



## Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: [www.riit.com.mx](http://www.riit.com.mx)

### Evaluación de propiedades tecno-funcionales de cepas probióticas comerciales del género *Lactobacillus*

### Evaluation of techno-functional properties of commercial probiotic of *Lactobacillus* genus strains

Rosales-Bravo, H.<sup>a</sup>, Vázquez-Martínez, J.<sup>b</sup>, Morales-Torres, H. C.<sup>c</sup>, Olalde-Portugal, V.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos del Estado de Guanajuato, León, Gto., 37536. Tel. 477 711 8076 ext.5607.

<sup>b</sup> Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, TecNM, Irapuato, Gto., México. 36821.

<sup>c</sup> Departamento de Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV Unidad Irapuato, Irapuato, Gto., 36821. Tel. 462-623-96-47.

Autores para correspondencia: [hugo.rosalesb@cecycetg.edu.mx](mailto:hugo.rosalesb@cecycetg.edu.mx); [juan.vazquez@itesi.edu.mx](mailto:juan.vazquez@itesi.edu.mx); [espadadeagua2@yahoo.com.mx](mailto:espadadeagua2@yahoo.com.mx); [olalde.victor@yahoo.com](mailto:olalde.victor@yahoo.com)

**Innovación tecnológica:** uso de cultivos probióticos comerciales en la fabricación de productos lácteos fermentados.

**Área de aplicación industrial:** alimentos lácteos fermentados a partir de cultivos probióticos.

Recibido: 26 marzo 2020

Aceptado: 18 junio 2020

#### Abstract

In this study we evaluated technological and functional properties of four commercial probiotic of *Lactobacillus* genus strains: one *L. acidophilus* strain and three *L. casei* group strains (*L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*). Technological properties were evaluated by free amino acids production, acidification profile, glucose consumption and cellular viability in fermentation of modified MRS medium. The functional properties were determined through the antibacterial activity against Gram negative pathogens, compatibility with probiotic strains and assimilation of prebiotics: lactulose, raffinose, fructooligosaccharides and agave inulin. Our results show that *L. casei* group strains displayed the best performance in free amino acids production and acidification profile, as well as higher inhibitory effect versus *Salmonella* and *Shigella* pathogen strains. However, *L. acidophilus* showed better prebiotics assimilation ability. Finally, all the strains were compatible with *Bifidobacterium* probiotic strains. This data suggests that these

strains have potential use as adjunct cultures in fermented dairy foods, improving the nutritional and sensory value of the product, in addition to functional effect through their antibacterial activity and prebiotic assimilation capacity.

**Keys words:** amino acids, fermentation, prebiotic, probiotic, technological

## Resumen

En este estudio se evaluaron propiedades tecnológicas y funcionales de cuatro cepas probióticas comerciales de *Lactobacillus*: una cepa de *L. acidophilus* y tres pertenecientes al grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*). La capacidad fermentativa se evaluó a través de producción de aminoácidos libres, perfil de acidificación, consumo de glucosa y viabilidad celular durante la fermentación de medio MRS modificado. Las propiedades funcionales se evaluaron en términos de actividad antibacteriana contra patógenos Gram negativos, compatibilidad con cepas probióticas y asimilación de prebióticos: lactulosa, rafinosa, fructooligosacáridos e inulina de agave. Los resultados demuestran que las cepas del grupo *L. casei* produjeron mayor cantidad de aminoácidos libres y mejor perfil de acidificación, así como mayor efecto inhibitorio contra bacterias patógenas *Salmonella* y *Shigella*. Sin embargo, *L. acidophilus* presentó mayor capacidad de asimilación de prebióticos. Finalmente, todas las cepas fueron compatibles con cepas probióticas de *Bifidobacterium*. Los resultados sugieren que las cepas evaluadas presentan potencial aplicación como cultivos adjuntos en alimentos lácteos fermentados, contribuyendo a mejorar el valor nutricional y sensorial del producto, además de proveer un efecto funcional a través su actividad antibacteriana y capacidad de asimilación de prebióticos.

**Palabras clave:** aminoácidos, fermentación, lactobacillus, prebiótico, probiótico.

## I. Introducción

El término alimento funcional se define como “Alimentos que por virtud de la presencia de componentes alimentarios fisiológicamente activos proveen beneficios a la salud más allá de su valor nutritivo” (Academy of Nutrition and Dietetics, 2013). Algunos alimentos lácteos fermentados poseen diversos componentes con propiedades funcionales, que abarcan desde péptidos bioactivos, aminoácidos libres, ácidos orgánicos y vitaminas, hasta microorganismos probióticos (Melini *et al.*, 2019). Estos últimos constituyen uno de los principales componentes funcionales contenidos en alimentos elaborados

artesanalmente, que representan una forma accesible a la población de diversos países (Akabanda *et al.*, 2014; Gallegos-Acevedo *et al.* 2019).

De acuerdo con la FAO/OMS (2002) el término probiótico define a “microorganismos vivos, que cuando son consumidos en cantidades adecuadas como parte de un alimento confieren beneficios al huésped”. El género *Lactobacillus* incluye más de 200 especies distribuidas en 15 grupos, clasificados de acuerdo con sus características genotípicas y fenotípicas; que destacan en importancia debido a sus capacidades metabólicas y su adaptabilidad a diferentes hábitats (Duar *et al.*, 2017). Las

pruebas de funcionalidad en este tipo de cepas son variables entre los diferentes estudios, sin embargo, en términos generales incluye: resistencia a pH y bilis, adhesión a células intestinales, producción de ácidos orgánicos, inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, asimilación de prebióticos, entre otras (Vinderola *et al.*, 2011).

Existe una gran diversidad de cepas de *Lactobacillus* disponibles en el mercado y algunas han sido evaluadas como probióticos en el tratamiento de diversas patologías, como: intolerancias alimentarias, inflamación, infecciones intestinales, diabetes, obesidad, entre otras; caracterizadas por un desbalance de la microbiota intestinal debido a alteraciones intestinales específicas de cada patología o de las modificaciones nutricionales particulares, que resultan en alteraciones inmunológicas, fisiológicas y metabólicas del huésped (Heeney *et al.*, 2018; Wilkins *et al.*, 2019). Se reporta que la suplementación de algunas cepas de *Lactobacillus* reduce los síntomas de estas enfermedades y mejora en la calidad de vida del individuo (Yu-Ling *et al.*, 2019).

El uso de probióticos se ha extendido a la industria láctea como cultivos adjuntos, donde su participación metabólica secundaria al cultivo iniciador o dominante contribuye en la proteólisis de las proteínas de la leche, con efecto positivo en el incremento de aminoácidos libres y producción de compuestos volátiles durante la fermentación (Smit *et al.*, 2005; Radeljević *et al.*, 2013). Este proceso es realizado por un complejo sistema proteolítico cepa-específico, cuyas variantes fenotípicas en sus componentes comprende proteasas ancladas a pared celular, transportadores de aminoácidos y péptidos, así como peptidasas intracelulares, lo cual refleja en el impacto tecnológico de las

cepas durante la producción de lácteos fermentados (Tagliazucchi *et al.* 2019). Sin embargo, a pesar la gran diversidad de cepas de *Lactobacillus* comerciales, los estudios que reportan el impacto metabólico durante la fermentación láctea son limitados a cierto número de cepas (Bintsis, 2018; Li *et al.* 2017; Linares *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2019).

Debido a las aplicaciones antes señaladas, existen diversos criterios para evaluar el potencial funcional y tecnológico de las cepas, que abarca desde estudios *in vitro*, *in vivo* en modelos animales y humanos, hasta experimentos de escalamiento en planta piloto (Allam *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2015). A pesar de que estos últimos representan una opción más acertada al comportamiento de microorganismos en un entorno real, los estudios *in vitro* proporcionan información preliminar sobre el potencial de las cepas bajo condiciones simuladas, representando una opción económica y confiable para la selección de cepas con potencial clínico y tecnológico.

El objetivo de este estudio fue evaluar propiedades tecnológicas y funcionales de cuatro cepas probióticas comerciales del género *Lactobacillus*, en términos de producción de aminoácidos libres totales, perfil de acidificación, consumo de glucosa y células viables, así como actividad antibacteriana contra patógenos Gram negativos, compatibilidad con cepas probióticas y asimilación de prebióticos.

## II. Materiales

### 2. 1 Microorganismos y condiciones de crecimiento

Las cepas de este estudio proceden de la colección American Type Culture Collection (ATCC), e incluye: una cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y tres

pertenecientes al grupo *L. casei*: *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. Previo al estudio se evaluó compatibilidad entre cepas.

Para la prueba de actividad antimicrobiana se usó: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Cholerasuis ATCC 10708, *Salmonella entérica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 1045 y *Shigella flexnerii* ATCC 12022. En la prueba de compatibilidad con cepas probióticas se usó: *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, *Bifidobacterium animalis* ATCC 27530, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Bifidobacterium infantis* ATCC 15707.

En todos los casos se usaron cultivos stock, los cuales se elaboraron a partir de cultivos axénicos de cada cepa colectados durante la fase exponencial. A partir de alícuotas de estos cultivos se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min a 4 °C y se resuspendió al volumen inicial con medio líquido al 30 % de glicerol (v/v) (Sigma, USA), se almacenó a -80 °C para posteriores análisis. Para las cepas probióticas los medios empleados fueron agar y caldo De Man Rogosa and Sharpe (MRS; BD, USA). Para las cepas patógenas, se utilizó agar y caldo Nutritivo (BD, USA).

### III. Métodos

#### 3.1 Propiedades tecnológicas

##### 3.1.1 Fermentación

###### 3.1.1.1 Inóculo

Preinóculos de cada cepa de *Lactobacillus* fueron preparados colocando 10 ml de caldo MRS con 1 % (v/v) de cultivo stock e

incubando a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas hasta fase estacionaria. Posteriormente, el inóculo se preparó en 10 ml de caldo MRS con 1 % (v/v) del pre-inóculo e incubando a las mismas condiciones. A continuación, el paquete celular se sometió al lavado en dos ocasiones consecutivas con solución de fosfatos pH 7.0, se resuspendió al mismo volumen y se ajustó a 10<sup>6</sup> UFC.

##### 3.1.1.2 Condiciones de fermentación

250 ml de caldo MRS modificado (se reemplazó la proteosa peptona por peptona de caseína; BD, USA) se esterilizaron por filtración con el uso de una membrana de 0.25 µm (Merck Millipore, USA) de acuerdo con Lee *et al.*, (2014). Posteriormente se inoculó y se incubó a 37 °C bajo condiciones anaerobias y estáticas por 96 h. El experimento fue realizado por triplicado con tomas de muestras a 0, 12, 24, 48, 72 y 96 h.

##### 3.1.2 Tratamiento de muestras

Para la determinación de aminoácidos, carbohidratos y ácidos orgánicos, se partió de las muestras fermentadas libres de células, tomando como control el medio sin fermentar. Para esto, se tomaron alícuotas de 1 ml de muestra y se trataron con igual volumen de acetonitrilo (Sigma, USA), con reposo de 12 h a 4 °C y posterior centrifugado a 13000 rpm por 5 min, de acuerdo con el procedimiento reportado por Polson *et al.* (2003). Posteriormente las muestras se liofilizaron y se resuspendieron al volumen inicial con agua ultrapura.

##### 3.1.3 Determinación de aminoácidos libres totales

Las muestras se sometieron previamente a derivatización usando el kit Pico Taq (Waters Corp., Milford, MA, USA) de

acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La cuantificación se realizó con la determinación de los derivados de fenilisotiocianato generados a partir de los aminoácidos libres (Bidlingmeyer *et al.* 1984). La determinación se realizó mediante un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 acoplado a un detector UV, con una columna C18 Pico-Tag (3.9 x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Waters, USA). Las condiciones de operación fueron: velocidad de flujo de 1.0 ml/min. Como disolvente A se usó ácido acético (Sigma, USA) 0.14 M pH 6.5 (Sigma, USA); como solvente B se usó acetonitrilo (Sigma, USA) en proporción 60:20 (v/v) en agua ultra-pura. La elución se realizó usando 96 % de A y 4 % de B durante 10 min. Posteriormente se lavó con 100 % de B. El volumen de inyección fue de 4 µl de las muestras. Para la cuantificación se empleó una mezcla estándar de aminoácidos H-estándar (Waters Corp., Milford, MA, USA), realizando una curva de calibración en concentraciones de 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 pmol. La determinación se realizó a una longitud de onda de 240 nm. Los resultados se expresan en mg/l.

### 3.1.4 Perfil de acidificación

El perfil de acidificación consistió en determinar el pH y el contenido de ácidos orgánicos de cada muestra. La determinación de pH se realizó directamente en las muestras no tratadas, mientras que para la determinación de ácidos orgánicos se partió de alícuotas de 50 µl de muestra tratada, diluyendo en una proporción de 1:20 con agua ultra pura. Se determinó el contenido de ácido acético, propiónico, butírico y láctico mediante HPLC de acuerdo con el método propuesto por Al-Tamimi *et al.* (2006). El procedimiento incluyó una columna

Aminex HPX-87H de intercambio iónico (300 x 7.8 mm, 9 µm de tamaño de partícula; Bio-Rad, Watford, Herts, UK) y como fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM previamente desgasificado. La velocidad de flujo utilizada fue de 0.6 ml/min, a temperatura de operación de 50 °C. La cuantificación se realizó con un detector UV a 220 nm, calibrando con los estándares en concentraciones entre 1-100 mM. El volumen de inyección fue de 10 µl. Los resultados se reportan en g/l.

### 3.1.5 Determinación del contenido de hexosas totales

El contenido de carbohidratos totales se realizó con el método propuesto por Trevelyan and Harrison (1956). Las muestras se diluyeron a 1 ml en proporción 1:50 en agua ultrapura, se adicionaron 5 ml de solución de antrona (5 % alcohol absoluto, 0.2 % de antrona, aforado con solución de ácido sulfúrico al 75 %) y se mantuvieron a 0 °C por 10 min. Posteriormente, las muestras se colocaron a 80 °C en baño maría durante 10 min, para finalmente almacenarlos a 0 °C. La cuantificación de carbohidratos totales se determinó mediante una curva de calibración utilizando soluciones de glucosa en concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml a 625 nm. Los resultados se reportan en g/l.

### 3.1.6 Determinación de células viables

Las células viables se determinaron realizando una serie de diluciones 1/10 (10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-6</sup>) en solución de fosfatos pH 7.0. Se procedió a inocular 0.1 ml de cada una de las diluciones en placas con agar MRS (BD, USA), que se incubaron a 37 °C por 48 h. Los resultados se reportan en unidades formadoras de colonias por volumen de medio fermentado (UFC/ml).

### 3.2 Propiedades funcionales

#### 3.2.1 Actividad antibacteriana

La prueba contra cepas patógenas Gram negativas se realizó de acuerdo con Vinderola *et al.* (2008). Para esto, cultivos axénicos en fase estacionaria de las cepas *S. choleraesuis* ATCC 10708, *S. enteritidis* ATCC 1045 y *S. flexnerii* ATCC 12022 se desarrollaron en Caldo Nutritivo (BD, USA) y se inocularon en agar Mueller-Hinton (BD, USA) a una temperatura de 45-50 °C, homogeneizando y vertiendo la suspensión celular en cajas de petri de 100 mm de diámetro, con ajuste del contenido celular a 10<sup>6</sup> UFC/ml. Posteriormente, se realizaron cuatro pozos de 9 mm de diámetro en cada placa de agar y fueron sellados en el fondo con 5 µl de agar estéril. Cultivos axénicos en fase estacionaria de cada cepa de *Lactobacillus* fueron centrifugados a 12000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante. Cada muestra de sobrenadante libre de células se dividió en dos porciones, una fue neutralizada (con NaOH 5 M) y ambas fueron esterilizadas por filtración empleando una membrana de 0.25 µm. Volúmenes de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 µl de cada sobrenadante fueron adicionados en los pozos en las cajas de petri inoculadas con cada cepa patógena. Como control se empleó caldo MRS estéril pH 6.5. Las condiciones de incubación fueron 37 °C, en anaerobiosis por 24 h y los halos de inhibición fueron registrados en mm posterior a la incubación.

#### 3.2.2 Compatibilidad con cepas probióticas

La prueba se realizó por medio del ensayo por gota en agar suave MRS (0.7 % de agar) como reporta Ismail *et al.* (2016). Después de la solidificación del agar, gotas de 5 µl de

cultivo axénico en fase estacionaria de cada cepa de *Lactobacillus* (10<sup>6</sup> UFC/ml) fueron depositadas sobre la superficie del agar previamente inoculado con cultivo axénico en fase estacionaria de cada una de las cepas probióticas (10<sup>6</sup> UFC/ml), las cuales se incubaron a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas por 24 h. El efecto se evaluó después de la incubación, a través de la medición de las zonas de inhibición alrededor de la marca de crecimiento, los resultados son expresados subjetivamente en términos de capacidad inhibitoria a través de una escala hedónica de cuatro niveles de acuerdo con el diámetro de inhibición generado.

#### 3.2.3 Capacidad de asimilación de prebióticos

Para esta prueba se evaluó la capacidad de asimilación de cuatro carbohidratos usados como prebióticos: rafinosa (Sigma, USA), lactulosa (Regulact, México), fructooligosacáridos (FOS, Raftilose\_P95; Sigma, USA) e inulina de agave (Producto comercial, México), con el uso de glucosa como control. Se determinó el crecimiento mediante densidad óptica (OD<sub>600</sub> nm) de muestras de caldo MRS modificado, con el reemplazo de la glucosa por el correspondiente prebiótico al 1 % (p/v). Posteriormente se inoculó al 1 % (v/v) de cultivo axénico en fase estacionaria de las cepas en estudio, sometidas a dos lavados consecutivos con solución de fosfatos pH 7 y se incubó a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. El crecimiento se determinó a intervalos de 3 h durante las primeras 24 h y posteriormente cada 24 h hasta alcanzar 96 h. Los datos se ajustaron a un modelo logístico no lineal y se determinó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) (Likotrafiti *et al.*, 2013).

### 3.3 Presentación de resultados y análisis estadísticos

Todos los resultados se expresaron como los valores promedio  $\pm$  desviación estándar. En todos los análisis, se evaluó la normalidad de los datos y homogeneidad de varianza mediante las pruebas Shapiro y Levene respectivamente. Una vez cumplidas estas pruebas, se procedió al uso de la prueba paramétrica Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación de medias por método de Tukey con  $\alpha=0.05$  con el uso del programa R (R: A language and environment for statistical computing Core Team 2013).

## IV. Resultados y discusión

### 4.1 Propiedades tecnológicas

Todas las cepas alcanzaron la máxima población a las 24 h de fermentación, con una reducción de células viables en los tiempos posteriores (Figuras 1a-d). La cepa *L. casei* presentó la mayor viabilidad al término de la fermentación (96 h) con  $2.43 \times 10^7$  UFC/ml, una unidad logarítmica mayor respecto a *L. paracasei* ATCC 25302 y *L. rhamnosus* ATCC 53103, y dos unidades logarítmicas respecto a *L. acidophilus* ATCC 4356 ( $p < 0.05$ ).

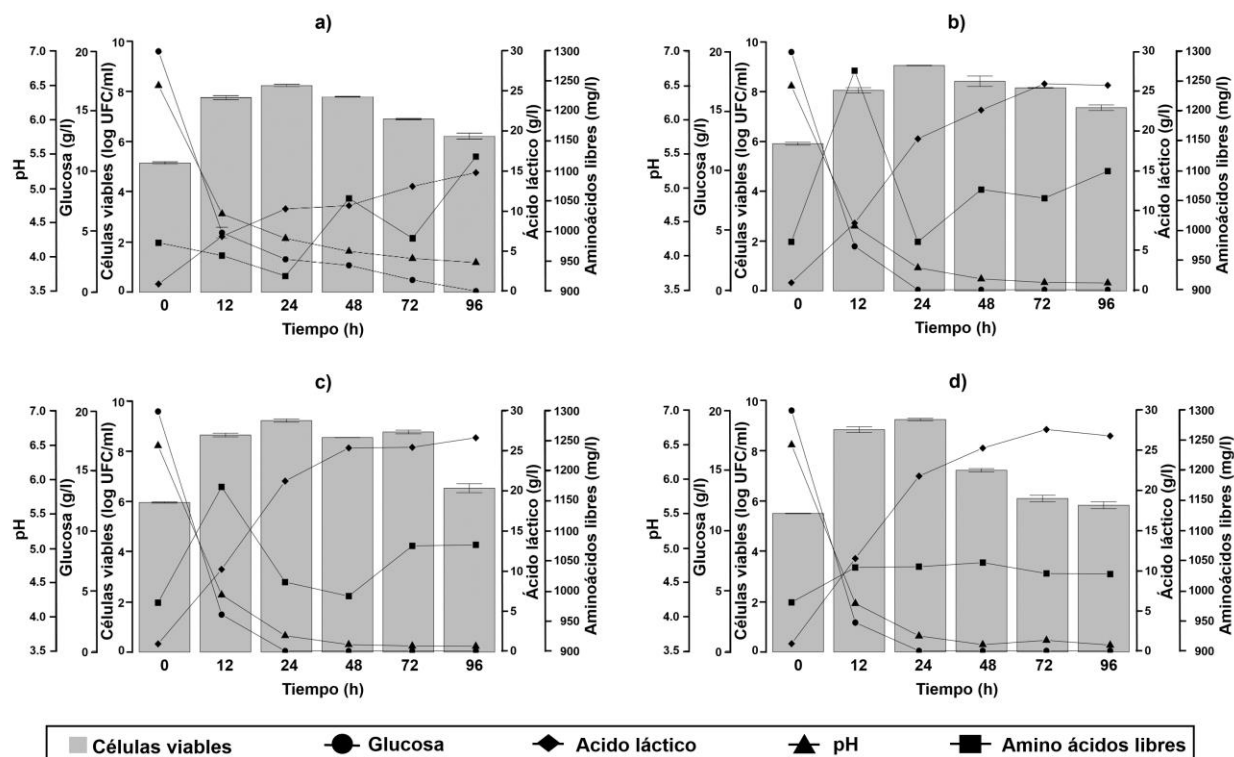
En los parámetros de consumo de glucosa y perfil de acidificación las cepas del grupo *L. casei* presentaron un patrón similar, con reducción total del contenido de glucosa a las 24 h de fermentación en contraste a *L. acidophilus* ATCC 4356, que presentó esta condición hasta las 96 h ( $p < 0.05$ ). El perfil de acidificación generado por las cepas del grupo *L. casei* destacó con una máxima producción de ácido láctico ( $21 - 28 \pm 0.7$  g/l) y reducción de pH (3.5-3.6) posterior a las 24 h de fermentación ( $p < 0.05$ ) (Figuras 1a-d). Este comportamiento similar entre las cepas del grupo *L. casei* está determinado por la estrecha relación filogenética de las

cepas de este grupo (Toh *et al.*, 2013). Además, la reducción del contenido total de glucosa en el medio a las 24 h de fermentación y el incremento del contenido de ácido láctico se debe a su capacidad para catabolizar aminoácidos libres para obtención de energía (Liu *et al.*, 2012). Adicionalmente, la cantidad de ácido láctico producido por las cepas del grupo *L. casei* superó en un 40-43 % a *L. acidophilus* ATCC 4356, así como a cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* usadas en maduración de quesos bajo condiciones de fermentación *in vitro* similares a este estudio (Serna, 2006), y con similitud a cepas de *L. casei*, *L. plantarum* y *L. delbrueckii* aisladas a partir de diferentes fuentes (Sheeladevi and Ramanathan, 2011).

En la producción de aminoácidos libres totales (Figura 1a-d) la mayor producción estuvo representada por *L. casei* ATCC 393 y *L. paracasei* ATCC 25302, con un comportamiento similar al tiempo de 12 h ( $1180.7 \pm 24.4 - 1285.2 \pm 28.4$  mg/l), lo cual representa un incremento del 17.1 – 23.9 % respecto al control ( $p < 0.05$ ) (Figuras 1b-c). *L. acidophilus* ATCC 4356 registró un incremento constante durante el tiempo de fermentación, con un incremento máximo del 11.4 % ( $1103.5 \pm 29.6$  mg/l) al término del proceso ( $p < 0.05$ ) (Figura 1a). *L. rhamnosus* ATCC 53103 fue la cepa con menor producción ( $p < 0.05$ ) (Figura 1d). La diferencia en la cantidad de aminoácidos producidos durante la fermentación podría explicarse por variaciones en los componentes de su metabolismo proteolítico, donde el tipo peptidasas intracelulares y sus mecanismos de regulación, así como las necesidades nutricionales debidas a las auxotrofías para los diferentes aminoácidos propios de cada cepa influyen en su liberación al medio (Altermann *et al.*, 2005; Mozzi *et al.*, 2010; Sasaki *et al.*, 1995). El patrón similar entre las cepas *L. casei* ATCC 393 y *L. paracasei*

ATCC 25302 sugiere la relación filogenética

más estrecha (Toh *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Variables cinéticas evaluadas en fermentación de medio MRS modificado incubado bajo condiciones anaeróbicas por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores iniciales de los parámetros cinéticos (tiempo 0) fueron:  $10^5 - 10^6$  UFC/ml, 20 g/l de glucosa, 0.88 g/l de ácido láctico, pH=6.5 y 980.74 mg/l de aminoácidos libres totales. Las cepas evaluadas fueron: a) *L. acidophilus* ATCC 4356, b) *L. casei* ATCC 393, c) *L. paracasei* ATCC 25302 y d) *L. rhamnosus* ATCC 52103. La información representa el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

Con excepción de *L. rhamnosus* ATCC 53103, cuya producción de aminoácidos libres fue constante a partir de las 12 h de fermentación, las demás cepas presentaron un incremento después de las 48 h, lo cual se relaciona con la lisis celular y liberación de peptidasas intracelulares, así como baja utilización de los aminoácidos del medio para crecimiento del cultivo debido a las condiciones desfavorables del medio. Este fenómeno es común en el proceso de maduración de quesos en donde la proteólisis secundaria por efecto de las peptidasas bacterianas libres favorece la liberación de aminoácidos a partir de los péptidos generados por la plasmina, al

incrementar el tiempo de maduración (Hynes *et al.*, 2003; Nateghi, 2012; Radeljević *et al.*, 2013).

Por otra parte, en los perfiles de aminoácidos libres *L. casei* y *L. paracasei* presentaron la mayor producción a las 12 h de fermentación para los aminoácidos esenciales: Ile ( $85.6 \pm 1.5 - 88.5 \pm 2.1$  mg/l), Leu ( $194.9 \pm 4.7 - 208.9 \pm 5.1$  mg/l), Lys ( $71.3 \pm 3.1$  mg/l), Met ( $37.2 \pm 0.7 - 40.2 \pm 1.3$  mg/l), Phe ( $132.2 \pm 3.4 - 141.3 \pm 2.9$  mg/l), Val ( $15.1 \pm 0.9 - 15.8 \pm 0.7$  mg/l) e His ( $20.5 \pm 0.7 - 21.9 \pm 0.6$  mg/l), así como para los aminoácidos no-esenciales: Ala ( $61.7 \pm 0.5 - 66.1 \pm 1.3$  mg/l), Arg ( $62.4 \pm 1.2 - 66.8 \pm 0.7$  mg/l).



mg/l), Asp ( $67.3 \pm 1.3 - 72.9 \pm 0.5$  m/l), Glu ( $104.7 \pm 1.8$  m/l), Tyr ( $61.8 \pm 07$  mg/l) ( $p < 0.05$ ). *L. rhamnosus* presentó la mayor producción para el aminoácido Gly ( $64.4 \pm 1.2 - 70.6 \pm 0.5$  mg/l) entre las 24 y 72 h de fermentación, así como para el aminoácido Ser ( $39.6 \pm 0.2$  mg/l). Adicionalmente, esta cepa presentó alta producción para Lys ( $56.5 \pm 1.6$  mg/l) y Thr ( $83.6 \pm 3.6$  mg/l) a las 12 h de fermentación ( $p < 0.05$ ). *L. acidophilus* incrementó la producción a las 96 h de fermentación para los aminoácidos Tyr ( $61.0 \pm 0.9$  mg/l), Ser ( $38.9 \pm 0.5$  mg/l) e Ile ( $75.6 \pm 2.8$  mg/l) ( $p < 0.05$ ). Finalmente, todas las cepas presentaron incremento de Pro al término de la fermentación, destacando *L. casei* y *L. acidophilus* ( $156.7 \pm 2.8 - 158.2 \pm 1.9$  mg/l) ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1 y 2). Los contrastes cuantitativos encontrados entre los perfiles de aminoácidos libres, se debe a variaciones en componentes del sistema proteolítico cepa-específico como reporta Settachaimongkon *et al.* (2014) para cepas

de *Streptococcus* y *Lactobacillus*. El incremento en la disponibilidad de los aminoácidos esenciales: Ile, Leu, Val, Phe, Trp y Met, favorece la formación de  $\alpha$ -ceto ácidos, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos y ésteres, cuyo perfil cualitativo y cuantitativo impactan las características distintivas a los productos lácteos fermentados (Smit *et al.*, 2005). Así mismo, se reporta que la disponibilidad de Glu incrementa la eficiencia de reacciones de transaminación por la enzima glutamato deshidrogenasa presente en lactobacilli, lo cual favorece la formación de compuestos de sabor y aroma (Williams *et al.*, 2006). Esto sugiere que las cepas de *L. casei* y *L. paracasei* evaluadas en este estudio presentan potencial uso como cultivos adjuntos, como se reporta para otras cepas de *Lactobacillus* en la producción de queso (Aljewicz *et al.*, 2014; Peralta *et al.*, 2016; Stefanovic *et al.*, 2018).

**Tabla 1.** Perfil de aminoácidos esenciales producidos durante la fermentación de medio líquido MRS modificado incubado bajo condiciones anaerobias a 37°C por 96 h.

Tiempo (h)	Cultivo	Contenido de aminoácidos (mg/l)								
		Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Thr	Trp	Val	His
0	C	70.0±4.5 <sup>bc</sup>	168.5±11.8 <sup>bc</sup>	28.8±0.8 <sup>hi</sup>	36.3±1.7 <sup>ab</sup>	131.3±5.5 <sup>bc</sup>	53.1±2.5 <sup>ef</sup>	40.2±1.6 <sup>ef</sup>	12.3±0.7 <sup>cd</sup>	17.1±1.3 <sup>de</sup>
	LA	67.6±0.5 <sup>c</sup>	160.6±3.5 <sup>bc</sup>	33.4±1.2 <sup>gh</sup>	31.6±0.4 <sup>bc</sup>	107.7±1.5 <sup>cd</sup>	45.7±0.8 <sup>g</sup>	35.9±1.7 <sup>fg</sup>	11.9±0.6 <sup>cd</sup>	14.7±0.8 <sup>e</sup>
	LC	88.5±2.1 <sup>a</sup>	208.9±5.1 <sup>a</sup>	71.3±3.1 <sup>a</sup>	40.2±1.3 <sup>a</sup>	141.3±2.9 <sup>a</sup>	59.4±1.2 <sup>de</sup>	49.3±1.8 <sup>cd</sup>	15.1±0.9 <sup>ab</sup>	21.9±0.6 <sup>a</sup>
	LP	85.6±1.5 <sup>ab</sup>	194.9±4.7 <sup>ab</sup>	38.5±1.2 <sup>ef</sup>	37.2±0.7 <sup>ab</sup>	132.2±3.4 <sup>ab</sup>	55.5±1.6 <sup>ef</sup>	46.0±1.4 <sup>de</sup>	15.8±0.7 <sup>a</sup>	20.5±0.7 <sup>ab</sup>
12	LR	66.9±1.3 <sup>c</sup>	166.2±4.9 <sup>bc</sup>	56.5±1.6 <sup>b</sup>	25.8±0.3 <sup>cd</sup>	102.9±1.9 <sup>de</sup>	83.6±3.6 <sup>a</sup>	56.5±2.5 <sup>a</sup>	10.8±0.3 <sup>cd</sup>	20.2±0.9 <sup>ab</sup>
	LA	69.0±1.3 <sup>c</sup>	160.4±3.8 <sup>bc</sup>	38.7±1.0 <sup>ef</sup>	31.4±1.8 <sup>ab</sup>	101.7±3.3 <sup>ef</sup>	42.8±1.3 <sup>g</sup>	34.7±1.4 <sup>fg</sup>	11.9±0.6 <sup>cd</sup>	13.3±0.6 <sup>f</sup>
	LC	64.8±1.6 <sup>c</sup>	146.1±2.0 <sup>c</sup>	48.1±1.4 <sup>bc</sup>	23.2±0.7 <sup>g</sup>	89.2±1.6 <sup>b</sup>	60.4±1.9 <sup>de</sup>	47.2±0.9 <sup>cd</sup>	10.5±0.4 <sup>d</sup>	17.7±0.7 <sup>cd</sup>
	LP	70.1±1.1 <sup>bc</sup>	155.0±2.5 <sup>c</sup>	21.3±0.5 <sup>k</sup>	34.2±1.1 <sup>ab</sup>	128.3±4.3 <sup>bc</sup>	50.7±0.3 <sup>fg</sup>	36.3±0.9 <sup>fg</sup>	10.9±0.7 <sup>cd</sup>	17.2±0.2 <sup>de</sup>
24	LR	66.2±1.4 <sup>c</sup>	143.3±1.7 <sup>c</sup>	52.5±1.2 <sup>bc</sup>	25.2±0.7 <sup>ef</sup>	98.9±2.9 <sup>gh</sup>	67.8±2.1 <sup>b</sup>	57.2±2.2 <sup>a</sup>	10.5±0.5 <sup>d</sup>	20.8±0.9 <sup>ab</sup>
	LA	70.5±1.8 <sup>bc</sup>	162.3±4.9 <sup>bc</sup>	35.9±1.2 <sup>fg</sup>	33.2±0.8 <sup>b</sup>	111.8±2.8 <sup>cd</sup>	47.5±1.5 <sup>g</sup>	35.5±0.9 <sup>fg</sup>	12.4±0.9 <sup>bc</sup>	15.5±0.6 <sup>e</sup>
	LC	72.0±2.2 <sup>bc</sup>	140.7±3.2 <sup>c</sup>	35.3±1.4 <sup>fg</sup>	25.8±0.7 <sup>cd</sup>	100.2±1.5 <sup>fg</sup>	68.2±1.7 <sup>b</sup>	35.3±0.4 <sup>fg</sup>	10.9±0.7 <sup>cd</sup>	19.3±0.9 <sup>bc</sup>
	LP	68.3±1.6 <sup>c</sup>	136.8±2.5 <sup>c</sup>	22.1±0.7 <sup>k</sup>	30.9±0.9 <sup>bc</sup>	124.9±1.7 <sup>bc</sup>	49.7±0.6 <sup>fg</sup>	34.8±1.2 <sup>fg</sup>	11.3±0.5 <sup>cd</sup>	19.3±0.2 <sup>bc</sup>
48	LR	64.9±2.5 <sup>c</sup>	152.5±3.8 <sup>c</sup>	45.2±0.9 <sup>cd</sup>	24.8±0.5 <sup>ef</sup>	101.3±2.5 <sup>ef</sup>	67.1±1.6 <sup>b</sup>	51.2±1.1 <sup>bc</sup>	10.5±0.9 <sup>d</sup>	19.2±0.8 <sup>bc</sup>
	LA	69.0±2.5 <sup>c</sup>	154.7±2.1 <sup>c</sup>	38.9±0.7 <sup>ef</sup>	32.3±1.1 <sup>bc</sup>	105.7±3.4 <sup>de</sup>	44.4±0.9 <sup>g</sup>	32.5±1.2 <sup>fg</sup>	12.2±0.6 <sup>cd</sup>	15.5±0.6 <sup>e</sup>
	LC	72.8±1.7 <sup>bc</sup>	156.6±2.0 <sup>c</sup>	42.2±0.5 <sup>de</sup>	26.2±0.3 <sup>cd</sup>	103.1±2.6 <sup>de</sup>	64.8±1.3 <sup>bc</sup>	51.1±0.9 <sup>bc</sup>	11.1±0.4 <sup>cd</sup>	20.5±0.7 <sup>ab</sup>
	LP	69.1±0.9 <sup>c</sup>	154.4±2.5 <sup>c</sup>	25.9±1.1 <sup>jk</sup>	31.7±0.8 <sup>bc</sup>	127.2±1.6 <sup>bc</sup>	49.4±0.8 <sup>fg</sup>	41.8±0.6 <sup>ef</sup>	11.6±0.2 <sup>cd</sup>	19.6±0.8 <sup>bc</sup>

	LR	63.0±1.1 <sup>c</sup>	144.8±3.5 <sup>c</sup>	36.7±1.2 <sup>ef</sup>	24.1±0.7 <sup>ef</sup>	100.4±1.9 <sup>fg</sup>	62.8±1.5 <sup>cd</sup>	52.3±1.4 <sup>ab</sup>	10.2±0.3 <sup>d</sup>	19.2±0.5 <sup>bc</sup>
96	LA	75.6±2.8 <sup>bc</sup>	153.8±2.4 <sup>c</sup>	27.3±1.5 <sup>ij</sup>	34.9±1.1 <sup>ab</sup>	131.7±3.8 <sup>bc</sup>	50.0±1.7 <sup>fg</sup>	40.4±1.1 <sup>ef</sup>	13.5±0.4 <sup>bc</sup>	17.7±0.8 <sup>cd</sup>
	LC	71.3±2.6 <sup>bc</sup>	155.5±1.5 <sup>c</sup>	39.0±1.4 <sup>de</sup>	26.0±1.5 <sup>cd</sup>	98.2±2.7 <sup>h</sup>	62.5±2.3 <sup>cd</sup>	48.3±1.2 <sup>cd</sup>	11.3±0.7 <sup>cd</sup>	17.8±0.5 <sup>cd</sup>
	LP	69.2±1.7 <sup>c</sup>	154.2±2.9 <sup>c</sup>	20.6±0.7 <sup>k</sup>	32.5±0.9 <sup>bc</sup>	127.6±2.9 <sup>bc</sup>	49.8±1.4 <sup>fg</sup>	31.7±0.8 <sup>g</sup>	11.1±0.2 <sup>cd</sup>	19.9±0.4 <sup>ab</sup>
	LR	64.4±1.5 <sup>c</sup>	150.4±1.9 <sup>c</sup>	43.4±1.3 <sup>cd</sup>	25.5±1.4 <sup>de</sup>	97.0±2.6 <sup>h</sup>	64.1±1.2 <sup>bc</sup>	51.2±1.3 <sup>bc</sup>	10.5±0.5 <sup>d</sup>	18.8±0.7 <sup>cd</sup>

† C: caldo MRS modificado sin fermentar (control), LA: *L. acidophilus* ATCC 4356, LC: *L. casei* ATCC 393, LP: *L. paracasei* ATCC 25302 y LR: *L. rhamnosus* ATCC 53103.

§ Los valores expresan el valor promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores promedios para cada cepa patógena evaluada a  $p < 0.05$  mediante la prueba de Tukey.

**Tabla 2.** Perfil de aminoácidos no-esenciales producidos durante la fermentación de medio líquido MRS modificado incubado bajo condiciones anaerobias a 37°C por 96 h.

Tiempo (h)	Cultivo	Contenido de aminoácidos no esenciales (mg/l)								
		Ala	Asn	Arg	Asp	Gly	Glu	Pro	Tyr	Ser
0	C	46.4±0.9	19.0±0.4 <sup>ab</sup>	53.1±1.1 <sup>cd</sup>	62.3±1.7 <sup>cd</sup>	40.5±0.7 <sup>gh</sup>	64.5±1.4 <sup>f</sup>	47.7±0.9 <sup>k</sup>	59.0±0.9 <sup>bc</sup>	27.6±0.6 <sup>f</sup>
	LA	49.3±0.7 <sup>bc</sup>	16.6±0.3 <sup>b</sup>	46.6±0.1 <sup>de</sup>	25.5±0.8 <sup>k</sup>	33.8±0.4 <sup>h</sup>	76.2±0.5 <sup>de</sup>	81.3±2.1 <sup>j</sup>	48.7±0.8 <sup>d</sup>	31.4±1.4 <sup>de</sup>
	LC	66.1±1.3 <sup>a</sup>	7.4±1.2 <sup>de</sup>	66.8±0.7 <sup>a</sup>	72.9±0.5 <sup>a</sup>	59.4±1.1 <sup>cd</sup>	104.7±1.8 <sup>a</sup>	115.6±1.5 <sup>fg</sup>	61.8±0.7 <sup>a</sup>	35.5±0.6 <sup>cd</sup>
	LP	61.7±0.5 <sup>a</sup>	12.9±0.1 <sup>c</sup>	62.4±1.2 <sup>ab</sup>	67.3±1.3 <sup>ab</sup>	55.4±0.7 <sup>ef</sup>	96.1±1.8 <sup>cd</sup>	107.9±2.3 <sup>gh</sup>	57.7±0.5 <sup>bc</sup>	33.1±0.1 <sup>de</sup>
12	LA	55.1±0.1 <sup>ab</sup>	9.8±0.4 <sup>d</sup>	44.4±0.9 <sup>e</sup>	42.3±0.7 <sup>hi</sup>	52.6±0.2 <sup>fg</sup>	81.8±0.5 <sup>de</sup>	81.1±1.7 <sup>j</sup>	48.8±0.6 <sup>d</sup>	39.6±0.2 <sup>a</sup>
	LC	47.0±1.1 <sup>bc</sup>	19.3±0.6 <sup>ab</sup>	50.1±0.9 <sup>de</sup>	24.7±1.2 <sup>k</sup>	35.9±1.1 <sup>h</sup>	76.3±0.8 <sup>de</sup>	88.4±1.1 <sup>j</sup>	47.7±0.2 <sup>d</sup>	32.4±0.7 <sup>de</sup>
	LP	44.3±0.2 <sup>bc</sup>	5.6±0.4 <sup>ef</sup>	39.8±0.6 <sup>c</sup>	39.4±0.9 <sup>ij</sup>	51.2±0.7 <sup>fg</sup>	91.3±0.3 <sup>cd</sup>	121.7±2.9 <sup>de</sup>	44.8±1.1 <sup>d</sup>	30.1±0.4 <sup>de</sup>
	LR	42.4±0.2 <sup>c</sup>	5.9±0.1 <sup>e</sup>	56.6±0.5 <sup>bc</sup>	50.5±1.8 <sup>gh</sup>	57.3±1.0 <sup>de</sup>	79.3±2.3 <sup>de</sup>	117.7±1.3 <sup>ef</sup>	54.4±2.4 <sup>cd</sup>	29.4±0.4 <sup>de</sup>
24	LA	46.8±1.3	9.8±0.2 <sup>d</sup>	53.9±0.4 <sup>cd</sup>	65.8±1.3 <sup>bc</sup>	70.6±0.5 <sup>a</sup>	97.9±0.7 <sup>bc</sup>	93.7±2.8 <sup>ij</sup>	44.4±1.3 <sup>d</sup>	31.1±0.5 <sup>de</sup>
	LC	45.2±0.1 <sup>bc</sup>	20.3±1.0 <sup>a</sup>	56.3±0.6 <sup>bc</sup>	26.1±0.2 <sup>k</sup>	42.5±1.2 <sup>gh</sup>	79.8±1.3 <sup>de</sup>	106.4±3.2 <sup>hi</sup>	52.6±0.5 <sup>cd</sup>	36.8±1.6 <sup>cd</sup>
	LP	46.1±0.5 <sup>bc</sup>	2.4±0.1 <sup>h</sup>	47.7±0.9 <sup>de</sup>	49.9±0.5 <sup>gh</sup>	61.0±0.2 <sup>cd</sup>	103.1±0.6 <sup>a</sup>	135.7±1.4 <sup>b</sup>	51.1±0.8 <sup>cd</sup>	34.3±0.7 <sup>cd</sup>
	LR	40.5±0.9 <sup>c</sup>	5.8±0.2 <sup>ef</sup>	56.5±0.3 <sup>bc</sup>	43.1±0.4 <sup>hi</sup>	59.6±0.2 <sup>cd</sup>	79.1±0.5 <sup>de</sup>	124.5±2.3 <sup>cd</sup>	54.2±0.6 <sup>cd</sup>	29.9±0.7 <sup>de</sup>
48	LA	46.7±0.3 <sup>bc</sup>	9.3±0.1 <sup>d</sup>	50.5±0.6 <sup>de</sup>	54.8±0.5 <sup>de</sup>	64.4±1.2 <sup>bc</sup>	97.9±1.1 <sup>bc</sup>	102.1±1.4 <sup>hi</sup>	48.0±0.5 <sup>d</sup>	32.2±0.8 <sup>de</sup>
	LC	48.3±0.4 <sup>bc</sup>	20.1±0.6 <sup>a</sup>	52.2±0.2 <sup>cd</sup>	29.6±0.3 <sup>jk</sup>	45.7±0.1 <sup>sh</sup>	89.0±0.6 <sup>cd</sup>	110.2±2.7 <sup>gh</sup>	50.6±0.4 <sup>cd</sup>	37.5±0.4 <sup>bc</sup>
	LP	45.0±0.7 <sup>bc</sup>	3.0±0.1 <sup>fg</sup>	48.0±0.5 <sup>de</sup>	58.1±0.7 <sup>de</sup>	68.2±0.4 <sup>ab</sup>	101.2±0.3 <sup>ab</sup>	154.0±2.9 <sup>a</sup>	53.5±1.2 <sup>cd</sup>	34.1±0.5 <sup>cd</sup>
	LR	44.5±0.7 <sup>bc</sup>	8.0±0.3 <sup>de</sup>	50.7±1.6 <sup>de</sup>	50.7±0.1 <sup>gh</sup>	61.7±0.8 <sup>cd</sup>	98.7±1.3 <sup>bc</sup>	130.8±1.7 <sup>bc</sup>	60.2±0.1 <sup>ab</sup>	31.1±0.9 <sup>de</sup>
72	LA	45.2±1.1 <sup>bc</sup>	9.8±0.4 <sup>d</sup>	51.1±1.0 <sup>de</sup>	55.0±0.3 <sup>de</sup>	67.0±0.9 <sup>ab</sup>	97.5±1.1 <sup>bc</sup>	107.5±3.2 <sup>gh</sup>	47.2±0.4 <sup>d</sup>	31.9±0.7 <sup>de</sup>
	LC	46.0±0.5 <sup>bc</sup>	21.2±0.3 <sup>a</sup>	54.6±1.9 <sup>cd</sup>	32.4±0.1 <sup>jk</sup>	52.8±1.6 <sup>fg</sup>	93.5±1.8 <sup>cd</sup>	158.2±1.9 <sup>a</sup>	61.0±0.9 <sup>a</sup>	38.9±0.5 <sup>ab</sup>
	LP	45.7±0.7 <sup>bc</sup>	2.8±0.1 <sup>gh</sup>	48.5±0.4 <sup>de</sup>	53.4±0.9 <sup>fg</sup>	61.8±1.1 <sup>cd</sup>	108.8±1.0 <sup>a</sup>	156.7±2.8 <sup>a</sup>	50.8±1.2 <sup>cd</sup>	35.2±0.6 <sup>cd</sup>
	LR	44.9±0.6 <sup>bc</sup>	7.9±0.1 <sup>de</sup>	51.4±0.7 <sup>de</sup>	50.2±0.9 <sup>gh</sup>	62.4±0.1 <sup>cd</sup>	100.1±0.6 <sup>bc</sup>	129.2±3.6 <sup>bc</sup>	55.6±0.4 <sup>cd</sup>	31.5±0.4 <sup>de</sup>
96	LA	47.2±0.5 <sup>bc</sup>	9.7±0.4 <sup>d</sup>	48.5±1.2 <sup>de</sup>	54.5±0.5 <sup>ef</sup>	61.4±0.4 <sup>cd</sup>	95.7±1.4 <sup>cd</sup>	111.2±1.5 <sup>gh</sup>	45.0±1.2 <sup>d</sup>	31.9±0.9 <sup>de</sup>

† C: caldo MRS modificado sin fermentar (control), LA: *L. acidophilus* ATCC 4356, LC: *L. casei* ATCC 393, LP: *L. paracasei* ATCC 25302 y LR: *L. rhamnosus* ATCC 53103.

¶ El aminoácido Gln no fue detectado, mientras que para Cys el contenido fue 0 en todas las muestras.

§ Los valores expresan el valor promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores promedios para cada cepa patógena evaluada a  $p < 0.05$  mediante la prueba de Tukey.

## 4.2 Propiedades funcionales

### 4.2.1 Actividad antibacteriana y compatibilidad con cepas probióticas

La evaluación de la capacidad antagonista de las cepas de *Lactobacillus* contra patógenos Gram negativos reveló que el sobrenadante libre de células neutralizado no presentó

efecto inhibitorio, mientras que el sobrenadante no neutralizado libre de células presentó el mayor efecto inhibitorio a volúmenes  $\geq 200 \mu\text{L}$ . *L. paracasei* ATCC 25302 presentó la mayor inhibición contra *S. choleraesuis* and *S. flexnerii* ( $p < 0.05$ ), mientras que *L. rhamnosus* ATCC 53103 contra *S. enteritidis* ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1). Estos resultados coinciden con los reportados para otros estudios, donde revelan que la producción de ácidos orgánicos representa el mecanismo principal de inhibición de patógenos y corresponde al

mecanismo principal de regulación de la microbiota intestinal (Belicová *et al.*, 2013; Naidu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Así mismo, el efecto letal de los ácidos orgánicos radica en su forma no disociada, la cual difunde pasivamente a través de la membrana, alterando el gradiente electroquímico y permeabilidad de la membrana celular, y cuya concentración depende del pH del medio, lo cual correlaciona con el sobrenadante no neutralizado libre de células (Bae and Lee, 2015).

**Tabla 3.** Actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas de sobrenadante libre de células de medio MRS fermentado por cultivos axénicos de cepas de *Lactobacillus*.

Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Diámetro de zonas de inhibición (mm)											
	<i>L. acidophilus</i>			<i>L. casei</i>			<i>L. paracasei</i>			<i>L. rhamnosus</i>		
	SF	SE	SC	SF	SE	SC	SF	SE	SC	SF	SE	SC
50	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>
100	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>
150	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	12.1 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	10.6 $\pm$ 0.2 <sup>g</sup>	10.9 $\pm$ 0.6 <sup>e</sup>	10.1 $\pm$ 0.3 <sup>g</sup>	12.1 $\pm$ 0.4 <sup>e</sup>	0 <sup>f</sup>
200	0 <sup>g</sup>	0 <sup>i</sup>	0 <sup>f</sup>	12.1 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	11.2 $\pm$ 0.1 <sup>f</sup>	0 <sup>f</sup>	12.4 $\pm$ 0.1 <sup>cd</sup>	13.0 $\pm$ 0.6 <sup>e</sup>	11.4 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	12.1 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	14.9 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	11.6 $\pm$ 0.3 <sup>de</sup>
250	0 <sup>g</sup>	10.4 $\pm$ 0.4 <sup>h</sup>	11.6 $\pm$ 0.2 <sup>d</sup>	12.8 $\pm$ 0.6 <sup>e</sup>	13.8 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	0 <sup>f</sup>	14.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	14.5 $\pm$ 0.4 <sup>e</sup>	14.8 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	14.3 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	15.7 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	11.5 $\pm$ 0.2 <sup>de</sup>
300	10.9 $\pm$ 2 <sup>e</sup>	10.5 $\pm$ 0.3 <sup>h</sup>	11.9 $\pm$ 0.1 <sup>d</sup>	14.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	14.9 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>	10.9 $\pm$ 2 <sup>e</sup>	15.5 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	14.6 $\pm$ 0.2 <sup>e</sup>	15.9 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	14.4 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>	16.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	13.2 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>

† SF: *Shigella flexnerii* ATCC 12022; SE: *Salmonella enteritidis* ATCC 1045; SC: *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708.

‡ pH y contenido de ácido láctico de sobrenadante libre de células no neutralizado (mg/100  $\mu\text{L}$ ): caldo MRS sin fermentar (control) pH=6.5 y 0.08 $\pm$ 0.00; *L. acidophilus* ATCC 4356 pH=4.27 y 1.02 $\pm$ 0.01; *L. casei* ATCC 393 pH=3.82 y 1.90 $\pm$ 0.01; *L. paracasei* ATCC 25302 pH=3.72 y 2.12 $\pm$ 0.01; *L. rhamnosus* ATCC 53103 pH=3.71 y 2.18 $\pm$ 0.01.

§ Los valores expresan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Diferentes superíndices indican diferencias significativas entre los valores promedios para cada cepa patógena evaluada a  $p < 0.05$  mediante la prueba de Tukey.

Por otra parte, la prueba de compatibilidad entre cepas probióticas reveló que las cepas de *Lactobacillus* son compatibles entre ellas y con cepas probióticas del género *Bifidobacterium*, con ausencia de halos de inhibición en el agar MRS, lo cual debe a mecanismos de ambos géneros bacterianos que involucran: recambio de lípidos con incremento en la rigidez e impermeabilidad de membrana citoplasmática, excreción de protones por medio de ATPasas, producción intracelular de aminoácidos de cadena ramificada (Ile, Leu y Val) y amonio (Papadimitriou *et al.*, 2016; Ruíz *et al.*, 2011). Esto resalta su potencial en

aplicaciones clínicas y tecnológicas debido a que *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* forman parte de la microbiota intestinal normal del ser humano, lo cual representa bajo riesgo en mecanismos inhibitorios o de competencia contra cepas comensales del huésped (Mueller *et al.*, 2015). Adicionalmente, la compatibilidad entre cepas podría sugerir su aplicación como cultivos mixtos en la producción de alimentos lácteos fermentados (Rosa do Carmo *et al.*, 2017).

#### 4.2.2 Asimilación de prebióticos

De las cepas evaluadas, *L. acidophilus* ATCC 4356 presentó la mayor capacidad de asimilación de prebióticos, con velocidades específicas de crecimiento de 0.68, 1.01 y 0.61 para lactulosa, rafinosa y FOS respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 2a y Tabla 4). El pH resultante de la fermentación de estos sustratos fue similar al control y osciló entre 4.2 y 4.3 al término de la fermentación (96 h) ( $p < 0.05$ ). Las cepas *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* ATCC 25302 y *L. rhamnosus* ATCC 53103 mostraron baja densidad óptica y ligero cambio de pH en los prebióticos mencionados ( $p < 0.05$ ) (Figuras 2b-d y Tabla 2). Estos resultados corresponden a los reportados por Altermann *et al.* (2005) y Figueroa-González *et al.* (2019) que refieren baja capacidad de asimilación de lactulosa y FOS por cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus*, en contraste a *L. acidophilus*. El medio con inulina de agave comercial produjo baja densidad óptica y escasa acidificación para todas las cepas de *Lactobacillus* ( $p < 0.05$ ) (Figuras 2a-d y Tabla 4), lo cual indica escasa asimilación del carbohidrato, que es contrario a lo

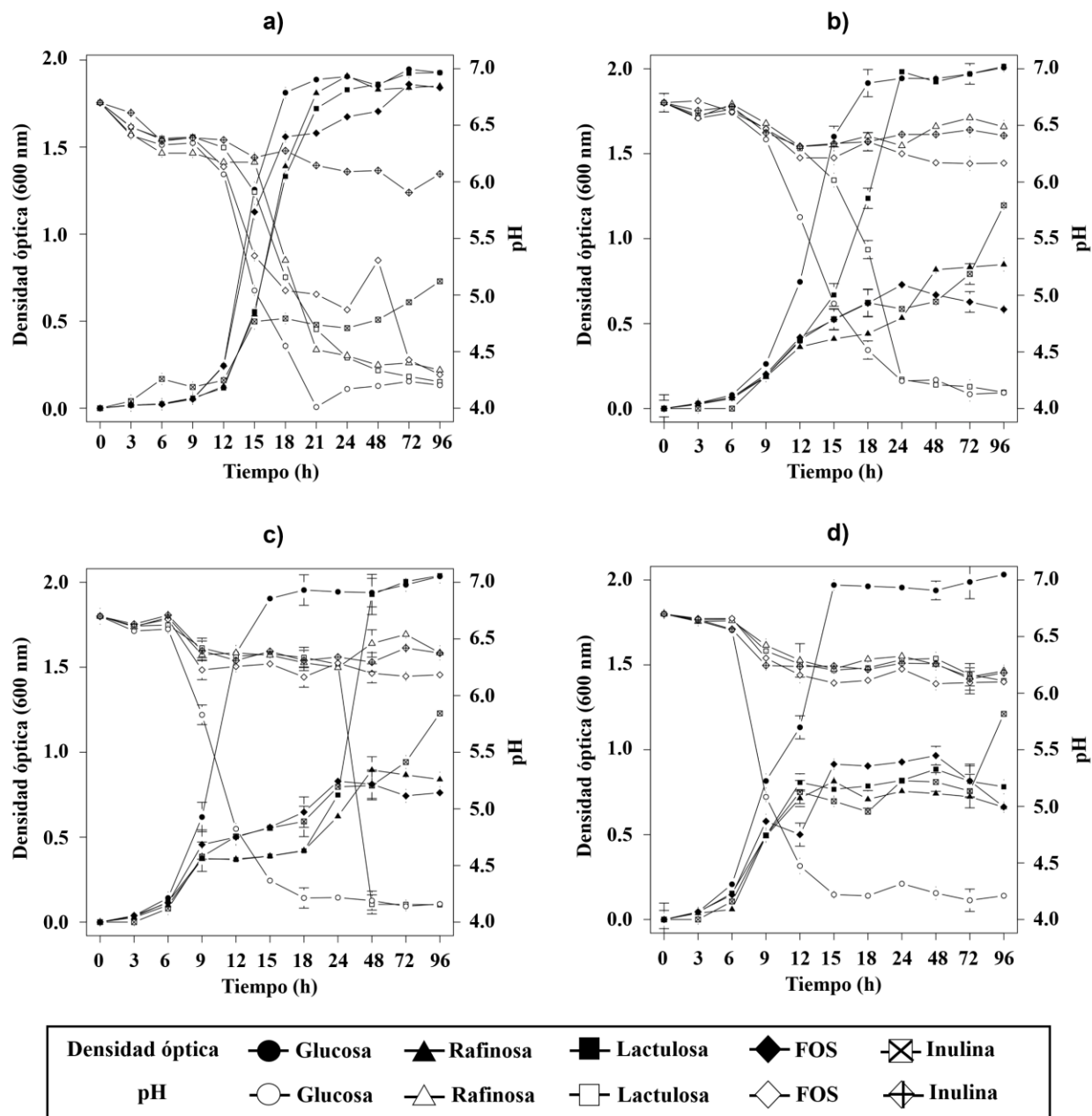
reportado por Kaplan and Hutkins (2000), Cai *et al.* (2007) y Velázquez-Martínez *et al.* (2014) para cepas de *L. casei* y *L. paracasei*, pero similar respecto a *L. acidophilus* y *L. rhamnosus*. Es importante destacar que las variaciones metabólicas observadas están determinadas por sus características genotípicas específicas particulares de cada cepa, las cuales están determinadas por las condiciones ambientales del hábitat del microorganismo (Altermann *et al.*, 2005). Finalmente, la importancia de la asimilación de prebióticos radica en el diseño de productos simbióticos comerciales (probiótico + prebiótico), en los cuales se incluye el sustrato para promover el crecimiento del probiótico específico. Esto sugiere que la cepa *L. acidophilus* evaluada en este estudio presenta versatilidad los sustratos utilizados, lo cual sugiere una ventaja competitiva contra microorganismos comensales y patógenos dentro del tracto gastrointestinal, representando un mecanismo de acción importante en los microorganismos probióticos (Dicks and Botes, 2010).

**Tabla 4.** Velocidad específica de crecimiento de cepas de *Lactobacillus* determinadas en fermentación de MRS modificado suplementado con prebióticos.

Cepas	Prebióticos				
	Glucosa	Rafinosa	Lactulosa	FOS	Inulina
	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )
LA	0.45±0.01	1.01±0.00*	0.68±0.03*	0.61±0.03*	0.40±0.03
LC	0.69±0.02	0.14±0.01	0.11±0.00	0.29±0.01	0.19±0.00
LP	0.83±0.02	0.64±0.01	0.57±0.00	0.70±0.02	0.26±0.02
LR	0.58±0.03	0.15±0.00	0.35±0.01	0.41±0.00	0.25±0.01

† LA: *L. acidophilus* ATCC 4356, LC: *L. casei* ATCC 393, LP: *L. paracasei* ATCC 25302, LR: *L. rhamnosus* ATCC 52103.

\* Indica significancia en la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) respecto al control a  $p < 0.05$  aplicando la prueba de Tukey. Los valores indican el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento y cambio de pH de las cepas: a) *L. acidophilus* ATCC 4356, b) *L. casei* ATCC 393, c) *L. paracasei* ATCC 25302 y d) *L. rhamnosus* ATCC 52103, durante la fermentación de medio MRS modificado (reemplazo de glucosa por prebiótico al 1 % (p/v) incubado a 37 °C durante 96h. Los símbolos rellenos corresponden a la medición de la absorbancia y los símbolos vacíos a las mediciones de pH. Los valores expresan el valor promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

## V. Conclusión

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas evaluadas presentan potencial aplicación como cultivos adjuntos en la

elaboración de alimentos lácteos fermentados con propiedades funcionales. La cepa *L. casei* y *L. paracasei* destacaron en la producción de aminoácidos libres con incremento en la disponibilidad de

aminoácidos esenciales, los cuales favorecerían en valor nutricional y propiedades sensoriales del alimento fermentado. Así mismo, estas cepas junto con *L. rhamnosus* presentaron mayor efecto antibacteriano contra patógenos Gram negativos, lo cual proveería al consumidor un efecto protector contra infecciones intestinales y agregaría al producto la propiedad funcional. Finalmente, *L. acidophilus*, resultó en mayor capacidad de asimilación de prebióticos, que podría resultar en una ventaja tecnológica en el diseño de productos simbióticos. Finalmente, todas las cepas fueron compatibles con cepas probióticas de *Bifidobacterium*, que podría representar una ventaja en el diseño de cultivos mixtos.

## VI. Agradecimientos

Agradecimiento a Berenice Cuevas y Yolanda Rodríguez Aza por el apoyo en la ejecución de la técnica HPLC. A Rosalinda Serrato Flores por apoyo en la ejecución en la técnica de determinación de hexosas totales. Además, agradecimiento a la Dra. Mercedes Guadalupe López por proporcionar las cepas de *Lactobacillus* usadas en este estudio.

## VII. Referencias

1. Academy of Nutrition and Dietetics. “Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Functional Foods”, *J Acad Nutr Diet*, 113, 2013, 1096-1103. 2212. doi:10.1016/j.jand.2013.06.002.
2. Allam, M.G.M., Darwish, A.M.G., Ayad, E.H.E., Shokery, E.S., Mashaly, R.E. and Darwish, S.M., “*In vivo* evaluation of safety and probiotic traits of isolated *Enterococcus faecium* strain KT712”, *Research Journal of*

*Microbiology*, 11(6), 2016, 169-177. doi.org/10.3923/jm.2016.169.177.

3. Aljewicz, M., Cichosz, G., Nalepa, B. and Kowalska, M., “Influence of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactobacillus rhamnosus* HN001 on proteolysis patterns of Edan Cheese”, *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 2014, 439-447. doi.10.17113/ftb.52.04.14.3659.
4. Al-Tamimi, M.A., Palframan, R.J., Cooper, J.M., Gibson, G.R. and Rastal, R.A., “*In vitro* fermentation of sugar beet Arabian and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora”, *Journal of Applied Microbiology*, 100, 2006, 407-414. doi.10.1111/j.1365-2672.2005.02780.x
5. Altermann, E., Russel, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L. et al., “Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM”, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 2005, 3906-3912. doi.10.1073/pnas.0409188102.
6. Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Parkouda, C., Jespersen, L., “The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana”, 2014, 11. *International Journal of Food Science*. doi.org/10.1155/2014/721067.
7. Bae, Y.M. and Lee, S.Y., “Combined effects of organic acids and salt depending on type of acids and pathogens in laboratory media and acidified pickle”, *Journal of Applied*

- Microbiology*, 119, 2015, 455-464. doi:10.1111/jam.12845.
8. Belicová, A., Mikulášová, M. and Dusinsky, R., “Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from slovak bryndza chesse”, *BioMed Research International*, 1, 2013, 1-8. doi.org/10.1155/2013/760298.
  9. Bintsis, T., “Lactic acid bacteria: their applications in foods”, *J Bacteriol Mycol Open Access*, 6(2), 2018, 89–94. doi. 10.15406/jbmoa.2018.06.00182.
  10. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T.L., “Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization”, *Journal of Chromatography*. 336, 1984, 93-104. doi.org/10.1016/S0378-4347(00)85133-6.
  11. Dicks, L.M.T. and Botes, M., “Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action”, *Beneficial Microbes*, 1, 2010, 11-29. doi.10.3920/BM2009.0012.
  12. Duar, R.M, Lin, X.B., Zheng, J., Martino, M.E., Grenier, T., Pérez.Muñoz, M.E., Leulier, F., Gänzle, M. and Walter, J. “Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*”, *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp1), S27-S48. doi.10.1093/femsre/fux030.
  13. FAO/WHO, “Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a joint. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food”, 2002, London Ontario, Canada.
  14. Figueroa-González, I., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Gariba, M. and Cruz-Guerrero, A., “Prebiotic effect of commercial saccharides on probiotic bacteria isolated from commercial products”, *Food Sci. Technol*, 39(3), 2019, 747-753. doi.org/10.1590/fst.07318.
  15. Rosa do Carmo, F.L., Rabah, H., Fernandes-Cordeiro, B., Da Silva, S.H., Jan, D., Azevedo, V., Dias de Oliveira Carvalho, R., “Applications of probiotic bacteria and dairy foods in health”, *Current Reseach in Microbiology*, 2, 2017, 34.
  16. Gallegos-Acevedo, M.E., Chávez-Martínez, A., Corral-Luna, A., Rentería-Monterrubio, A.L., Burrola-Barraza, M.E., Lechuga-Valles, R., Domínguez-Viveros, J., Castillo-González, A.R. and Sánchez-vega, R., “Microbial characterization and diversity of artisanal Ranchero cheese with emphasis in *Lactococcus* strains”, *Food Sci. Technol*, 39(1), 2019, 143-148. doi.org/10.1590/fst.28217.
  17. Hynes, E., Bach, C., Lamberet, G., Ogier, J.C., Son, O. and Delacroix-Buchet, A., “Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profile and sensory characteristics of washed-curd cheese”, *Lait*. 83, 2003, 31-43. doi.10.1051/lait:2002048.
  18. Heeney, D.D., Gareau, M.G. and Marco, M.L. “Intestinal *Lactobacillus* in health and disease, a driver or just along for the ride?”, *Curr Opin Biotechnol*. 49, 2018, 140-147. doi. 10.1016/j.copbio.2017.08.004
  19. Ismail, A., Ktari, L., Ahmed, M., Bolhuis, H., Boudabbous, A. et al.

- “Antimicrobial activities of bacteria associated with the brown alga *Padina pavonica*”, *Frontiers in Microbiology*, 7, 2016, 1-13. doi.org/10.3389/fmicb.2016.01072.
20. Kaplan, H. and Hutkins, R.W., “Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid” *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2000, 2682-2684. doi.10.1128/aem.66.6.2682-2684.2000.
21. Kumar, S.T., Kumar, J.P., Nagar, N., Kumar, A.P. and Seshadri, S., “*In Vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *labeo rohita* and *catla catla*”, *Probiotics and Antimicrobial proteins*, 7(2), 2015, 126-136.
22. Lee, K., Kim, H. and Park, S., “Amino acids analysis during lactic acid fermentation by single strain cultures of lactobacilli and mixed culture starter made from them”, *African Journal of Biotechnology*, 13, 2014, 2867-2873. Doi.10.5897/AJB2013.13422.
23. Li, C., Song, J., Kwok, L., Wang, J., Dong, Y., Yu, H., Hou, Q., Zhang, H. and Chen, Y., “Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage”, *J. Dairy Sci*, 100, 2512–2525. doi.org/10.3168/jds.2016-11864.
24. Likotrafiti, E., Tuohy, K.M., Gibson, G.R. and Rastall, R.A., “Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*”, *Anaerobe*, 20, 2013, 5-13. doi.10.1016/j.anaerobe.2013.01.002.
25. Linares, D.M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Ross, R.P. and Stanton, C., “Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods”, *Front Microbiol*, 8, 2017, 846. doi: 10.3389/fmicb.2017.00846.
26. Liu, E., Zheng, H., Hao, P., Konno, T., Yu, Y., Kume, H., Oda, M. and Ji, Z.S., “A model of proteolysis and amino acid biosynthesis for *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in whey”, *Current Microbiology*, 65(6), 2012, 742-51. doi.10.1007/s00284-012-0214-4.
27. Melini, F., Melini, V., Luziatelli, F., Ficca, A.G. and Ruzzi, M., “Health-promoting components in fermented foods: an up-to-date systematic review”, *Nutrients*, 11(5), 2019, 1189. doi. 10.3390/nu11051189.
28. Mozzi, F., Raya, R.R., Vingolo, G.M., “Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications”, Editorial Office, USA, 2010, 16-18. doi.10.1002/9781118868386.
29. Mueller, N.T., Bakacs, E., Combellick, J., Grigoryan, Z. and Dominguez-Bello, M.G., “The infant microbiome development: mom matters”, *Trends in Molecular Medicine*, 21, 2015, 109–117. doi.org/10.1016/j.molmed.2014.12.002.
30. Nateghi, L., “Effects of different adjunct starter culture on proteolysis of reduced fat Cheddar cheese during ripening”, *African Journal of Biotechnology*, 11(61), 2012, 12491-12499. doi.10.5897/AJB11.3359.
31. Naidu, K.S.B., Adam, J.K., Gobender, P., “The use of probiotic



- and safety concerns: a review”, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 2012, 6871-6877. doi.10.5897/AJMR12.1281.
32. Papadimitriou, K., Alegría, A., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobetti, M., Kleerebezem, M., José A. Lemos, M.J., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turroni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Effie Tsakalidou, E. and Kokb, J. Stress “Physiology of lactic acid bacteria”, *Microbiol Mol Biol Rev*, 80, 2016, 837–890. doi:10.1128/MMBR.00076-15.
  33. Peralta, G.H., Wolf, I.V., Perotti, M.C., Bergamini, C.V. and Hynes, E.R., “Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptococci cultures in a cheese extract”, *Dairy Sci. & Technol*, 96, 2026, 603–621. doi.10.1007/s13594-016-0291-4.
  34. Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V. and Grant, R., “Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry.”, *Journal of Chromatography. B Analytical Technologies in the Biomedical Life Science*, 785, 2003, 263-275.
  35. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
  36. Radeljević, B., Mikulec, N., Antunac, N., Prpić, Z., Maletić, M. and Havranek, J. “Influence of starter culture on total free amino acids concentration during ripening of Krk cheese”, *Mljekarstvo*, 63(1), 2013, 15-21.
  37. Rao, K.P., Chennappa, G., Suraj, U., Nagaraja, H., Raj, A.P. and Sreenivasa, M.Y., “Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from sorghum-based traditional fermented food”, *Probiotics and Antimicrobial proteins*, 7(2), 2015, 146-156. doi.10.1007/s12602-015-9186-6.
  38. Ruíz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolle, A. and Sánchez, B., “How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences”, *Genes Nutr*, 6(3), 2011, 307–318. doi: 10.1007/s12263-010-0207-5.
  39. Sasaki, M., Bosman, B.W., Tan, P.S., “Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli”, *Journal of Dairy Research*, 62, 1995, 601-610. doi.10.1017/s0022029900031332.
  40. Serna Cock, L., “Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 2006, doi.10.2225/vol9-issue1-fulltext-10.
  41. Settachaimongkon, S., Nout, R., Fernandes, E.C.A., Hettinga, K.A., Hervoort, J.M., Hooijdonk, T.C.M., Zwietering, M.H., Smid, E.J. and Valenberg, H.J.F., “Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt”, *Int. J. Food Microbiol.* 177, 2014, 29-36.

- doi.10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.008.
42. Sheeladevi, A. and Ramanathan, N., “Lactic acid production using lactic acid bacteria under optimized conditions”, *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2(6), 2011, 1686-1691.
43. Smit, G., Smit, B.A. and Engles, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 2005, 591–610.  
doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.002.
44. Stefanovic, E., Licaweley, N., Rocas, C., Rea, M.C., O’Sullivan, M., Sheeran, J.J. and McAuliffe., “Evaluation of the potential of *Lactobacillus paracasei* adjuncts for flavor compounds development and diversification in short-aged cheddar cheese”, *Front Microbiol*, 9, 2018, 1506.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.01506.
45. Toh, H., Oshima, K., Nakano, A., Takahata, M., Murakami, M. et al., “Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group”, *PLOS ONE*, 8(10), 2013, 1-11.  
doi.org/10.1371/journal.pone.0075073.
46. Tagliazucchi, D., Martini, S. and Solieri., “Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented dairy food”, *Fermentation*, 5, 2019, 96,  
doi.10.3390/fermentation5040096.
47. Trevelyan, W. E. and Harrison, J. S., “Studies on yeast metabolism. 1. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates”, *Biochemical Journal*, 50, 1952, 298-303.  
doi: 10.1042/bj0500298.
48. Yu-Ling, T., Tsu-Lung, L., Ching-Jung, C., Tsung-Ru, W., Wei-Fan, L., Chia-Chen, L. and Hsin-ChiH, L. “Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases”, *Biomed Sci*, 26:3, 2019, 2-8.  
doi.10.1186/s12929-018-0493-6.
49. Velázquez-Martínez, J.R., González-Cervantes, R.M., Hernández-Gallegos, M.A., Campos-Mendiola, R., Jiménez-Aparicio, A.R. and Arenas-Ocampo, M.L., “Prebiotic potential of *Agave angustifolia* Haw fructans with different degrees of polymerization”, *Molecules*, 19, 2014, 12660-12675.  
doi:10.3390/molecules190812660.
50. Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J. “Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use”, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 2008, 1678-1688.  
doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.008.
51. Vinderola, G., Binetti, A., Burns, P. and Reinheimer, J., “Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products”, *Front Microbiology*, 2, 2011, 70.  
doi.org/10.3389/fmicb.2011.00070.
52. Wilkins, L.J., Monja, M. and Miller, A.W., “Defning dysbiosis for a cluster of chronic diseases”, *Scientific Reports*, 9, 2019, 12918.  
doi.org/10.1038/s41598-019-49452-y.
53. Williams, A.G., Withers, S.E., Brenchany, E.Y. and Banks, J.M.,

- “Glutamate dehydrogenase activity in lactobacilli and the use of glutamate dehydrogenase-producing adjunct *Lactobacillus* spp. cultures in the manufacture of cheddar cheese”, *Journal of Applied Microbiology*, 101, 2006, 1062–1075.  
doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03017.x.
54. Zhang, Y.C., Zhang, L.W., Du, M., Yi, H. et al., “Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food”, *Microbiological Research*, 67(1), 2011, 27-31.  
doi.10.1016/j.micres.2011.02.006.
55. Zhou, T., Hou, R., Lai-Yu, K., Li, C., Ma, Y., Mi, Z., Chen, Y., “Effects of applying *Lactobacillus helveticus* H9 as adjunct starter culture in yogurt fermentation and storage. *J. Dairy Sci.* 102, 2018, 223–235.  
doi.org/10.3168/jds.2018-14602.