



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Detección, aislamiento y resistencia térmica de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de bases para helado y superficies de contacto en su elaboración.

Trabajo escrito

Que como parte de los requisitos para
obtener el Diploma de
Especialidad en Inocuidad de Alimentos

Presenta
Berenice Solano Gallardo

Dirigido por:
Dra. Sofia María Arvizu Medrano

Querétaro, Qro. a 16 agosto 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Especialidad en Inocuidad Alimentaria

Detección, aislamiento y resistencia térmica de cepas de *Leuconostoc spp.*
aisladas de bases para helado y superficies de contacto en su elaboración.

Trabajo Escrito

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de
Especialidad en Inocuidad Alimentaria

Presenta:
Berenice Solano Gallardo

Dirigido por:
Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía M. Arvizu Medrano
Presidente
Dra. Nanci Edid Gonzáles Martínez
Secretario
M. en C. Beatriz L. Alvarez Mayorga
Vocal
Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Suplente
Dra. Dalia E. Miranda Castilleja
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Agosto 2024
México

DEDICATORIA

Este proyecto va dedicado especialmente a todas las personas que me ayudaron a seguir desarrollándome y me alentaron para el logro de este objetivo, gracias a mi familia que siempre esta presente, especialmente a mi madre, la que me ha apoyado siempre con todo su amor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Lactoproducos La Loma, por permitirme desarrollar el presente trabajo en sus instalaciones, así como el uso de la información recabada, a la Dra. Sofia por su dirección, apoyo, paciencia y guía en la elaboración de este presente trabajo, a mis sinodales por el tiempo y dedicación en la revisión de este, así como a la Universidad Autónoma de Queretaro por las facilidades prestadas en sus instalaciones y a lo largo del desarrollo de la especialidad.

DEDICATORIA DE ORIGINALIDAD

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante la ejecución de mi trabajo de tesis de manera ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en investigaciones futuras.

Este manuscrito es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

A handwritten signature in black ink, reading "Berenice Solano Gallardo". The signature is written in a cursive style with a large, stylized 'S' at the end. A horizontal line is drawn underneath the signature.

QBP. Berenice Solano Gallardo

RESUMEN

Se ha identificado la presencia de cepas de *Leuconostoc spp* en bases para helado, jarabe de tres leches y superficies de equipos de una planta productora, su presencia ha significado un problema en la elaboración de aguas frescas que emplean como materia prima las bases de helado y son adicionadas de frutas y otros ingredientes que favorecen su proliferación. El presente trabajo está enfocado en identificar y evaluar la tolerancia al calor de cepas de *Leuconostoc spp.* aisladas de bases para helado y de superficies de la línea de producción para determinar si su presencia es debido a una re-contaminación o por sobrevivencia al proceso de pasteurización. Se tomaron muestras de producto de las etapas de: pasteurización, tanques de almacenamiento y envasado de producto, se incubaron 24 h a 30 °C para evidenciar la presencia de bacterias ácido-lácticas productoras de polímeros con mayor facilidad [agar MRS+10% de sacarosa (MRSS) incubadas a 30°C/24h]. Se aislaron cepas de las placas de MRSS y se identificaron mediante pruebas fenotípicas y genotípicas. Cepas seleccionadas fueron evaluadas en su tolerancia a 57°C por 15 min. Durante el estudio se implementaron cambios en el producto y en el proceso y para evidenciar su impacto se evaluó la concentración de las BAL productoras de polímeros durante el almacenamiento de muestras en condiciones de vida acelerada.

Se identificó que la presencia de las cepas de *Leuconostoc spp.* en bases para helado se asociaba principalmente a una re-contaminación por contacto de superficies y no se demostró una prevalencia prolongada de estas en el proceso de producción. La limpieza y rediseño del proceso de envasado se asoció con una mayor vida de anaquel del producto. Las cepas aisladas de base para helado muestran mayor resistencia térmica con respecto a las cepas aisladas de jarabe 3 leches y superficies de contacto, siendo la cepa L6 la más sensible y la cepa H3.2 la más resistente.

Palabras clave: Deterioro microbiano, base para helado, *Leuconostoc*.

ABSTRACT

The presence of *Leuconostoc* spp. strains has been identified in ice cream base, milk syrup and equipment surfaces of a production plant; their presence has been a problem in the production of flavored water that use ice cream base as raw material and are added with fruits and other ingredients that favor their proliferation. The aim of this work was to identify and to evaluate the heat tolerance of *Leuconostoc* spp. strains isolated from ice cream base and surfaces of the production line to determine if their presence is due to re-contamination or survival of the pasteurization process. Product samples were taken from the pasteurization step, storage tanks and product packaging stage, and incubated for 24 h at 30 °C to evidence the presence of polymer-producing lactic acid bacteria more easily [MRS+10% sucrose agar (MRSS) incubated at 30°C/24h]. Strains were isolated from MRSS plates and identified by phenotypic and genotypic tests. Selected strains were evaluated for their tolerance at 57°C for 15 min. During the study, product and process changes were implemented and to show their impact, the concentration of polymer-producing LAB was evaluated during sample storage under accelerated life conditions. It was identified that the presence of *Leuconostoc* spp. strains in ice cream bases was mainly associated with surface contact recontamination and did not show a prolonged prevalence of these strains in the production process. Deep cleaning and redesign of the packaging process was associated with increased product shelf life. Strains isolated from ice cream base showed higher thermal resistance with respect to strains isolated from milk syrup and contact surfaces, with strain L6 being the most sensitive and strain H3.2 the most resistant.

Key words: Microbial spoilage, Ice cream base, *Leuconostoc*.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Leuconostoc.....	2
2.2 Bases para helado	2
2.3 Deterioro de bases para helado	3
2.4 Estrategias de control para el deterioro de bases para helado.	5
3. OBJETIVO:.....	6
3.1 Objetivo General	6
3.2 Objetivos específicos.....	6
4. METODOLOGIA.....	6
4.1 Obtención de muestras de superficies, producto en proceso y terminado.	6
4.2 Recuento de BAL productoras de dextranos de superficies y producto en línea.	7
4.3 Vida de anaquel acelerada de producto antes y después de la modificación en el sistema de envasado, extensión de tratamiento térmico e incremento de conservadores en base para helados.....	7
4.4 Identificación y caracterización genética de cepas <i>Leuconostoc</i> spp aisladas de superficies de contacto y producto.....	8
4.4.1 Identificación fenotípica de <i>Leuconostoc</i> spp.....	8
4.4.2 Activación de las cepas de <i>Leuconostoc</i> spp.....	8
4.4.3 Extracción de ADN.	9
4.4.4 Identificación de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. a nivel género.	9
4.5 Tolerancia térmica de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp.	11
4.6 Análisis estadístico.	12
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
5.2 Evaluación de vida de anaquel de producto terminado con rompimiento y conservación de condiciones ideales después de la aplicación de medidas de control y las modificaciones de la etapa de envasado.....	16

5.3 Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. aisladas de base para helado y superficies.....	21
5.4 Tolerancia térmica de cepas aisladas e identificadas de <i>Leuconostoc</i> spp.....	24
6. CONCLUSIONES.....	26
7. REFERENCIAS	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Motivos principales de quejas en el 2023 en bases para helado (Elaboración propia).....	4
Figura 2. Colonias típicas de BAL productoras de dextrano en medio MRSS.	13
Figura 3. Porcentaje de muestras con conteo de BAL productoras de polímeros en diferentes etapas del proceso.	13
Figura 4. A- Placa Petri con colonias BAL productoras de dextrano en medio MRSS, tomadas de sistema de envasado, B- Piezas de sistema de envasado compuesto de sistemas de mangueras y pistones.	14
Figura 5. Porcentaje de muestras con presencia de BAL productoras de polímeros en diferentes etapas de proceso, antes y después de modificación de la etapa de envasado.	15
Figura 6. Curvas de crecimiento de BAL productoras de dextranos bajo diferentes temperaturas de preparación y pasteurización (Línea punteada. - refrigeración, Línea continua. - estrés térmico).....	17
Figura 7. Curvas de crecimiento de BAL productoras de dextranos con diferentes procesos de pasteurización (Línea punteada. - refrigeración, Línea continua. - estrés térmico).....	18
Figura 8. Curvas de crecimiento de BAL productoras de dextranos con incremento de conservadores (Línea punteada. - refrigeración, Línea continua. - estrés térmico).....	19
Figura 9. Curva de vida de anaquel de base para helado en refrigeración; línea verde: lote elaborado posterior a cambio de etapa de envasado, línea roja: Lote elaborado previo a cambio de etapa de envasado.....	20
Figura 10. Curva de vida de anaquel de base para helado en condiciones aceleradas; línea verde. - lote elaborado posterior a cambio de etapa de envasado, línea roja. - lote elaborado previo a cambio de etapa de envasado.	20
Figura 11. Clústeres formados por cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. con base en el perfil de RAPD. C) Cepas provenientes de superficies de contacto con el alimento, H) Cepas aisladas de base para helado, L) cepas aisladas de jarabe de tres leches en 2021.....	23
Figura 12. Curva de muerte térmica de las diferentes cepas de superficies, base para helado y jarabe de 3 leches.....	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores específicos para <i>Leuconostoc</i> spp.	10
Tabla 2. Condiciones de amplificación para <i>Leuconostoc</i> spp.	11
Tabla 3. Identificación genética de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. aisladas de superficies de contacto y producto terminado.....	22

1. INTRODUCCIÓN

Las bases para helado son elaboradas con leche, sueros de leche y azúcares, adicionadas de gomas y estabilizantes. Las comercializadas en el territorio mexicano son utilizadas tradicionalmente para la elaboración de paletas y helados; dando una ventaja en este oficio, el paletero tradicional la ha adaptado para la elaboración de agua fresca con la finalidad de proporcionar cuerpo y cremosidad.

Durante la producción de la base para helado, esta se somete a pasteurización y durante el almacenamiento y la distribución se mantiene a temperaturas de refrigeración (0 a 5 °C) para conservar sus características microbiológicas y organolépticas. Sin embargo, durante el año 2023 el indicador de quejas por aguas filantes con mal sabor y grumos se incrementó en la empresa productora líder en mercado.

Estas quejas de mercado han representado un impacto económico importante en la organización otorgando indemnizaciones. Se han identificado altas concentraciones de *Leuconostoc* spp en producto deteriorado.

Se han implementado diferentes acciones: ajuste en la proporción de conservadores y modificación de tiempo de sostenimiento para someter al microorganismo a un tratamiento térmico más severo, sin embargo, se han detectado células sobrevivientes de *Leuconostoc* spp. y los estudios internos de monitoreo han identificado su presencia en superficies posterior al proceso de pasteurización.

En este trabajo se plantea detectar y aislar cepas de *Leuconostoc* de producto terminado y superficies de contacto y evaluar su tolerancia al calor.

2. ANTECEDENTES

2.1 Leuconostoc

El género *Leuconostoc* pertenece al grupo de las bacterias lácticas (BAL) son heterofermentativas y utilizan lactosa y citrato para producir ácido láctico y CO₂. Los miembros del Género *Leuconostoc* son cocos Gram positivos, catalasa negativos, anaerobios facultativos, dispuestos en pares o cadenas (Garvie *et al.*, 1986). *Leuconostoc* spp. se consideran organismos que generalmente se encuentran distribuidos en el ambiente, en alimentos refrigerados y en la leche cruda y confieren junto con otras BAL características especiales a los quesos elaborados con leche cruda (Cicotello *et al.*, 2018). *Leuconostoc* muestra propiedades tecnológicas valiosas como la síntesis de dextranos a partir de sacarosa o alfa glucoligosacaridos de maltosa o isomaltosa, que tiene uso como espesantes o texturizante para leches cultivadas o estabilizantes para helados (Sanchez *et al.*, 2005),

Este género de bacterias se considera no patógenas para los humanos, solo se consideran como patógenos oportunista de personas susceptibles con problemas de salud y ninguno de estos aislamientos se ha relacionado con productos alimenticios (Ogier *et al.*, 2008).

2.2 Bases para helado

El helado ha sido popular durante las temporadas más cálidas debido a sus propiedades refrescantes. Los helados y los postres helados son populares en todo el mundo, aunque el helado es un postre helado popular en todas partes del mundo, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Canadá, Australia, Bélgica, Finlandia y Suecia son los principales países consumidores. Las bases para helado son emulsiones que están compuestas por sólidos grasos, lácteos, azúcares y estabilizantes (Kilara *et al.*, 2006). La mezcla de helado debe

contener un mínimo de 10% de grasa láctea y 20% de sólidos lácteos totales, a menudo se adicionan estabilizantes y emulsivos (Voronin *et al.*, 2021), el helado se endulza con edulcorantes seguros y adecuados y puede caracterizarse por la adición de ingredientes aromatizantes (21CFR §135.110;FDA, 2024).

Se considera que el valor y poder nutritivo de los helados abarca proteínas, las cuales son de un alto valor biológicos y con un alto contenido de aminoácidos esenciales para la vida, las vitaminas se encuentran solubles en la parte grasa y de igual manera en el agua, la energía calórica la aportan los diversos azúcares como la sacarosa, glucosa, entre otras, lo último, pero no menos importante son las sales minerales (calcio, potasio, sodio, magnesio etc.) (Bartolo, 2005), las bases para helado son un medio rico muy nutritivo, que confiere propiedades suficientes para el crecimiento de diferentes microorganismos entre ellos *Leuconostoc spp.* ocasionando deterioro en los alimentos.

2.3 Deterioro de bases para helado

El proceso que provoca la modificación de características sensoriales en un alimento se conoce como deterioro de los alimentos. El grado de deterioro de los alimentos puede determinarse por su apariencia, textura, aroma, sabor, color o el gusto. Los tipos de deterioro que pueden sufrir un alimento son: físicos, químicos y microbiológicos.

Dentro de los agentes que causan el deterioro de alimentos, los principales son de naturaleza microbiana, especialmente en los alimentos perecederos. La descomposición de los alimentos puede deberse a 2 factores principales, los extrínsecos (la humedad y la temperatura) e intrínsecos (alto contenido de agua, nutrientes, pH neutros y la presencia de microorganismos) (Amit *et al.*, 2017).

Las bases para helado son materias primas importantes en la industria en México, por su alto contenido de nutrientes permite el crecimiento de BAL, incluyendo *Leuconostoc spp.* Este género suele ser un problema por ser microorganismo deteriorador y puede causar mal sabor, filantés, grumos y producto espeso. Si los clientes no mantienen la cadena de

frio del producto propician las condiciones para la actividad del *Leuconostoc* spp (Nel *et al.*, 2020). Como podemos observar en la Figura 1, en el 2023 en el negocio de bases tenemos identificado que el mayor porcentaje de quejas es debido a temas de descomposición y deterioro, seguido de aguas filantes y producto espeso. El 77% de las quejas podrían estar generadas por el deterioro asociado a la actividad de *Leuconostoc* spp.



Figura 1. Motivos principales de quejas en el 2023 en bases para helado (Elaboración propia).

Para la compañía el impacto de mercado por estas incidencias ha representado un incremento importante de reportes de quejas con picos altos en temporada de calor (marzo a junio). Las temperaturas a las cuales el producto es expuesto cuando se presenta una ruptura de frío (por la saturación en las cámaras de refrigeración de los clientes o la falta de control en los refrigeradores) y la presencia de *Leuconostoc* spp desencadena el deterioro del producto.

2.4 Estrategias de control para el deterioro de bases para helado.

El procesamiento de alimentos tiene varios propósitos diferentes. En primer lugar, pretende aumentar la vida útil de los alimentos protegiéndolos de agentes físicos, químicos y biológicos de deterioro o inactivar los patógenos que pueden estar presentes en las materias primas y que puedan comprometer la salud del consumidor (Martínez *et al.*, 2024).

Para aumentar su vida útil y así posibilitar su transporte y almacenamiento, es necesario realizar tratamientos tecnológicos específicos que los protejan de los agentes de deterioro. El deterioro de los alimentos también se puede prevenir o retardar mediante el uso de conservantes que retrasen el crecimiento microbiano o reduzcan las reacciones de deterioro, como la oxidación de los componentes de los alimentos (Martínez *et al.*, 2021)

El tratamiento térmico es uno de los procedimientos más antiguos y eficaces utilizados para reducir la actividad de microorganismos y enzimas y prolongar la vida útil de los alimentos. Los tratamientos térmicos que se aplican a los alimentos no eliminan a todos los microorganismos se requieren otras estrategias para minimizar su alteración durante el almacenamiento (Martínez *et al.*, 2024), como puede ser la congelación o la refrigeración durante su vida de anaquel; con ello, mantener sus características organolépticas y evitar su deterioro prematuro.

Siguiendo los principios de conservación y prevención de deterioro de alimentos el proceso de elaboración de base para helado se robusteció con incremento de 10 % de conservadores en temporada alta (Abril – Junio), así como el incremento en las temperaturas de pasteurización, tiempo de sostenimiento y preparación, como medidas de control para disminuir la presencia de *Leuconostoc* spp.

3. OBJETIVO:

3.1 Objetivo General

Detectar, aislar y evaluar la resistencia térmica de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de superficies de contacto y base de helado.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar puntos de contaminación de BAL productoras de polímeros en las etapas de post-pasteurización del proceso de producción de bases para helados.
2. Evaluar vida de anaquel acelerada antes y después de la modificación en el sistema de envasado, extensión de tratamiento térmico e incremento de conservadores en base para helados.
3. Aislamiento, caracterización y tolerancia térmica de *Leuconostoc* spp. a partir de superficies de contacto y bases para helado.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtención de muestras de superficies, producto en proceso y terminado.

En la línea de producción se tomaron muestras de producto de las etapas de: pasteurización, tanques de almacenamiento y envasado de producto, se incubaron 24 h a 30 °C con la finalidad de que los organismos presentes se multiplicaran y poder identificar su presencia con mayor facilidad.

A partir de superficies de la etapa de envasado, se tomaron muestras de las superficies con esponjas e hisopos hidratados en agua peptonada, cada muestra se conservó en refrigeración en el laboratorio de microbiología hasta su siembra.

4.2 Recuento de BAL productoras de dextranos de superficies y producto en línea.

De manera aséptica, se pesó 1 g de cada muestra de producto en un tubo estéril y se añadieron 9 mL de diluyente de peptona (0.1%), la mezcla se homogenizó a velocidad media durante 30 s de manera manual. Se realizaron diluciones decimales consecutivas y se tomaron 0.5 mL de diluciones seleccionadas para ser inoculadas en placas de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) adicionado con 10 % de sacarosa (MRSS). Se utilizó la técnica de extensión en superficie y se incubaron a 30 °C ± 2 por 48 h. Se realizó el conteo de colonias típicas de *Leuconostoc* spp (Figura 2).

Los hisopos y esponjas hidratadas de las muestras de superficies antes y después de la limpieza se homogenizaron de manera manual durante 30 seg, una vez finalizada la homogenización se tomó de manera aséptica 1 mL de agua peptonada (medio de hidratación) y se inoculó de manera aséptica de manera directa en placas de agar MRS con 10 % de sacarosa utilizando la misma técnica de siembra e incubación descrita para el producto de línea.

4.3 Vida de anaquel acelerada de producto antes y después de la modificación en el sistema de envasado, extensión de tratamiento térmico e incremento de conservadores en base para helados.

Como medidas de control para erradicar la presencia de *Leuconostoc* spp se realizó: incremento de número de camas de sostenimiento (de 4 a 6), incremento de las temperaturas de pasteurización (de 87.5 a 90 °C), incremento de 10 % de conservadores y modificación de sistema de envasado.

Antes y después de la aplicación de cada una de las medidas de control se almacenó el producto (cubetas de 20 kg por triplicado) para simular las rupturas que las bases para helado llegan a tener en mercado y durante la manipulación del cliente y tener una medida

de la vida de anaquel del producto. El almacenamiento consistió en tres ciclos consecutivos que consistieron en: 8 h en cámaras de 30 °C y 16 h a 5°C hasta cumplir su vida útil de 40 días; simultáneamente se almacenó cubeta de producto en refrigeración. Cada semana se realizaron recuentos de BAL productoras de dextranos.

4.4 Identificación y caracterización genética de cepas *Leuconostoc* spp aisladas de superficies de contacto y producto.

4.4.1 Identificación fenotípica de *Leuconostoc* spp.

A partir de las placas de MRS de los recuentos de BAL productoras de polímeros se aislaron y purificaron por pases sucesivos 22 colonias. Las cepas aisladas y purificadas se identificaron mediante tinción de Gram y prueba de catalasa con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 % v/v. Fueron seleccionadas aquellas bacterias Gram positivas en forma cocoide dispuestos en pares, tripletes o tétradas y catalasa negativa. Las cepas que cumplieron con estas características se conservaron a -20 °C en caldo MRS + glicerol al 20 % v/v.

4.4.2 Activación de las cepas de *Leuconostoc* spp.

Las cepas de *Leuconostoc* spp se activaron mediante la transferencia 50 µL del cultivo en caldo MRS + glicerol al 20 % (previamente descongelado) en un tubo con 5 mL de caldo MRS, con posterior incubación a 30 °C ± 2 por 24 h. Este procedimiento se realizó 3 veces sucesivas y el último pase se dejó incubar solo 18 h; del último cultivo se transfirió 1 mL a tubo eppendorf, el cual se centrifugó a 12 000 x g/ 2 min. El botón celular fue lavado 2 veces con solución salina fisiológica (SSF: 0.85 %NaCl).

4.4.3 Extracción de ADN.

Se centrifugó 1 mL de la suspensión de cada una de las cepas previamente activadas (4.4.2) a 12 000 x g/ 2 min, la biomasa obtenida se suspendió en 300 µL de amortiguador TNES y posteriormente se realizó una lisis por calentamiento en termobloque (95 °C/ 10 min). Finalizado el calentamiento, se centrifugó a 12 000 x g/ 1 min y se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 90 µL de acetato de sodio 3 M y se incubó a -20 °C/ 10 min. Posterior a la incubación se centrifugó a 12000 x g/ 1 min y se recuperó el sobrenadante, se añadió 400 µL de isopropanol y a continuación se incubó a -20 °C/ 10 min, se centrifugó a 12 000 x g/ 5 min, eliminando el sobrenadante y suspendiendo el sedimento en 1 mL de etanol al 70 % con agitación suave, seguido de una incubación a temperatura ambiente por 5 min y posterior centrifugación (12 000 x g/ 5 min). Se eliminó el sobrenadante y se secó en termobloque 60 °C/ 30 min. El ADN obtenido se suspendió en 50 µL de agua Milli-Q y se preservó a -20 °C. El ADN de cada cepa fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm en NanoDrop para asegurar una concentración mínima de 50 ng/µL.

4.4.4 Identificación de cepas de *Leuconostoc* spp. a nivel género.

A partir del ADN extraído de las cepas identificadas fenotípicamente como *Leuconostoc* spp. se realizó una prueba de PCR usando iniciadores específicos para este género (Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores específicos para *Leuconostoc* spp.

Género	Iniciadores	Secuencia 5' a 3'	Condiciones de amplificación y tamaño de producto	Referencia
<i>Leuconostoc</i> spp.	Leuc A	CAC TTT GTC TCC GAA GAG	Desnaturalización inicial: 94 °C/ 5 min, 35 ciclos: desnaturalización 94 °C/ 30 s; alineación 56 °C/ 45 s; extensión 72 °C/ 45 s y extensión final 72 °C/ 5 min. 613 pb	(Macián et al., 2004)
	Leuc S	AAG CAG TGT TGT ATG GGA		

Después de la amplificación, el producto obtenido, se evidenció mediante una electroforésis en gel de agarosa (1%) a 100 v durante 30 min y tinción con bromuro de etidio (1 ppm) utilizando un fotodocumentador para visualizar la banda generada.4.4.5 Caracterización genotípica mediante Amplificación Polimórfica Aleatorizada de ADN (RAPD).

Las cepas aisladas e identificadas a nivel género como *Leuconostoc*, se sometieron a la técnica de RAPD, usando un cebador específico para el género *Leuconostoc* spp. y dirigido a regiones conservadas de genes que codifican la enzima dextranucrasa (Holt & Cote, 1998). Las cepas aisladas del presente trabajo se compararon con cepas aisladas en trabajos previos en la misma empresa en el 2021 (Bravo-Pantaleón, 2023).

Se utilizó la metodología empleada por Padilla-Frausto (2010), el iniciador aleatorio y las condiciones de amplificación se describen en la (Tabla 2). Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 2 %/ 100 mV/ 45 min, se revelaron con bromuro de etidio (1 ppm) utilizando un fotodocumentador para visualizar los perfiles RADP (patrones de banda) y se analizaron mediante la aplicación GelAnalyzer 19.1.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para *Leuconostoc* spp.

Iniciador	Secuencia 5' a 3'	Mezcla de reacción	Condiciones de PCR
1299	(AGCT)CC(AG)TC (CT)TG (AGCT)CC(AG)AA (AG) TA (AGCT)ACCCA	250µM de cada dNTP, 1.5 U de Taq ADN polimerasa (11 µL), 0.75µM del iniciador (1µL) y 1µL ADN molde. Vol. de reacción 13 µL.	Desnaturalización inicial: 95 °C/ 1 min, 40 ciclos: desnaturalización 94°C/ 1 min; alineación 30 °C/ 1 min; elongación 72 °C/ 5 min y extensión final 72 °C/ 10 min.

4.5 Tolerancia térmica de cepas de *Leuconostoc* spp.

Se emplearon cepas de *Leuconostoc* aisladas en el presente trabajo y algunas aisladas previamente del mismo proceso (Bravo-Pantaleón, 2023). Cada cepa se activó como se describe en el punto 4.2, para realizar la activación final se realizó la siembra de cada cepa y se sembró en 9 mL de caldo MSR, este se incubó a 30 °C por 24 h.

Se evaluó la resistencia térmica siguiendo la metodología empleada por Zacarías-Muñoz (2011) con algunas modificaciones. Para esta prueba se utilizó base para helado como matriz alimentaria, colocando 1 mL en tubos de ensayo estériles (13 x 100 mm), los cuales se inocularon por triplicado con cada una de las cepas a evaluar en una concentración de 6 a 7 log UFC/mL. Los tubos de ensayo fueron puestos en baño María a 57 °C por 15 min y cada 5 min los tubos correspondientes fueron retirados del baño María y colocado en un baño de hielo para la posterior cuantificación de las poblaciones sobrevivientes realizando diluciones seriadas como se describe en (4.2). La cuantificación se realizó por extensión en superficie en agar MRS con incubación a 30°C/48 h.

4.6 Análisis estadístico.

Se realizaron curvas de muerte térmica de cada cepa. Para identificar diferencias en la tolerancia al calor de las cepas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey. Los análisis se realizaron en el programa estadístico R Studio versión 4.2.1 (Posit, 2023).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Proceso, identificación de puntos de contaminación de BAL productoras de polímero en las etapas de post-pasteurización del proceso de producción de bases para helados.

Dentro de los muestreos realizados en las diferentes etapas de proceso en octubre 2023, se observó que al monitorear muestras de producto recién elaboradas no se logra detectar la presencia de *Leuconostoc* spp, sin embargo, en las pruebas de vida de anaquel aceleradas al que se somete el producto se identifica de manera temprana su presencia.

La línea donde se elabora la base para helado se segmenta en 3 etapas globales de proceso: pasteurización, almacenamiento y envasado de producto (cubeta PT), las muestras se incubaron 24 h previo a la siembra a 30 °C, con esta acción se pudo detectar con mayor facilidad la presencia y concentración de las BAL productoras de polímeros (ver figura 2) por etapa de proceso. En la Figura 3 podemos observar el porcentaje de muestras en donde se detectaron las BAL productoras de polímeros, así como la concentración alcanzada después de la incubación a 30 °C por 24 h.

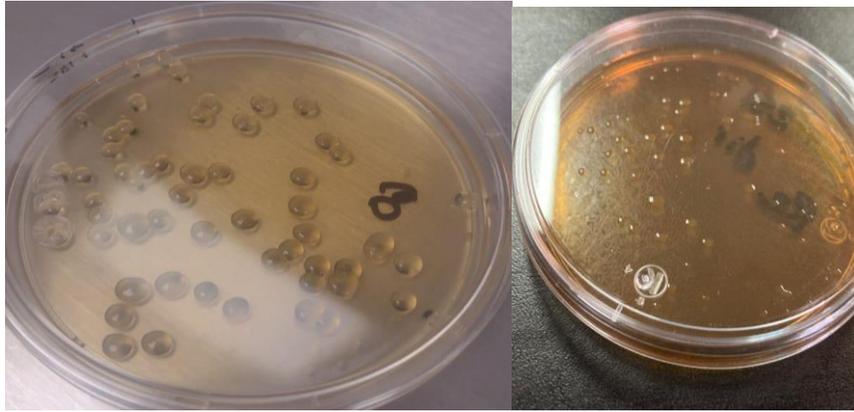


Figura 2. Colonias típicas de BAL productoras de dextrano en medio MRSS.

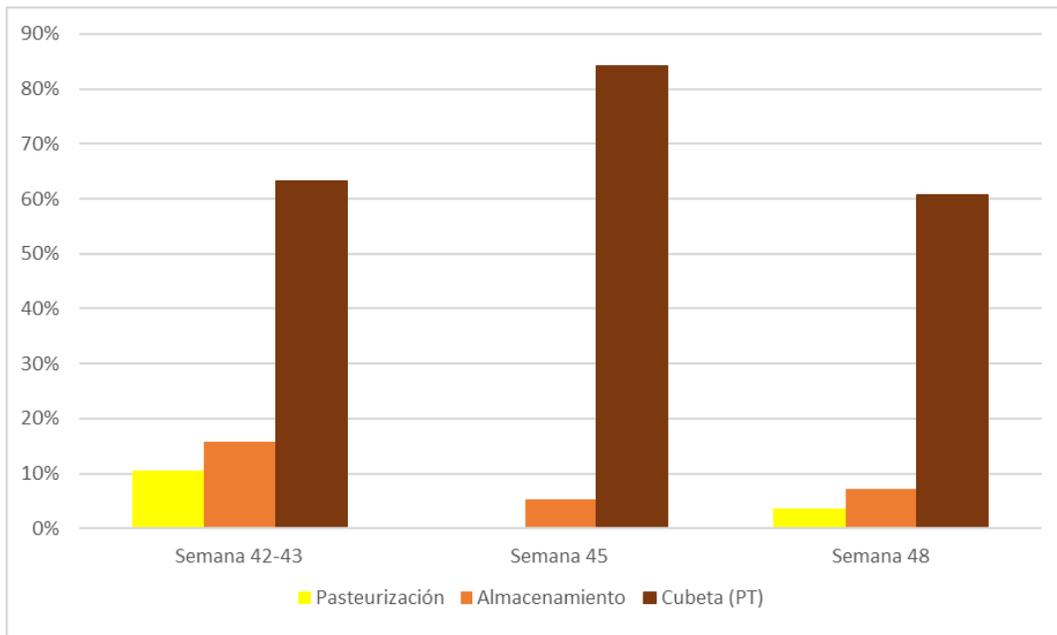


Figura 3. Porcentaje de muestras con conteo de BAL productoras de polímeros en diferentes etapas del proceso.

Con estos resultados obtenidos a lo largo de 4 semanas de seguimiento de todos los lotes producidos podemos visualizar que el porcentaje de resultados positivos en la etapa de pasteurización es mayor o igual a 10 %, en la etapa de almacenamiento el porcentaje

parece incrementar a un 15 % en semana 42 a 43, en datos de semana 45 y 48 el porcentaje se mantiene por debajo de 10 %, sin embargo en la etapa de envasado del producto terminado en cubetas el porcentaje incrementa de manera significativa alcanzando valores de entre 60 a 80 % de muestras con presencia de BAL productoras de polímeros, la concentración alcanzada va de 3.2 a 4.3 Log UFC/ml.

Los valores obtenidos nos indican que existe una re-contaminación en la etapa de envasado. Con esta información se enfocó el muestreo de superficies entre estas etapas, se desmontó el sistema de envasado actual Figura 4, donde se encontró presencia de cepas de BAL generadoras de dextrano en los pistones de envasado y mangueras, las cuales tenían irregularidades que permitían la acumulación de materia orgánica y de estas bacterias.



A



B

Figura 4. A- Placa Petri con colonias BAL productoras de dextrano en medio MRSS, tomadas de sistema de envasado, B- Piezas de sistema de envasado compuesto de sistemas de mangueras y pistones.

Una vez identificado el punto de re-contaminación, se procedió a realizar el cambio a la tubería sanitaria para sustituir el diseño de mangueras y dosificadores que conforman el

proceso de envasado. Se realizó la cuantificación de BAL productoras de polímeros en de las muestras de etapas de los puntos de proceso descritos con anterioridad (pasteurización, almacenamiento y envasado), se monitoreo durante 5 semanas, en la Figura 5 podemos observar los datos previos al cambio y los posteriores a este (semana 1 a la 5 del 2024).

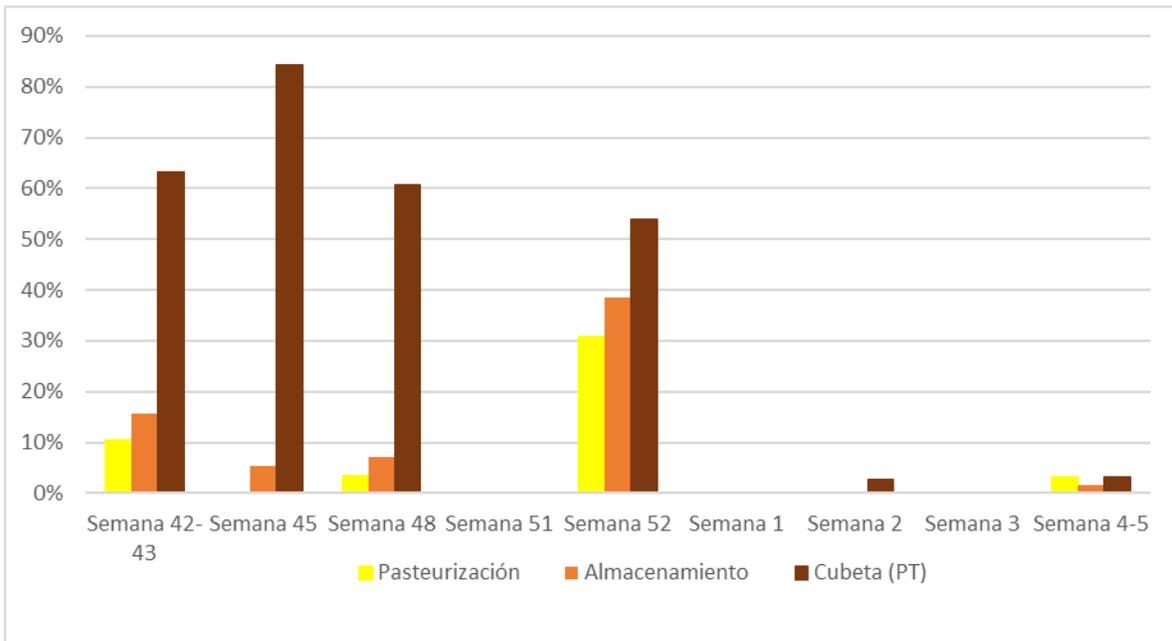


Figura 5. Porcentaje de muestras con presencia de BAL productoras de polímeros en diferentes etapas de proceso, antes y después de modificación de la etapa de envasado.

El porcentaje de positivos en la etapa de envasado sufre un descenso importante teniendo 0 % en semana 1 y 3, en semana 2, 4 y 5 los niveles en porcentaje son menores a 5 % con concentraciones de máximo 2 Log UFC/ml, reduciendo de manera significativa la presencia de BAL productoras de polímeros.

En un trabajo previo se identificaron como *Leuconostoc* el 95.8% de las colonias que mostraron producción de polímeros en el medio MRSS a partir de muestras de bases para helado y jarabe de leche producido en la misma empresa (BravoPantaleón, 2023). Por ello este grupo microbiano se empleó como indicador a lo largo de la identificación de los puntos de contaminación y del estudio de la vida de anaquel del producto. A partir de las placas de BAL productoras de polímeros se aislaron cepas que posteriormente se identificaron mediante pruebas fenotípicas y genéticas.

5.2 Evaluación de vida de anaquel de producto terminado con rompimiento y conservación de condiciones ideales después de la aplicación de medidas de control y las modificaciones de la etapa de envasado.

La primera etapa en la producción del alimento es la preparación (mezcla de aditivos y materias primas para formar emulsión), esta se efectuó en dos condiciones 75 y 85 °C. La temperatura de 75 °C se mantiene en la preparación para lograr temperaturas de pasteurización de 87.5 °C; mientras que la temperatura de 85 °C se seleccionó para que la temperatura de pasteurización se lograra de manera más pronta y el intercambio de calor hacia la muestra fuera más efectivo para la eliminación en condiciones de pasteurización de 90 °C. Para incrementar el tiempo de sostenimiento y tener mayor letalidad sobre *Leuconostoc* se incrementó el número de camas del tubo de sostenimiento (holding), de 4 camas a 5 y posteriormente a 6 en donde se combinaron en cada cama las condiciones de preparación y pasteurización anteriormente descritas (75 & 87.5 °C y 85 & 90°C).

Podemos observar en la Figura 6, 7 y 8 que compara estas 3 condiciones preparación, temperatura de pasteurización y tiempo de sostenimiento, no representó reducción de las poblaciones a niveles esperados, teniendo variabilidad en las lecturas a los 7 días de la muestra en estrés térmico alcanzando de 3.5 a 6.5 log UFC/g, de manera indistinta y en refrigeración donde a los 14 días se observan de 2 a 5 logaritmos, sin mostrar cambios representativos con respecto al estándar, por lo que se pudo predecir que la presencia de *Leuconostoc* está presente a pesar de incrementar tiempo de sostenimiento, adición de 10

% más de conservadores con un ajuste de 2.5 % de nisina (Benzoato de sodio, sorbato de potasio, propionato de sodio) y temperatura de pasteurización más elevada.

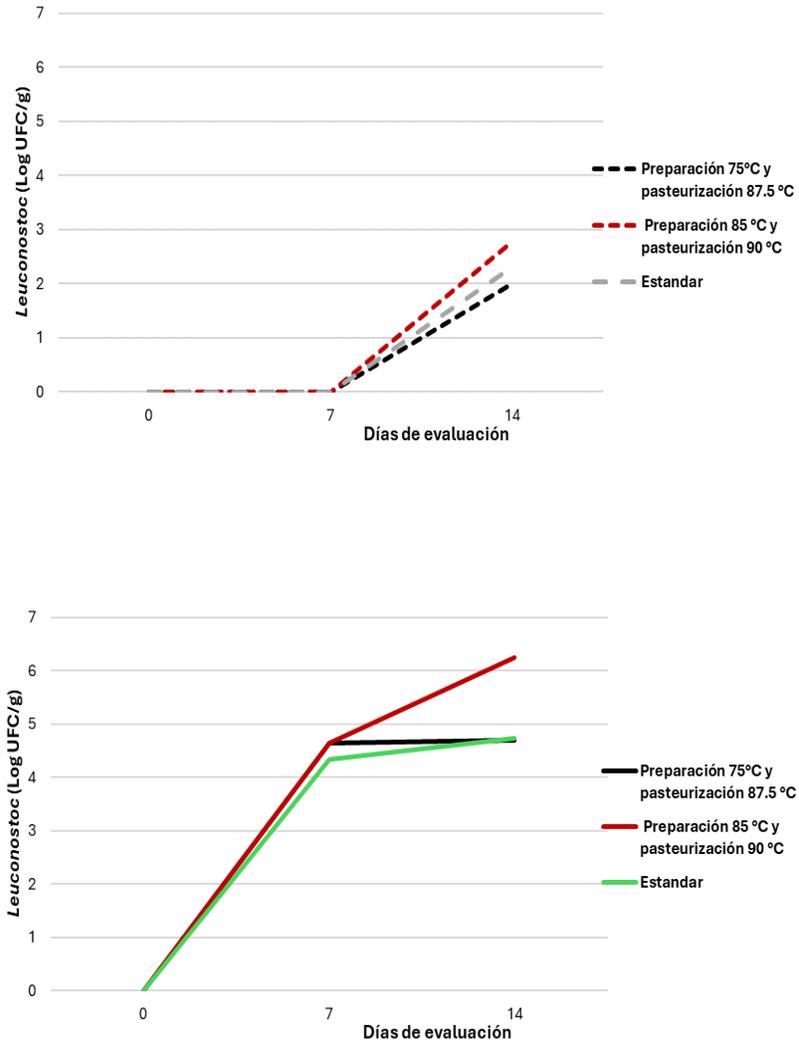


Figura 6. Curvas de crecimiento de BAL productoras de dextranos bajo diferentes temperaturas de preparación y pasteurización (Línea punteada. - refrigeración, Línea continua. - estrés térmico)

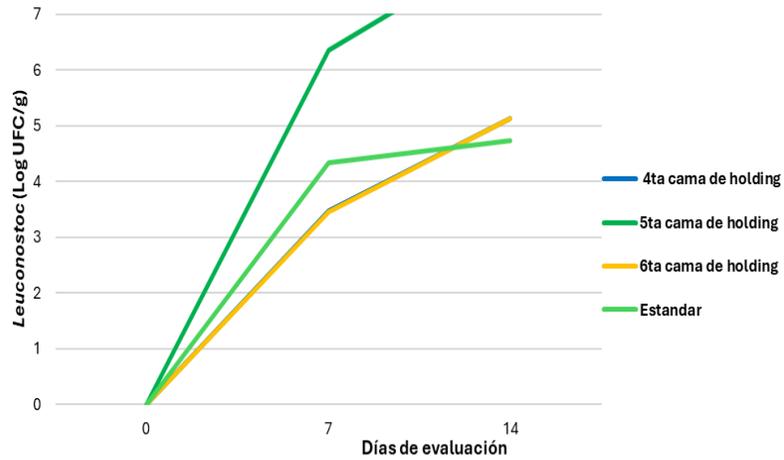
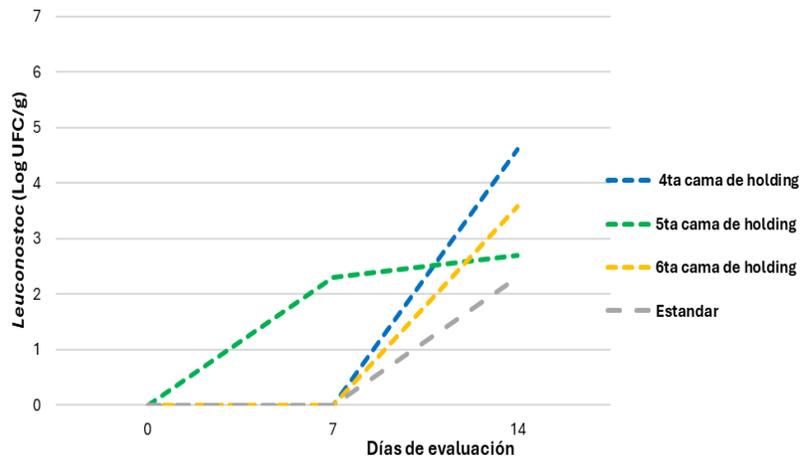


Figura 7. Curvas de crecimiento de BAL productoras de dextranos con diferentes procesos de pasteurización (Línea punteada. - refrigeración, Línea continua. - estrés térmico)

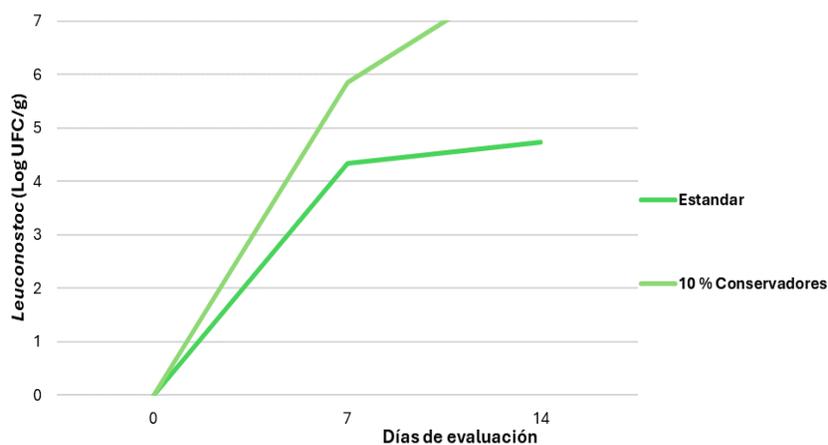
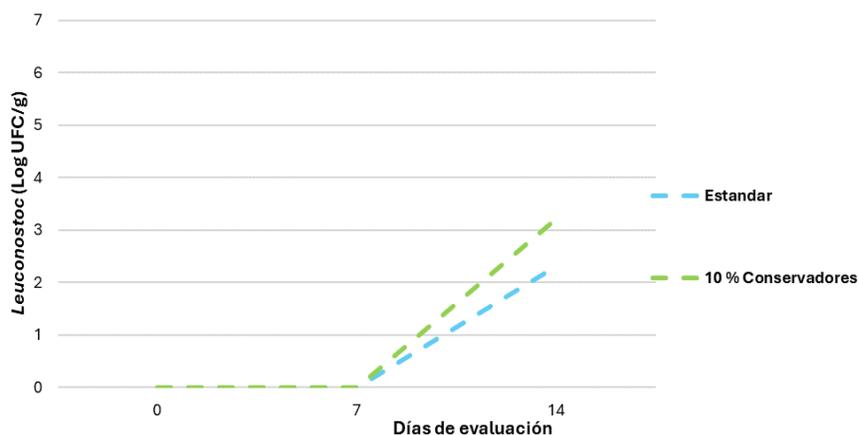


Figura 8. Curvas de crecimiento de BAL productoras de dextranos con incremento de conservadores (Línea punteada. - refrigeración, Línea continua. - estrés térmico)

Ya que se confirma después del seguimiento de 5 semanas que la reducción de *Leuconostoc* spp. es efectiva se procede a realizar los estudios de vida de anaquel de lotes

posteriores al cambio del sistema de envasado como se describe en 4.2, hasta la conclusión de su vida de anaquel de 40 días como se muestra en la Figura 9 y 10.

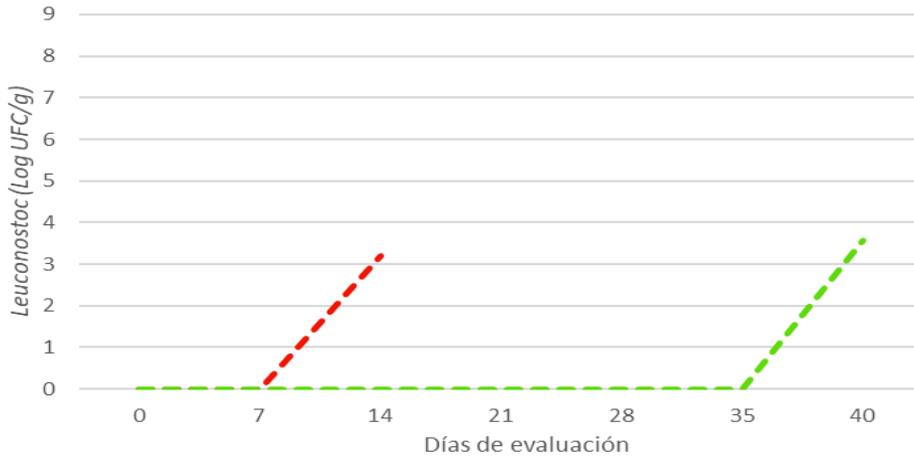


Figura 9. Curva de vida de anaquel de base para helado en refrigeración; línea verde: lote elaborado posterior a cambio de etapa de envasado, línea roja: Lote elaborado previo a cambio de etapa de envasado.

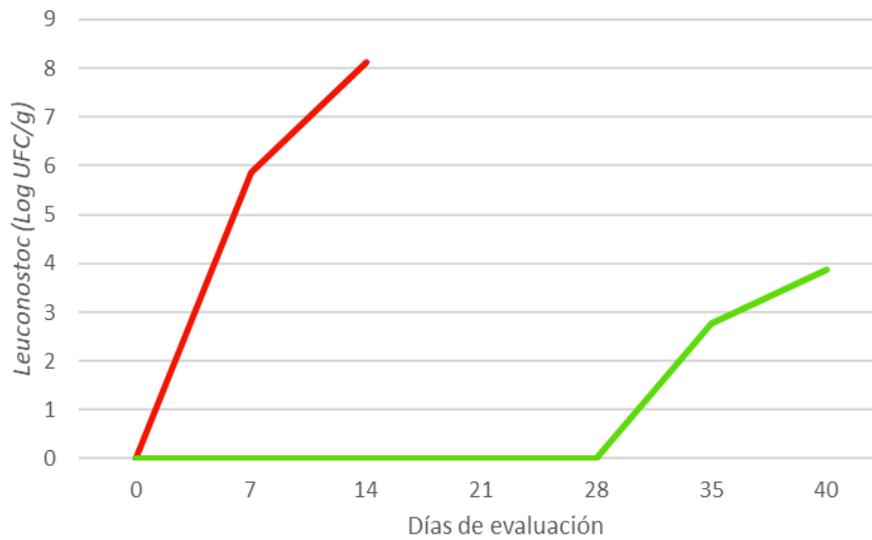


Figura 10. Curva de vida de anaquel de base para helado en condiciones aceleradas; línea verde. - lote elaborado posterior a cambio de etapa de envasado, línea roja. - lote elaborado previo a cambio de etapa de envasado.

En la Figura 10 la línea roja representa la concentración de BAL productoras de polímeros en base para helado con el sistema de envasado anterior, en las condiciones de vida de anaquel acelerada al día 7 y 14 se alcanza entre 6 y 8 log UFC/g respectivamente, en contraste con el cambio del sistema en donde *Leuconostoc* spp. se encuentra en el día 35 obteniendo 2.8 log UFC/g (ver Figura 10), de la misma forma podemos observar en la figura 9 el producto refrigerado en el sistema de envasado anterior obteníamos crecimiento de *Leuconostoc* spp al día 7 en 3 logaritmos desarrollando de manera exponencial desde el día 7, los resultados con el nuevo sistema muestran desarrollo hasta el día 40 alcanzando 3.5 logaritmos (ver Figura 9), los resultados anteriores son muy alentadores ya que la reducción de población permite que la base cumpla perfectamente con su vida de anaquel a 40 días sin presentar crecimiento crítico del microorganismo que lo degrada.

5.3 Aislamiento, identificación y caracterización de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de base para helado y superficies.

A partir de muestras de lotes de base para helado y superficie de contacto en la elaboración se aislaron en total 45 cepas, de las cuales 22 se identificaron fenotípicamente a las características típicas de *Leuconostoc* spp.: bacteria Gram +, cocoide, dispuesta en pares, tripletes y/o cadenas cortas, catalasa negativa y morfología colonial lisa, convexa, de forma redonda, color blanquecino (ver Figura 2). Once de las cepas aisladas son correspondientes a superficies en contacto con alimentos identificadas con la letra C y el resto de las, cepas fueron aisladas de muestras de bases para helado sin deterioro identificadas con letra H (Tabla 3).

La distribución y persistencia de microorganismos de descomposición mediante el uso de técnicas de genotipado permite una identificación clara de las fuentes de contaminación en el entorno de procesamiento de alimentos (Padilla, 2015).

Tabla 3. Identificación genética de cepas de *Leuconostoc* spp. aisladas de superficies de contacto y producto terminado.

Cepa	Muestra	Identificación mediante PCR
C1	Superficies de contacto	<i>Leuconostoc</i> spp.
C2		
C3		
C4		
C5		
C6		
C7		
C8		
C9		
C10		
C11		
H1.2	Producto terminado	
H2.1		
H2.2		
H3.1		
H3.2		
H4.1		
H4.2		
H5.2		
H6.2		
H7.1		
H7.2		

Con la finalidad de conocer si las 22 cepas aisladas de producto terminado, superficies aún eran las mismas que las aisladas en el año 2021 de Jarabe de tres leches y asociar las cepas aisladas de superficies y del producto terminado, se realizó una caracterización mediante la técnica de RAPD y se obtuvieron perfiles de bandas de cada una de las cepas evaluadas. Con ayuda del índice de Jaccard se obtuvo el grado de similitud entre cada uno de los perfiles y utilizando el método de Ward se realizó una agrupación jerárquica teniendo como resultado la agrupación genética mostrada en la Figura 11.

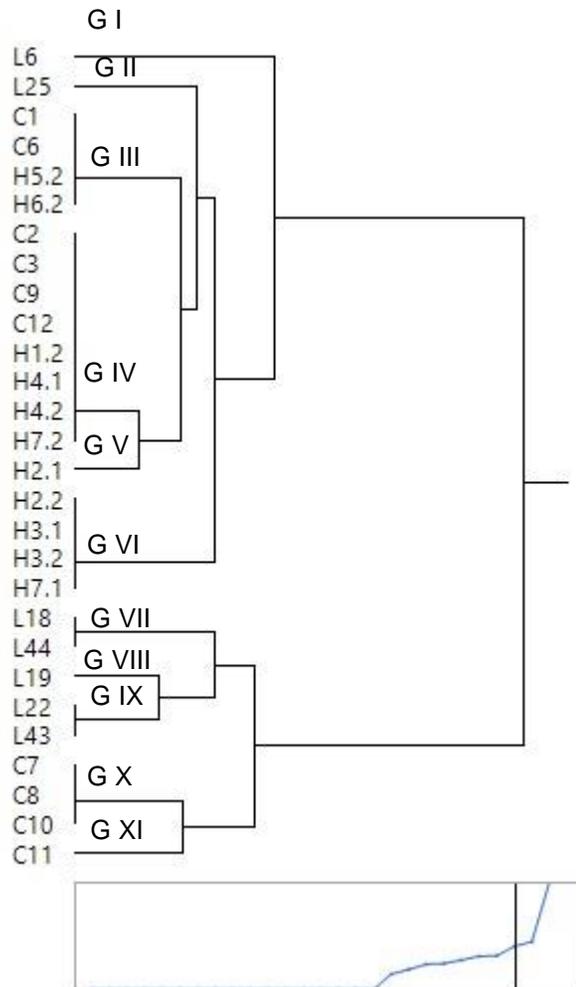


Figura 11. Clústeres formados por cepas de *Leuconostoc* spp. con base en el perfil de RAPD. C) Cepas provenientes de superficies de contacto con el alimento, H) Cepas aisladas de base para helado, L) cepas aisladas de jarabe de tres leches en 2021.

Se identificó 11 genotipos (G I a G XI), los genotipos III y IV agrupan cepas de superficies como de base para helado, las cepas C1, C2, C3, C6 y C12 son proveniente de pistones y boquillas de envasado las cuales fueron tomadas al término de la producción, la cepa C9 de este mismo grupo es una muestra tomada de el pistón posterior a la limpieza. Esto podría ser el resultado de que algunas células de *Leuconostoc* sobrevivan al proceso de limpieza y permanezcan en la superficie de los equipos, creando así una fuente o depósito microbiano que contamina los productos terminados (Padilla, 2015).

La persistencia de *Leuconostoc* puede llegar a incrementarse mediante la colonización de las superficies de los equipos. Se ha informado sobre la producción de dextrano y la formación de biopelículas para *Leuconostoc mesenteroides* en superficies inertes. Además, el entorno de procesamiento puede proporcionar disponibilidad de sustrato y condiciones de crecimiento favorables para el establecimiento de nichos ecológicos de BAL (Padilla, 2015).

No se encontró prevalencia de *Leuconostoc* ya que las boquillas y pistones de envasado son una fuente de contaminación, es por ello que se encuentran presentes en el producto terminado, provocando el deterioro de estos, motivo por el cual se agrupan en los mismos genotipos.

5.4 Tolerancia térmica de cepas aisladas e identificadas de *Leuconostoc* spp.

El tratamiento térmico ha sido una medida de control para la reducción de microorganismos en la industria láctea, con la aplicación de procesos de pasteurización se inactivan los patógenos y se disminuye la carga de los deterioradores. De acuerdo con el árbol filogenético se eligieron 3 cepas de producto terminado H5.2, H3.2, H4.1, 2 cepas de superficies C7, C9 y 2 cepas que se aislaron en el año 2021 de jarabe de 3 leches L6 y L25 para evaluar la resistencia térmica a 57 °C por 15 min.

En la curva de muerte térmica podemos observar ver Figura 12 que las cepas con mayor resistencia térmica son las aisladas de base para helado. La cepa más destacada fue H3.2 que no disminuyó su concentración viable durante al menos 10 min manteniendo su concentración, lo que nos podría indicar una adaptación a las condiciones de estrés o mayor resistencia térmica.

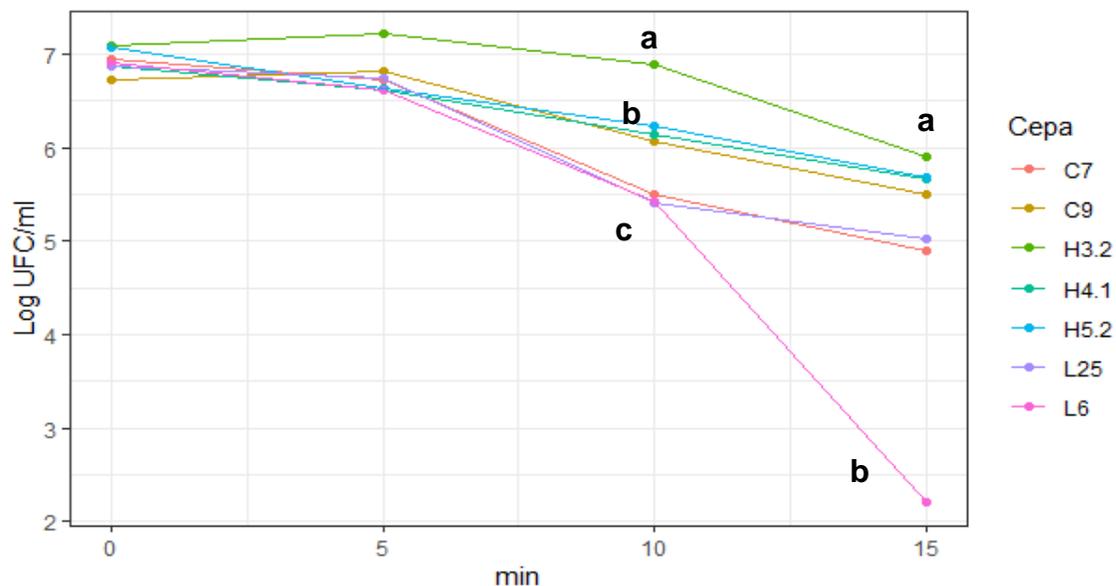


Figura 12. Curva de muerte térmica de las diferentes cepas de superficies, base para helado y jarabe de 3 leches.

En la condición de exposición de 15 min, identificamos 2 grupos importantes de cepas a y b, el grupo a esta conformado por cepas aisladas de las diferentes fuentes que tuvieron una reducción de aproximadamente 1.5 log UFC/g. Destacan 2 cepas L25 y C9, las cuales durante la exposición a los diferentes tiempos se comportaron de manera similar.

La cepa L6 en la condición de 15 min de exposición (letra b), es la cepa con mayor diferencia significativa con respecto a todas las expuestas, teniendo la menor resistencia térmica en este tiempo. Existe limitada información sobre la tolerancia térmica de *Leuconostoc*, la mayor parte de la literatura se enfoca en su conservación como un probiótico, como microorganismo iniciador y como productor de dextranos. Franz y Holy (1996) reportaron valores D para *L. mesenteroides* aislado de salchichas de menos de 1 min en medio de cultivo expuesto a 57°C. En otro estudio, se evaluó la tolerancia al calor de *L. mesenteroides* suspendido en leche en polvo baja en grasa (10%) y se registraron reducciones de cerca de un logaritmo después de aplicar 60°C por 20 min (Osorio-Rodríguez, 2017). Este reporte muestra una tolerancia térmica de las cepas similares a las observadas en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

- Para que las cepas de *Leuconostoc* spp. se puedan evidenciar en muestras de producto terminado es necesario proporcionar condiciones que permitan su desarrollo.
- La presencia de las cepas de *Leuconostoc* spp. en bases para helado se asociaba principalmente a una re-contaminación por contacto de superficies que permitían su sobrevivencia y no se demostró una prevalencia prolongada de estas en el proceso de producción.
- Es fundamental la limpieza y desinfección de las superficies posteriores al tratamiento térmico para tener un alimento inócuo y con una vida útil prolongada.
- Las cepas aisladas de base para helado muestran mayor resistencia térmica (57°C/10 min) con respecto a las cepas aisladas de jarabe 3 leches y superficies de contacto, siendo la cepa L6 la más sensible y la cepa H3.2 la más resistente.

7. REFERENCIAS

- Amit, S. K., Uddin, Md. M., Rahman, R., Islam, S. M. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & Food Security*, 6(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>.
- Bartolo, E. D. (2005). *Guía De Elaboración De Helados*. Obtenido de http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/publicaciones/elaboracion/Elaboracion_Helados.pdf.
- Bravo Pantaleon, C.L., 2023, *Caracterización y control de cepas de Leuconostoc deterioradoras de jarabe de leche y base de helados (Tesis Maestría)*, Universidad Autónoma de Queretaro, Queretaro, México.
- CFR - Código de Regulaciones Federales Título 21, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=135.110>, 22 de marzo 2024.
- Cicotello, J., Wolf, I. V., D'Angelo, L., Daniela M. Guglielmotti, Andrea Quiberoni, Viviana B. Suárez, Response of *Leuconostoc* strains against technological stress factors: Growth performance and volatile profiles, *Food Microbiology*, Volume 73, 2018, Pages 362-370, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.010>.
- Franz CM, von Holy A. Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *Int J Food Microbiol*. 1996 Feb;29(1):59-73. doi: 10.1016/0168-1605(95)00022-4. PMID: 8722187.
- Garvie, E.I. (1986) Genus *Leuconostoc*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Holt, null, & Cote, null. (1998). Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains by a modified randomly amplified polymorphic DNA protocol. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3096–3098. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.3096-3098.1998>.

- Ogier, J.-C., Casalta, E., Farrokh, C. and Saihi, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus, International Journal of Food Microbiology, Volume 126, Issue 3, 2008, Pages 286-290, ISSN 0168-1605, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.012>.
- Osorio Rodriguez, Ingrid C., "Heat, Acid and Osmotic Stress Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* as Influenced by Prior Exposure to Various Mild Stress Conditions" (2017). LSU Master's Theses. 4331.
- Kilara, A., & Chandan, R. C. (n.d.). Ice Cream and Frozen Desserts. Handbook of Food Products Manufacturing, 593–633. doi:10.1002/9780470113554.ch74
- Macián, M. C., Chenoll, E., & Aznar, R. (2004). Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR. Journal of Applied Microbiology, 97(2), 384–394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02317.x>
- Martínez S., Carballo J., editores. Propiedades fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales de los alimentos afectados por su procesamiento y almacenamiento. MDPI; Basilea, Suiza: 2021. Dec 2;10(12):2970. doi: 10.3390/foods10122970. PMID: 34945521; PMCID: PMC8701254
- Martínez S, Carballo J. Physicochemical, Sensory, and Nutritional Properties of Foods Affected by Processing and Storage Series II. Foods. 2024 Jan 2;13(1):156. doi: 10.3390/foods13010156. PMID: 38201184; PMCID: PMC10778898.
- Nel, S., Davis, S. B., Endo, A., Dicks, L. M. T. Phylogenetic analysis of *Leuconostoc* and *Lactobacillus* species isolated from sugarcane processing streams. Microbiologyopen. 2020 Aug;9(8):e1065. doi: 10.1002/mbo3.1065. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32496663; PMCID: PMC7424246.
- Padilla-Frausto, J.J., Cepeda-Marquez, L.G., Salgado, L.M., Iturriaga, M.H., Arvizu-Medrano, S.M., Detection and Genotyping of *Leuconostoc* spp. in a Sausage Processing Plant, Journal of Food Protection, Volume 78, Issue 12, 2015, Pages 2170-2176, ISSN 0362-028X, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-192>.

- Sánchez, J. I, Martínez, B., Rodríguez, A. Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int J Food Microbiol.* 2005 Dec 15;105(3):377-87. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.025. Epub 2005 Aug 8. PMID: 16085331.
- Voronin, G. L., Ning, G., Coupland, J. N., Roberts, R. and Harte, F. M. Freezing kinetics and microstructure of ice cream from high-pressure-jet processing of ice cream mix. *J Dairy Sci.* 2021 Mar;104(3):2843-2854. doi: 10.3168/jds.2020-19011. Epub 2021 Jan 16. PMID: 33461820.