- c) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas.

2.2.1 Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladoras que incluyen varios géneros como *Lactobacillus* el cual comprende 261 especies (a marzo de 2020) que son extremadamente diversas a nivel fenotípico, ecológico y genotípico (Zheng et al., 2020), tales como: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weisella* y *Enterococcus*, entre otras (Vandamme et al., 1996). Este grupo de bacterias se caracteriza por la ausencia en de genes cuyos productos se encuentran involucrados en varias rutas de biosíntesis. Debido a esta limitante, las BAL se consideran auxótrofas y suelen encontrarse en ambientes ricos en aminoácidos, purinas y pirimidinas (Kandler, 1983). Desde un punto de vista bioquímico, las BAL incluyen a los homofermentativos, cuyo único producto de la fermentación

es el ácido láctico y heterofermentativos, que además de ácido láctico liberan otros productos secundarios durante la fermentación de carbohidratos como el ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (Kleerebezem y Hugenholtz, 2003; Broadbent *et al.*, 2008). Originalmente la taxonomía clásica agrupó a las BAL por sus características morfológicas y fisiológicas. Con la llegada de las herramientas moleculares se redefinió el grupo, particularmente mediante la secuenciación de ARN ribosomal 16S (Stackebrandt y Teuber, 1988). Las BAL han sido utilizadas de forma segura durante cientos de años y siguen siendo utilizadas en la producción y preservación de alimentos debido a la producción de ácido láctico como producto de la fermentación de las hexosas. Como consecuencia de su historial se les ha otorgado la clasificación Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, de sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) por la Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration, FDA) de los Estados Unidos.

Las BAL están muy extendidas, se encuentran de forma natural en muchas fuentes de alimentos vegetales y animales y se han utilizado de forma segura durante mucho tiempo en la producción de lácteos y otros productos fermentados, como lo demuestra la atribución de QPS (presunción cualificada de seguridad, en la UE) y GRAS (en EE. UU.) (EFSA, 2015; Grosu-Tudor *et al.*, 2014). Hoy en día, las cepas de BAL se utilizan ampliamente como cultivos iniciadores/aditivos en la producción de alimentos y brindan los beneficios de seguridad microbiológica, uniformidad, calidad y durabilidad en el producto final (Rzepakowska *et al.*, 2017; Nieto-Arribas *et al.*, 2009).

Se pueden utilizar muchas especies de microorganismos como probióticos o cultivos iniciadores, incluidas bacterias, levaduras y mohos. Estos microorganismos se añaden o se pueden encontrar de forma natural en muchos alimentos diferentes, como productos lácteos fermentados (yogur, queso y kéfir), verduras y frutas encurtidas, cereales, embutidos fermentados, pan, cerveza o vino (Santacroce *et al.*, 2019; Vijaya Kumar y otros, 2015). En la industria alimentaria predominan las bacterias ácido lácticas (BAL). Incluyen principalmente los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weisella* (Khaneghah *et al.*, 2020).

Una característica común de todas las BAL es la capacidad de metabolizar anaeróbicamente varios azúcares mediante fermentación (dependiendo de la especie/cepa). El principal producto

de este proceso es el ácido láctico, que tiene propiedades conservantes y contribuye a la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Las bacterias homofermentativas, como las que pertenecen a los géneros *Lactococcus* o *Streptococcus*, producen este ácido a través de la vía Embden-Meyerhof (EM) (Hatti-Kaul *et al.*, 2018). Por el contrario, las cepas de BAL heterofermentativas (*Weissella*, *Leuconostoc* y ciertos *Lactobacillus*), además de ácido láctico, también pueden producir ácido acético, etanol, dióxido de carbono o acetato a través de las vías de la fosfoacetolasa. Dependiendo, entre otras cosas, de la temperatura y de la cepa utilizada, la cantidad de ácido láctico producido puede variar desde unos pocos hasta más de 200 g por litro de medio (Abedi & Hashemi, 2020).

El ácido láctico neutraliza el potencial electroquímico de las membranas celulares y desnaturaliza las proteínas intracelulares de los microorganismos al reducir el pH del medio ambiente, lo que limita el crecimiento de bacterias patógenas y perjudiciales. Además, los cambios beneficiosos que se producen en el organismo del huésped bajo la influencia de los probióticos incluyen un aumento en el número de microflora intestinal positiva. La actividad antimicrobiana de las cepas probióticas también resulta de su capacidad para formar biopelículas en la pared intestinal, competir por nutrientes y producir o liberar diversos metabolitos: ácido láctico, péptidos antimicrobianos, ácidos grasos de cadena corta y peróxido de hidrógeno (Santacroce *et al.*, 2019; Khaneghah *et al.*, 2020).

Las propiedades importantes de los probióticos también incluyen su capacidad para biosintetizar vitaminas del grupo B solubles en agua (ácido fólico, riboflavina, niacina y cobalamina), que no son producidas por el cuerpo humano (Hatti-Kaul *et al.*, 2018). Cada vitamina del grupo B es químicamente diferente y actúa en sinergia para mantener la homeostasis del cuerpo al desempeñar funciones importantes en procesos metabólicos como la producción de energía y la formación de glóbulos rojos. Estas vitaminas se eliminan o destruyen fácilmente durante la cocción y el procesamiento de alimentos; así, el uso de bacterias permite enriquecer los alimentos con estos compuestos *in situ*, lo que supone un beneficio adicional para los consumidores. Además, las cepas de BAL producen enzimas que provocan la degradación de grasas, proteínas y carbohidratos presentes en los productos alimenticios. Como resultado, se forman compuestos volátiles, como aldehídos, cetonas, ésteres o alcoholes, que confieren a los productos alimenticios finales propiedades

organolépticas específicas (Hu *et al.*, 2022). Las BAL también son una rica fuente de compuestos lipídicos que forman membranas celulares, participan en vías metabólicas (en el transporte de proteínas, replicación del ADN, etc.) y son un material energético de reserva.

2.2.1 *Lactococcus lactis*

A pesar de la asociación común de *Lactococcus lactis* con los productos lácteos, la bacteria se aisló originalmente de plantas donde se creía que estaba inactiva, y solo se volvió activa y se multiplicó en el tracto gastrointestinal después de ser consumida por rumiantes (Bolotin *et al.*, 2001). Originario del género *Streptococcus* y reclasificado en el género *Lactococcus* en 1985, *L. lactis* se divide en tres subespecies, a saber, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *hordniae* (Parapouli *et al.*, 2013). Fenotípicamente, se clasifica como bacteria intestinal anaeróbica facultativa, Gram positiva, esférica, homolactata y no esporulante, con cientos de cepas y biovariantes publicadas hasta la fecha (Duwat *et al.*, 2001; Garrigues *et al.*, 1997).

Lactococcus lactis se ha utilizado durante siglos en la fermentación de alimentos, especialmente queso, yogur, chucrut y similares, por lo que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) lo reconoce generalmente como seguro (GRAS). Además de impartir sabor, *L. lactis*, al ser una bacteria del ácido láctico (BAL), también produce ácido que conserva los alimentos. Algunas cepas potencian aún más esta propiedad de conservación con la producción de bacteriocinas, reforzando así su papel en la industria alimentaria. Además de su importante función en los alimentos, *L. lactis* se ha convertido en el laboratorio modelo en lo que respecta a la ingeniería genética. Varios factores, incluido su genoma de pequeño tamaño completamente secuenciado (2,3 Mbp) y el desarrollo de herramientas de ingeniería genética compatibles con éxito, como sistemas de clonación y expresión con opciones personalizables, lo han convertido en un modelo deseable. Durante las últimas dos décadas, *L. lactis* ha ampliado enormemente su aplicación desde la alimentación hasta convertirse en una exitosa fábrica de células microbianas y, en muchas ocasiones, actuando como una alternativa Gram positiva a *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum*, o su contraparte Gram negativa *Escherichia coli* (García-Fruitós, 2012).

Las cepas de *Lactococcus lactis* son los principales componentes de BAL de los cultivos iniciadores utilizados para producir muchos productos lácteos fermentados (Lo *et al.*, 2018). En la fabricación de queso, la principal característica de las cepas de lactococos es su capacidad para acidificar rápidamente la leche, contribuyendo así también al desarrollo de propiedades sensoriales superiores (es decir, gusto, sabor y textura) en los quesos (López-Díaz *et al.*, 2000). Además, la aparición de *Lactococcus* en los quesos se ha relacionado con una mayor seguridad microbiana y estabilidad de los productos durante el almacenamiento, relacionada con la producción de sustancias (p. ej., ácidos orgánicos, bacteriocinas, grasas y metabolitos de aminoácidos) capaces de inhibir el deterioro y el crecimiento de microorganismos patógenos (Coelho *et al.*, 2014; Dal Bello *et al.*, 2012).

2.2.2 *Lacticaseibacillus casei*

Hay más de 200 especies de *Lactobacillus*, el género más grande y diverso dentro de las bacterias del ácido láctico (BAL) (Sun *et al.*, 2015). *Lactobacillus spp.* son parte del microbiota de humanos y animales (Casey *et al.*, 2004) donde colonizan el tracto gastrointestinal (TGI) y el tracto urogenital (Parolin *et al.*, 2015). También se encuentran en una variedad de productos alimenticios, desde frutas y verduras (Savino *et al.*, 2012) hasta una variedad de productos fermentados naturalmente (Ao *et al.*, 2012; Owusu-Kwarteng *et al.*, 2015). *Lactobacillus spp.* se han utilizado y estudiado ampliamente como cultivos iniciadores de fermentación (Aryana & Olson, 2017) y como probióticos (Ryan *et al.*, 2015; Pace *et al.*, 2015). Su larga historia de uso en productos fermentados ha llevado a su reconocimiento como GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la FDA, y les ha valido un lugar en la lista QPS elaborada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2016).

El grupo *Lactobacillus casei* (LCG), compuesto principalmente por las especies estrechamente relacionadas *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y, se encuentran entre algunas de las especies más estudiadas debido a su potencial comercial, industrial y sanitario aplicado. Comercialmente, se utilizan para fermentar productos lácteos, produciendo a menudo alimentos con mejor sabor y textura. También se ha descubierto que producen muchos metabolitos bioactivos que pueden conferir beneficios al huésped cuando se consumen (Dietrich *et al.*,

2014). Como tal, muchas cepas de LCG se consideran probióticos. El *L. rhamnosus* GG (LGG), es quizás una de las cepas bacterianas más estudiadas en relación con aplicaciones sanitarias (Segers & Lebeer, 2014).

2.3. Prebióticos

El término prebiótico se refiere a ingredientes alimentarios no digeribles que producen efectos beneficiosos en el huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un tipo o un número limitado de bacterias en el colon. Esta definición se superpone en parte con la definición de fibra dietética, aunque añade la selectividad de los prebióticos sobre ciertos microorganismos específicos (por ejemplo, la ingestión de fructooligosacáridos e inulina favorece selectivamente a las bifidobacterias) (Schrezenmeir & de Vrese, 2001).

Algunos de estos componentes de la fibra cumplen estrictamente los criterios para ser considerados prebióticos: inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, oligosacáridos derivados de la soja, xilooligosacáridos, pirodextrinas e isomaltooligosacáridos, entre otros (Macfarlane, 2010).

2.3.1. Inulina

La inulina y sus derivados ofrecen múltiples usos como ingredientes en la formulación de productos destinados a la alimentación gracias a sus ventajas nutricionales, funcionales y sus propiedades tecnológicas (Cardarelli *et al.*, 2007).

La inulina es extraída de diversas fuentes, tales como cereales, vegetales, frutas, hongos y bacterias, teniendo un grado de polimerización (GP) máximo de 200 en plantas (Giannouli *et al.*, 2004). Se la caracteriza por su grado de polimerización promedio GPn. Se presenta como un polvo blanco, sin olor, con sabor ligeramente dulce (10 % respecto de la sacarosa) y sin efecto residual. La inulina se comercializa con un grado de polimerización específico: de cadena larga (> 20 unidades), que proporciona viscosidad y puede utilizarse como espesante o sustituto de grasa, o de cadena corta (< 10 unidades), que tiene capacidad edulcorante por lo que se ha utilizado como sustituto parcial de la sacarosa (Cardarelli *et al.*, 2007).

En la Tabla 1 se pueden observar las propiedades funcionales de la inulina como así también las cantidades recomendadas a utilizar en la formulación de diferentes productos alimenticios.

Tabla 1. Propiedades funcionales de la inulina y cantidades recomendadas (Frank, 2022)

Aplicaciones	Propiedades funcionales	Cantidad recomendada (g/100g/cc)
Productos lácteos	<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpo y palatabilidad • Capacidad de formar geles • Mejora la aceptabilidad • Acción emulsificante • Sustitutos de azúcares y grasas • Sinergismo con edulcorantes 	2 - 10
Postres congelados	<ul style="list-style-type: none"> • Facilita su procesamiento • Sensación cremosa en la boca • Excelentes propiedades de fusión • Estabilidad ante la congelación • Sustituto de azucares y grasas • Sinergismo con edulcorantes 	2 - 10
Productos untables, helados y salsas	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidad de emulsiones • Agente espesante • Mejora la textura • Sustituto de grasas 	2 - 10
Productos horneados	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución de la actividad acuosa • Sustituto de azúcares • Acelera la formación de la corteza del pan y la reacción de Maillard • Reduce tiempos de cocción 	2 - 15
Preparación con frutas	<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpo y palatabilidad • Sustituto de grasas • Capacidad de formar gel • Sinergismo con edulcorantes • Estabilidad de emulsiones 	2 - 10
Aderezos de ensaladas	<ul style="list-style-type: none"> • Cuerpo y palatabilidad • Sustituto de grasas 	2 - 10

Productos cárnicos	<ul style="list-style-type: none"> • Contribuye a la textura • Sustituto de grasas 	2 - 10
Chocolate	<ul style="list-style-type: none"> • Sustituto de azúcares • Humectante 	5 - 30

La inulina pertenece al grupo de los fructanos. Es un polímero lineal de unidades de D-fructosa con enlaces glicosídicos β (2 -1), puede tener o no una molécula de glucosa terminal (Argoti *et al.*, 2021; Olagnero *et al.*, 2007; Vijn & Smeekens 1999). Su estructura no permite que se hidrolice en la parte superior del tracto gastrointestinal. Es metabolizado selectivamente en el colon por bifidobacterias y lactobacilos que producen enzimas fructofuranosidasas (Warchol *et al.*, 2002). Actualmente, se fomenta el uso combinado de cepas probióticas con prebióticos para formar productos simbióticos, en los que el prebiótico constituye una fuente de energía que aumenta la supervivencia intestinal de las bacterias beneficiosas (Fook *et al.*, 1999).

Inulina es el nombre con el que se designa a una familia de carbohidratos complejos (polisacáridos), compuestos por cadenas moleculares de fructosa, con la fórmula general. $C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$. Se trata, por tanto, de un fructosano o polímero formado por moléculas de fructosa, que se sintetiza a partir de sacarosa (López *et al.*, 2003), es decir, un compuesto formado por una mezcla de oligómeros y polímeros de unidades de fructosa, presenta la particularidad de ser muy heterogéneo en su grado de polimerización (Barclay *et al.*, 2016), consta de una cadena lineal de enlaces $\beta(2-1)$ fructosil-fructosa; al final de la cadena está presente una unidad de glucosa a través de un enlace similar a la sacarosa, puede estar presente una unidad inicial de glucosa, pero no es exclusivamente necesaria), cuando nos referimos a la definición de inulina, la primera unidad de la cadena (extremo no reductor) puede ser un grupo β -D-glucopiranosilo o β -D-fructopiranosilo (Lara-Fiallos *et al.*, 2017).

El grado de polimerización (GP) de la inulina, así como la presencia de ramificaciones, son propiedades importantes ya que influyen en la funcionalidad de la mayoría de las inulinas. Se hace una distinción estricta entre inulina de origen vegetal y de origen microbiano. El GP de la inulina en una planta es bastante bajo (máximo 200), mientras que la inulina bacteriana tiene un DP muy alto, puede llegar a 100.000 o más unidades de fructosa, en cambio, esta inulina es muy ramificada (= quince%). En la inulina de origen vegetal, las unidades de fructosa unidas a

la glucosa terminal pueden variar desde unas pocas unidades hasta 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definida como un polifrufructano con un DP superior a 30 unidades (Pedreschi *et al.*, 2003; Ricca *et al.*, 2007). Además, se define como un carbohidrato de almacenamiento presente en muchas plantas, vegetales y cereales, por lo que se encuentra en diversos productos de la industria alimentaria, siendo considerado actualmente un elemento clave en el mercado de productos funcionales (Madrigal & Sangronis, 2007).

En la inulina de achicoria, el número de unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal puede variar de 2 a 70, siendo una mezcla de oligómeros y polímeros. El GP más alto de origen vegetal se ha encontrado en la alcachofa (*Cynara scolymus*), por encima de 200 (Lara-Fiallos *et al.*, 2017).

2.3.2. Fructosa

Se ha demostrado que los oligosacáridos que contienen D-fructosa en su estructura, conocidos genéricamente como fructooligosacáridos, tienen propiedades nutricionales beneficiosas tanto para la dieta animal como para la humana. Estos oligosacáridos modifican la flora intestinal favoreciendo, particularmente, un aumento de la proporción de bacterias de tipo *Bifidus* en el tracto digestivo.

Los oligosacáridos existen naturalmente en alimentos como la leche, la miel, las verduras, las frutas, los cereales, las legumbres y las nueces. Pueden extraerse de estos últimos u obtenerse mediante procesos físicos, químicos o enzimáticos (Ruas-Madiedo *et al.*, 2015; Mano *et al.*, 2018; Panesar *et al.*, 2013). Se pueden clasificar además en digeribles y no digeribles (NDO). La razón por la que los humanos no pueden digerir algunos de estos oligosacáridos es la presencia de enlaces glicosídicos que son resistentes a la hidrólisis por enzimas en el tracto intestinal. Sin embargo, algunos de los microorganismos que habitan en el intestino (microbiota intestinal) cuentan con enzimas capaces de romper este tipo de enlaces. Los NDO se clasifican como prebióticos porque muestran ciertos efectos positivos en la salud humana al ser fermentados por bacterias del colon y estimular el crecimiento de especies beneficiosas, principalmente lactobacilos o bifidobacterias. Además, se ha descubierto que participan en la

regulación del sistema inmunológico, protegen contra ciertos tipos de cáncer como el de colon y previenen enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Ruas-Madiedo *et al.*, 2015; Mano *et al.*, 2018; Patel & Goyal, 2012). Dentro de los NDO encontramos diferentes grupos según las moléculas que los componen: fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos y mananooligosacáridos (Mano *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2017).

Los FOS son uno de los grupos de prebióticos más examinados (Campbell *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2017,14). Se añaden a muchos alimentos como galletas, yogur, fórmulas infantiles y postres debido a sus posibles beneficios (Bali *et al.*, 2015). Están formados principalmente por moléculas de fructosa y una molécula terminal de glucosa. Estas fructosas pueden unirse entre sí mediante enlaces glicosídicos β (2-1) o β (2-6), los cuales son resistentes a las enzimas intestinales (Campbell *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2017; Bali *et al.*, 2015). Los FOS más simples con enlaces β (2-1) son la 1-kestosa (glucosa – fructosa - fructosa), la nistosa (glucosa – fructosa – fructosa - fructosa) y la 1- β -fructoranosil nistosa (glucosa – fructosa -fructosa – fructosa - fructosa). Como prebióticos, favorecen el crecimiento y/o la actividad de determinadas especies y cepas de la biota intestinal en el colon. Además, se ha demostrado que participan en la activación del sistema inmunológico, inhiben el crecimiento de microorganismos dañinos, intervienen en la síntesis de vitaminas tipo B, reducen el colesterol sérico, regulan la absorción de algunos minerales y previenen la aparición de cáncer de colon (Mano *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2017; Di Bartolomeo *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2010).

2.4. Ácido gálico

El ácido gálico (GA, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es un componente fenólico natural extraído de plantas, especialmente del té verde, las uvas y las bayas (Lu *et al.*, 2006; Yilmaz & Toledo, 2004). Exhibe una variedad de actividades biológicas, como antiinflamatorias (Kroes *et al.*, 1992), antioxidantes (Aruoma *et al.*, 1993) y de inhibición enzimática (Cirillo *et al.*, 2010). Además, el GA ha sido identificado como un reticulante o plastificante fenólico natural que puede modificar el rendimiento mecánico de los materiales poliméricos naturales (Sun *et al.*, 2014).

El ácido gálico se utiliza ampliamente como ingrediente revelador en fotografía y tintas de impresión. También sirve como precursor para la producción comercial de un fármaco antimicrobiano trimetoprima, un galato de propilo conservante de alimentos y algunos colorantes (Pourrat *et al.*, 1997). Además de esto, el ácido gálico posee una amplia gama de actividades biológicas, como antioxidante, antibacteriano, antiviral, analgésico, etc. Como antioxidante, el ácido gálico actúa como agente antiapoptótico y ayuda a proteger las células humanas contra el daño oxidativo (Treviño-Cueto *et al.*, 2007). También se ha descubierto que el ácido gálico muestra actividad citotóxica contra las células cancerosas, sin dañar las células normales (Mondal *et al.*, 2001). Debido a sus diversas propiedades interesantes y aplicaciones comerciales, el ácido gálico es un compuesto de gran interés tanto para la industria farmacéutica como para la química. Convencionalmente, el ácido gálico se produce mediante hidrólisis ácida del ácido tánico, pero tiene desventajas de costo, rendimiento y baja pureza. Alternativamente, el ácido gálico puede producirse mediante la hidrólisis microbiana del ácido tánico por la tanasa (tanina-acilhidrolasa EC 3.1.1.20), una enzima inducible, secretada por microorganismos (Pinto *et al.*, 2001).

2.5. Encapsulación

En términos generales, la microencapsulación consiste en atrapar sustancias sólidas, líquidas o gaseosas dentro de pequeñas estructuras (Desai *et al.*, 2005, Zuidam *et al.*, 2010). Las sustancias encapsuladas se denominan frecuentemente “núcleo”, “agente activo”, “relleno” o “fase interna”, mientras que las sustancias utilizadas como agentes encapsulantes se denominan “cubierta”, “membrana”, “coraza”, “fase externa”, “material de pared” o “matriz” (Zuidam *et al.*, 2010, Nedovic *et al.*, 2011). Dependiendo del tamaño, los sistemas de encapsulación pueden clasificarse en cápsulas (0,001 a 3 mm), microcápsulas (0,1 a 1 μm) o nanocápsulas (1 a 100 nm) (Vasile, 2016).

La tecnología de encapsulación implica el proceso por el que pequeñas partículas, en su mayoría bioactivas, se rodean de una pared que consiste en un polímero formando un complejo

de cubrimiento conocido como cápsula (Muhoza *et al.*, 2020), dicha matriz es semipermeable y fuerte, rodea un núcleo líquido o sólido (Harpeni *et al.*, 2021). Según Burgain *et al.* (2011) las cápsulas producidas pueden ser mononucleares con un solo núcleo cubierto por una capa y agregados con muchos núcleos incrustados en una matriz.

Existe una variedad de métodos tanto físicos como químicos utilizados para proteger las propiedades físicas y químicas de la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, entre los que se encuentra la microencapsulación, que es una de las más utilizadas a escala industrial (Cano-Chauca *et al.*, 2005; Otálora *et al.*, 2015).

De esta forma se obtienen microcápsulas que constan de una membrana semipermeable, fuerte y delgada de un material polimérico, que rodea y a su vez contiene la sustancia de interés, denominada centro activo o núcleo. Estas microcápsulas pueden liberar su contenido a velocidades controladas en condiciones específicas, al mismo tiempo que protegen el compuesto encapsulado de la luz y el oxígeno, cumpliendo así su función de preservar propiedades biológicas o fisicoquímicas.

La mayoría de las microcápsulas son pequeñas esferas con diámetros en el rango de 0,2 μm a 5000 μm . El producto resultante de este proceso tecnológico se denomina “microcápsulas”, “microesferas” (Fu & Hu, 2017), sistemas que difieren en morfología y estructura interna y tamaño que dependerá en gran medida del tipo de atomización y pueden variar entre 1 a 600 μm cuando se utilizan ruedas giratorias, de 10 a 800 μm cuando se utilizan boquillas de presión de un solo fluido y, entre 5 a 300 μm para boquillas de presión de dos fluidos (Rios-Aguirre & Gil-Garzón, 2021). Cuando las partículas tienen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de microencapsulación se denomina “nanoesferas”, “nanopartículas” o “nanocápsulas” (Shaikh *et al.*, 2006; O. Anselmino & Gilg 1928; Lozano, 2009).

En su forma más simple, una microcápsula es una microesfera con una pared uniforme a su alrededor, que está compuesta, por un lado, por un núcleo, relleno o fase interna, que es el material que va al interior de la microcápsula; por otro lado, está la cubierta, revestimiento, material de pared o membrana, que es la encargada de cubrir el material que se encuentra en el interior de la microcápsula. La microcápsula puede tomar diferentes formas dependiendo de diversos factores como los materiales utilizados, el manejo de las variables de secado, entre

otros. Existen diferentes tipos de partículas formadas a partir de microencapsulación que pueden ser: esfera simple que se caracteriza por tener un recubrimiento de partícula de espesor uniforme que contiene un núcleo de forma irregular; varias partículas centrales incrustadas en una matriz continua de material de pared; varios núcleos diferentes dentro de una misma cápsula; y microcápsulas de paredes múltiples (Gibbs *et al.*, 1999).

2.5.1. Materiales encapsulantes

La elección de un material de pared para la microencapsulación es de gran importancia porque puede tener un impacto en la eficiencia de la encapsulación y en la conservación de las propiedades, dándole estabilidad a las microcápsulas obtenidas. El sistema de encapsulación se utiliza con el fin de proteger los compuestos a encapsular de factores que puedan provocar su deterioro, evitar la interacción prematura entre el material del núcleo y otros ingredientes, limitar las pérdidas volátiles y facilitar una liberación controlada o sostenida de forma dirigida de acuerdo con la aplicación que se quiera dar a las mismas (Shahidi & Han, 1993).

Un material encapsulante se define como un componente que forma un recubrimiento de capa delgada sobre una superficie. Esta capa puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica o una combinación de ambas. Las cubiertas orgánicas presentan frecuentemente pigmentos, extensores y otros aditivos como catalizadores, absorbentes, modificadores y antioxidantes (Kosaraju, *et al.*, 2006). El primer material encapsulante utilizado fue la gelatina (Fanger, 1974), pero actualmente existe una gran variedad de compuestos que responden a las diferentes matrices o compuestos que se buscan proteger mediante microencapsulación. Las características relevantes asociadas al tipo de material encapsulante tales como: la cobertura específica y algunas características de interés para su posterior aplicación. Estos materiales deben tener características ideales para ser utilizados como recubrimiento en un proceso de microencapsulación en alimentos, tal y como han descrito varios autores (Parra, 2010; Fuentes *et al.*, 2016): a) baja viscosidad a altas concentraciones, b) facilitar la formación de películas, c) propiedades emulsionantes, d) baja higroscopicidad, para evitar aglomeraciones y facilitar su manipulación, e) alto contenido de sólidos, f) bajo costo, g) no tener sabor, h) no reaccionar con

el material que será encapsulado y ser insoluble en él, i) ser soluble en la matriz donde se realizará la aplicación y j) fácil adquisición.

2.5.2. Microencapsulación mediante secado por aspersion

La microencapsulación mediante secado por aspersion ha sido objeto de estudio durante varias décadas y ha estado en constante innovación, convirtiéndose en una de las tendencias más importantes para la industria alimentaria (Risch & Reineccius, 1995), cosmética (Barroso *et al.*, 2014), farmacéutica (Krajišnik *et al.*, 2017), textil (Badulescu *et al.*, 2010), entre otros (Gouin, 2004). El secado por aspersion es una de las técnicas de encapsulación más antiguas, que se remonta a la década de 1930, donde las primeras aplicaciones se centraron en la microencapsulación de sabores, utilizando goma de acacia como material de pared o encapsulante (Shahidi & Han, 1993). El principio de acción del secado por aspersion utilizado para la microencapsulación consiste en: i) alimentar a la cámara o torre de secado una matriz, conformada por el compuesto de interés a encapsular y un material protector o encapsulante, la cual se homogeneiza hasta formar una dispersión (Bruschi, 2015) o emulsión (Jelvehgari, & Montazam, 2012), dependiendo de la naturaleza del compuesto y su afinidad química con el encapsulante; esta alimentación se realiza de forma continua y bajo presión mediante un sistema de boquilla o disco giratorio (Ye *et al.*, 2007); ii) cuando el sistema se introduce en la torre de secado, entra en contacto con una corriente de aire caliente que puede ser en contracorriente y comienza la rápida eliminación de la humedad de la matriz, transformándose en pequeñas esferas, no porosas. partículas, recubiertas por una fina capa o película del encapsulante, que en su interior tienen una fase interna definida; iii) las microcápsulas formadas al salir de la cámara de secado pasan por un ciclón y se depositan en el colector donde pueden ser recolectadas (Risch & Reineccio, 1995).

La técnica de microencapsulación por secado por aspersion se caracteriza por sus bajos costos en comparación con otros métodos de secado utilizados (Moreno *et al.*, 2016), de ahí que exista una gran variedad de aplicaciones, entre las que se encuentran la encapsulación de esencias (Frascareli *et al.*, 2012), bebidas en polvo (Reineccius, 2004), saborizantes (Shaikh *et al.*, 2006), probióticos (Lozada, 2021), colorantes (Rodríguez-Amaya, 2019), entre otros. Debido a la

amplia diversidad de aplicaciones, la microencapsulación actuará como un mecanismo de protección, de acuerdo a la composición química, polaridad, solubilidad, propiedades físicas y funcionales de cada matriz, mejorando aspectos como: i) vida útil del agente encapsulado evitando la oxidación, como en el caso de los aceites esenciales o las vitaminas liposolubles; ii) prolongar la estabilidad y actividad funcional de compuestos termolábiles o altamente reactivos, como los antioxidantes; iii) facilitar la incorporación de compuestos insolubles, debido a la interacción que se facilita entre el material encapsulante y el medio o disolvente en el que se va a dispersar; iv) conservar los perfiles de aroma y sabor por más tiempo; y finalmente v) la biodisponibilidad de nutrientes al facilitar la liberación controlada en los sitios de interacción requerida, entre otros beneficios (de Souza *et al.*, 2015; Moreno *et al.*, 2018).

CAPITULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Investigación de Ciencias de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias ubicado en la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí (ULEAM), el mismo que geográficamente se encuentra ubicado entre las siguientes coordenadas 0°57'10' Latitud Sur 80°44'43' Longitud Oeste y una Altitud de 6 msnm, Manta-Manabí-Ecuador.

3.2. DURACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El tiempo fue de 3 años

3.3. FACTORES EN ESTUDIO

Los factores que se manejaron para el desarrollo y estudio de recubrimientos comestibles fueron:

- Factor A: Microorganismos probióticos.
- Factor B: Tipo de prebióticos.

➤ NIVELES

Para el factor Microorganismos probióticos se utilizaron los siguientes niveles:

- $A_1 = Lactococcus\ lactis$
- $A_2 = Lacticaseibacillus\ casei$

Para el factor Tipo de prebióticos se utilizaron los siguientes niveles:

- $B_1 = Fructosa$

- B₂ = Inulina

3.4. COMBINACIONES

Dada la combinación de los diferentes niveles contenidos en cada factor se obtuvieron como resultado las combinaciones indicadas en la Tabla 2:

Tabla 1. Combinaciones de los probióticos y prebióticos utilizados

Combinación	Código	Descripción	
		Probiótico	Prebióticos
A1B1	a ₁ b ₁	Lactococcus lactis	Fructosa
A1B2	a ₁ b ₂	Lactococcus lactis	Inulina
A2B1	a ₂ b ₁	Lacticaseibacillus casei	Fructosa
A2B2	a ₂ b ₂	Lacticaseibacillus casei	Inulina

3.5. EXPERIMENTAL

3.5.1 Estudio de la cinética de crecimiento microbiano

Selección de cepas bacterianas, prebióticos y condiciones de crecimiento

Se seleccionaron dos cepas de bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* CU-R-704, *Lacticaseibacillus casei* CU-L-CASEI) y dos fuentes prebióticas (inulina y fructosa). Las cepas probióticas y los prebióticos fueron adquiridas a Descalzi S.A (Ecuador). La activación inicial de las bacterias ácido lácticas en combinación con prebióticos se realizó en medio de agua bidestilada estéril a pH 6,5 ± 0,2. con incubación a 37 °C durante 24 a 48 h.

Las cepas de *Escherichia coli* (ATCC CECT-4076), *Salmonella spp.* (ATCC CECT-708) y *Listeria monocytogenes* (ATCC CECT-5672) se utilizaron como patógenos de control y fueron aisladas de queso perteneciente a una Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y proporcionadas en estado liofilizado por Laboratorios Certificados Españoles (Universidad de Valencia, España). Estas cepas se activaron en caldo de soja tríplico (TSB), caldo infusión cerebro corazón (BHI) y caldo nutritivo (BN) de las marcas (HIMEDIA y MERCK) a pH 7,2 ± 0,2. El tiempo de esterilización en autoclave fue 15 minutos a 121°C, con incubación a 37 °C durante 24 h.

Conservación de las cepas bacterianas

La conservación de las cepas (BAL), consistió en mantener los cultivos viables a lo largo del tiempo, puros, sin contaminaciones y sin cambios en sus características, es decir, estables. La técnica utilizada fue el subcultivo seriado, que radicó en resembrar las cepas de microorganismos estudiados cada cierto tiempo en el medio adecuado. Para el caso de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI), se realizó un cultivo sobre medio semisólido de Tioglicolato (DIFCO), con adición de 0,01 g de carbonato de calcio por crioviales y pH $7,1 \pm 0,2$. El tiempo de esterilización en autoclave fue 15 minutos a 121°C , la temperatura de incubación de 37°C por 48 horas, posteriormente se almacenó a temperatura entre -20 y -70°C en crioviales de 2 mL hasta su posterior procesamiento (Gurjot Deepika *et al.*, 2012 y Benjamin *et al.*, 2021).

Las cepas patógenas de control utilizadas *Escherichia coli* (ATCC CECT-4076), *Salmonella* spp. (ATCC CECT-708) y *Listeria monocytogenes* (ATCC CECT-5672), fueron cultivadas sobre agar nutritivo (DIFCO) inclinado, a 35°C para posibilitar el crecimiento óptimo de los microorganismos. Luego fueron transferidas a un compartimiento refrigerado (4°C) en crioviales de 5 mL que contenían glicerol al 20 % (v/v) para lentificar el metabolismo de las bacterias. El procedimiento de resiembra de las cepas de microorganismos se realizó cada 20 días, para así detectar con mayor precisión los contaminantes microbianos.

Actividad antibacteriana: métodos de ensayo de difusión con disco-placa

La difusión con disco-placa se realizó por triplicado de acuerdo a la metodología descrita por Tsuchida *et al.* (2018); Neveling *et al.* (2020) y Akihiko y Suzuki (2021); con algunas modificaciones en lo que respecta al método de difusión de pozos de agar. La suspensión de las cepas bacterianas indicadoras Gram positivas y negativas se ajustó a la escala del estándar McFarland a 0,5, la cual se utilizó para medir el número de bacterias por mL de suspensión, con la ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis. Se calibró el equipo usando agua bidestilada estéril, después de la lectura se elimina el agua de la cubeta y se seca bien, se procede a colocar los reactivos del estándar McFarland en la cubeta con un volumen de 3 mL, se mide la densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{ nm}}$) y se obtienen los valores de absorbancias de cada reactivo. Luego se preparó el inóculo escogiendo con un hisopo de 1 a 3 colonias frescas en fase exponencial,

las cuales se introducen en solución fisiológica de cloruro de sodio a 0,9 % (p/v) para bacterias patógenas y en caldo MRS para las bacterias lácticas y se lee en el espectrofotómetro a 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$).

Los valores de absorbancias se presentaron entre 0,05 y 0,10 en aquellos casos que dieron por arriba de 0,10 se le adicionó más solución fisiológica y aquellos que dieron por debajo del rango se les añadió más colonias, una vez que se obtiene el inóculo se introduce el hisopo, se mezcla y se exprime bien por las paredes del tubo de ensayo. La siembra se realizó por duplicado en placas de agar Mueller Hinton (BD Difco) con una altura de 4 mm y en tres direcciones distintas, lo más seguido posible para no dejar ningún espacio libre de bacterias y para que tenga la misma probabilidad el disco que la bacteria de ejercer su acción.

Los discos se elaboraron con papel de filtro (Fisher Scientific Q8) de 5 mm de diámetro, después se impregnaron con las disoluciones y fueron llevados a cabo utilizando placas Petri estéril y se llenaron con concentraciones de 100 $\mu\text{l/mL}$ de sobrenadante libre de células en medios de agua bidestilada de cada cepa, *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI), con combinación prebiótica de inulina y fructosa (ajustada a pH 6,5 mediante NaOH 1 N) obtenida por centrifugación repetida a 4000 rpm durante 10 min y esterilización con filtro de 0.22 μm . Las placas de agar Mueller Hinton con cada cepa indicadora se incubaron aeróbicamente a 37 °C durante 24 h. Posteriormente a la incubación se midieron los diámetros (mm) de la zona de inhibición alrededor del disco como actividad antimicrobiana. Las cepas con zonas de inhibición de menos de 6 mm de diámetro, entre 6 y 10 mm y más de 10 mm se clasificaron como no inhibidores, inhibidores intermedios e inhibidores fuertes, respectivamente.

Curva de calibración para determinar la concentración de células estimadas de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI)

Previamente a la realización de la curva de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa, se determinó la concentración celular estimada (células/mL) siguiendo la metodología de Arcos *et al.* (2004) con ligeras modificaciones mediante una curva de calibración a partir de los valores conocidos de densidad óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) dados en absorbancia (A) y de aproximación de concentración celular (células/mL)

de los estándares de patrones de McFarland, como lo indican Dalynn (2014) y McFarland (2020). Se preparó una escala con cinco (5) puntos e iniciando con los valores de densidad óptica (DO_{600nm} 0.5 a ~ 4) dados en absorbancia (A) y una suspensión celular aproximada a $1,5 \cdot 10^8$ células/mL y un máximo de $1,2 \cdot 10^9$ células/mL. De acuerdo con esta información se generó la ecuación linealizada para interpolar y estimar la concentración celular (células/mL):

$$C = 0,0966 + 0,0511 (A) \quad (1)$$

Donde: C = concentración de células (células/mL) y A = absorbancia de los cultivos bacterianos.

La concentración celular estimada se usó para las proyecciones de las curvas de cinética de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa (Figura 3).

Cinética de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) en medio líquido

Se generaron los tratamientos producto de la combinación de probióticos de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) y sus respectivos prebióticos (inulina y fructosa) en medio líquido, siendo estos *L. lactis* + fructosa; *L. lactis* + inulina; *L. casei* + fructosa y *L. casei* + inulina.

Se consideró tres preinóculos por cada tratamiento y preparados de la siguiente manera: inoculación de cada una de las cepas por separado al 0,1 % (p/v) ≈ 1 g/L en agua bidestilada estéril, el medio se lo preparó según Rodríguez et al. (2019) con modificaciones en porcentaje de la fuente de carbono la cual fue suplementado con 1 % (p/v) ≈ 10 g/L de cada prebiótico (inulina y fructosa). Las células se cultivaron a 200 rpm, a pH $6,5 \pm 0,2$ y 37 °C por 24 horas en matraces de 100 mL que contenían 10 mL de preinóculo, según Deepika et al. (2009).

Cuando los preinóculos alcanzaron una densidad óptica (OD) 600 nm entre 0,05 y 0,1 (tiempo aproximado para salir de la fase Lag o de latencia consecuencia de la criopreservación (Ludwig y Bryant, 2011), los cultivos fueron llevados a un volumen de 100 mL de medio a razón de 0,1 % (v/v), preparado de la misma manera que los preinóculos. Se emplearon erlenmeyers de 250 mL para cada tratamiento diseñado, en donde se vertieron los preinóculos frescos a razón

de 0,1 % (v/v) y se cultivaron en agitación constante a 200 rpm, a pH 6.5 ± 0.2 y 37 °C por 12 horas.

Se prepararon y estandarizaron los inóculos con la suspensión bacteriana proveniente de la fase de crecimiento exponencial a concentración óptima para que la densidad óptica inicial a 600 nm correspondiera a 0,05 ($1,5 \cdot 10^8$ células/mL), y en aquellas preparaciones donde el inóculo presentó un grado de turbidez mayor a este rango 0,05 y 0,10 con respecto al estándar a escala de McFarland equivalente a 0,5 se realizaron diluciones en serie (1:10, 1:100, etc.) con la solución fisiológica hasta ajustarla a lo requerido, y a aquellas que dieron por debajo del rango se le añadió más inóculo.

Posteriormente se tomó una muestra de 3 mL de suspensión bacteriana para obtener las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos en una centrífuga MED INSTRUMENTS/ MPW 352R, se eliminó el sobrenadante, se realizó tres lavados con agua bidestilada estéril para eliminar los residuos del caldo y el pellet de las células bacterianas se suspendió en 3 mL de solución de inulina y/o fructosa al 1 % (p/v).

Asimismo, se analizaron los sobrenadantes a intervalos de tiempo de 17 min durante 6 horas. Además, para realizar la cinética se trabajó según metodologías de Singh *et al.* (2015), Konopacki *et al.* (2020) y Forler *et al.* (2021) y se aseguró el crecimiento sincrónico de los inóculos, con mediciones de la densidad óptica a 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) y llenado de los pocillos en los extremos de la microplaca con 200 μL de agua bidestilada, posteriormente se tomó 200 μL de muestras de las suspensiones bacterianas frescas, inmediatamente se colocaron en los pocillos internos de la microplaca sometida a incubación a 37 °C en el lector de microplaca Synergy H1 (Frederick, 1998; Mytilinaios *et al.*, 2012; Breidt y Fleming, 2020; Neveling *et al.*, 2020; Konopacki *et al.*, 2020 y Krishnamurthi *et al.*, 2021) las cepas de *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei* en caldo vegetal utilizando el modelo sigmoideo de Gompertz modificado (Zwietering *et al.*, 1990; Janf *et al.*, 1992; Mytilinaios *et al.*, 2012 y Singh *et al.*, 2015) se modeló la cinética de crecimiento en condiciones extrínseca de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa, la cual se obtuvo a partir de un intervalo de tiempo la concentración de biomasa en densidad óptica expresados en $\ln N$ ($DO_{600\text{ nm}}$) están dados en absorbancia (A) y la concentración celular estimada expresada en $\ln N$ (células/mL⁻¹).

El modelo modificado de Gompertz presenta tres (3) parámetros de coeficientes de función sigmoideal (A , μ_A y L), que fueron utilizados para encontrar otros parámetros cinéticos que describen el proceso de crecimiento de la concentración microbiana, incluido la velocidad máxima específica de crecimiento medio (μ_M), la velocidad específica de crecimiento exponencial (μ_E), duración de la fase de latencia y/o tiempo de retraso (λ) y el tiempo de generación (T_G). Además, se calcularon parámetros de la relación entre la concentraciones de biomasa y células estimadas expresados en $\ln N$ (DO_{600nm} y células/mL) tales como: número máximo de la relación de concentración de biomasa y células estimadas a la cual las células se aceleran y empiezan a dividirse (X_{MA} y N_{MA}); número máximo de la relación de concentración de biomasa y células estimadas a la cual las células alcanzan su crecimiento medio (X_{MM} y N_{MM}) y valor máximo de la relación de concentración de biomasa y células estimadas a la cual las células alcanzan su crecimiento exponencial (X_{ME} y N_{ME}) (M. Zwietering *et al.*, 1990; Cayré *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2008; Hernández, 2018; Konopacki *et al.*, 2020 y Chambi y Torres, 2021).

Modelo de Gompertz

$$\ln(N/N_0) = A \exp(-\exp(((\mu * e) / A)(L - t) + 1)) \quad (2)$$

Donde: N = logaritmo natural de la concentración de biomasa y células bacteriana expresados en $\ln N$ en un tiempo (t); N_0 = logaritmo natural de la concentración de biomasa y células bacterianas iniciales ($t = 0$) en el cultivo expresados en $\ln N$; A = logaritmo natural de la concentración de biomasa y células bacterianas asintóticas iniciales expresados en $\ln N$; μ = representa la pendiente de la curva y describe velocidad específica de crecimiento (t^{-1}); e = es una constante (2,718); L = tiempo en el que se obtiene el máximo valor de μ ; t = tiempo incubación (h^{-1}) (Zwietering *et al.*, 1990; Agatangelo y Santos, 2007; Castro *et al.*, 2008 y Chambi y Torres, 2021).

Las siguientes fórmulas complementaron los parámetros estimados de la cinética de crecimiento:

$$\mu_E = \frac{A * \mu_A}{e} \quad (3)$$

Donde: μ_E = velocidad máxima específica de crecimiento exponencial; A = ss el logaritmo natural de la concentración de biomasa y células bacteriana asintóticas iniciales expresados en ln N (DO_{600nm} y células/mL); μ_A = velocidad máxima específica de crecimiento de aceleración de la relación entre concentración de células en ln N (DO_{600nm} y células/mL) y e = es una constante (2,718).

$$\mu_M = \frac{\mu_A}{2} \quad (4)$$

Donde: μ_M = velocidad máxima específica de crecimiento medio y μ_A = velocidad máxima específica de crecimiento de aceleración de la relación entre concentración de células en ln N (DO_{600nm} y células/mL).

$$\lambda = L - \frac{1}{\mu_A} \quad (5)$$

Donde: λ = tiempo de retraso y/o duración de la fase de latencia; L = tiempo en que se obtiene el valor máximo de μ .

$$X_{MA} = \frac{1}{\mu_A} \quad (6)$$

Donde: X_{MA} = máxima concentración de biomasa a la cual las células se aceleran y empiezan a dividirse y μ_A = velocidad máxima específica de crecimiento de aceleración.

$$X_{MM} = \frac{1}{\mu_M} \quad (7)$$

Donde: X_{MM} = máxima biomasa a la cual las células alcanzan su crecimiento medio y μ_M = velocidad máxima específica de crecimiento medio.

$$X_{ME} = \frac{1}{\mu_E} \quad (8)$$

Donde: X_{ME} = máxima biomasa a la cual las células alcanzan su crecimiento exponencial y μ_E = velocidad máxima específica de crecimiento exponencial.

$$N_{MA} = \frac{1}{\mu_A} \quad (9)$$

Donde: N_{MA} = número máximo de concentración de células estimadas a la cual las células se aceleran y empiezan a dividirse y μ_A = velocidad máxima específica de crecimiento de aceleración de concentración de células en Ln N (células/mL).

$$N_{MM} = \frac{1}{\mu_M} \quad (10)$$

Donde: N_{MM} = número máximo de células estimadas a la cual las células alcanzan su crecimiento medio y μ_A = velocidad máxima específica de crecimiento medio de concentración de células en Ln N (células/mL).

$$N_{ME} = \frac{1}{\mu_E} \quad (11)$$

Donde: N_{ME} = valor máximo de células estimadas a la cual las células alcanzan su crecimiento exponencial y μ_E = velocidad máxima específica de crecimiento exponencial de concentración de células en Ln N (DO_{600nm}).

Modelo de bondad de ajuste

Se realizó el ajuste del modelo predictivo con los puntos experimentales obtenidos aplicando los criterios estadísticos sugeridos por Torres *et al.* (2012) y Chambi y Torres (2021) siendo estos la desviación estándar y el coeficiente de determinación R^2 .

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (12)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (13)$$

Los datos se analizaron por medio de la técnica estadística del análisis de varianza, utilizando el paquete de software InfoStat Versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017); previamente se probaron la normalidad de los errores (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de la varianza (Prueba de Levene). Se procedió a realizar comparaciones de medias entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 0,05%.

Además, se realizaron gráficos de cinética de crecimiento, coeficiente de correlación múltiple y/o de determinación (R^2), curva de calibración de estándar de patrones McFarland de correlación lineal, distribución normal esperado (prueba de Shapiro-Wilk) y análisis de regresión no lineal en el software Statistica versión 10, Statsoft, Inc. 1984 - 2011, USA (StatSoft Inc, 2011).

Microencapsulación y actividad antimicrobiana de microorganismos BAL

Activación de bacterias del ácido láctico (BAL)

Las cepas puras liofilizadas de *Lactococcus lactis* CU-R-704 y *Lactobacillus casei* CU-L-CASEI se sembraron en medio Man, Rogosa y Sharp (MRS) y se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones anaeróbicas y posteriormente se mantuvieron a 4 °C (cepas de control). Para los estudios, se inocularon tubos de ensayo que contenían caldo MRS (pH 6,0) con 10⁸ UFC/mL de cultivo puro. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en un baño maría a 45° C y se resuspendió en 1/5 de su volumen original en agua destilada. Finalmente se filtró a través de una membrana estéril de 0,22 µm de porosidad. Esta solución madre se denominó suspensión BAL (Pranckute *et al.*, 2014).

Activación de bacterias patógenas.

Para realizar las pruebas de control de patógenos, se utilizaron cepas de *Salmonella* spp. (ATCC CECT-708), *Escherichia coli* (ATCC CECT-4076) y *Listeria monocytogenes* (ATCC CECT-5672), estas cepas fueron aisladas de muestras de queso pertenecientes a una Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y proporcionadas en estado liofilizado por Laboratorios Certificados Españoles (Universidad de Valencia, España). Para la activación posterior, se realizaron caldo de soja tríptico (TSB, HIMEDIA), caldo de infusión cerebro-corazón (BHI, HIMEDIA) y caldo nutritivo (BN, MERCK) a pH 7,2 ± 0,2. Se realizó un proceso de esterilización a 121 °C por 15 minutos, luego se incubaron a 37 °C por 24 h.

Microencapsulación de BAL (*L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI)) mediante secado por aspersión

Las suspensiones inoculadas se sometieron a secado por aspersión Modelo B-290 (Büchi). Las condiciones de proceso que se manejaron fueron temperatura de entrada de 70 ± 5 °C, temperatura de salida 48 ± 3 °C, velocidad de succión 75% y flujo de aire 600NL/h (Rodea-González *et al.*, 2012; Aguilera-Ortiz *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2003).

Eficiencia de encapsulación

El rendimiento de encapsulación (EY) de las microcápsulas se calculó según Cai *et al.* (2014). Las cápsulas se añadieron a una solución salina de peptona templada (37 °C) (1 g/L de peptona, 8,5 g/L de NaCl) y se agitaron durante 30 minutos. EY se calculó de la siguiente manera:

$$\text{EY (\%)} = \text{N}/\text{N0} * 100 \quad \text{(14)}$$

Donde N y N0 son la concentración de células viables liberadas de las microesferas y la concentración celular inicial utilizada en el proceso de microencapsulación, respectivamente. El recuento de células viables se realizó según Zhao *et al.* (2015).

Actividad antibacteriana in vitro: métodos de ensayo de difusión en disco-placa

La actividad antimicrobiana de las BAL (*L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI)) preparadas se determinó utilizando bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* (ATCC CECT-4076 y *Salmonella spp.* (ATCC CECT-708) y Gram positivas (*Listeria monocytogenes* (ATCC CECT-5672)). Se recogieron cultivos microbianos de bacterias patógenas aisladas del queso del Centro Español de Acopio de Cultivos Tipo (CECT, España).

El método de difusión disco-placa se realizó según CLSI (CLSI, 2009) y se utilizó para estudiar el potencial antimicrobiano de las BAL. Los biodiscos se elaboraron con papel de filtro de 5 mm de diámetro (Fisher Scientific Q8) y se impregnaron con inóculos comerciales previamente activados y estandarizados de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) a una tasa del 1 % (p/v) o $1,5 \cdot 10^8$ células/mL en combinación con inulina y fructosa al 1 % (p/v) o 10 g/L.

Los cultivos bacterianos de cepas patógenas Gram positivas y Gram negativas se ajustaron a 0,05 de la escala McFarland Standard mediante lecturas espectrofotométricas a DO 600 nm. Se esparcieron 200 microlitros (μL) de cultivos de bacterias patógenas en cajas de Petri preparadas con 20 mL de agar Mueller Hinton (BD Difco), posteriormente se colocaron los biodiscos de papel de filtro de 5 mm (Fisher Scientific Q2) a una distancia segura de diámetro, por triplicado, según las metodologías descritas por Srihasam *et al.* (2020), Neveling *et al.* (2020) y Suzuki y Suzuki (2021).

El diámetro de la zona de inhibición (mm) se midió con un calibre Vernier después de incubar las bacterias en condiciones aeróbicas durante 24 horas a 37 °C (Srihasam *et al.*, 2020). Las cepas con zonas de inhibición inferiores a 6 mm de diámetro, entre 6 y 10 mm y superiores a 10 mm se clasificaron como no inhibidoras, inhibidoras intermedias e inhibidoras fuertes, respectivamente (Suzuki y Suzuki, 2021).

Actividad antibacteriana *in vivo* (evaluada en queso fresco Manaba)

Los análisis microbiológicos se realizaron evaluando la presencia de *Salmonella* spp., utilizando el método (INEN, 2009); *E. coli* utilizando el método (INEN, 1990) y *L. monocytogenes* utilizando el método (ISO, 1996).

El ANOVA y la significancia de la diferencia entre medias se determinaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$) con el software de estadística InfoStat (Infostat versión 2020). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

El queso que formo parte de esta investigación fue elaborado en el laboratorio de procesos lácteos de la Uleam Manta; para lo cual se adquirió leche cruda la cual se pasteurizó a 65 °C por 15 min y luego se ajustó la temperatura a 38°C para su posterior cuajado por un lapso de 40 min con sobres de cuajo comercial marca HANSEN cuya dosificación prescrita es de 1,6 g para 75 L de leche. Luego de pasado el tiempo indicado se procedió a cortar la cuajada, desuerar, salar, se separó por los tratamientos en estudio aplicando las bacterias patógenas estudiadas, se colocó las BAL encapsuladas estudiadas y se moldeó y escurrió. Posteriormente se realizaron los respectivos análisis microbiológicos, según los tiempos establecidos en la presente investigación.

Como punto de partida el queso fresco puede presentar, a nivel microbiológico, presencia de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *coliformes*, *Clostridium spp*, levaduras y bacteriófagos y como microorganismos benéficos podríamos encontrar *Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp*, *Lactococcus spp*, y *cremoris*.

Evaluación de la supervivencia en condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* de microorganismos BAL

Sustancias químicas y cepas bacterianas

Se utilizaron cepas de bacterias ácido lácticas (*Lactococcus lactis* CU-R-704, *Lacticaseibacillus casei* CU-L-CASEI), las cepas probióticas fueron adquiridas en la empresa Descalzi S.A, Guayquil-Ecuador. Dos fuentes prebióticas (inulina de achicoria, BNEO, Alemania, y D(-)-Fructose, SIGMA ALDRICH, USA). Alginato de sodio (Shandong Jeijing Group, China), cloruro de calcio, medio Man, Rogosa y Sharp (MRS) y agar MRS fueron adquiridos a Sigma-Aldrich® (EE.UU.).

Activación y preparación de los cultivos bacterianos

Las cepas puras liofilizadas de *Lactococcus lactis* CU-R-704 y *Lacticaseibacillus casei* CU-L-CASEI se rehidrataron en 100 mL de caldo MRS estéril, se sembraron en medio Agar MRS y se incubaron a 37 °C durante 48 horas en condiciones anaerobias y posteriormente se mantuvieron en 4 °C (cepas de control). Para los estudios, se inocularon tubos de ensayo que contenían caldo MRS (pH 6,0) con 10⁸ UFC/mL de cultivo puro. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en un baño de agua a 45 °C y se resuspendió en 1/5 de su volumen original en agua destilada. Finalmente, se filtró a través de una membrana estéril de 0,22 µm de porosidad. Esta solución madre se denominó suspensión BAL (Larre *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2020; Varela-Pérez *et al.*, 2022).

Preparación de Cápsulas Cargadas con *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*

Una mezcla de alginato de sodio en agua al 3 % (p/v) se combinó con suspensiones bacterianas de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* de aproximadamente 7,5 log. Se utilizó una solución de cloruro de calcio 0,1 M. para entrecruzar las cadenas y realizar el intercambio iónico entre el sodio y el calcio, para que el polímero se entrecruce y se solidifique. Las suspensiones inoculadas se sometieron a secado por aspersión en un secadero spray (Modelo B-290, Büchi). Las condiciones de proceso fueron temperatura de entrada de 70 ± 5 °C, temperatura de salida 48 ± 3 °C, velocidad de succión 75 % y flujo de aire 600 NL/h (Rodea-González *et al.*, 2012; Aguilera-Ortiz *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2010).

Viabilidad y eficiencia de encapsulación de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*

La viabilidad y la eficiencia de encapsulación de las bacterias se evaluaron disolviendo 1 g de cápsulas en solución de PBS (pH 7) durante 15 minutos con agitación a 2000 rpm con un vórtex (Genie-2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, EE.UU.); Se utilizaron 100 µL como inóculo para posteriores diluciones seriadas y se contaron las colonias. En el caso de las células libres, se omitió el tampón y la agitación. Para la evaluación de viabilidad se utilizó la Ecuación (15):

$$EE (\%) = \frac{\log N}{\log N_0} 100 \quad (15)$$

La viabilidad se da en porcentaje, N_0 es el número de bacterias (log UFC/mL) antes de la encapsulación y N es el número de bacterias (log UFC/mL) liberadas por las cápsulas (Varela-Pérez *et al.*, 2022; Ding y Shah, 2009; Poletto *et al.*, 2019; Chávarri *et al.*, 2010).

Medición del tamaño de las cápsulas

Los tamaños de partícula de las microcápsulas se determinaron midiendo diámetros de 300 microesferas utilizando un estereomicroscopio (Olympus SZX16, Japan). Se calcularon los diámetros medios de las microesferas.

Viabilidad de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* libres y encapsulados en condiciones gastrointestinales simuladas

Para la simulación gastrointestinal se siguió el método de digestión *in vitro* COST INFOGEST (Varela-Pérez *et al.*, 2022; Brodkorb *et al.*, 2019; Minekus *et al.*, 2014). Para la fase oral se tomaron 5 g de cápsulas de cada tratamiento y 5 mL de células libres o 5 mL de células libres.

Posteriormente se mezclaron con 3,5 mL de solución salival que consistió en: 0,5 mL de solución de α -amilasa a 1500 U/mL, 25 μ L de CaCl_2 0,3 M y 975 μ L de agua destilada y se incubaron durante 2 min a 37 °C.; luego se agregaron 7,5 mL de solución madre de electrolitos gástricos previamente preparada para la fase gástrica que consistió en 1,6 mL de solución de pepsina de 25.000 U/mL y 5 μ L de CaCl_2 0,3 M. El pH de la solución se ajustó a $3 \pm 0,2$ con HCl 1 M y se llevó a 20 mL con agua destilada. La fase gástrica se incubó a 37 °C durante 2 h. Al final de la fase gástrica, las muestras se enfriaron en un baño de hielo antes de preparar la fase intestinal.

Para la última etapa, se mezclaron 20 mL de la fase gástrica con 11 mL de solución madre de electrolitos intestinales, 5 mL de pancreatina a 100 U/mL, 40 μ L de CaCl_2 0,3 M y 2,5 mL de solución de bilis al 9 %. El valor del pH se ajustó a $7,0 \pm 0,2$ con NaOH 1 M y se llevó a 40 mL con agua destilada. Posteriormente la fase se incubó a 37 °C durante 2 h a 95 rpm. Las incubaciones de todas las soluciones se llevaron a cabo en un agitador orbital. Al final de cada etapa de la digestión, se tomaron alícuotas de los sistemas LG libres y encapsulados para realizar el análisis de viabilidad mediante placas de Petri. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey utilizando el software de estadística InfoStat (Info stat versión 2020). El nivel de significación se fijó en $p \leq 0,05$. Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos representan las medias \pm desviación estándar.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto *in vitro* de la actividad antibacteriana que ejercen los probióticos y prebióticos sobre bacterias patógenas

Los resultados obtenidos a través del análisis de varianza mostraron que las cepas de probióticos combinadas con prebióticos presentaron una actividad antibacteriana ($p < 0.05$) *in vitro* en *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (Tabla 2). Al respecto, se observaron los mayores valores promedios de diámetros de inhibición (mm) en las cepas probióticas combinadas con inulina en *Salmonella* spp. de $12,33 \pm 1,5$ mm. Mientras tanto, en *L. monocytogenes* el mayor promedio fue el obtenido en *Lactococcus lactis* + Inulina ($12,33 \pm 1,5$ mm); aunque *Lacticaseibacillus casei* + Fructosa y *Lacticaseibacillus casei* + Inulina fueron similares estadísticamente ($p > 0,05$).

Asimismo, el menor valor promedio de diámetro del halo inhibitorio ocurrió con la combinación *Lacticaseibacillus casei* + Fructosa ($7,00 \pm 1,1$ mm), con reducción del 43,22 % en comparación al valor promedio máximo $12,33 \pm 1,5$ que fue observado en otros tratamientos, considerados inhibidores fuertes (Vega et al., 2024; Santander-Cortés & Castro-Rosas, 2024).

Los mayores promedios como *Lacticaseibacillus casei* + inulina y *Lactococcus lactis* + inulina probados tienen capacidad potencial de actividad antibacterial bajo condiciones *in vitro*, y presentaron un fuerte efecto inhibitorio contra la mayoría de las bacterias patógenas probadas (Tabla 2). El estudio experimental indicó que *L. lactis* + fructuosa y *L. casei* + inulina no presentaron diferencia significativa entre las bacterias ácido lácticas y si entre el resto de los tratamientos ($p < 0,05$) presentando diferencia significativa contra *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. ($p < 0,05$) (Tabla 2), así mismo no presentó diferencias significativas contra *Escherichia coli* ($p > 0,05$), pero mostraron actividades antibacterianas con zona de inhibición de $12,33 \pm 1,5$ mm de diámetro considerada como inhibidores fuertes, de acuerdo con la literatura.

Asimismo, los tratamientos con *L. lactis* + inulina y *L. casei* + inulina contra la bacteria *Salmonella* spp., y *E. coli* no presentaron diferencia significativa entre ellos y si en *Listeria* ($p < 0,05$) y se demuestra que también existe actividad antibacteriana contra las bacterias mencionadas que obtuvo una zona de inhibición de $12,33 \pm 1,5$ mm y $10,67 \pm 2,1$ mm de

diámetro considerada como inhibidores fuertes, seguida de *L. lactis* + *fructuosa* con $10,00 \pm 0,0$ mm de diámetro, considerada como inhibidores intermedios y *L. casei* + *fructuosa* con $7,00 \pm 1,1$ mm de diámetro indica como inhibidores intermedios a este tratamiento.

El tratamiento en combinación de *L. lactis* + *inulina* presentó significancia ($p < 0,05$) en la zona de inhibición de crecimiento de *Listeria monocytogenes* con halo de inhibidores fuertes ($12,33 \pm 1,5$ mm de diámetro) en comparación a la combinación de *L. lactis* + *fructosa* también presentó un halo menor de $10,33 \pm 0,8$ mm de diámetro considerado como inhibidores fuertes. Los tratamientos *L. casei* + inulina y *L. lactis* + inulina presentaron las mejores zonas de inhibición, contra todas las bacterias patógenas probadas en este estudio.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de cepas *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* combinada con inulina y fructosa en bacterias patógenas del queso, expresada como diámetro del halo de inhibición teniendo en cuenta la desviación estandar.

Combinacion	<i>E. coli</i> (mm)	<i>Salmonella spp.</i> (mm)	<i>L. monocytogenes</i> (mm)
A1B1	$12,33 \pm 1,5^a$	$10,00 \pm 0,0^b$	$10,33 \pm 0,8^b$
A1B2	$12,33 \pm 1,5^a$	$12,33 \pm 1,5^a$	$11,33 \pm 1,0^{ab}$
A2B1	$10,67 \pm 1,0^a$	$7,00 \pm 1,1^c$	$11,67 \pm 2,0^{ab}$
A2B2	$10,67 \pm 2,1^a$	$12,33 \pm 1,5^a$	$12,33 \pm 1,5^a$

$n = 6$; ^{ab} Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente de acuerdo con la prueba de Tukey al 0,05%.

Las cepas de probióticos combinadas con prebióticos (*Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* combinada con inulina y fructosa) ejercieron una importante actividad antibacteriana que puede antagonizar debido a que estas cepas pueden producir una mayor cantidad de ácido láctico y metabolitos celulares extracelulares con propiedades bactericida contra *Salmonella spp.*, y *Listeria monocytogenes*, pese a que *E. coli* (Tabla 2) no fue afectada estadísticamente, pero si presentó zonas de inhibición fuertes al igual que las otras dos bacterias patógenas que presentaron valores entre 10,67 a 12,33 mm de diámetro con método de difusión con disco-placa, resultados que se asemejan a los obtenidos por Rocha-Ramírez *et al.* (2021) quienes lograron obtener con las cepas de *L. rhamnosus* GG y *L. casei* zonas de inhibición media y fuerte contra *E. coli* (10,00 a 12,00 mm de diámetro); mientras que, Alizadeh *et al.* (2019)

obtuvieron con *L. reuteri* aislado de humanos una zona de inhibición intermedia contra *E. coli* (7 a 10 mm de diámetro).

Soundharrajan *et al.* (2019) demostraron que las cepas de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis* de sobrenadantes frescos extracelulares y sobrenadantes extracelulares desnaturalizados tienen actividad antibacteriana contra *E. coli* en base a zonas inhibitoras fuerte con diámetros variables de 27,67 mm, 26,67 mm, 10,90 mm y 13,70 mm con método de difusión en agar. Aunado a esto, Adivina *et al.* (2019) lograron obtener con la cepa *Lactobacillus plantarum* CIP 103151 una mayor actividad antagonista contra *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* con zona de inhibición fuerte que varió de 19,33 a 21 mm de diámetro. Por otra parte, Argyri *et al.* (2013) han informado que entre las BAL seleccionadas aisladas de productos lácteos fermentados iraníes, especies de *Lactobacillus*, particularmente *L. plantarum* 15HN, mostraron actividad antagonista contra, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* con zonas de inhibición fuerte de 13,7, 12,3 y 12,3 mm de diámetro, respectivamente. En este mismo sentido, Riaz Rajoka *et al.*, 2017 y Adivina *et al.*, 2019) han verificado que todos los *Lactobacillus rhamnosus* aislados de la leche humana presentaron inhibición media a fuerte en el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* utilizando el método de difusión de pocillos de agar con diámetros variables (6 mm a 14 mm).

El sobrenadante libre de células obtenido en caldo MRS de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *L. monocytogenes*, mientras que su actividad antimicrobiana no fue abolida y/o disminuida por el tratamiento con inulina y fructosa, lo que estima que su actividad antimicrobiana no está relacionada con los sustratos utilizados y puede estar asociada con su naturaleza peptídica. En los tratamientos, no se observó pérdida de actividad después de aplicar los sustratos inulina y fructosa, lo que indica que la actividad inhibitora de la cepa *L. lactis* (CU-R-704) no se debió a los sustratos inulina y fructosa.

Además, la cepa *L. lactis* (CU-R-704) puede tener una influencia directa a partir de bacteriocina natural de clase I que produce antibióticos tales como la nisina A y Z ejerciendo una fuerte actividad para inhibir flora Gram negativa y positiva (*E. coli*, *Salmonella spp.*, y *L. monocytogenes*) (De Vuyst, 1992; Akihiko y Suzuki, 2021). Estos autores reportaron que la cepa de *L. lactis* (CBW2) posee el gen estructural para el precursor de nisina A, y la deducción de su

secuencia reveló una coincidencia del 100 % con la de la nisina Z. Estos resultados sugieren que la cepa *L. lactis* (CBW2) produce el precursor de sustancias similares a la nisina Z la cual tendría una función de control del crecimiento. La cepa de *L. casei* (CU-L-CASEI) también presentó actividad de inhibidores intermedios y fuertes contra bacterias *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *L. monocytogenes* debido posiblemente a la bacteriocina natural de clase III como la caseicina. Igualmente, Klaenhammer (1993) y Ramos Gorbeña y Sáenz (2009) reportaron que la mayoría de estas bacteriocinas clase III son producidas por el género *Lactobacillus*.

Según el resultado de actividad antimicrobiana, todas las cepas poseían actividades inhibitoras de bacterias Gram negativa y positiva, y su disparidad en la actividad de antagonismo contra diferentes patógenos indica que las cepas probióticas estudiadas son altamente específicas de patógenos y un requisito previo para el potencial probiótico. En general, la actividad antimicrobiana de los probióticos puede deberse a la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas. Por lo tanto, al producir estos compuestos antimicrobianos, los microorganismos probióticos obtienen una ventaja sobre otros microorganismos para sobrevivir en las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (Handa, 2012 y Adivina *et al.*, 2019).

La actividad de inhibición bacteriana se expresa en la fase logarítmica temprana y en la fase estacionaria (Ogunbanwo *et al.*, 2003; Ramos Gorbeña y Sáenz, 2009) por lo que a la hora de aplicar las bacteriocinas a un alimento a partir de un cultivo iniciador y/o para su purificación, es importante realizar un modelado matemático no lineal para poder considerar las etapas de velocidad máxima específica de producción de la bacteriocina que se presenta en la fase logarítmica con el fin de aumentar la efectividad del proceso de acción de estos compuestos frente a microorganismos deterioradores y/o patógenos importantes.

Las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas se autoprotegen de la toxicidad de sus compuestos mediante la expresión de una proteína de inmunidad específica. Es de acuerdo con el tipo de alimento que se quiere preservar con bacteriocinas, que dependerá de su almacenamiento, para lograr que todos los efectos en conjunto permitan la aplicación efectiva de estos biopreservantes naturales, lo que podría requerir de la combinación con otros métodos

de conservación como la refrigeración, ya que es un método utilizado para extender la vida útil de alimentos perecibles como lácteos y sus derivados susceptibles a las alteraciones por *E. coli*, *Salmonella spp.*, y *L. monocytogenes* que deben controlarse para que las bacterias lácticas puedan seguir reproduciéndose y liberando más compuestos biopreservantes en el alimento, lo cual da estabilidad al producto y logra periodos de vida útil más amplios.

Curva de calibración para determinar de concentración celular estimada a partir de densidad óptica y de aproximación de concentración celular de los estándares de patrones de McFarland

Se obtuvieron los valores de densidad óptica (DO_{600nm}) y de aproximación de concentración celular (células/mL) de los estándares de patrones de McFarland, según una escala comprendida entre 0.5 a ~4 (Tabla 3). Los resultados obtenidos fueron ajustados con una ecuación lineal: $y = 0.0966 + 0.0511(x)$, con un coeficiente de determinación R^2 de 0,97 (Figura 1). Los datos obtenidos de la correlación lineal entre la aproximación de concentración celular y densidad óptica (Figura 1) fue utilizada para interpolar todos los datos de las cinéticas de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa (Tabla 5).

Tabla 3. Valores de densidad (DO_{600nm}) y concentración celular (células/mL) de acuerdo con los Estándares de patrones McFarland.

Estándar McFarland	BaCl ₂ al 1% (mL)	H ₂ SO ₄ al 1% (mL)	A (DO_{600nm})	Concentración celular bacteriana aproximada (células/mL)
0,5	0,05	9,95	0,132	$1,5 \cdot 10^8$
1	0,1	9,90	0,257	$3,0 \cdot 10^8$
2	0,2	9,80	0,451	$6,0 \cdot 10^8$
3	0,3	9,70	0,582	$9,0 \cdot 10^8$
4	0,4	9,60	0,669	$1,2 \cdot 10^9$

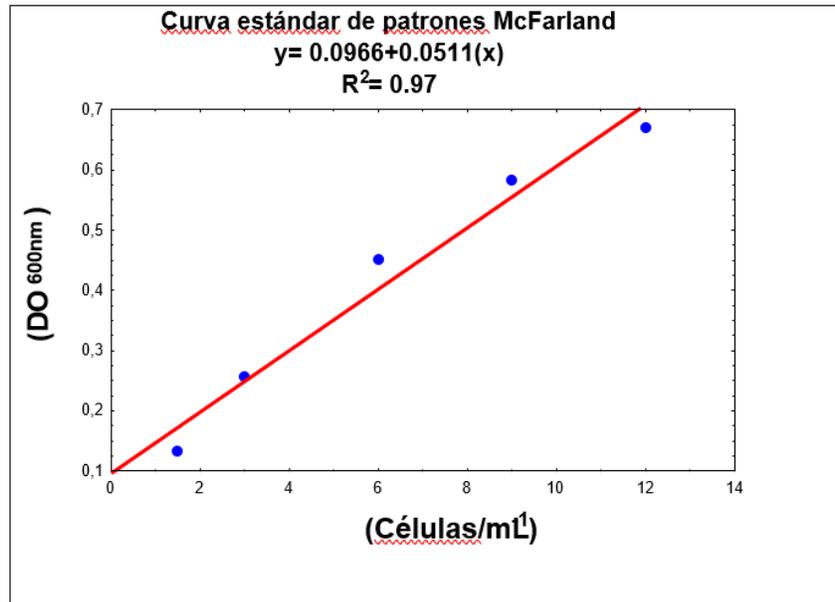


Figura 1. Estándar de patrones McFarland para cuantificar la concentración celular estimada.

Los resultados de este estudio muestran que la calibración obtenida al graficar valores de DO 600 nm dados en absorbancia (A) frente a la aproximación de concentración estimada de la concentración de células/mL (Figura 1) a partir de la tabla conocida de escala de los estándares de patrones McFarland (Tabla 3), es una herramienta válida para estimar las concentraciones celulares de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con un valor de R^2 cercano a 1; de acuerdo a lo reportado por Arcos *et al.* (2004). Los patrones MacFarland a (DO 600nm) representan un procedimiento práctico, rápido, simple, confiable y económico cuando se trata de estimar concentraciones celulares.

Silvestri *et al.* (2018) en su estudio específicamente en la calibración de los datos en ln N (DO 600 nm, 0,1 a ~1,5 y concentración en UFC o células/mL) obtuvieron coeficientes de determinación muy similares a los reportados en esta tesis con otras especies como *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* con valores de $R^2 = 0,95, 0,96$ y $0,98$ respectivamente.

Valores promedios de crecimiento en densidad óptica (DO 600nm) y concentración celular estimada (células/mL)

Las tablas 4 y 5, muestran los valores correspondientes a los diferentes promedios de ln N (DO_{600nm}) y concentración estimada de células (10⁸ células/mL) estimados para cada uno de los tratamientos aplicados al crecimiento en condiciones extrínseca de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa, respectivamente.

Tabla 4. Valores promedios de crecimiento en ln N de *L. lactis* y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa

Tiempo (Horas)	Crecimiento de biomasa							
	Combinacion							
	A1B1	ln N	A1B2	ln N	A2B1	ln N	A2B2	ln N
0	0,3397 ± 0,03	0,00	0,2723 ± 0,04	0,00	0,1497 ± 0,02	0,00	0,3535 ± 0,19	0,00
0,17	0,4010 ± 0,06	0,17	0,2813 ± 0,02	0,03	0,1580 ± 0,02	0,05	0,3540 ± 0,19	0,00
0,33	0,3940 ± 0,07	0,15	0,2880 ± 0,01	0,06	0,1613 ± 0,02	0,08	0,3545 ± 0,19	0,00
0,5	0,4107 ± 0,08	0,19	0,2947 ± 0,01	0,08	0,1623 ± 0,02	0,08	0,3608 ± 0,18	0,02
0,67	0,4343 ± 0,09	0,25	0,2970 ± 0,01	0,09	0,1633 ± 0,02	0,09	0,3670 ± 0,19	0,04
0,83	0,4677 ± 0,09	0,32	0,2980 ± 0,01	0,09	0,1637 ± 0,02	0,09	0,3680 ± 0,19	0,04
1	0,4980 ± 0,09	0,38	0,2997 ± 0,01	0,10	0,1647 ± 0,02	0,10	0,3685 ± 0,19	0,04
1,17	0,5173 ± 0,09	0,42	0,3000 ± 0,01	0,10	0,1660 ± 0,02	0,10	0,3740 ± 0,19	0,06
1,33	0,5310 ± 0,09	0,45	0,3030 ± 0,01	0,11	0,1673 ± 0,03	0,11	0,3750 ± 0,19	0,06
1,5	0,5420 ± 0,08	0,47	0,3090 ± 0,01	0,13	0,1680 ± 0,02	0,12	0,3800 ± 0,20	0,07
1,67	0,5543 ± 0,08	0,49	0,3147 ± 0,01	0,14	0,1693 ± 0,02	0,12	0,3870 ± 0,20	0,09
1,83	0,5623 ± 0,07	0,50	0,3200 ± 0,02	0,16	0,1700 ± 0,04	0,13	0,3915 ± 0,20	0,10
2	0,5710 ± 0,07	0,52	0,3243 ± 0,03	0,17	0,1710 ± 0,03	0,13	0,3975 ± 0,20	0,12
2,17	0,5807 ± 0,06	0,54	0,3237 ± 0,03	0,17	0,1727 ± 0,04	0,14	0,4040 ± 0,21	0,13
2,33	0,5873 ± 0,06	0,55	0,3240 ± 0,02	0,17	0,1733 ± 0,03	0,15	0,4140 ± 0,22	0,16
2,5	0,5907 ± 0,06	0,55	0,3230 ± 0,02	0,17	0,1737 ± 0,03	0,15	0,4145 ± 0,22	0,16
2,67	0,5923 ± 0,06	0,56	0,3227 ± 0,02	0,17	0,1740 ± 0,02	0,15	0,4195 ± 0,23	0,17
2,83	0,5927 ± 0,05	0,56	0,3220 ± 0,02	0,17	0,1743 ± 0,04	0,15	0,4195 ± 0,23	0,17
3	0,5923 ± 0,05	0,56	0,3217 ± 0,02	0,17	0,1747 ± 0,03	0,15	0,4250 ± 0,23	0,18
3,17	0,5883 ± 0,05	0,55	0,3217 ± 0,02	0,17	0,1750 ± 0,02	0,16	0,4300 ± 0,24	0,20
3,33	0,5853 ± 0,06	0,54	0,3217 ± 0,02	0,17	0,1753 ± 0,03	0,16	0,4325 ± 0,24	0,20
3,5	0,5830 ± 0,06	0,54	0,3227 ± 0,02	0,17	0,1757 ± 0,03	0,16	0,4585 ± 0,27	0,26
3,67	0,5777 ± 0,06	0,53	0,3247 ± 0,02	0,18	0,1760 ± 0,03	0,16	0,4725 ± 0,29	0,29
3,83	0,5700 ± 0,05	0,52	0,3250 ± 0,02	0,18	0,1767 ± 0,04	0,17	0,4730 ± 0,29	0,29
4	0,5693 ± 0,04	0,52	0,3260 ± 0,02	0,18	0,1770 ± 0,04	0,17	0,4810 ± 0,30	0,31
4,17	0,5727 ± 0,05	0,52	0,3270 ± 0,02	0,18	0,1773 ± 0,04	0,17	0,4880 ± 0,30	0,32
4,33	0,5777 ± 0,05	0,53	0,3260 ± 0,03	0,18	0,1777 ± 0,04	0,17	0,4940 ± 0,31	0,33
4,5	0,5823 ± 0,05	0,54	0,3267 ± 0,03	0,18	0,1780 ± 0,04	0,17	0,4990 ± 0,31	0,34
4,67	0,5873 ± 0,06	0,55	0,3243 ± 0,03	0,17	0,1783 ± 0,03	0,18	0,5295 ± 0,35	0,40

4,83	0,5910 ± 0,06	0,55	0,3237 ± 0,03	0,17	0,1773 ± 0,04	0,17	0,5180 ± 0,34	0,38
5	0,5947 ± 0,06	0,56	0,3223 ± 0,03	0,17	0,1757 ± 0,04	0,16	0,5100 ± 0,34	0,37
5,17	0,5977 ± 0,07	0,57	0,3197 ± 0,03	0,16	0,1753 ± 0,04	0,16	0,5000 ± 0,33	0,35
5,33	0,6040 ± 0,07	0,58	0,3163 ± 0,03	0,15	0,1740 ± 0,03	0,15	0,5045 ± 0,33	0,36
5,5	0,6073 ± 0,07	0,58	0,3110 ± 0,03	0,13	0,1723 ± 0,03	0,14	0,4925 ± 0,32	0,33
5,67	0,6090 ± 0,07	0,58	0,3090 ± 0,03	0,13	0,1717 ± 0,03	0,14	0,4975 ± 0,33	0,34
5,83	0,6120 ± 0,07	0,59	0,3060 ± 0,03	0,12	0,1713 ± 0,04	0,14	0,5070 ± 0,34	0,36
6	0,6163 ± 0,07	0,6	0,3003 ± 0,03	0,10	0,1687 ± 0,04	0,12	0,5150 ± 0,35	0,38

Tabla 5. Valores promedios de crecimiento de células estimadas en Ln N (células/mL) y determinados en la ecuación de la regresión lineal de la curva estándar de patrones McFarland en un tiempo de 6 horas para *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa.

Tiempo (Horas)	Crecimiento estimado en Ln N (células/mL)							
	$y = 0.0966 + 0.0511(x)$							
	Tratamientos							
	A1B1 ± (DE) ¹	Ln ²	A1B2 ± (DE) ¹	Ln ²	A2B1 ± (DE) ¹	Ln ²	A2B2 ± (DE) ¹	Ln ²
0	4,8E+08 ± 5E+07	0	3,4E+08 ± 8E+07	0	1,04E+08 ± 5E+07	0	5,0E+08 ± 4E+08	0
0,17	6,0E+08 ± 1E+08	0,23	3,6E+08 ± 4E+07	0,05	1,20E+08 ± 4E+07	0,15	5,0E+08 ± 4E+08	0
0,33	5,8E+08 ± 1E+08	0,2	3,7E+08 ± 3E+07	0,09	1,27E+08 ± 4E+07	0,2	5,0E+08 ± 4E+08	0
0,5	6,1E+08 ± 2E+08	0,26	3,9E+08 ± 2E+07	0,12	1,29E+08 ± 4E+07	0,21	5,2E+08 ± 3E+08	0,03
0,67	6,6E+08 ± 2E+08	0,33	3,9E+08 ± 1E+07	0,13	1,31E+08 ± 5E+07	0,23	5,3E+08 ± 4E+08	0,05
0,83	7,3E+08 ± 2E+08	0,42	3,9E+08 ± 1E+07	0,14	1,31E+08 ± 5E+07	0,23	5,3E+08 ± 4E+08	0,05
1	7,9E+08 ± 2E+08	0,5	4,0E+08 ± 1E+07	0,14	1,33E+08 ± 4E+07	0,25	5,3E+08 ± 4E+08	0,06
1,17	8,2E+08 ± 2E+08	0,55	4,0E+08 ± 1E+07	0,15	1,36E+08 ± 5E+07	0,27	5,4E+08 ± 4E+08	0,08
1,33	8,5E+08 ± 2E+08	0,58	4,0E+08 ± 1E+07	0,16	1,38E+08 ± 6E+07	0,29	5,4E+08 ± 4E+08	0,08
1,5	8,7E+08 ± 2E+08	0,61	4,2E+08 ± 2E+07	0,19	1,40E+08 ± 4E+07	0,3	5,5E+08 ± 4E+08	0,1
1,67	9,0E+08 ± 2E+08	0,63	4,3E+08 ± 3E+07	0,22	1,42E+08 ± 3E+07	0,32	5,7E+08 ± 4E+08	0,12
1,83	9,1E+08 ± 1E+08	0,65	4,4E+08 ± 4E+07	0,24	1,44E+08 ± 8E+07	0,32	5,8E+08 ± 4E+08	0,14
2	9,3E+08 ± 1E+08	0,67	4,5E+08 ± 5E+07	0,26	1,46E+08 ± 5E+07	0,34	5,9E+08 ± 4E+08	0,16
2,17	9,5E+08 ± 1E+08	0,69	4,4E+08 ± 5E+07	0,26	1,49E+08 ± 7E+07	0,36	6,0E+08 ± 4E+08	0,18
2,33	9,6E+08 ± 1E+08	0,7	4,5E+08 ± 5E+07	0,26	1,50E+08 ± 6E+07	0,37	6,2E+08 ± 4E+08	0,21
2,5	9,7E+08 ± 1E+08	0,71	4,4E+08 ± 5E+07	0,25	1,51E+08 ± 6E+07	0,37	6,2E+08 ± 4E+08	0,21
2,67	9,7E+08 ± 1E+08	0,71	4,4E+08 ± 4E+07	0,25	1,51E+08 ± 4E+07	0,38	6,3E+08 ± 4E+08	0,23
2,83	9,7E+08 ± 1E+08	0,71	4,4E+08 ± 4E+07	0,25	1,52E+08 ± 7E+07	0,38	6,3E+08 ± 4E+08	0,23
3	9,7E+08 ± 1E+08	0,71	4,4E+08 ± 4E+07	0,25	1,53E+08 ± 6E+07	0,39	6,4E+08 ± 5E+08	0,25
3,17	9,6E+08 ± 1E+08	0,7	4,4E+08 ± 4E+07	0,25	1,53E+08 ± 4E+07	0,39	6,5E+08 ± 5E+08	0,26
3,33	9,6E+08 ± 1E+08	0,7	4,4E+08 ± 4E+07	0,25	1,54E+08 ± 6E+07	0,39	6,6E+08 ± 5E+08	0,27
3,5	9,5E+08 ± 1E+08	0,69	4,4E+08 ± 4E+07	0,25	1,55E+08 ± 6E+07	0,4	7,1E+08 ± 5E+08	0,34
3,67	9,4E+08 ± 1E+08	0,68	4,5E+08 ± 4E+07	0,26	1,55E+08 ± 6E+07	0,4	7,4E+08 ± 6E+08	0,38
3,83	9,3E+08 ± 9E+07	0,67	4,5E+08 ± 4E+07	0,26	1,57E+08 ± 7E+07	0,41	7,4E+08 ± 6E+08	0,38
4	9,3E+08 ± 8E+07	0,67	4,5E+08 ± 5E+07	0,27	1,57E+08 ± 7E+07	0,42	7,5E+08 ± 6E+08	0,4
4,17	9,3E+08 ± 9E+07	0,67	4,5E+08 ± 5E+07	0,27	1,58E+08 ± 7E+07	0,42	7,7E+08 ± 6E+08	0,42
4,33	9,4E+08 ± 9E+07	0,68	4,5E+08 ± 5E+07	0,27	1,59E+08 ± 7E+07	0,42	7,8E+08 ± 6E+08	0,44
4,5	9,5E+08 ± 1E+08	0,69	4,5E+08 ± 5E+07	0,27	1,59E+08 ± 7E+07	0,43	7,9E+08 ± 6E+08	0,45
4,67	9,6E+08 ± 1E+08	0,7	4,5E+08 ± 5E+07	0,26	1,60E+08 ± 7E+07	0,43	8,5E+08 ± 7E+08	0,52
4,83	9,7E+08 ± 1E+08	0,71	4,4E+08 ± 5E+07	0,26	1,58E+08 ± 7E+07	0,42	8,2E+08 ± 7E+08	0,49
5	9,7E+08 ± 1E+08	0,72	4,4E+08 ± 6E+07	0,25	1,55E+08 ± 7E+07	0,4	8,1E+08 ± 7E+08	0,48

5,17	9,8E+08 ± 1E+08	0,72	4,4E+08 ± 6E+07	0,24	1,54E+08 ± 7E+07	0,39	7,9E+08 ± 6E+08	0,45
5,33	9,9E+08 ± 1E+08	0,74	4,3E+08 ± 6E+07	0,22	1,51E+08 ± 7E+07	0,38	8,0E+08 ± 7E+08	0,46
5,5	1,0E+09 ± 1E+08	0,74	4,2E+08 ± 6E+07	0,2	1,48E+08 ± 6E+07	0,36	7,7E+08 ± 6E+08	0,43
5,67	1,0E+09 ± 1E+08	0,75	4,2E+08 ± 7E+07	0,19	1,47E+08 ± 6E+07	0,35	7,8E+08 ± 6E+08	0,45
5,83	1,0E+09 ± 1E+08	0,75	4,1E+08 ± 7E+07	0,18	1,46E+08 ± 8E+07	0,34	8,0E+08 ± 7E+08	0,47
6	1,0E+09 ± 1E+08	0,76	4,0E+08 ± 6E+07	0,15	1,41E+08 ± 7E+07	0,31	8,2E+08 ± 7E+08	0,49

Los valores de la relación entre las concentraciones expresadas $\ln N$ (DO_{600nm} y células/mL) de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa bacterianos obtenidos experimentalmente que se usaron para elaborar la curva de la cinética de crecimiento aplicando el modelo de Gompertz (Tabla 4 y 5); términos generales, el modelo usado en los cuatro tratamientos dan visualmente curvas de crecimiento muy ajustadas (Figura 2 y 3) concuerda con Castro *et al.* (2008); Chambi y Torres (2021) quienes manifiestan que el modelo de Gompertz es mejor que los modelos de regresión lineal simple, puesto que el modelo no lineal predictivo mencionado pueden determinar las fases de crecimiento de cualquier microorganismos y es aplicado actualmente en numerosos estudios y necesario para predecir la vida útil de un producto y desarrollar procesos agroindustriales.

El modelo aplicado para conocer las curvas de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebióticas de inulina y fructosa se ajustó a la relación entre las concentraciones obtenidas en $\ln N$ (DO_{600nm} y Células/mL) donde los coeficientes de funciones sigmoidales de Gompertz determinan que la concentración máxima de crecimiento entre la relación de biomasa y células estimadas de acuerdo a la función (A) especificadas por la asíntota no se vio afectada en (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + Fructosa y presentó las mayores concentraciones que fluctuaron entre 0.556 y 0,713 (Tabla 6 y 7, respectivamente) y $\approx 9.7 \cdot 10^8$ (valor obtenido de Figura 2 y 3, utilizando Tabla 4 y 5); seguido de (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + Inulina con valores de 0.425 y 0.548 (Tabla 6 y 7, respectivamente) y $\approx 8.5 \cdot 10^8$ (valor obtenido de Figura 2 y 3, utilizando Tabla 4 y 5) valores que no se repiten, porque las otras capacidades de carga del resto de tratamientos están por debajo a esas concentraciones, aparentemente la adición de nuevos nutrientes no mejoraría las relaciones entre las concentraciones de biomasa y células estimadas totales que se obtendrían.

Así mismo, el resto de tratamientos presentó una fuerte disminución del valor de la asíntota, resultados que se asemejan a los obtenidos por Śliżewska y Chlebicz-Wójcik (2020) quienes en su investigación con la cepa de *Lactobacillus paracasei* LOCK 1091 usando glucosa e inulina en concentraciones de 1% (p/v) en el medio de cultivo () alcanzaron valores expresado en $\ln N$

de 7,53 y 9,43, respectivamente. Además, contrastan con los obtenidos por los mismos autores, cuando utilizaron la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 1087, empleando como fuente de carbono una mezcla de harinas naturales en proporción de harina: agua, de 1:1, 1:1,5 y 1:2, en un medio de cultivo de fermentación semisólido, donde obtuvieron valores de concentraciones de células de $9.27 \cdot 10^9$, $3.1 \cdot 10^{10}$ y $9,44 \cdot 10^9$ células/mL).

La tasa máxima de crecimiento específico de aceleración (μ_A) en el presente estudio fue máxima para la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa y fueron superiores al resto de las combinaciones con valores de $0,364 \text{ h}^{-1}$ y $0,473 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 6 y 7), esto indica que la fructosa como fuente de carbono fue el factor más importante en la tasa de crecimiento dando una mayor pendiente debido a la afinidad de consumo que tiene el microorganismo hacia este sustrato (Figura 2 y 3). Las otras combinaciones A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina y A2B1 = *Lactocaseibacillus casei* + fructosa presentaron valores de μ_A de $0,104$ a $0,155 \text{ h}^{-1}$ y $0,072$ a $0,187 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 5 y 6). En todos los casos los valores obtenidos en este trabajo son casi un orden de magnitud menor que los reportados por Singh *et al.* (2015), quienes empleando la cepa *Lactococcus lactis* NCIM 2114, obtuvieron tasas máximas de crecimiento específico de aceleración (μ_A) entre $0,97$ a $1,68$ en medio de cultivo MRS bajo condiciones de cero (0) aireación y con agitación constante de 25, 50 y 100 rpm.

Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2019) en su investigación con las cepas de *L. lactis* mostraron valores similares a los de esta investigación con tasa de crecimiento máxima entre $0,27$ a $0,46 \text{ h}^{-1}$ usando un medio líquido FSM. La afinidad de consumo que tiene el la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa hacia la fructosa manifiesta un aceleramiento en la velocidad específica de crecimiento (L) y se alcanza antes de las $0,072$ o $0,092 \text{ h}$ (Tabla 6 y 7); mientras que en el resto de las combinaciones la velocidad máxima se alcanza a tiempos mayores.

El mayor tiempo obtenido para alcanzar la velocidad máxima de crecimiento corresponde a la combinación A2B2 = *Lactocaseibacillus casei* + inulina con $0,805$ y $0,802$ (Tabla 6 y 7), lo cual indica, por la tendencia, que el crecimiento máximo todavía no se ha alcanzado (Figura 2 y 3). Quizás un experimento más largo, consecuencia del tiempo (L) que es un tiempo mayor para que el microorganismo alcance su máximo de velocidad, sería lo ideal; de acuerdo con los resultados obtenidos se debería hacer un experimento más largo entre 10 a 12 horas. En efecto, resultados que concuerdan con Cayré, Vignolo y Garro (2007), quienes en su investigación con

bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas obtuvieron un tiempo mayor donde alcanza su máxima velocidad específica de crecimiento (L) con 0,855 h⁻¹ y contrasta con Singh et al. (2015) quienes obtuvieron en su trabajo de investigación con la cepa *Lactococcus lactis* NCIM 2114 velocidad específica de crecimiento (L) entre 0.33 y 0.53 h⁻¹ en medio de cultivo MRS bajo condiciones de cero (0) aireación y con agitación constante de 25, 50 y 100 rpm.

Las tasas máximas de crecimiento específico de medio (μ_M) en el presente estudio se pudo evidenciar en la relación entre las concentraciones obtenidas. En la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa se obtuvo una tasa máxima de crecimiento medio entre 0,182 y 0,236 (Tabla 6 y 7), indicando que la cepa depende mucho de la cantidad y de la afinidad del sustrato para obtener la mitad de la velocidad máxima de reacción, seguido de la combinación A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina y la combinación A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa con valores de 0,052 a 0,077 y 0,036 a 0,093 (Tabla 6 y 7), en acuerdo? con lo reportado por Singh et al. (2015), quienes obtuvieron con la cepa *Lactococcus lactis* NCIM 2114, tasas máximas de crecimiento específico medio (μ_M) entre 0,48 a 0,84 en medio de cultivo MRS bajo condiciones de cero (0) aireación y con agitación constante de 25, 50 y 100 rpm.

Las tasas máximas de crecimiento específico exponencial (μ_E) fueron las más altas para la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa con valores de 0,075 y 0,124 h⁻¹ (Tabla 6 y 7). Esto puede ser debido a la concentración y la afinidad con la fuente de carbono, lo que permite una mayor velocidad de reacción, y cuando el sustrato alcanza su límite máximo también se alcanza la velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_E). Esto permite conocer cuando la relación microorganismo-sustrato llega a su velocidad máxima y por ende el microorganismo se satura y no requiere más fructosa del medio. A partir de la velocidad máxima de crecimiento exponencial (μ_E) se obtuvo el contenido máximo de nisina a las 1,33 h, mientras que la combinación A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa alcanza el contenido máximo de caseína a las 2,17 h, resultados que son comparables con los obtenidos por Singh et al. (2015) quienes alcanzaron con *Lactococcus lactis* un contenido máximo de nisina a las 4,55 h, demostrando así, que las velocidades de crecimiento específica máxima pueden ser predichas con buena precisión por el modelo de Gompertz (Figura 2 y 3).

Además, los resultados obtenidos no coinciden con los reportados por Dalgaard y Koutsoumanis (2001) quienes manifiestan que el modelo de Gompertz fue inapropiado para la estimación de la velocidad máxima de crecimiento específica exponencial (μ_E). Singh et al. (2015) utilizaron un *Lactococcus lactis*, obteniendo velocidades máximas de crecimiento exponencial (μ_E) entre 0,23 a 0,30 h⁻¹ en medio de cultivo MRS bajo condiciones de 0, 0,2 y 0,4 de aireación y con agitación constante de 25, 50 y 100 rpm. Śliżewska y Chlebicz-Wójcik (2020) mostraron empleando una cepa de *Lactobacillus spp.* en un medio de fermentación semisólido (SSF), tasas de crecimiento máxima específica (μ_E), que variaron entre 0,21 a 0,37 h⁻¹, mientras que μ_E de bacterias cultivadas en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) no excedió el valor de 0,23 h⁻¹.

El tiempo de demora (λ) (Tabla 6 y 7) dependió en gran medida de la afinidad del microorganismos para asimilar el sustrato, especialmente en la fase de latencia en la que la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa presentó la menor disminución en el tiempo de demora entre 2,25 y 2,82 h (Tabla 6 y 7), resultados que se asemejan a lo reportado por Krishnamurthi et al. (2021).

La relación que existe entre el tiempo de demora (λ) en Ln N (DO 600nm y células/mL) son diferente como se muestra en la Tabla 6 y 7, concordando con lo manifestado por Dalgaard y Koutsoumanis (2001), quienes mencionan que los valores relacionados (DO dado Absorbancia / concentración estimada de recuento viables de colonias) son muy diferentes con respecto al tiempo de demora (λ) y contrasta con Rezvani, Ardestani y Najafpour (2017), quienes obtuvieron un tiempo de demora de 6 h con las cepas *L. lactis*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii* y *L. fermentum*. Además, Śliżewska y Chlebicz-Wójcik (2020) observaron un tiempo de demora en los cultivos de cepas de *Lactobacillus* en el medio (SSF), alcanzando hasta 5,64 h, mientras que se obtuvo una clara etapa de adaptación en el medio MRS en la cepa de *L. paracasei* LOCK 1091 de 1,14 h.

Los menores tiempos de generación (T_G), con respecto al sustrato, corresponden a la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa, con valores de entre 9,30 y 5,59 h (Tabla 6 y 7). Esto se debe a todas las condiciones extrínsecas del cultivo que lo hacen interesante y aplicable para mejorar su rendimiento a una escala mayor. La segunda alternativa es la combinación A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina con tiempos de 44,38 a 26,56 h (Tabla 6

y 7). Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Ślizewska y Chlebicz-Wójcik (2020), quienes obtuvieron, usando cepas de *Lactobacillus* spp., tiempos de generación (T_G) más cortos usando el medio SSF en lugar de MRS para los propósitos de crecimiento, variando de 0,96 a 1,41 h y de 1,32 a 2,61 h, respectivamente.

El número máximo de concentración de biomasa y células estimadas de aceleración (X_{MA} y N_{MA}), media (X_{MM} y N_{MM}) y exponencial (X_{ME} y N_{ME}), dependió de la velocidad específica de crecimiento de aceleración (μ_A), media (μ_M) y exponencial (μ_E) donde el tipo y la concentración de sustrato juega un papel fundamental para cada microorganismo, ya que cada cepa se comporta muy diferente ante la afinidad y asimilación de la fuente de carbono. La combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa presentó valores de 2,75 g/L y $2,11 \cdot 10^8$ células/mL en la fase de aceleración; 5,49 g/L y $4,23 \cdot 10^8$ células/mL en la fase media y 13,41 g/L y $8,07 \cdot 10^8$ células/mL en la fase exponencial (Tabla 5 y 6).

En la Figura 2 se presenta la comparación del modelamiento matemático del crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con los resultados experimentales de la A medidos. Los resultados obtenidos indican que los cultivos microbianos se analizaron hasta que alcanzaron la fase de meseta. Como resultados del crecimiento más lento se presentó en (T3) A2B1 = *Lactocaseibacillus casei* + Fructosa y (T4) A2B2 = *Lactocaseibacillus casei* + Inulina, las curvas se prolongaron hasta la sexta hora. Los datos de concentración de biomasa/células fueron luego ajustados con el modelo de Gompertz, cuyas predicciones son también graficadas en las Figuras 2 y 3.

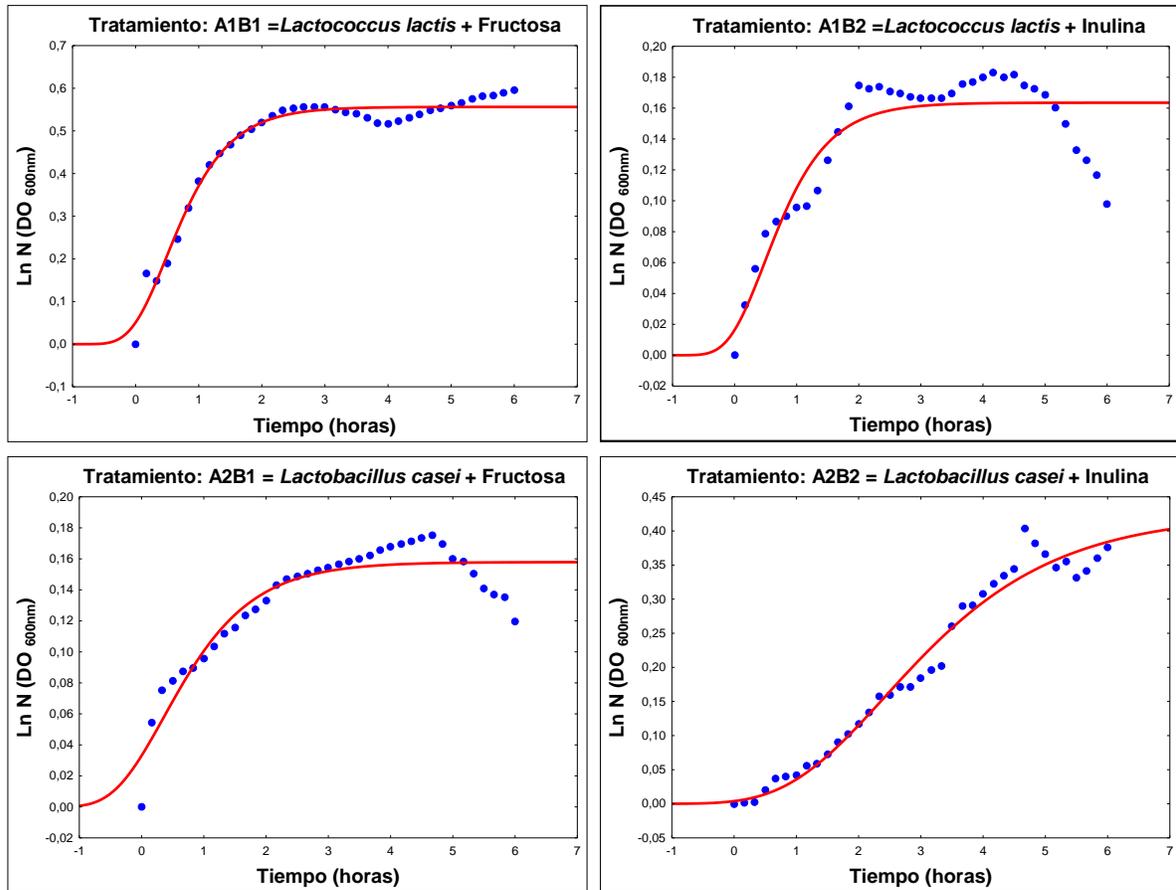


Figura 2. Curva de crecimiento de biomasa expresada en A de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa. Combinaciones: A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa, A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina, combinación A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa y A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina.

Comparación de coeficientes de función sigmoideal y parámetros encontrados en la cinética de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI)

En la Tabla 6 y 7 se observa la comparación entre los coeficientes de la función sigmoideal y los parámetros encontrados en la cinética de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI). Los valores experimentales obtenidos se ajustaron mediante el modelo de Gompertz (ec. 1).

Los coeficientes de las funciones sigmoideales y los parámetros encontrados en la cinética de crecimiento de los cultivos de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI), con respecto al logaritmo natural de la diferencia de la relación entre las concentraciones de biomasa y células estimadas inicial y final en la fase estacionaria fueron mayores para la combinación A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa con valores de 0,556 a 0,713 (Tabla 6 y 7), seguido de la combinación A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina con valores de 0,425 a 0,548. La combinación A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa presentó valores de 0,243 a 0,393 mientras que la combinación A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina y mostró los valores más bajos de 0,158 a 0,163

Tabla 6. Coeficientes de función sigmoideal y parámetros encontrados del modelo de curva de crecimiento en densidad óptica expresados en A a 600 nm de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI).

Combinación	Coeficientes de función sigmoideal			Parámetros cinéticos encontrados						
	A	μ_A	L	μ_M	μ_E	λ	T_G	X_{MA}	X_{MM}	X_{ME}
	h-1			(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h)	(h)	g/L	g/L	g/L
A1B1	0,556	0,364	≤ 0,072	0,182	0,075	≤ 2,82	9,30	2,75	5,49	13,41
A1B2	0,163	0,104	≤ 0,096	0,052	0,006	≤ 9,75	111,30	9,66	19,32	160,58
A2B1	0,158	0,072	≤ 0,443	0,036	0,004	≤ 14,28	165,08	13,84	27,68	238,17
A2B2	0,425	0,100	0,854	0,050	0,016	≤ 9,15	44,38	10,00	20,01	64,03

Tabla 7. Coeficientes de función sigmoideal y parámetros encontrados del modelo de curva de crecimiento celular estimado de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI).

Combinación	Coeficientes de función sigmoideal			Parámetros cinéticos encontrados						
	A	μ_A	L	μ_M	μ_E	λ	T_G	N_{MA}	N_{MM}	N_{ME}
	h-1			(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h)	(h)	Células/mL	Células/mL	Células/mL

A1B1	0.713	0.473	≤0.092	0.236	0.124	≤2.21	5.59	2.11	4.23	8.07
A1B2	0.243	0.155	≤0.109	0.077	0.014	≤6.58	50.15	6.47	12.93	72.35
A2B1	0.393	0.187	≤0.467	0.093	0.027	≤5.82	25.69	5.35	10.71	37.06
A2B2	0.548	0.129	0.802	0.065	0.026	≤6.93	26.56	7,73	15.46	38.32

Bondad de ajuste del modelo de la cinética de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI)

En la Tabla 8 se presenta la bondad del ajuste del modelo (expresada en R^2) entre los datos experimentales obtenidos y el modelo de Gompertz en la cinética de crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa.

El coeficiente de determinación (R^2) muestra que los mejores ajustes corresponden a las combinaciones A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa y A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina con $R^2 = 0,97$ (Tabla 8). Todos los ajustes presentaron valores de R^2 superiores a 0,81. también los valores de las desviaciones estándar muestran que (T3) A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + Fructosa y (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + Inulina presentaron las menores variabilidades de datos con 0.038 y 0.068 en comparación a los demás tratamientos.

Tabla 8. Bondad del ajuste de los datos experimentales de concentración de biomasa al modelo matemático de Gompertz en la cinética de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa.

Combinación	R^2	Desviación estándar
	A1B1	0,97
A1B2	0,81	0,046
A2B1	0,88	0,038
A2B2	0,97	0,134

La figura 3 muestra el análisis de los valores de normalidad esperados y expresados en A sobre el crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa, en la que se puede observar que los datos de concentración de biomasa

obedecen en algunas de las combinaciones a una distribución normal indicando una confiabilidad de los datos obtenidos, con un valor ($p < 0,05$).

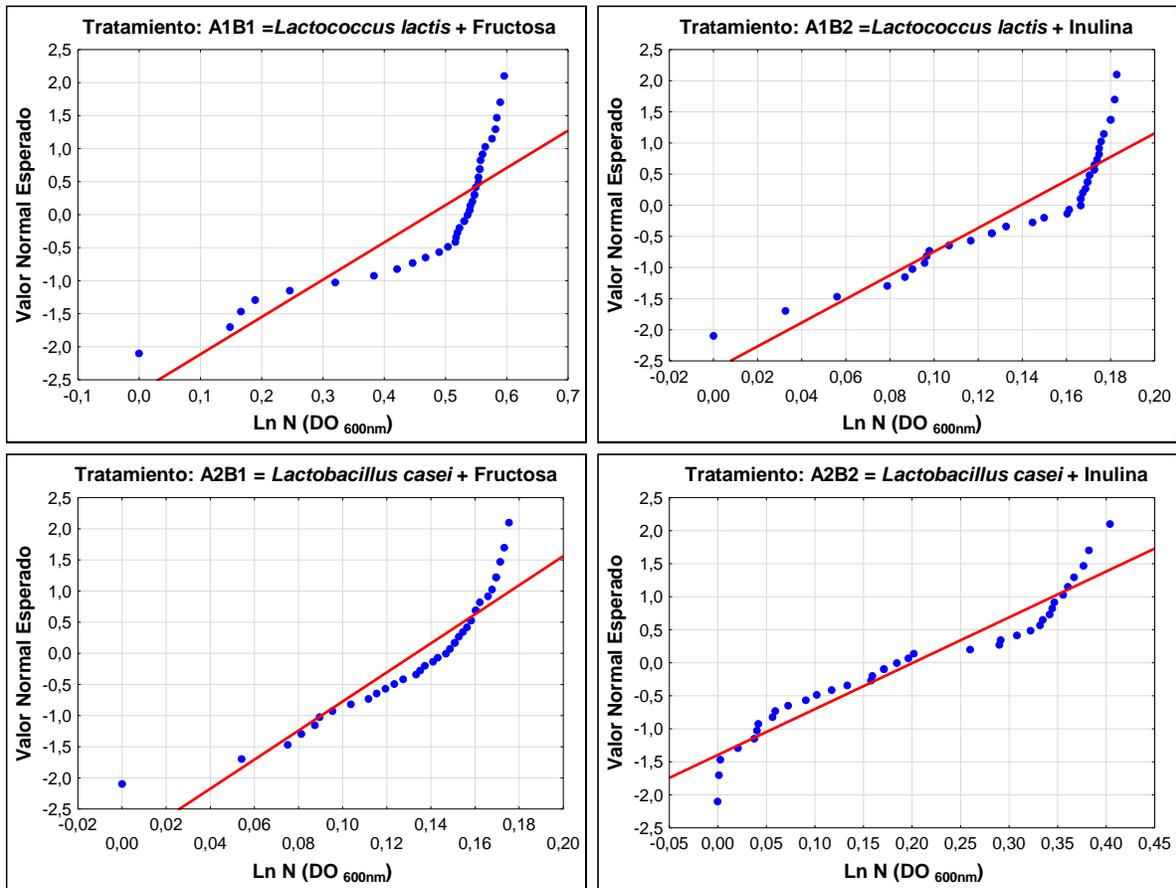


Figura 3. Valor normal esperado en función de la A medida en expresado Ln N (DO_{600nm}) el crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) con la actividad prebiótica de inulina y fructosa: Combinaciones; A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa, A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina, A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa, y A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina.

En base a la bondad del ajuste obtenido se puede concluir que el modelo de Gompertz representa adecuadamente los valores experimentales de concentración de biomasa para las combinaciones A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa y A2B2 = *L. casei* + inulina; lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Cayré et al., 2007; Singh et al. 2015; Vanegas y Ramírez, 2016; Chambi y Torres, 2021). En el caso de la desviación estándar T3) A2B1 = *L. casei* + Fructosa y (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + Inulina asociado a las concentraciones (Tablas 8 y 9) y la precisión de éstas (Figura 2 y 3) evidencian pequeñas diferencias entre las curvas de

crecimiento que a menudo se representan como concentraciones en Ln N (DO_{600nm} y células/mL).

Según, Konopacki *et al.* (2020) las combinaciones A1B2 y A2B1 con valores de desviación estándar en el ajuste del modelo de Gompertz, oscilan entre 0,038 y 0,046 (Tabla 8). Estos valores de desviación estándar son similares a los reportados en el ajuste de los parámetros cinéticos de crecimiento en bacterias lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas (Cayré *et al.* 2007).

Así mismo, Chambi y Torres (2021), en su trabajo de modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii* mostraron una distribución de datos que obedecen a una distribución normal siendo el modelado de éstos el correcto, en contraste a lo observado en esta tesis. En la Figura 3 se observa que los resultados obtenidos de concentración de biomasa para las diferentes combinaciones estudiadas están de acuerdo con los valores normales esperados teniendo en cuenta que provienen de distintas especies y con distintos prebióticos.

Efecto del encapsulamiento de los tratamientos

El tamaño de la cápsula presentó un valor alrededor de 90 µm y, por lo tanto, podría clasificarse como microcápsulas (John *et al.* 2011). La eficiencia de encapsulación de las BAL fue del 89,5 %, superior al 48,1 % reportado en estudios para *B. bifidum* encapsulado (Zhou *et al.*, 2011), 74,4 % para *L. fermentum* (Martín *et al.*, 2013) y 77 % para células de levadura. Los diferentes resultados pueden deberse a diferentes materiales utilizados en los procesos de encapsulación o a un pH diferente dentro de la cápsula que puede causar daño biológico.

La Tabla 10 muestra que la combinación A1B1 (*L. lactis* con fructosa) encapsulado tuvo la mayor viabilidad celular durante el almacenamiento ($p < 0,05$). La viabilidad de las células encapsuladas disminuyó a lo largo de los 30 días de almacenamiento ($p < 0,05$), siendo el log UFC/g de 15,23 para el día 0 y de 9,87 para el día 30 de almacenamiento, mientras que la combinación A1B2 (*L. lactis* con inulina) presentó la más baja viabilidad celular luego de 30

días, disminuyendo desde 15,10 el día 0 a 5,35 el día 30. La encapsulación celular puede mostrar un efecto protector (Kiran *et al.*, 2015; Sathyabama *et al.*, 2014).

Tabla 10. Viabilidad de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* encapsulados en combinación con fructosa e inulina almacenados a 25 ± 2 °C expresado como log CFU/g.

Combinación	t (días)			
	0	10	20	30
A1B1	15,23 \pm 0,03 ^{ab}	12,37 \pm 0,12 ^{bc}	10,29 \pm 0,02 ^a	9,87 \pm 0,03 ^a
A1B2	15,10 \pm 0,05 ^b	14,60 \pm 0,10 ^a	9,87 \pm 0,04 ^b	5,35 \pm 0,17 ^d
A2B1	15,87 \pm 0,01 ^a	12,73 \pm 0,03 ^b	9,05 \pm 0,08 ^b	7,65 \pm 0,29 ^b
A2B2	15,80 \pm 0,02 ^a	12,01 \pm 0,01 ^c	8,74 \pm 0,01 ^c	6,44 \pm 0,41 ^c

n=3, diferentes letras en superíndice en una misma columna indican que difieren estadísticamente según la prueba de Tukey en 0,05

En la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de *L. lactis* y *L. casei* en combinación con inulina y fructosa, se obtuvieron zonas de inhibición intermedia y fuerte, entre 7,00 a 12,33 mm de diámetro del halo de inhibición contra patógenos Gram negativos y positivos. Aunque todas las combinaciones presentaron una fuerte inhibición para *Escherichia coli* no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$)., *Salmonella* spp. Por otra parte, las diferentes combinaciones presentaron inhibiciones intermedias y fuertes ante *Listeria monocytogenes*, mostrando diferencias estadísticas ($p < 0,05$). *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* tienen propiedades probióticas endógenas provenientes de las bacteriocinas naturales que generan y permiten una actividad antagónica sobre las bacterias patógenas del queso artesanal.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza mostraron que las cepas de probióticos combinadas con prebióticos presentaron actividad antibacteriana ($p < 0,05$) *in vitro* contra *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* (Tabla 11). En este sentido, los mayores valores promedio de diámetros de inhibición (mm) se observaron en las cepas probióticas combinadas con inulina en *Salmonella* spp. de $12,33 \pm 1,5$ mm. Por otra parte, para *L. monocytogenes* el promedio más alto se obtuvo en *Lactococcus lactis* + inulina ($12,33 \pm 1,5$ mm); aunque, *L. casei* + fructosa y *L. casei* + inulina fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$).

Asimismo, el valor promedio más bajo del diámetro del halo inhibitor se presentó con la combinación *L. casei* + fructosa ($7,00 \pm 1,1$ mm), con una reducción del 43,22 % respecto al valor promedio máximo de $12,33 \pm 1,5$ que se observó en otros tratamientos, considerados inhibidores fuertes.

Los promedios más altos como *Lacticaseibacillus casei* + inulina y *Lactococcus lactis* + inulina probados tienen capacidad potencial de actividad antibacteriana en condiciones *in vitro* y exhibieron un fuerte efecto inhibitor contra la mayoría de las bacterias patógenas probadas (Tabla 11). El estudio experimental indicó que *L. lactis* + fructosa y *L. casei* + inulina no presentaron diferencias significativas para *Escherichia coli*; sin embargo, para *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* las diferencias son evidentes.

Asimismo, los tratamientos *L. lactis* + inulina y *L. casei* + inulina contra las bacterias *Salmonella* spp., y *E. coli* no presentaron diferencias significativas entre ellos y si en *L. monocytogenes* ($p < 0,05$). También se encuentra actividad antibacteriana contra las bacterias mencionadas que obtuvieron unos diámetros del halo de inhibición de $12,33 \pm 1,5$; $10,67 \pm 2,1$ mm de diámetro consideradas como inhibidores fuertes, seguida de *L. lactis* + fructosa con ($10,67 \pm 0,0$ mm de diámetro del halo de inhibición y *L. casei* + fructosa con $7,00 \pm 1,1$ mm de diámetro del halo de inhibición indicados como inhibidores intermedios.

La combinación de *L. lactis* + inulina presentó significancia con $p < 0,05$ en la zona de inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* con un halo de $12,33 \pm 1,5$ mm de diámetro en comparación con la combinación de *L. lactis* + inulina. *L. lactis* + fructosa también presentó un halo menor ($10,33 \pm 0,8$ mm de diámetro), considerados como inhibidores fuertes. Las combinaciones *L. casei* + inulina y *L. lactis* + inulina presentaron los mayores diámetros del halo de inhibición, frente a todas las bacterias patógenas probadas en este estudio.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* combinadas con inulina y fructosa contra bacterias patógenas.

Combinacion	<i>E. coli</i> D (mm)	<i>Salmonella</i> spp. D (mm)	<i>L. monocytogenes</i> D (mm)
A1B1	$12,33 \pm 1,5^a$	$10,00 \pm 0,0^b$	$10,33 \pm 0,8^b$

A1B2	12,33 ± 1,5 ^a	12,33 ± 1,5 ^a	11,33 ± 1,0 ^{ab}
A2B1	10,67 ± 1,0 ^a	7,00 ± 1,1 ^c	11,67 ± 2,0 ^{ab}
A2B2	10,67 ± 2,1 ^a	12,33 ± 1,5 ^a	12,33 ± 1,5 ^a

n = 3; diferentes letras en superíndice en una misma columna indican diferencia estadísticamente según la prueba de Tukey en 0,05

Las cepas de probióticos combinadas con prebióticos (*L. lactis* y *L. casei* combinados con inulina y fructosa) ejercieron una importante actividad antibacteriana que puede antagonizar a las cepas patógenas estudiadas porque pueden producir una mayor cantidad de ácido láctico y metabolitos extracelulares con propiedades bactericidas contra *Salmonella spp.*, y *Listeria monocytogenes*, a pesar de que *E. coli* (Tabla 11) no se vio afectada estadísticamente, pero sí presentó fuertes zonas de inhibición al igual que las otras dos bacterias patógenas que presentaron valores entre 10,67 a 12,33 mm del diámetro del halo de inhibición, resultados similares a los obtenidos por Rocha-Ramírez *et al.* (2021), quienes lograron obtener con las cepas de *L. rhamnosus* GG y *Lacticaseibacillus casei* zonas de inhibición medias y fuertes contra *E. coli* (10,00 a 12,00 mm de diámetro del halo de inhibición). Mientras que Azizian *et al.* (2019) obtuvieron con *L. reuteri* aislado de humanos una zona intermedia de inhibición contra *E. coli* (7 a 10 mm de diámetro del halo de inhibición).

Soundharrajan *et al.* (2019) demostraron que los sobrenadantes extracelulares frescos y sobrenadantes extracelulares desnaturalizados de las cepas de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis* tienen actividad antibacteriana contra *E. coli* basada en fuertes zonas inhibidoras con diámetros del halo de inhibición de 27,67 mm, 26,67 mm, 10,90 mm. y 13,70 mm con el método de difusión en agar. Sumado a esto, Soundharrajan *et al.* (2019) lograron obtener mayor actividad antagonista contra *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* con la cepa *Lactobacillus plantarum* CIP 103151 con una fuerte zona de inhibición que osciló entre 19,33 y 21 mm de diámetro del halo de inhibición. De acuerdo con esto, Argyri *et al.* (2013) han informado que entre las 8 BAL seleccionadas aisladas de productos lácteos fermentados iraníes, las especies de *Lactobacillus*, particularmente *L. plantarum* 15HN, mostraron actividad antagonista contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* con fuertes zonas de inhibición de 13,7, 12,3 y 12,3 mm de diámetro del halo de inhibición, respectivamente. Asimismo, Soundharrajan (2019) han comprobado que todos los *Lactobacillus*

rhamnosus aislados de leche humana presentaron una inhibición media a fuerte en el crecimiento de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* utilizando el método de difusión de pocillos de agar con diámetros del halo de inhibición de 6 mm a 14 mm.

El sobrenadante libre de células obtenido en caldo MRS de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) inhibió el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*, mientras que su actividad antimicrobiana no fue abolida y/o disminuida por el tratamiento con inulina y fructosa, lo que sugiere que su actividad antimicrobiana no está relacionada con los sustratos utilizados y puede estar asociada con su naturaleza peptídica. En los tratamientos no se observó pérdida de actividad luego de aplicar los sustratos inulina y fructosa, lo que indica que la actividad inhibidora de la cepa *L. lactis* (CU-R-704) no se debió a los sustratos inulina y fructosa. Además, la cepa *L. lactis* (CU-R-704) puede tener una influencia directa de la bacteriocina natural de clase I productora de antibióticos como la nisina A y Z, ejerciendo una fuerte actividad para inhibir la flora Gram negativa y positiva (*E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*). De Vuyst & Vandamme (1992) y Suzuki & Suzuki (2021) reportaron que la cepa *L. lactis* (CBW2) posee el gen estructural para el precursor de la nisina A, y su deducción de secuencia reveló una coincidencia del 100 % con la de la nisina Z. Estos resultados sugieren que la cepa *L. lactis* (CBW2) produce el precursor de sustancias similares a la nisina Z indicando que la nisina tiene una función de control del crecimiento. La cepa de *L. casei* (CU-L-CASEI) también exhibió una actividad inhibidora intensa e intermedia contra las bacterias *E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*, posiblemente debido a la bacteriocina natural de clase III, como la caseicina. De manera similar Klaenhammer (1993) y Gorbeña & Saénz (2009) informan que la mayoría de estas bacteriocinas de clase III son producidas por el género *Lactobacillus*.

Según el resultado de la actividad antimicrobiana, todas las cepas poseían actividades inhibidoras de bacterias Gram negativas y Gram positivas, y su disparidad en la actividad de antagonismo contra diferentes patógenos indica que las cepas probióticas estudiadas son altamente específicas de patógenos y un requisito previo para el potencial probiótico. En general, la actividad antimicrobiana de los probióticos puede deberse a la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos de cadena corta y bacteriocinas. Por lo tanto, al producir estos

compuestos antimicrobianos, los microorganismos probióticos obtienen una ventaja sobre otros microorganismos para sobrevivir en las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (Hand *et al.*, 2012; Soundharrajan *et al.*, 2019).

Las bacterias del ácido láctico productoras de bacteriocinas se protegen de la toxicidad de sus compuestos expresando una proteína inmune específica. Es de acuerdo con el tipo de alimento que se va a conservar con bacteriocinas, el cual dependerá de su almacenamiento, para lograr que todos los efectos en conjunto permitan la aplicación efectiva de estos bioconservantes naturales, lo que podría requerir la combinación con otros métodos de conservación, como la refrigeración, ya que es un método utilizado para alargar la vida útil de alimentos perecederos como los lácteos y sus derivados susceptibles a alteraciones por *E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* que deben ser controlados para que las bacterias ácido lácticas puede seguir reproduciéndose y liberando más compuestos bioconservantes en el alimento, lo que le da estabilidad al producto y logra mayores periodos de vida útil.

Las tablas 12, 13 y 14 muestran los resultados de los conteos de *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria* en muestras de queso fresco manaba durante 30 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C, los valores indican que *L. lactis* con fructosa prebiótico y ácido gálico encapsulado, presentan un conteo menor en las muestras evaluadas ($p < 0,05$), los resultados indican una disminución en los conteos en todos los tratamientos a lo largo de los 30 días de almacenamiento, principalmente contra *E. coli* y *L. monocytogenes*, siendo *L. lactis* con prebiótico de fructosa, el que presenta el valor más bajo con 1,02 log UFC/g para *E. coli* y 1,03 log UFC/g para *Listeria*, en contraste con la muestra control que presentó el conteo más alto con 18,33 log UFC/g para *E. coli* y 18,44 log UFC/g para *L. monocytogenes* el día 30 del periodo de evaluación. Por el contrario, para el recuento de *Salmonella* hubo poca disminución a lo largo de los 30 días de almacenamiento.

Tabla 12. Actividad antimicrobiana *in vivo* de cepas de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* combinadas con inulina y fructosa contra *E. coli* inoculadas en muestras de queso fresco de manaba.

Combinación	Día 0 Log UFC/g	Día 10 Log UFC/g	Día 20 Log UFC/g	Día 30 Log UFC/g
<i>L. lactis</i> + fructosa (<i>E. coli</i>)	15,07 ^a	4,80 ^a	1,02 ^a	1,02 ^a
<i>L. lactis</i> + inulina (<i>E. coli</i>)	15,20 ^b	10,57 ^c	10,69 ^c	10,52 ^c

<i>L. casei</i> + fructosa (<i>E. coli</i>)	15,80 ^d	12,90 ^d	11,10 ^d	11,40 ^d
<i>L. casei</i> + inulina (<i>E. coli</i>)	15,46 ^c	10,23 ^b	10,56 ^b	10,22 ^b

n = 3; diferentes letras en superíndice en una misma columna indican diferencias estadísticamente según la prueba de Tukey en 0,05

Tabla 13. Actividad antimicrobiana *in vivo* de cepas de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* combinadas con inulina y fructosa contra *Salmonella* inoculadas en muestras de queso fresco de manaba.

Tratamientos	Día 0 Log UFC/g	Día 10 Log UFC/g	Día 20 Log UFC/g	Día 30 Log UFC/g
L. lactis + fructosa (<i>Salmonella</i>)	15.55 ^b	11.33 ^a	10.56 ^b	10.52 ^a
L. lactis + inulina (<i>Salmonella</i>)	15.03 ^a	12.29 ^b	10.75 ^d	10.80 ^b
L. casei + fructosa (<i>Salmonella</i>)	15.70 ^c	12.80 ^c	10.67 ^c	10.82 ^b
L. casei + inulina (<i>Salmonella</i>)	15.05 ^a	12.74 ^c	10.42 ^a	10.80 ^b

*Media ± DE; (n=3); Diferentes letras en superíndice en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey en 0,05

Tabla 14. Actividad antimicrobiana *in vivo* de cepas de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* combinadas con inulina y fructosa contra *L. monocytogenes* inoculadas en muestras de queso fresco de manaba.

Tratamientos	Día 0 Log UFC/g	Día 10 Log UFC/g	Día 20 Log UFC/g	Día 30 Log UFC/g
L. lactis + fructosa (<i>Listeria</i>)	15.82 ^d	9.27 ^a	8.33 ^b	1.03 ^a
L. lactis + inulina (<i>Listeria</i>)	15.29 ^b	10.57 ^c	10.52 ^d	10.78 ^d
L. casei + fructosa (<i>Listeria</i>)	15.00 ^a	10.92 ^d	9.82 ^c	10.47 ^c
L. casei + inulina (<i>Listeria</i>)	15.43 ^c	10.30 ^b	6.67 ^a	9.52 ^b

*Media ± DE; (n=3); Diferentes letras en superíndice en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey en 0,05

El queso tratado con *L. lactis* + fructosa y *L. lactis* + inulina mostraron recuentos viables más altos (*Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes*) en comparación con las muestras tratadas con BAL encapsulado ($p < 0,05$, Tablas 12, 13 y 14). La presencia de BAL en el queso podría ayudar a inhibir los microorganismos mediante la producción de bacteriocinas (Aymerich, 2000). Además, los estudios *in vitro* mostraron inhibición de estos patógenos. Estudios anteriores mostraron inhibición de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. enteritidis* por LABs (Lord, 2002; Winkowski *et al.*, 1993).

En los resultados obtenidos en esta tesis, este comportamiento podría atribuirse a la presencia de bacteriocinas y al efecto antimicrobiano que ha sido reportado por varios autores (Contente, et al., 2024; Díaz-Formoso et al., 2024; Bautista & Barrado, 2023; Heredia-Castro et al., 2017). Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen ribosómico que se secretan al medio extracelular y podrían inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Monroy *et al.*, 2009; Beshkova & Frengova, 2012; Mondragón *et al.*, 2013). En la naturaleza existe una gran diversidad bacteriana, y se estima que el 99 % de las bacterias producen al menos una bacteriocina (Dolz, 2008).

Las bacteriocinas BAL contienen residuos de aminoácidos como lisina, arginina e histidina, que les confieren un carácter catiónico (pH neutro), y contienen residuos de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano, que les confiere su naturaleza hidrofóbica. Además, las bacteriocinas también son de naturaleza anfipática (Diep & Nes, 2002; Yusuf, 2013). Las bacteriocinas se han agrupado en cinco clases según diversos criterios de clasificación, tales como: microorganismos productores, pesos moleculares, propiedades físicas, estructuras químicas, modo de acción y características genéticas y bioquímicas (Nes *et al.*, 2007; Monroy *et al.*, 2009; Balciunas *et al.*, 2013).

La mayoría de las bacteriocinas BAL inhiben el crecimiento de bacterias mediante la formación de poros en la membrana celular, que se inicia mediante la atracción de las bacteriocinas hacia la bacteria objetivo a través de fuerzas electrostáticas, porque las bacteriocinas están cargadas positivamente e interactúan con los fosfolípidos de la membrana bacteriana cargados negativamente. Además, la naturaleza anfipática de las bacteriocinas facilita aún más su distribución a lo largo de la superficie de la membrana celular bacteriana (Cotter *et al.*, 2005; Nishie *et al.*, 2012; Yusuf, 2013).

La unión de las bacteriocinas con las bacterias diana se produce entre la región N-terminal de la bacteriocina (región hidrófila) con la superficie polar de la membrana celular. Una vez que la bacteriocina se une a la bacteria, la región C-terminal (región hidrófoba) penetra hacia el interior no polar de la membrana celular, lo que produce la formación de poros en la membrana y, por tanto, el vaciado intracelular, generando la pérdida de iones K, de energía en forma de ATP y en algunos casos, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular (Bemena *et al.*, 2014). Las consecuencias de lo anterior se traducen en una disminución del potencial de membrana y en la escasa disponibilidad de las reservas energéticas de la célula, lo que conduce a una

disminución en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que finalmente desencadena en la muerte de la célula (Vásquez *et al.*, 2009; Yusuf, 2013; Bemena *et al.*, 2014). Se ha demostrado que algunas bacteriocinas de clase I, como la nisina, tienen un modo de acción dual, ya que pueden formar poros en la membrana celular uniéndose a ella y a través de ella (debido a su naturaleza anfipática) y/o uniéndose al lípido II (el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano) impidiendo la formación de la pared celular (López *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2014). La naturaleza anfipática de las bacteriocinas de clase II facilita la inserción del péptido en la membrana de la bacteria diana, provocando su despolarización y, por tanto, su muerte (Dridier *et al.*, 2006; Yusuf, 2013). Las bacteriocinas de clase III, como la lisostafina, pueden actuar directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram positivas objetivo, lo que provoca la lisis de las bacterias (Lai *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005).

Las bacteriocinas pueden constituir una alternativa al uso masivo de antibióticos, además de contribuir a reducir la resistencia a los mismos y combatir un grupo cada vez mayor de bacterias patógenas resistentes a la mayoría de los antibióticos producidos y conocidos hoy en día (Jamuna & Jeevaratnam, 2006; Savadogo *et al.*, 2007).

Es interesante considerar el papel que pueden desempeñar las bacterias lácticas en el campo de las infecciones. El aumento del uso de antibióticos, el aumento de la resistencia bacteriana, el aumento de pacientes inmunodeprimidos y de infecciones oportunistas en estos pacientes y la aparición de nuevos patógenos son factores que determinan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento y prevención de infecciones. En el pasado se han realizado una serie de estudios siguiendo diferentes metodologías, lo que nos permite una comparación real de los resultados. Entre estos estudios cabe mencionar el de Consignado *et al.* (1993), quienes encontraron actividad antibacteriana en *Lacticaseibacillus casei* contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*. Utilizaron el método de placa vertida a partir de un inóculo de 10^3 UFC/mL; sin embargo, no indican la concentración de LAB ni el tipo de inhibición encontrada (Larre *et al.*, 2007).

Por su parte, Reque *et al.* (2000) reportaron que *Lactobacillus fermentum* tenía actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, utilizando la técnica de difusión en pozos que solo obtuvo resultados cualitativos. Asahara *et al.* (2001) encontraron actividad antimicrobiana en *L. casei* contra *Escherichia coli* e indicaron que *Lactobacillus fermentum* y

Lactobacillus plantarum no mostraron actividad significativa. Chuayana *et al.* (2003), utilizando una metodología no estandarizada, concluyó que *Lactobacillus casei* tendría una acción bacteriostática contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Sin embargo, no mencionan ningún valor referencial de esta afirmación.

Otros estudios que se han basado en la determinación de diámetros de halos de inhibición incluyen el de Oyetayo *et al.* (2003) quienes verificaron la actividad antimicrobiana de *L. casei* y *Lactobacillus acidophilus* contra *Escherichia coli*; Nowroozi *et al.* (2004) quienes estudiaron la actividad de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* contra *Salmonella typhi* y finalmente Turgay & Erbilir (2006) quienes han verificado la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus casei* contra *Escherichia coli*.

La capacidad antimicrobiana de las BAL que producen bacteriocinas en la conservación de quesos es un tema que ha cobrado mayor importancia en la actualidad, debido a las ventajas tecnológicas que aportan al producto final (Parra, 2010, Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008; Favaro *et al.*, 2015). Algunos estudios han mostrado que el uso de BALs que producen bacteriocinas ha sido eficiente para reducir los niveles de *Listeria innocua* y *L. monocytogenes* en queso manchego, madurado, fresco y requesón (Rodríguez, *et al.*, 1998; O'sullivan *et al.*, 2006; Dal Bello *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2012).

Por otra parte, se ha reportado también que las BALs que producen bacteriocinas pueden disminuir la concentración de varias especies del género *Clostridium*, como *C. tyrobutyricum* y *C. beijerinckii* NIA 63 en quesos y otras esporas de especies de *Clostridium* en Vidiago, semiduro, Kasseri y oveja (Rilla *et al.*, 2003; Matijašić *et al.*, 2007; Anastasiou *et al.*, 2009; Martínez-Cuesta *et al.*, 2010; Garde *et al.*, 2001). También se ha señalado que, aunque las BAL son productoras de bacteriocinas *in vitro*, esto no garantiza su actividad durante el proceso de elaboración del queso, ya que las bacteriocinas pueden interactuar con la grasa perdiendo su actividad, o pueden ser inactivadas por las proteasas (Nunez *et al.*, 1997; Hamama *et al.*, 2002; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Vesković-Moračanin *et al.*, 2014).

Otros estudios se centraron en combinar tratamientos antimicrobianos con BAL productoras de bacteriocinas para mejorar la actividad antimicrobiana. Aly *et al.* (2012) informaron que la aplicación de *Lactococcus lactis*, un productor de nisina Z, mejoró la actividad antimicrobiana del queso cuando se combinó con gelatina obtenida de piel bovina. Arqués *et al.* (2005) demostraron que el efecto combinado de altas presiones y BALs que producen bacteriocinas

(nisina A, nisina Z, lacticina 481, TAB 57, TAB 7, enterocina I, enterocina AS-48) disminuyó el número de *Listeria monocytogenes* en el queso. Por otra parte, se ha reportado que *Lactobacillus sakei subsp. sakei 2a* se combinó con inulina como fuente de fibra y se pudo observar una disminución en los recuentos de *L. monocytogenes*. Esto indica que las BAL productoras de bacteriocinas también son eficientes en quesos que utilizan simbióticos. Asimismo, se menciona que esta bacteria expresó los genes sakP y sakQ responsables de la síntesis de bacteriocinas en el queso (Martínez *et al.*, 2005).

Otra opción que se ha considerado es la aplicación de BAL multiproductoras de bacteriocinas. Se ha informado que la actividad antimicrobiana de la nisina en combinación con pediocina aumenta su actividad contra *Listeria monocytogenes* (Rodríguez *et al.*, 2005). Aran *et al.* (2015) utilizaron un *Enterococcus faecium* WHE 81 productor de bacteriocina en la superficie de queso Munster contaminado con *Listeria monocytogenes* e informaron que esta cepa erradicó casi por completo el patógeno. Estos mismos autores sugieren que una BAL que produce diferentes y múltiples bacteriocinas es más eficiente contra la resistencia desarrollada por el patógeno en comparación con aquellas que producen solo una. Además, el efecto sinérgico entre bacteriocinas puede favorecer la actividad antimicrobiana. Sin embargo, se ha reportado que *Lactococcus lactis* CL2, productor de nisina y pediocina, disminuyó el conteo de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en el queso, aunque su inhibición no fue mejor que las LAB productoras solo de nisina, por lo que los autores sugirieron que en el queso no había ningún efecto sinérgico entre ambas bacteriocinas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Actualmente, la nisina y la pediocina PA-1 (producidas por fermentación con *Pediococcus acidilactici*) son las bacteriocinas más utilizadas en la industria alimentaria con fines de conservación. La nisina fue la primera en comercializarse y sus efectos antimicrobianos son los más documentados, destacando su capacidad para reducir el recuento de *Staphylococcus aureus* en el queso fresco de Minas sin afectar las propiedades fisicoquímicas y las características sensoriales (Sobrino-López & Martín-Belloso *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2011; Felicio *et al.*, 2015; Favaro *et al.*, 2015).

En el queso fresco hispano, la combinación de ácido caprílico con nisina y cinamaldehído controló los genes de *Listeria monocytogenes* y tuvo un bajo impacto en la flora natural de las bacteriocinas del queso (Gadotti *et al.*, 2014). El contenido de grasa en el queso podría afectar negativamente la actividad antimicrobiana de la nisina debido a su naturaleza anfipática, que

favorece su interacción con los lípidos; sin embargo, el NaCl podría aumentar su actividad (Chollet *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, algunos estudios se han centrado en el desarrollo de estrategias que permitan aumentar la actividad de las bacteriocinas. Por ejemplo, la nisina Z y la nisina encapsulada en liposomas fueron eficaces para inhibir el crecimiento de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* en el queso Cheddar y el queso fresco Minas, respectivamente (Gadotti *et al.*, 2014; Benech *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2012).

Otro estudio demostró que el tratamiento térmico más la adición de nisina tuvo un efecto sinérgico contra *L. innocua*, logrando matarla completamente después de seis días de almacenamiento, mientras que el tratamiento hidrostático de alta presión aplicado en quesos para la inactivación de *Bacillus cereus* fue más eficiente cuando se incluyó nisina como agente antimicrobiano (López-Pedemonte *et al.*, 2003). La actividad antimicrobiana de la nisina también se probó en el suero de queso. Se ha informado que la adición de nisina en la producción de queso feta redujo el recuento de *Listeria monocytogenes*, modificando la flora microbiana normal del suero (Samelis *et al.*, 2003). También se ha reportado que la aplicación de bajas temperaturas, campo eléctrico pulsado y la aplicación de MicroGARDTM (cultivo láctico pasteurizado como bioprotector natural) favorecieron la acción antimicrobiana de la nisina contra *Listeria innocua* en el suero de queso (Gallo *et al.*, 2007a; Gallo *et al.*, 2007b; von Staszewski & Jagus, 2008).

Medición del tamaño de la cápsula

Los diámetros medios de las microcápsulas de alginato no fueron significativamente ($p > 0,05$) diferentes a los diámetros promedio que oscilaron entre 89,5 μm . Por lo tanto, podrían ser consideradas como microcápsulas ($< 100 \mu\text{m}$ de diámetro) y macrocápsulas ($> 100 \mu\text{m}$ de diámetro) (John *et al.*, 2011).

En este trabajo se utilizó el método de aspersión para encapsular *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*. El método de aspersión es una técnica muy utilizada en los últimos años para encapsular probióticos. El tamaño y rendimiento en el proceso de encapsulación puede verse afectado por varios factores, como el tamaño de la boquilla, la concentración y la composición del polímero (Voo *et al.*, 2011). Los resultados con diámetros mayores fueron reportados por Klemmer *et al.* (2011). En su estudio, el diámetro medio de las cápsulas producidas por una aguja de 20 G (diámetro interno 0,584 mm) fue de 2170 μm , mientras que

el diámetro medio de las cápsulas producidas por la aguja de 27 G (diámetro interno 0,191 mm) rondaba los 1750 μm . Las medidas de las cápsulas obtenidas por Muthukumarasamy *et al.* (2006), donde se utilizó la técnica de extrusión para encapsular *Lactobacillus reuteri* usando alginato como material de pared, produjo cápsulas con un diámetro medio de 2370 μm , de la misma manera Varela-Pérez *et al.* (2022) en su estudio encapsularon *Lactobacillus gasseri*, y en el cual obtuvieron diámetros alrededor de $2599 \pm 0.122 \mu\text{m}$ y $2915 \pm 0,196 \mu\text{m}$.

Viabilidad de cápsulas cargadas con *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*

Después de transcurridas 24 h de incubación, se logró obtener una concentración de 8,7 log UFC/mL para *L. casei* + fructosa; 8,1 log UFC/mL para *L. casei* + inulina; 7,9 log UFC/mL para *Lactococcus lactis* + fructosa y 7,4 log UFC/mL para *Lactococcus lactis* + inulina antes de la encapsulación (Tabla 16). Estos datos indican una mayor presencia de células viables para *Lactococcus lactis* en contraste con las células de *L. casei*, también es muy notorio que las células presentan mayor número en presencia del sustrato fructosa seguido de las que estuvieron en presencia de inulina. Estas concentraciones se consideran adecuadas, según Kechagia *et al.* (2013), quienes indican que las concentraciones por encima de 6 log UFC/mL son estimadas como aceptables y beneficiosas. En base a esa referencia, se realizó el proceso de encapsulado con su respectivo pretratamiento.

Tabla 16. Viabilidad antes y después de la encapsulación de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* en combinación con fructosa e inulina almacenados a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Combinación	Antes de la encapsulación log UFC/mL	Después de la encapsulación log UFC/mL	Viabilidad (%)
A1B1	$7,90 \pm 0,01^{\text{C}}$	$6,34 \pm 0,60^{\text{C}}$	$82,00 \pm 0,0$
A1B2	$7,40 \pm 0,05^{\text{D}}$	$5,84 \pm 0,50^{\text{D}}$	$82,00 \pm 0,0$
A2B1	$8,70 \pm 0,03^{\text{A}}$	$7,14 \pm 0,08^{\text{A}}$	$82,00 \pm 0,0$
A2B2	$8,10 \pm 0,02^{\text{B}}$	$6,54 \pm 0,05^{\text{B}}$	$82,00 \pm 0,0$

n = 3; Diferentes letras en superíndice en una misma columna difieren estadísticamente según la prueba de Tukey en 0,05

Se determinó la viabilidad de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* encapsulados con fructosa e inulina. Los resultados mostraron valores de 82 % para el proceso de encapsulamiento mediante secado por aspersión (Tabla 16), lo cual es superior al 48,1 % reportado en estudios para *B bifidum* encapsulado (Zhou *et al.*, 2011), 74,41 % para

L. fermentum (Martín *et al.*, 2013) y 77 % para células de levadura (Song, Yu, & Ma, 2013). Los diferentes resultados en las investigaciones antes citadas podrían atribuirse a los diferentes materiales utilizados en los procesos de encapsulación o un pH diferente dentro de la cápsula que puede causar daño biológico. Ding y Shah, (2009) obtuvieron pérdidas de viabilidad de aproximadamente 2,93 log UFC/mL. En contraste con los resultados de este trabajo donde existió una reducción menor con una disminución en la viabilidad de aproximadamente de 1,56 log UFC/mL, estos datos son similares a los reportados por (Varela-Pérez *et al.*, 2022), quienes reportaron pérdidas de 1,762 log UFC/mL en el proceso de encapsulado de *Lactobacillus gasserii* ATCC® 19992™ (LG) con alginato de sodio.

Viabilidad de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* encapsulados con fructosa e inulina libres y encapsulados en condiciones gastrointestinales simuladas

Debido a la existencia de varias metodologías actualmente disponibles y diseñadas para simular el proceso de digestión, la comparación de resultados se convierte en una tarea no tan simple. Sin embargo, se llevaron a cabo tanto para las células libres y encapsuladas los mismos tiempos de exposición y similitudes en la metodología aplicada.

Al final de cada fase de simulación, se tomaron alícuotas para cuantificar el número de células liberadas de las cápsulas, así como también se tomaron alícuotas de las células sin encapsular. Al comienzo de la simulación gastrointestinal, las células libres sin encapsular tuvieron valores de viabilidad de 7,90 log UFC/mL (*L. lactis*+fructosa), 7,40 log UFC/mL (*L. lactis*+inulina), 8,70 log UFC/mL (*L. casei*+fructosa) y 8,10 log UFC/mL (*L. casei*+inulina) (Tabla 17). Para las células encapsuladas los valores de viabilidad fueron de 6,34 log UFC/mL (*L. lactis*+fructosa), 5,84 log UFC/mL (*L. lactis*+inulina), 7,14 log UFC/mL (*L. casei*+fructosa) y 6,54 log UFC/mL (*L. casei*+inulina) (Tabla 17).

En la fase salival las células libres expusieron una reducción de al menos siete ciclos logarítmicos en contraste con las células encapsuladas las cuales no presentaron disminución alguna. Para la fase gástrica, la viabilidad siguió disminuyendo; sin embargo, todavía se hallaron bacterias viables al finalizar el ciclo. Una tendencia similar fue reportada por Jurado-Gámez *et al.* (2016), que expuso *L. gasserii* a pHs de 6, 4,5 y 3,5 durante 3 h. Al final de sus experimentos,

reportaron células viables, lo que indica que *L. gasseri* puede tolerar y sobrevivir ambientes ácidos *in vitro*. Sin embargo, Chávarri *et al.* (2010) también realizaron estudios sobre *L. gasseri* y encontraron que, después de la exposición al fluido gástrico simulado (pH 2) durante 2 h, la viabilidad de las células libres de LG fue de 10 UFC/mL (límite de detección). Esos estudios sugieren que las células libres de *L. gasseri* pueden sobrevivir en condiciones gástricas simuladas a valores de pH de 2 o 3.

Las células libres una vez que las bacterias sobreviven a las condiciones de la fase gástrica, ingresan al intestino, donde la bilis es uno de los principales desafíos, ya que tiene propiedades detergentes con actividad antimicrobiana a través de la disolución de la membrana bacteriana (Prete *et al.*, 2020; Begley *et al.*, 2006). Por otro lado, no solo la bilis puede afectar la viabilidad bacteriana, sino que también las enzimas digestivas pueden afectar la supervivencia al dañar la membrana celular y el ADN (Han *et al.*, 2021).

Las cápsulas cargadas con *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*, mostraron una tendencia diferente en la fase salival (no se evidenció disminución en la viabilidad), mientras que para la fase gástrica el tratamiento A1B2 tuvo una liberación de 1,50 log UFC/mL; es decir, esta combinación experimentó pérdidas celulares más significativas en las cápsulas en comparación con el resto de las combinaciones las cuales perdieron 1,0 log UFC/mL. Esta pérdida de viabilidad puede atribuirse a la exposición a un valor de pH bajo (pH 3) (Ortakci & Sert, 2012; Afzaal *et al.*, 2021) Sin embargo el alginato se puede convertir en ácido alginico el cual forma geles ácidos y mantiene su estructura de gel. Finalmente, en la fase intestinal, las cápsulas experimentan un fenómeno de ruptura, pero como es de esperarse las cápsulas de alginato más la presencia de prebióticos proporcionaron a las bacterias un ambiente ideal para sobrevivir a la pancreatina y las sales biliares durante el tiempo necesario para evitar una disminución de viabilidad debido al efecto antimicrobiano de las sales biliares (Silva *et al.*, 2018). Se ha informado que las cápsulas de alginato cambian a medida que están sujetas a diferentes condiciones, por ejemplo, en presencia de jugo gástrico, las paredes se comprimen, a diferencia con el *L. casei* que en jugo intestinal produce una expansión (Luca & Oroian, 2021). A pesar de lo anterior, las cápsulas permanecieron sin cambios significativos en la fase gástrica.

En la fase intestinal las capsulas como era de esperarse se hincharon e intercambiaron los iones Ca^{+2} con el medio produciendo un gel menos compacto lo que concuerda con lo

informado por Silva *et al.* (2018), quienes encapsularon *Lactobacillus acidophilus* con alginato de sodio, los mismos que reportaron un comportamiento similar al encontrado en nuestro trabajo, y se atribuyó a la inestabilidad de las cápsulas cuando se exponen a pH neutro; el fenómeno por el cual dicha expansión se puede explicar ya que el alginato está en pH neutro, sus grupos carboxilos están expuestos a las sales biliares, y con esto, se produce un intercambio iónico, resultando en un intercambio iónico a nivel de los puntos de entrecruzamiento lo que hace que disminuya la concentración de los mismos y por ende la estructura de gel hasta volver a tener cadenas de alginato de sodio las cuales son solubles en el medio (Silva *et al.*, 2018).

Las Tablas 17 y 18 presentan los valores de concentración de células viables al principio y al final de la simulación gastrointestinal. Las células libres de *Lactococcus lactis* y *L. casei* presentaron un mayor número de log UFC/mL, pero al llegar a la etapa final de la simulación, mostraron una disminución muy significativa en la viabilidad. Como ha sido reportado en numerosos artículos, la mayoría de los probióticos libres son fáciles de ser dañados por el ácido del estómago. Sohail *et al.* (2011) indicaron una disminución de más de 6 log UFC/mL de *L. acidophilus* sometidos a exposición gastrointestinal en pH 2,0 por 20 minutos. Sin embargo, la combinación A2B2 presentó el 78,29 % y la combinación A2B1 el 81,30 % de células viables, siendo este último la mejor combinación de las ensayadas. Zeashan *et al.* (2020) encapsularon *Lactobacillus acidophilus* en una matriz de alginato y obtuvieron una viabilidad de aproximadamente el 90 % para ambas fases de simulación (gástrica e intestinal), con la salvedad que emplearon una especie diferente de *Lactobacillus* y que realizaron la fase gástrica e intestinal por separado. En nuestro trabajo, donde la simulación fue continua, la mayor viabilidad fue obtenida con la combinación A2B1 (*L. casei* + fructosa).

Table 17. Viabilidad de células libres de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*, no encapsuladas en condiciones gastrointestinales *in vitro* (n = 3).

Combinación	Concentración inicial (N ₀) log UFC/mL	Concentración final (N) log UFC/mL	Viabilidad (%)
A1B1	7,90 ± 0,01 ^c	0,84 ± 0,0 ^b	10,66
A1B2	7,40 ± 0,05 ^d	0,50 ± 0,0 ^c	6,83
A2B1	8,70 ± 0,03 ^a	1,12 ± 0,0 ^a	12,90

A2B2	8,10 ± 0,02 ^b	0,26 ± 0,0 ^d	3,20
-------------	--------------------------	-------------------------	------

Letras iguales en una columna significa que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Table 18. Viabilidad de células de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*, encapsuladas en condiciones gastrointestinales *in vitro* (n = 3).

Combinación	Concentración inicial (N₀) log UFC/mL	Concentración final (N) log UFC/mL	Viabilidad (%)
A1B1	6,34 ± 0,61 ^c	4,79 ± 0,33 ^c	75,50
A1B2	5,84 ± 0,54 ^d	3,72 ± 0,15 ^d	63,75
A2B1	7,14 ± 0,08 ^a	5,81 ± 0,41 ^a	81,30
A2B2	6,54 ± 0,06 ^b	5,12 ± 0,13 ^b	78,29

Letras iguales en una columna significa que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Estos resultados difieren de los reportados por Sultana *et al.* (2000), quienes encontraron que la encapsulación de bacterias en capsulas de alginato no protege eficazmente a los organismos de la alta acidez, pero está en acuerdo con lo publicado por Chávarri *et al.* (2010), los cuales sometieron a simulación gastrointestinal a *Lactobacillus gasseri* y obtuvieron una viabilidad del 98,86 %. Al comparar las viabilidades finales de la simulación gastrointestinal, Lee *et al.* (2019) reportaron viabilidades menores a las reportadas en este trabajo con valores de 41 % para cápsulas de alginato con *Lactobacillus acidophilus*, obtenidas por extrusión. Kim *et al.* (2008) quienes reportaron que a pH 1,2, *L. acidophilus* no encapsulado fueron completamente destruidos después 1 h de incubación mientras que *L. acidophilus* encapsulado mostraron valores por encima de 10⁶ UFC/mL a pH 1,5 después de 2 h. Nazzaro *et al.* (2009) encontraron *L. acidophilus* (La-05) no sobrevivió en el ambiente gástrico simulado de pH 1,0 después de 1 h, pero *L. acidophilus* (La-05) encapsulado sufrió una reducción de 1 log UFC/mL a pH 1,0 después de 2 h de incubación. Chandramouli *et al.* (2004) informó una mayor supervivencia que las células sin encapsular de *L. acidophilus* CSCC2400 y CSCC2409 inmovilizados en capsulas de alginato en ambientes de pH bajo.

Para ejercer efectos positivos en la salud, los probióticos deben resistir las condiciones estresantes del estómago, con un pH de los jugos gástricos entre 1,5 y 3,0 (Kos *et al.*, 2000). Por lo tanto, uno de los principales propósitos de la encapsulación es mejorar la tolerancia de los probióticos a un pH bajo (durante su paso por el estómago). El

El ecosistema intestinal participa, de manera activa, en la regulación cualitativa del equilibrio del microbiota intestinal, y de las interacciones a que está sometida con las bacterias entre sí, los sustratos digestivos, el epitelio de la mucosa del intestino y el sistema inmunitario. A la luz de los conocimientos más recientes, la participación de los probióticos en los eventos que ocurren en el ecosistema intestinal ocupa un sitio de interés para la salud humana (Castañeda, 2014). Es evidente que ciertas cepas de probióticos o cepas combinadas, tienen un potente efecto como inmunomodulador (Inturri, *et al.*, 2015), no solo en distintas afecciones intestinales, sino también en afecciones alérgicas y autoinmunes, como el asma, la dermatitis atópica y la artritis reumática. La eficacia de la administración de probióticos depende del tipo de cepa y de la dosis administrada, en base a estas pautas es necesario la investigación de matrices que puedan mantener vivos los microorganismos beneficiosos al momento de ingerirlos en algún alimento (Castañeda, 2014; Valdovinos *et al.*, 2017; Floch *et al.*, 2015).

Entre los probióticos bacterianos de *Lactobacillus*, los más usados, según las especies son: *acidophilus*, *casei*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* y *salivarius*; y de *Bifidobacterium* existen aproximadamente 30 especies (Pace *et al.*, 2015), algunas de las que habitan en el tracto intestinal humano corresponden a las especies adolescentes (*animalis*, *bifidum*, *breve* y *longum*). Los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal (Castañeda, 2017a; Castañeda, 2017b). La preparación de probióticos debe contener un determinado número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por dosis. Las dosis usadas en terapéutica y prevención varían entre 10^6 a 10^9 UFC, siendo dosis terapéutica de 10^9 UFC (Castañeda, 2014).

Las acciones de los probióticos incluyen competición por los nutrientes con gérmenes patógenos (Candela *et al.*, 2008), modulación de la respuesta inmune del huésped (Mazmanian *et al.*, 2005), biosíntesis de vitamina K (Bentley & Meganathan, 1982), efecto metabólico de fermentación de la fibra dietética, influencia en el contenido del tránsito por peristalsis (Matsumoto *et al.*, 2012) y detoxificación de los xenobióticos (Maurice *et al.*, 2013). Por lo antes expuesto se hace necesario profundizar más sobre los estudios de las BAL como organismos potencialmente importantes para la industria alimentaria.

CAPITULO V. CONCLUSIONES

En esta tesis se estudió el efecto de la inclusión de probióticos como *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) en combinación prebiótica con inulina y fructosa sobre bacterias patógenas generadas en alimentos lácticos y sus derivados, y las condiciones en las cuales estos probióticos y prebióticos deberían incorporarse para que mantengan su actividad en función de las condiciones del medio. Los resultados obtenidos muestran que las combinaciones A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa y A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina en presencia de *E. coli*; las combinaciones A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina y A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulina en presencia de *Salmonella spp* y las combinaciones A1B2 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa y A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina en presencia de *L. monocytogenes*, poseen propiedades de inhibición en la colonización y crecimiento de bacterias patógenas y regulación del deterioro alimentario. Todos estos son elementos que los convierten en buenos candidatos para su uso como probióticos. Sin embargo, es importante evaluar sus propiedades en modelos alimentarios para garantizar sus aplicaciones y uso seguro.

Mediante el modelado matemático de Gompertz se logró evaluar las curvas de crecimiento microbiano. El modelo fue capaz de representar el crecimiento de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI) bajo las diferentes condiciones teniendo en cuenta la actividad prebiótica de inulina y fructosa. Las cinéticas de crecimiento de la concentración de biomasa en función del tiempo mostraron diferentes ajustes para las diferentes combinaciones estudiadas, siendo las combinaciones A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructosa y A2B2 = *Lacticaseibacillus casei* + inulina las que mostraron el mejor ajuste, seguidas por las combinaciones A2B1 = *Lacticaseibacillus casei* + fructosa y A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulina. Así, el modelo usado es una herramienta precisa y útil para estudiar el crecimiento exponencial de *L. lactis* (CU-R-704) y *L. casei* (CU-L-CASEI). Dado que los probióticos estudiados son bacterias ácido lácticas, producen metabolitos primarios y terciarios como nisina y caseicina al principio de la fase exponencial.

La microencapsulación de *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei*, encapsulados en combinación con fructosa e inulina y ácido gálico almacenados presentó un tamaño considerado para las microcápsulas de 90 μm , se evidenció una buena eficiencia del proceso de

encapsulación de 89.5 %, además las cápsulas protegieron a las BAL durante 30 días de almacenamiento a 25 ± 2 °C, lo que indica que este método puede ser utilizado en la industria alimentaria.

La encapsulación de la combinación *L. lactis* + inulina mostró mayor viabilidad que las células libres durante el almacenamiento a 25 ± 2 °C. Además, *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* en combinación con inulina, fructosa y ácido gálico encapsulado pueden ser una herramienta prometedora para controlar la presencia de microorganismos patógenos durante el almacenamiento del queso Manaba. En este trabajo se encontró que la supervivencia bacteriana de las combinaciones *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* encapsulados con fructosa e inulina fue de 82% Esto da lugar a futuras aplicaciones de combinaciones efectivas de probióticos y prebióticos para maximizar la capacidad del huésped extendiendo su vida útil.

En los últimos años se ha observado un creciente interés en el desarrollo de alimentos funcionales, especialmente aquellos que contienen bacterias beneficiosas para la salud humana como lo son las BAL, ya que pueden proporcionar beneficios para la salud y representan un mercado creciente en la industria alimentaria. El uso de BAL se ha asociado con una amplia variedad de productos lácteos, las cuales se pueden incorporar en varias matrices alimentarias, a pesar de los problemas para mantener la viabilidad microbiana en las mismas.

Este estudio comparó el efecto de dos probióticos *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* en presencia de dos prebióticos fructosa e inulina encapsulados en una matriz de alginato, sobre la viabilidad celular de las BAL durante simulaciones del tránsito gastrointestinal.

El uso de alginato de sodio como matriz de las paredes de las cápsulas y la presencia de los prebióticos mejoran las características de supervivencia de las cepas probióticas. Este estudio indica que las células encapsuladas tuvieron mayor viabilidad en contraste con las células sin encapsular las cuales disminuyeron su viabilidad significativamente en los medios simulados. La combinación *L. casei* + fructosa presentó las mejores condiciones de viabilidad en el ensayo de simulación *in vitro* del tránsito gastrointestinal. Estos resultados indican que el método de encapsulación proporcionó protección a *L. lactis* y *L. casei* en condiciones gástricas e

intestinales simuladas. Sin embargo, aun cuando se obtuvieron viabilidades razonablemente altas, la concentración final obtenida no fue suficiente para cumplir con el requisito de la ingesta mínima necesaria ($6 \log$ UFC/mL) que las bacterias probióticas requieren para proporcionar un efecto beneficioso a su anfitrión.

Debido a la alta sensibilidad de las cepas utilizadas, se deben utilizar altas concentraciones en matrices alimentarias para que la población mínima requerida pueda alcanzar el objetivo previsto. Es necesario realizar más estudios comparando varias fuentes de prebióticos, otras cepas de BAL y además otras fuentes de matrices que sean amigables con el ambiente y que no causen ningún efecto adverso en la salud de las personas.

AGRADECIMIENTO

Con profunda estima y consideración, extiendo mi más sincero agradecimiento al PhD. Stalin Santacruz Terán (TUTOR) y PhD. Silvia Clavijo Velázquez (COOTUTORA), por la dedicación, inestimable apoyo e incondicional guía siendo pilares fundamentales en la dirección y enriquecimiento de esta investigación.

Expreso mi agradecimiento a los lectores: PhD. María Silvina Cabezas, PhD. Cecilia Adriana Flores, PhD. Marcelo Villarque cuyas perspicaces observaciones y constructivos comentarios han sido cruciales para la consolidación de este trabajo académico.

Reconozco con aprecio el apoyo del personal técnico de laboratorio de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí: Mg. Marlon Castro García y Cesar López Zambrano, así como también al personal técnico de laboratorio de la Escuela Politécnica Nacional: Mg. Mayra Molina Ramon, Mg. Iván Chango Villacis, Mg. Klever, por su valioso aporte en los análisis realizados en esta investigación.

Un especial agradecimiento al PhD. Víctor Otero Tuarez por su apoyo incondicional en todo momento para guiar este trabajo de investigación con su acertado conocimiento.

A la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, institución a la que pertenezco por haberme permitido como docente impulsar este gran objetivo académico, así como también el uso de los laboratorios y equipamiento.

A la Escuela Politécnica Nacional por haber hecho posible la realización de mi estudio en su programa doctoral con la coordinación de la PhD Jenny Ruales y PhD Edwin Vera, así como también las facilidades del uso de sus laboratorios y equipamiento.

A la Universidad Nacional de CUYO Reconozco mi agradecimiento por abrirme sus puertas y permitirme culminar mi estudio doctoral en su prestigiosa Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria en el programa doctoral en Ingeniería de Productos y Procesos de la Industria Alimentaria.

Finalmente, mi agradecimiento a mis amigos, compañeros y colegas que con sus palabras de aliento con profunda amistad supieron darme ese apoyo emocional que tanto necesite.

A cada uno de ustedes, mi más profundo agradecimiento por su invaluable contribución en este viaje académico.

DEDICATORIA

A Dios por ser siempre mi fortaleza espiritual y demostrarme la perseverancia necesaria para alcanzar mis objetivos, y ser quien en todo momento guía mi camino e ilumina mis acciones demostrándome que su tiempo es perfecto.

A mi amada Madre por su amor, entrega y apoyo emocional que siempre se ha caracterizado en transmitirme en todo momento son muy sabias sus enseñanzas.

A la memoria de mi amado Padre que, desde el cielo, me protege, guía, aconseja y me da el valor necesario para enfrentar todos los desafíos que se me presentan.

A mis amadas hijas Yumare y Zaskia por ser ese motor que día a día me impulsan para ser brindar la mejor versión de mí. Quiero ser para ellas un ejemplo de logros, éxitos y perseverancia.

A mis hermanos por su constante apoyo y motivación.

A mi gran amor Jorge por haber llegado a mi vida en el mejor momento quien con su paciencia, amor y bellos momentos compartidos hace que cada día sea muy especial a su lado y en el final de este proceso académico fue mi mejor compañía y apoyo.

Growth kinetics of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* in liquid culture medium containing as prebiotics inulin or fructose

Yessenia Maribel García Montes,^{a,b} Edwin Rafael Vera Calle,^a Stalin Gustavo Santacruz Terán,^b Marlon Reinaldo Castro García,^{b*} Jenny Cumandá Ruales Nájera^a and Mario René Lopez Vera^c

Abstract

BACKGROUND: Predictive microbiology is a tool that allows us to evaluate the behavior of the concentration of biomass and estimated cells under extrinsic conditions, providing scientific and industrial benefits. In the present study, the growth of *L. lactis* and *L. casei* combined with inulin and fructose was modeled using the Gompertz sigmoidal growth functions and plotted using data obtained from batch culture in relation to biomass and cell concentration expressed as estimates in $\ln N$ (OD_{600nm} and cells mL^{-1}) as a function of time.

RESULTS: The results of the kinetic modeling indicated that (T1) A1B1 = *L. lactis* + fructose and (T4) A2B2 = *L. casei* + inulin presented the best function coefficients and best fits in most cases compared to the rest. The specific growth rate of the maximum acceleration was from 0.364 to 0.473 h^{-1} and 0.100 to 0.129 h^{-1} , the concentration of bacterial cells (A) was from 0.556 to 0.713 and 0.425 to 0.548 respectively and the time where (μ) occurred with a greater magnitude (L) fluctuated between 0.854 and 0.802 and when this time in (L) is very fast, it presents values of ≤ 0.072 to ≤ 0.092 . Its coefficient of determination and/or multiple regression (R^2) obtained in the two adjustments was 0.97.

CONCLUSION: It was possible to predict the influence of the carbon source on the behavior of maximum growth rates, higher consumption due to nutrient affinity and shorter growth time.

© 2023 Society of Chemical Industry.

Keywords: *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus casei*; prebiotics; growth kinetics

INTRODUCTION

Recently, the influence of prebiotic ingredients on the cell growth of lactic acid bacteria (LAB) has been investigated. These have aroused great interest due to their properties as functional food and their beneficial effects on health and well-being of those who ingest them.¹

In recent decades, the potential of LAB as natural bio-preservatives of dairy products has been explored, due to the production of various metabolites such as lactic acid, hydrogen peroxide, diacetyl, carbon dioxide (CO_2) and the bacteriocins *per se*,^{2,3} the latter being those that have aroused the greatest interest.

Functional dairy products contain probiotic microorganisms belonging to the *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Saccharomyces* genera. These products have historically been defined as foods that contain live microorganisms that improve the health of the host through the improvement of the microbiotic balance in the human intestinal tract.⁴ Probiotics, including some species of *Lactococcus*, are known as live microorganisms that, when used in adequate amounts, provide health benefits to the host because they can survive the journey through the upper digestive tract, adhering to intestinal cells and contributing to intestinal balance.^{5,6}

On the other hand, prebiotics are defined as non-digestible food ingredients that positively affect the host, selectively stimulating the growth and/or metabolic activity of a limited number of strains of colonic bacteria,⁷ are non-digestible and, through an absorption process, resist hydrolysis in the upper gastrointestinal tract of humans.^{8,9} Likewise, they are functional ingredients found naturally in some plant and animal foods that have received considerable attention from the pharmaceutical and food industries due to their positive health effects.¹⁰ When consumed in adequate amounts, these ingredients reach the colon

* Correspondence to: MRC García, Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica 'Eloy Alfaro' de Manabí, Av. Circunvalación, Manta, 130207 Manabí, Ecuador, E-mail: marlon.castro@uleam.edu.ec

a Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador

b Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica 'Eloy Alfaro' de Manabí, Av. Circunvalación, Manta, Ecuador

c Laboratorio de Microbiología Ambiental, Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí 'MFL', Caiceta, Ecuador

intact and improve the modulation and composition of the intestinal microbiota, providing health benefits to the host and, therefore, to users.¹¹⁻¹³

Currently, mixtures of probiotics and prebiotics are often used to take advantage of their synergistic effects in application to additional products, these mixtures being called symbiotics.¹⁴ On the other hand, the design of symbiotic products is a new challenge for functional foods since prebiotics can improve the viability of probiotic bacteria and stimulate beneficial microbiota in the human gastrointestinal tract.¹⁵ The physiological effect of prebiotics seems to be related to an increase in the viscosity of the contents of the gastrointestinal tract, reducing the rate of gastric emptying, and increasing nutrient absorption.¹⁶

Inulin is considered a prebiotic. It is a polydisperse fructan consisting of a mixture of oligomers and larger polymers formed by β -(2-1)-fructosyl-fructose unions.¹⁷ The degree of polymerization from chicory ranges from 3 to 60, with an average value of approximately 10. Inulin can be synthesized from chicory root and from sucrose through the action of β -fructo-furanosidase (origin: *Aspergillus niger*).^{18,19} Inulin has a mild neutral flavor, is moderately soluble in water and provides body and palatability. It has various applications in the food industry, being part of the intrinsic composition of foods or added to them (functional foods), used in the food industry as substitutes for sugars and fats and usually provide texture to foods, stabilize foam formation and improve sensory qualities (organoleptic properties) of fermented milk products, biscuits, jams, bread, milk, candies, chocolates, beverages, frozen desserts, cereals, energy bars, meat, low-fat products or sugars due to the low amount of calories it provides, fruit preparations and fructose syrup.^{20,21}

Oligofructose is obtained by partial enzymatic hydrolysis of inulin. It is composed of linear chains of glucofuranosyl-fructosyl. The degree of polymerization ranges from 2 to 8, with an average value of approximately 4. It is present in foods such as cereals, onions, garlic, bananas and corn.^{22,23} This substance is much more soluble than inulin and moderately sweet, approximately the sweetness of sugar.¹⁷ In combination with intense sweeteners, it generates a more finished palate and a longer lasting fruit taste with less after-taste. In the food industry it can be used in yoghurts with fruit, fermented milks, fresh cheeses, ice creams and dairy drinks with a reduced-calorie food positioning. It also improves the texture and palatability of the final product, shows wetting properties, reduces water activity and changes the boiling and freezing points.²⁴

Rastall²⁵ studied the applications and industrialization of prebiotics and reported that, although several hydrocarbons are marketed as prebiotics throughout the world, the most prominent are inulin, fructo-oligosaccharides (FOS) and galacto-oligosaccharides (GOS). They are, therefore, the most widely studied hydrocarbons in human clinical trials.

Previous studies have evaluated the influence of various prebiotics on the growth and acidification of pure probiotic cultures and co-cultures in fermented skim milk. These studies reported that the addition of inulin significantly reduces the fermentation time and increases the viability of probiotic bacteria.²⁶

It is necessary to highlight, as indicated by Guimarães et al.,²⁷ that probiotics (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., etc.) and prebiotics (inulin, FOS, GOS, etc.) are functional ingredients that can change the texture of food, improving it or not, in addition to the inhibitory effect on the growth of pathogenic bacteria, according to Margalho et al.²⁸

To achieve a better understanding of the functional activity of prebiotics towards probiotic bacteria, it is necessary to develop

better symbiotic preparations. The success in establishing the necessary symbiotic conditions is closely related to the compatibility between the chosen components, that is, between the prebiotic ingredients and the probiotic bacteria.²⁹⁻³¹

The authors suggest that *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus casei* strains could be useful as probiotic bacteria when used together with prebiotics (inulin and fructose) to create a symbiotic development, which could control the growth of beneficial bacteria in the gastrointestinal tract. Therefore, the study reported here aimed to evaluate the influence of inulin and fructose on the growth of bacterial strains *Lactococcus lactis* CU-R-704 and *Lactobacillus casei* CU-L-CASEI and to evaluate the parameters of the kinetics of growth using the modified Gompertz model.

MATERIALS AND METHODS

Selection of bacterial strains, prebiotics and growth conditions

Strains of LAB (*Lactococcus lactis* CU-R-704, *Lactobacillus casei* CU-L-CASEI) and two prebiotic sources (inulin from BENEIO chicory, Germany, and fructose) were used. The probiotic and prebiotic strains were purchased from Descalzi SA. The initial activation of the LAB in combination with prebiotics was carried out in sterile bidistilled water at pH 6.5 \pm 0.2 and with an incubation process at 37 °C for 48 h.

Linear regression between absorbance reading and standard curve of McFarland patterns to determine average values of growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) in concentration of number of estimated cells (*N* cells mL⁻¹)

From the absorbance readings, the cell concentration (cells mL⁻¹) was determined following the methodology of Arcos et al.³² with slight modifications. A five-point calibration curve was developed with absorbances between 0.05 and ca 0.4) corresponding to cell suspensions between 1.5 \times 10⁸ and 1.2 \times 10⁹ cells mL⁻¹. Based on this information, the linearized equation was generated to interpolate and estimate cell concentration (cells mL⁻¹):

$$Y = 0.0966 + 0.0511(x) \quad (1)$$

where *Y* = absorbance of bacterial cultures and *x* = cell concentration in (cells mL⁻¹).

$$y = 0.0966 + 0.0511(x) \approx \text{Abs} = 0.0966 + 0.0511 (\text{cells mL}^{-1}).$$

$$\text{Cells mL}^{-1} = (\text{Abs} - 0.0966)/0.0511.$$

$$\text{Cells mL}^{-1} = (0.3397 - 0.0966)/0.0511.$$

$$\text{Cells mL}^{-1} = 4.76 \approx 4.8.$$

Growth kinetics of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) in liquid medium

The treatment products of the combination of probiotics of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) and their respective prebiotics (inulin and fructose) in liquid medium were generated, these being *L. lactis* + fructose; *L. lactis* + inulin; *L. casei* + fructose; and *L. casei* + inulin.

Three preinocula were considered for each treatment, and they were prepared as follows following the methodology of Deepika et al.³³ and Rodríguez et al.⁷ where bidistilled water was used as a liquid medium for each of the BAL strains separately at concentrations of 1% (p/v) or 1.5 \times 10⁸ and supplemented with the prebiotic source of inulin and fructose at 1% (p/v) or 10 g L⁻¹. BAL cultures were incubated with orbital shaking at 6 \times g, pH 6.5 \pm 0.2 for 24 h at 37 °C.

Likewise, a 3 mL sample of the BAL culture was taken and centrifuged at $2486 \times g$ for 10 min (MED Instruments/MPW 352R centrifuge). The supernatant was eliminated, and three washes were carried out with sterile bidistilled water to eliminate the residues of the water broth. The bacterial cell pellet was resuspended in 3 mL of the source solution of inulin and/or fructose at 1% (p/v) or 10 g L^{-1} .

Likewise, following the methodologies of Singh *et al.*,³⁴ Konopacki *et al.*³⁵ and Forler *et al.*,³⁶ 200 μL of bidistilled water was first inoculated as a control in the wells at the ends of the microplates. Subsequently, 200 μL of fresh LAB with prebiotic activity was inoculated into the internal wells of the microplate, which were incubated in a Synergy H1 microplate reader at 37°C . Measurements of growth of BAL cultures at optical density at 600 nm were recorded at time intervals of 17 min for 6 h.

Following previously reported methodologies,^{10,34,37-44} the modified Gompertz sigmoid model was selected to perform the kinetics of growth under extrinsic conditions of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) with the prebiotic activity of inulin and fructose, which allows us in this work to make a comparison in log biomass ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) and the number of cells estimated log(cells mL^{-1}) of the cell concentration variable.

The modified Gompertz model presents three sigmoidal function coefficient parameters (a , b and c), which were used to find other kinetic parameters that describe the growth process of the microbial concentration, including the calculated A , rate of specific maximum growth (μ_{max}), duration of the lag phase and/or lag time (λ), generation time (T_G), time associated with the inflection point ($T_{\text{Pt. Inf.}}$), concentration cell to inflection point ($C_{\text{C Pt. Inf.}}$), time between lag time and inflection point (TT. Lag pt. Inf.), number of generations per time unit (K), exponential growth limit time ($T_{\text{C. exp.}}$), maximum initial cell concentration in biomass (CX_{max0}) and number of estimated cells (CN_{max0}), maximum concentration of total cells in biomass (CX_{max}) and number of estimated cells (CN_{max}), productivity of maximum concentration of viable cells in biomass (PX_{max}) and number of cells estimated (PN_{max}).^{41,43,45-47} At the same time, the equation given by Zwietering *et al.*⁴³ from the original equation of Gompertz,⁴⁸ and used by Singh *et al.*³⁴ was used.

Mathematical properties of the Gompertz model

The Gompertz equation arises from self-regulating growth models, where the growth rate decreases exponentially with time after reaching the inflection point. The Gompertz equation is usually expressed in the following way:

$$y = a \times \exp[-\exp(b-ct)] \quad (2)$$

$$y = N0 + a \times \exp[-\exp(b-ct)] \quad (3)$$

where y is the concentration of BAL bacteria at a time (t); $N0$ is the initial cell concentration, $a > 0$ is the maximum value of cell concentration reached, corresponding to an asymptote; the parameter $b > 0$ controls the difference between the initial concentration and the final concentration at a time (t^{-1}); \exp is the value corresponding to (2.718); parameter $c > 0$ describes the time in which the growth rate is of greater magnitude; and t is an incubation time (h). The inflection point is the point in time where $y = a/\exp$, this giving $t = b/c$. The Gompertz curve allows generating asymmetry around the inflection point and reaches this point before 50% of the maximum value of cell number

concentration is reached. It shows fast early growth, but slower values as it approaches the asymptote, with a long period of linear growth around the inflection point.^{34,43,46,47,49}

The Gompertz function conversion formulas selected to model growth were:

$$a = A \text{ (calculated and/or asymptotic level } A \text{ of the growth curve)} \quad (4)$$

$$c = \frac{\mu_{\text{max}}^{\text{exp}}}{a} \quad (5)$$

where c is the constant that describes the time in which the growth rate is of greater magnitude; μ_{max} = specific maximum growth rate (time from the exponential growth phase) of the organisms in each of the treatments; \exp is the value corresponding to (2.718); a is the maximum value of concentration of number of cells reached, corresponding to an asymptote.

$$b = \frac{\mu_{\text{max}}^{\text{exp}}}{a} \lambda + 1 \quad (6)$$

where b is the value that controls the difference between the initial concentration and the final concentration at a time (t^{-1}); μ_{max} = maximum specific growth rate (time from the exponential growth phase) of the organisms in each of the treatments; \exp is the value corresponding to (2.718); a is the maximum value of concentration of number of cells reached, corresponding to an asymptote; λ = lag time and/or duration of the lag phase (time elapsed after inoculation and before the start of exponential growth).

Likewise, the Gompertz function was used to determine the predictive parameters of growth kinetics in the organisms studied. The formulas used and the derived values of the three parameters a , b and c obtained were calculated as:

$$T_{\text{Pt. Inf.}} = \frac{b}{c} \quad (7)$$

where $T_{\text{Pt. Inf.}}$ = time associated with the inflection point; b is the value that controls the difference between the initial concentration and the final concentration at a time (t^{-1}); c is a constant that describes the time in which the growth rate is of greater magnitude.

$$C_{\text{C Pt. Inf.}} = \frac{a}{\exp} \quad (8)$$

where $C_{\text{C Pt. Inf.}}$ = cell concentration at the inflection point; a is the maximum value of concentration of number of cells reached, corresponding to an asymptote; \exp is the value corresponding to (2.718).

$$\mu_{\text{max}} = \frac{aC}{\exp} \quad (9)$$

where μ_{max} = specific maximum growth rate (time from the exponential growth phase) of the organisms in each of the treatments; a is the maximum value of concentration of number of cells reached, corresponding to an asymptote; c is a constant that describes the time in which the growth rate is of greater magnitude; \exp = is the value corresponding to (2.718).

$$\lambda = \frac{b-1}{c} \quad (10)$$

where λ = lag time and/or duration of the lag phase (time elapsed after inoculation and before the start of exponential growth); b is the value that controls the difference between the initial concentration and the final concentration at a time (t^{-1}); and c is a constant that describes the time in which the growth rate is of greater magnitude.

$$TT.Lag\ pt.\ Inf. = T_{Pt.\ Inf.} - \lambda \quad (11)$$

where TT. Lag pt. Inf. = time between the lag time and the inflection point t (h); $T_{Pt.\ Inf.}$ = time associated with the inflection point; and λ = delay time and/or duration of the lag phase (time elapsed after inoculation and before the start of exponential growth).

$$k = \frac{1}{T_g} \quad (12)$$

where k = number of generations per unit of time (generations/h) and/or the times the cells divided in 1 h and T_g = generation time and/or the time it takes for a cell to divide.

$$T_g = \frac{\log(2)}{\mu_{max}} \quad (13)$$

where T_g = generation time and/or time it takes for a cell to divide; \log = base 10 logarithm; and μ_{max} = maximum growth rate (time from the exponential growth phase) of the organisms in each of the treatments.

$$Tc.exp. = \frac{a}{\mu_{max}} \quad (14)$$

where Tc.exp. = exponential growth time limit; a is the maximum value of cell number concentration reached, corresponding to an asymptote; and μ_{max} = maximum specific growth rate.

$$CX_{max0} = \frac{a}{T_{Pt.\ Inf.}} \quad (15)$$

where CX_{max0} = initial maximum cell concentration; a is the maximum value of concentration of number of cells reached, corresponding to an asymptote; and $T_{Pt.\ Inf.}$ = time associated with the inflection point.

$$CN_{max0} = \frac{a}{T_{Pt.\ Inf.}} \quad (16)$$

where CN_{max0} = initial maximum cell concentration; a is the maximum value of cell number concentration reached, corresponding to an asymptote; and $T_{Pt.\ Inf.}$ = time associated with the inflection point.

$$CX_{max} = a + c \quad (17)$$

where CX_{max} = maximum concentration of total cells; a is the maximum value of cell number concentration reached, corresponding to an asymptote; and c is a constant that describes the time in which the growth rate is of greater magnitude.

$$CN_{max} = a + c \quad (18)$$

where CN_{max} = maximum concentration of total cell number; a is the maximum value of concentration of number of cells reached, corresponding to an asymptote; and c is a constant that describes the time in which the growth rate is of greater magnitude.

$$RX_{max} = \frac{X - X_0}{s} \quad (19)$$

where RX_{max} = yield of maximum concentration of viable cells; X represents the total concentration of viable cells (g cells L⁻¹); X_0 is the initial biomass concentration (g cells L⁻¹); and s represents the consumed substrate (g).

$$RN_{max} = \frac{N - N_0}{s} \quad (20)$$

where RN_{max} = yield of maximum concentration of number of viable cells; X represents the total concentration of viable cells (cells mL⁻¹); X_0 is the initial biomass concentration (cells mL⁻¹); and s represents the consumed substrate (g).

$$PX_{max} = \frac{X}{t} \quad (21)$$

where PX_{max} = productivity of maximum concentration of viable cells; X represents the total count of viable cells (g cells L⁻¹); and t = total incubation time (h).

$$PN_{max} = \frac{N}{t} \quad (22)$$

where PN_{max} = maximum concentration productivity of the number of viable cells; N represents the total count of viable cells (cells mL⁻¹ kg⁻¹); and t = total incubation time (h).

Goodness of fit model

The adjustment of the predictive model and between the experimental points was carried out applying the statistical criteria suggested by Torres et al.⁵⁰ and Chambi et al.,⁴⁷ these being the standard deviation and the determination coefficient R^2 :

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (23)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (24)$$

Statistical analysis

In addition, graphs of growth kinetics, coefficient of multiple correlation and/or determination (R^2), standard calibration curve of linear correlation McFarland patterns, expected normal distribution (Shapiro–Wilk test) and non-regression analysis were made linear in Statistic software version 10, Statsoft, Inc.

RESULTS

Growth kinetics of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) with the prebiotic activity of inulin and fructose are expressed in

base 10 logarithm of log biomass (DO_{600nm}) measured in g cells L^{-1} and estimated cell numbers measured in log N (cells mL^{-1}).

For the parameterization of the Gompertz model regarding the variable cell concentration in the modeling of the exponential phase of the growth period, the parameters a , b and c were determined according to the sigmoidal functions shown in Figs 1 and 2 and Tables 1 and 2. The growth kinetics determined in the non-linear modified Gompertz function helped to calculate the asymptote 'CXmax' accurately. The Gompertz model showed that the maximum growth is reached with the highest concentration of maximum cells in biomass (CXmax) and number of estimated cells (CNmax) in the BAL of the experimental group used in A1B1, which varied between 0.24 log (g cells L^{-1}) or 0.59 (g cells L^{-1}) and 8.99 log (cells mL^{-1}) or 9.60×10^8 (cells mL^{-1}) at 2.71 and 2.66 h. A2B2 resulted in medium growth and cell concentration was 0.18 log (g cells L^{-1}) or 0.54 (g cells L^{-1}) and 8.93 log (cells mL^{-1}) or 8.70×10^8 (cells mL^{-1}) respectively after of 6 h. The lowest concentration was obtained in A2B1 with a cell concentration of

0.068 log (g cells L^{-1}) or 0.18 (g cells L^{-1}) and 8.19 log (cells mL^{-1}) or 1.54×10^8 (cells mL^{-1}) at 3.30 and 3.26 h, respectively.

The resulting growth parameters are presented in Figs 3 and 4 and Tables 3 and 4, the values of the slope of the line tangent to the inflection point during the linear period of expression of the curve and/or growth rate are shown. Specific maximum growth (μ_{max}) agrees with the trend of the average division values and/or number of generations (k) where the highest proliferation value (μ_{max}) was observed in A1B1 up to 3.0 to 5.0 times higher with respect to the rest of the treatments, which varied from 0.16 to 0.21 h^{-1} , while A2B1 and A2B2 did not exceed 0.03 to 0.06 h^{-1} . Furthermore, the shortest T_g was estimated for A1B1 (1.90 to 1.47 h) and the longest for A2B1 and A2B2 (3.71 and 5.36 h, respectively). The Gompertz model showed that the longest lag phase (λ) was observed in A2B2, and was approximately 0.85 and 0.80 h.

In contrast, for A1B1, a clear faster adaptation stage was observed with values between -0.07 and -0.09 h respectively. Likewise, the average division values and/or number of

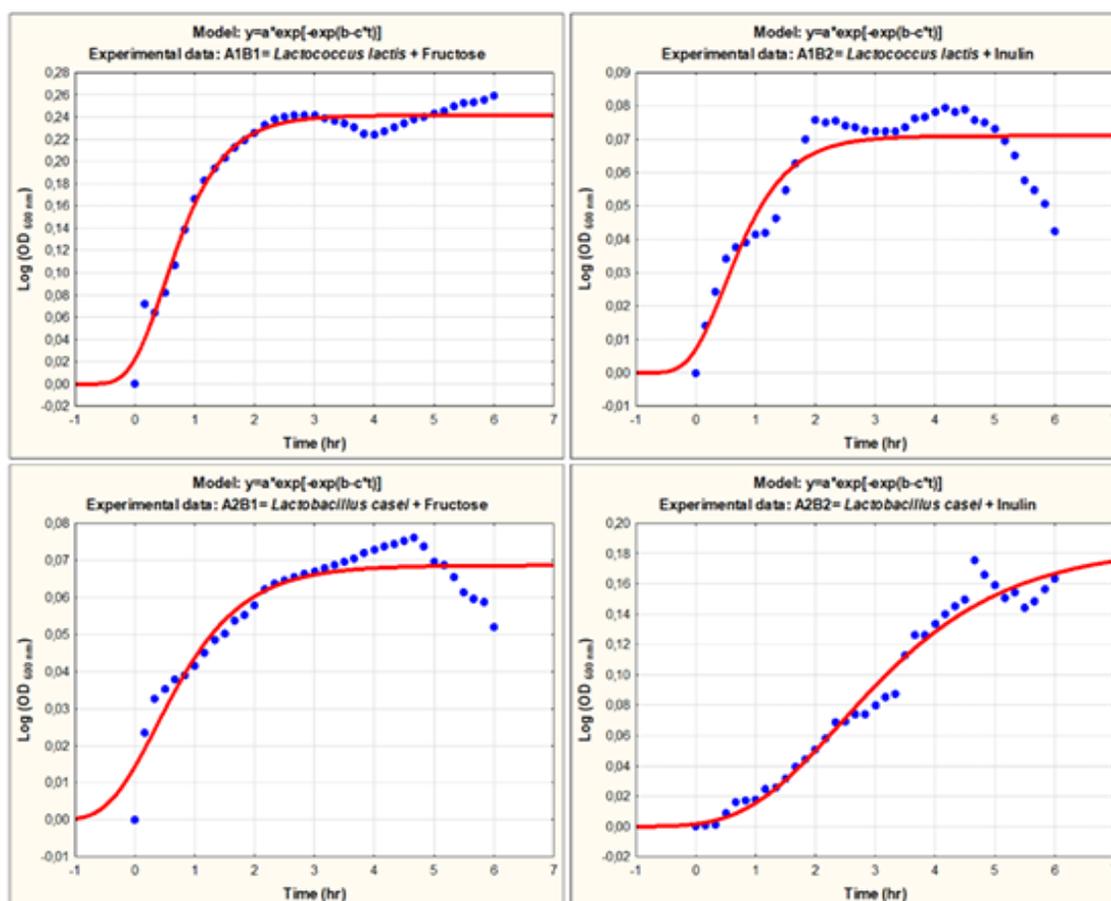


Figure 1. Growth prediction of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI), based on the prebiotic activity of inulin and fructose.

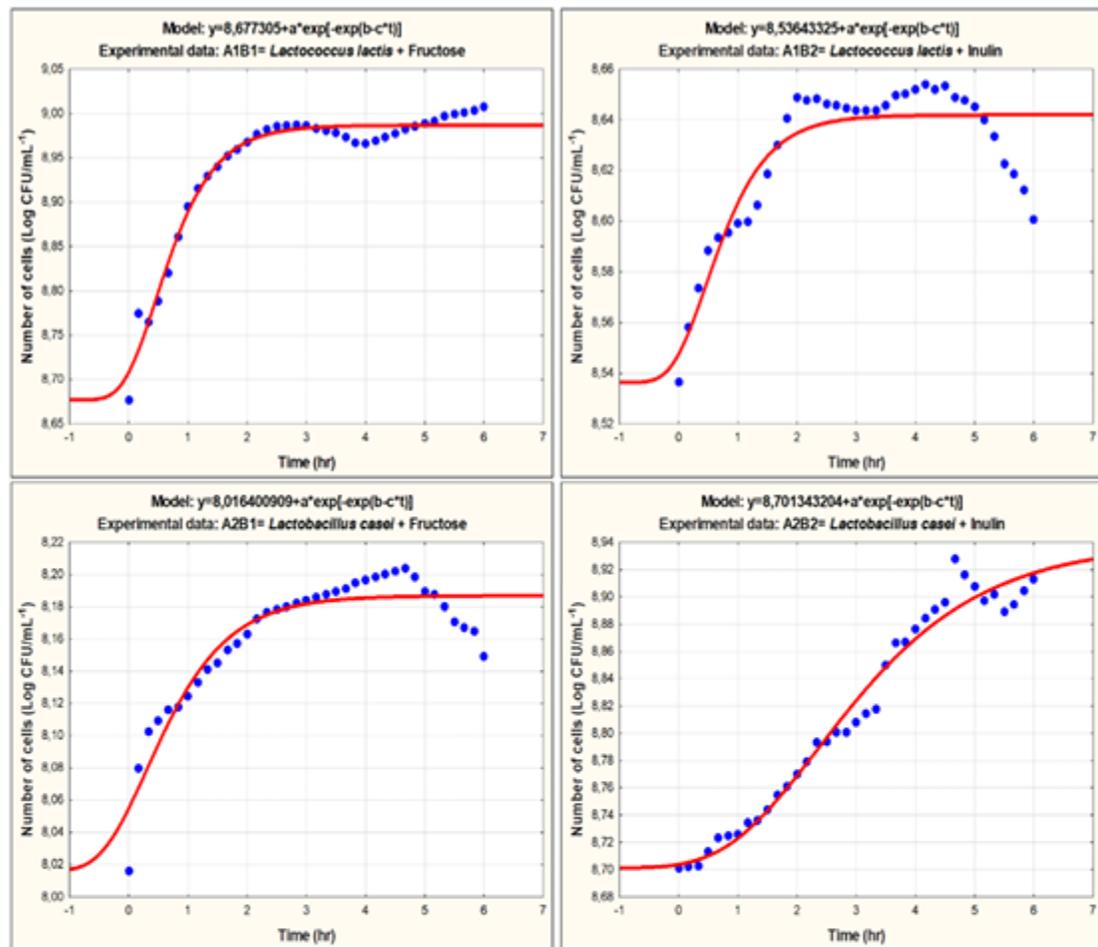


Figure 2. Growth prediction of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASE1), based on the prebiotic activity of inulin and fructose.

Table 1. Effect of prebiotic source of inulin and fructose on the growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASE1), expressed in logarithm of base 10 in log biomass (DO_{600nm})

Treatments	Variable: cell concentration				
	Sigmoidal function coefficients			Kinetic parameters	
	A	B	C	$A=CX_{max}$ Log (g cells L ⁻¹)	$A=CX_{max}$ g cells L ⁻¹
A1B1 ^a	0.24	0.87	1.78	0.24	0.59
A1B2 ^b	0.07	0.83	1.72	0.07	0.32
A2B1 ^c	0.068	0.45	1.24	0.068	0.18
A2B2 ^d	0.18	1.55	0.64	0.18	0.54

^a (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructose.

^b (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulin.

^c (T3) A2B1 = *Lactobacillus casei* + fructose.

^d (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulin.

generations (k) are presented. The smallest was observed for A2B1 and A2B2 (0.10 and 0.19 h) and the highest for A1B1 (0.53 to 0.68 h). This means that A2B1 and A2B2 need the shortest period for cell division compared to the rest of the treatments. On the contrary, A1B1 needs more time. On the other hand, the time between the lag time and the inflection point (T.T. Lag pt. inf.) was lowest for A1B1 at between 0.56 and 0.55 h and highest for A2B2 at 1.56 h. The parameterization of the second derivative equal to 0 or inflection time (T pt. Inf.) produces X time coordinates with an adequate value for A1B1 from 0.49 to 0.46 h, and a higher value in A2B2 with 2.42 to 2.36 h for the cell concentration reached at the turning point. The parameterization on the Y axis produced cell concentration values at the inflection point (C c. pt. Inf.) being highest in A1B1 with 0.09 log (g cells L⁻¹) or 0.42 (g cells L⁻¹) at 8.79 log (cells mL⁻¹) or 6.18×10^8 (cells mL⁻¹) and the lowest value was reached in A2B1 with 0.03 log (g cells L⁻¹) or 0.6 (g cells L⁻¹) at 8.08 log (cells mL⁻¹) or 1.20×10^8 (cells mL⁻¹) approximately in the experimented BAL.

Table 2. Effect of prebiotic source of inulin and fructose on the growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI), expressed in logarithm and in number of estimated cells ($\log(\text{cells mL}^{-1})$)

Treatments	Variable: cell concentration				
	Sigmoidal function coefficients			Kinetic parameters	
	A	B	C	$A = CN_{max}$	$A = CN_{max}$
				Log N (cells mL^{-1})	N (cells mL^{-1})
A1B1 ^a	0.31	0.83	1.80	8.99	9.60×10^8
A1B2 ^b	0.11	0.81	1.73	8.64	4.38×10^8
A2B1 ^c	0.17	0.40	1.29	8.19	1.54×10^8
A2B2 ^d	0.24	1.51	0.64	8.93	8.70×10^8

^a (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructose.
^b (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulin.
^c (T3) A2B1 = *Lactobacillus casei* + fructose.
^d (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulin.

The time limit of the shortest exponential growth phase occurs in A1B1 that varied from 1.51 and 1.53 h and a concentration of 0.20 $\log(\text{g cells L}^{-1})$ or 0.54 (g cells L^{-1}) and 8.94 $\log(\text{cells mL}^{-1})$ or 8.73×10^8 (cells mL^{-1}) approximately. The end of the growth phase and the beginning of the stationary phase can be distinguished in the predictive curve, while for A2B1 in a prolonged time of 2.19 and 2.10 h, with a concentration of 0.06 $\log(\text{g cells L}^{-1})$ or 0.17 (g cells L^{-1}) and 8.17 $\log(\text{cells mL}^{-1})$ or 1.48×10^8 (cells mL^{-1}), respectively, shows the same behavior.

The Gompertz model used to model the growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) using the nonlinear sigmoidal functions provided a good representation of nonlinear growth. The model using nonlinear regression presented reliable estimations of the coefficients of determination (R^2) revealing that the best fits of the predictive model correspond to A1B1 and A2B2

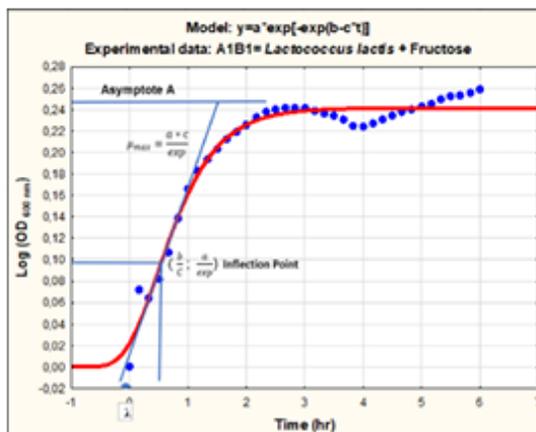


Figure 3. Growth curve of the data modeled from the Gompertz sigmoidal function, showing the tangent line and the maximum specific growth rate (μ_{max}) in the exponential phase, asymptotic cell concentration, inflection point and the time of delay (λ).

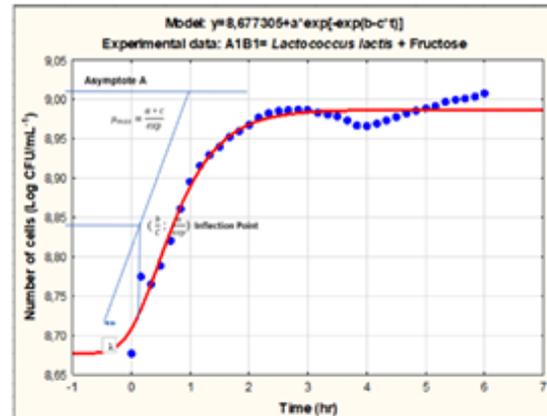


Figure 4. Growth curve of the data modeled from the Gompertz sigmoidal function, showing the tangent line in the exponential phase and maximum specific growth rate (μ_{max}), asymptotic cell concentration, inflection point and lag time (λ).

with higher values of R^2 of 0.974 and 0.976 for the function used, which fall close to 1, where R^2 describes the growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI). However, all the treatments evaluated were adjusted to the Gompertz mathematical model with values higher than 0.814 (Tables 4 and 5 and Figs 2 and 3) for the cell concentration variable (Table 6).

The parameterizations of the resulting production and productivity of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) cultivated in

Table 3. Parameters of the exponential growth curve of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) with two prebiotic sources, inulin and fructose, expressed in logarithm and in log biomass (DO_{600nm})

Variable (cell concentration)	Treatments			
	A1B1 ^a	A1B2 ^b	A2B1 ^c	A2B2 ^d
Kinetic parameters				
μ_{max} (h^{-1})	0.16	0.07	0.03	0.04
T_g (h)	1.90	6.69	9.59	6.93
λ (h)	-0.07	-0.11	-0.44	0.85
k (h)	0.53	0.15	0.10	0.14
T t. Lag pt. inf (h)	0.56	0.58	0.80	1.56
T pt. inf (h)	0.49	0.47	0.36	2.42
C c. pt. inf: log (g cells L^{-1})	0.09	0.04	0.03	0.07
C c. pt. inf (g cells L^{-1})	0.42	0.29	0.16	0.41
T c. exp. (h)	1.53	1.58	2.19	4.25
T c. 50% maturity of the asymptote (h)	0.74	0.56	0.44	3.35
T c. 98% maturity of the asymptote (h)	2.71	1.86	3.26	>6,00
R^2	0.974	0.814	0.882	0.975

- ^a (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructose.
^b (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulin.
^c (T3) A2B1 = *Lactobacillus casei* + fructose.
^d (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulin.

Table 4. Parameters of the exponential growth curve of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) under different prebiotic sources of inulin and fructose, expressed in logarithm of biomass (cells mL⁻¹)

Variable (cell concentration)	Treatments			
	A1B1 ^a	A1B2 ^b	A2B1 ^c	A2B2 ^d
Kinetic parameters				
μ_{max} (h ⁻¹)	0.21	0.07	0.08	0.06
T_g (h)	1.47	4.48	3.71	5.36
λ (h)	-0.09	-0.11	-0.47	0.80
k (h)	0.68	0.22	0.27	0.19
T t. Lag pt. inf (h)	0.55	0.58	0.77	1.56
T pt. inf (h)	0.46	0.47	0.31	2.36
C c. pt. inf: log (cells/mL ⁻¹)	8.79	8.58	8.08	8.79
C c. pt. inf (cells mL ⁻¹)	6.18×10^8	3.95×10^8	1.20×10^8	6.15×10^8
T c. exp. (h)	1.51	1.57	2.10	4.24
T c. 50% maturity of the asymptote (h)	0.72	0.53	0.33	3.36
T c. 98% maturity of the asymptote (h)	2.66	1.86	3.30	>6.00
R^2	0.974	0.814	0.885	0.976

^a (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructose.
^b (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulin.
^c (T3) A2B1 = *Lactobacillus casei* + fructose.
^d (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulin.

media under different prebiotic sources of inulin and fructose are presented in Table 4–6. The initial maximum cell concentration in biomass (CXmax0) and estimated cell number (CNmax0) depend on the type of substrate in the medium and the species used.

Table 5. Maximum cell concentration productivity of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) cultured in media under different prebiotic sources of inulin and fructose, expressed as logarithm of biomass (g cells L⁻¹)

Variable (cell concentration)	Treatments			
	A1B1 ^a	A1B2 ^b	A2B1 ^c	A2B2 ^d
Productivity kinetic parameters				
CXmax0 log (g cells L ⁻¹)	0.49	0.01	0.19	0.08
CXmax0 (g cells L ⁻¹)	1.06	0.28	0.23	0.42
CXmax log (g cells L ⁻¹)	2.02	1.79	1.31	0.82
CXmax (g cells L ⁻¹)	35.69	16.88	3.07	2.36
RXmax log (g cells L ⁻¹ g ⁻¹ S. consumed)	0.15	0.18	0.11	0.07
RXmax (g cells L ⁻¹ g ⁻¹ S. consumed)	0.48	0.41	0.19	0.42
PXmax log (g cells L ⁻¹ × h)	1.06	0.50	0.14	0.12
Pxmax (g cells L ⁻¹ × h)	3.92	0.27	0.21	0.46

^a (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructose.
^b (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulin.
^c (T3) A2B1 = *Lactobacillus casei* + fructose.
^d (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulin.

A1B1 resulted in a much higher CXmax0 and CNmax0 compared to A2B1, which varied from 0.49 log (g cells L⁻¹) or 1.06 (g cells L⁻¹) and 9.35 log (cells mL⁻¹) or 2.22×10^9 (cells mL⁻¹) or 0.23 (g cells L⁻¹) and 8.57 log (cells mL⁻¹) or 3.74×10^8 (cells mL⁻¹), respectively. In addition, the maximum concentration of total cells in biomass (CXmax) and cell number (CNmax) of highest concentration estimated for A1B1 was 2.02 log (g cells L⁻¹) or 35.69 (g cells L⁻¹) and 10.79 log (cells mL⁻¹) or 6.17×10^{10} (cells mL⁻¹), and the lowest was present in A2B2 and A2B1 and its values were 0.82 log (g cells L⁻¹) or 2.36 (g cells L⁻¹), 9.58 log (cells mL⁻¹) or 3.81×10^9 (cells mL⁻¹), 1.31 log (g cells L⁻¹) or 3.07 (g cells L⁻¹) and 9.48 log (cells mL⁻¹) or 3.02×10^9 (cells mL⁻¹), respectively.

Likewise, the yield of maximum concentration of viable cells on the substrate consumed in biomass (RXmax) and number of cells (RNmax) of highest concentration was for A2B1 with 0.15 log (g cells L⁻¹ g⁻¹ substrate consumed) or 0.48 (g cells L⁻¹ g⁻¹ substrate consumed) and 8.82 log (cells mL⁻¹ g⁻¹ substrate consumed) or 6.63×10^8 (cells mL⁻¹ g⁻¹ substrate consumed), respectively, and the lowest yield was reached in A2B1 with values of 0.11 log (g cells L⁻¹ g⁻¹ substrate consumed) or 0.19 (g cells L⁻¹ g⁻¹ substrate consumed) and 8.1182 log (cells mL⁻¹ g⁻¹ substrate consumed) or 1.28×10^8 (cells mL⁻¹ g⁻¹ substrate consumed), respectively. For the productivity of maximum concentration of viable cells in biomass (PXmax) and number of estimated cells (PNmax), it turned out that A1B1 showed a higher growth productivity, which varied from 1.06 log (g cells L⁻¹ × h) or 3.92 (g cells L⁻¹ × h) and 10.12 log (cells mL⁻¹ (kg × h)⁻¹) or 1.31×10^{10} (cells mL⁻¹ (kg × h)⁻¹) respectively at 1.53 and 1.51 h in the exponential growth phase. Likewise, it is evident that A2B1 and A2B2 had decreased PXmax and PNmax, which varied between 0.14 log (g cells L⁻¹ × h) or 0.21 (g cells L⁻¹ × h) and 8.41 log (cells mL⁻¹ (kg × h)⁻¹) or 2.57×10^8 (cells mL⁻¹ (kg × h)⁻¹), 0.12 log (g cells L⁻¹ × h) or 0.46 (g cells L⁻¹ × h) at one time of 2.19 and 2.10 h in the exponential phase and 8.87 log (cells mL⁻¹ (kg × h)⁻¹) or 7.34×10^8 (cells mL⁻¹ (kg × h)⁻¹) respectively at 4.24 and 4.25 h (exponential phase).

DISCUSSION

Growth kinetics of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) with the prebiotic activity of inulin and fructose were expressed in logarithm of base 10 of biomass, measured in log(DO_{600nm}) or (g cells L⁻¹) and estimated cell numbers measured in log N (cells mL⁻¹).

Parameterization of the coefficients of the Gompertz model, for the cellular concentration of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) with the prebiotic activity of inulin and fructose in log(DO_{600nm}) and log(cells mL⁻¹), provides very valuable information, since it allowed estimating the growth parameters, the maximum concentration value of the number of cells reached, which corresponds to the asymptote, yields and productivity in hours for the variable evaluated. There are many studies that indicate that glucose is one of the carbohydrates that is most used as a carbon source for the culture of LAB. Its ability to degrade various carbohydrates is well established and it is known that it depends on the strain that it contains,^{51–54} which could also be evidenced in our study. In addition, the exponential growth kinetics were observed in all the treatments tested, showing excellent growth with values of maximum cell concentrations that were above the range

Table 6. Maximum cell number concentration productivity of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) cultured in media under different prebiotic sources of inulin and fructose, expressed as logarithm of number of estimated cells log (cells mL⁻¹)

Variable (cell concentration)	Treatments			
	A1B1 ^a	A1B2 ^b	A2B1 ^c	A2B2 ^d
Productivity kinetic parameters				
CNmax0 log (cells mL ⁻¹)	9.35	8.76	8.57	8.80
CNmax0 (cells mL ⁻¹)	2.22 × 10 ⁹	5.78 × 10 ⁸	3.74 × 10 ⁸	6.34 × 10 ⁸
CNmax log (cells mL ⁻¹)	10.79	10.37	9.48	9.58
CNmax (cells mL ⁻¹)	6.17 × 10 ¹⁰	2.36 × 10 ¹⁰	3.02 × 10 ⁹	3.81 × 10 ⁹
RNmax log (cells mL ⁻¹ g ⁻¹ S. consumed)	8.82	8.70	8.11	8.78
RNmax (cells mL ⁻¹ g ⁻¹ S. consumed)	6.63 × 10 ⁸	4.98 × 10 ⁸	1.28 × 10 ⁸	6.01 × 10 ⁸
PNmax log (cells mL ⁻¹ (kg × h) ⁻¹)	10.12	8.95	8.41	8.87
PNmax (cells mL ⁻¹ (kg × h) ⁻¹)	1.31 × 10 ¹⁰	8.83 × 10 ⁸	2.57 × 10 ⁸	7.34 × 10 ⁸

^a (T1) A1B1 = *Lactococcus lactis* + fructose.
^b (T2) A1B2 = *Lactococcus lactis* + inulin.
^c (T3) A2B1 = *Lactobacillus casei* + fructose.
^d (T4) A2B2 = *Lactobacillus casei* + inulin.

established at BAL of 1.0×10^6 and 1.0×10^7 cells g⁻¹ of product, as a level recommended for probiotics in fermented cheese-type products.⁵⁵⁻⁶¹ It is for this reason that the strains studied can be used in the preparation of inocula with probiotic properties that will allow competition against pathogenic microorganisms, facilitating the colonization of cheese and its derivatives. In this study, two types of sugars (fructose and inulin) were used as carbon sources in the growth medium to find a suitable sugar on the optimal exponential growth of the mentioned strains. In their study, Farinha *et al.*¹ evaluated the growth kinetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 and *Lactobacillus sakei* *L. lactis* in MRS medium supplemented with FOS (MRS + FOS), polydextrose (MRS + PD) and inulin (MRS + IN). The exponential growth phase of *L. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 occurred at 2–8 h intervals for all runs (MRS, MRS + FOS, MRS + PD and MRS + IN). The use of all prebiotic ingredients increased the specific cell biomass, the growth rate and consequently decreased the generation time compared to the control (MRS only).

The results described in this article show that the two carbon sources studied could support the growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI), although their concentration varied in relation to the type of carbon. Carbohydrates show good capacity for adaptation, degradation, and growth to a broader group of carbohydrates.⁶² However, fructose as a carbon source significantly promoted the growth of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI). These results are incompatible with previous studies by Ramírez-López and Vélez-Ruiz⁵⁸ who obtained in their research work with the *L. lactis* strain isolated from raw milk and fresh artisanal goat cheese, growth with cell concentrations up to 7.90 log (CFU mL⁻¹) in the medium formulated with fructose, results that are much lower than ours, where it was established that the highest cell concentrations in log biomass (DO_{600nm}) and number of estimated cells log (cells mL⁻¹) in the strains of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) fluctuated between 0.24 log (g cells L⁻¹) or 0.59 g cells L⁻¹, 8.99 log (cells mL⁻¹) or 9.60 × 10⁸ cells mL⁻¹, 0.068 log (g cells L⁻¹) or 0.18 g cells L⁻¹, 8.19 log (cells mL⁻¹) or 1.54 × 10⁹ cells mL⁻¹ in medium formulated with fructose as carbon source.

Likewise, Calderón *et al.*⁶³ and Hayek and Ibrahim⁶⁴ mention in their research work that the *Lentilactobacillus hilgardii* MHP strain

did not grow in chemically defined media (MQD) that contained glucose and fructose as a source of carbohydrates after three sub-cultures. Yongjin *et al.*⁵⁴ showed that when fructose was used as the only carbon source, it generated a low biomass production in *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830™). This was followed by inulin, which promoted a considerable growth in *L. casei* (CU-L-CASEI) despite the fact that its specific speed was very late, which indicates by the trend observed that it was possible to predict that its maximum growth was not reached, perhaps a longer experiment, as a consequence of the time in (c), which is a longer time for this strain to reach its maximum growth rate that promotes a greater amount of biomass, thus allowing to know the behavior of *L. casei* (CU-L-CASEI) with inulin that could be an alternative source to promote good growth in a longer time.

With results that differ from those of previous studies, Watson *et al.*⁶⁵ showed that the growth of *Lactobacillus* spp., among them *Lactobacillus casei*, in the presence of maltodextrin and inulin was poor compared to the effect caused by glucose. The results reported by Iraporda *et al.*⁶⁶ show that there is an influence of inulin on the growth of *Lactobacillus* spp. The results of Śliżewska and Chlebicz-Wójcik⁵² were different from ours for both *Lactobacillus casei* (CU-L-CASEI) and *Lactococcus lactis* (CU-R-704) cultured in the presence of 1% (w/v) inulin. In addition, Önal Darilmaz *et al.*⁶⁷ presented in their research a higher growth in the strains of *Lactobacillus* spp. in the presence of 5% (w/v) inulin compared to cultures carried out in unmodified MRS medium with 2% (w/v) glucose. Śliżewska and Chlebicz-Wójcik⁶⁸ mention in their research work that the strains of *Lactobacillus* spp. that were cultivated in semi-solid fermentation medium (FSS) with some flour-to-water ratio of 1:1.0 promoted a growth very similar to that of our work.

In this research, the Gompertz model allowed the estimation of the growth delay time (λ) in the four treatments studied, where they ranged from -0.07 to 0.85 h, but with a well-marked difference in A1B1 and A1B2 recorded in the experimental data, results that do not agree with previous studies³⁴ which reported values from 0 to 1.63 h. In another study by Śliżewska and Chlebicz-Wójcik,⁵² it was observed in cultures of the *Lactobacillus* strains in the semi-solid fermentation medium (SSF) that the time reached up to 5.64 h. Our results reveal information on how

high-polymerized (GP) chicory inulin affects *L. casei* (CU-L-CASEI) on the extension of the delayed phase (λ) and cell division time and/or generation (T_g). This may be since the chicory inulin used in our study has high remnant compounds (GP) with the presence of β -(2 \rightarrow 1) bonds, without branching of the molecule and with its chain length in its structure that it possesses, carrying out the degradation of inulin extracellularly and not intracellularly. The kinetic parameters of *L. casei* with prebiotic activity of chicory inulin were determined in a previous study by Ayala et al.⁶⁹ who indicate that the delay phase (λ) was greater in the presence of chicory inulin, but it was not described, and an opposite process occurred with agave inulin that was characterized by a zero-delay phase (λ), while the generation time was reduced 3.74 and 4.85 times with respect to our study.

In the Gompertz model, one can predict μ_{max} as it also influences the death phase of the cell concentration. The value of μ_{max} allows one to predict that when a higher growth rate is obtained, it implies that the maximum cell concentration will be reached, and due to the dynamics inherited from this type of function, after reaching this maximum point, the concentration in biomass and number of estimated cells begin to decline slower than the ascending phase. However, the value of the maximum growth rate (μ_{max}) had a greater impact on the adjustment of the exponential growth phase, in which treatment A1B1 had the best value with 0.21 h⁻¹. These results are incompatible with previous studies by Ramírez-López and Vélez-Ruiz⁵⁸ who, applying the primary growth model of Baranyi and Roberts,⁷⁰ determined that *Lactococcus lactis*, under the addition of fructose in culture medium, reached the value of μ_{max} of 0.377 h⁻¹. It was observed in a different study⁷¹ that the μ_{max} of *L. lactis* can be as high as 0.91 h⁻¹ under low aeration conditions. Likewise, in another work by Singh et al.³⁴ they reported μ_{max} in *L. lactis* with a range of 0.23 to 0.30 h⁻¹ under different conditions of agitation and aeration. However, to achieve a good fit with the Gompertz primary model, it is necessary to measure the largest amount of experimental data with the greatest possible continuity, which will ensure a better prediction by the model. In the fermentation process by treatment carried out for this work, the two LAB strains showed atypical values, which could be due to the strains and carbon source used applied as a supplement in the culture medium. Therefore, the experimental data had to be adjusted to calculate all the necessary predictive parameters for the Gompertz model. It is important to keep in mind that outliers are not present in all data measurements obtained in the experimental work carried out on the variable cell concentration in biomass log(DO_{600nm}) and number of estimated cells log(cells mL⁻¹).

Predictive models aim to ensure food quality and provide a tool to support decision-making on fermentation design. Therefore, based on the results and as illustrated in Figs 2–4, treatments A1B1 and A2B1 present conditions of potential use as probiotics and starter cultures for fresh artisanal cheese from cow milk. Based on these results, the decision can be made to carry out a fermentation process under the same culture conditions only from 1.86 to 3.30 h, that is, when the maximum growth is reached in biomass values and number of cells estimated. These results are incompatible with previous studies by Singh et al.³⁴ who reported from their experimental work the maximum growth of *L. lactis* (NCIM 2114) after 8 h. In another study, Jurado-Gómez et al.⁷² in their study of the *L. casei* strain, reported its maximum growth after 14 and 16 h under the effect of Pro and MRS culture media.

The Gompertz model applied to the growth data of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) under commercial and industrial conditions shows that its parameters have a biological sense and sensitivity, and can be interpreted by the growth to maturity at 50% of the asymptote and its maximum growth through its maximum cell concentration reached, which directly serve to estimate the influence of production factors that retard or accelerate growth and modify the maximum cell concentration. In this sense, Singh et al.³⁴ described a sigmoidal trend for the accretion of the maximum value of the concentration of the number of cells reached over time on *L. lactis* (NCIM 2114), which was different from that observed in our research and in which the inflection point was present in an early period at the maturity of the asymptote in a 50% of the maximum cell concentration reached in *L. lactis* (NCIM 2114) not described. This allows that the accretion rate of the maximum cell concentration reached in the strain of *L. lactis* (NCIM 2114) is just as fast in the descending phase compared to the ascending phase, which was different in this investigation, where the strains of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) show excellent sigmoidal tendencies for the accretion of the maximum concentration of cells reached in time and in which the inflection point occurs in a period earlier than the growth of maturity at 50% of the asymptote with values of 36.46% and 36.49% at the maximum cell concentration reached in both strains. This allowed us to determine that the accretion rate of the maximum cell concentration reached in our work was slower in the descending phase compared to the ascending phase.

In general, it was found in our work that the values of time and maximum cell concentration reached at the inflection point were different for most of the treatments. However, in the calculated values, it was observed that the time to the inflection point was higher for *L. casei* (CU-L-CASEI) and the concentration was lower, which may be associated with the effect of inulin due to its characteristics described above. An opposite effect was presented by the strain *L. lactis* (CU-R-704) in that the time to the inflection point was lower and whose concentration was higher, which may be due to the polymerization effect of fructose, results that differ from those of the work by Singh et al.³⁴ who obtained with the strain *L. lactis* (NCIM 2114) higher values both in time and in the cell concentration at the inflection point with the use of glucose in the culture medium. Likewise, it was observed in another study by Ślizewska and Chlebicz-Wójcik⁶⁸ that *Lactobacillus* spp. strains reached higher values of cell concentrations and time to the inflection point under the semi-solid fermentation medium (SSF).

According to the values of the coefficient of determination (R^2) it can be established that the Gompertz model has an excellent fit to the experimental data of *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) with the prebiotic activity of fructose, which achieved average values of R^2 in the range between 0.882 and 0.974. Furthermore, the general fit of the experimental data for the four main treatments under study is illustrated in Figs 2–4. These results are inconsistent with those of previous studies by Ramírez-López and Vélez-Ruiz⁵⁸ who obtained under the primary growth model of Baranyi and Roberts⁷⁰ an R^2 of 0.948 in the growth of *L. lactis* in medium formulated with fructose. In another work, Singh et al.³⁴ reported, using the Gompertz model, average values of R^2 in the range between 0.885 and 0.999 for the strain of *L. lactis* NCIM 2114 under conditions of aeration and agitation in different liquid media. Likewise, Jurado-Gómez et al.⁵⁸ present in the applied model of their research work on the growth kinetics of

Lactobacillus casei high values in the adjustment of the experimental data, which reached average R^2 in the range of 0.910 to 0.938.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained, we conclude that the maximum concentration of cells in biomass and number of cells in *L. lactis* (CU-R-704) and *L. casei* (CU-L-CASEI) under prebiotic source of fructose were reached in lower growth time with values of 0.24 log (g cells L⁻¹) or 0.59 g cells L⁻¹ and 8.99 log N (cells mL⁻¹) or 9.60 × 10⁸ cells mL⁻¹, and for the second strain, a mean time was reached with values between 0.068 log (g cells L⁻¹) or 0.18 g cells L⁻¹ and 8.19 log N (cells mL⁻¹) or 1.54 × 10⁸ cells mL⁻¹ in a medium based on bidistilled water supplemented with a fructose content of 10 g L⁻¹. The Gompertz mathematical model to find the growth profile of the two mentioned strains can be used to predict the behavior of the growth kinetics during a period of 6 h in estimated biomass and number of cells. In addition, both the numerical simulations and the statistical results related to R^2 support our assertion that the Gompertz model accurately represents the growth phases in biomass and number of estimated cells, being ideal for use in predictive microbiology, which allows knowing if the strains studied and the carbohydrate are suitable as prebiotics, probiotics and/or starter cultures for the fermentation process of artisanal fresh cheese from cow milk.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Farinha L, Sabo S, Porto M, Souza E, Oliveira M and Oliveira R, Influence of prebiotic ingredients on the growth kinetics and bacteriocin production of *Lactococcus lactis*. *Chem Eng Trans* **43**:313–318 (2015). <https://doi.org/10.3303/CET1543053>.
- Siamansouri M, Mozaffari S and Alikhani FE, Bacteriocins and lactic acid bacteria. *J Biol* **2**:227–234 (2013).
- Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA and Ricke SC, Essential oils as antimicrobials in food systems: a review. *Food Control* **54**:111–119 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>.
- Tamime AY, Saarela M, Korslund Søndergaard A, Mistry VV and Shah NP, Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products, in *Probiotic Dairy Products*, ed. by Tamime A. Wiley, Oxford, UK, pp. 39–72 (2006). <https://doi.org/10.1002/9780470995785.ch3>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2014 (2002).
- Martinez FAC, Balcianas EM, Salgado JM, González JMD, Converti A and de Souza Oliveira RP, Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends Food Sci Technol* **30**:70–83 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>.
- Rodríguez LGR, Mohamed F, Bleckwedel J, Medina R, De Vuyst L, Hebert EM et al., Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. *Front Microbiol* **10**:1091 (2019). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>.
- Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R and Saarela M, Technological challenges for future probiotic foods. *Int Dairy J* **12**:173–182 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00099-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00099-1).
- Apolinário AC, de Lima Damasceno BPG, de Macêdo Beltrão NE, Pessoa A, Converti A and da Silva JA, Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydr Polym* **101**:368–378 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.081>.
- Paulo Farias D, Araujo FF, Neri-Numa IA and Pastore GM, Prebiotics: trends in food, health and technological applications. *Trends Food Sci Technol* **93**:23–35 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.004>.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM and Bressollier P, An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Lebenswiss Technol* **50**:1–16 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>.
- Roberfroid M, Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* **137**:830S–837S (2007). <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>.
- Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I et al., Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* **104**:S1–S63 (2010). <https://doi.org/10.1017/S0007114510003363>.
- Al-Sheraji SH, Ismail A, Manap MY, Mustafa S, Yusof RM and Hassan FA, Prebiotics as functional foods: a review. *J Funct Foods* **5**:1542–1553 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>.
- Corbo MR, Bevilacqua A, Petrucci L, Casanova FP and Sinigaglia M, Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **13**:1192–1206 (2014). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12109>.
- Bernal-Castro CA, Díaz-Moreno C and Gutiérrez-Cortés C, Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Rev Chil Nutr* **44**:383–392 (2017). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400383>.
- Olagnier G, Abad A, Bendersky S, Genevois C, Granzella L and Montonati M, Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Dieta* **25**:20–33 (2007).
- Roberfroid MB, Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* **93**:S13–S25 (2005). <https://doi.org/10.1079/bjn20041350>.
- Rao AV, Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. *J Nutr* **129**:1442S–1445S (1999). <https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1442S>.
- Li W, Zhang J, Yu C, Li Q, Dong F, Wang G et al., Extraction, degree of polymerization determination and prebiotic effect evaluation of inulin from Jerusalem artichoke. *Carbohydr Polym* **121**:315–319 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.055>.
- Lara-Fiallos M, Lara-Gordillo P, Julián-Ricardo MC, Pérez-Martínez A and Benites-Cortés I, Avances en la producción de inulina. *Tecnol quim* **37**:352–366 (2017).
- van Loo J, Coussement P, de Leenheer L, Hoebregs H and Smits G, On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Crit Rev Food Sci Nutr* **35**:525–552 (1995). <https://doi.org/10.1080/10408399509527714>.
- Coussement P, A new generation of dietary fibres. *Eur Dairy Magaz* **3**:22–24 (1995).
- Montani M, Capturar la oportunidad en Alimentos Funcionales. *Enfasis Alimentación* **11**:78–82 (2005).
- Rastall RA, Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu Rev Food Sci Technol* **1**:305–339 (2010). <https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100746>.
- Pinheiro Oliveira R, Perego P, Nogueira De Oliveira M and Converti A, Growth and survival of mixed probiotics in nonfat fermented milk: the effect of inulin. *Chem Eng Trans* **24**:457–462 (2011). <https://doi.org/10.3303/CET1124077>.
- Guimarães JT, Balthazar CF, Silva R, Rocha RS, Graça JS, Esmerino EA et al., Impact of probiotics and prebiotics on food texture. *Curr Opin Food Sci* **33**:38–44 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.12.002>.
- Margallo LP, Jorge GP, Noleto DAP, Silva CE, Abreu JS, Piran MVF et al., Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: from screening to in product approach. *Microbiol Res* **242**:126622 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126622>.
- Mei G-Y, Carey CM, Tosh S and Kostrzynska M, Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics. *Can J Microbiol* **57**:857–865 (2011). <https://doi.org/10.1139/w11-077>.
- Pranckute R, Kaunietis A, Kuisiene N and Citavicius D, Development of synbiotics with inulin, palatinose, alpha-cyclodextrin and probiotic bacteria. *Pol J Microbiol* **63**:33–41 (2014).

- 31 Muñoz M, Mosquera A, Alméciga-Díaz CJ, Melendez AP and Sánchez OF, Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe* **18**:321–330 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.01.007>.
- 32 Arcos ML, Ossa F and Díaz TE, Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Redalyc* **5**:60–63 (2004).
- 33 Deepika G, Green RJ, Frazier RA and Charalampopoulos D, Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG: changes to the surface properties of *Lact. rhamnosus* GG with growth time. *J Appl Microbiol* **107**:1230–1240 (2009). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04306.x>.
- 34 Singh S, Singh K, Mandjiny S and Holmes L, Modeling the growth of *Lactococcus lactis* NCIM 2114 under differently aerated and agitated conditions in broth medium. *Fermentation* **1**:86–97 (2015). <https://doi.org/10.3390/fermentation1010086>.
- 35 Konopacki M, Augustyniak A, Grygorciewicz B, Dolegowska B, Kordas M and Rakoczy R, Single mathematical parameter for evaluation of the microorganisms' growth as the objective function in the optimization by the DOE techniques. *Microorganisms* **8**:1706 (2020). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111706>.
- 36 Forler B, Horstmann G, Schäfer J, Michel C, Weiss A, Stressler T et al., Effects of protein, calcium, and pH on gene transcription, cell-envelope peptidase activity of *Lactococcus lactis* strains, and the formation of bitter peptides. *Foods* **10**:1588 (2021). <https://doi.org/10.3390/foods10071588>.
- 37 Rodríguez Molina M and Chambi Rodríguez AD, Determinación de la curva de crecimiento microbiano *Saccharomyces Boulardii* en tunta variedades chaska y negra. *Fides Et Ratio* **18**:201–214 (2019).
- 38 Mytilinaios I, Salih M, Schofield HK and Lambert RJW, Growth curve prediction from optical density data. *Int J Food Microbiol* **154**:169–176 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.035>.
- 39 Lu Z, Pérez-Díaz IM, Hayes JS and Breidt F, Bacteriophages infecting Gram-negative bacteria in a commercial cucumber fermentation. *Front Microbiol* **11**:1306 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01306>.
- 40 Neveling DP, Ahire JJ, Laubscher W, Rautenbach M and Dicks LMT, Genetic and phenotypic characteristics of a multi-strain probiotic for broilers. *Curr Microbiol* **77**:369–387 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01797-3>.
- 41 Konopacki M, Grygorciewicz B, Dolegowska B, Kordas M and Rakoczy R, PhageScore: a simple method for comparative evaluation of bacteriophages lytic activity. *Biochem Eng J* **161**:107652 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107652>.
- 42 Krishnamurthi VR, Niyonshuti II, Chen J and Wang Y, A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. *PLoS One* **16**:e0245205 (2021). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245205>.
- 43 Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM and van't Riet K, Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**:1875–1881 (1990). <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>.
- 44 Van Impe JF, Nicolai BM, Martens T, De Baerdemaeker J and Vandewalle J, Dynamic mathematical model to predict microbial growth and inactivation during food processing. *Appl Environ Microbiol* **58**:2901–2909 (1992). <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2901-2909.1992>.
- 45 Cayré ME, Vignolo GM and Garro OA, Selección de un modelo primario para describir la curva de crecimiento de bacterias lácticas y brochothrix therosphacta sobre emulsiones cárnicas cocidas. *CIT Inf Tecnol* **18**:23–30 (2007). <https://doi.org/10.4067/s0718-07642007000300004>.
- 46 Castro G, Valbuena E, Sánchez E, Briñez W, Vera H and Leal M, Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Redalyc* **18**:582–588 (2008).
- 47 Chambi Rodríguez AD, Juliaca P, Torres Jiménez AM and Juliaca P, Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. *J High Andean Res* **23**:47–54 (2021). <https://doi.org/10.18271/ria.2021.213>.
- 48 Gompertz B, On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. In a letter to Francis Baily, Esq. F. R. S. &c. by Benjamin Gompertz, Esq. F. R. S. *Abstr Pap Print. Philos Trans R Soc Lond* **2**:252–253 (1833). <https://doi.org/10.1098/rspl.1815.0271>.
- 49 Agatangelo, J., & Santos, E. Estudio del comportamiento cinético de microorganismo de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. 2007. <https://tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/aje1d1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- 50 Torres V, Barbosa I, Meyer R, Noda A and Sarduy L, Criterios de bondad de ajuste en la selección de modelos no lineales en la descripción de comportamientos biológicos. *Rev Cubana Cienc Agríc* **46**:345–350 (2012).
- 51 Fernández Villa KJ, Chanci Echeverri IC, Wilches López L and Cardona Arias JA, Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitorio de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: Revisión sistemática de la literatura, 2008–2012. *Biosalud* **13**:45–61 (2014).
- 52 Śliżewska K and Chlebicz-Wójcik A, Growth kinetics of probiotic *Lactobacillus* strains in the alternative, cost-efficient semi-solid fermentation medium. *Biology* **9**:423 (2020). <https://doi.org/10.3390/biology9120423>.
- 53 Carevic M, Vukasinovic-Sekulic M, Grbavcic S, Stojanovic M, Mihailovic M, Dimitrijevic A et al., Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hem Ind* **69**:305–312 (2015). <https://doi.org/10.2298/hemind140303044c>.
- 54 Deng Y, Xu M, Ji D and Agyei D, Optimization of β -galactosidase production by batch cultures of *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830TM). *Fermentation* **6**:27 (2020). <https://doi.org/10.3390/fermentation6010027>.
- 55 Codex Alimentarius, *Leche y productos lácteos*, Vol. 12, 2nd edn. Publicado por la Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma, p. 130 (2010).
- 56 Boylston TD, Vinderola CG, Ghoddusi HB and Reinheimer JA, Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int Dairy J* **14**:375–387 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jdairyj.2003.08.008>.
- 57 Elshaghabee FMF, El-Husseini A and Mohamed MSM, Enhancement of labneh quality by laser-induced modulation of lactocaseibacillus casei NRRL B-1922. *Fermentation* **8**:132 (2022). <https://doi.org/10.3390/fermentation8030132>.
- 58 Ramírez-López C and Vélez-Ruiz JF, Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *CIT Inf Tecnol* **27**:115–128 (2016). <https://doi.org/10.4067/s0718-07642016000600012>.
- 59 Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Nevado FP and de Guña CM, Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci* **80**:715–721 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.03.011>.
- 60 Hummel AS, Hertel C, Holzapfel WH and Franz CMAP, Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* **73**:730–739 (2007). <https://doi.org/10.1128/AEM.02105-06>.
- 61 Huertas P and Adolfo R, Review. Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional En Los Alimentos. *Biotechnol Sect Agr Agraínd* **8**:93–105 (2010).
- 62 Vázquez MSM, Suárez MH and Zapata BS, Utilización DE sustancias antimicrobianas producidas Por bacterias ácido lácticas en la Conservación DE la Carne. *Rev Chil Nutr* **36**:64–71 (2009). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182009000100007>.
- 63 Calderon M, Loiseau G and Guyot JP, Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sour-dough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *J Appl Microbiol* **90**:508–516 (2001). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01272.x>.
- 64 Hayek SA and Ibrahim SA, Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food Nutr Sci* **04**:73–87 (2013). <https://doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>.
- 65 Watson D, O'Connell Motherway M, Schoterman MHC, van Neerven RJJ, Nauta A and van Sinderen D, Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *J Appl Microbiol* **114**:1132–1146 (2013). <https://doi.org/10.1111/jam.12105>.
- 66 Iraporda C, Rubel IA, Manrique GD and Abraham AG, Influence of inulin rich carbohydrates from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers on probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Lebenson Wiss Technol* **101**:738–746 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.074>.
- 67 Onal Darılmaz D, Sönmez Ş and Beyatlı Y, The effects of inulin as a prebiotic supplement and the symbiotic interactions of probiotics to improve oxalate degrading activity. *Int J Food Sci Technol* **54**:121–131 (2019). <https://doi.org/10.1111/ijfs.13912>.
- 68 Śliżewska K and Chlebicz-Wójcik A, The in vitro analysis of prebiotics to be used as a component of a synbiotic preparation. *Nutrients* **12**:1272 (2020b). <https://doi.org/10.3390/nu12051272>.

- 69 Ayala Monter MA, Hernández Sánchez D, Pinto Ruiz R, González Muñoz SS, Bárcena Gama JR, Hernández Mendo O *et al.*, Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. *Rev Mex Cienc Pecu* **9**:346 (2018). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>.
- 70 Baranyi J and Roberts TA, A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* **23**:277–294 (1994). [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0).
- 71 Nordkvist M, Jensen NBS and Villadsen J, Glucose metabolism in *Lactococcus lactis* MG1363 under different aeration conditions: requirement of acetate to sustain growth under microaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **69**:3462–3468 (2003). <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3462-3468.2003>.
- 72 Gámez HJ, Yamá FC and Tulcán AC, Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Rev Vet Zootec* **8**:15–35 (2014). <https://doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.2>.

REFERENCIAS

- Afzaal, M., Khan, A. U., Saeed, F., Ahmed, A., Ahmad, M. H., Maan, A. A., ... & Hussain, S. (2019). Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. *Food science & nutrition*, 7(12), 3931-3940.
- Agatangelo, J., & Santos, E. (2007). Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismo de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. <https://tdx.cat/bitstream/handle/10803/5691/ajse1d1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aguilera-Ortíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Madinaveitia, R. G. C., Valenzuela, J. A., & Baca, P. R. (2012). Antocianinas de higo como colorantes para yogur natural. *Biotecnia*, 14(1), 18-24.
- Akihiko, S., & Suzuki, M. (2021). Actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de una ballena picuda de Cuvier varada (*Ziphius cavirostris*) contra bacterias grampositivas y negativas. *Microorganismos*, 9(2), 243. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/2/243/htm>
- Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* a las células Caco-2 intestinales humanas por el candidato probiótico *Lactobacillus plantarum* cepa L15. *Patogenica Microbiana*, 136, 103677. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401019308848?via%3Dihub#!>
- Aly, S., Floury, J., Piot, M., Lortal, S., & Jeanson, S. (2012). The efficacy of nisin can drastically vary when produced *in situ* in model cheeses. *Food Microbiology*, 32(1), 185-190.
- Anastasiou, R., Aktypis, A., Georgalaki, M., Papadelli, M., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2009). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasserli cheese production and ripening. *International dairy journal*, 19(5), 330-335.
- Aran, H., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffrès, E., Dousset, X., Pillot, G., ... & Hwanhlem, N. (2015). Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation. *Food Control*, 54, 126-134.
- Arcos, M. L., Ossa, F., & Díaz, T. E. (2004). Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. *Redalyc*, 5(1), 60-63. <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449953025009.pdf>
- Argoti, I. C. F., Gámez, H. J., & Amariles, V. A. (2021). Elaboración de néctar de mango con adición de probiótico *Lactobacillus gasseri* e inulina como alimento funcional, sin aditivos químicos y como una alternativa a la industria de alimentos. *Conocimiento Global*, 6(1), 18.
- Arguello, P., Lucero, O., Castillo, G., Escobar, S., Albuja, A., Gallegos, J. y Carrascal, A. (2015). Calidad microbiológica de los quesos artesanales elaborados en zonas rurales de Riobamba. *Perspectiva*, 16(18), 65-74.
- Argyri, A. A., Georgia Zoumpoulou, G., Karatzas, K.-A., Effie Tsakalidou, E., Nychas, G.-J.,

- Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selección de posibles bacterias probióticas del ácido láctico de aceitunas fermentadas mediante pruebas in vitro. *ScienceDirect*, 33(2), 282–291. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002012002298>
- Arqués, J. L., Rodríguez, E., Gaya, P., Medina, M., & Nunez, M. (2005). Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International dairy journal*, 15(6-9), 893-900.
- Arteaga Solórzano, R. A., Armenteros Amaya, M., Quintana García, D., & Martínez Vasallo, A. (2021a). Evaluación de las buenas prácticas en la elaboración de queso artesanal en Manabí, Ecuador. *Revista de Salud Animal*, 43(2).
- Arteaga-Solórzano, R. A., Armenteros-Amaya, M., Colas-Chavez, M., Pérez-Ruano, M., & Fimia-Duarte, R. (2021b). Calidad sanitaria de la leche y quesos artesanales elaborados en la provincia de Manabí, Ecuador. *Revista de producción animal*, 33(3), 54-66.
- Ashraf, R. y Smith, S. C. (2016). Bacterias comerciales del ácido láctico y cepas probióticas: tolerancia a la bilis, pepsina y antibióticos. *Revista internacional de investigación alimentaria*, 23(2), 777.
- Asahara, T., Nomoto, K., Watanuki, M., & Yokokura, T. (2001). Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(6), 1751-1760.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of food protection*, 63(6), 721-726.
- Azizian, K., Taghizadeh, S., Hosseinpour, R., Tanomand, A., Sheykhsaran, E., Alizadeh, N., ... & Kafil, H. S. (2019). Efecto inhibitor de *Lactobacillus* aislado de la cavidad oral contra patógenos bacterianos y su efecto en la promoción de la salud. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 60(1), 27-33.
- Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDGdM, Converti A, Oliveira RPdS (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32: 134-142.
- Barragán Domínguez, A. E. (2023). Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa productora de queso fresco enriquecido con quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en la parroquia San Lorenzo, provincia de Bolívar, Ecuador (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Alimentos).
- Bautista, A. G., & Barrado, A. G. (2023). Bacteriocinas como bioconservador alimentario: Características generales y aplicación en alimentos. *Pubsaúde*, 12, a366.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. G. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and environmental microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Bemena LD, Mohamed LA, Fernandes AM, Lee BH (2014). Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3: 924-949.

- Benjamin, F., Gudrun, H., Johannes, S., Christina, M., Weiss, A., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., & AndHerbert, S. (2021). Effects of Protein, Calcium, and pH on Gene Transcription, Cell-Envelope Peptidase Activity of *Lactococcus lactis* Strains, and the Formation of Bitter Peptides. *Foods*, 10 (1588), 7. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1588/htm>
- Bentley, R., & Meganathan, R. (1982). Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiological reviews*, 46(3), 241-280.
- Beshkova D, Frengova G (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Eng. Life Sci.* 12: 419-432.
- Boonchu, T., & Utama-Ang, N. (2015). Optimization of extraction and microencapsulation of bioactive compounds from red grape (*Vitis vinifera L.*) pomace. *Journal of food science and technology*, 52(2), 783-792.
- Breidt, F., & Fleming, H. P. (2020). Modelización del crecimiento competitivo de *Listeria monocytogenes* y *Lactococcus lactis* en caldo vegetal. *ASM*, 64(9). <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.64.9.3159-3165.1998>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... & Recio, I. (2019). INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature protocols*, 14(4), 991-1014.
- Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., ... & Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International journal of food microbiology*, 125(3), 286-292.
- Castañeda Guillot, C. (2017a). El ecosistema intestinal, su microbiota y los probióticos. *Belize journal of medicine*, 6(2), 10-14.
- Castañeda Guillot, C. (2017b). Probiótico *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: de la investigación a la práctica clínica. *Belize journal of medicine*, 6(2), 15-21.
- Castañeda Guillot, C. (2018). Probióticos, puesta al día: an update. *Revista cubana de pediatría*, 90(2), 286-298.
- Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H., & Leal, M. (2008). Comparación de Modelos Sigmoidales Aplicados al Crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Redalyc*, 18(5), 582–588. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95918509.pdf>
- Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., ... Spiegel, C. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

- Cavaliere, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., . . . Spiegel, C. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Recuperado el 24 de 04 de 2021, de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2009). Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. *Journal of food science*, 74(6), M231-M236.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of microbiological methods*, 56(1), 27-35.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & del Carmen Villarán, M. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 185-189.
- Cayré, M., Vignolo, G., & Garro, O. (2007). Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. *scielo*, 18(23-29). doi:10.4067/S0718-07642007000300004
- Chambi Rodriguez, A. D., & Torres Jiménez, A. M. (2021). Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. *Scielo*, 23 (1) 2313–2957. http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S231329572021000100047&lng=pt&nrm=iso
- Choubey, S.; Varughese, L.R.; Kumar, V. & Beniwal, V. (2015) - Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. *Pharmaceutical Patent Analyst*, vol. 4, n. 4, p. 305-315. <https://doi.org/10.4155/ppa.15.14>
- Chuayana, J. E., Ponce, C. V., Rivera, M. R. B., & Cabrera, E. C. (2003). Antimicrobial activity of probiotics from milk products. *Phil J. Microbiol. Infect. Dis*, 32(2), 71-74.
- CLSI. 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44–A2. 23 p. In: Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI document M44–A2.
- Colorado Hernández, S. (2018). *Determinación de Parámetros Cinéticos de Synechococcus sp. pcc 7002 En Cultivo Sumergido*. https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/13698/Salome_ColoradoHernandez_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Consignado G.; Peña A.; Jacalne A. 1993. "In vitro study on the antibacterial activity of *Lactobacillus casei* against four diarrhea-causing organisms" *Phil J Microbiol Infect Dis* 22: 50-55.

- Contente, D., Díaz-Formoso, L., Feito, J., Hernández, PE, Muñoz-Atienza, E., Borrero, J., Poeta, P., & Cintas, LM (2024). Evaluación genómica y funcional de dos cepas de *Lactocaseibacillus paracasei* y dos de *Lactiplantibacillus plantarum*, aisladas de un tanque de cría de rotíferos (*Brachionus plicatilis*), como probióticos para la acuicultura. *Genes*, 15 (1), 64. <https://doi.org/10.3390/genes15010064>
- Corso, A. (2009). *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wpcontent/uploads/2012/11/08Novedades_CLSI_2009_vFer1.pdf
- Cotter PD, Hill C, Ross RP (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 777-788.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., & Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *International journal of food microbiology*, 153(1-2), 58-65.
- Dalynn. (2014). *McFARLAND STANDARD*. http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pd
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparación de las tasas máximas de crecimiento específico y los tiempos de retardo estimados a partir de los datos de absorbancia y recuento viable mediante diferentes modelos matemáticos. *Elsevier*, 43(3), 183-196. doi:10.1016/S0167-7012(00)00219-0
- De Vuyst L, V. E. (1992). *Influencia de la fuente de carbono en la producción de nisina en Lactococcus lactis subsp. fermentaciones por lotes de lactis*. 138(3), 571–578. <https://doi.org/10.1099 / 00221287-138-3-571>
- Deepika, G., Green, R., Frazier, R., & Charalampopoulos, D. (2009). Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied Microbiology*, 107(4), 1230–1240. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2009.04306.x>
- Deepika, Gurjot, Karunakaran, E., Hurley, C. R., Biggs, C. A., & Charalampopoulos, D. (2012). Influence of fermentation conditions on the surface properties and adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-116>
- Díaz-Formoso, L., Contente, D., Feito, J., Hernández, PE, Borrero, J., Muñoz-Atienza, E., & Cintas, LM (2024). Secuencia genómica de *Streptococcus salivarius* MDI13 y *Lactobacillus sakei* MEI5: dos cepas probióticas prometedoras aisladas de merluzas europeas (*Merluccius merluccius*, L.). *Ciencias Veterinarias*, 11 (8), 365. <https://doi.org/10.3390/vetsci11080365>
- Diep DB, Nes IF (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets* 3: 107-122.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., González, L., Tablada, M., Díaz, M., Robledo, C., & Balzarini,

- M. (2017). *InfoStat, versión 2017, Grupo InfoStat, FCA*, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>
- Dolz MC (2008). Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutr. Clín. Diet. Hosp.* 28: 20-37.
- Draget, K. I., Skjåk-Bræk, G., & Smidsrød, O. (1997). Alginate based new materials. *International journal of biological macromolecules*, 21(1-2), 47-55. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(97\)00040-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(97)00040-8)
- Espinosa C. (2012). Estudio del queso manaba y su aplicación gastronómica. (Tesis). Universidad Técnica Equinoccial, Quito, Ecuador. 124 p.
- Estándares de McFarland. (16 de diciembre de 2020). *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/wiki/McFarland_standards
- Estupiñán Nájera, F. A. (2021). Diseño de un plan de negocio para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de queso fresco en el cantón La Troncal (Bachelor's thesis).
- FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; FAO: Rome, Italy, 2002; pp. 1–11.
- Favaro L, Barretto Penna AL, Todorov SD (2015) Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation? *Trends Food Sci. Tech.* 41: 37-48.
- Felicio, B. A., Pinto, M. S., Oliveira, F. S., Lempk, M. W., Pires, A. C. S., & Lelis, C. A. (2015). Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of Minas Frescal cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(7), 4364-4369.
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
- Ferreira Leite Ladislau, H., Silva de Farias, T. G., Mendonca Soares, B. L., Medeiros, J. A. D. C., Ferrão Castelo Branco Melo, N., Stamford–Arnaud, T. M., ... & Stamford, T. L. M. (2021). The effect of co-encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 with inulin on alginate/chitosan matrix: the viability in fermented soy blend and simulated digestive system. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(10), 5395-5401.
- Floch, M. H., Walker, W. A., Sanders, M. E., Nieuwdorp, M., Kim, A. S., Brenner, D. A., ... & Brandt, L. J. (2015). Recommendations for probiotic use—2015 update: proceedings and consensus opinion. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49, S69-S73.
- Forler, B., Horstmann, G., Schäfer, J., Michel, C., Weiss, A., Stressler, T., Fischer, L., Hinrichs, J., & Schmidt, H. (2021). Efectos de las proteínas, el calcio y el pH en la transcripción genética, la actividad peptidasa de la envoltura celular de las cepas de *Lactococcus lactis* y la formación de péptidos amargos. *Foods*, 10(7), 1588. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1588/htm>
- Francl, A. L., Thongaram, T., & Miller, M. J. (2010). The PTS transporters of *Lactobacillus*

gasseri ATCC 33323. BMC microbiology, 10(1), 1-13.

- Gadotti C, Nelson L, Diez-Gonzalez F (2014) Inhibitory effect of combinations of caprylic acid and nisin on *Listeria monocytogenes* in queso fresco. Food Microbiol. 39: 1-6.
- Garde, S., Ávila, M., Arias, R., Gaya, P., & Nuñez, M. (2011). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. International journal of food microbiology, 150(1), 59-65.
- Gorbeña, J. C. R., & Saénz, T. A. (2009). Bacteriocinas de las bacterias lácticas: biopreservación en la industria Alimentaria. Biotempo, 9.
- Guarner, F., Khan, A. G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., & Kim, N. (2012). World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics october 2011. Journal of clinical gastroenterology, 46(6), 468-481.
- Guesh Mulaw. (2019). In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. *Microbiology*. <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2019/7179514/>
- Guillot, C. C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. Revista Cubana de Pediatría, 90(1), 94-110.
- Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Silva, R., Rocha, R. S., Graça, J. S., Esmerino, E. A., & Cruz, A. G. (2020). *Impact of probiotics and prebiotics on food texture. Current Opinion in Food Science*. 33, 38–44.
- Hamama, A., El Hankouri, N., & El Ayadi, M. (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. International Dairy Journal, 12(11), 933-938.
- Han, S., Lu, Y., Xie, J., Fei, Y., Zheng, G., Wang, Z., ... & Li, L. (2021). Probiotic gastrointestinal transit and colonization after oral administration: A long journey. Frontiers in cellular and infection microbiology, 11, 609722.
- Hand, T. W., Dos Santos, L. M., Bouladoux, N., Molloy, M. J., Pagán, A. J., Pepper, M., & Belkaid, Y. (2012). Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. Science, 337(6101), 1553-1556.
- Handa, S. (2012). *Aislamiento de Bacterias del Ácido Láctico y Estudio de su Potencial como Probióticos*. <https://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/95146>
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. Interciencia, 42(6), 340-346.
- Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. Carbohydrate polymers, 95(1), 50-56.
- Husmaini, A. M., Purwati, E., Yuniza, A. y Alimon, A. R. (2011). Crecimiento y supervivencia de bacterias del ácido láctico aisladas del subproducto del aceite de coco virgen como

candidato probiótico para aves de corral. *Int J Poultry Sci*, 10, 309-314.

Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Fahey Jr, G., Goh, Y. J., ... & Sanders, M. E. (2016). Prebiotics: why definitions matter. *Current opinion in biotechnology*, 37, 1-7.

Imeson, A. (Ed.). (2010). *Food stabilisers, thickeners and gelling agents*. John Wiley & Sons.

International Organization for Standardization (ISO) (1996). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method*, International Standard ISO 11290-1: 1996, Geneva, Switzerland. Available at. Accessed on: 25 Oct. 2022.

Inturri, R., Stivala, A., & Blandino, G. (2015). Microbiological characteristics of the probiotic strains *B. longum* BB536 and *L. rhamnosus* HN001 used in combination. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, 61(4), 191-197.

Jamuna M and Jeevaratnam K (2006). Isolation and characterization of Lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50(2), 79–90.

Janf, V., Bart, M. N., Martens, T., Baerdemaeker, J., & Vandewallwe Joos. (1992). DynamicMathematicalModelToPredictMicrobialGrowthandInactivationduringFoodProcessing. *Appliedandenvironmentalmicrobiology*, 58(9), 2901–2909. <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/aem.58.9.2901-2909.1992>

John, R. P., Tyagi, R. D., Brar, S. K., Surampalli, R. Y., & Prévost, D. (2011). Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical reviews in biotechnology*, 31(3), 211-226.

Jurado-Gámez, H., Martínez-Benavides, J., Benavides, D. A. R., Morillo-Garcés, J. A., Orbes-Villacorte, A. E., & Mesías-Pantoja, L. N. (2016). Cinética de fermentación, pruebas de desafío in vitro y efecto de inhibición de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992. *Revista Veterinaria y Zootecnia (On Line)*, 10(2), 72-89.

Jurado Teixeira, B., Aparcana Aaturima, I. M., Villarreal Inca, L. S., Ramos Llica, E., Calixto Cotos, M. R., Hurtado Manrique, P. E., & Acosta Alfaro, K. M. D. C. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la sociedad química del Perú*, 82(3), 272-279.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

Khaneghah, A. M., Abhari, K., Eş, I., Soares, M. B., Oliveira, R. B., Hosseini, H., ... & Sant'Ana, A. S. (2020). Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 205-218.

Kim, K., Liu, X., Zhang, Y., & Sun, Y. (2008). Nanonewton force-controlled manipulation of biological cells using a monolithic MEMS microgripper with two-axis force feedback. *Journal*

of micromechanics and microengineering, 18(5), 055013.

- Kiran, F., Mokrani, M., & Osmanagaoglu, O. (2015). Effect of encapsulation on viability of *Pediococcus pentosaceus* during its passage through gastrointestinal tract model. *Current Microbiology*, 71, 95–105.
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 12(1-3), 39-85.
- Klemmer, K. J., Korber, D. R., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2011). Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. *International journal of food science & technology*, 46(11), 2248-2256.
- Konopacki, M., Augustyniak, A., Bałomiej, G., Dołęgowska, B., Kordas, M., & Rakoczy, R. (2020). Parámetro matemático único para la evaluación del crecimiento de microorganismos como función objetivo en la optimización por las técnicas DOE. *Microorganisms*, 8(11), 1706. <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/11/1706/htm>
- Kos, B. S. J. G. J. M. S., Šušković, J., Goreta, J., & Matošić, S. (2000). Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, 38(2), 121-127.
- Krishnamurthi, V. R., Niyonshuti, I. I., Chen, J., & Wang, Y. (2021). *Un nuevo método de análisis para evaluar el crecimiento bacteriano con lectores de microplacas*. *Plos one*. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0245205>
- Lai AC, Tran S, Simmonds RS (2002). Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 215: 133-138.
- Larre, C. H., Florez, M., & Huapaya, J. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. *Horizonte Médico*, 7(1), 16-22.
- Lee, Y., Ji, Y. R., Lee, S., Choi, M. J., & Cho, Y. (2019). Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* kbl409 by extrusion technology to enhance survival under simulated intestinal and freeze-drying conditions.
- León, J. (2022). Producción nacional de queso alcanzó las 126.685 toneladas en 2021, mostrando un aumento de 9.1%. Recuperado de. <https://agraria.pe/noticias/produccion-nacional-de-queso-alcanzo-las-126-685-toneladas-e-27412>
- Lee K, Runyon M, Herrman T, Phillips R and Hsieh J. 2015. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food control* 47: 264-276.
- Liang, S., Jiang, W., Song, Y., & Zhou, S. F. (2020). Improvement and metabolomics-based analysis of d-lactic acid production from agro-industrial wastes by *Lactobacillus delbrueckii* submitted to adaptive laboratory evolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(29), 7660-7669.
- Likotrafiti, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2014). An in vitro study of the effect

of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly faecal microbiota. *Anaerobe*, 27, 50-55.

- Lord E. 2002. Utilización de *Lactobacillus acidophilus* como agente antagónico para el control de *Salmonella enteritidis* en pescado. Tesis. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. 63 p.
- López M, Edmundo J, Ochoa ZA, Santoyo PG, Anaya LJ, Medina ME, Martínez TM, Loeza LPD (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 39: 49-57.
- Luca, L., & Oroian, M. (2021). Influence of different prebiotics on viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* encapsulated in alginate microcapsules. *Foods*, 10(4), 710.
- Ma, D., Liang, L., Chen, W., Liu, H., & Song, Y. F. (2013). Covalently Tethered Polyoxometalate–Pyrene Hybrids for Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes as High-Performance Anode Material. *Advanced Functional Materials*, 23(48), 6100-6105.
- Mäkeläinen, H., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., & Ouwehand, A. (2010). Xylooligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. *Beneficial Microbes*, 1(2), 139-148.
- Margalho, L. P., Jorge, G. P., Noletto, D. A., Silva, C. E., Abreu, J. S., Piran, M. V., & Sant'Ana, A. S. (2021). Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. *Microbiological Research*, 126622, 242.
- Mahboubi, M. (2019). *Lactobacillus gasseri* as a functional food and its role in obesity. *International Journal of Medical Reviews*, 6(2), 59-64.
- Martín, MJ, Lara-Villoslada, F., Ruiz, MA y Morales, ME (2013). Efecto del almidón no modificado sobre la viabilidad de *Lactobacillus fermentum* CECT5716 encapsulado en alginato. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos*, 53 (2), 480-486.
- Martínez-Cuesta, M. C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T., & Peláez, C. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lactacin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International dairy journal*, 20(1), 18-24.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.
- Martinez, R. C. R., Staliano, C. D., Vieira, A. D. S., Villarreal, M. L. M., Todorov, S. D., Saad, S. M. I., & de Melo Franco, B. D. G. (2015). Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. *Food microbiology*, 48, 143-152.
- Matijašić, B. B., Rajšp, M. K., Perko, B., & Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17(2), 157-

166.

- Matsumoto, M., Ishige, A., Yazawa, Y., Kondo, M., Muramatsu, K., & Watanabe, K. (2012). Promotion of intestinal peristalsis by *Bifidobacterium spp.* capable of hydrolysing sennosides in mice. *PloS one*, 7(2), e31700.
- Maurice, C. F., Haiser, H. J., & Turnbaugh, P. J. (2013). Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell*, 152(1-2), 39-50.
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O., & Kasper, D. L. (2005). An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), 107-118.
- MH Zwietering, Jongenburger, I., FM Rombouts, & K. van 't Riet. (1990). Modelado de la curva de crecimiento bacteriano. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, 132(4), 1966-1970.
- Misra, S., Pandey, P., & Mishra, H. N. (2021). Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 340-351.
- Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Najafi, M. H., & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, 42(8), 1040-1045.
- Mondragón Preciado G, Escalante Minakata P, Osuna Castro JA, Ibarra Junquera V, Morlett Chávez JA, Aguilar González CN, Rodríguez Herrera R (2013). Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos. *INVYCIE*. 59: 64-70.
- Monroy DMC, Castro BT, Fernández PFJ, Mayorga RL (2009). Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73: 63-72.
- Muhammad Shahid Riaz Rajoka, Hafiza Mahreen Mehwish, Muhammad Siddiq, Zhao Haobin, Jing Zhu, Dongyan Shao, Xiaoguang Xu, & Junling Shi. (2017). Identificación, caracterización y potencial probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* aislado de la leche materna. *ScienceDirect*, 84, 271–280. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643817303705>
- Muthukumarasamy, P., Allan-Wojtas, P., & Holley, R. A. (2006). Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. *Journal of food science*, 71(1), M20-M24.
- Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H., & Lambert, R. J. (2012). Predicción de la curva de crecimiento a partir de datos de densidad óptica. *ScienceDirect*, 154(3), 169–176.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016816051100763X>

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Sada, A., & Orlando, P. (2009). Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 319-323.
- Nes IF, Yoon SS, Diep DB (2007) Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 675-690.
- Neveling, D. P., Ahire, J. J., Laubscher, W., Rautenbach, M., & Pollas, L. M. (2020). Características genéticas y fenotípicas de un probiótico de cepas múltiples para pollos de engorde. *Microbiología*, 77, 369–387. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-019-01797-3>
- Neveling, DP, Ahire, JJ, Laubscher, W., Rautenbach, M. y Dicks, LM (2020). Características genéticas y fenotípicas de un probiótico multicepa para pollos de engorde. *Microbiología actual*, 77 (3), 369-387. DOI <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01797-3>
- Nishie M, Nagao J, Sonomoto K (2012). Antibacterial peptides “bacteriocins”: An overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci.* 17: 1-16.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEN, N. 1529-15: 2009. Control Microbiológico de los Alimentos. Toma, Envío y Preparación de Muestras Para el Análisis Microbiológico. Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN), 14.
- Norma Técnica Ecuatoriana INEM NTE 1 529-8:1990-02. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E. coli*. Recuperado de <http://archive.org/stream/ec.nte.1529.8.1990#page/n0/mode/2up>
- Novoa, A. V., Motidome, M., Mancini-Filho, J., Linares, A. F., Tanae, M. M., Torres, L. M. B., & Lapa, A. J. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (SG gmelim) Howe. *Braz J Pharm Sci*, 37, 373-382.
- Nobre, D. A. C., Macedo, W. R., Silva, G. H., Lopes, L. S., & Jaimes, E. H. L. (2019). Aplicación y efecto antioxidante del ácido gálico sobre la calidad de semillas de trigo. *Revista de Ciências Agrárias*, 42(1), 22-29.
- Nowroozi J.; Mirzaii M.; Norouzi M. 2004. “Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria” *Iranian J Publ Health* 33:1 -7.
- Nunez, M., Rodriguez, J. L., Garcia, E., Gaya, P., & Medina, M. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 83(6), 671-677.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., & Onilude, A. A. (2003). Caracterización de bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* F1 y *Lactobacillus brevis* OG1. *Africana de Biotecnología*, 2 (8), 219–227. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/14770>
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). “Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos” *Andequat*, 25(121), 6-14.

- Ortakci, F. A. T. İ. H., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal of dairy science*, 95(12), 6918-6925.
- O'sullivan, L., O'connor, E. B., Ross, R. P., & Hill, C. (2006). Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 135-143.
- Oyetayo V.; Adetuyi F.; AKINYOSOYE F. 2003. "Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent *in vivo*" *African Journal of Biotechnology* 2: 448-452.
- Pace, F., Pace, M., & Quartarone, G. (2015). Probiotics in digestive diseases: focus on *Lactobacillus* GG. *Minerva gastroenterologica e dietologica*, 61(4), 273-292.
- Parámetro matemático único para la evaluación del crecimiento de microorganismos como función objetivo en la optimización por las técnicas DOE. (2020). 8(11), 1706. doi:10.3390 / microorganismos8111706
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684.
- Pasin, B. L., Azón, C. G., & Garriga, A. M. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130-151.
- Paulo Farias, D., Araujo, F. F., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2019). *Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. Trends in Food Science & Technology*. 93, 23–35.
- Parámetro matemático único para la evaluación del crecimiento de microorganismos como función objetivo en la optimización por las técnicas DOE. (2020). 8(11), 1706. doi:10.3390 / microorganismos8111706
- Peighambardoust, S. H., Tafti, A. G., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 215-224.
- Pérez, RAR, Morales, NYM, & Chams, LMC (2017). Evaluación microbiológica de queso costeño artesanal y evaluación higiénico-localizadora de pequeños comercios en Córdoba, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 19 (3), 311. <https://doi.org/10.15446/rsap.v19n3.54853>
- Perez RH, Zendo T, Sonomoto K (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb. Cell Fact.* 13: 1-13.
- Pinto, M. S., de Carvalho, A. F., dos Santos Pires, A. C., Souza, A. A. C., da Silva, P. H. F., Sobral, D., ... & de Lima Santos, A. (2011). The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal*, 21(2), 90-96.

- Poletto, G., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., ... & de Menezes, C. R. (2019). Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. *Food Hydrocolloids*, 95, 238-244.
- Prete, R., Long, S. L., Gallardo, A. L., Gahan, C. G., Corsetti, A., & Joyce, S. A. (2020). Beneficial bile acid metabolism from *Lactobacillus plantarum* of food origin. *Scientific reports*, 10(1), 1165.
- Prince, P.S.M.; Priscilla, H. & Devika, P.T. (2009) - Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, vol. 615, n. 1-3, p. 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.05.003>
- Ramos Gorbeña, J. C., & Sáenz, T. A. (2009). Bacteriocinas de las Bacterias Lácticas: Biopreservación en la Industria Alimentaria. *Biotempo*, 9, 66–70. <https://www.urp.edu.pe/pdf/id/2342/n/pdf>
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., & Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food research international*, 43(1), 1-7.
- Reque, E. D. F., Pandey, A., Franco, S. G., & Soccol, C. R. (2000). Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 303-307.
- Rilla, N., Martínez, B., Delgado, T., & Rodríguez, A. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 23-33.
- Rodríguez-Barona, S., Montes, L. M., & Ramírez, D. D. J. (2012). Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersion en presencia de prebióticos. *Vitae*, 19(1), S186-S188.
- Rodea-González, D. A., Cruz-Olivares, J., Román-Guerrero, A., Rodríguez-Huezo, M. E., Vernon-Carter, E. J., & Pérez-Alonso, C. (2012). Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 102-109.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, JL, Rodríguez, JM, Núñez, M., & Medina, M. (2005). Actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* productor de pediocina sobre *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157: H7 en queso. *Diario Internacional de Productos Lácteos*, 15 (1), 51-57.
- Rodríguez, E., Gaya, P., Nuñez, M., & Medina, M. (1998). Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. *International journal of food microbiology*, 39(1-2), 129-132.
- Rokka S. y Rantamaki P. (2010). Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *Eur Food Res Technol* (231): 1-12.
- Rocha-Ramírez, L. M., Hernández-Chiñas, U., Moreno-Guerrero, S. S., Ramírez-Pacheco, A., & Eslava, C. A. (2021). Probiotic Properties and Immunomodulatory Activity of *Lactobacillus*

Strains Isolated from Dairy Products. *Microorganismos*, 9(4), 825.
<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/4/825>

- Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M. A., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2013). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206-212. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.115>
- Rodríguez, L. G. R., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversidad y propiedades funcionales de bacterias del ácido láctico aisladas de frutos y flores silvestres presentes en el norte de Argentina. *Frontiers Microbiología*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01091/full?report=reader#h3>
- Rutiaga-Quiñones, O. M., Martínez, L. O., & Esquivel-González, B. E. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersion de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 180-192.
- Santacroce, L., Charitos, I. A., & Bottalico, L. (2019). A successful history: probiotics and their potential as antimicrobials. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 17(8), 635-645.
- Santacruz, S., & Castro, M. (2018). Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT*, 93, 570-572.
- Santacruz, S., & Medrano, P. (2021). Uso de compuestos fenólicos de la cáscara de la mazorca de cacao (*Theobroma cacao L.*) como inhibidores de *Salmonella spp.* en queso fresco producido en Manabí, Ecuador. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 74 (3), 9715-9722.
- Santander-Cortés, A. I., & Castro-Rosas, J. (2024). Aislamiento de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de alimentos fermentados típicos de México: una revisión. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M. D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2002). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International journal of food microbiology*, 72(1-2), 125-136.
- Savadogo A, Ouattara CAT, Bassol IH and Traore S (2006). Bacteriocin and lactic acid bacteria- a minireview. *Afr. J. Biotechnol.* 5(9), 678-683.
- Sathyabama, S., Ranjith, M., & Brindha, V. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in gastric environment. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 57, 419–425.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., & Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43(1), 193-202.
- Sharaf, O. M., Al-Gamal, M. S., Ibrahim, G. A., Dabiza, N. M., Salem, S. S., El-Ssayad, M. F. y

- Youssef, A. M. (2019). Evaluación y caracterización de algunos metabolitos de cultivo protectores en formas libres y cargadas de nano-quitosano contra contaminantes comunes del queso egipcio. *Polímeros de carbohidratos*, 223, 115094.
- Silva, M. P., Tulini, F. L., Martins, E., Penning, M., Favaro-Trindade, C. S., & Poncelet, D. (2018). Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. *LWT*, 89, 392-399.
- Silva, G. D., Constant, P. B. L., Figueiredo, R. D., & Moura, S. M. (2010). Formulação e estabilidade de corantes de anto-cianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*) Formulation and stability of anthocyanins's colorants for-mulated with peels jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 21(3), 429-436.
- Srihasam, S., Thyagarajan, K., Korivi, M., Lebaka, VR y Mallem, SPR (2020). Generación fitogénica de nanopartículas de NiO utilizando extracto de hoja de Stevia y evaluación de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas in vitro. *Biomoléculas*, 10 (1), 89.
- Shinde, T., Sun-Waterhouse, D. y Brooks, J. (2014). Encapsulación por coextrusión del probiótico *Lactobacillus acidophilus* solo o junto con polifenoles de piel de manzana: un sistema de suministro acuoso y de valor agregado que utiliza alginato. *Tecnología de alimentos y bioprocesos* 7 (6), 1581-1596.
- Silva, G. D., Constant, P. B. L., Figueiredo, R. D., & Moura, S. M. (2010). Formulação e estabilidade de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria ssp.*) Formulation and stability of anthocyanins's colorants formulated with peels jabuticaba (*Myrciaria ssp.*). *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 21(3), 429-436.
- Silvestri, A., Ferrari, E., Gozzi, S., Marchi, F., & Foschino, R. (2018). Determinación de los parámetros de crecimiento dependientes de la temperatura en bacterias patógenas psicrotólicas y uso provisional de la temperatura cinética media para el control microbiológico de los alimentos. *Frontiers Microbiology*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03023/full#h4>
- Singh, S., Singh, K. N., Mandjiny, S., & Holmes, L. (2015). Modeling the Growth of *Lactococcus lactis* NCIM 2114 under Differently Aerated and Agitated Conditions in Broth Medium. *Fermentación*, 1(1), 86–97. <https://www.mdpi.com/2311-5637/1/1/86/htm#B18-fermentation-01-00086>
- Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020a). Cinética de crecimiento de cepas probióticas de *Lactobacillus* en el medio de fermentación semisólido alternativo y rentable. *Biología*, 9 (12), 423. <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/12/423/htm>
- Śliżewska, K., & Chlebicz-Wójcik, A. (2020b). El análisis in vitro de prebióticos para su uso como componente de una preparación simbiótica. *Nutrients*, 12 (5), 1272. <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/5/1272/htm>
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Uso de nisina y otras bacteriocinas para la conservación de productos lácteos. *Diario Internacional de Productos Lácteos*, 18 (4), 329-343.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., & Bhandari, B. (2011). Survivability of

probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 162-168.

- Soundharrajan, I., Kim, D., Kuppusamy, P., Muthusamy, K., Lee, H., & Choi, K. (2019). Potencial de fermentación de ensilaje de probióticos y triticale de *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis* y sus impactos sobre las bacterias patógenas. *Microorganismos* (7), 318. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090318>
- StatSoft Inc. (2011). *Statistica (Sistema de Software de análisis de datos), versión 10*. <http://www.statsoft.com>
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International journal of food microbiology*, 62(1-2), 47-55.
- Suzuki, A. y Suzuki, M. (2021). Actividad antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de una ballena picuda de Cuvier varada (*Ziphius cavirostris*) contra bacterias grampositivas y negativas. *Microorganismos*, 9 (2), 243. <https://doi.org/10.3390/microorganismos9020243>
- Taitzoglou, I. A., Tsantariotou, M., Zervos, I., Kouretas, D., & Kokolis, N. A. (2001). Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid in vitro. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 121(1), 131-137.
- Torres, V., Barbosa, I., Meyer, R., Noda, A., & Sarduy, L. (2012). Criterios de bondad de ajuste en la selección de modelos no lineales en la descripción de comportamientos biológicos. *Redalyc*, 46(4). <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193027579001.pdf>
- TR Klaenhammer. (1993). Genética de bacteriocinas producidas por bacterias del ácido láctico. *Pubmed*, 12 (1-3), 39–85. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x>
- Tsuchida, S., Kakooza, S., Mbehang Nguema, P. P., Wampande, E. M., & Ushida, K. (2018). Características del *Lactobacillus* específico de gorila aislado de gorilas cautivos y salvajes. *Microorganismos*, 6, 3. <https://www.mdpi.com/2076-2607/6/3/86>
- Turgay, Ö., & Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from various foods. *Turkish Journal of Biology*, 30(1), 39-44.
- Valdovinos, M. A., Montijo, E., Abreu, A. T., Heller, S., González-Garay, A., Bacarreza, D., ... & Guarner, F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de gastroenterología de México*, 82(2), 156-178.
- Vanegas, D., & Ramírez, M. (2016). Correlación del Crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en la Producción de Polihidroxialcanoatos de Cadena Media (PHAMCL) mediante Modelos Primarios de Gompertz, Logístico y Baranyi. *scielo*, 27(2). Obtenido de https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642016000200011&script=sci_arttext
- Varela-Pérez, A., Romero-Chapol, O. O., Castillo-Olmos, A. G., García, H. S., Suárez-Quiroz, M. L., Singh, J., ... & Cano-Sarmiento, C. (2022). Encapsulation of *Lactobacillus gasseri*:

Characterization, probiotic survival, in vitro evaluation and viability in apple juice. *Foods*, 11(5), 740.

- Vásquez MSM, Suárez MH, Zapata BS (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.* 36: 64-71.
- Vásquez, V. Salhuana, G. J. G. Jiménez, L. A. & Abanto Ríos, L. M. (2018). Evaluación de la calidad bacteriológica de quesos frescos en Cajamarca. *Ecología aplicada*, 17(1), 45-51. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i1.1172>
- Vega, M. F., Libonatti, C., Ramos, O. Y., & Basualdo, M. (2024). Caracterización de una comunidad microbiana aislada de colonias de abejas melíferas. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Vera Pingitore, E., Todorov, S. D., & Sesma, F. (2012). Gombossy de Melo Franco, BD Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. *Food Microbiol*, 32, 38-47.
- Verma, S.; Singh, A. & Mishra, A. (2013) - Gallic acid: Molecular rival of cancer. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 35, n. 3, p. 473-485. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.02.011>
- Vesković-Moračanin, S. M., Đukić, D. A., & Memiši, N. R. (2014). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review. *Acta periodica technologica*, (45), 271-283.
- Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S. V. N., & Reddy, O. V. S. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, 52, 6112-6124.
- Villegas-Soto, N. R., Hernández-Monzón, A., & Díaz-Abreu, J. A. (2018). Nuevo sistema tecnológico para producción artesanal de queso fresco con máximo aprovechamiento de componentes de la leche. *Tecnología Química*, 38(3), 530-541.
- Voo, W. P., Ravindra, P., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2011). Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(3), 294-299.
- Winkowski K, Crandall A and Montville T. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* in beef at refrigeration temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2552-2557. <https://doi.org/10.1128/aem.59.8.2552-2557.1993>
- Yao, Y.; Wu, M.; Huang, Y.; Li, C.; Pan, X.; Zhu, W. & Huang, Y. (2017) - Appropriately raising fermentation temperature beneficial to the increase of antioxidant activity and gallic acid content in *Eurotium cristatum*-fermented loose tea. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 82, p. 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.032>
- Yusuf MA (2013). Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin producer: A mini review. *IOSR J. Pharm.* 3: 44-50.
- Zambrano, L. (2021). Consumo: El queso se apodera de las mesas de los hogares urbanos. *Expreso*. Recuperado de <https://www.expreso.ec/guayaquil/queso-apodera>

mesashogares-urbanos115046.html#:~:text=Un%2099%2C7%20%25%20de%20los,25%20centavos%2C%20generalmente%20los%20criollos.

- Zambrano M. (2014). Determinación de la presencia de *Salmonella* en queso fresco comercializado en el cantón Chone provincia de Manabí entre mayo y julio del 2014. (Tesis). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador. 41 p.
- Zeashan, M.; Afzaal, M.; Saeed, F.; Ahmen, A.; Tufail, T.; Ahmed, A.; Anjum, M.F. (2020). Survival and behavior of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated human gastrointestinal and technological conditions. *Food Sci. Nutr.*8, 2419–2426
- Zhao, M., Qu, F., Cai, S., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, GO y Jiang, F. (2015). Microencapsulación de *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1. 2686: Correlación entre la capacidad de supervivencia de las bacterias y las propiedades físicas de las microcápsulas. *Biofísica de alimentos*, 10 (3), 292-299. DOI <https://doi.org/10.1007/s11483-014-9389-5>
- Zhou, Q., Zhang, Z., Chen, T., Guo, X., & Zhou, S. (2011). Preparation and characterization of thermosensitive pluronic F127-b-poly (ϵ -caprolactone) mixed micelles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), 45-57.
- Zommiti, M., Feuilleley, M. G., & Connil, N. (2020). Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, 8(12), 1907.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Riet, K. van 't. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC184525/>
- Zwietering, M., Yo Jongenburger, FM Rombouts, & Riet, K. van 't. (1990). Modelado de la curva de crecimiento bacteriano. *Pubmed*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128>