

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA FERMENTACIÓN DE SUERO  
LÁCTEO Y PERMEADO DE SUERO UTILIZANDO  
*Lactiplantibacillus plantarum* INMOVILIZADO Y LIBRE”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**  
IBT. David Cruz Pérez

**Dirigido por:**  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Centro Universitario, Querétaro, Qro., México.  
Noviembre, 2025.

**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 licenciatario 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 licenciatario.

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

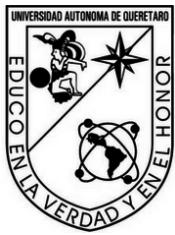
 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**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  
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA FERMENTACIÓN DE SUERO  
LÁCTEO Y PERMEADO DE SUERO UTILIZANDO  
*Lactiplantibacillus plantarum* INMOVILIZADO Y LIBRE”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Presenta:**

IBT. David Cruz Pérez

**Dirigido por:**

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Presidente

Dr. Carlos Regalado González

Secretario

Dra. Lucía Guadalupe Abadía García

Vocal

Dra. Monserrat Escamilla García

Suplente

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro., México.  
Noviembre, 2025.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), por abrirme sus puertas y ofrecerme la formación académica, los recursos y el espacio para desarrollar este trabajo. En sus aulas y laboratorios no solo adquirí conocimientos, sino también experiencias que marcaron mi formación profesional y personal.

A la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla (UNAM) y al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) , por abrirme las puertas de sus laboratorios y brindar el apoyo necesario para llevar a cabo parte del trabajo experimental. Agradezco profundamente el acceso a sus recursos y la colaboración de su personal.

A la Secretaría de Ciencia y Humanidades, Tecnología e Innovación e Innovación (SECIHTI), por el apoyo brindado a través de financiamiento que hizo posible la realización de este proyecto.

A mi comité de tesis Dra. Silvia Lorena Amaya Llano, Dr. Carlos Regalado González, Dra. Lucía Guadalupe Abadía García, Dra. Monserrat Escamilla García y Dra. Sofía María Arvizu Medrano, por todo su apoyo, tiempo, disposición y valiosas observaciones durante todo este proceso.

A la M. en C. María de Lourdes Pérez Tamayo, técnica de laboratorio, por su ayuda, paciencia y asesoría. Gracias por compartir su experiencia, por su disposición ante cada duda y por el acompañamiento.

A mis queridos amigos y compañeros de laboratorio Toño, Alexis, Andrés, David, Silvana, Lulú, Naye y Monse, por ser parte de este camino. Gracias por las risas y los momentos que hicieron que esta experiencia sea algo inolvidable. Su amistad fue parte fundamental de este logro.

A Paola, por su amor, comprensión, paciencia y apoyo constante. Por motivarme a seguir adelante y ser una fuente constante de ánimo y felicidad en todo momento. Gracias por ser mi refugio en esos momentos en los que mas necesitaba palabras de apoyo.

A mis amigos y compañeros de maestría Juan Carlos, Luis, Toño, Nicole, Pau. Por su amistad, las reuniones, risas compartidas.

A mis mejores amigos Luis Mario, David Arizmendi y Emmanuel, por estar al tanto de este proceso, por escucharme y por sus consejos.

Y finalmente a mis padres, por su amor, su constante apoyo y comprensión. Gracias por creer en mí, por acompañarme en cada etapa de este camino, por a pesar de las adversidades siempre estar ahí para mí.

## RESUMEN

El suero de leche, subproducto de la fabricación de queso, es un residuo altamente contaminante. Este subproducto, rico en nutrientes, no siempre se aprovecha en la industria quesera. Se han propuesto estrategias para utilizar sus componentes transformándolos en productos de valor agregado. El ultrasonido de alta intensidad puede mejorar la eficiencia de las reacciones y la inmovilización facilita la purificación de los productos. Por lo tanto, el presente estudio evaluó el efecto del ultrasonido en el pretratamiento de células de *Lactiplantibacillus plantarum* para la fermentación de suero lácteo y permeado de suero lácteo, el efecto del ultrasonido durante la fermentación y la inmovilización de células de *L. plantarum*. El estudio utilizó un diseño factorial con 2 factores (tiempo de tratamiento y amplitud) y 2 niveles para la producción de células en un medio de inducción sintético. Los resultados mostraron que el ultrasonido aplicado a las 12 horas de crecimiento puede modificar la viabilidad, de 8.82 log UFC/mL en el control a 8.97 log UFC/mL en el tratamiento de 20% y 5 minutos. Asimismo, la presencia de tampones como buffer de fosfatos (PBS) permitió un aumento notable en la producción de ácido láctico de 25 – 26 g/L en ausencia de PBS a 39 – 41 g/L en presencia de PBS, evidenciando el papel crucial de la capacidad amortiguadora del medio. Aunque la formación directa de tagatosa fue limitada, se observaron patrones de consumo de carbohidratos y actividad metabólica que confirman el potencial de *L. plantarum* para procesos de bioconversión. La inmovilización celular facilitó la manipulación y separación de la biomasa, ofreciendo ventajas operativas frente al uso de células libres. En conjunto, el estudio demuestra la viabilidad del uso del permeado suero lácteo como sustrato económico, así como el potencial del ultrasonido y la inmovilización celular como herramientas para mejorar procesos fermentativos.

Palabras clave: ultrasonido, suero lácteo, *L. plantarum*, galactosa

## ABSTRACT

Whey, a by-product of cheese production, is a highly polluting residue. This nutrient-rich by-product is not always utilized in the cheese industry. Strategies have been proposed to use its components by transforming them into value-added products. High-intensity ultrasound can enhance reaction efficiency, and immobilization facilitates product purification. Therefore, the present study evaluated the effect of ultrasound on the pretreatment of *Lactiplantibacillus plantarum* cells for the fermentation of whey and whey permeate, as well as the effect of ultrasound during fermentation and the immobilization of *L. plantarum* cells. The study used a factorial design with two factors (treatment time and amplitude) and two levels for cell production in a synthetic induction medium. The results showed that ultrasound applied at 12 hours of growth can modify viability, from 8.82 log CFU/mL in the control to 8.97 log CFU/mL in the treatment at 20% amplitude for 5 minutes. Likewise, the presence of buffers such as phosphate-buffered saline (PBS) led to a notable increase in lactic acid production from 25–26 g/L in the absence of PBS to 39–41 g/L in its presence highlighting the crucial role of the medium's buffering capacity. Although direct tagatose formation was limited, patterns of carbohydrate consumption and metabolic activity confirmed the potential of *L. plantarum* for bioconversion processes. Cell immobilization facilitated biomass handling and separation, offering operational advantages compared to the use of free cells. Overall, the study demonstrates the feasibility of using whey permeate as an economical substrate, as well as the potential of ultrasound and cell immobilization as tools to improve fermentative processes.

Key words: ultrasound, whey, *L. plantarum*, galactose

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



---

David Cruz Pérez

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE CUADROS .....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES .....	7
2.1    Industria láctea: queso.....	7
2.2    Prebióticos .....	9
2.3    Suero lácteo como sustrato para aditivos de valor agregado .....	10
2.4.1    Lactosa.....	12
2.4.2    Galactosa .....	13
2.4.3    Tagatosa .....	14
2.5    Lactiplantibacillus plantarum .....	18
2.5.1 <i>L. plantarum</i> en la producción de tagatosa.....	20
2.6    Inmovilización de células .....	21
2.7    Ultrasonido .....	22
2.7.1    Fermentaciones asistidas con ultrasonido .....	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	25
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1    General:.....	27
4.2    Específicos: .....	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
5.1    Materiales.....	28
5.2    Métodos .....	28
5.2.1    Efecto de la composición del medio de inducción .....	28
5.2.2    Efecto de la composición del medio sintético en el perfil de fermentación de <i>L. plantarum</i> .....	29
5.2.3    Producción de las células catalíticas de <i>L. plantarum</i> utilizando ultrasonido....	29
5.2.4    Evaluación de la viabilidad celular de <i>L. plantarum</i> .....	30
5.2.5    Fermentación del medio definido por <i>L. plantarum</i> .....	31
5.2.6    Cuantificación de carbohidratos con HPLC .....	31
5.2.7    Obtención del suero lácteo.....	32

5.2.8	Ultrafiltración .....	32
5.2.9	Hidrólisis de la lactosa .....	32
5.2.10	Inmovilización de las células.....	33
5.2.11	Fermentación del suero y permeado de suero hidrolizado con <i>L. plantarum</i> inmovilizado y libre. ....	33
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
6.2	Efecto de la composición de Manganeso, ácido bórico y PBS del medio sintético en la fermentación utilizando <i>L. plantarum</i> .....	36
6.2.1	Fermentación con células libres .....	36
6.2.2	Fermentación con células inmovilizadas.....	40
6.3	Efecto del ultrasonido de alta intensidad en el recuento de células libres .....	42
6.4	Efecto del ultrasonido de alta intensidad en la viabilidad celular de <i>L. plantarum</i> mediante microscopía confocal .....	43
6.5	Efecto del ultrasonido durante la inducción en la fermentación .....	45
6.6	Efecto del ultrasonido en la fermentación en suero lácteo y permeado utilizando <i>L. plantarum</i> libre .....	52
6.7	Efecto del ultrasonido en la fermentación en suero lácteo y permeado utilizando <i>L. plantarum</i> inmovilizado .....	57
VIII.	CONCLUSIÓN.....	64
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Volumen de la producción nacional de leche 2013 – 2022 (En millones de litros). Elaboración propia con datos del SIAP (2023) .....	8
Figura 2. Participación en la producción de queso por tipo enero-diciembre 2019. Tomada de SIAP (2020) .....	9
Figura 3. Hidrólisis de la lactosa mediada por la $\beta$ -Galactosidasa. Elaboración propia con información tomada de Guerrero y Illanes (2016) .....	12
Figura 4. Representación gráfica de la composición química del suero lácteo. Traducida de Tsermoula et al. (2021) .....	13
<i>Figura 5. Isomerización de D-Galactosa en D-Tagatosa mediada por la enzima L-arabinosa isomerasa. Elaboración propia con información de Miao et al. (2023) .....</i>	16
Figura 6. Comparación de la D-Galactosa con la L-Arabinosa. Elaboración propia con información de Miao et al. (2023) .....	17
Figura 7. Cuantificación de compuestos presentes en medio sintético fermentado durante 24 horas por <i>L. plantarum</i> libre. Los puntos representan la media $\pm$ DE .....	35
Figura 8. Cuantificación de compuestos durante la fermentación de <i>L. plantarum</i> libre y 8 tratamientos distintos de la composición del medio. Los puntos representan la media $\pm$ DE .....	38
Figura 9. Cuantificación de compuestos durante la fermentación de <i>L. plantarum</i> inmovilizado y 8 tratamientos distintos de la composición del medio sintético. Los puntos representan la media $\pm$ DE .....	41
Figura 10. Recuento de células viables de la cepa 2 con los 4 distintos tratamientos y el control .....	43
Figura 11. Micrografías confocales de <i>L. plantarum</i> expuesto a ultrasonido con 20 y 40% de amplitud por 5 y 15 minutos y posteriormente teñidas con el kit de Invitrogen™ LIVE/DEAD™ BacLight™ .....	44
Figura 12. Cuantificación de compuestos producidos por <i>L. plantarum</i> libre en medio simple con 4 pretratamientos de ultrasonido durante la inducción de las células. Los puntos representan la media $\pm$ DE .....	48
Figura 13. Cuantificación de cetosas producidas por <i>L. plantarum</i> inmovilizado en medio simple con 4 pretratamientos de ultrasonido durante la inducción de las células. Los puntos representan la media $\pm$ DE .....	50
Figura 14. Cinética de fermentación por <i>L. plantarum</i> en suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias $\pm$ DE .....	53
Figura 15. Cinética de fermentación por <i>L. plantarum</i> en permeado de suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias $\pm$ DE .....	56
Figura 16. Cinética de fermentación por <i>L. plantarum</i> inmovilizado en suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias $\pm$ DE .....	58
Figura 17. Cinética de fermentación por <i>L. plantarum</i> inmovilizado en permeado de suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias $\pm$ DE .....	62

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Propiedades físicas, químicas y biológicas de la tagatosa. Elaborada con información de Levin (2002) y Roy et al. (2018).....	17
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>L. plantarum</i> , elaborada con información de Qiao et al. (2022). .....	19
Cuadro 3. Diseño experimental de los medios de inducción evaluados. ....	28
Cuadro 4. Diseño experimental de la composición de los medios sintéticos evaluados....	29
Cuadro 5. Factores y niveles del diseño experimental de la producción de células de <i>L. plantarum</i> .....	30

## I. INTRODUCCIÓN

El suero de leche es un subproducto de la industria láctea que se produce en grandes volúmenes, generando alrededor de 95 millones de toneladas anuales. A pesar de su alto valor nutricional, gran parte del suero se desecha, contribuyendo a la contaminación ambiental debido a su alta carga orgánica (Panghal et al., 2018; Tsermoula et al., 2021).

En línea con el desarrollo sostenible y la economía circular, ha habido un creciente interés en revalorizar los recursos obtenidos en diversos procesos alimentarios. Se han utilizado diversas tecnologías para convertir este subproducto en una fuente de componentes valiosos como lactosa, galactosa, lactulosa, entre otros (Buchanan et al., 2023; Soumati et al., 2023; Andiç & Oğuz, 2022).

La inmovilización de células es una técnica que consiste en fijar células en una matriz polimérica que impide su liberación, pero que es lo suficientemente permeable para permitir la difusión de sustratos y productos. Esta técnica ofrece varias ventajas clave. Permite la reutilización de bacterias, lo que puede reducir costos y aumentar la eficiencia del proceso. Además, facilita la purificación del producto, ya que las células inmovilizadas pueden separarse fácilmente del medio de reacción. Esto puede simplificar el proceso de purificación y reducir su costo. Finalmente, la inmovilización puede aumentar la resistencia de las células a cambios en el pH, la temperatura y la presencia de solventes en el medio, lo que puede permitir su uso en condiciones más desafiantes. Estas ventajas hacen de la inmovilización una herramienta valiosa en muchos procesos biotecnológicos (Lapponi et al., 2022; Venugopal et al., 2022).

Por su parte el ultrasonido, que se refiere a las ondas sonoras con una frecuencia superior al límite de audición humana (más de 20 kHz), es una tecnología emergente con un gran potencial para transformar la industria alimentaria. Esta tecnología puede generar cavitación, un fenómeno físico que produce efectos notables en el medio de reacción y en las enzimas, lo que resulta en un aumento de la transferencia de masa del exterior al interior de la célula (Zhou et al., 2021).

Sin embargo, la implementación de la fermentación asistida por ultrasonido presenta desafíos tecnológicos. Es esencial la optimización de los parámetros del ultrasonido, como la frecuencia, la potencia y el tiempo de tratamiento, para maximizar los beneficios sin causar daño a las células microbianas. Además, la producción a escala industrial requiere de equipos especializados y de consideraciones de seguridad para garantizar la consistencia y la calidad del producto.

A pesar de estos desafíos, estudios recientes han documentado el considerable potencial de esta tecnología para transformar la industria alimentaria (Umego et al., 2021; Pawar & Rathod, 2020). Por lo tanto, el ultrasonido representa una oportunidad para mejorar la eficiencia y la sostenibilidad de los procesos de fermentación en la industria alimentaria.

Este proyecto buscó aprovechar el suero de leche, un sustrato barato y abundante, para la producción de tagatosa, mejorando las reacciones de isomerización con herramientas como el ultrasonido y la inmovilización de células.

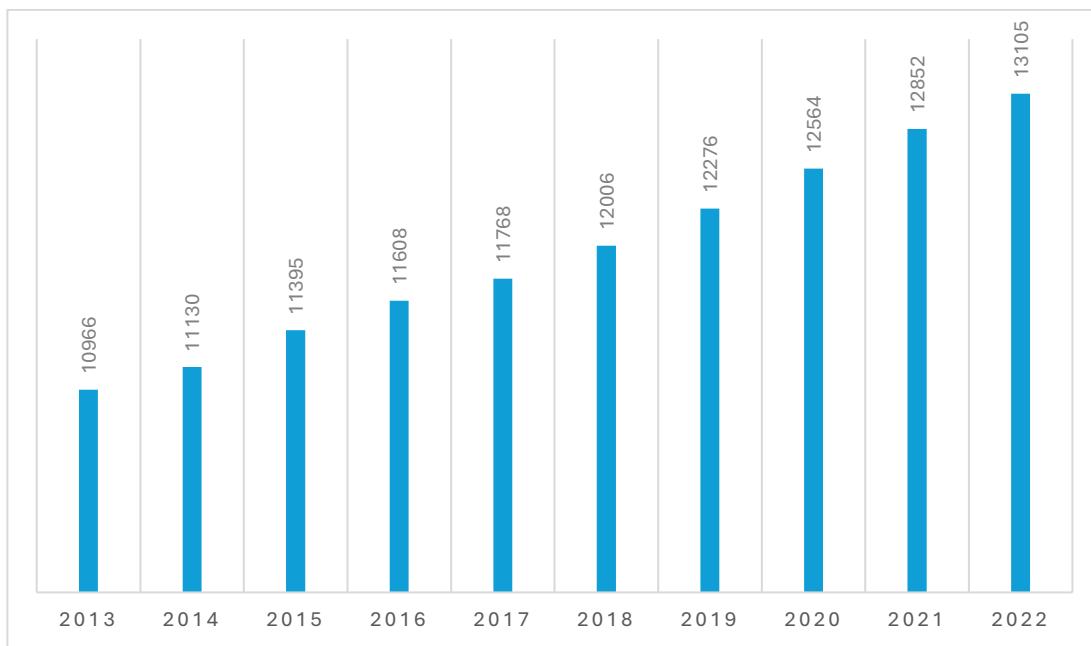
## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Industria láctea: queso

En el período comprendido entre 2013 y 2022, la industria láctea a nivel mundial experimentó un aumento del 1.3 %, alcanzando una producción total mundial de 950 millones de toneladas de leche. En México, la producción reportada en 2024 es de 13.60 millones de toneladas (en la Figura 1 se muestra la producción nacional de leche del periodo 2013 – 2023). El consumo *per cápita* de leche y productos lácteos es de 118 L a nivel mundial y de 110 L en México (FAO, 2023; SIAP, 2024).

La leche y los productos lácteos para los humanos aportan nutrientes vitales para su desarrollo; entre ellos contribuye a satisfacer necesidades de Calcio, Magnesio, Selenio, vitamina B<sub>12</sub> y B<sub>5</sub> (Bylund, 1995). Dentro de los productos lácteos en México el yogur posee el primer lugar con una producción de 1.2 millones de toneladas en 2019, el segundo lugar de derivados lácteos lo tiene el queso con una producción de 477 mil toneladas en 2019. Las tres principales variedades de quesos son el fresco con 89 mil toneladas, el doble crema con 72 mil toneladas y el amarillo con 52 mil toneladas. En la Figura 2 se detallan los porcentajes de producción de las principales variedades de queso (SIAP, 2020).

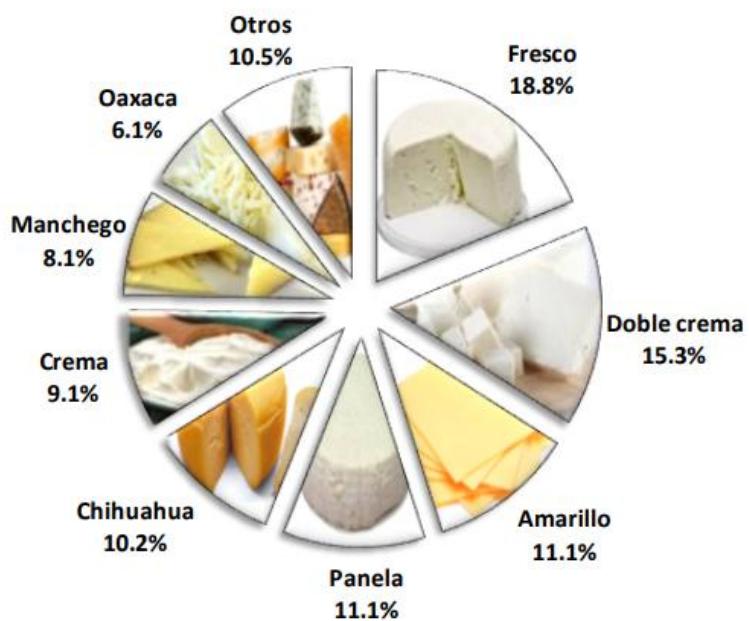
El queso de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010 es un producto elaborado a partir de cuajada estandarizada y pasteurizada de leche de vaca u de otras especies animales, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, bacterias lácticas, enzimas adecuadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento adicional mediante calentamiento, secado, prensado, con o sin adición de cultivos maduradores, mohos especiales, sales fundantes entre otros aditivos opcionales para producir diferentes tipos de queso que pueden ser: frescos, curados o procesados (Secretaría de Salud, 2010).



*Figura 1. Volumen de la producción nacional de leche 2013 – 2022 (En millones de litros). Elaboración propia con datos del SIAP (2023).*

La leche contiene en su mayoría agua (87 % en promedio), se conoce que del 100 % de leche que se procesa, solo un 10 – 15 % se convierte en queso. El resto, es decir, un 85 – 90 % se convierte en suero lácteo.

Lo que significa una producción anual de aproximadamente 2.5 millones de toneladas de suero lácteo producido en 2019 sólo en México, mientras que en el mundo en 2019 se produjeron aproximadamente 23 millones de toneladas de queso, lo que significa una producción mundial de aproximadamente 93 millones de toneladas de suero lácteo. Esto no incluye el suero proveniente de la producción de mantequilla y yogurt griego, del total de suero producido menos de un 50 % es utilizado o procesado (Tsermoula et al., 2021; OECD, 2019; Panghal et al., 2018). Sin embargo, los datos sobre el paradero del suero producido en México y en el mundo son demasiado ambiguos, es por esta razón que en materia de legislación y reglamentos actuales y futuros relacionados al procesamiento de suero se centran en la valorización y en última instancia su eliminación adecuada (Buchanan et al., 2023).



*Figura 2. Participación en la producción de queso por tipo enero-diciembre 2019. Tomada de SIAP (2020).*

## 2.2 Prebióticos

El concepto “prebiótico” fue introducido en el año 1995, la definición dada en ese momento fue: “un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al consumidor, debido a que estimula el crecimiento selectivo y/o la actividad de determinadas bacterias del colon, mejorando la salud del consumidor” (como ejemplo la inulina, oligosacáridos como los galactooligosacáridos, disacáridos como la lactulosa y monosacáridos como la tagatosa) (Gibson & Roberfroid, 1995; Erkmen & Bozoğlu, 2016).

La ISAPP (Asociación Científica Internacional para probióticos y prebióticos por sus siglas en inglés), ha propuesto una definición consenso de prebiótico debido a la crítica de algunas definiciones propuestas desde el nacimiento del concepto. La definición que propone la ISAPP de un prebiótico es: “un sustrato que es utilizado selectivamente por microorganismos del huésped y que confiere un beneficio para la salud”. Esta nueva definición no limita los prebióticos a carbohidratos y tampoco se limita al tracto gastrointestinal (Gibson et al., 2017).

De acuerdo con Erkmen y Bozoğlu (2016) las características de los prebióticos son: hidrólisis y absorción limitada en el tracto gastrointestinal; estimulación selectiva del crecimiento de bacterias benéficas en el tracto intestinal; disminución del pH; potencial para inhibir patógenos y limitar sus características de virulencia; estimular la inmunidad de las mucosas; reducir el riesgo de cáncer de colon y reducir los triglicéridos en sangre, así como mejorar la absorción de minerales (Calcio, Magnesio, Hierro y Zinc).

Por otra parte, Roy y Dhaneshwar (2023) describen los múltiples mecanismos de acción de los prebióticos en la enfermedad intestinal inflamatoria. Los mecanismos descritos son: proliferación selectiva de bacterias nativas de la microbiota intestinal e inhibición del crecimiento de patógenos y aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el acetato, butirato y propionato, los AGCC aceleran el proceso de regeneración y cicatrización de las células epiteliales intestinales, estimulan la producción de mucosa, regulan el pH intestinal, mejoran el metabolismo, modulan el sistema inmunológico y promueven acciones antiinflamatorias. Sin embargo, estos beneficios no son un resultado directo del consumo de la ingesta de prebióticos, sino de la estimulación del crecimiento de los microorganismos probióticos.

### **2.3 Suero lácteo como sustrato para aditivos de valor agregado**

El suero lácteo es un líquido obtenido de la coagulación de la caseína de la leche, por la adición de enzimas coagulantes de origen animal, vegetal o microbiano, o mediante la adición de ácidos de grado alimenticio, o mediante la coagulación por punto isoeléctrico de la caseína; es un desecho derivado de la transformación de la leche en queso (Secretaría de Salud, 2010).

La composición del suero lácteo es 95 % agua, 3.5 % de lactosa, 1 % de minerales y 0.5 % de proteína, además esté presenta una DBO 40 - 60 g/L, esto lo convierte en uno de los desechos más contaminantes de la industria láctea si no es tratado o aprovechado (Rocha & Guerra, 2020; Zandona et al., 2021).

Existen dos tipos principales de suero de acuerdo con el método utilizado para el proceso de coagulación de la leche, estos son: el suero dulce y el suero ácido. El primero es el más común y es producido al coagular la leche con renina y sin adición de algún agente acidificante. Este suero presenta un pH mayor a 5.6, contiene 46 – 52 g/L de lactosa, 6 – 10 g/L de proteína y 2.5 – 4.7 g/L de cenizas. Por otra parte, el suero ácido es el resultado de la producción de quesos con cultivos lácticos acidificantes o aquellos quesos con coagulación inducida por ácidos. Presenta un pH menor a 5.6, contiene 44 – 46 g/L de lactosa, 6 – 8 g/L de proteína y 4.3 – 7.2 g/L de cenizas (Soumati et al., 2023; Buchanan et al., 2023).

La historia del uso del suero lácteo se remonta al siglo VII a.C., para la producción de quesos de suero como el ricota, mientras que en el siglo V a.C., el médico griego Hipócrates recetaba suero lácteo para los trastornos digestivos y mejorar el sistema inmunológico. Es así como por miles de años el suero se consideraba principalmente un desecho de la industria láctea que se vertía en ríos y mares; parte se utilizaba solo como alimento para animales o fertilizante. Solo una pequeña porción se convertía en quesos de suero o se utilizaba en la medicina y cosmética, pues en la década de 1970 se utilizaba en baños por sus beneficios antiinflamatorios y nutritivos a la piel (Bintsis & Papademas, 2023; Panghal et al., 2018).

La eutrofización de los cuerpos de agua, así como la erosión del suelo son los problemas medioambientales que desencadena la incorporación del suero lácteo en efluentes de agua y su uso como fertilizante, respectivamente. Adicionalmente se ha registrado un aumento en la producción de suero lácteo; es por esto que el interés por reutilizar (revalorizar) y tratar este desecho ha aumentado (Buchanan et al., 2023; Zandona et al., 2021).

Hoy en día, el suero se considera como un subproducto con diversas aplicaciones potenciales, Tsermoula et al. (2021) hace una recopilación de algunos procesos que pueden realizarse al suero lácteo para convertirlo en productos con mayor valor agregado. Estos procesos incluyen: la concentración, para la obtención de suero en polvo; la cristalización, para obtención de suero reducido en lactosa; la desmineralización, para la obtención de suero desmineralizado; y la ultrafiltración,

para la obtención de lactosa y proteína en el permeado y el concentrado, respectivamente. Asimismo, se hace mención del rápido crecimiento, en los últimos 70 años, de las tecnologías de aprovechamiento del suero lácteo y, por lo tanto, también el crecimiento del mercado de los productos de valor agregado obtenidos de estas tecnologías, llegando a tener en 2019 un valor de mercado de 53, 800 millones de dólares.

#### 2.4.1 Lactosa

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche por esto es la principal fuente de energía 4 kcal/g. En la naturaleza solo se puede encontrar en la leche y su contenido es inversamente proporcional a la proteína y grasa y varía dependiendo de la especie de mamífero. Es un disacárido conformado de glucosa y galactosa unidos por un enlace glicosídico  $\beta$  (1->4), es un azúcar reductor y al ser hidrolizado por efecto de la  $\beta$  -Galactosidasa (lactasa) produce los monómeros de D-glucosa y D-galactosa (Figura 3) (Dominici et al., 2022; Andiç & Oğuz, 2022).

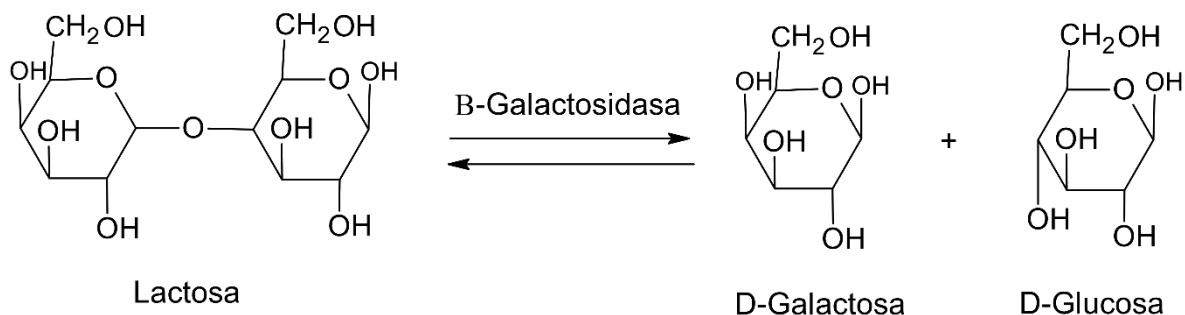
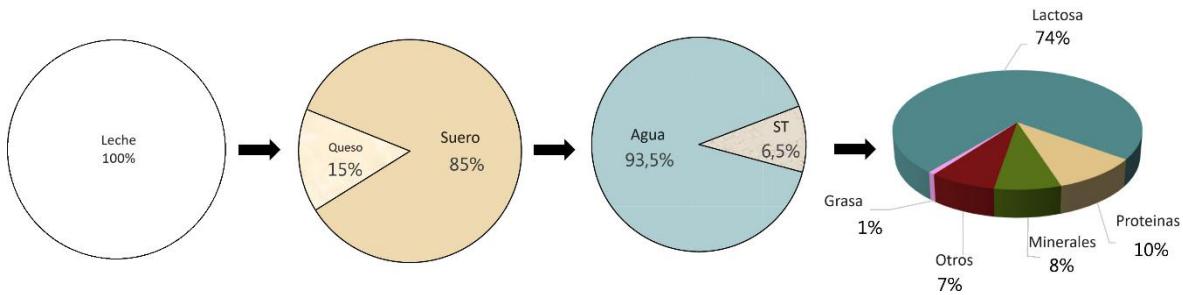


Figura 3. Hidrólisis de la lactosa mediada por la  $\beta$ -Galactosidasa. Elaboración propia con información tomada de Guerrero y Illanes (2016).

Durante la producción de queso el 90 % del contenido de lactosa de la leche se va al suero (Figura 4). Es por esto que se ha utilizado para producir compuestos de valor agregado como: galactooligosacáridos, lactulosa, lactosacarosa, ácido

poliláctico y ácido láctico, epilactosa, ácido lactobiónico y lactitol, así como para producir bioetanol, aprovechando este compuesto que se encuentra en gran proporción en este subproducto agroindustrial (Andiç & Oğuz, 2022; Misselwitz et al., 2019; Xiao et al., 2019).

Algunos de los compuestos obtenidos a partir de la lactosa se ha reportado su efecto prebiótico como en el caso de los galactooligosacáridos, lactulosa, lactosacarosa, lactitol, ácido lactobiónico, epilactosa y tagatosa (Guerrero & Illanes, 2016; Zhang et al., 2020).



*Figura 4. Representación gráfica de la composición química del suero lácteo. Traducida de Tsermoula et al. (2021).*

#### 2.4.2 Galactosa

La galactosa es un azúcar reductor, específicamente una aldohexosa (monosacárido de seis carbonos con un grupo aldehído), que se encuentra

frecuentemente asociada con la glucosa en el disacárido de lactosa que se encuentra en la leche, pero no es su única fuente en la naturaleza, pues esta se puede encontrar en gran cantidad en macroalgas y plantas (Santos et al., 2012)

Este carbohidrato es un importante metabolito celular y es uno de los más abundantes en la dieta de los humanos, puede encontrarse en la dieta diaria principalmente en la leche en forma de lactosa y en menores cantidades en cereales, frutas, vegetales y miel. La galactosa es un carbohidrato interesante para aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas, debido a su estructura y solubilidad, entre otras cualidades (Conte et al., 2021).

De acuerdo con Chen et al. (2021) en el área biotecnológica la galactosa es útil como materia prima para producir biocombustibles o edulcorantes bajos en calorías como el galactitol y la tagatosa. Nguyen et al. (2016) evaluaron levaduras adaptadas a la galactosa para la producción de bioetanol a partir de biomasa de algas, la máxima concentración de etanol que obtuvieron fue de 15.8 g/L utilizando *Saccharomyces cerevisiae*.

Jagtap et al. (2019) exploraron la producción de galactitol a partir de galactosa con la levadura *Rhodosporidium tuloroides*, obteniendo una concentración máxima de  $8.4 \pm 0.8$  g/L partiendo de 40 g/L de galactosa. Patel et al. (2016) investigaron la producción de tagatosa a partir de galactosa usando fosfoglucosa isomerasa de *Pseudomonas aeruginosa*, obtuvieron las condiciones óptimas de temperatura (60 °C) y pH 7 para la máxima actividad de isomerización de esta enzima y una máxima producción de 567.57 μM de tagatosa partiendo de 1000 mM de galactosa después de 180 min.

### 2.4.3 Tagatosa

La D-Tagatosa es una cetohexosa natural, “clasificada como azúcar raro” debido a que se encuentra en pocas proporciones en la naturaleza. Es un isómero de la D-galactosa y se encuentra naturalmente en algunos alimentos, como: leche en polvo, chocolates con leche, algunos quesos y yogures entre otros. Dentro de sus características fisicoquímicas (en el Cuadro 1 se detallan las propiedades de la tagatosa) destaca que es un azúcar reductor y por lo tanto puede propiciar la reacción de Maillard, su temperatura de fusión es de 134 °C, es estable en pH 2 – 7 y su solubilidad es 58 % (p/p) (Oh, 2007).

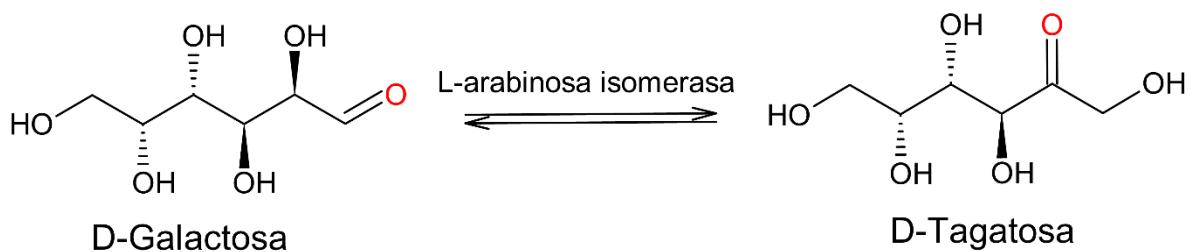
Este “azúcar raro” ha tenido diferentes aplicaciones a nivel farmacéutico y alimentario. Específicamente en el área de los alimentos se considera un azúcar funcional debido a sus propiedades similares a la sacarosa (azúcar de mesa), como

la textura, dulzor relativo (92 %), perfil de dulzor, pardeamiento por reacción de Maillard, su valor calórico (1.5 kcal/g). Presenta la particularidad de que su metabolismo no es completo pues se absorbe aproximadamente sólo 20 - 25 % y el porcentaje restante se fermenta en el colon (Levin, 2002). Además, la FDA lo ha categorizado en la lista de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS por sus siglas en inglés) y su uso en productos alimenticios es aceptado en varios países, incluyendo la Unión Europea, Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Corea del Sur (Roy et al., 2018). Sin embargo, en México debido al desconocimiento de este novedoso azúcar funcional las regulaciones son nulas, pues no Figura en ninguna Norma Oficial Mexicana. Su uso en productos va desde: galletas, pasteles, cereales, bebidas dietéticas o sin azúcar, helados, dulces, chicles sin azúcar, chocolates y otros productos (Oh, 2007).

De acuerdo con Miao et al. (2023) se han evaluado algunos beneficios de la tagatosa como lo son: pérdida de peso en personas con diabetes tipo 2, control glicémico, factor de regulación sanguínea, anti-caries, anti-envejecimiento y propiedades prebióticas. Por ejemplo, Son et al. (2019) evaluaron el efecto prebiótico de la tagatosa en conjunto con el probiótico *Lactobacillus rhamnosus GG* (*LGG*), en un modelo murino de colitis inducida con sulfato de sodio dextrano (DSS). A los ratones se les dieron dosis de tagatosa (25 mg) en conjunto con el probiótico *LGG* ( $10^9$  UFC/mL) cada dos días por 3 semanas y observaron una recuperación en la microbiota intestinal, pues se aumentaron los niveles de bacterias benéficas como *Bacteroides* y *Lactobacilli*. Por otra parte, observaron la disminución de expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , lo que sugiere una disminución de la respuesta de inflamación.

La tagatosa es un edulcorante emergente bajo en calorías con potencial para sustituir a la sacarosa, pues proporciona propiedades tecnológicas y funcionales a los productos que la contienen, no afecta su sabor, textura, disminuye las calorías. En pocas palabras puede beneficiar a la salud sin cambiar el sabor del producto. Sin embargo, debido a la baja presencia de este azúcar raro en la naturaleza su

extracción directa a gran escala es prácticamente imposible, por lo cual los métodos para su producción incluyen métodos químicos y biológicos, siendo los métodos químicos poco viables debido a su bajo rendimiento y/o impactos al medio ambiente. Los métodos biológicos son más utilizados debido a su bajo impacto al medio ambiente, genera pocos subproductos y su purificación es fácil. Para el caso del método químico se parte de D-galactosa como sustrato, mientras que para los métodos biológicos se puede partir de D-fructosa o D-galactosa dependiendo de la o las enzimas que se utilicen para la conversión (Miao et al., 2023).



*Figura 5.* Isomerización de D-Galactosa en D-Tagatosa mediada por la enzima L-arabinosa isomerasa. Elaboración propia con información de Miao et al. (2023).

Dentro de la producción a partir de galactosa destaca la producción con la enzima L-arabinosa isomerasa (Figura 5) la cual es específica para L-arabinosa, sin embargo, presenta actividad también por la D-galactosa debido a la similitud entre estas, ya que solo difieren en la falta de un carbono en la cadena, como se muestra en la Figura 6. Las desventajas de este método de producción son una baja especificidad hacia la galactosa y requerimiento de iones (manganese y calcio), sin embargo, las ventajas son que se pueden utilizar fuentes de sustrato económicas como el suero lácteo rico en lactosa y algunas algas, esto le convierte en una buena

opción de investigación y desarrollo para la producción de tagatosa a bajos costos (Salonen et al., 2012).

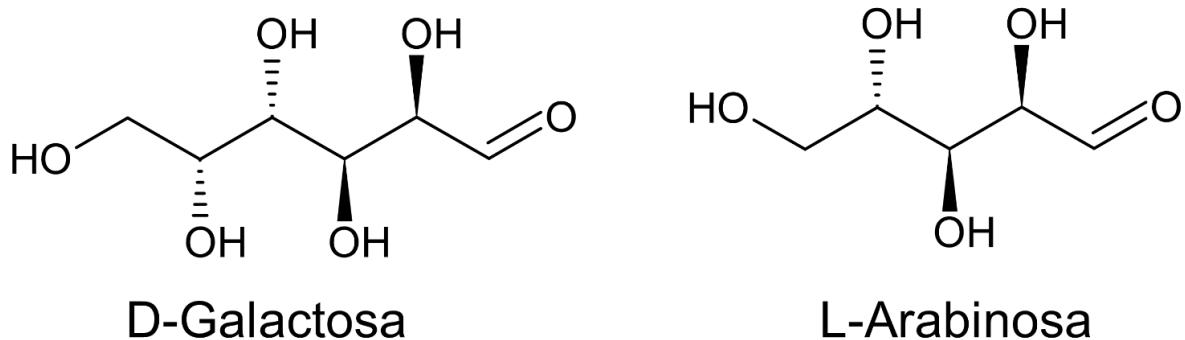


Figura 6. Comparación de la D-Galactosa con la L-Arabinosa. Elaboración propia con información de Miao et al. (2023).

Se han reportado varios microorganismos con la capacidad de producir L-arabinosa isomerasa, no obstante, las bacterias ácido lácticas (BAL) se han reconocido como una fuente de la L-arabinosa isomerasa segura debido a su reputación como microorganismos GRAS. Algunas bacterias de este grupo capaces de producir la L-arabinosa isomerasa son: *L. gayonii*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. bif fermentans*, *L. reuteri*, *L. sakei* y aunque no es BAL el *Bifidobacterium longum* (Patra et al., 2009; Guerrero & Illanes, 2016).

Cuadro 1. Propiedades físicas, químicas y biológicas de la tagatosa. Elaborada con información de Levin (2002) y Roy et al. (2018).

Propiedad	Valor / Comentario
Nombre común	D-Tagatosa, Tagatosa
Sinónimos	1, D-tagatopiranosa, D-Lio-hexulosa, D-tagatopiranósido
Fórmula molecular	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Familia química	Carbohidrato; monosacárido, cetohexosa
Categoría	Azúcar raro

<i>Peso molecular</i>	180.16
<i>Forma física</i>	Sólido cristalino anhídrico blanco
<i>Temperatura de fusión</i>	134 °C
<i>Solubilidad en agua</i>	160g/100mL a 20 °C
<i>Rango de estabilidad de pH</i>	2 – 7
<i>Dulzor relativo</i>	92 %
<i>Perfil de dulzor</i>	Emula la sacarosa, pero con un inicio más rápido como la fructosa
<i>Efecto refrescante</i>	Ninguno
<i>Valor calórico</i>	1.5 kcal/g
<i>Cariogenicidad</i>	Ninguno
<i>Potenciador del sabor</i>	Sinergia con edulcorantes de alta intensidad
<i>Beneficios a la salud</i>	Bajo en calorías, prebiótico, bajo índice glucémico, apto para diabéticos.
<i>Metabolismo</i>	Absorción ~25 % efecto laxante en altas dosis
<i>Reacciones de Maillard</i>	Marrón como la sacarosa
<i>Estado regulatorio</i>	Generalmente reconocido como seguro (GRAS)

## 2.5 *Lactiplantibacillus plantarum*

*L. plantarum* es una bacteria Gram-positiva, perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas (en el Cuadro 2 se detalla su clasificación taxonómica). Esta bacteria tiene forma de bastón, sus dimensiones aproximadas son 0.9 - 1.2  $\mu\text{m}$  de longitud, se agrupa en cadenas cortas. Debido a su metabolismo se clasifica como

heterofermentativa y anaerobia facultativa, pues metaboliza las hexosas en ácido láctico y las pentosas en ácido láctico y ácido acético (heterofermentación).

Se le considera ubicua, pues se ha encontrado en plantas, insectos, carne, vino, tracto gastrointestinal y fluidos animales incluyendo a los humanos, además de ser a menudo la especie dominante en chucrut, encurtidos, masa madre, las aceitunas y el kimchi. (Liu et al., 2018; Todorov & De Melo Franco, 2010).

Dentro de los lactobacilos esta bacteria es una de las especies más estudiada y utilizada en la industria de alimentos como probiótico o como iniciador. La FDA incluye a esta bacteria en la lista de microorganismos GRAS y la EFSA (European Food Safety Authority) la considera con estado de presunción de seguridad (QPS). La mayoría de los estudios respaldan la inocuidad de *L. plantarum*. Existen pequeñas excepciones como Cannon et al. (2005) que reportan infecciones en humanos en las que se implica *L. plantarum* y otras especies de lactobacilos, sin embargo, esto debe ser acatado a pacientes inmunocomprometidos pues son susceptibles a infecciones oportunistas (Seddik et al., 2017).

*Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *L. plantarum*, elaborada con información de Qiao et al. (2022).*

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Lactobacillaceae
Género	<i>Lactiplantibacillus</i>
Especie	<i>L. plantarum</i>

Se ha secuenciado el genoma de varias cepas como *L. plantarum* WCFS1, *L. plantarum* ST-III, *L. plantarum* P-8, *L. plantarum* JDM1, ATCC 14917 entre otras.

Los datos de secuenciación han revelado que esta bacteria es auxótrofa para varios aminoácidos y vitaminas. Además, se conoce que en promedio el tamaño del genoma de esta especie es de 3.2 millones de bases, y puede no tener plásmidos o hasta un máximo de 3 plásmidos como es el caso de la cepa WCFS1. Además, se ha reportado que esta bacteria presenta casetes relacionados al metabolismo de carbohidratos y éstos pueden ser modificados de acuerdo con las necesidades de la producción, esto hace que se considere a *L. plantarum* como buen candidato para ingeniería metabólica (Siezen & Van Hylckama Vlieg, 2011; Behera et al., 2018).

### **2.5.1 *L. plantarum* en la producción de tagatosa**

Se ha reportado la producción de ácido láctico a partir de L-arabinosa en algunas cepas de *L. plantarum*, para esta metabolización se requiere de la ruta de las pentosas fosfato, ya que produce D-Ribulosa-5P a partir de la L-arabinosa (Todorov & De Melo Franco, 2010). Gracias a esta información se puede prever que *L. plantarum* presente el operón ara (L-arabinosa) y dentro de este operón se encuentra el gen araA responsable de la expresión de la L-arabinosa isomerasa (NCBI, 2023).

Jayamuthunagai et al. (2017) reportaron la producción de D-tagatosa utilizando permeado de suero con células de *L. plantarum* permeabilizadas e inmovilizadas, obtuvieron un porcentaje de isomerización máxima de 33 % y 38 % con células no tratadas y con células permeabilizadas respectivamente. Las condiciones de la fermentación fueron 37 °C con pH 7 y una concentración inicial de Mn<sup>+2</sup> de 5 mM (cofactor de L-isomerasa) incubado por 48 horas y se sugiere el uso de borato para cambiar el equilibrio de reacción y así poder obtener rendimientos más altos; considerando que la comercialización de D-tagatosa exige altos rendimientos para reducir sus costos y poder dar abasto a la demanda.

Por otra parte, Sun et al. (2020) optimizaron las condiciones de fermentación para la producción de L-arabinosa isomerasa de *L. plantarum* WU14, reportaron que la mejor relación de volumen células, D-galactosa y borato fue 5:1:2 respectivamente,

además reportaron una concentración final máxima de 58 g/L de tagatosa con las relaciones anteriormente mencionadas, tras 24 horas a 37 ° C y pH 6.5.

## 2.6 Inmovilización de células

La inmovilización de microorganismos ha sido usada desde los finales de los años 60, y esta consiste en fijar células en una matriz polimérica que no permite su liberación, pero es suficientemente permeable por lo que permite la difusión de sustratos y productos. Además, esta técnica permite la reutilización de bacterias, el aumento de resistencia a cambios de pH, temperatura y/o solventes en el medio y una fácil recuperación de las células para disminuir tiempos y costos de la purificación de productos. Estas ventajas han propiciado su uso en procesos biotecnológicos de distintas áreas como la industria alimentaria, la farmacéutica, biorremediación, biosensores y síntesis de productos de valor agregado (Lapponi et al., 2022; Venugopal et al., 2022).

Las matrices más utilizadas para la inmovilización en la industria de alimentos son el quitosano, ácido hialurónico, quitina, celulosa, agarosa y alginato. La selección de la matriz a utilizar en la inmovilización es de gran importancia para que la técnica de inmovilización sea efectiva. Sin embargo, el alginato es definitivamente el polímero más utilizado en dicha técnica debido a sus costo, biocompatibilidad, biodegradabilidad y facilidad de manipulación (Sánchez et al., 2013).

Una desventaja de esta matriz es su baja resistencia mecánica debido su alta capacidad de unión al agua, para reducir dicho problema se ha mejorado la matriz al combinar el alginato con alcohol polivinílico el cual disminuye la capacidad de unión al agua del alginato (Radosavljević et al. (2019).

Algunos factores importantes para lograr máximos beneficios son el tamaño de las esferas, el tamaño de poro de estas, la capacidad retención de las células, entre otros. Lee et al. (2020) analizaron el efecto del tamaño de las esferas en la inmovilización de *Chlorella vulgaris* y *Chamydomonas reinhardtii* para el tratamiento

de aguas residuales, obtuvieron que el mejor diámetro de perlas para la reducción de materia orgánica fue de 3.5 mm para ambas especies.

## 2.7 Ultrasonido

El concepto de “ultrasonido” se refiere a las ondas sonoras cuya frecuencia supera el límite de audición humana, es decir, más de 20 kHz. Estas ondas, al propagarse a través de un medio, generan compresiones y descompresiones en las partículas del medio, lo que resulta en una gran cantidad de energía debido a la turbulencia y al incremento en la transferencia de masa. En la industria alimentaria, el ultrasonido se clasifica en dos categorías según su intensidad y frecuencia: ultrasonido de baja y alta intensidad (Zhou et al., 2021).

Las ondas ultrasónicas de baja intensidad y alta frecuencia son las que tienen una frecuencia superior a 100 kHz y una intensidad inferior a 1 W/cm<sup>2</sup>. Se utilizan principalmente para el análisis no destructivo y el control de calidad de los alimentos durante su procesamiento y almacenamiento, así como para regular la calidad de las frutas y verduras en las operaciones antes y después de la cosecha.

Por otro lado, las ondas ultrasónicas de alta intensidad y baja frecuencia tienen efectos significativos sobre las propiedades físicas, bioquímicas y mecánicas de los alimentos. Estas ondas tienen una frecuencia entre 20 y 100 kHz y una intensidad en el rango de 10 a 1000 W/cm<sup>2</sup>. Se utilizan para emulsionar, desespumar, regular microestructuras y modificar la textura de productos grasos, la cristalización y las propiedades funcionales de las proteínas. Además, se aplican en diversas operaciones unitarias como la congelación, el secado, el ablandamiento y la concentración.

La cavitación acústica es un efecto característico del ultrasonido de alta intensidad, se produce por la formación, crecimiento y colapso de grandes burbujas que liberan una gran cantidad de energía (Zhang et al., 2023; Bhargava et al., 2021).

### 2.7.1 Fermentaciones asistidas con ultrasonido

Las fermentaciones son procesos biológicos utilizados para la producción de moléculas y alimentos con características y sabores específicos, mediante el uso de bacterias, hongos o levaduras. Sin embargo, el crecimiento de estos organismos, que es fundamental para las fermentaciones, está limitado por las tasas de transferencia de masa. Se han explorado diversas estrategias para aumentar estas tasas, como el uso de microorganismos genéticamente modificados (OGM) y la implementación de procesos de fermentación en lote continuo o alimentado. Recientemente, la aplicación de ultrasonido de baja frecuencia ha surgido como una alternativa prometedora para acelerar el crecimiento de los microorganismos, ya que puede aumentar la tasa de transferencia de masa y la permeabilidad de la pared celular. Este fenómeno puede atribuirse a varios factores, como la cavitación acústica, la formación de radicales libres, las intensas microturbulencias que homogenizan el medio y la formación de poros en la membrana.

No obstante, la implementación de la fermentación asistida por ultrasonido presenta desafíos tecnológicos. La optimización de los parámetros del ultrasonido, como la frecuencia, la potencia y el tiempo de tratamiento, es esencial para maximizar los beneficios sin causar daño a las células microbianas. Además, la producción a escala industrial requiere de equipos especializados y de consideraciones de seguridad para garantizar la consistencia y la calidad del producto. A pesar de estos desafíos, el potencial de esta tecnología para transformar la industria alimentaria es considerable, como se ha documentado en algunos estudios (Umego et al., 2021; Pawar & Rathod, 2020).

Shokri et al. (2021) utilizaron ultrasonido para asistir la fermentación de *L. brevis* y estudiar los cambios en el metabolismo, así como la actividad probiótica del mismo, las condiciones del tratamiento ultrasónico fueron 23 kHz, 10 µm de amplitud por 3 y 5 min. Observaron un aumento de 1 log UFC/mL en los recuentos de células viables de *L. brevis*, aumento de 58 – 82 % en la tasa de crecimiento específico y 16 – 36 % de aumento en la permeabilidad de la membrana celular. Además de un

pH 0.5 más bajo, aumento de 36 % en la hidrólisis de proteínas y un aumento de 31 % en el rendimiento de la producción de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Por otra parte, una mayor amplitud de 15  $\mu\text{m}$  resultó en una mayor letalidad para *L. brevis* puesto que se observó indirectamente una menor actividad metabólica, al reducirse el rendimiento de la producción de GABA en 30 – 36 %.

Behzadnia et al. (2020) estudiaron el uso de un tratamiento ultrasónico tipo baño en la producción de biosurfactantes por *L. plantarum* ATCC 8014, la frecuencia fue de 25 kHz y una potencia de 7.4 W durante 30 min en diferentes etapas del proceso de fermentación. Comprobaron que el mejor tratamiento fue una sola sonicación a las 12 horas de fermentación, pues las sonicaciones múltiples no tuvieron mejora ni una diferencia significativa y además al ser mayor número de aplicaciones no resulta económicamente viable. Observaron un aumento de 30 % en la producción de biomasa y de biosurfactante, lo cual se podría explicar debido al aumento de la permeabilidad de la membrana confirmada por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Gholamhosseinpour y Hashemi (2018) utilizaron ultrasonido con una frecuencia de 30 kHz, potencia de 100 W y amplitud de 25 % por 5, 10 y 15 min en la fermentación de leche con *L. plantarum* AF1, observaron un aumento de 88 – 94 % en la permeabilidad de la membrana celular con el tratamiento ultrasónico, un aumento del 26 % en el conteo de células viables a las 16 h, un aumento en el consumo de lactosa de 62 %, e incremento de 146 % y 137 % en la concentración de glucosa y galactosa. Por lo cual se puede deducir un aumento en la actividad metabólica resultado del aumento de la permeabilidad de la membrana celular.

### III. JUSTIFICACIÓN

Cada año se generan más de 950 millones de toneladas de leche a nivel global, de las cuales una gran proporción se destina a la fabricación de queso. Sólo entre el 10 y el 15 % de esa leche se convierte en el producto final, mientras que el resto se transforma en suero. Este subproducto, que se genera en grandes cantidades, se desecha en su mayoría y es considerado un contaminante debido a su alto contenido de materia orgánica; lo que resulta en una alta demanda de oxígeno tanto biológica como química. Se estima que la producción anual de suero en todo el mundo es de 93 millones de toneladas, que contienen alrededor de 1.5 y 8.6 millones de toneladas de proteínas y lactosa, respectivamente. A pesar del crecimiento anual en la producción de suero, menos de la mitad se reutiliza, lo que indica que una gran cantidad de nutrientes lácteos no se aprovecha de manera eficiente, lo que puede tener implicaciones serias para la sostenibilidad. Por lo tanto, es esencial encontrar métodos rentables y sostenibles para utilizar el suero y promover el desarrollo sostenible. Se requiere considerar la valorización del suero a través de diversas tecnologías y productos para aprovechar eficientemente los nutrientes valiosos que contiene y minimizar su impacto ambiental.

Es importante destacar que el suero de leche es una fuente rica en nutrientes, incluyendo lactosa, proteínas, vitaminas y minerales. La lactosa, siendo el componente de mayor concentración, ha llevado al desarrollo de tecnologías para su aprovechamiento, generando productos como lactulosa, lactitol, galactooligosacáridos, lactosacarosa, ácido lactobiónico, epilactosa y tagatosa, entre otros.

Desafortunadamente, las reacciones químicas para la obtención de tagatosa tienen un alto impacto medioambiental. Por ello, se han explorado métodos biológicos para la producción de tagatosa, los cuales son más respetuosos con el medio ambiente y las condiciones de reacción son menos extremas. Aunque estos métodos presentan un menor rendimiento, se están realizando esfuerzos para mejorarlo mediante el uso de organismos genéticamente modificados, aporte de iones, uso

de borato como secuestrador del producto, e inmovilización y permeabilización de la membrana celular con detergentes.

Por otra parte, se ha reportado el uso de ultrasonido de alta intensidad en fermentaciones para aumentar la producción de biomasa y de metabolitos de interés. Se ha demostrado que el tratamiento ultrasónico mejora la transferencia de masa al homogeneizar el medio y aumentar la permeabilidad de la membrana celular.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 General:

- Evaluar el efecto del ultrasonido en la fermentación de suero lácteo y permeado de suero con *L. plantarum* inmovilizado y libre.

### 4.2 Específicos:

- Evaluar la fermentación de células de *L. plantarum* libres e inmovilizadas en medio sintético
- Evaluar un pretratamiento de ultrasonido de alta intensidad en la producción de células de *L. plantarum* en medio sintético.
- Evaluar el rendimiento de ácido láctico usando ultrasonido de alta intensidad en la fermentación con células de *L. plantarum* libres e inmovilizadas a partir de suero lácteo y permeado de suero lácteo.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

Se utilizó una cepa de *L. plantarum* aislada de un suplemento alimenticio, el suero lácteo se obtuvo de la producción de queso panela realizado en la planta piloto de lácteos de la Universidad Autónoma de Querétaro utilizando leche entera de la marca Alpura. Se utilizó  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (Lactozyme 2600L de Sigma Aldrich), estándares de lactosa, glucosa, galactosa, tagatosa (Sigma Aldrich), ácido clorhídrico y ácido sulfúrico (J.T. Baker).

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 Efecto de la composición del medio de inducción

Para la selección de la composición del medio de inducción se siguió el diseño experimental descrito en el Cuadro 3, en el cual se utilizaron 4 concentraciones de glucosa y 2 concentraciones de arabinosa. Se inocularon los medios con *L. plantarum* y se incubaron a una temperatura de 37° C por 24 h. Para las siguientes etapas se utilizó el tratamiento 8.

*Cuadro 3.* Diseño experimental de los medios de inducción evaluados.

	Factores	
	Glucosa	Arabinosa
Concentraciones	0.2%	0.25%
	0.5%	0.5%
	1%	
	2%	

### **5.2.2 Efecto de la composición del medio sintético en el perfil de fermentación de *L. plantarum***

Para la selección de la composición del medio sintético se siguió el diseño experimental descrito en el Cuadro 3, en el cual se variaron 3 factores en 2 niveles, los factores fueron concentración de manganeso, ácido bórico y buffer de fosfatos. Se inocularon los medios con *L. plantarum* y se incubaron a una temperatura de 37° C por 24 h. Para las siguientes tapas se utilizó el tratamiento 7.

Cuadro 4. Diseño experimental de la composición de los medios sintéticos evaluados.

Factores	Tratamientos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Mn (%)	0.005	0.15	0.005	0.15	0.005	0.15	0.005	0.15
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (%)	0	0	0.027	0.027	0	0	0.027	0.027
PBS (mM)	0	0	0	0	200	200	200	200

### **5.2.3 Producción de las células catalíticas de *L. plantarum* utilizando ultrasonido**

La cepa de *L. plantarum* se activó en 5 mL de medio MRS y se incubó a 37 °C para su desarrollo, se realizaron al menos dos subcultivos y posteriormente se inocularon en caldo MRS suplementado con L- arabinosa 0.25 %, pH 6.5, 250 mL y se incubaron a una temperatura de 37° C por 24 h. A las 12 horas de fermentación, se aplicaron los tratamientos de ultrasonido con un sonicador de sonda (Cole Parmer, Instruments Company, EUA) con una potencia de 500 W, una frecuencia de 20 kHz y una sonda de titanio con diámetro de 13 mm. Se incluyó un control que consistió en la suspensión de células sin aplicación de tratamiento ultrasónico. Se aplicó un diseño factorial completo con los factores presentados en Cuadro 5.

*Cuadro 5. Factores y niveles del diseño experimental de la producción de células de *L. plantarum*.*

Factores		
Niveles	Tiempo de tratamiento (min)	Ultrasonido (% amplitud)
-1	5	20
1	15	40

#### **5.2.4 Evaluación de la viabilidad celular de *L. plantarum***

Se concentraron 25 mL de las células tratadas con los diferentes tratamientos de ultrasonido por 10 minutos a 4000 g, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de NaCl al 0.85%. Para el caso del tratamiento de ultrasonido control se colocó 1 mL de la suspensión anterior en 20 mL de NaCl al 0.85% y 1 mL en 20 mL de alcohol isopropílico al 70% (control positivo y control negativo respectivamente). Para los tratamientos de ultrasonido se siguió solo el procedimiento de control positivo.

Se incubaron todas las muestras a temperatura ambiente por 1h mezclando cada 15 minutos y se centrifugaron por 10 minutos a 4000 g, posteriormente se resuspendieron los pellets en 20 mL de NaCl al 0.85% y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 4000 g, para resuspender finalmente en 10 mL de NaCl 0.85%, se determinó la OD<sub>600</sub> en cubeta de cuarzo de 1 cm.

Se tiñó 1 mL de suspensión bacteriana con 3 µL de la mezcla de colorantes (1:1) del kit de Invitrogen™ LIVE/DEAD™ BacLight™, se homogeneizó e incubó a

temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos, se tomaron 5  $\mu$ L de la suspensión bacteriana teñida y se colocó en portaobjetos y se cubrió para observar en el microscopio confocal.

Para las siguientes etapas se utilizó el tratamiento de ultrasonido de 20% de amplitud y 15 minutos.

### **5.2.5 Fermentación del medio definido por *L. plantarum***

Se inoculó una concentración final de 3 % v/v de células al medio de fermentación definido con: lactosa 1%, glucosa 2 %, galactosa 2 %, extracto de levadura 0.5 %, peptona de soya 1 %, peptona de carne 1 %, acetato de sodio anhidro 0.5 %, MgSO<sub>4</sub> 0.02 %, MnSO<sub>4</sub> 0.005%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 % y pH 6.5, se incubó a 37 °C por 24h. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24 y 48 horas de fermentación para cuantificar la cantidad de cetosas por UV-Vis y la identificación y cuantificación de carbohidratos con HPLC.

### **5.2.6 Cuantificación de carbohidratos con HPLC**

Los productos resultantes de la fermentación con células producidas, se determinó mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Las muestras recolectadas se diluyeron en agua grado HPLC hasta alcanzar una concentración de 0.5 g/L, se filtraron con un filtro de 0.45  $\mu$ m de poro y se analizaron en un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) conectado a un detector de índice de refracción con una columna Hi-Plex Ca (Duo) y agua grado HPLC previamente desgasificada y filtrada como fase móvil. Las condiciones de análisis fueron: temperatura de columna = 80 °C, flujo = 0.2 mL/min, volumen de inyección = 10  $\mu$ L y tiempo de corrida = 40 min. Los datos obtenidos se procesaron utilizando el software HP ChemStation. Se utilizaron curvas de calibración utilizando

estándares (lactosa, glucosa, galactosa, tagatosa y ácido láctico) en cinco concentraciones (0.125, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 g/L).

### **5.2.7      Obtención del suero lácteo**

Se produjo queso panela en la planta piloto de lácteos de la Facultad de Química. Se partió de leche pasteurizada comercial (Alpura), inicialmente se elevó la temperatura de la leche pasteurizada a 37 °C. Luego, se añadió cuajo microbiano y cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) de grado alimenticio en una proporción de 1 mL y 2 g respectivamente por cada 10 L de leche. Esta mezcla se dejó en reposo durante 45 min. Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se cortó la cuajada en cubos de aproximadamente 1 cm desuerando durante 5 min. Posteriormente, para facilitar el desuerado, se incrementó gradualmente la temperatura durante 30 min hasta alcanzar los 40 °C, manteniendo una agitación constante. Al final de este proceso, se extrajo el suero dulce con un filtro de tela.

### **5.2.8      Ultrafiltración**

El suero se sometió a ultrafiltración utilizando una unidad de ultrafiltración tangencial por membranas en placa marca (Sterlitech) equipada con una membrana (PES - polietersulfona, con un tamaño de poro de 10 kDa) y operando a una presión inferior a 2 bar. La corriente del concentrado se recirculó al depósito de alimentación, mientras que la corriente del permeado se recogió en un recipiente separado.

### **5.2.9      Hidrólisis de la lactosa**

El suero y el permeado de suero se incubó a 30 °C, pH 7.3 por 2 horas en presencia de una  $\beta$ -galactosidasa de *K. lactis* (Lactozyme, Sigma Aldrich) para llevar a cabo la hidrólisis de la lactosa.

### **5.2.10 Inmovilización de las células**

Las células de *L. plantarum* se les aplicó el tratamiento de ultrasonido seleccionado en la etapa anterior (5.2.3) y se sometieron a inmovilización. Para ello, se mezclaron las células (4 % p/v) con una solución de alginato de sodio al 2 % y se dejó caer (desde una altura de 20 cm) sobre una solución de cloruro de calcio 0.2 M helado con agitación continua. Finalmente, formadas se dejaron reposar sobre el cloruro de calcio durante al menos 3 horas a 25 °C. Finalmente las perlas se lavaron con agua destilada y solución amortiguadora de fosfato 50 mM y se almacenaron en suspensión en solución amortiguadora de fosfato a 4° C.

### **5.2.11 Fermentación del suero y permeado de suero hidrolizado con *L. plantarum* inmovilizado y libre.**

Se inoculó suero y permeado en una concentración final de 3 % de células inmovilizadas y libres, se ajustó pH a 6.5, y se incubó por 48 h. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24 y 48 horas de fermentación para cuantificar los carbohidratos por HPLC de acuerdo con la sección 5.2.6.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto de la concentración de glucosa y arabinosa en el medio de inducción en la fermentación de medio sintético utilizando *L. plantarum*

Se presenta en la Figura 7, la concentración de los compuestos evaluados en el medio sintético a lo largo de las 24 horas de fermentación de *L. plantarum* en medio de composición definida, evaluando ocho tratamientos del medio de inducción que variaron la concentración de glucosa (0.2, 0.5, 1 y 2 %) y arabinosa (0.25 y 0.5 %) mostrados en el Cuadro 3. En general, los perfiles resultaron muy similares entre tratamientos y el efecto más marcado se observó en función del tiempo de fermentación.

Como puede observarse la concentración inicial de lactosa fue de  $10.53 \pm 0.005$  g/L, glucosa  $16.44 \pm 0.02$  g/L, galactosa  $22.15 \pm 0.073$  g/L, y el ácido láctico no estaba presente en medio. A las 12 horas de fermentación no se encuentran diferencias significativas en la concentración de compuestos analizados mostrando una marcada reducción en la concentración de glucosa encontrando concentraciones alrededor de los 3.5 g/L y también una ligera reducción de galactosa alcanzando valores de 18.56 g/L en la fermentación que se realizó utilizando el tratamiento 7 como medio de inducción. Así mismo se muestra la marcada producción de ácido láctico alcanzando concentraciones de 12.80 g/L. Después de 24 horas de fermentación, la concentración de lactosa no muestra cambios con respecto a la inicial, y la concentración de glucosa y galactosa no muestran diferencias significativas entre tratamientos ( $p>0.05$ ); sin embargo continúa una marcada reducción en la concentración de glucosa hasta consumirla totalmente. La concentración de ácido láctico muestra diferentes respuestas con respecto a los tratamientos de medio de inducción alcanzando las concentraciones más altas de  $15.95 \pm 0.68$  g/L con la inducción del T7 (Glucosa 2% y Arabinosa

0.25%) y las menores concentraciones con el T1 (Glucosa 0.2% y Arabinosa 0.25%).

Considerando estos patrones de consumo y producción, es posible identificar tendencias generales en el comportamiento fermentativo de la bacteria. A partir de estas observaciones, se puede interpretar con mayor claridad la dinámica metabólica observada durante el proceso.

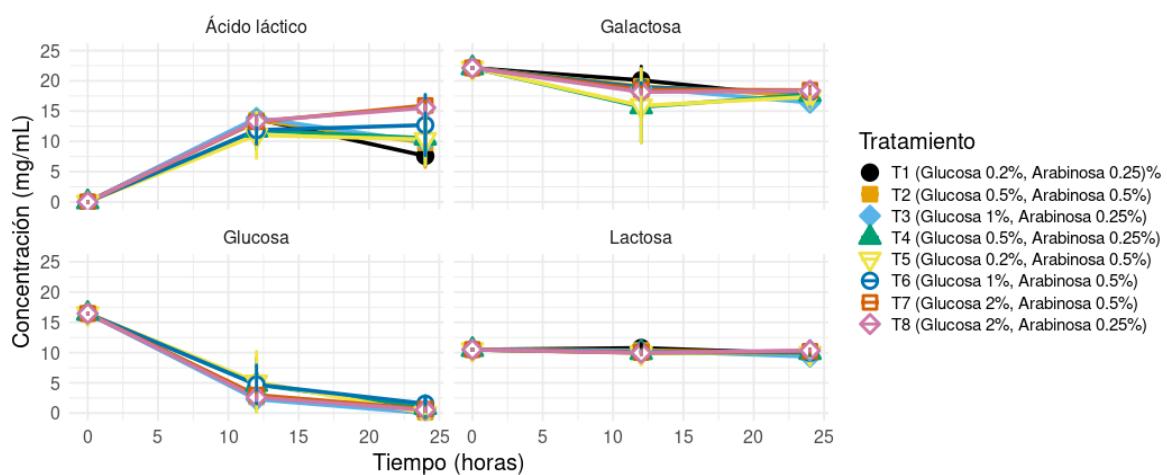


Figura 7. Cuantificación de compuestos presentes en medio sintético fermentado durante 24 horas por *L. plantarum libre*. Los puntos representan la media  $\pm$  DE.

Independientemente de la composición del medio de inducción, el comportamiento fermentativo fue muy similar entre los tratamientos. La desaparición temprana de la glucosa confirma que este azúcar fue el principal sustrato utilizado por la bacteria, lo cual es consistente con lo descrito para fermentaciones de *L. plantarum*, que dispone de múltiples sistemas para la captación eficiente de carbohidratos simples, incluyendo transportadores PTS y fosfohidrolasas asociadas al metabolismo de hexosas (Cui et al., 2021; Plaza-Vinuesa et al., 2023). La disminución de glucosa coincidió con un incremento sostenido de ácido láctico, acorde con la fisiología habitual de las bacterias lácticas, cuya fermentación homoláctica constituye una vía eficiente para la obtención de energía a partir de hexosas.

El patrón de producción de ácido láctico, con un aumento pronunciado durante las primeras 12 horas y una estabilización posterior, es coherente con la transición desde una fase exponencial hacia una fase de mantenimiento celular. Tendencias similares se reportan en procesos fermentativos donde la disponibilidad de azúcares simples determina la intensidad metabólica (Kacaribu & Darwin, 2024).

En relación con la galactosa, el consumo parcial observado respalda su uso como sustrato secundario. Este comportamiento es congruente con la represión catabólica regulada por glucosa, ampliamente descrita en bacterias lácticas (Thompson, 1987; Wang et al., 2021), donde la presencia de un monosacárido preferido inhibe la expresión o actividad de las rutas para otros carbohidratos. La baja variación de lactosa sugiere límites en su hidrólisis o transporte, lo cual coincide con la variabilidad documentada en *L. plantarum* respecto a su capacidad para metabolizar este disacárido (Zhang et al., 2020; Plaza-Vinuesa et al., 2023).

Por otro lado, aunque la arabinosa no fue medida en el medio sintético, es relevante mencionar que su uso en el medio de inducción puede modular rutas convergentes del metabolismo de cetosas, considerando que enzimas como la L-arabinosa isomerasa de *L. plantarum* poseen actividad sobre galactosa y participan en la formación de D-tagatosa (Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2021). Esto podría explicar ligeras variaciones entre tratamientos, aunque sin impacto significativo en la cinética global.

## **6.2 Efecto de la composición de Manganeso, ácido bórico y PBS del medio sintético en la fermentación utilizando *L. plantarum***

### **6.2.1 Fermentación con células libres**

En la Figura 8 se muestran los resultados de la cuantificación de azúcares y ácido láctico en medio sintético durante 48 horas de fermentación por *L. plantarum*. Se

puede observar que la glucosa (inicial:  $16.47 \pm 0.06$  g/L) se reduce por completo durante las primeras 12 horas y el tratamiento con altos niveles de Manganese, ácido bórico y PBS mostró el consumo más acelerado, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos. Un comportamiento similar se presentó con la galactosa, que inició la fermentación con una concentración de  $22.13 \pm 0.06$  g/L, mostrando una marcada disminución a las 12 horas con una concentración final entre 12 y 18 g/L a las 48 horas de fermentación, dependiendo del tratamiento.

La lactosa cuantificada muestra un comportamiento errático debido a que la cuantificación de la concentración inicial fue de  $10.53 \pm 0.005$  g/L, sin embargo, en los tiempos 12 y 48 horas muestra un aumento en la concentración detectada, lo cual es algo no posible, debido a que las bacterias ácido lácticas no pueden sintetizar lactosa durante la fermentación. Una posible explicación es que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa expresada por la cepa de *L. plantarum* haya realizado la actividad de transferencia a la par de la hidrólisis y sintetizado compuestos diméricos de glucosa y galactosa isómeros de la lactosa, estos compuestos denominados oligosacáridos pueden presentarse de manera natural en suero.

La concentración de ácido láctico incrementó de manera sostenida hasta las 24 horas, principalmente en los tratamientos 5-8 (presencia de PBS) en donde se alcanzaron concentraciones de 39 – 41 g/L, mientras que los tratamientos 1-4 (Sin PBS), mostraron una producción menor alcanzando concentraciones de 25 – 26 g/L.

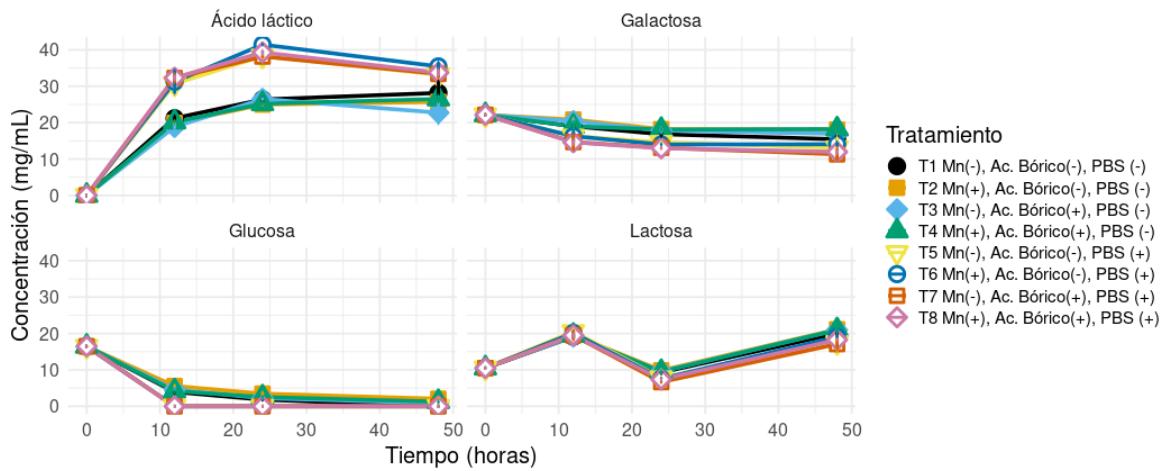


Figura 8. Cuantificación de compuestos durante la fermentación de *L. plantarum* libre y 8 tratamientos distintos de la composición del medio. Los puntos representan la media  $\pm$  DE.

Los resultados obtenidos muestran que la presencia de PBS es el factor con mayor influencia sobre la cinética fermentativa, ya que los tratamientos con PBS (+) exhibieron un consumo acelerado de glucosa y galactosa, así como una producción significativamente superior de ácido láctico en comparación con los tratamientos sin PBS. A las 24 h, los sistemas con PBS (+) alcanzaron concentraciones cercanas a 39–41 g/L de ácido láctico, mientras que los tratamientos sin PBS permanecieron alrededor de 25–26 g/L; esta diferencia se mantuvo incluso a las 48 h, lo que evidencia una fermentación más intensa y sostenida cuando el medio es tamponado. Este comportamiento coincide con hallazgos recientes que demuestran que la capacidad de amortiguamiento del medio desempeña un papel determinante en la dinámica de acidificación, ya que regula la caída del pH y retrasa la inhibición metabólica por acumulación de ácido. En un estudio donde se desarrolló un medio sintético precisamente para analizar el efecto de la capacidad tampón sobre la fermentación de jugo de pepino, Anthony et al. (2025) demostraron que una mayor capacidad de amortiguamiento permite mantener un ambiente más estable para la

actividad de las bacterias ácido lácticas, promoviendo así un metabolismo más eficiente. De forma complementaria, Breidt y Skinner (2022) mostraron que los modelos de capacidad tampón explican adecuadamente los cambios de pH y de ácidos orgánicos durante fermentaciones lácticas. Esto indica que un medio más amortiguado reduce la inhibición por acidificación y facilita una mayor conversión de azúcares hacia productos fermentativos. En este sentido, el comportamiento observado en los tratamientos con PBS (+), caracterizado por el agotamiento rápido de glucosa a las 12 horas y un consumo más profundo de galactosa; es congruente con lo reportado en la literatura, ya que la capacidad tampón actúa como un modulador directo del ritmo metabólico y de la acumulación de ácidos.

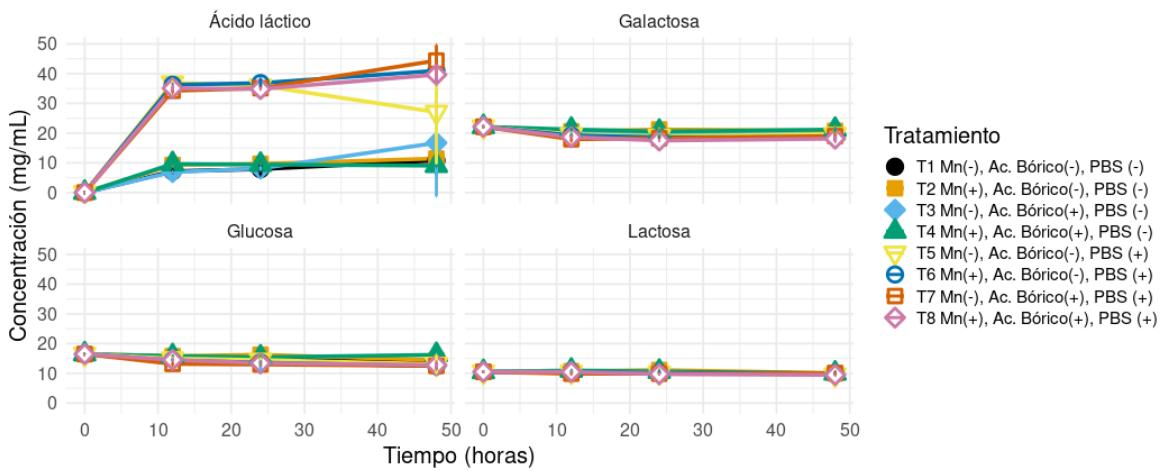
Asimismo, estudios realizados en otros sistemas fermentativos confirman que la capacidad de tamponamiento influye fuertemente en la acidificación generada por bacterias lácticas. Por ejemplo, Peyer et al. (2017) demostraron que una mayor capacidad de amortiguamiento en fermentado por bacterias lácticas permite alcanzar tasas de acidificación más elevadas y sostenidas, precisamente porque el pH desciende más lentamente y las células no enfrentan un ambiente ácido inhibitorio de forma temprana. Este principio coincide con los resultados del presente trabajo: en ausencia de PBS, el pH probablemente disminuyó más rápidamente, limitando el metabolismo bacteriano y reduciendo la velocidad de consumo de carbohidratos; mientras que en presencia de PBS, la amortiguación permitió mantener condiciones más favorables para la actividad de las bacterias ácido-lácticas, extendiendo su fase metabólicamente activa y favoreciendo una mayor síntesis de ácido láctico.

Finalmente, el papel del manganeso y del ácido bórico se observa como secundario, ya que dentro de cada nivel de PBS las diferencias entre Mn(+)/Mn(–) y ácido bórico(+)/(–) fueron mínimas en las concentraciones de los productos determinados. Esto resulta coherente con lo señalado en los estudios previos, donde la capacidad tampón del medio tiene un efecto global sobre la fisiología bacteriana, mientras que los cofactores metálicos u otros aditivos suelen modular aspectos específicos del

metabolismo. En conjunto, los resultados confirman que el PBS modula de manera determinante la cinética fermentativa al proporcionar un entorno químicamente estable, condición ampliamente respaldada por la literatura que documenta el rol central de la capacidad de amortiguamiento en fermentaciones realizadas por bacterias ácido lácticas.

### **6.2.2 Fermentación con células inmovilizadas**

En la Figura 9, se presenta la cuantificación de compuestos presentes en la fermentación. Puede observarse una disminución de la concentración de lactosa y galactosa con respecto a sus concentraciones iniciales de  $10.53 \pm 0.005$  g/L y  $22.13 \pm 0.06$  g/L, respectivamente. Sin embargo, esta concentración es sustancialmente mayor a la encontrada en la fermentación utilizando células libres. Por otro lado, la concentración de ácido láctico muestra una tendencia marcada de aumento principalmente en los tratamientos 5-8, alcanzando concentraciones de  $38.03 \pm 7.58$  g/L. La lactosa inicial al parecer no fue metabolizada debido a que mantiene su concentración inicial de  $10.53 \pm 0.005$  g/L. La glucosa, por otra parte, mostró una disminución moderada a lo largo del proceso fermentativo. A partir de su concentración inicial de  $16.47 \pm 0.06$  g/L, se redujo a 14.31 g/L a las 24 horas y posteriormente a 13.45 g/L a las 48 h, evidenciando un consumo parcial pero consistente durante la fermentación.



**Figura 9.** Cuantificación de compuestos durante la fermentación de *L. plantarum* inmovilizado y 8 tratamientos distintos de la composición del medio sintético. Los puntos representan la media  $\pm$  DE.

Por otro lado, el ácido bórico ha sido identificado como un modulador del metabolismo microbiano al participar en interacciones con polisacáridos de la pared celular y en el transporte de azúcares, lo que podría explicar el aumento observado en combinación con Mn y PBS (Sun et al., 2020).

El efecto más marcado se observó con la inclusión de PBS (200 mM), lo cual probablemente esté relacionado con el mantenimiento de un pH estable durante el proceso fermentativo. Se ha demostrado que la estabilidad del pH favorece el rendimiento metabólico de *L. plantarum* y reduce el estrés ácido, mejorando la conversión de azúcares en metabolitos de interés (Peyer et al., 2017).

Finalmente, el hecho de que las células inmovilizadas presentaran un rendimiento mayor en comparación con las células libres puede atribuirse a la protección física y a la mayor densidad celular, lo que se traduce en una mayor estabilidad metabólica. Esto concuerda con investigaciones recientes que destacan la inmovilización como estrategia para aumentar la productividad de metabolitos microbianos al mejorar la tolerancia a condiciones de estrés y aumentar la eficiencia del bioprocreso (Karwowski et al., 2024).

### 6.3 Efecto del ultrasonido de alta intensidad en el recuento de células libres

En la Figura 10 se presenta el efecto de los distintos tratamientos de ultrasonido sobre la viabilidad de *L. plantarum* libre, expresada como log UFC/mL. El control, sin aplicación de tratamiento de ultrasonido, mostró el valor más bajo, con una media cercana a 8.82 log UFC/mL y baja dispersión.

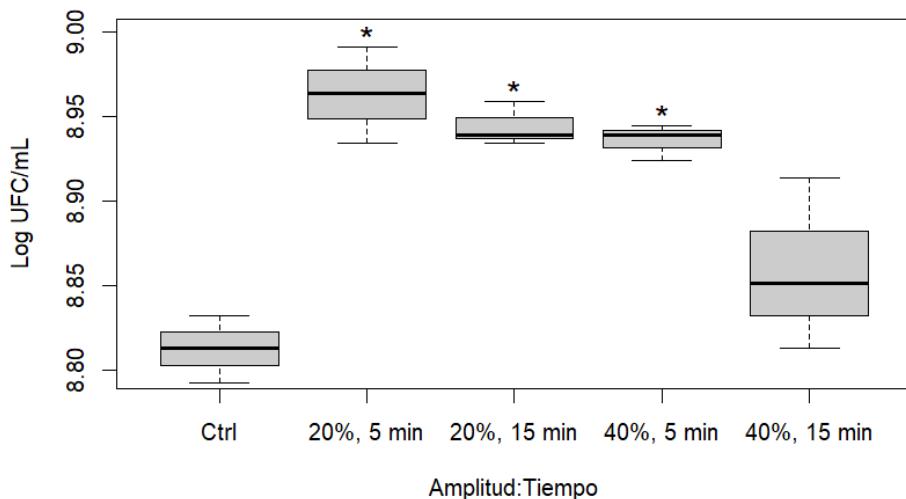
Los tratamientos a 20 % de amplitud evidenciaron un incremento significativo en el recuento celular respecto al control. A 5 min, el valor alcanzó aproximadamente 8.97 log UFC/mL ( $p < 0.05$ ), constituyendo el tratamiento con mayor efecto positivo. A 15 min, aunque el valor se mantuvo superior al control (8.94 log UFC/mL), se observó una ligera disminución en comparación con el tiempo de 5 min.

En el caso de la amplitud del 40 %, el tratamiento a 5 min también mostró un aumento significativo frente al control (8.93 log UFC/mL,  $p < 0.05$ ), aunque de menor magnitud que el observado con 20 % durante el mismo tiempo. Por otro lado, la aplicación de 40 % durante 15 min resultó en un valor cercano a 8.85 log UFC/mL, estadísticamente similar al control y con mayor dispersión de los datos.

En conjunto, los resultados indican que el ultrasonido puede inducir un incremento en la viabilidad celular de *L. plantarum* bajo condiciones específicas de amplitud y tiempo, siendo más evidente con intensidades moderadas y tiempos cortos de exposición.

El efecto observado concuerda con lo reportado en la literatura, donde la aplicación de ultrasonido de baja a moderada intensidad ha mostrado un impacto positivo sobre la viabilidad y la actividad metabólica de bacterias ácido lácticas. Dicho efecto se atribuye a la generación de cavitación estable, que promueve una mayor permeabilidad de la membrana celular y facilita el intercambio de nutrientes y metabolitos, sin inducir daños letales en la estructura celular (Speranza et al., 2021)

Particularmente, el incremento significativo registrado a 20% de amplitud por 5 min sugiere que el estímulo físico favoreció la estabilidad fisiológica de *L. plantarum*. Estudios previos han demostrado que exposiciones cortas a ultrasonido en este rango promueven el crecimiento y la actividad fermentativa de lactobacilos sin comprometer su viabilidad (Racioppo et al., 2023).

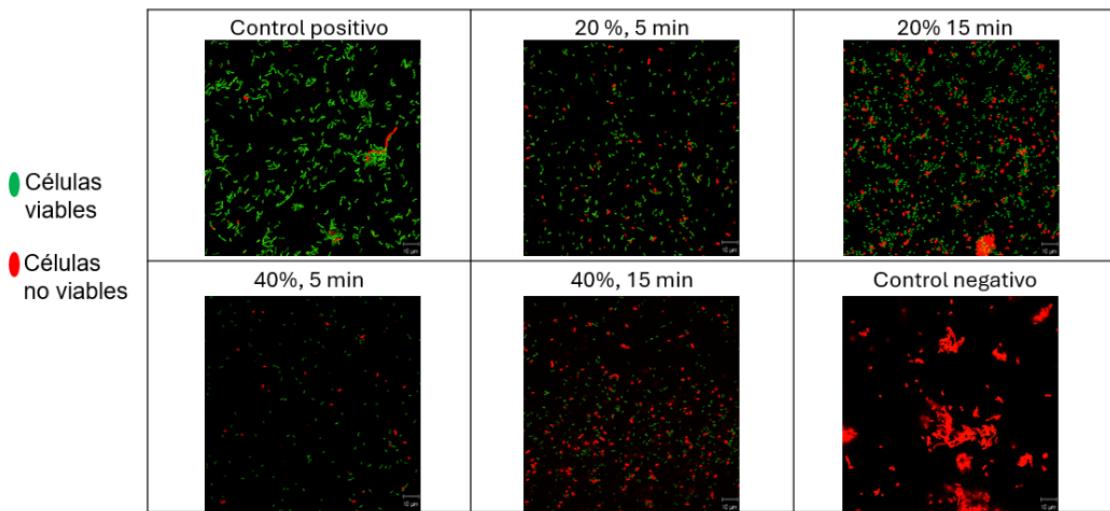


*Figura 10.* Recuento de células viables de la cepa 2 con los 4 distintos tratamientos y el control.

En el caso de la amplitud del 40 %, la respuesta depende del tiempo. A 5 min, el efecto positivo fue similar al obtenido con 20 % de amplitud, mientras que a 15 min los recuentos se redujeron hasta valores comparables con el control. Este comportamiento coincide con lo descrito por investigaciones recientes, donde intensidades más altas combinadas con tiempos prolongados generan cavitación transitoria y efectos mecánicos destructivos, ocasionando daño en la membrana, pérdida de integridad celular y disminución de la viabilidad (Hashemi & Gholamhosseinpour, 2020).

#### 6.4 Efecto del ultrasonido de alta intensidad en la viabilidad celular de *L. plantarum* mediante microscopía confocal

En la Figura 11 se presentan los resultados de la viabilidad de *L. plantarum* tras los tratamientos de ultrasonido, teñidas con el kit de Invitrogen™ LIVE/DEAD™ BacLight™ y evaluadas con microscopía confocal. En el control positivo se observa una alta proporción de células viables, representadas en color verde, con muy pocas células no viables. En el tratamiento al 20 % durante 5 minutos continúan predominando de células viables, aunque ya se evidencian algunas células no viables (color rojo) dispersas. Al incrementar el tiempo a 15 minutos con la misma amplitud (20 %), la proporción de células no viables aumenta de manera notable.



*Figura 11.* Micrografías confocales de *L. plantarum* expuesto a ultrasonido con 20 y 40% de amplitud por 5 y 15 minutos y posteriormente teñidas con el kit de Invitrogen™ LIVE/DEAD™ BacLight™.

Por otro lado, en los tratamientos con 40 % de amplitud se observa un efecto más marcado. A los 5 minutos, la viabilidad celular se ve comprometida con una presencia considerable de células no viables, mientras que al extender el tiempo a 15 minutos, la mayoría de las células aparecen teñidas de rojo, indicando pérdida significativa de viabilidad. Finalmente, en el control negativo predominan completamente las células no viables, lo cual confirma la efectividad de la tinción y el contraste con el control positivo.

Estos resultados concuerdan con lo observado en varios estudios en los cuales el uso de amplitudes moderadas con tiempos cortos mejoró o modificó la viabilidad celular sin causar daño irreversible, y por el contrario amplitudes altas y tiempos prolongados, la viabilidad celular disminuyó. Bolívar-Jacobo et al. (2023) encontraron que tratamientos de 20 y 30 % de amplitud por 3 minutos muestran buena viabilidad en *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus helveticus*, pero al 40 % de amplitud por 3 minutos el número de células muertas ya es considerable. Asimismo, Wang et al. (2021) mostraron que al aplicar el ultrasonido en etapas específicas del crecimiento microbiano puede favorecer la producción de metabolitos sin comprometer la viabilidad celular. Sin embargo, intensidades elevadas o tiempos prolongados generan un efecto adverso, como daño a la membrana y acumulación de especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, Gholamhosseinpour et al. (2025) demuestran que la aplicación de ultrasonido puede aumentar la viabilidad microbiana y mejorar funciones como acidificación y producción de antioxidantes, cuando el tratamiento incluye tanto el medio como las células, puesto que la utilización del ultrasonido solo en el medio, o solo en las células resultaron en mejoras menores, así como en el conjunto o inoculación, por lo que la mejor condición fue el uso de ultrasonido por separado en células y medio.

## 6.5 Efecto del ultrasonido durante la inducción en la fermentación

Se presentan en la Figura 12 los metabolitos evaluados de la fermentación de *L. plantarum* libre en medio sintético con pretratamiento de ultrasonido durante la inducción a lo largo de 24 horas, se evaluaron 4 tratamientos de ultrasonido y su respectivo control. Los perfiles fueron muy similares entre tratamientos y el mayor efecto se observó en función del tiempo de fermentación.

Como puede observarse, todos los tratamientos iniciaron sin concentración de ácido láctico detectable a las 0 horas. Para las 12 horas, los valores obtenidos fueron muy similares entre tratamientos, registrándose concentraciones de 35.20 g/L para 20% de amplitud por 15 minutos, 35.13 g/L para 20% de amplitud por 5 minutos, 34.90 g/L para 40% de amplitud por 15 minutos y 35.33 g/L para 40% de amplitud por 5 minutos, mientras que el control presentó 35.20 g/L. A las 24 horas se mantuvieron en concentraciones similares. En general, la concentración de ácido láctico mostró valores cercanos entre todos los tratamientos y el control en ambos tiempos evaluados. Respecto a la galactosa, todos los tratamientos iniciaron con la misma concentración inicial de 22.13 g/L. A las 12 horas, las concentraciones disminuyeron en todos los casos, registrándose 15.47 g/L para 20% de amplitud por 15 minutos, 15.30 g/L para 20% de amplitud por 5 minutos, 15.57 g/L para 40% de amplitud por 15 minutos, 15.77 g/L para 40% de amplitud por 5 minutos y 15.70 g/L en el control. Para las 24 horas, se observó una reducción continua, con valores de 13.43 g/L para 20% de amplitud por 15 minutos, 14.43 g/L para 20% de amplitud por 5 minutos, 13.43 g/L para 40% de amplitud por 15 minutos, 13.60 g/L para 40% de amplitud por 5 minutos y 13.67 g/L en el control. El consumo de galactosa fue semejante entre tratamientos, sin diferencias notables en la tendencia general.

Para la glucosa, todos los tratamientos presentaron una concentración inicial de 16.47 g/L. A las 12 horas se observó un agotamiento total del compuesto en todos los grupos, incluidos los tratamientos sometidos a ultrasonido y el control. Esta misma condición se mantuvo a las 24 horas, sin detección de glucosa residual en ninguno de los tratamientos evaluados. En cuanto a la lactosa, los valores iniciales fueron equivalentes para todos los tratamientos, con 10.50 g/L. A las 12 horas, se registró una disminución moderada en todos los casos, alcanzando 8.63 g/L para 20% de amplitud por 15 minutos, 8.67 g/L para 20% de amplitud por 5 minutos, 8.73 g/L para 40% de amplitud por 15 minutos, 8.67 g/L para 40% de amplitud por 5 minutos y 8.77 g/L en el control. Para las 24 horas, la concentración continuó descendiendo, registrándose valores de 7.47 g/L para 20% de amplitud por 15

minutos, 8.10 g/L para 20% de amplitud por 5 minutos, 7.47 g/L para 40% de amplitud por 15 minutos, 7.40 g/L para 40% de amplitud por 5 minutos y 7.47 g/L en el control. Los valores obtenidos indican que la lactosa presentó un comportamiento descendente similar en todos los tratamientos evaluados.

Los resultados muestran que la aplicación de ultrasonido durante la inducción, en intensidades del 20% y 40% y tiempos de 5 o 15 minutos, no produjo un incremento significativo en la producción de ácido láctico en cultivos libres de *L. plantarum*. A las 12 h, todos los tratamientos alcanzaron concentraciones muy similares, alrededor de 35 g/L, incluyendo el control. A las 24 horas esta tendencia se mantuvo, con variaciones mínimas entre tratamientos y sin evidencia de que el ultrasonido mejorara la actividad fermentativa. Incluso el tratamiento con la mayor concentración registrada (20% amplitud por 5 minutos), no mostró una diferencia lo suficientemente marcada para atribuirle un efecto estimulante. Esto indica que, bajo las condiciones empleadas, el ultrasonido no modificó de manera apreciable el rendimiento metabólico, ni la velocidad de producción de lactato en cultivos libres. La cinética de consumo de carbohidratos refuerza esta observación. La glucosa fue consumida por completo a las 12 horas en todos los grupos por igual, mientras que la galactosa y la lactosa mostraron perfiles de disminución prácticamente paralelos entre los tratamientos con ultrasonido y el control. Esto sugiere que la sonicación no alteró la actividad de los sistemas de transporte de azúcares ni las rutas centrales del metabolismo. Este comportamiento coincide con estudios que indican que exposiciones cortas y de baja a moderada intensidad no generan modificaciones relevantes en la permeabilidad de membrana ni en la actividad de lactato deshidrogenasa en bacterias lácticas (Khokhlova et al., 2023). Asimismo, se ha reportado que *L. plantarum* presenta una elevada tolerancia fisiológica a perturbaciones físicas moderadas, lo que puede explicar la ausencia de respuestas metabólicas diferenciadas ante sonicación de baja intensidad. En otras especies, los efectos beneficiosos del ultrasonido aparecen cuando la intensidad supera un umbral capaz de inducir cambios en permeabilidad o en el flujo metabólico, pero sin

llegar a niveles que provocan daño celular (Muñoz et al., 2021). En este estudio, los valores prácticamente idénticos entre tratamientos sugieren que el ultrasonido aplicado se encuentra por debajo de ese umbral de bioestimulación para *L. plantarum* libre. De igual forma, intensidades altas o tiempos excesivos pueden generar cavitación intensa y estrés oxidativo, con reducción de la actividad fermentativa, pero este fenómeno tampoco se evidenció en los datos obtenidos (Yildiz et al., 2019; Zhang et al., 2023). En conjunto, los resultados indican que ni la intensidad ni el tiempo de ultrasonido evaluados fueron suficientes para modificar el comportamiento fermentativo de *L. plantarum* en estado libre. Tanto la producción de ácido láctico como la utilización de glucosa, galactosa y lactosa se mantuvieron prácticamente idénticas al control, lo que sugiere que, bajo las condiciones estudiadas, la aplicación de ultrasonido durante la inducción no constituye una estrategia efectiva para mejorar la actividad fermentativa en cultivos libres de *L. plantarum*.

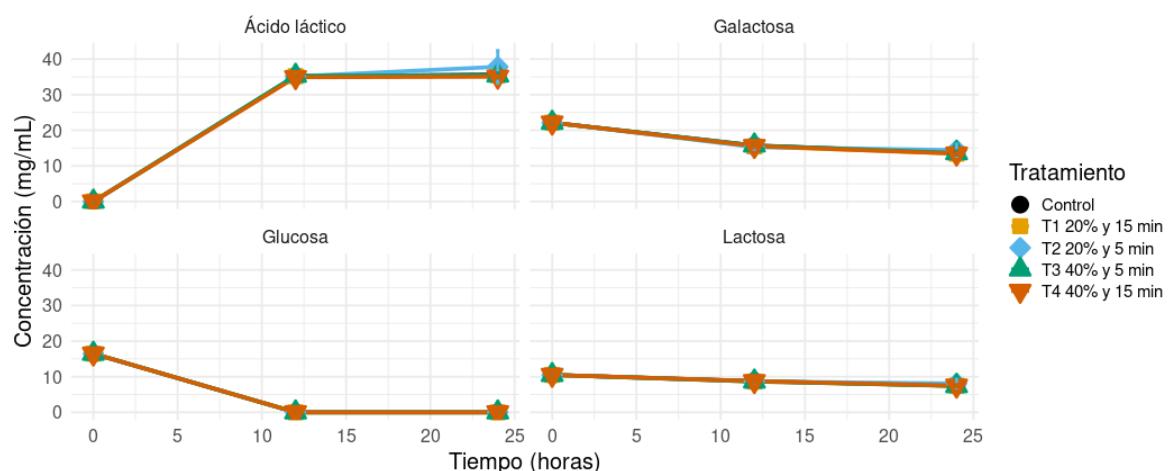


Figura 12. Cuantificación de compuestos producidos por *L. plantarum* libre en medio simple con 4 pretratamientos de ultrasonido durante la inducción de las células. Los puntos representan la media ± DE.

Se presenta en la Figura 13 los metabolitos evaluados de la fermentación de *L. plantarum* inmovilizado en medio sintético definido con pretratamiento de

ultrasonido durante la inducción a lo largo de 24 horas, se evaluaron 4 tratamientos de ultrasonido con su respectivo control. Los perfiles fueron muy similares entre tratamientos y el mayor efecto se observó en función del tiempo de fermentación. La concentración de ácido láctico fue nula en todos los tratamientos a las 0 h. A las 12 h, los valores aumentaron de forma similar entre tratamientos, registrándose 35.7 g/L para 20% de amplitud por 15 min, 39.03 g/L para 20% de amplitud por 5 min, 34.40 g/L para 40% amplitud por 15 min y 35.90 g/L para 40% de amplitud por 5 min, mientras que el control presentó 35.5 g/L. A las 24 horas las concentraciones se mantuvieron muy similares.

En cuanto a la galactosa, todos los tratamientos iniciaron con 22.13 g/L a las 0 h. A las 12 h, los valores disminuyeron a un rango entre 16.9 y 18.17 g/L, con 17.87 g/L para 20% de amplitud por 15 min, 18.07 g/L para 20% de amplitud por 5 min, 18.17 g/L para 40% de amplitud por 15 min, 18.13 g/L para 40% de amplitud por 5 min y 16.90 g/L en el control. A las 24 h, las concentraciones variaron entre 16.30 y 18.47 g/L, manteniendo valores próximos entre tratamientos.

La glucosa inició con 16.47 g/L en todos los tratamientos. A las 12 horas se redujo a 11.6 g/L en 20% de amplitud por 15 min, 10.33 g/L en 20% de amplitud por 5 min, 12.23 g/L en 40% de amplitud por 15 min, 12.10 g/L en 40% amplitud por 5 min y 6.6 g/L en el control. A las 24 h, las concentraciones fueron de 11 g/L para 20% de amplitud por 15 min, 6.17 g/L para 20% de amplitud por 5 min, 11.35 g/L para 40% de amplitud por 15 min, 7.6 g/L para 40% de amplitud por 5 min y 5.1 g/L en el control.

Respecto a la lactosa, todos los tratamientos comenzaron con 10.5 g/L. A las 12 h, los valores oscilaron entre 9.07 y 9.33 g/L, mientras que el control mostró 9.07 g/L. A las 24 h, las concentraciones variaron entre 8.8 y 9.37 g/L, siendo 9.2 g/L el valor registrado para el control.

Los resultados obtenidos en cultivos inmovilizados muestran que la aplicación de ultrasonido, tanto en intensidades del 20 % como del 40 % y con tiempos de exposición de 5 y 15 minutos, no generó un incremento significativo en la producción de ácido láctico. A las 12 h, las concentraciones alcanzadas se mantuvieron dentro

del mismo rango que el control, y a las 24 horas las diferencias entre tratamientos fueron mínimas. Esto indica que el ultrasonido aplicado durante la inducción no aumentó la actividad fermentativa de *L. plantarum* inmovilizado. Este comportamiento también se reflejó en la cinética de consumo de galactosa y lactosa, cuyos descensos fueron paralelos entre tratamientos, y en la glucosa, cuyo agotamiento fue similar salvo ligeras variaciones atribuibles a la variabilidad experimental. Resultados de este tipo coinciden con estudios donde la exposición al ultrasonido no necesariamente promueve cambios fermentativos cuando la intensidad empleada se encuentra por debajo del umbral de bioestimulación (Dahroud et al., 2016).

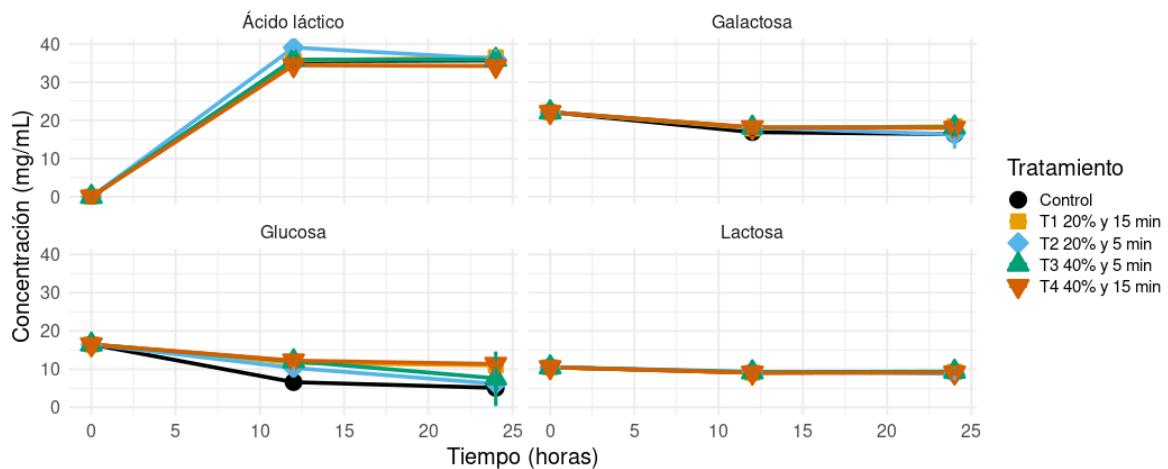


Figura 13. Cuantificación de cetosas producidas por *L. plantarum* inmovilizado en medio simple con 4 pretratamientos de ultrasonido durante la inducción de las células. Los puntos representan la media ± DE.

Al comparar estos hallazgos con los cultivos libres, se observa un patrón similar: el ultrasonido tampoco provocó incrementos detectables en la producción de ácido láctico, y la cinética de consumo de glucosa, galactosa y lactosa permaneció prácticamente idéntica al control. La coincidencia entre ambos sistemas (libres e inmovilizados) sugiere que *L. plantarum* no respondió metabólicamente a las condiciones ultrasónicas aplicadas, lo cual concuerda con investigaciones donde

intensidades moderadas no modifican de forma apreciable el perfil fermentativo de bacterias lácticas (Abesinghe et al., 2022).

Las diferencias entre los sistemas se presentaron principalmente en la dinámica del consumo de glucosa. En cultivos libres, la glucosa se agotó completamente a las 12 h, mientras que en los cultivos inmovilizados permaneció una fracción residual. No obstante, esta diferencia no se reflejó en la producción final de ácido láctico, lo que sugiere que la inmovilización confirió una mayor estabilidad metabólica y permitió lograr una conversión comparable aun con menor agotamiento del sustrato. Este tipo de estabilidad ha sido descrita en sistemas donde la matriz de inmovilización atenúa fluctuaciones ambientales y protege parcialmente la actividad de las células frente a perturbaciones físicas, incluido el ultrasonido (Tseng & Yang, 2022).

La ausencia de un efecto estimulante del ultrasonido también coincide con reportes que indican que, dependiendo de la intensidad, el ultrasonido puede no generar cambios positivos en la permeabilidad de membrana ni en la velocidad de conversión fermentativa, e incluso puede inducir leves respuestas de estrés sin afectar la fermentación de manera visible (Radziejewska-Kubzdela et al., 2024). Además, se ha documentado que ciertos estímulos físicos, incluido el ultrasonido, pueden provocar modificaciones estructurales sutiles, alteraciones en la actividad enzimática o ajustes en el metabolismo energético, los cuales no siempre se traducen en una mejora fermentativa (Bolívar-Jacobo et al., 2023). Esto puede explicar por qué, a pesar de pequeñas variaciones en la cinética de glucosa, la producción de ácido láctico se mantuvo estable y sin incrementos atribuibles al tratamiento.

En conjunto, los resultados permiten concluir que, aunque la inmovilización proporciona una mayor estabilidad metabólica frente a variaciones en el consumo de azúcares, no modifica la ausencia de respuesta al ultrasonido, ya que la falta de bioestimulación fue consistente tanto en células libres como inmovilizadas. Por lo tanto, bajo las condiciones evaluadas, el ultrasonido aplicado durante la inducción no representa una estrategia eficaz para mejorar la fermentación por *L. plantarum*.

## 6.6 Efecto del ultrasonido en la fermentación en suero lácteo y permeado utilizando *L. plantarum* libre

La Figura 14 muestra la cuantificación de metabolitos en suero lácteo fermentado por *L. plantarum* libre sometido a tratamiento ultrasónico y sin tratamiento ultrasónico previo a la inoculación. Puede observarse que la lactosa no estuvo presente en el suero debido al pretratamiento con enzima beta-galactosidasa y que por tanto los azúcares predominantes fueron glucosa y galactosa a concentraciones de  $25 \pm 0.005$  g/L y  $25 \pm 0.06$  g/L, respectivamente. A las 24 y 48 horas de fermentación, se detectó la presencia de compuestos que coincidieron en tiempos de retención cromatográfica equivalentes a los de la lactosa, cuantificados aproximadamente en 3 g/L. Aunque analíticamente fueron registrados como lactosa debido a la similitud en su comportamiento cromatográfico, es improbable que dicho carbohidrato esté realmente presente en estas etapas del proceso fermentativo. Esto se debe a que *L. plantarum* no posee la capacidad metabólica para sintetizar lactosa *de novo*, por lo que la detección de este no puede atribuirse a la síntesis del disacárido.

Una explicación es la formación de disacáridos u oligosacáridos derivados de las reacciones de transgalactosilación, catalizadas por  $\beta$ -galactosidasas producidas por *L. plantarum* durante la fermentación. Estas enzimas, además de hidrolizar la lactosa en glucosa y galactosa para su aprovechamiento metabólico, pueden transferir unidades de galactosa a otros aceptores de carbohidratos presentes en el medio, generando galactooligosacáridos (GOS) con pesos moleculares y tiempos de retención similares al de la lactosa. Como consecuencia, los métodos de cuantificación convencionales basados en HPLC con detección por índice de refracción pueden integrar estos compuestos dentro del pico correspondiente a lactosa, generando un aparente incremento o persistencia del disacárido sin que realmente se encuentre presente. Este comportamiento sugiere que, *L. plantarum* desarrolla una actividad  $\beta$ -galactosidasa. Puede observarse que el perfil de consumo de la galactosa a las 24 y 48 horas, presenta un perfil muy similar no

mostrando diferencias por la aplicación de ultrasonidos. Sin embargo, el consumo de lactosa muestra una tendencia de consumo mayor en los tratamientos de ultrasonido, efecto que se muestra muy contundente a las 48 horas de fermentación. Por otro lado, la producción de ácido láctico no muestra diferencias significativas entre el control y el tratamiento con ultrasonido. Adicionalmente, no se observó producción durante las 48 horas de fermentación.

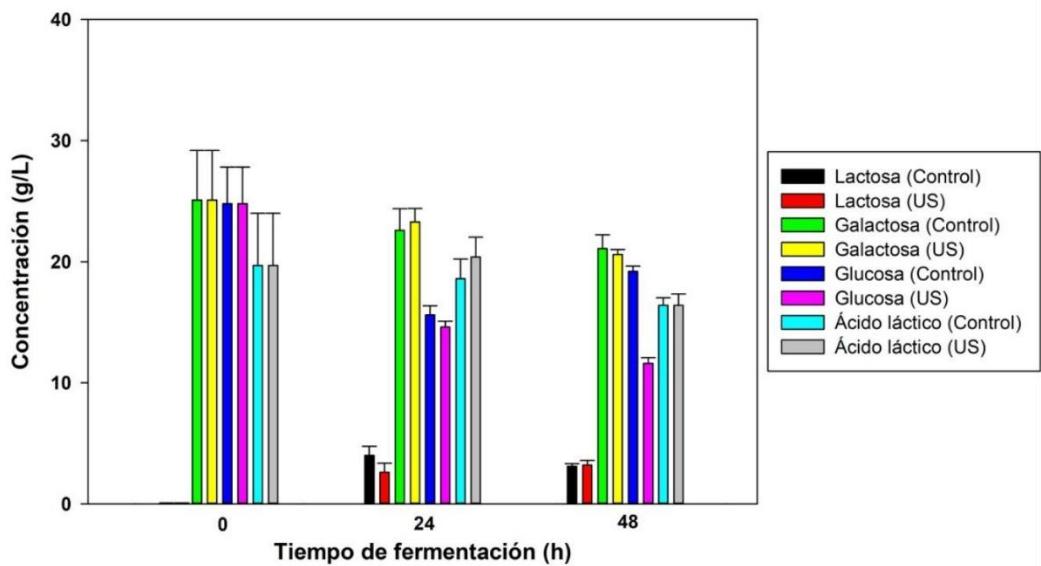


Figura 14. Cinética de fermentación por *L. plantarum* en suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias  $\pm$  DE.

La fermentación realizada en suero lácteo previamente hidrolizado con  $\beta$ -galactosidasa generó un medio altamente enriquecido en galactosa y glucosa libres, lo que facilitó una rápida disponibilidad de carbohidratos para *L. plantarum*. Bajo estas condiciones nutricionales favorables, se planteó la posibilidad de que la inducción por ultrasonido (20 %, 5 min) pudiera modular la fisiología celular, ya fuera mediante una mayor captación de azúcares o por alteraciones en la eficiencia fermentativa. Sin embargo, los resultados mostraron que la producción de ácido láctico fue prácticamente equivalente entre el tratamiento ultrasónico y el control,

con valores de 18.6 g/L y 20.4 g/L a las 24 h, respectivamente, y concentraciones casi idénticas (~16.4 g/L) a las 48 h. Esto indica que, en suero lácteo hidrolizado, el ultrasonido aplicado durante la inducción no promovió una ventaja metabólica observable. La ausencia de un efecto estimulante puede explicarse por la naturaleza del medio de cultivo. El suero hidrolizado proporciona monosacáridos de forma inmediata, lo que reduce la necesidad de mecanismos de transporte altamente activos y disminuye la probabilidad de que estímulos físicos externos, como el ultrasonido, modulen la velocidad de conversión metabólica. Estudios recientes señalan que, en medios ricos en azúcares simples, la permeabilidad celular y la actividad enzimática de LAB muestran cambios limitados tras la exposición a ultrasonido moderado, debido a que el microorganismo ya opera cerca de su capacidad metabólica máxima (Akdeniz & Akalın, 2022). Esto concuerda con los resultados obtenidos, donde *L. plantarum* no mostró un aumento en la producción de ácido láctico ni modificaciones en su cinética fermentativa. Otro factor determinante fue la composición química del suero: la presencia de PBS y ácido bórico incrementó la estabilidad del pH y la capacidad buffer del sistema. Medios altamente tamponados tienden a amortiguar los efectos físicos transitorios, reduciendo la magnitud de las perturbaciones inducidas por el ultrasonido. Breidt & Skinner (2022) demostraron que una mayor capacidad buffer limita la variación de pH durante la fermentación, lo que estabiliza la actividad metabólica de LAB y atenúa la respuesta a estímulos externos. Bajo estas condiciones, es comprensible que *L. plantarum* mantuviera un perfil fermentativo estable, independiente del tratamiento ultrasónico aplicado.

En cuanto al comportamiento de los carbohidratos, la galactosa mostró descensos similares entre tratamientos, reduciéndose de ~25 g/L a ~22 g/L a las 24 horas y posteriormente a ~20–21 g/L a las 48 h. De manera análoga, el consumo de glucosa fue comparable entre el ultrasonido y el control, lo cual sugiere que la disponibilidad inmediata de monosacáridos limitó la posibilidad de que la sonicación alterara los mecanismos de transporte o la velocidad de utilización. Trabajos recientes en

bebidas fermentadas ultrasónicas han mostrado efectos positivos únicamente cuando la matriz presenta barreras físicas, viscosidad elevada o disponibilidad limitada de azúcares fermentables (Johnson et al., 2023), condiciones que no aplican al suero hidrolizado utilizado en este estudio. Finalmente, la lactosa residual permaneció en niveles bajos, como era esperado debido a la hidrólisis previa. Las pequeñas variaciones observadas entre el control y el ultrasonido a 24 y 48 horas no siguieron un patrón consistente y no se reflejaron en cambios metabólicos relevantes. Esto coincide con reportes donde el ultrasonido de intensidad moderada no modifica de forma significativa la actividad  $\beta$ -galactosidasa residual ni genera cambios detectables en la hidrólisis de lactosa en medios lácteos procesados (Tseng & Yang, 2022).

En conjunto, los datos demuestran que, en un suero lácteo hidrolizado y químicamente estabilizado con PBS y ácido bórico, el tratamiento ultrasónico aplicado durante la inducción no alteró el metabolismo fermentativo de *L. plantarum*, ni aceleró la producción de ácido láctico, ni modificó el consumo de carbohidratos disponibles. La combinación de un medio altamente accesible (azúcares simples), un entorno químicamente estable (capacidad buffer) y una matriz sin restricciones físicas significativas probablemente mitigó cualquier efecto potencial del ultrasonido. Por lo tanto, bajo las condiciones evaluadas, el ultrasonido no constituye una herramienta efectiva para mejorar la fermentación en suero lácteo hidrolizado, y *L. plantarum* mostró un comportamiento robusto y estable, característico de su fisiología tolerante a perturbaciones moderadas.

En la Figura 15, se presenta la cuantificación de metabolitos en permeado de suero lácteo fermentado por *L. plantarum* sometidos a tratamiento ultrasónico y sin tratamiento ultrasónico previo a la inoculación. Se cuantificó una pequeña cantidad de lactosa residual de aproximadamente 1 g/L, no se encontraron diferencias significativas al inicio de la fermentación en los azúcares cuantificados. A las 24 horas de fermentación se detectó una menor concentración de galactosa en la muestra sonicada durante la inducción, sin embargo no se observó una tendencia

de modificación marcada de la fermentación debida a este pretratamiento en permeado en el consumo de los azúcares presentes ni en la producción de ácido láctico.

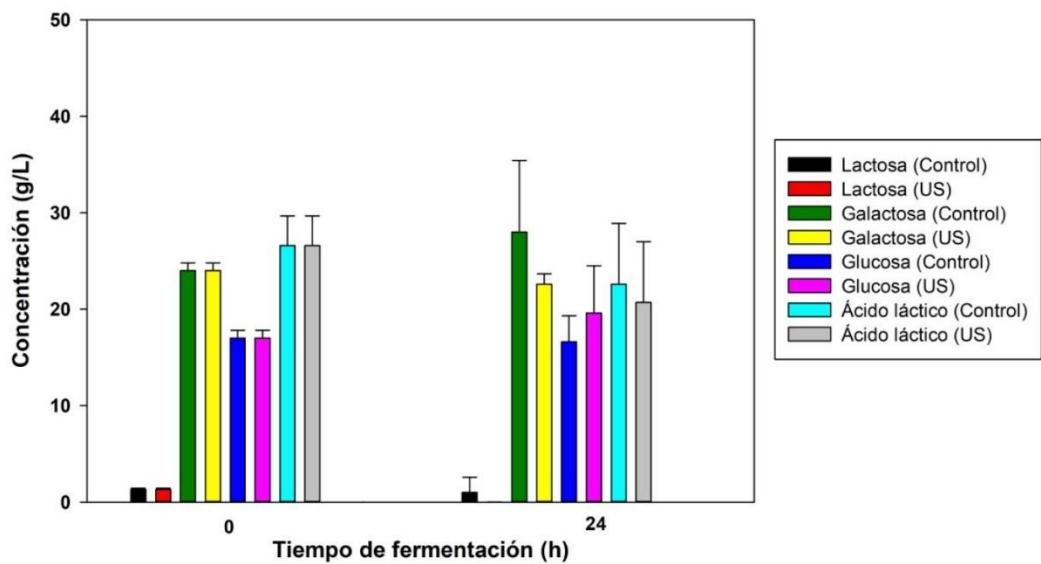


Figura 15. Cinética de fermentación por *L. plantarum* en permeado de suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias  $\pm$  DE.

La comparación entre las fermentaciones en suero lácteo hidrolizado y permeado de suero lácteo hidrolizado muestra que la presencia de azúcares simples producto de la acción de  $\beta$ -galactosidasa determinó un comportamiento fermentativo altamente eficiente e independiente del tratamiento con ultrasonido. En ambos medios, *L. plantarum* alcanzó producciones similares de ácido láctico a las 24 horas ( $\approx 20$ – $23$  g/L), y las diferencias entre control y ultrasonido fueron mínimas. Esto sugiere que, una vez que la lactosa es convertida en glucosa y galactosa, la fermentación progresó sin limitaciones de sustrato, disminuyendo la posibilidad de que estímulos físicos adicionales modulen la actividad metabólica. Este fenómeno ha sido reportado en estudios recientes donde la disponibilidad de azúcares simples reduce la sensibilidad de LAB a tratamientos ultrasónicos de intensidad moderada (Bevilacqua et al., 2024).

similitud en la respuesta entre suero y permeado hidrolizado se explica porque, aún cuando el suero contiene proteínas séricas y péptidos que podrían favorecer una mayor absorción de energía acústica, su impacto fisiológico sigue siendo limitado cuando el metabolismo está impulsado por monosacáridos disponibles de forma inmediata. En medios lácteos simplificados como el permeado, la cavitación generada por ultrasonido también es menos eficiente debido al bajo contenido proteico, lo que reduce aún más la probabilidad de bioestimulación. Investigaciones recientes han señalado que los efectos positivos del ultrasonido sobre LAB se observan principalmente en matrices estructuralmente más complejas o menos accesibles, como jugos vegetales o leches sin hidrolizar, y no en sistemas ricos en monosacáridos (Abesinghe et al., 2022). La cinética de los azúcares confirmó este comportamiento: en ambos medios, galactosa y glucosa disminuyeron de forma paralela entre control y ultrasonido, y la lactosa residual permaneció en niveles bajos. Estas tendencias son consistentes con reportes donde el ultrasonido no altera significativamente el transporte de azúcares, ni la actividad enzimática cuando el metabolismo opera cerca de su capacidad máxima, como ocurre en medios hidrolizados (Gholamhosseinpour et al., 2025; Shokri et al., 2021). Finalmente, la ausencia de efectos negativos también es relevante: no se observaron patrones de inhibición, daño subletal o reducción metabólica atribuibles al tratamiento ultrasónico. Esto concuerda con estudios que muestran que intensidades bajas a moderadas de ultrasonido no afectan la viabilidad de *L. plantarum* en sistemas lácteos estabilizados (Costa et al., 2025).

## **6.7 Efecto del ultrasonido en la fermentación en suero lácteo y permeado utilizando *L. plantarum* inmovilizado**

En la Figura 16, se presenta la cuantificación de metabolitos en suero lácteo fermentado por *L. plantarum* inmovilizado en perlas de alginato de sodio y sometidos a tratamiento ultrasónico y como control sin tratamiento ultrasónico previo a la inoculación. No se detectó lactosa residual al inicio de la fermentación en los

azúcares cuantificados. Sin embargo, en los muestreos correspondientes a las 24 y 48 horas de fermentación, se observó la aparición de compuestos que presentaron tiempos de retención coincidentes con el de la lactosa, alcanzando valores cercanos a 2 g/L, sin embargo, es poco probable que se trate realmente de este disacárido. *L. plantarum* carece de las rutas metabólicas necesarias para resintetizar lactosa a partir de sus monómeros, por lo que la presencia de ese pico no puede atribuirse a la producción de lactosa por la bacteria. Lo más probable es que dichos compuestos correspondan a oligosacáridos de tipo galactosídico generados durante la fermentación. Este fenómeno se explica por la actividad de  $\beta$ -galactosidasas sintetizadas por *L. plantarum*. A las 24 horas de fermentación se detectó una menor concentración de galactosa en la muestra sonicada durante la inducción, sin embargo no se observó una tendencia de modificación marcada de la fermentación debida a este pretratamiento en suero en el consumo de los azúcares presentes ni en la producción de ácido láctico.

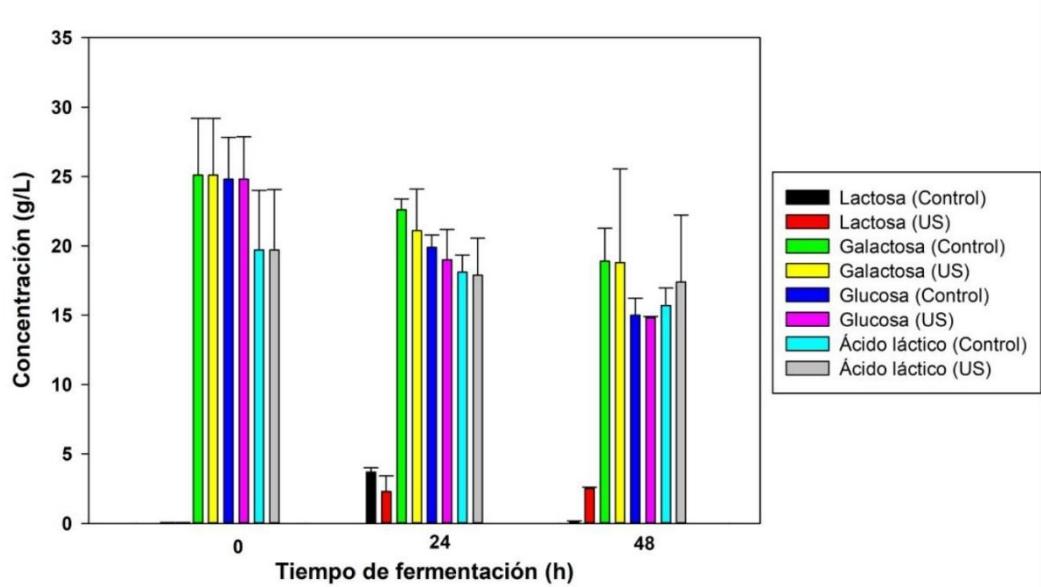


Figura 16. Cinética de fermentación por *L. plantarum* inmovilizado en suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias  $\pm$  DE.

En general, la aplicación de ultrasonido durante la inducción (20 %, 5 min) no produjo un incremento claro en la producción de ácido láctico frente al control. A las 24 y 48 h, las concentraciones de ácido láctico en el tratamiento sonicado se mantuvieron dentro del mismo orden de magnitud que el control, con diferencias que se sitúan dentro de la variabilidad experimental. Este comportamiento contrasta con algunos reportes donde el ultrasonido, aplicado en etapas específicas de crecimiento y a intensidades bien controladas, puede estimular el crecimiento de *L. plantarum* y aumentar la conversión de ácidos orgánicos, como se ha descrito en la fermentación de jugo de manzana al aplicar ultrasonido en fase lag o logarítmica (Wang et al., 2021). Sin embargo, también se ha señalado que el efecto positivo se atenúa conforme avanza la fermentación y que parámetros como potencia, tiempo de sonicación y fase de crecimiento determinan si predomina la bioestimulación o un efecto neutro.

El hecho de que las células estuvieran inmovilizadas en una matriz de alginato probablemente contribuyó a amortiguar el efecto del ultrasonido. La inmovilización de *L. plantarum* en geles de alginato, a menudo reforzados o recubiertos con otros biopolímeros, se ha asociado con una mayor tolerancia frente a condiciones de estrés (pH, temperatura, oxígeno disuelto, fuerzas mecánicas) y con una buena estabilidad de la actividad metabólica durante fermentaciones repetidas (Díaz-Negrete et al., 2025; Mahmoud et al., 2020). En sistemas lácteos y derivados, se ha demostrado que las células inmovilizadas o microencapsuladas mantienen su viabilidad y su capacidad fermentativa incluso bajo condiciones de procesamiento adversas, lo que reduce el impacto de estímulos físicos como el ultrasonido.

En cuanto al consumo de azúcares, el patrón observado en el suero hidrolizado con *L. plantarum* inmovilizado muestra descensos similares de galactosa y glucosa tanto en el control como en el tratamiento sonicado, mientras que la lactosa residual permanece baja debido a la hidrólisis previa por  $\beta$ -galactosidasa. Este comportamiento concuerda con trabajos sobre producción de ácido láctico a partir de suero y permeado de suero, donde la disponibilidad de azúcares simples y el uso

de células inmovilizadas permiten una alta conversión de sustrato con perfiles de consumo relativamente robustos frente a variaciones en las condiciones de operación (Monkoondee et al., 2015; Dosuky et al., 2022). En el presente caso, aun cuando el ultrasonido modificó ligeramente algunos valores de azúcares residuales, estas variaciones no se tradujeron en cambios consistentes en la producción de ácido láctico, lo que sugiere que la cinética global estuvo dominada por la alta disponibilidad de sustrato y por la protección conferida por la matriz de inmovilización.

La presencia de PBS en el medio contribuye a mantener un pH relativamente estable durante la fermentación, lo cual es crítico para la actividad de las bacterias lácticas y, en particular, para la síntesis de ácido láctico. Estudios recientes de modelos tampón en fermentaciones vegetales han mostrado que una mayor capacidad buffer suaviza los cambios de pH y favorece una acidificación más controlada, al mismo tiempo que reduce el estrés ácido sobre las células (Breidt & Skinner, 2022). Bajo estas condiciones, es esperable que el impacto adicional de un estímulo físico moderado, como la sonicación breve, sea limitado, ya que el pH no cae tan rápidamente a valores que comprometan la viabilidad o la actividad enzimática. El ácido bórico, por su parte, puede interactuar con grupos dioles en carbohidratos y componentes de la pared celular, pero en las concentraciones empleadas se comporta principalmente como modulador del microentorno y no como un factor determinante de la velocidad de fermentación; la literatura lo asocia más con estabilidad de matrices y complejación de carbohidratos que con cambios drásticos en la acidificación láctica.

Al comparar estos resultados con otros trabajos donde se aplican ultrasonidos en matrices lácteas, se observa que los efectos positivos sobre la fermentación no son universales. Revisiones recientes sobre el uso de ultrasonido en la industria láctea señalan que esta tecnología puede acelerar la acidificación y modificar el metabolismo de bacterias lácticas, pero también que, dependiendo de la potencia, frecuencia y tiempo, el resultado puede ser neutro o incluso inhibitorio (Akdeniz &

Akalın, 2020). La combinación de una matriz hidrolizada rica en azúcares simples, con alta capacidad buffer (PBS) y células inmovilizadas en alginato conforma un sistema muy robusto, en el que las ventajas potenciales de la sonicación moderada quedan enmascaradas por la propia eficiencia de la fermentación.

En conjunto, los datos indican que, en suero lácteo hidrolizado con células de *L. plantarum* inmovilizadas y adicionado con PBS y ácido bórico, el ultrasonido aplicado durante la inducción no modificó de manera sustancial la producción de ácido láctico ni la utilización de los carbohidratos disponibles. La inmovilización aportó protección y estabilidad metabólica, el medio hidrolizado aseguró una rápida disponibilidad de sustrato y el sistema tampón limitó los cambios bruscos de pH. Bajo este escenario, el ultrasonido en las condiciones empleadas no alcanzó el umbral necesario para generar una bioestimulación observable, pero tampoco produjo daño metabólico evidente, de modo que el perfil fermentativo se mantuvo comparable al control.

En la Figura 17, se presenta la cuantificación de metabolitos en permeado de suero lácteo fermentado por *L. plantarum* inmovilizado en perlas de alginato de sodio y sometidos a tratamiento ultrasónico y como control sin tratamiento ultrasónico previo a la inoculación. Se detectó lactosa residual de aproximadamente 1 g/L, no se encontraron diferencias significativas al inicio de la fermentación en los azúcares cuantificados. Se observaron cambios en la concentración de lactosa, glucosa, galactosa y ácido láctico a lo largo del tiempo, lo cual concuerda con comportamientos reportados en la literatura para este tipo de fermentaciones. No se encontraron diferencias significativas en el perfil de los azúcares presentes en el permeado durante la fermentación. La producción de ácido láctico se ve favorecida por el tratamiento de ultrasonido a las 24 horas de fermentación, sin embargo, este efecto no persiste a las 48 horas.

Durante la fermentación, se evidenció un consumo progresivo de lactosa y un aumento del ácido láctico, alcanzando valores de 39.7 g/L para el control y 32.1 g/L con ultrasonido a las 48 h. Este comportamiento coincide con lo reportado por (Vera-

Peña et al., 2022), quienes describen que *L. plantarum* puede metabolizar de manera simultánea glucosa y lactosa mediante una cinética doble Monod, sin inhibición por el producto.

El incremento en ácido láctico indica una fermentación láctica activa, consistente con el metabolismo homofermentativo de *L. plantarum* (Danova et al., 2023).

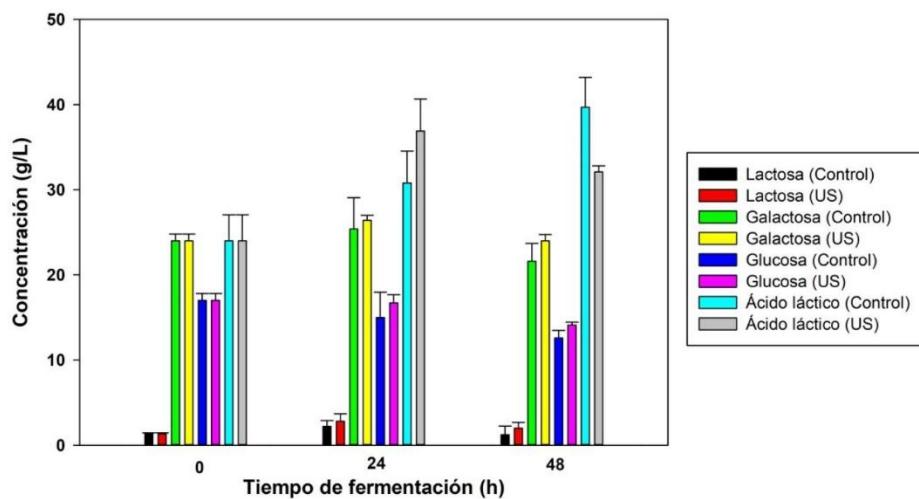


Figura 17. Cinética de fermentación por *L. plantarum* inmovilizado en permeado de suero lácteo con y sin ultrasonido durante la inducción. Los resultados están expresados como las medias  $\pm$  DE.

El tratamiento con ultrasonido puede inducir cambios fisiológicos que favorecen la producción de metabolitos en las primeras etapas de fermentación, pero una exposición prolongada puede generar estrés celular, lo que explicaría la menor producción de ácido láctico a las 48 horas en comparación con el control. Este efecto fue también descrito por Chen et al. (2023), quienes observaron que intensidades moderadas de ultrasonido mejoran el metabolismo y consumo de azúcares en *L. plantarum*, mientras que intensidades altas pueden afectar la viabilidad celular.

El permeado de suero lácteo es una fuente rica en lactosa y galactosa, adecuada para el crecimiento de *L. plantarum*. Estudios previos muestran que este sustrato

puede ser eficientemente utilizado por cepas de *L. plantarum* para producir ácido láctico y metabolitos funcionales (Golowczyc et al., 2013). La inmovilización celular, además, favorece la estabilidad del proceso y la reutilización del biocatalizador, mejorando la productividad y reduciendo la acumulación de subproductos (Norton et al., 1994).

El presente estudio evaluó de manera integral el efecto del ultrasonido durante la inducción de células, el comportamiento fermentativo de *L. plantarum* libre e inmovilizado y el uso de suero lácteo y permeado como sustratos reales, generando información relevante sobre viabilidad, permeabilidad celular y cinética de consumo de carbohidratos. No obstante, el trabajo presenta limitaciones importantes: la cuantificación de lactosa mostró comportamientos no fisiológicos probablemente asociados a interferencias analíticas; solo se evaluaron dos amplitudes y dos tiempos de ultrasonido; y los ensayos se realizaron a escala de laboratorio con una sola cepa, lo que restringe la extrapolación industrial y la generalización de los resultados. Estas limitaciones abren oportunidades para estudios futuros orientados a optimización de parámetros, caracterización enzimática y validación en condiciones piloto.

## VIII. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que *Lactiplantibacillus plantarum* posee una elevada capacidad fermentativa y una notable estabilidad metabólica frente a variaciones en la composición del medio, la inmovilización celular y la aplicación de ultrasonido. En medios sintéticos, mostró un patrón consistente de consumo de glucosa como sustrato preferente, seguido de una utilización parcial de galactosa, mientras que la lactosa permaneció prácticamente sin cambios. La producción de ácido láctico se mantuvo como el principal producto metabólico, alcanzando concentraciones elevadas y reflejando la naturaleza homofermentativa de la especie.

La presencia de PBS en el medio se identificó como el factor más determinante en la mejora de la cinética fermentativa, al proporcionar un ambiente químicamente estable que favoreció la conversión sostenida de azúcares y la acumulación de ácido láctico, al tiempo que redujo la inhibición asociada a la acidificación. En contraste, los cofactores como manganeso o ácido bórico mostraron efectos secundarios y limitados sobre la velocidad o rendimiento de la fermentación.

El uso de células inmovilizadas en alginato incrementó la estabilidad y eficiencia del proceso, permitiendo una conversión más uniforme y una mayor tolerancia a las condiciones de estrés. La inmovilización actuó como un sistema protector que mantuvo la viabilidad y la actividad metabólica, especialmente en fermentaciones prolongadas o con medios complejos como el suero y el permeado de suero lácteo.

Respecto al ultrasonido, tanto en cultivos libres como inmovilizados, los resultados indicaron que su aplicación en intensidades moderadas y tiempos cortos no modificó significativamente la producción de ácido láctico ni el consumo de carbohidratos. En algunos casos se observó una ligera estimulación inicial, pero sin efecto sostenido a lo largo del tiempo. En general, la respuesta de *L. plantarum* fue neutra, reflejando su alta tolerancia fisiológica y la robustez de su metabolismo. Además, la estabilidad

del pH y la disponibilidad inmediata de azúcares simples en medios hidrolizados probablemente amortiguaron cualquier posible efecto de bioestimulación acústica.

En conjunto, los resultados confirman que *L. plantarum* es un microorganismo altamente adaptable, capaz de mantener una fermentación eficiente en diversos entornos, incluso bajo condiciones físicas moderadamente perturbadas. La inmovilización celular y la capacidad tampón del medio se consolidan como estrategias efectivas para optimizar la fermentación, mientras que la sonicación, en las condiciones estudiadas, no representa una herramienta determinante para mejorar el rendimiento fermentativo, además el permeado de suero lácteo es una fuente rica en lactosa y galactosa, adecuado para el crecimiento de *L. plantarum* por lo cual podría utilizarse como sustrato para generación de metabolitos.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., De Jesús Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S. L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
- Abesinghe, A., Vidanarachchi, J., Islam, N., & Karim, M. (2022). Effects of ultrasound on the fermentation profile and metabolic activity of lactic acid bacteria in buffalo's (*Bubalus bubalis*) milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 79, 103048. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103048>
- Akdeniz, V., & Akalın, A. S. (2020). Recent advances in dual effect of power ultrasound to microorganisms in dairy industry: activation or inactivation. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 62(4), 889-904. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1830027>
- Andiç, S., & Oğuz, Ş. (2022). Lactose and Lactose Derivatives. *Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 10(6), 1130–1137. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i6.1130-1137.4935>
- Anthony, A., Skinner, C., Katare, N., Guydan, D., Johanningsmeier, S., & Breidt, F. (2025). Development of a Synthetic Medium to Investigate the Role of Buffer Capacity and Metabolites on the Fermentation Chemistry of Cucumber Juice. *Journal of Food Protection*, 88(9), 100580. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2025.100580>
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: An approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Behzadnia, A., Moosavi-Nasab, M., Tiwari, B. K., & Setoodeh, P. (2020). *Lactobacillus plantarum*-derived biosurfactant: Ultrasound-induced production and

- characterization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 65, 105037. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105037>
- Bevilacqua, A., Speranza, B., Campaniello, D., Racioppo, A., Accettulli, A., De Santis, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2024). Effect of ultrasound-attenuation on technological and functional properties of two strains of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from table olives. *Ultrasonics Sonochemistry*, 110, 107057. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2024.107057>
- Bhargava, N., Mor, R. S., Kumar, K., & Sharanagat, V. S. (2021). Advances in application of ultrasound in food processing: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105293. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105293>
- Bintsis, T., & Papademas, P. (2023). Sustainable approaches in whey cheese production: A review. *Dairy*, 4(2), 249–270. <https://doi.org/10.3390/dairy4020018>
- Bolívar-Jacobo, N. A., Reyes-Villagrana, R. A., Espino-Solís, G. P., Rentería-Monterrubio, A. L., Arévalos-Sánchez, M. M., Sánchez-Vega, R., Santellano-Estrada, E., Chávez-Flores, D., & Chávez-Martínez, A. (2023). The effects of high-intensity ultrasound on fermentative activity and kinetic growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus helveticus*. *Fermentation*, 9(4), 356. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040356>
- Bosma, E. F., Rau, M. H., Van Gijtenbeek, L. A., & Siedler, S. (2021). Regulation and distinct physiological roles of manganese in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab028>
- Breidt, F., & Skinner, C. (2022). Buffer Models for pH and Acid Changes Occurring in Cucumber Juice Fermented with *Lactiplantibacillus pentosus* and *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal Of Food Protection*, 85(9), 1273-1281. <https://doi.org/10.4315/jfp-22-068>
- Buchanan, D., Martindale, W., Romeih, E., & Hebishy, E. (2023). Recent advances in whey processing and valorization. *International Journal of Dairy Technology*, 76(2), 291–312. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12935>
- Bylund, G. (1995). *Dairy Processing Handbook*. Teknotext AB.

- Chen, J., Wang, Q., Wu, Y., Wu, Y., Sun, Y., Ding, Y., Wei, Z., Manickam, S., Pan, S., Yang, J., & Tao, Y. (2023). Ultrasound-assisted fermentation of ginkgo kernel juice by *Lactiplantibacillus plantarum*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 99, 106587. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106587>
- Chen, P., Hong, Z., Cheng, C., Ng, I., Lo, Y., Nagarajan, D., & Chang, J. (2020). Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 using microalgae as feedstock. *Bioresource Technology*, 308, 123266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123266>
- Chen, Q., Xu, W., Wu, H., Guang, C., Zhang, W., & Mu, W. (2021). D-galactose utilization through microbial fermentation and enzyme-catalyzed conversion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(19), 7161–7170. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11568-5>
- Conte, F., Van Buuringen, N., Voermans, N. C., & Lefeber, D. (2021). Galactose in human metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(8), 129898. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.129898>
- Costa, M. A., Kuhn, D., Schmitz, C., Lehn, D. N., & De Souza, C. F. V. (2025). Ultrasound-assisted Fermentation by Lactic Acid Bacteria: Effects on the Technological, Sensory, and Microbiological Characteristics of Ricotta Cheese. *Food And Bioprocess Technology*, 18(8), 7633-7645. <https://doi.org/10.1007/s11947-025-03917-3>
- Cui, Y., Wang, M., Zheng, Y., Miao, K., & Qu, X. (2021). The carbohydrate metabolism of *Lactiplantibacillus plantarum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13452. <https://doi.org/10.3390/ijms222413452>
- Dagher, S. F., Ragout, A. L., Siñeriz, F., & Bruno-Bárcena, J. M. (2010). Cell Immobilization for Production of Lactic Acid. *Advances In Applied Microbiology*, 71, 113-148. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(10\)71005-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(10)71005-4)
- Dahroud, B. D., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Hamishehkar, H., Bialvaei, A. Z., Yousefi, M., & Kafil, H. S. (2016). Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp.*casei* ATTC 39392.

- International Journal Of Biological Macromolecules*, 86, 462-467.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.103>
- Diaz-Negrete, N. I., Montfort, G. R. C., Cueto-Wong, C., López-Fernández, S. G., & Balandrán-Quintana, R. R. (2025). Encapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* Using Lactoferrin and Alginate: Layer-by-Layer Coating and Dual Coating Air Brush Approaches for Enhanced Stability. *Dairy*, 6(3), 27. <https://doi.org/10.3390/dairy6030027>
- Dische, Z., & Borenfreund, E. (1951). A spectrophotometric method for detection of keto sugars and trioses. *Journal of Biological Chemistry*, 192(2), 583–587. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)77782-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)77782-5)
- Dominici, S., Marescotti, F., Sanmartin, C., Macaluso, M., Taglieri, I., Venturi, F., Zinnai, A., & Facioni, M. S. (2022). Lactose: Characteristics, applications, and substitutions. *Foods*, 11(10), 1486. <https://doi.org/10.3390/foods11101486>
- Dosuky, A. S., Elsayed, T. R., Yousef, E. T., Barakat, O. S., & Nasr, N. F. (2022). Isolation, identification, and application of lactic acid-producing bacteria using salted cheese whey substrate and immobilized cells technology. *Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology*, 20(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00316-5>
- Erkmen, O., & Bozoğlu, T. F. (2016). *Food Microbiology: Principles into Practice*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119237860>
- FAO. (2023). *Dairy Market Review – Emerging trends and outlook 2023*.
- Fu, X., Belwal, T., Cravotto, G., & Luo, Z. (2020). Sono-physical and sonochemical effects of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104726. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104726>
- Gholamhosseinpour, A., & Hashemi, S. M. B. (2018). Ultrasound pretreatment of fermented milk. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1). <https://doi.org/10.1111/jfpe.12930>
- Gholamhosseinpour, A., Hashemi, S. M. B., & Mazydi, H. K. (2025). Ultrasound-enhanced fermentation by *L. helveticus*. *Food Chemistry X*, 29, 102724. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102724>

- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. (1995). Prebiotics concept. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. <https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401>
- Gibson, G. R., Hutkins, R. W., et al. (2017). ISAPP consensus on prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Golowczyc, M., Vera, C., Santos, M., Guerrero, C., Carasi, P., Illanes, A., Gómez-Zavaglia, A., & Tymczyszyn, E. (2013). Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. *Journal Of Dairy Research*, 80(3), 374-381. <https://doi.org/10.1017/s0022029913000356>
- Guerrero, C., & Illanes, A. (2016). Enzymatic production of lactose-derived prebiotics. In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802724-0.00006-8>
- Guerrero-Wyss, M., Agüero, S. D., & Angarita, L. (2018). D-Tagatose as functional food. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8718053>
- Hashemi, S. M. B., & Gholamhosseinpour, A. (2020). Effect of ultrasound and fermentation on goat milk bioactivities. *International Journal of Food Science & Technology*, 55, 2642–2649. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14517>
- Jagtap, S. S., Bedekar, A. A., Liu, J. J., Jin, Y. S., & Rao, C. V. (2019). Galactitol production from galactose. *Biotechnology for Biofuels*, 12. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1586-5>
- Jayamuthunagai, J., Srisowmeya, G., Chakravarthy, M., & Pennathur, G. (2017). D-Tagatose production using immobilized *L. plantarum*. *Bioresource Technology*, 235, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.123>
- Johnson, N. A. N., Adade, S. y. S., Ekumah, J., Li, Y., Betchem, G., Issaka, E., & Ma, Y. (2023). Efficacy of Ultrasound-Assisted Lactic Acid Fermentation and Its Effect on the Nutritional and Sensory Quality of Novel Chickpea-Based Beverage. *Fermentation*, 9(6), 495. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060495>
- Kacaribu, A. A., & Darwin, D. (2024). Biotechnological lactic acid production. *BioTechnologia*, 105(2), 179–194. <https://doi.org/10.5114/bta.2024.139757>

- Karwowski, M. S. M., Kassuia, Y. S., Turchenski, D. G., De Oliveira Aust, A. C. C., & De Macedo, R. E. F. (2024). Novel immobilization of *L. plantarum*. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/10820132231224240>
- Khokhlova, T. D., Wang, Y., Son, H., Totten, S., Whang, S., & Hwang, J. H. (2023). Chronic effects of pulsed high intensity focused ultrasound aided delivery of gemcitabine in a mouse model of pancreatic cancer. *Ultrasonics*, 132, 106993. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2023.106993>
- Kim, S., Singh, D., ... & Lee, C. H. (2023). Strain-specific metabolomic diversity of *L. plantarum*. *Food Microbiology*, 116, 104364. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104364>
- Lapponi, M. J., Méndez, M. B., Trelles, J. A., & Rivero, C. W. (2022). Cell immobilization strategies. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 33, 100565. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100565>
- Lee, H., Jeong, D., Im, S., & Jang, A. (2020). Optimization of alginate bead size. *Bioresource Technology*, 302, 122891. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122891>
- Levin, G. V. (2002). Tagatose, new GRAS sweetener. *Journal of Medicinal Food*, 5(1), 23–36. <https://doi.org/10.1089/109662002753723197>
- Liu, Y., Liang, M., & Tsai, Y. (2018). New perspectives of *L. plantarum* as a probiotic. *Journal of Microbiology*, 56(9), 601–613. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-8079-2>
- Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F., & El-Sayed, H. S. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Helijon*, 6(3), e03541. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03541>
- Miao, P., Wang, Q., Ren, K., Zhang, Z., Xu, T., Xu, M., Zhang, X., & Rao, Z. (2023). Biocatalytic pathways for D-tagatose production. *Catalysts*, 13(11), 1437. <https://doi.org/10.3390/catal13111437>

- Misselwitz, B., Butter, M., Verbeke, K., & Fox, M. (2019). Update on lactose malabsorption. *Gut*, 68(11), 2080–2091. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318404>
- Monkoondee, S., Kuntiya, A., Chaiyaso, T., Leksawasdi, N., Techapun, C., Kawee-Ai, A., & Seesuriyachan, P. (2015). Treatability of cheese whey for single-cell protein production in nonsterile systems: Part I. Optimal condition for lactic acid fermentation using a microaerobic sequencing batch reactor (microaerobic SBR) with immobilized *Lactobacillus plantarum* TISTR 2265 and microbial communities. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(4), 392-398. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1045613>
- Muñoz, R., Viveros, N., Bevilacqua, A., Pérez, M. S., & Arévalo-Villena, M. (2021). Effects of ultrasound treatments on wine microorganisms. *Ultrasonics Sonochemistry*, 79, 105775. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105775>
- NCBI. (2023). Gene ID: 77216582; *araA* L-arabinose isomerase [*L. plantarum*].
- Nguyen, T. H., Hun, C., ... & Kim, S. (2016). Galactose-adapted yeasts for bioethanol. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1259–1266. <https://doi.org/10.4014/jmb.1602.02019>
- Norton, S., Lacroix, C., & Vuillemand, J. (1994). Reduction of Yeast Extract Supplementation in Lactic Acid Fermentation of Whey Permeate by Immobilized Cell Technology. *Journal Of Dairy Science*, 77(9), 2494-2508. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(94\)77191-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)77191-5)
- OECD/FAO. (2019). *OECD-FAO Agricultural Outlook*.
- Oh, D. K. (2007). Tagatose: Properties and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0981-1>
- Panghal, A., Patidar, R., ... & Sindhu, N. (2018). Whey valorization. *Nutrition & Food Science*, 48(3), 520–535. <https://doi.org/10.1108/nfs-01-2018-0017>
- Patra, F., Tomar, S. K., & Arora, S. (2009). Low-calorie sweeteners from LAB. *Journal of Food Science*, 74(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.01005.x>

- Peyer, L. C., Bellut, K., Lynch, K. M., Zarnkow, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., & Arendt, E. K. (2017). Buffering capacity in wort fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(4), 497–505. <https://doi.org/10.1002/jib.447>
- Plaza-Vinuesa, L., Sánchez-Arroyo, A., Moreno, F. J., De las Rivas, B., & Muñoz, R. (2023). Dual GH1 enzymes for lactose metabolism in *L. plantarum* WCFS1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(28), 10693–10700. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01158>
- Qiao, N., Wittouck, S., ... & Gänzle, M. G. (2022). Taxonomy of *Lactobacillaceae*. *JDS Communications*, 3(3), 222–227. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>
- Racioppo, A., Speranza, B., Altieri, C., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., & Bevilacqua, A. (2023). Ultrasound increases biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1094671>
- Radosavljević, M., Lević, S., Belović, M., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., Mojović, L., & Nedović, V. (2019). Immobilization of *L. rhamnosus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(2), 315–322. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02228-0>
- Radziejewska-Kubzdela, E., Kidoń, M., Kowiel, A., Waszkowiak, K., Szymandera-Buszka, K., Bednarek, M., Kuligowski, M., Kobus-Cisowska, J., & Mierzwa, D. (2024). The Effect of Ultrasound and Lactic Acid Fermentation on the Selected Quality Parameters and Bioactive Compounds Content in Fermented Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Molecules*, 29(23), 5586. <https://doi.org/10.3390/molecules29235586>
- Rizzi, F., Juan, B., Espadaler-Mazo, J., Capellas, M., & Huedo, P. (2024). Stability of *L. plantarum* KABP051 in fruit juices. *Foods*, 13(23), 3851. <https://doi.org/10.3390/foods13233851>
- Rocha, J. M., & Guerra, A. (2020). Valorization of lactose and derivatives. *European Food Research and Technology*, 246, 2161–2174. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03580-2>
- Roy, S., & Dhaneshwar, S. (2023). Role of probiotics and prebiotics in IBD. *World Journal of Gastroenterology*, 29(14), 2078–2100. <https://doi.org/10.3748/wjg.v29.i14.2078>

- Roy, S., Chikkerur, J., & Samanta, A. (2018). Tagatose as nutraceutical. *Journal of Food Science*, 83(11), 2699–2709. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14358>
- Salonen, N. J., Nyssölä, A., Salonen, K., & Turunen, O. (2012). L-arabinose isomerase from *Bifidobacterium longum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(2), 392–405. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9783-8>
- Sánchez, P., Hernández, R. M., Pedraz, J. L., & Orive, G. (2013). Encapsulation of cells in alginate gels. In *Methods in Molecular Biology*, 313–325. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_21)
- Santos, F. V. D., Santos, V. J. S. V., Lyon, J. P., & Moreira, L. M. (2012). Galactose chemistry. In *Food and Nutritional Components in Focus*, 86–100. <https://doi.org/10.1039/9781849734929-00086>
- SE. (2012). *Análisis del sector lácteo*. México.
- Secretaría de Salud. (2010). *NOM-243-SSA1-2010*.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Probiotic potential of *L. plantarum*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Shiwa, Y., Fujiwara, H., Numaguchi, M., Abdel-Rahman, M. A., ... & Shimizu-Kadota, M. (2020). Transcriptome of carbon catabolite repression in *Enterococcus mundtii*. *PLoS ONE*, 15(11), e0242070. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242070>
- Shokri, S., Terefe, N. S., Shekarforoush, S. S., & Hosseinzadeh, S. (2021). Ultrasound-assisted fermentation of *L. brevis*. *Chemical Engineering and Processing*, 166, 108470. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108470>
- SIAP. (2020). *Boletín de leche*. México.
- SIAP. (2023). *Panorama Agroalimentario 2023*. México.
- SIAP. (2024). Escenario mensual de productos agroalimentarios. México.
- Siezen, R. J., & Van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2011). Genomic diversity of *L. plantarum*. *Microbial Cell Factories*, 10(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-s1-s3>

- Son, S. B., Koh, J. H., ... & Kim, Y. (2019). Symbiotic effect of *L. rhamnosus* and tagatose. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 2844–2853. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15013>
- Soumati, B., Atmani, M., Benabderrahmane, A., & Benjelloun, M. (2023). Whey valorization. *Journal of Ecological Engineering*, 24(10), 86–104. <https://doi.org/10.12911/22998993/169505>
- Speranza, B., Campaniello, D., Altieri, C., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., & Corbo, M. R. (2021). Ultrasound-treated *L. plantarum* increases acidification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 74, 105583. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105583>
- Sun, Z., Miao, T., Yin, A., Qiu, H., Xiao, Y.-Y., Li, Y., Jiang, H., & Xu, B. (2020). Fermentation optimization for L-arabinose isomerase. *Food Science and Nutrition*, 9(1), 230–243. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1989>
- Thompson, J. (1987). Regulation of sugar transport in LAB. *FEMS Microbiology Letters*, 46(3), 221–231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02462.x>
- Todorov, S. D., & De Melo Franco, B. D. G. (2010). *L. plantarum* in food production. *Food Reviews International*, 26(3), 205–229. <https://doi.org/10.1080/87559129.2010.484113>
- Tong, Y., Zhai, Q., Wang, G., Zhang, Q., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2017). Manganese starvation in *L. plantarum*. *RSC Advances*, 7, 12959–12968. <https://doi.org/10.1039/c7ra00072c>
- Tseng, H., & Yang, C. (2022). Assessment of Ultrasonic Stress on Survival and  $\beta$ -Glucosidase Activity of Encapsulated *Lactiplantibacillus plantarum* BCRC 10357 in Fermentation of Black Soymilk. *Foods*, 11(9), 1234. <https://doi.org/10.3390/foods11091234>
- Tsermoula, P., Khakimov, B., Nielsen, J. H., & Engelsen, S. B. (2021). Whey as a valuable byproduct. *Trends in Food Science and Technology*, 118, 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.025>
- Venugopal, G., Kaari, M., Baskaran, A., & Manikkam, R. (2022). Immobilization using sodium alginate. In *Springer Protocols Handbooks*, 491–494. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1\\_73](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_73)

- Vera-Peña, M. Y., Hernández-García, H., & Valencia-García, F. E. (2022). Kinetic modeling of lactic acid production, co-substrate consumptions and growth in *Lactiplantibacillus plantarum* 60-1. *DYNA*, 89(224), 50-57. <https://doi.org/10.15446/dyna.v89n224.102243>
- Villarreal, M. B., Hernández, S. L. L. C., Uriarte, S. L., & González, M. P. B. (2023). Encapsulation of *Lactiplantibacillus plantarum* and Beetroot Extract with Alginate and Effect of Capsules on Rheological Properties and Stability of an Oil-in-Water Emulsion Model Food. *Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences*, 242-252. <https://doi.org/10.31883/pjfn.s/169729>
- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., Manvi, D., & Gowda, N. N. (2022). A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, 3(1), 100248. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>
- Wang, D., Xu, R., Liu, S., Sun, X., Zhang, T., Shi, L., & Wang, Y. (2024). Enhancing probiotic stress resistance. *Food Research International*, 199, 115369. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115369>
- Wang, G., Lyu, X., Wang, L., Wang, M., & Yang, R. (2023). One-pot production of D-tagatose from D-galactose. *Food Chemistry: X*, 20, 100928. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100928>
- Wang, H., Tao, Y., Li, Y., Wu, S., Li, D., Liu, X., Han, Y., Manickam, S., & Show, P. L. (2021). Application of ultrasonication during fermentation of apple juice by *L. plantarum*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 73, 105486. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105486>
- Wang, J., Jiang, Y., Yu, P., Lee, Y. K., Liu, X., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2021). Effect of carbon catabolite repression in *Lacticaseibacillus paracasei*. *Food Bioscience*, 40, 100912. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100912>
- Wang, X., Gao, S., Yun, S., Zhang, M., Peng, L., Li, Y., & Zhou, Y. (2022). Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application. *Pharmaceuticals*, 15(5), 644. <https://doi.org/10.3390/ph15050644>

- Wang, Y., Huo, K., Gao, L., Cai, D., Wang, B., Zhao, G., Liu, J., & Hao, J. (2022). Improvement of L-lactic acid fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyvinyl alcohol/Fe3O4 composite using sweet sorghum juice. *Industrial Crops And Products*, 182, 114922. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114922>
- Xiao, Y., Chen, Q., Guang, C., Zhang, W., & Mu, W. (2019). Biological production of lactose derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3683–3691. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09755-6>
- Xu, Z., Li, C., Ye, Y., Wang, T., Zhang, S., & Liu, X. (2021). The  $\beta$ -galactosidase LacLM plays the major role in lactose utilization of *Lactiplantibacillus plantarum*. *LWT*, 153, 112481. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112481>
- Yildiz, S., Pokhrel, P. R., Unluturk, S., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2019). Identification of equivalent processing conditions for pasteurization of strawberry juice by high pressure, ultrasound, and pulsed electric fields processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 57, 102195. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102195>
- Zandona, E., Blažić, M., & Jambrak, A. R. (2021). Whey utilization. *Food Technology and Biotechnology*, 59(2), 147–161. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.02.21.6968>
- Zhang, H., Jiang, B., & Pan, B. (2006). Purification of L-arabinose isomerase producing D-tagatose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 641–646. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9274-6>
- Zhang, Q., Zheng, H., Lin, J., Nie, G., Fan, X., & García-Martín, J. F. (2023). The state-of-the-art research of the application of ultrasound to winemaking: A critical review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 95, 106384. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106384>
- Zhang, S., Guo, T., Xin, Y., Qin, L., & Kong, J. (2021). D-tagatose production using engineered *L. plantarum*. *LWT*, 142, 110995. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110995>

Zhang, S., Xu, Z., Qin, L., & Kong, J. (2020). Low-sugar yogurt using *L. plantarum* WCFS1. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3045–3054.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17347>

Zhou, Y., Su, Y., Zhang, Y., Zhu, P., Mei, Z., Zhou, X., & Yu, H. (2021). Ultrasound to promote fermentation and maturation. *Food Chemistry*, 357, 12