



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
DETERIORADORAS DE BASE PARA HELADOS”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

RAQUEL ADRIANA MONTIEL GARCIA

DIRIGIDA POR

Dra. DALIA ELIZABETH MIRANDA CASTILLEJA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 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

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS DETERIORADORAS DE BASE PARA
HELADOS”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

RAQUEL ADRIANA MONTIEL GARCIA

DIRIGIDA POR

Dra. DALIA ELIZABETH MIRANDA CASTILLEJA

SINODALES

Dra. DALIA ELIZABETH MIRANDA CASTILLEJA
DIRECTOR

Dra. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO
SINODAL

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA
SINODAL

M. en C. CINTHYA LIZBETH BRAVO PANTALEON
SINODAL

Dra. ANGÉLICA GODÍNEZ OVIEDO
SINODAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. El deterioro en los alimentos y su impacto	3
I.1.1 Deterioro físico	3
I.1.2 Deterioro químico o bioquímico	4
I.1.3 Deterioro microbiológico	5
I.2 Microorganismos causantes de deterioro en alimentos	6
I.2.1 Levaduras	6
I.2.2 Mohos	6
I.2.3 Bacterias	7
I.2.3.1 Bacterias formadoras de esporas	7
I.2.4 Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	7
I.3 Deterioro de alimentos lácteos	8
I.3.1 Microorganismos causantes de deterioro en productos lácteos	8
I.3.2 Microorganismos causantes de deterioro en productos lácteos azucarados	10
I.4 Leuconostoc spp.	11
I.4.1 Generalidades	12
I.4.2 Metabolismo	12
I.4.3 Identificación	14
I.4.4 Genotipificación o diferenciación a nivel de cepas	16
I.5 Control de BAL causantes de deterioro	17
I.5.1 Tratamiento térmico	18
I.5.2 Desinfectantes	19
I.5.3 Conservadores	19
I.6 Deterioro en planta de lácteos	21
II. OBJETIVOS	22
II.1. Objetivo general	22
II.2. Objetivos particulares	22
III. METODOLOGÍA	23
III.1 Sitio experimental	23

III.2 Material biológico	23
III.3 Activación y preparación de cepas	23
III.4 Persistencia de cepas en la planta productora mediante genotipificación RAPD	24
III.5 Capacidad de deterioro de cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. en base para helado (BH)	25
III.5.1.Cuantificación de BAL	25
III.5.2 Viscosidad	25
III.5.3 pH	26
III.6 Susceptibilidad a conservadores en formulación modelo de Base para Helados	26
III.7 Análisis estadístico	26
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
IV.1 Persistencia de genotipos aislados durante en los años 2021 y 2023	27
IV.2 Capacidad de deterioro en base para helado	31
IV.3 Susceptibilidad a conservadores dentro de la formulación de base para helado	38
V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
VI. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Productos lácteos y tipos típicos de microorganismos causantes de deterioro o actividad microbiana	9
2 Especies y subespecies del género Leuconostoc	11
3 Cepas de Leuconostoc spp. previamente aisladas y evaluadas en su capacidad de deterioro en jarabe de leche	23
4 Criterios para definir el nivel de deterioro	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Morfologías de <i>L. citreum</i> KACC 91348P.	13
2 Metabolismo general de <i>Leuconostoc</i>	14
3 Micrografías electrónicas de transmisión	15
4 Perfil RAPD de 37 cepas de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	27
5 Conglomerado Jerárquico por el método de Ward	29
6 Prueba de Tukey de los valores de crecimiento bacteriano	32
7 Prueba de Tukey de los valores de viscosidad (cSt)	33
8 Prueba de Tukey de los valores de pH	34
9 Gráfica tridimensional generada en R que representa la viscosidad, el crecimiento y el pH de las distintas cepas inoculadas en el producto	35
10 Prueba de Dunnett de crecimiento	39
11 Prueba de Dunnett de viscosidad	40
12 Prueba de Dunnett de pH	40
13 Evaluación de la capacidad de deterioro en producto adicionado con dos conservadores diferentes	42

RESUMEN

Los productos lácteos son aquellos derivados de cualquier tipo de procesamiento de la leche incluidos los productos azucarados. El deterioro de los alimentos genera importantes pérdidas económicas y contribuye de forma significativa al desperdicio de alimentos. En México, la industria del helado tiene un valor estimado de 850 millones de dólares (mdd). En la región del Bajío, una empresa dedicada a la producción de lácteos azucarados enfrenta casos de deterioro inusual, causado por *Leuconostoc* spp. En este estudio se determinó la prevalencia de algunas cepas dentro de la planta. Además, se evaluó la capacidad de deterioro de cepas previamente aisladas e identificadas en una base para helado, y se analizó la susceptibilidad de cinco de ellas —seleccionadas por su alta capacidad de deterioro— frente a dos conservadores en una formulación del mismo producto. Se detectaron aislamientos de *Leuconostoc* spp. con perfiles genéticos similares (mismo conglomerado) durante al menos dos años, lo que podría indicar una adaptación al ambiente de la planta. La capacidad de deterioro varió según la cepa ($p<0.0001$), sin correlación directa entre crecimiento, viscosidad y acidificación. Las cepas C19, C43 y C44 fueron las más deterioradoras coincidiendo con un estudio previo en otro producto de la misma planta. Además, contrastando con un estudio previo efectuado en jarabe de leche, se observó que la matriz alimentaria influye de forma diferencial en el nivel de deterioro causado por cada cepa. Finalmente, las cepas evaluadas mostraron resistencia parcial al conservador Nisina (6ppm), y aunque el conservador alternativo Lactiplus a una concentración de 0.5 % no logró prevenir completamente el deterioro, fue más efectivo, reduciendo un 7% la acidificación del producto en comparación con Nisina. Estos resultados ayudan a comprender mejor los fenómenos de deterioro en matrices alimentarias que se consideran muy estables y permitirán mejores diseños de control para prevenir el desarrollo de bacterias deterioradoras.

INTRODUCCIÓN

En 2023, la producción de leche en México alcanzó los 13,333 millones de litros, lo que representó un aumento del 1.7 % respecto al año anterior. El consumo anual per cápita fue de 133.9 litros y el país se posicionó como el 14.º productor a nivel mundial. En 2021, la elaboración de productos lácteos aportó el 9 % del PIB agroalimentario. Dentro de esta industria, la leche ocupa el primer lugar tanto en producción como en consumo, seguida por derivados como el yogur, la crema, el queso y los productos lácteos azucarados.

En contraste con este destacado crecimiento, en nuestro país en 2021 se desperdiciaron alrededor de 20.4 millones de toneladas de alimentos, de las cuales el 8% fueron productos lácteos y carnes. Una de las principales causas de este problema se debe al deterioro al que son propensos los productos lácteos, el cual provoca cambios sensoriales indeseables para el consumidor derivando en su desecho.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son uno de los principales agentes causantes del deterioro en los productos lácteos, causan acidez, sabores poco agradables y cambios en la textura como viscosidad y coagulación. Como estrategias de control ante este deterioro están las buenas prácticas de manufactura que buscan evitar o minimizar la contaminación, tratamientos térmicos como la pasteurización que reducen las poblaciones de los microorganismos deterioradores, el enfriamiento o congelación que reducen el desarrollo y el uso adecuado de sanitizantes y conservadores.

En este contexto una empresa dedicada a la producción de lácteos azucarados en la región del Bajío recurrió al cuerpo académico buscando orientación con un problema de deterioro en algunos de los lotes de su producto de base para helado y jarabe de tres leches. Derivado de esta problemática se cimentó un proyecto que derivó en una tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y el presente trabajo, el cual busca complementar la información generada con

anterioridad, aportando datos e información de la persistencia de cepas dentro de las instalaciones de la empresa, la capacidad que tienen algunas cepas para deteriorar distintos productos elaborados en la planta y la susceptibilidad de las bacterias deterioradoras frente conservadores no usados, para finalmente ofrecer a la empresa alternativas para su control y erradicación del problema.

I. ANTECEDENTES

I.1. El deterioro en los alimentos y su impacto

En 2021, según el Banco Mundial, en México se desperdiciaron alrededor de 20.4 millones de toneladas de alimentos, lo que representa aproximadamente el 34 % de la producción total de alimentos en el país. Los alimentos no consumidos constituyen un desperdicio no solo del producto en sí, sino también de los recursos empleados para su producción, lo que genera un impacto económico y ambiental significativo. Este desperdicio suele deberse al deterioro de los alimentos, el cual puede estar influenciado por diversos mecanismos y factores.

El deterioro en sí, se define como la acción o el proceso de volverse inferior en calidad, funcionamiento o condición, implica generalmente la disminución del valor o de la utilidad (Webster, 2023). En los alimentos es un proceso en el que éstos sufren un cambio sensorial que puede ser táctil, visual, olfativo o de sabor que provoca que se consideren indeseables o inaceptables para el consumo humano. Este proceso puede ser físico, químico o microbiológico (Rawat, 2015).

I.1.1 Deterioro físico

Es el deterioro de los alimentos debido a cambios físicos o inestabilidad de los ingredientes, suele presentarse con cambios en textura, nivel de humedad, granulosidad o sinéresis. Los factores clave que contribuyen al deterioro físico son el contenido de humedad, la temperatura y la cristalización. Un cambio en el contenido de agua o humedad es una causa frecuente de deterioro en los alimentos, este puede ocurrir en forma de pérdida, ganancia o migración (Amit y col., 2017).

La temperatura puede afectar el metabolismo de algunos productos, por ejemplo, bajas temperaturas pueden ejercer un efecto negativo en alimentos susceptibles a daños por congelación o daño por frío. En general, una congelación parcial en estos alimentos puede romper las células y producir deterioro, si estos se congelan lentamente o varias veces pueden experimentar cambios en la textura. En productos azucarados, por acumulación de humedad o aumento de temperatura se

puede observar la cristalización del azúcar, que puede resultar en el endurecimiento de galletas y granulosidad en dulces y helados (Amit y col., 2017).

I.1.2 Deterioro químico o bioquímico

Este deterioro se debe a reacciones químicas espontáneas que ocurren cuando los diferentes componentes que se encuentran en el alimento reaccionan entre sí o con algún componente agregado y también existen reacciones químicas causadas por enzimas. Ejemplos de esto incluyen oxidación, pardeamiento enzimático y pardeamiento no enzimático (Rebezov y col., 2021).

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos. En los tejidos vivos de plantas y animales se mantiene en equilibrio la actividad enzimática, pero ésta se altera durante la cosecha y el sacrificio, y en algunos casos las enzimas pueden causar deterioro debido a esto. La pepsina que se encuentra en el estómago de los animales y participa en el proceso de digestión después del sacrificio descompone las proteínas debilitando tejidos y haciéndolos susceptibles a contaminación microbiana. Después de la cosecha ciertas enzimas continúan catalizando los procesos bioquímicos de maduración y eventualmente provocan pudrición. Por otro lado, las enzimas oxidativas en las frutas continúan la respiración celular lo que disminuye la vida útil de frutas frescas y provocan deterioro (Singh & Desrosier, 2023).

Por otra parte, algunos pueden ser fenómenos meramente químicos, tales como la oxidación de lípidos. Esta, es una de las principales causas de deterioro de los alimentos, en la que los ácidos grasos insaturados de las grasas se oxidan lentamente frente a la exposición del oxígeno del aire, la luz y los iones metálicos; puede deberse a una auto-oxidación, foto-oxidación u oxidación enzimática. La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados genera sabor rancio o desagradable, disminuye el valor nutricional y la vida de anaquel. En el arroz, la oxidación de proteínas y lípidos reduce la calidad nutricional, provocando pérdida de sabor, color o valor. En la carne, los productos formados por la oxidación de lípidos, dañan la miosina afectando el músculo esquelético; los aldehídos producidos deterioran el

color y el sabor de la carne y generan pérdida de masa muscular (Geng y col., 2023).

También se tienen reacciones de pardeamiento no enzimático, como la reacción de Maillard, la cual tiene lugar entre los azúcares reductores y el grupo amino de las proteínas o aminoácidos presentes en el alimento. Los productos de esta reacción provocan un oscurecimiento del color, reducen la solubilidad de las proteínas y desarrollan sabores amargos; son causa de deterioro de leche en polvo, huevos en polvo y cereales para el desayuno (Singh & Desrosier, 2023).

I.1.3 Deterioro microbiológico

Este tipo de deterioro es el más frecuente y el que más pérdidas ocasiona. Se estima que alrededor del 25% de los alimentos producidos a nivel mundial se pierden debido a este tipo de deterioro (Bondi y col., 2014; Petruzzi y col. 2017).

Los cambios sensoriales desagradables en los alimentos son causados por actividad metabólica de una variedad de microorganismos que usan a los alimentos como fuentes de carbono y energía. Estos organismos pueden ser bacterias, levaduras y hongos (mohos). Cabe señalar que los alimentos deteriorados microbiológicamente podrían ser considerados seguros para su consumo, puesto que generalmente los microorganismos deterioradores no son patógenos, no obstante, debido a los cambios en su textura, sabor u olor son rechazados por el consumidor (Rawat, 2015). Adicionalmente algunos de estos microorganismos deterioradores podrían generar toxinas o compuestos tóxicos que permanecen en el alimento.

El crecimiento microbiano y la contaminación por microorganismos deterioradores pueden ocurrir durante la cosecha, el procesamiento y el envasado de los alimentos. Estos suelen ser habitantes comunes del suelo, el agua o del tracto gastrointestinal de los animales, y pueden dispersarse a través del aire y el agua. El nivel de deterioro está influenciado por factores intrínsecos del alimento que regulan el crecimiento microbiano, tales como su actividad de agua, el pH, la composición química, la carga bacteriana y el tipo de microorganismos presentes.

Factores extrínsecos, como la temperatura, la humedad relativa y la atmósfera del ambiente que rodea al alimento, también influyen de manera decisiva en la velocidad con la que se presenta el deterioro. Los efectos del deterioro microbiológico son variados y dependen del microorganismo involucrado (Karanth y col. 2023).

I.2 Microorganismos causantes de deterioro en alimentos

En un alimento deteriorado se pueden identificar múltiples especies de microorganismos presentes, pero se considera que sólo algunas son las principales responsables de la producción de los compuestos que causan malos olores y sabores (Rawat, 2015). Dentro de los tipos de microorganismos que con mayor frecuencia son responsables del deterioro de los alimentos se encuentran los siguientes.

I.2.1 Levaduras

Organismos unicelulares que a diferencia de algunos mohos no producen metabolitos secundarios tóxicos. Son anaerobios facultativos, frecuentemente colonizan alimentos con alto contenido de azúcar o sal como jarabe de arce, los encurtidos y el chucrut. *Zygosaccharomyces* que, por ejemplo, tolera altas concentraciones de azúcar y sal, produce malos olores y sabores y dióxido de carbono que provoca que los recipientes en donde se encuentran los alimentos se hinchen y exploten (Rawat, 2015).

I.2.2 Mohos

Los mohos son hongos filamentosos capaces de crecer en un rango amplio de temperaturas, son aerobios de metabolismo oxidativo, algunos géneros pueden crecer en un rango de actividad de agua de 0.62-1.0. Son los microorganismos que con mayor frecuencia deterioran los alimentos. Debido a su formación de esporas, pueden contaminar a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde los cultivos extensivos en campo hasta el consumo, incluso se ha observado que son capaces de deteriorar agua mineral embotellada (Sperber, 2009).

I.2.3 Bacterias

I.2.3.1 Bacterias formadoras de esporas

Las bacterias formadoras de esporas están frecuentemente asociadas al deterioro de alimentos tratados térmicamente, debido a que sus esporas pueden resistir altas temperaturas. Son Gram positivas, anaerobias estrictas o facultativas, pueden ser termófilas y producir sulfuro de hidrógeno o dióxido de carbono especialmente en enlatados; termófilos como *Bacillus* spp. y *Geobacillus* spp. provocan sabor agrio en alimentos enlatados (Rawat, 2015). Dentro de éstas, las anaerobias mesófilas deterioran hortalizas, causan pudrición en enlatados y producción de ácido butírico en conservas de verduras y frutas. Géneros como *Clostridium* spp. que toleran bajas temperaturas, producen gases y malos olores en carnes refrigeradas y jamones curados en salmuera, mientras que otros como *Bacillus* spp. producen malos olores y gases en alimentos y leche refrigerados y envasados al vacío (Rawat, 2015).

I.2.4 Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL son cocos y bacilos Gram positivos que usan carbohidratos como fuente de carbono al fermentar, producen principalmente ácido láctico y poseen tolerancia a pH bajo. En este grupo de bacterias se incluyen más de 60 géneros, pero los que se mencionan con frecuencia en la alteración de los alimentos son *Lactobacilli* (antiguo género *Lactobacillus*), *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Weissella*. Tienen varias características metabólicas importantes como la capacidad de producir ácido, hidrolizar proteínas, producir exopolisacáridos viscosos y la capacidad de inhibir otras bacterias. Pueden descomponer las macromoléculas de los alimentos, producen una variedad de productos como aminas, bacteriocinas y vitaminas, e incluso, son usados como probióticos para promover la salud en el organismo (Wang y col., 2021). Las bacterias ácido lácticas si bien, pueden ser útiles en la producción de alimentos fermentados, como yogur o encurtidos, son también consideradas deterioradoras. Pueden producir enverdecimiento en carnes y formación de gases en quesos,

recipientes de encurtidos o alimentos enlatados inflados debido a la producción de gases; sabores desagradables y viscosidad indeseada en algunas bebidas (Rawat, 2015).

Algunas BAL como *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp. son capaces de producir viscosidad indeseada, esto se debe a que forman polímeros a partir de polisacáridos que contienen glucosa y galactosa (Erkmen & Bozoglu, 2016a).

I.3 Deterioro de alimentos lácteos

Un 8% del desperdicio de alimentos está representado por los lácteos, como el yogur o el queso, lo que implica una pérdida de recursos, así como un impacto económico y ambiental negativo (Higuera-Albarran, 2023). Algunos factores como el exceso de este tipo de productos en las tiendas o el desecho de estos debido a que han superado su fecha de caducidad y su deterioro contribuyen a su desperdicio. Además, como otros alimentos, son susceptibles a la contaminación con deterioradores en varios puntos a lo largo del proceso continuo de producción, procesamiento y venta (Martin y col., 2021).

I.3.1 Microorganismos causantes de deterioro en productos lácteos

En el Cuadro 1, se pueden observar algunos de los principales microorganismos causantes de deterioro en diversos alimentos lácteos. Las BAL suelen ser los microorganismos deterioradores que predominan en la leche cruda y proliferan si ésta no se enfriá adecuadamente. Bacterias psicrótrofas como *Pseudomonas*, *Enterobacter* o *Alcaligenes* pueden crecer y producir olores rancios debido a la acción de lipasas o péptidos amargos debidos a las proteasas que generan (Rawat, 2015).

Los microorganismos lipolíticos inducen cambios en la grasa de la mantequilla de productos lácteos, haciendo imposible su comercialización para el consumo humano. Las bacterias proteolíticas degradan las proteínas y provocan sabor amargo y putrefacción en algunos productos. Las levaduras son contaminantes

especialmente relevantes en productos lácteos fermentados y su principal causa de deterioro (Hassan, 2019).

Cuadro 1. Productos lácteos y tipos típicos de microorganismos causantes de deterioro o actividad microbiana (Adaptado de Ledebach & Marshall, 2009).

Producto lácteo	Microorganismos causantes de deterioro o actividad microbiana
Leche cruda	Una amplia variedad de microbios diferentes
Leche pasteurizada	Psicrótrofos, formadores de esporas, degradación enzimática microbiana
Leche concentrada/condensada	Bacterias formadoras de esporas, hongos osmófilos
Leche en polvo	Degrado enzimática microbiana
Mantequilla	Psicrótrofos, degradación enzimática
Suero de leche cultivado, crema agria	Psicrótrofos, coliformes, levaduras, bacterias ácido lácticas
Queso cottage	Psicrótrofos, coliformes, levaduras, mohos, degradación enzimática microbiana
Yogur, bebidas a base de yogur	Levaduras
Otros productos lácteos fermentados	Hongos, coliformes
Queso crema, queso procesado	Hongos, bacterias formadoras de esporas
Queso suave, quesos frescos	Psicrótrofos, coliformes, hongos, bacterias ácido lácticas, degradación enzimática microbiana
Quesos madurados	Hongos, bacterias ácido lácticas, bacterias formadoras de esporas, degradación enzimática microbiana

Los mohos que deterioran productos lácteos crecen bien en baja temperatura, baja actividad de agua, pH bajo y poco oxígeno. Producen esporas termoestables que pueden contaminar después de que los productos pasan por un tratamiento térmico de pasteurización. La mayoría de las especies de mohos responsables del deterioro de los productos lácteos pertenecen a los filos *Ascomycota* y *Mucoromycota*, incluidos varios *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Geotrichum*. Entre estos mohos, se reporta con frecuencia la contaminación de los lácteos por *Penicillium* y *Mucor* (Shi & Maktabdar, 2022).

I.3.2 Microorganismos causantes de deterioro en productos lácteos azucarados

Los productos lácteos azucarados incluyen leche condensada, pudines, helado, yogures, entre otros. La leche condensada azucarada es elaborada con leche que se calienta a altas temperaturas de hasta 100 °C de 10 a 30 min y luego condensada al vacío, sólo esporas de bacterias termófilas pueden sobrevivir a tal temperatura. *Clostridium* spp. puede producir gases y provocar hinchazón de la lata, debido a que puede formar esporas anaerobias, *Bacillus* y *Clostridium* son responsables de sabor amargo en estos productos (Erkmen & Bozoglu, 2016a).

Cepas variadas de *Bacillus* spp. producen deterioro proteolítico ácido, “coagulación dulce” y destrucción de proteínas. Microorganismos como *Micrococcus* y hongos crecen debido a su tolerancia a la baja actividad de agua y desarrollan sabores desagradables, *Wallemia sebi* coagula la caseína sin producción de gas. También pueden deteriorarse debido a levaduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida famata*, entre otras, que son capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas. Si los contenedores contienen aire, mohos como *Aspergillus* y *Penicillium* pueden crecer en la superficie del producto (Erkmen & Bozoglu, 2016a)

Otro grupo microbiano, común deteriorador de estos alimentos son las BAL. Estas bacterias contribuyen a sabores desagradables “agrios” debido a que producen ácido láctico, acético y propiónico como subproducto de reacciones metabólicas. *Lactococcus lactis* le da a la leche cruda un sabor a malta debido a varios

aldehídos y alcoholes que produce. Las BAL también contribuyen al deterioro del queso en la medida en que producen olores desagradables, gases y formación de cristales blancos de lactato de calcio (Xu y col., 2020).

Cuadro 2. Especies y subespecies del género *Leuconostoc* y los ambientes a dónde están asociados (Adaptado de Holland & Liu, 2011).

Especie	Fuente primaria
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
subsp. <i>mesenteroides</i>	Plantas/quesos de leche cruda/carnes
subsp. <i>dextranicum</i>	Plantas/quesos de leche cruda
subsp. <i>Cremoris</i>	Productos lácteos
<i>Leuconostoc lactis</i>	Productos lácteos
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Carnes refrigeradas
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	Carnes refrigeradas
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Carnes refrigeradas
<i>Leuconostoc fallax</i>	Sauerkraut
<i>Leuconostoc inhae</i>	Kimchi
<i>Leuconostoc kimchi</i>	Kimchi
<i>Leuconostoc citreum</i>	Fuentes clínicas humanas
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Fuentes clínicas humanas

I.4 *Leuconostoc* spp.

El género de *Leuconostoc* se encuentra extendido en el medio ambiente y se ha aislado de materia vegetal, fuentes clínicas humanas y alimentos como carnes fermentadas almacenadas en refrigeración, verduras fermentadas como chucrut y kimchi y en productos lácteos fermentados como queso o yogur (Cuadro 2). En algunos casos muy aislados se han asociado a infecciones humanas; sin embargo, las cepas que las causan son consideradas como oportunistas en individuos

inmunocomprometidos y en general *Leuconostoc* spp. es “generalmente reconocido como seguro” (GRAS) (Holland & Liu, 2011).

I.4.1 Generalidades

Por lo general *Leuconostoc* spp. son cocos mesófilos (su crecimiento óptimo se encuentra a los 25-30 °C), Gram positivos, catalasa negativos, inmóviles, aerotolerantes y a menudo elipsoidales, suelen presentarse en cadenas (Figura 1). Son microorganismos nutricionalmente exigentes dado que requieren una fuente de aminoácidos y vitaminas además de una fuente de carbono fermentable. Crecen bien en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) aunque a menudo requieren suplementos de vitaminas B, minerales y aminoácidos para crecer (Holland & Liu, 2011).

Estas BAL producen compuestos antagonistas como bacteriocinas cuando compiten con la microbiota local, al agotar la mayoría de los nutrientes, exhiben actividades antagónicas contra patógenos y deterioradores (hongos). Varias cepas de *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *L. gelidum*, *L. mesenteroides* y *L. parmesenteroides* han mostrado actividades bacteriocinógenas. Las bacteriocinas son pequeños péptidos térmicamente estables que permeabilizan la membrana celular de cepas sensibles y se ha considerado como una posible vía para estabilizar la microbiota natural de bebidas y alimentos fermentados (Lonvaud-Funel, 2014).

I.4.2 Metabolismo

El crecimiento de *Leuconostoc* spp. depende de la fuente de carbono fermentable que se encuentre en el medio. Las enzimas clave para su metabolismo, que se encuentran presentes en todo el género, son la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la xilulosa-5 fosfocetolasa. Fermentan fructosa, pentosa, galactosa y manosa, aunque se encontró que la utilización de la rafinosa y la lactosa varía según la cepa (Shin & Han, 2015).

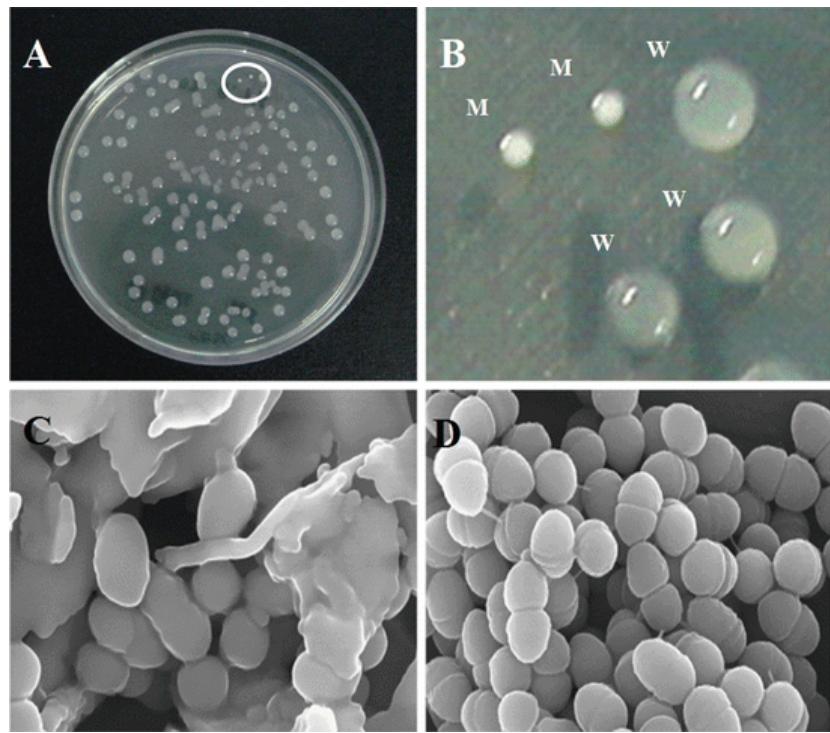
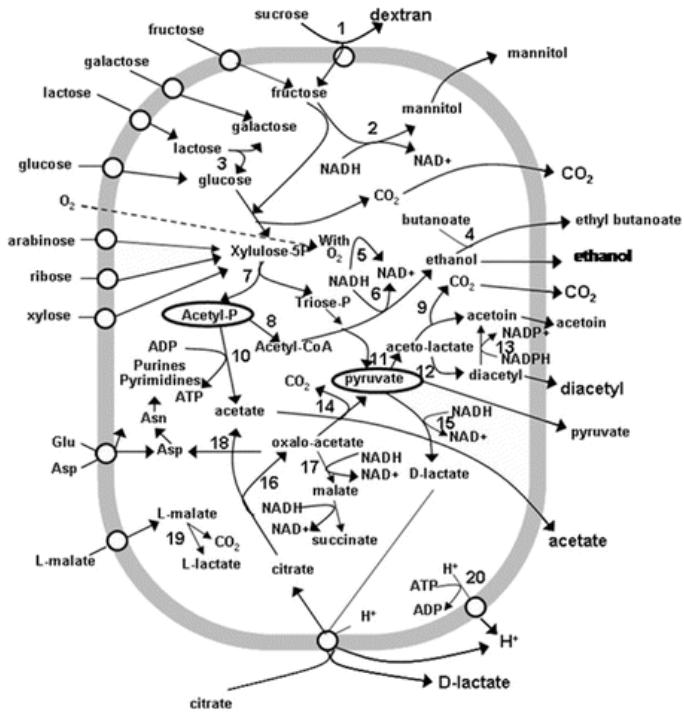


Figura 1. Morfologías de *L. citreum* KACC 91348P. (a) Colonias en medio de sacarosa-agar. (b) Colonias delimitadas de la imagen (a): W, cepa de tipo salvaje que produce dextrano; M, cepa mutante que no produce dextrano. (c) Morfología de la cepa que produce dextrano observada por SEM. (d) Morfología de la cepa que no produce dextrano según lo observado por SEM (Extraída de Jin y col., 2014).

Fermentación del citrato

Leuconostoc spp. metaboliza el citrato que se encuentra en pequeñas cantidades en la leche. La enzima citrato permeasa facilita la absorción del citrato y posteriormente este se divide en acetato y oxaloacetato. Gracias a la enzima citrato liasa, el oxaloacetato se descarboxila en piruvato y éste último se reduce a lactato y el exceso resulta en acetato, diacetilo y acetoína. El diacetilo es el responsable de dar sabor en muchos productos lácteos fermentados. El CO₂ producido es responsable de la formación de “ojos” en determinados tipos de quesos y de la efervescencia de la leche cultivada (Endo y col., 2022).



1	dextransacarasa	11	α-acetolactato sintasa
2	mannitol - deshidrogenasa	12	formación no enzimática
3	β-galactosidasa	13	diacetil reductasa
4	esterasa	14	oxalacetato descarboxilasa
5	NADH oxidasa	15	lactato deshidrogenasa
6	alcohol deshidrogenasa	16	citrato liasa
7	fosfocetolasa	17	malato deshidrogenasa
8	fosfotransacilasa	18	formación de aspartato
9	α-acetolactato descarboxilasa	19	enzima maloláctica
10	acetato quinasa	20	ATPasa

Figura 2. Metabolismo de *Leuconostoc*. (Adaptada de Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).

Fermentación primaria

Leuconostoc spp. carecen de citocromos funcionales y de algunas enzimas del ciclo de Krebs por lo que utilizan la vía heterofermentativa para metabolizar hexosas como glucosa y galactosa para producir D(-)-lactato, etanol y CO₂ como productos finales. En presencia de acetaldehído, fructosa y piruvato en lugar de etanol se forma ácido acético y ATP adicional. Algunas cepas, en presencia de sacarosa en el medio, producen una dextransacarasa extracelular que cataliza la formación de dextranos, estas reacciones pueden producir viscosidad indeseada u ofrecer aplicaciones texturales y posiblemente funcionales (prebióticas) en alimentos fermentados. Estos exopolisacáridos facilitan la formación de biopelículas bacterianas facilitando la supervivencia al tracto gastrointestinal o condiciones inhóspitas (Endo y col., 2022).

I.4.3 Identificación

Tradicionalmente la identificación de bacterias se ha realizado mediante métodos de cultivo dependientes (Franco-Duarte y col., 2019). Las BAL son bacterias exigentes que necesitan de medios de cultivo complejos, regularmente se formulan

conteniendo diversos carbohidratos (dextrosa, sacarosa, maltosa o lactosa), diversas fuentes de nitrógeno (peptona, extracto de levadura, etc.), minerales y agentes tampón. Los medios de cultivo comúnmente usados son el agar MRS y M17 (Hayek y col., 2019).

La microscopía es otra técnica tradicional y una herramienta esencial para la identificación microbiana. Las imágenes obtenidas por microscopía, como las que se muestran en la Figura 3, permiten analizar la forma, agrupación, reacción ante ciertos colorantes o tinciones, el movimiento y otros rasgos que, en conjunto, aportan información para la identificación y clasificación de los microorganismos. Actualmente, la observación microscópica todavía se utiliza, sin embargo, por sí sola, no es suficiente para una certera identificación (Franco-Duarte y col., 2019).

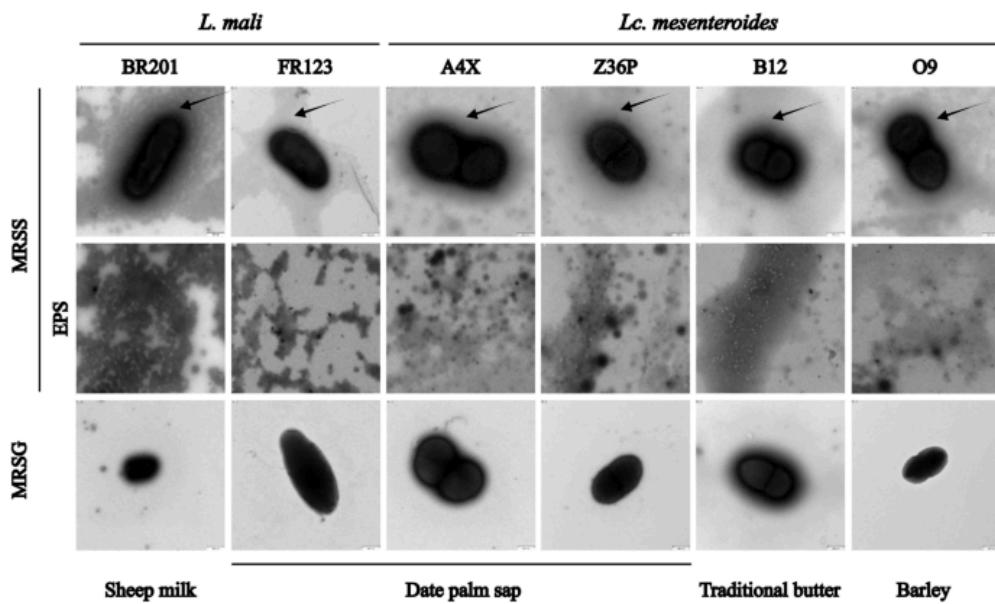


Figura 3. Mediante MET se observó la producción de exopolisacáridos por BAL en colonias cultivadas en medios sólidos. Las flechas señalan los exopolisacáridos asociados a las células cultivadas en presencia de sacarosa (Extraída de Zarour y col. 2024).

Así mismo, algunas reacciones bioquímicas, se han usado por décadas para identificar microorganismos aislados de diferentes materiales. Por ejemplo, pruebas simples, como la de catalasa, oxidasa y utilización de sustratos, junto a métodos de

tinción como la de Gram y la de Ziehl-Neelsen, son pruebas tradicionales que permiten identificar grupos microbianos, géneros y hasta especies (Moore, 2021).

Si bien estas técnicas tradicionales constituyeron un precedente importante para el estudio y clasificación de los microorganismos e incluso son técnicas que son usadas ampliamente hoy día, en las últimas décadas el avance de las técnicas moleculares ofrece métodos más precisos y rápidos, estas se basan en el análisis de material genético como el ADN y el ARN y permiten obtener una identificación y caracterización más específica, en comparación con los métodos tradicionales.

Por ejemplo, la amplificación del gen 16S rRNA, empleando los cebadores universales 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3'), seguida de su secuenciación, es uno de los métodos más usados para la identificación de bacterias a nivel de especie (Kaur y col. 2017; Hou y col., 2018). Otros, como los cebadores universales 239 (5'-CTGAAGCGGA-3') y KAY3 (5'-CTGGCGACTG-3'), se han reportado en la literatura para la identificación de *Leuconostoc* y BAL (Sharma y col., 2016; Sharma y col., 2019).

I.4.4 Genotipificación o diferenciación a nivel de cepas

La genotipificación de bacterias es una herramienta que permite investigar las relaciones y diferencias entre cepas individuales de una misma especie, e incluso se puede usar para estudiar la estructura y dinámica de la población bacteriana (Nykrýnová y col., 2022). La genotipificación es una estrategia para caracterizar especies, discriminando a nivel de cepa, tanto fenotípica como genéticamente, ésta juega un papel importante para evaluar diferencias potenciales. Por años se ha usado la tipificación tradicional (serotipos, biotipos y fagotipos) pero actualmente se prefiere a nivel molecular debido a su especificidad (Al-Obaidi y col., 2018).

Entre las técnicas de genotipificación, se incluye la de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP por sus siglas en inglés). Esta consiste en fragmentar el ADN mediante endonucleasas, o enzimas de restricción y posteriormente mediante PCR los fragmentos se amplifican y se separan con una

electroforesis, lo que permite visualizar patrones de diferente número y tamaño de los fragmentos obtenidos (Ochoa-Díaz y col., 2017).

Otra técnica es la de Electroforesis en Gel de Campos Pulsados (PFGE por sus siglas en inglés). En ésta, mediante el uso de dos campos eléctricos que alternan su actividad y generan “pulsos”, el ADN migra en un gel de agarosa gradualmente, separando fragmentos generados previamente mediante la digestión del ADN por enzimas de restricción. Esta electroforesis permite la separación de dichos fragmentos que finalmente se teñirán y visualizarán bajo luz UV (Ochoa-Díaz y col., 2017).

La Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés) es una técnica basada en PCR que utiliza cebadores que se unen y amplifican sitios no específicos del ADN. Los amplicones generados azarosamente migran en un gel de agarosa y revelan patrones de bandas (Chatterjee & Raval, 2019). La RAPD resulta conveniente para identificar y caracterizar algunas cepas bacterianas; varios estudios han reportado el éxito en el uso de esta técnica para la diferenciación de cepas de *Leuconostoc* spp. (Kaur y col., 2017). En concreto, el cebador específico 1299 [5'- (AGCT)CC(AG)TC(CT)TG(AGCT)CC(AG)AA(AG)TA(AGCT)ACCCA -3'], diseñado a partir de la región C-terminal del gen de la dextranasa B-1299 (enzima responsable de la producción de dextrano en *Leuconostoc* spp.), se ha reportado como una estrategia exitosa para la diferenciación de cepas *Leuconostoc* spp. productoras del polímero (Frausto y col., 2015)

I.5 Control de BAL causantes de deterioro

Los microorganismos causantes de deterioro están ampliamente distribuidos en el agua, el suelo y el aire; aunque resulta casi imposible evitar su ingreso a los alimentos, el primer aspecto a vigilar son las buenas prácticas de fabricación y procesamiento de los alimentos. Particularmente, el saneamiento y la higiene permite prevenir o reducir al máximo la contaminación de microorganismos deterioradores.

Existen tecnologías de procesamiento que eliminan o reducen la carga microbiana. Además de los tratamientos térmicos, ampliamente reconocidos como la pasteurización, se incorporan algunas “nuevas” tecnologías, tales como las altas presiones, la exposición a ozono, la radiación y los campos eléctricos pulsados (Alvarez-Cisneros y col., 2025).

Finalmente, para evitar el deterioro en los alimentos es fundamental limitar el crecimiento de los microorganismos deterioradores en el producto. Esto se logra por diversas vías, una de ellas es controlando la temperatura durante su producción, almacenamiento y comercialización, es decir manteniendo cadena de frío. Esta opción no siempre es factible o bien, resulta insuficiente; es por ello que también se recurre a la adición de compuestos con efecto bacteriostático dentro de la formulación. Entre los conservadores autorizados, pero temidos por reacciones toxicológicas reconocidas en ellos, se incluyen sorbatos y benzoatos. Sin embargo, actualmente también se encuentran opciones mucho menos tóxicas como los ácidos orgánicos, las bacteriocinas (como la nisin) e incluso aceites esenciales y especias que exhiben actividad inhibidora (Eilin Doyle, 2007).

I.5.1 Tratamiento térmico

La pasteurización es un tratamiento térmico suave, cuyo objetivo principal es eliminar por completo las células vegetativas de bacterias patógenas, inactivar enzimas y reducir en general la carga microbiana de origen, este proceso también elimina una proporción significativa de microorganismos causantes de deterioro. Este proceso implica un tratamiento con una temperatura por debajo de 100 °C y los productos se enfrián rápidamente después de este (Erkmen & Bozoglu, 2016b).

Usualmente, en la pasteurización de la leche, ésta se pasa a través de un intercambiador de calor a alta temperatura, calentando hasta 72 °C durante 15 segundos y enfriando rápidamente; esta se conoce como pasteurización instantánea (HTST). La base para helado se puede pasteurizar a 71.1 °C durante 30 min o a 82.2 °C durante 16 a 20 s (Erkmen & Bozoglu, 2016b).

I.5.2 Desinfectantes

Los desinfectantes empleados en la industria alimenticia son sustancias químicas que eliminan bacterias, virus y otros microorganismos presentes en los productos alimenticios o en las superficies que los contactan. Se busca que ejerzan un efecto biocida de amplio espectro contra bacterias, hongos y virus; que sean eficientes a bajas temperaturas y económicos. No deben alterar el sabor de los alimentos ni sus propiedades, los más comunes se basan en cloro (Somengil, 2022). Los desinfectantes aprobados para usarse en superficies que se encuentran en contacto con alimentos incluyen productos con ingredientes activos como hipocloritos, dióxido de cloro, yodoforos, ácido peracético y amonio cuaternario de última generación (Imperial Dade, 2021).

El ácido peracético (PAA) o ácido peroxyacético. Es un compuesto orgánico producto de la reacción del ácido acético con peróxido de hidrógeno. Tiene numerosas aplicaciones industriales, principalmente como sanitizante en la industria alimentaria y de bebidas. Su mecanismo biocida de oxidación consiste en transferir electrones del ácido en su forma oxidada, a los microorganismos, provocando su inactivación. Sus características de buena eficacia, sin residuos tóxicos y de bajo costo relativamente hace del PAA un antimicrobiano ampliamente usado en la industria (Estornell, 2019).

I.5.3 Conservadores

Los conservadores alimenticios son aditivos específicos que previenen el deterioro causado por enzimas, microorganismos y la exposición al oxígeno. Son compuestos que se añaden de manera intencional para proteger la calidad y extender la vida útil de los alimentos y bebidas. Estos deben ser no tóxicos, solubles, no alterar las propiedades organolépticas y exhibir propiedades antimicrobianas preferentemente en un amplio rango de pH. Se usan en cantidades controladas y niveles bajos (García-García & Searle, 2016; MacDonald & Reitmeier, 2017).

El sorbato de potasio, el propionato de calcio y el benzoato de sodio son conservadores utilizados para prevenir el crecimiento microbiano y retarda los cambios de color, textura y sabor. El sorbato de potasio y el benzoato de sodio inhiben el crecimiento de mohos y levaduras, el BHA y BHT son antioxidantes que previenen el enranciamiento de las grasas (MacDonald & Reitmeier, 2017).

Los conservantes más utilizados en productos lácteos son benzoato, sorbato y natamicina. El benzoato y el sorbato tienen un fuerte efecto sobre la actividad antimicrobiana, así como sobre la calidad e inocuidad del producto. La natamicina es activa contra casi todas las levaduras y mohos (Bhatti, 2019).

La conservación utilizando antimicrobianos naturales es deseable debido a la creciente demanda de alimentos con etiqueta limpia por parte de los consumidores que prefieren los conservantes naturales sobre los químicos. Por esta razón, la nisina —un bactericida natural— se utiliza cada vez más en productos lácteos (Ibarra-Sánchez y col., 2020).

La nisina es un conservante de alimentos, bactericida natural y toxicológicamente seguro. Es un polipéptido producido durante la fermentación por *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis*, una BAL reconocida como segura. Exhibe actividad biocida contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y es particularmente eficaz contra esporas bacterianas. Por otro lado, no exhibe la misma actividad contra las Gram negativas, mohos y levaduras. Se ha demostrado que este conservante es eficaz para controlar el deterioro provocado por BAL, como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Delves-Broughton, 2014).

El fundamento del efecto antimicrobiano de la nisina se basa en la inhibición de la biosíntesis de la pared celular, el conservador se une al lípido II que es un precursor de la pared celular, conduciendo a la formación de poros y posteriormente produciendo muerte bacteriana (Ibarra-Sánchez y col., 2020).

Lactiplus es un conservador de amplio espectro y soluble en agua, resultado de la reacción del ácido propiónico y sales de sodio, es un inhibidor de diseño (Nutryplus, s. f.). El ácido propiónico es un ácido orgánico empleado como agente

antimicrobiano en productos alimenticios como lácteos. Este ácido muestra un efecto inhibidor en bacterias que lo metabolizan acumulándose en las células, bloqueando las vías metabólicas y provocando inhibición enzimática. Dependiendo de la concentración reduce el pH intracelular e inhibe el crecimiento debido a una acumulación de aniones (Ranaei y col., 2020).

También se sabe que la matriz alimentaria puede llegar a influir en la acción de los conservadores. Por ejemplo, en muchos casos la actividad antimicrobiana de los péptidos bioactivos (como la nisin) disminuye en presencia de proteínas, también la alta concentración de grasa reduce el efecto antimicrobiano debido a la interacción hidrofóbica de los péptidos y la grasa presente en el alimento que impiden la aproximación de los péptidos a las bacterias para su eliminación. Incluso el pH de la matriz puede afectar a agentes antimicrobianos que dependen de este factor (nisina, ácidos orgánicos) debido a que influye en su vía de difusión así como puede afectar su solubilidad. La nisin muestra una alta efectividad y buena solubilidad en medios más ácidos (alrededor de valores de 2.5) y pierde el efecto en matrices con un pH cercano al neutro (Wang y col., 2023).

I.6 Deterioro en planta de lácteos

Una empresa de la región dedicada a elaborar productos lácteos azucarados está presentando problemas poco comunes de deterioro en forma de viscosidad indeseada en su producto de base para helado, previamente se encontró que BAL de tipo *Leuconostoc spp.* productoras de polímeros son las responsables. Por lo que el presente proyecto pretende evaluar la persistencia de algunas cepas deterioradoras presentes en la planta durante los años 2021 y 2023, también determinar el nivel de deterioro causado por algunas cepas en base para helado y finalmente probar su susceptibilidad a conservadores para controlar el deterioro del producto

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Caracterizar genotípicamente cepas de *Leuconostoc* spp. dentro de una planta de lácteos azucarados, así como en su capacidad para deteriorar base para helados, y en su susceptibilidad a conservadores.

II.2. Objetivos particulares

- Determinar la persistencia de genotipos de cepas *Leuconostoc* spp. aislados en distintos años de muestreo (2021 y 2023) dentro de la planta de lácteos
- Evaluar la capacidad de deterioro de cepas pre-seleccionadas de *Leuconostoc* spp. en base para helado
- Evaluar la susceptibilidad de cepas seleccionadas de *Leuconostoc* a conservadores en una formulación de base para helado

III. METODOLOGÍA

III.1 Sitio experimental

La experimentación se realizó dentro de los laboratorios de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, incluidos los laboratorios de fermentaciones y fisiología de frutas y hortalizas, el de inocuidad microbiana de los alimentos y el de microbiología molecular.

III.2 Material biológico

Se trabajó con 36 cepas de *Leuconostoc* spp., 15 de ellas fueron aisladas durante el 2021 y evaluadas en su capacidad de deterioro de jarabe de leche por Bravo y col. (2024) y las restantes fueron recuperadas durante el 2023 para determinar la persistencia de cepas dentro del mismo proceso de producción (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cepas de *Leuconostoc* spp. previamente aisladas y evaluadas en su capacidad de deterioro en jarabe de leche (Bravo y col. 2024).

Clave cepa	Nivel de deterioro en Jarabe de Leche	Clave cepa	Nivel de deterioro en Jarabe de Leche
C4	Alto	C23	Intermedio
C19	Alto	C24	Intermedio
C43	Alto	C33	Intermedio
C44	Alto	C30	Alto
C1	Alto	C40	Alto
C9	Intermedio	C16	Bajo
C21	Bajo	C31	Intermedio
C6	Intermedio		

III.3 Activación y preparación de cepas

A partir de las cepas conservadas a -20 °C, se tomaron 20 µL y se inocularon en un tubo con 3 mL de caldo MRS, los cuales se incubaron durante 48 h a 30 °C para su activación. Para generar la suspensión celular de trabajo, se realizó un subcultivo con 18 h de incubación. Esto permitió alcanzar una máxima concentración de células viables (alrededor de 1x10⁹ UFC/mL). A partir de este cultivo, se realizaron

las diluciones decimales seriadas hasta alcanzar las concentraciones deseadas de trabajo para cada experimento.

III.4 Persistencia de cepas en la planta productora mediante genotipificación RAPD

A 29 cepas se les extrajo su ADN empleando un protocolo modificado de Barragán Castillo y col. (2020), como se describe a continuación. El pellet celular recolectado, se suspendió en 300 μ L de buffer TNES (Tris-HCl de 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0.5%) y se sometió a lisis térmica a 95 °C por 10 min; se centrifugó a 12,000 G por 2 min. Al sobrenadante recuperado se le añadieron 80 μ L de acetato de sodio 3M y se incubaron durante 10 min a -20 °C. Nuevamente se centrifugó (12,000 G por 2 min.), se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 300 μ L de isopropanol, incubando a -20 °C por 10 min y tras una centrifugación se agregó 1 mL de etanol al 70%, reposando 5 min a temperatura ambiente. Después de una última centrifugación el sobrenadante se eliminó, el pellet se secó en termobloque a 50 °C; y, por último, se resuspendió en 50 μ L de agua tridestilada estéril.

La caracterización genotípica se realizó mediante la técnica de RAPD utilizada por Frausto y col., 2015, empleando el cebador aleatorio 1299 (5'-(AGCT)CC(AG)TC(CT)TG(AGCT)CC(AG)AA(AG)TA(AGCT)ACCCA-3'). La amplificación se realizó con una mezcla de reacción de 13 μ L totales, que incluyeron 0.8 μ M del iniciador, 1 μ L del ADN extraído y 6.5 μ L GoTaq Master Mix 2X (Promega). La PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones

- Desnaturalización inicial: 95 °C, 1 min, seguido de 40 ciclos de:
 - Desnaturalización: 95 °C, 1 min,
 - Hibridación: 30 °C durante 1 min
 - Elongación: 72 °C durante 5 min
- Y una extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los perfiles genéticos se analizaron con una electroforesis de gel de agarosa al 1.8%, que se corrió a 100V durante 30 min. El gel se sumergió en una solución al

0.5% de bromuro de etidio por 10 min para finalmente revelarlo en un fotodocumentador Kodak Edas 290.

Los perfiles de bandeo nominales de cada cepa se analizaron mediante Image J, y a partir de éstos se realizó un análisis de conglomerados jerárquico con el método de Ward para establecer similitudes genotípicas entre las cepas.

III.5 Capacidad de deterioro de cepas de *Leuconostoc spp.* en base para helado (BH)

Se evaluó la capacidad de deterioro de las 15 cepas de *Leuconostoc spp.* previamente aisladas y caracterizadas en su capacidad para deteriorar jarabe de leche (Cuadro 3). Para ello, se inocularon 6 Log UFC/mL de cada cepa en 100 mL de BH por triplicado, y se incubaron a 10 °C durante 10 días. Se determinó la concentración de BAL, y variables físicas y químicas asociadas al deterioro, como se puntuiza a continuación.

III.5.1.Cuantificación de BAL

Para conocer la concentración de células viables antes y después de la incubación, se tomaron 100 µl de cada réplica, realizando dos diluciones seriadas y sembrando por la técnica de goteo 10 µl de cada dilución en una placa de agar MRS. Las placas se incubaron 48 h a 30 °C y posteriormente se contaron las colonias, reportando la concentración en UFC/mL.

III.5.2 Viscosidad

La viscosidad se midió mediante el uso de una copa Ford #4 (TCP SG-244, Máster Airbrush) sujetada a un soporte universal. Se llenó la copa con 50 g del producto bloqueando el orificio de salida y posteriormente liberando el líquido, registrando con ayuda de un cronómetro, el tiempo que tardó en caer de forma continua. Los resultados se expresan en centiStokes (cSt) con la siguiente fórmula (Bravo y col. 2024, Bancalari y col., 2020)

$$\text{Viscosidad (cSt)} = V = (3.7(t)) - \left(\frac{400}{t}\right)$$

$$V = \text{Viscosidad}$$
$$t = \text{tiempo de flujo (en segundos)}$$

III.5.3 pH

El pH se midió con un potenciómetro Hannah calibrado a dos puntos (4 y 7) utilizando 50 grs de la muestra.

III.6 Susceptibilidad a conservadores en formulación modelo de Base para Helados

Con 5 cepas deterioradoras (C6, C16, C30, C40 y C44) de base para helado (BH), se evaluaron dos tratamientos, uno con nisin (6 ppm), otro con Lactiplus (0.5%) y sus respectivos controles; como controles se incluyeron la BH sin conservador con cada cepa y la BH sin inocular. Se empleó BH recién fabricada, sin conservadores y proveniente de la empresa vinculada al proyecto.

Se activaron las cepas (sección 3.3) y se inoculó una concentración de 1×10^4 UFC/mL de cada cepa en 100 mL de producto, realizando cada tratamiento por triplicado. Todas las porciones (controles y tratamientos) se incubaron a 10 °C durante 10 días. Tanto al momento de la inoculación (T0) como al final de la incubación (Tf) se determinó la concentración de BAL, la viscosidad y el pH (sección 3.5).

III.7 Análisis estadístico

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, incluyendo controles pertinentes. Los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar. Se realizaron análisis de varianza (ANDEVA), pruebas de Dunnett y de Tukey para determinar la relevancia de los factores evaluados y diferencias significativas entre tratamientos, empleando la plataforma RStudio 2023.12 y el software estadístico JMP 11. Los factores evaluados, dependiendo del ensayo, incluyeron: cepas, sanitizantes y conservadores.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Persistencia de genotipos aislados durante en los años 2021 y 2023

En total se comparó el perfil genotípico de 29 cepas mediante la técnica de RAPD, de las cuales 8 de ellas provenían de aislamientos realizados durante el 2021 (denotadas con la letra L), y 21 de aislamientos del 2023. De estas últimas, 10 fueron aisladas por el laboratorio de microbiología de la planta a partir de superficies como válvulas, tuberías de transferencia, conexiones y otras áreas en contacto directo con el producto posterior al tratamiento térmico, durante diversos muestreos internos (letra C). Las 11 cepas restantes fueron aisladas de lotes de base para helado enviados al Laboratorio de Inocuidad Microbiana de los Alimentos (LIMA) de la UAQ para su análisis (letra H). En la Figura 4 se observan los patrones de banda obtenidos por algunas de estas cepas.

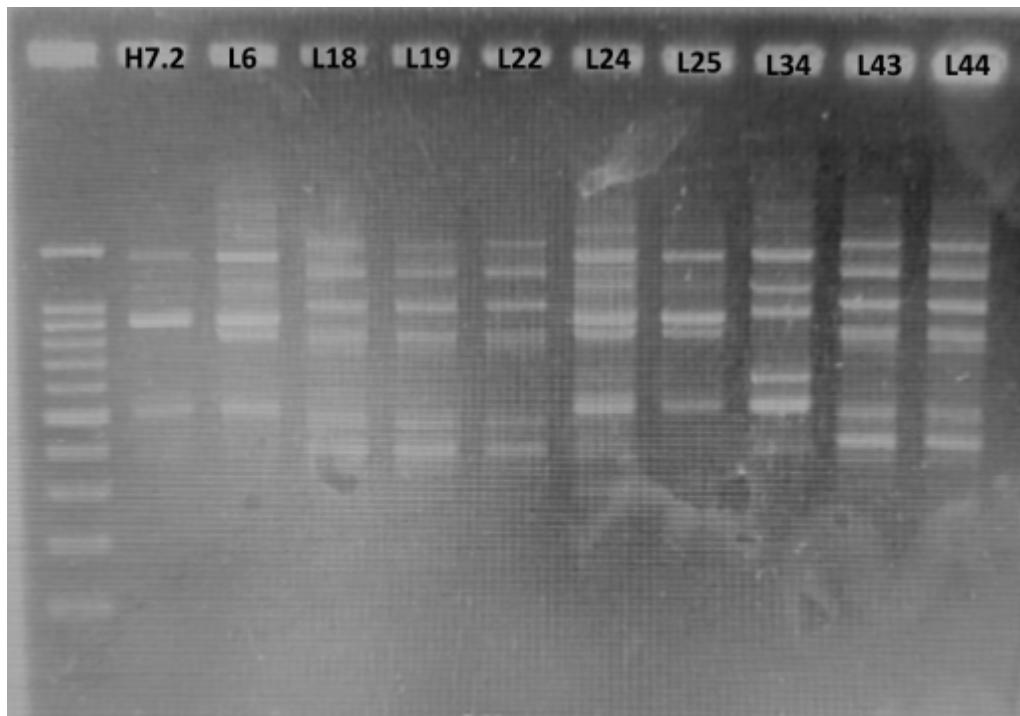


Figura 4. Patrones de banda obtenidos por algunas de las cepas *Leuconostoc* spp. genotipificadas mediante RAPD. En el primer carril se ubica el marcador de peso molecular (TrackIt 100 bp, Invitrogen) y en los subsecuentes cepas del 2021 (L) y 2023 (H).

A simple vista, se puede observar que las cepas de los dos últimos carriles (L43 y L44) presentan un patrón de bandas muy similar (en 420, 500, 850, 1000, 1300, 1500 bp). Sin embargo, un análisis basado únicamente en esta observación es poco confiable debido a la calidad de la imagen. Es por eso que programas como Image J son utilizados para analizar los resultados obtenidos en los patrones de bandas generados por la electroforesis, estos permiten denotar y comparar las bandas de las muestras en comparación con el marcador de peso molecular. Este programa informático realiza un análisis evaluando los píxeles luminosos en las imágenes digitalizadas de los geles, lo que facilita en gran medida la evaluación de la intensidad y el tamaño de bandas (Gallagher, 2010).

Mediante este análisis se creó una matriz binaria de ausencia y presencia (0 y 1) de bandas, la cual fue utilizada como base para el análisis de conglomerados jerárquico mediante el método de Ward, que permitió clasificar las cepas con base en la similitud en sus patrones de bandas (Tokuda y col., 2021). El dendrograma generado se muestra en la Figura 5, la cual ilustra las relaciones jerárquicas entre los diferentes grupos conformados por las cepas basados en sus patrones de semejanza.

En la Figura 5 se pueden observar tres grupos principales representados por tres diferentes colores. Es importante recalcar que las cepas con nomenclatura "L" fueron aisladas en 2021, mientras que las cepas "C" y "H" fueron aisladas en 2023; las cepas "C" provienen de aislamientos realizados en la planta, durante monitoreos internos y las "H" se obtuvieron de muestras de base para helado analizado en el LIMA. En el conglomerado de color rojo, se observa mayoritariamente cepas del 2023 (C y H), encontrando similitud sólo con dos aislamientos del 2021; L6 y L25. Por el contrario, el conglomerado color verde, agrupa una mayor proporción de aislamientos del 2023 y cuatro del 2021 (C7, C8, C10 y C11). En ambos conglomerados se encuentran cepas recuperadas en distintos años.

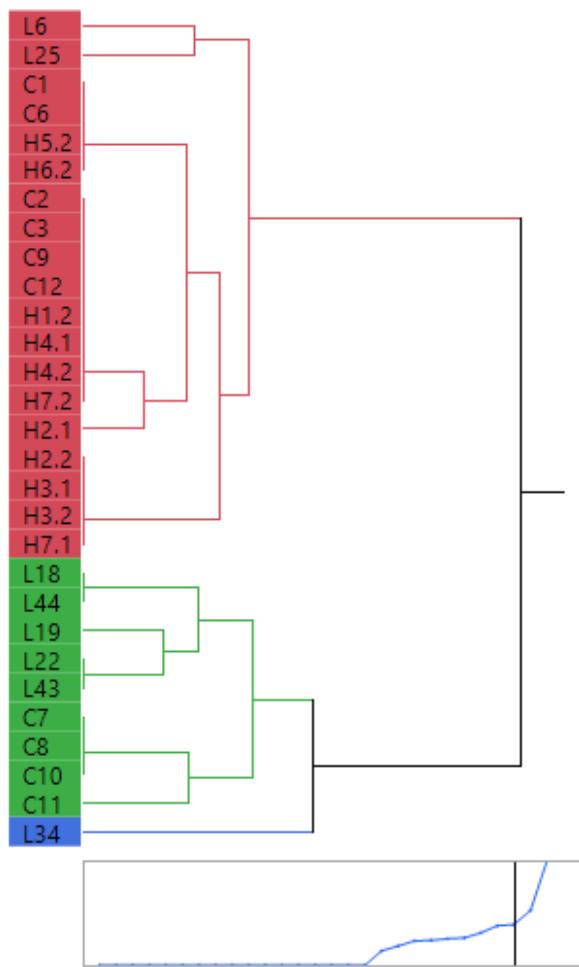


Figura 5. Conglomerado Jerárquico por el método de Ward a partir de los patrones de bandeo de las 29 cepas genotipificadas mediante RAPD.

Las cepas aisladas en 2021 presentan similitudes genéticas con las cepas recolectadas en 2023. Este hallazgo propone que existe una persistencia de estas BAL en el ambiente durante un periodo de tres años, por lo que no han sido completamente eliminadas mediante los procesos de sanitización, limpieza y pasteurización aplicados, tanto al producto como a las instalaciones donde se lleva a cabo el proceso. No obstante, al no ser idénticas (aislamientos del 2021 y del 2023), se podría asumir que han sufrido modificaciones genéticas a lo largo de esos años, tal vez impulsadas por fenómenos de adaptación a las condiciones de la planta de procesamiento. La capacidad de estas cepas para sobrevivir sugiere que

podrían estar desarrollando una resistencia a bactericidas y conservadores, sumado a su capacidad para desarrollar biopelículas que las protegen de condiciones ambientales adversas y de productos destinados a eliminarlas (Zhou y col., 2013; Nkemngong & Teska, 2024).

Como se ha mencionado previamente, las bacterias *Leuconostoc* spp. son productoras de dextrano, un polisacárido que en muchos casos está asociado a la formación de biopelículas. Diversos estudios han señalado una estrecha relación entre este tipo de estructuras y la persistencia bacteriana (Beroz y col., 2018; Burmølle y col., 2010; Helaine y col., 2014). Las células se adhieren a superficies inertes, secretan proteínas y generan una matriz polisacáridica que envuelve a las colonias, actuando como una barrera con alta selectividad frente a nutrientes y antimicrobianos. Esta matriz no solo ofrece protección física, sino que también crea un ambiente interno con baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes, condiciones que favorecen el estado persistente (Pan y col., 2023). Es probable que esta capacidad contribuya a la dificultad para eliminarlas dentro de la planta, puesto que la habilidad de estas bacterias para adherirse a superficies inertes convierte al acero inoxidable —material ampliamente utilizado en la industria alimentaria— en un entorno ideal para la formación de biopelículas.

Aunque la persistencia es un mecanismo de supervivencia que no se transmite genéticamente —debido a que implica un estado fisiológico reversible en una subpoblación de células—, la resistencia, en cambio, sí tiene una base genética heredable. Mientras que las células persistentes pueden sobrevivir temporalmente a los tratamientos antimicrobianos sin presentar mutaciones, las bacterias resistentes poseen cambios genéticos que les permiten tolerar concentraciones elevadas de antimicrobianos de forma permanente y transmisible (Serrano y col., 2025; Pan y col., 2023). Tanto la teoría como la experimentación sugieren que las células persistentes facilitan la resistencia genética al constituir un reservorio evolutivo de células viables (Windels y col., 2019).

Se plantea que podría existir una persistencia de cepas en las superficies donde se procesa el alimento y, además, algunas han desarrollado resistencia frente a los sanitizantes, conservadores y tratamientos térmicos aplicados en las distintas etapas del procesamiento. Esta resistencia podría haberse desarrollado y heredado en cepas a lo largo de generaciones dentro de la planta.

IV.2 Capacidad de deterioro en base para helado

Se evaluó la capacidad de deterioro de 15 cepas previamente aisladas y evaluadas por Bravo y col. (2024) en jarabe de leche, considerando tres variables respuesta: crecimiento (Log UFC/g), viscosidad (cSt) y pH. El producto inoculado y sin inocular (control) se almacenó a 10 °C durante 10 días para determinar su nivel de deterioro. El análisis de varianza (ANDEVA) reveló diferencias significativas para las tres variables ($p<0.0001$) por lo que se realizó una comparación de medias de Tukey entre las cepas

En la Figura 6 se presentan los resultados de la prueba de Tukey aplicada a la concentración de BAL en el producto inoculado con las diferentes cepas, así como en el control sin inocular. En el gráfico, las letras que se encuentran encima de cada barra, si son distintas entre ellas, indican que existen diferencias significativas entre las cepas ($\alpha=0.05$). En términos generales, la mayoría de las cepas, así como el grupo control, presentaron una concentración final similar. Las cepas C31 y C43 fueron las que alcanzaron mayor concentración. Por otro lado, la cepa C21 exhibió un crecimiento significativamente menor en comparación con todas las demás. Las cepas C6 y C16 también mostraron una menor capacidad de crecimiento, comparadas particularmente con C31 y C43. El control —producto con microbiota nativa— presentó un crecimiento bacteriano intermedio, aun sin haber sido inoculado. El producto no era estéril, sólo pasteurizado, por lo que sí se esperaba crecimiento de bacterias naturalmente presentes, provenientes de la planta de procesamiento.

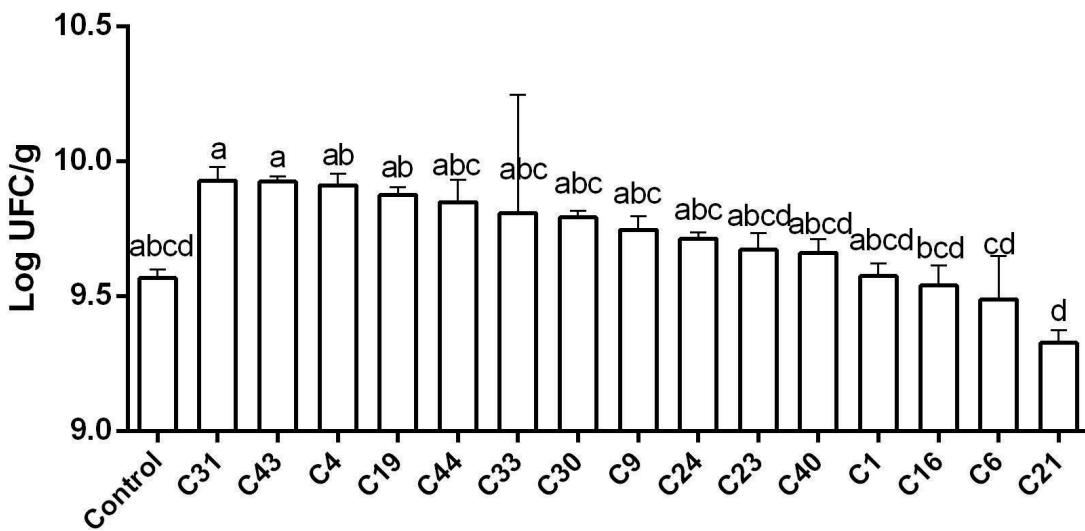


Figura 6. Prueba de Tukey de los valores de crecimiento bacteriano en Log UFC/g en base para helado inoculada con distintas cepas de *Leuconostoc*.

Tanto en viscosidad (Figura 7) como en pH (Figura 8) se aprecian diferencias más claras que en el crecimiento; sin embargo, las desviaciones de los tratamientos no permitieron una separación estadística definida. A continuación, se destacarán los tratamientos más contrastantes, considerando que varias cepas mostraron comportamientos estadísticamente similares a los que se discutirán.

En viscosidad (Figura 7) la cepa C16 es la que más aumentó la viscosidad del producto lácteo, en comparación con cepas como C1 y C40 que presentaron la menor viscosidad. Cepas como la C24 y C23 presentan un efecto intermedio. El control no inoculado, contrario a lo que se esperaba, se ubicó en un punto intermedio, lo que puede sugerir que las bacterias que ya se encontraban naturalmente en el producto provocaron algún tipo de deterioro o que algunas cepas inoculadas disminuyeron la viscosidad. La disminución de la viscosidad de algunas cepas puede deberse a su capacidad proteolítica, lo que podría conducir a la hidrólisis de proteínas presentes en el producto y por lo tanto una alteración en su viscosidad y consistencia (Toledano y col., 2011).

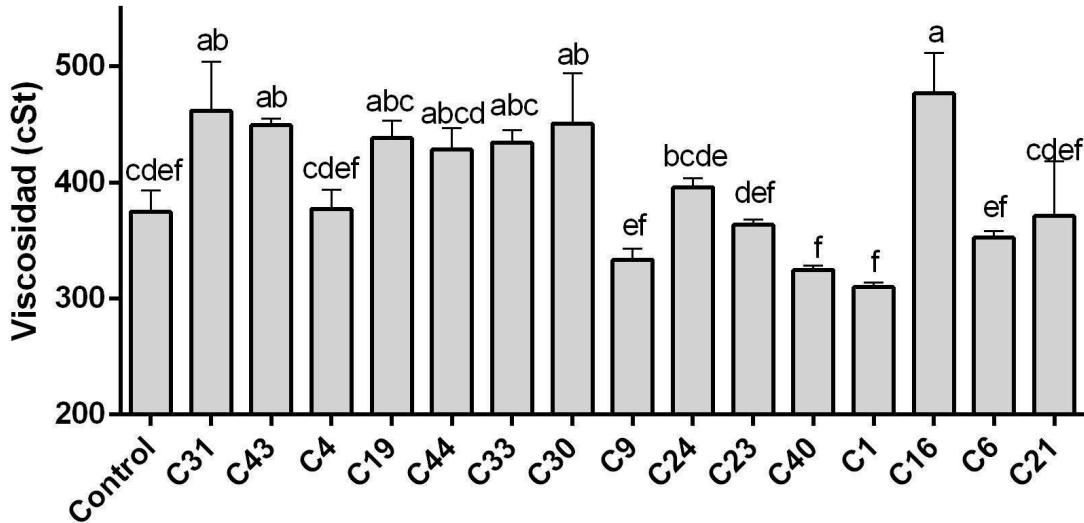


Figura 7. Prueba de Tukey de los valores de viscosidad (cSt) en base para helado inoculada con distintas cepas de *Leuconostoc*.

En la Figura 8 se presentan los resultados del pH, en donde las cepas C43, C19 y C44 muestran los valores más bajos, lo que indica un mayor deterioro del producto vía acidificación. Estas cepas presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto, aunque son similares entre sí. Por otro lado, las cepas C40 y C6 exhiben los valores de pH más altos, lo que indica un menor deterioro del producto. En este análisis, el control presenta un pH intermedio, que puede deberse a la acidificación por bacterias naturalmente presentes en el producto. Si bien no fue inoculado con ninguna cepa, naturalmente ya contenía una carga bacteriana que modificó al producto, esto se conoce como post-acidificación y es muy común en alimentos lácteos fermentados o que presentan algún tipo de concentración bacteriana residual como es el caso (Guan y col., 2024)

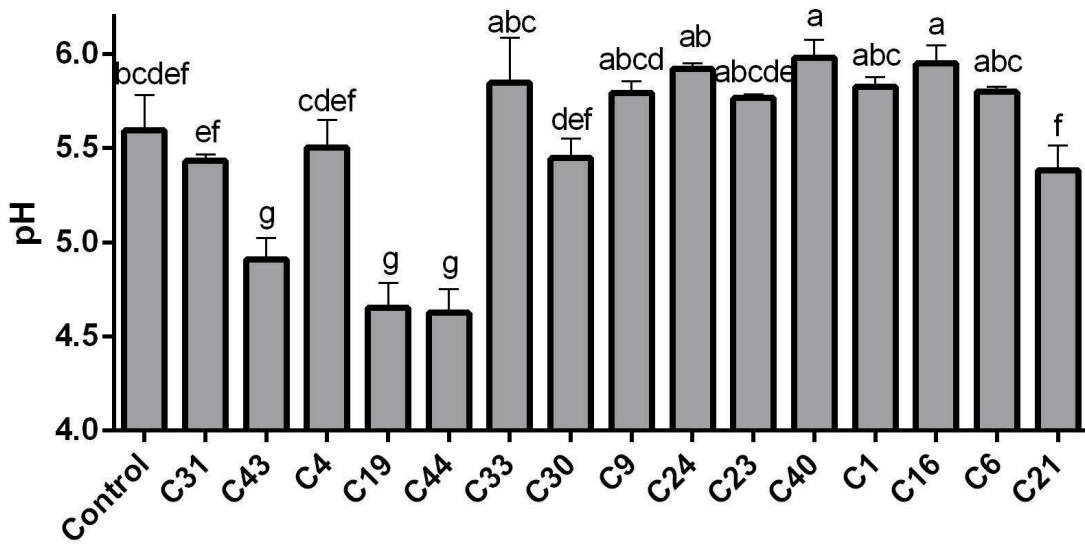


Figura 8. Prueba de Tukey de los valores de pH en base para helado inoculada con distintas cepas de Leuconostoc.

A partir de estos resultados y observando la complejidad de los datos, se propusieron dos estrategias para su análisis. La primera consiste en una gráfica tridimensional, presentada en la Figura 9, en la que cada eje corresponde a una de las tres variables evaluadas para medir el deterioro.

En la Figura 9 se aprecian algunos agrupamientos. El de mayor número de cepas, alrededor de 10, abarca desde aquellas que deterioraron poco al producto (poco crecimiento, baja viscosidad y pH cercano a 6) hasta un deterioro intermedio, denotado principalmente por una disminución de pH y, algunas un ligero incremento en la viscosidad. Hacia la zona superior-derecha de la gráfica se encuentran las cepas que ocasionaron el mayor deterioro, afectando todas las variables, encontrando una elevada concentración microbiana, bajo pH y alta viscosidad. Finalmente, algunas cepas que generaron variaciones importantes principalmente en pH y que se encuentran en la sección central en colores verde, rosa y lila.

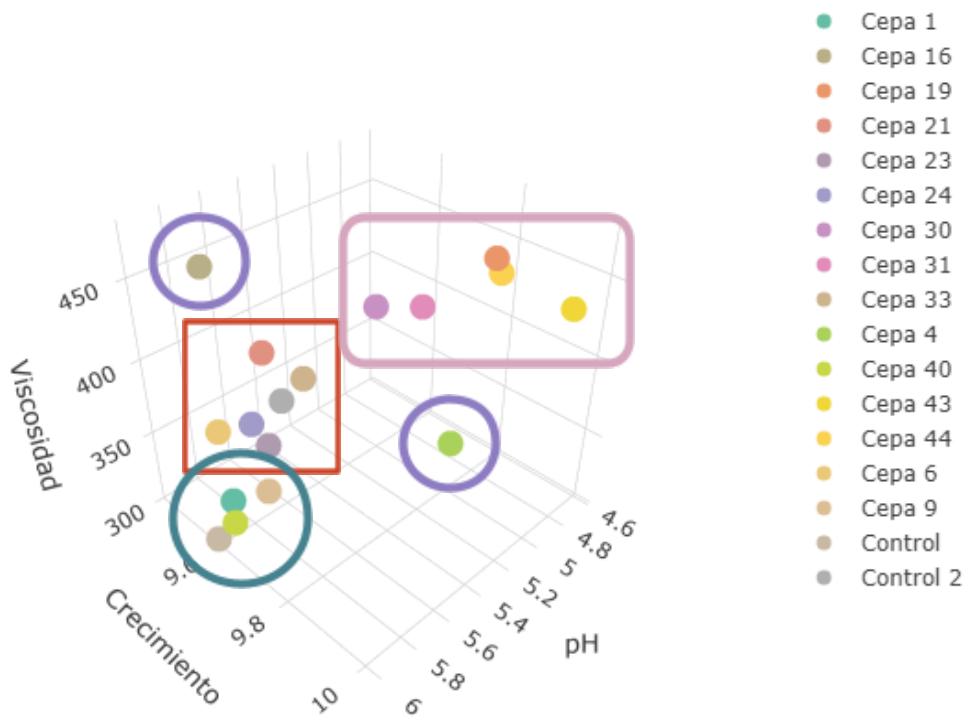


Figura 9. Gráfica tridimensional generada en R que representa la viscosidad, el crecimiento y el pH de las distintas cepas inoculadas en el producto

Derivado de la complejidad para la interpretación de esta gráfica que integra todas las variables, se optó por generar un sistema de clasificación del nivel de deterioro causado por las cepas evaluadas. Con base en esta clasificación, se comparó el deterioro de las mismas cepas evaluadas por Bravo y col. (2024) en otro producto lácteo (jarabe de leche) con la finalidad de discernir si la matriz alimentaria en la que se desarrollean las bacterias influye en su comportamiento y el deterioro que causan (Cuadro 4). Cabe destacar que al ser productos diferentes el nivel de deterioro del jarabe de leche se basó en distintos valores.

Cuadro 4. Criterios para definir el nivel de deterioro en función del crecimiento microbiano, viscosidad y pH en jarabe de leche (Bravo y col., 2024) y base de helado

	Variables	Nivel	Cepas según deterioro de Jarabe de leche	Cepas según deterioro de BH
Alto	Crecimiento	≥ 9.81	C1, C4, <u>C19</u> , C30, C40, <u>C43</u> y <u>C44</u>	<u>C19</u> , C31, <u>C43</u> y <u>C44</u>
	Viscosidad	≥ 450		
	pH	≤ 5		
Medio	Crecimiento	9.61 - 9.80	C6, C9, <u>C23</u> , <u>C24</u> , C31 y <u>C33</u>	C4, C16, C21, <u>C23</u> , <u>C24</u> , C30 y <u>C33</u>
	Viscosidad	360 - 450		
	pH	5 - 5.8		
Bajo	Crecimiento	≤ 9.60	C16 y C21	C1, C6, C9 y C40
	Viscosidad	≤ 360		
	pH	≥ 5.8		

Algunas cepas exhiben un comportamiento similar en ambos productos. En particular, las cepas C19, C43 y C44 generan un alto nivel de deterioro en ambos casos. De manera similar, entre las cepas que son moderadamente perjudiciales para la calidad del producto, destacan C23, C24 y C33, que también presentan un comportamiento consistente en ambos productos.

Por otro lado, las cepas que causan un deterioro bajo no presentan un comportamiento uniforme. Destacan las cepas C1 y C40, las cuales muestran

efectos opuestos en cada producto: mientras que en el jarabe de leche provocan un alto deterioro, en la base para helado parecen ser inofensivas. Esto sugiere que la matriz alimentaria podría influir en su supervivencia y en su capacidad para generar deterioro, estudios han demostrado las diferentes interacciones que presentan las BAL con los diferentes componentes de los productos lácteos (Burgain y col., 2014)

La composición química de la base para helado suele consistir en una combinación de leche o crema, azúcar, estabilizantes, emulsionantes y saborizantes (Trejo-Flores y col., 2023). Algunos estudios han analizado cómo la composición del helado influye en la supervivencia de bacterias ácido lácticas (BAL). Por ejemplo, Alamprese y col. (2002, 2005) estudiaron a *Lactobacillus johnsonii* y *L. rhamnosus* en helados con diferentes niveles de grasa, azúcar y oxígeno, y no encontraron pérdidas importantes en su viabilidad durante el almacenamiento. Por otro lado, Homayouni y col. (2008) evaluó a *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *L. acidophilus* y *L. casei*, y observó que el uso de captadores de oxígeno como la L-cisteína ayudó a mejorar la supervivencia, especialmente de *L. casei*. Además, el contenido de azúcar no afectó la viabilidad de las bacterias en este caso.

Es importante destacar que, aunque ambos productos derivan de la leche, existen diferencias importantes entre estos que pudieron haber influido en el comportamiento de las BAL. La base para helado presenta un mayor contenido de sólidos totales, incluyendo grasas, azúcares, estabilizantes y emulsionantes, lo cual impacta en la viscosidad y la microestructura del producto (Gomand y col., 2019). Por otro lado, el jarabe de leche es una matriz más fluida, con menor viscosidad y un número menor de componentes funcionales añadidos, lo que puede modificar la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de estrés para las bacterias. Estas diferencias pueden afectar la difusión de metabolitos, la acidificación, y la respuesta frente a antimicrobianos, lo que explicaría las variaciones observadas de matriz a matriz (Burgain y col., 2014; Ranadheera y col., 2009).

La estructura física del alimento puede ofrecer cierta protección a las BAL durante el almacenamiento, sin embargo, factores como la composición química o

condiciones de almacenamiento son más importantes en la viabilidad de estas. Por ejemplo, el pH de la matriz suele tener un mayor impacto que su forma física. La capacidad de la matriz para mantener la viabilidad está determinada por el contenido, la proporción de nutrientes y parámetros como el pH, la actividad de agua (aw) y el contenido de oxígeno. Un pH ácido potencia el efecto bactericida por el aumento de la concentración de ácidos orgánicos y un alto contenido de grasa aumenta la tasa de oxidación reduciendo la supervivencia (Gomand y col., 2019).

Los productos lácteos son una buena matriz para la supervivencia de las bacterias ácido lácticas (BAL) porque contienen proteínas y derivados como la caseína hidrolizada o la triptona, que favorecen su crecimiento. Estos compuestos ayudan a reducir el potencial redox del alimento y a mantener un pH cercano a la neutralidad, condiciones que benefician a las BAL. Además, estas bacterias pueden usar la lactosa y aprovechar los aminoácidos liberados durante la hidrólisis de la caseína, lo que les da una ventaja para crecer y mantenerse viables (Burgain y col., 2014; Gomand y col., 2019).

IV.3 Susceptibilidad a conservadores dentro de la formulación de base para helado

Se evaluó la susceptibilidad de 5 cepas (6, 16, 30, 40, 44) con diferentes niveles de deterioro en BH (Cuadro 4), a dos conservadores: Nisina (Conservador 1) y Lactiplus (Conservador 2) midiendo las mismas variables de deterioro (concentración de células, viscosidad y pH).

Se determinó la significancia de los factores evaluados mediante un ANDEVA y posterior prueba de Dunnett (comparando contra el control sin inocular) (Lee & Lee, 2018). Resultaron significativos ($p<0.0001$) los efectos de ambos factores (cepa y conservador) para todas las variables, excepto para la concentración de BAL con los conservadores ($p<0.911$).

En la Figura 10 se puede observar que no hay diferencias estadísticas que nos indique que algún conservador inhibió de manera significativa el crecimiento de las BAL en comparación con el producto sin conservadores. También se aprecia en el

Conservador 1 (Nisina), un efecto contrario al esperado, pues se observa un crecimiento bacteriano ligeramente mayor al del control sin conservador. Esto podría estar relacionado con el uso reiterado de Nisina como conservador en la planta de procesamiento del producto lácteo. Es posible que esta exposición haya inducido mecanismos de resistencia en algunas de las bacterias, por lo que este conservador perdió su efectividad en lo que respecta a evitar el desarrollo (Maillard, 2018).

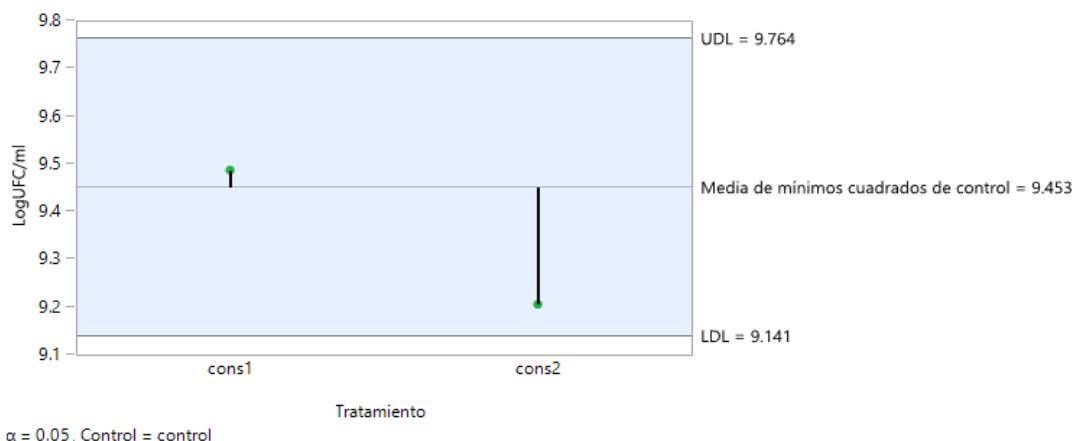


Figura 10. Prueba de Dunnett de crecimiento

En cuanto a la viscosidad, en la prueba se observa que ambos conservadores están fuera de los límites de decisión (Figura 11), lo que nos indica que hay una diferencia estadísticamente significativa en el uso de los conservadores respecto al control. En este caso, una disminución de la viscosidad nos dice que tanto Nisina como Lactiplus son productos eficaces para evitar el deterioro del producto en cuanto a esta variable.

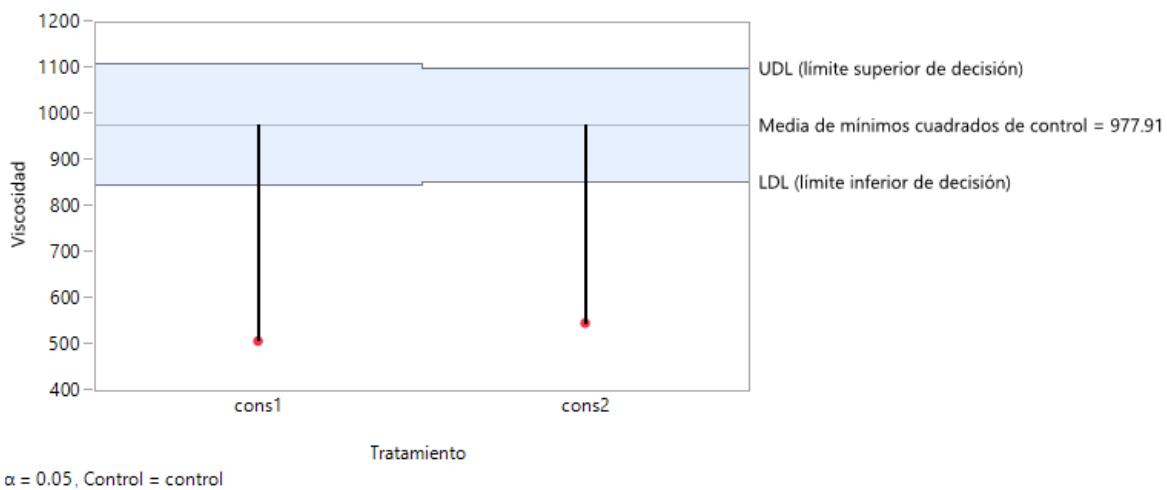


Figura 11. Prueba de Dunnett de viscosidad

En lo que respecta al efecto sobre el pH (Figura 12), Lactiplus se destacó como un conservador más eficaz, pues evitó una acidificación excesiva, significativamente superior al control, y mejor que cuando se emplea la Nisina.

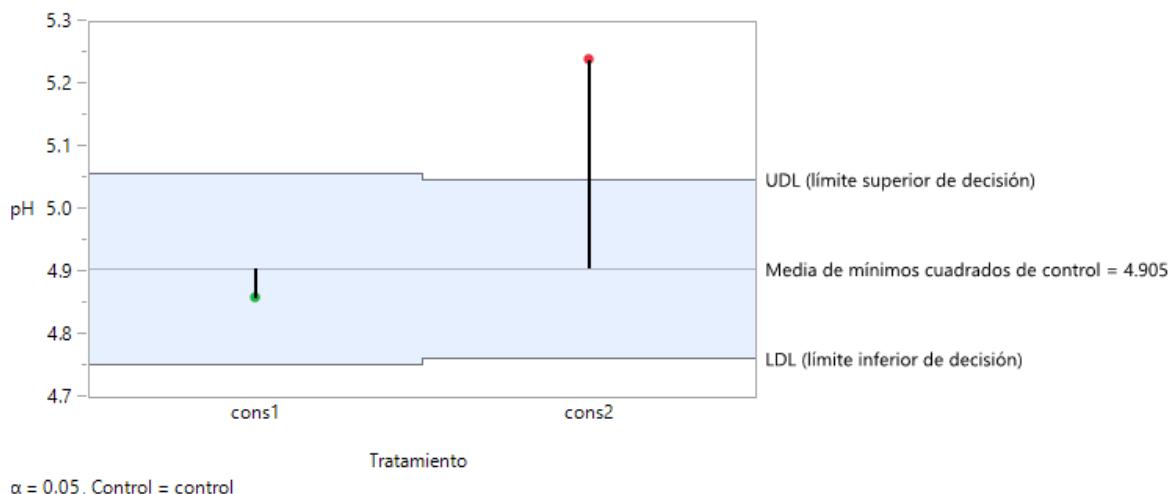


Figura 12. Prueba de Dunnett de pH

Los resultados previos analizan el efecto del conservador sobre las variables de respuesta sin considerar las cepas individualmente. Sin embargo, para examinar ahora el comportamiento de cada cepa, en la Figura 13 se presentan tres gráficas (paneles a, b y c), que nos permiten tener una visión más detallada.

En el panel a de la Figura 13 nuevamente se aprecia la similitud entre la concentración de las cepas en presencia de los conservadores; sólo C44 se observa diferente, pues creció menos que las otras y fue considerablemente inhibida por Lactiplus. En cuanto a la viscosidad (Figura 13b), también se confirma la eficacia de ambos conservadores y nuevamente destaca la cepa C44, cuya viscosidad es baja en general. Este resultado es relevante, puesto que esta cepa presenta una capacidad de deterioro alta.

Con relación al pH (Figura 13c), se observa que, para la mayoría de las cepas, Nisin fue similar al control, mientras que Lactiplus mantiene el pH en niveles superiores, evidenciando su capacidad para evitar la acidificación del producto. De nuevo, la cepa C44 se distingue del resto, pues ésta mantiene niveles de pH más altos y el efecto de Lactiplus es más notable.

La nisin es un péptido antimicrobiano compuesto por 34 residuos de aminoácidos, clasificado como una bacteriocina producida por cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*. Es soluble en medios ácidos y un eficiente bactericida frente a bacterias Gram positivas, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*. Además, es considerada segura para el consumo humano, debido a que no afecta negativamente a la microbiota intestinal, es biodegradable y se degrada rápidamente en el tracto digestivo por acción de proteasas. El mecanismo de acción se produce mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática y al inhibir la síntesis de peptidoglicano. Gracias a estas propiedades, la nisin ha sido ampliamente utilizada como conservador natural en una variedad de productos alimenticios, especialmente en matrices lácteas, cárnicas y de panificación (Setiarto y col., 2023; Lavigne-Martyn, 2011; Zhou y col., 2013)

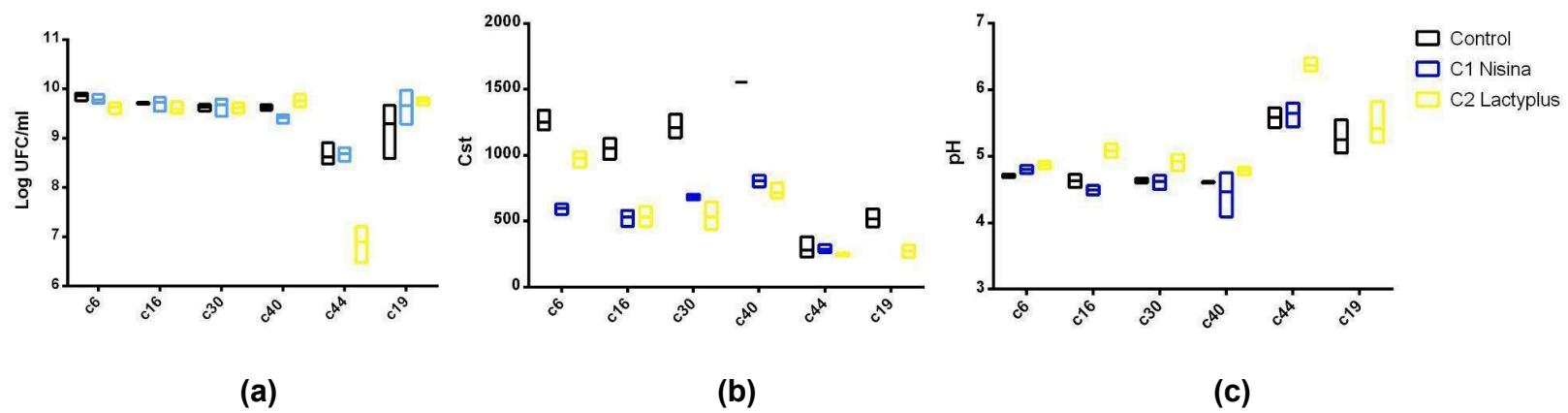


Figura 13. Evaluación de la capacidad de deterioro en producto adicionado con dos conservadores diferentes: C1 Nisin (■) y C2 Lactiplus (□) contra el producto sin conservadores (□). a. Recuento microbiano (log UFC/mL). b. Viscosidad (Cst). c. Valores de pH

La planta que produce la BH ha estado usando nisina como conservador en concentraciones cada vez más altas, lo que desafortunadamente puede favorecer la resistencia de las cepas. Algunas bacterias Gram positivas pueden desarrollar resistencia a la nisina cuando son expuestas de forma repetida a concentraciones crecientes de este compuesto. Se ha reportado resistencia en diversas especies, incluyendo *L. casei*, *S. thermophilus*, *P. acidilactici*, *S. bovis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, *S. aureus* y *C. botulinum*. Este mecanismo de resistencia puede modificar el grosor de la pared celular, la composición de la membrana de fosfolípidos e incluso en algunas especies hay una producción de la enzima nisinasa que degrada la nisina (Zhou y col., 2013).

El ácido propiónico (ácido propanoico, $C_3H_6O_2$) es el principal componente del conservador Lactiplus. Se trata de un ácido carboxílico que, en estado puro, es incoloro, soluble en agua y corrosivo. Tiene usos en diversas industrias, y en la alimentaria se emplea como agente antimicrobiano en productos lácteos, de panadería, cereales y piensos. Este compuesto presenta un efecto inhibidor sobre microorganismos capaces de metabolizarlo, acumulándose en el interior celular, bloqueando rutas metabólicas e inhibiendo enzimas. Dependiendo de la concentración, puede reducir el pH intracelular y limitar el crecimiento bacteriano debido a la acumulación de aniones (Goldberg & Rokem, 2009; Ranaei y col., 2020).

Estudios como el de Wang y col. (2014) demostraron el efecto inhibitorio del ácido propiónico en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, mediante la reducción del pH intracelular, y también evidenciaron su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*. De forma complementaria, Antone y col. (2022) evaluaron la eficacia de fermentados con ácido propiónico como componente principal frente a patógenos transmitidos por alimentos, demostrando una acción antimicrobiana potente y específica contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La persistencia de algunas cepas de *Leuconostoc spp.* dentro de la planta en un periodo de al menos dos años sugiere una adaptación a las condiciones del entorno, posiblemente facilitada por la formación de biopelículas.

Las cepas evaluadas mostraron diferencias en su capacidad para deteriorar base para helado, evidenciado por su crecimiento, producción de viscosidad y acidificación. Estas variables no se comportaron de manera dependiente, debido a que se observó una elevada viscosidad en cepas con bajo crecimiento, y viceversa. Las cepas C19, C43 y C44 presentaron una alta capacidad de deterioro de base para helado, confirmando lo encontrado por Bravo y col. (2024) en jarabe de leche. En otras cepas se observó que la matriz alimentaria influyó en la manifestación del deterioro, lo que sugiere que la composición del alimento y sus propiedades químicas pueden afectar el comportamiento metabólico de las bacterias.

Las cepas evaluadas presentan cierta resistencia al conservador actualmente empleado por la planta, la Nisina. Y el conservador alternativo Lactiplus, si bien mostró mayor eficacia, no evita por completo el deterioro con todas las cepas.

Los resultados de este estudio destacan la importancia de implementar un control sanitario integral en la planta, que no se limite únicamente a una desinfección efectiva, sino que también contemple la selección adecuada de conservadores teniendo en consideración la matriz alimentaria. Además, se resalta la necesidad de una vigilancia constante de la microbiota presente en el entorno y en el producto final, con el fin de prevenir y controlar el deterioro microbiano de manera más eficiente.

Se recomienda continuar caracterizando las cepas de *Leuconostoc spp.* deterioradoras de estos productos en algunos aspectos como: capacidad de formación de biopelículas; tolerancia frente a sanitizantes en células planctónicas y en biopelículas; interacciones entre las cepas y con la matriz alimentaria para determinar cómo afectan sus capacidades metabólicas.

También se recomiendan diferentes formulaciones del conservador alternativo Lactiplus que fue efectivo en algunas de las variables evaluadas

También se recomienda evaluar e implementar distintas técnicas de sanitización, barreras múltiples y métodos de control ante biopelículas en superficies donde se procesa el producto

Finalmente, este trabajo proporciona información útil para el diseño de estrategias específicas que mejoren la inocuidad y vida útil de este producto lácteo.

VI. REFERENCIAS

- Al-Obaidi, M. M. J., Suhaili, Z., & MohdDesa, M. N. (2018). Genotyping Approaches for Identification and Characterization of *Staphylococcus aureus*. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75969>
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., & Corti, S. (2005). Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. *International Journal Of Dairy Technology*, 58(4), 200-206. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00214.x>
- Alamprese, C., Foschino, R., Rossi, M., Pompei, C., & Savani, L. (2002). Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 201-208. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00159-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00159-5)
- Alvarez-Cisneros, Y. M., De Lourdes Pérez-Chabela, M., & Ponce-Alquicira, E. (2025). New Technologies in Meat Preservation. En *InTechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1009509>
- Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture & food security*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Antone, U., Ciprovica, I., Zolovs, M., Scerbaka, R., & Liepins, J. (2022). Propionic Acid Fermentation—Study of Substrates, Strains, and Antimicrobial Properties. *Fermentation*, 9(1), 26. <https://doi.org/10.3390/fermentation9010026>
- Barragán-Castillo, Y. M., Miranda-Castilleja, D. E., Aldrete-Tapia, J. A., Arvizu-Medrano, S. M., & Martínez-Peniche, R. Á. (2020). Native yeast from distinct organs of grapevines established in Queretaro, Mexico, and their potential oenological utilization. *CiêNcia E TéCnica Vitivinícola/CiêNcia E Técnica Vitivinícola*, 35(1), 30-41. <https://doi.org/10.1051/ctv/20203501030>
- Beroz, F., Yan, J., Meir, Y., Sabass, B., Stone, H. A., Bassler, B. L., & Wingreen, N. S. (2018). Verticalization of bacterial biofilms. *Nature Physics*, 14(9), 954-960. <https://doi.org/10.1038/s41567-018-0170-4>
- Bhatti, B. (2019, 19 septiembre). *Food Preservatives | Use of Preservatives in Dairy Industry | DSS Imagetech*. DSS Imagetech. <https://www.dssimage.com/blog/use-of-preservatives-in-dairy-industry/>
- Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A., Cailliez-Grimal, C., & Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food:

Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances In Colloid And Interface Science*, 213, 21-35.

Burmølle, M., Thomsen, T. R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., Tvede, M., Nyvad, B., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Moser, C., Kirketerp-Møller, K., Johansen, H. K., Høiby, N., Jensen, P. Ø., Sørensen, S. J., & Bjarnsholt, T. (2010). Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59(3), 324-336. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2010.00714.x>

Chatterjee, S., & Raval, I. H. (2019). Pathogenic Microbial Genetic Diversity with Reference to Health. En *Elsevier eBooks* (pp. 559-577). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814849-5.00032-0>

Cubas, I. (2023, 23 junio). *Datos sobre la industria de lácteos en México: producción, consumo y economía*. THE FOOD TECH - Medio de Noticias Líder En la Industria de Alimentos y Bebidas. Recuperado 10 de julio de 2024, de <https://thefoodtech.com/tendencias-de-consumo/datos-sobre-la-industria-de-lacteos-en-mexico-produccion-consumo-y-economia/>

Delves-Broughton, J. (2014). BACTERIA | Nisin. En *Elsevier eBooks* (pp. 187-193). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00030-6>

Eilin Doyle, M. (2007). Microbial Food Spoilage — Losses and Control Strategies A Brief Review of the Literature. *FRI BRIEFINGS*. https://fri.wisc.edu/files/Briefs File/2017-07-18_0857_FRI_Brief_Microbial_Food_Spoilage_7_07.pdf

Endo, A., Maeno, S., & Liu, S. (2022). Lactic acid bacteria: *Leuconostoc* spp. En *Elsevier eBooks* (pp. 226-232). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00859-3>

Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016a). Spoilage of Milk and Milk Products. En *Food Microbiology: Principles into Practice* (1.a ed., pp. 307-336). <https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch19>

Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016b). Food Preservation by High Temperatures. En *Food Microbiology: Principles into Practice* (1.a ed., pp. 12-33). <https://doi.org/10.1002/9781119237860.ch28>

Estornell, J. (2019, 22 febrero). *El ácido peracético (PAA): biocida de amplio espectro y bajo en residuos*. Christeyns. <https://www.betelgeux.es/blog/2018/01/31/el-acido-peracetico-paa-biocida-de-amplio-espectro-y-bajo-en-residuos/>

Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Tintino, S. R., De Souza, V. C. A., Sharifi-Rad, J., Coutinho, H. D. M., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>

Frausto, J. J. P., Cepeda-Marquez, L. G., Salgado, L. M., Hernández-Iturriaga, M., & Arvizu-Medrano, S. M. (2015). Detection and Genotyping of *Leuconostoc* spp. in a Sausage Processing Plant. *Journal Of Food Protection*, 78(12), 2170-2176. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-192>

Gallagher, S. R. (2010). Digital Image Processing and Analysis with ImageJ. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 3(1). <https://doi.org/10.1002/9780470089941.eta03cs03>

García-García, R., & Searle, S. (2016). Preservatives: food use. En *Elsevier eBooks* (pp. 505-509). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00568-7>

Geng, L., Liu, K., & Zhang, H. (2023). Lipid oxidation in foods and its implications on proteins. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1192199>

González, V. (2014). México tiene una «fría» industria de helados. *Manufactura*.

<https://manufactura.mx/industria/2014/08/25/mexico-tiene-una-fria-industria-de-helados>

Goldberg, I., & Rokem, J. (2009). Organic and Fatty Acid Production, Microbial. En *Elsevier eBooks* (pp. 421-442). <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00156-5>

Gomand, F., Borges, F., Burgain, J., Guerin, J., Revol-Junelles, A., & Gaiani, C. (2019). Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. *Annual Review Of Food Science And Technology*, 10(1), 285-310. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>

Guan, Y., Cui, Y., Qu, X., Li, B., & Zhang, L. (2024). Post-acidification of fermented milk and its molecular regulatory mechanism. *International Journal Of Food Microbiology*, 426, 110920. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110920>

Hassan, A., & Frank, J. (2011). MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH MILK. En *Elsevier eBooks* (pp. 447-457). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00309-5>

- Hassan, G. M., Meshref, A. M. S., Zeinhom, M. A., & Abdel-Halem. (2019). IMPACT OF SPOILAGE MICROORGANISMS ON SOME DAIRY PRODUCTS. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 65(161), 133-141. <https://doi.org/10.21608/avmj.2019.168769>
- Hayek, S. A., Gyawali, R., Aljaloud, S. O., Krastanov, A., & Ibrahim, S. A. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal Of Dairy Research*, 86(4), 490-502. <https://doi.org/10.1017/s002202991900075x>
- Helaine, S., Cheverton, A. M., Watson, K. G., Faure, L. M., Matthews, S. A., & Holden, D. W. (2014). Internalization of *Salmonella* by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. *Science*, 343(6167), 204-208. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, 14(6), 467-494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Higuera-Albarrán, C. (2023, 16 julio). Desperdicio de alimentos en México: frutas, verduras, carne y lácteos. CRÓNICA. <https://www.cronica.com.mx/nacional/desperdicio-alimentos-mexico-frutas-verduras-carne-lacteos.html>
- Holland, R., & Liu, S. (2011). Lactic acid bacteria | *Leuconostoc* spp. En Elsevier eBooks (pp. 138-142). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00267-3>
- Homayouni, A., Ehsani, Azizi, A., Razavi, S., & Yarmand. (2008). Growth and Survival of Some Probiotic Strains in Simulated Ice Cream Conditions. *Journal Of Applied Sciences*, 8(2), 379-382. <https://doi.org/10.3923/jas.2008.379.382>
- Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.0204>
- Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J., & Karam, L. (2020). Invited Review: Advances in Nisin use for preservation of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2041-2052. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498>

ImperialDade. (2021, 28 junio). Food Grade Sanitizer: What are Approved Sanitizers for Food Service? Recuperado 25 de marzo de 2024, de <https://www.imperialdade.com/blog/food-grade-sanitizers>

Jin, Q., Li, L., Kim, Y., & Han, N. S. (2014). Construction of a dextran-free *Leuconostoc citreum* mutant by targeted disruption of the dextranase gene. *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), 1104-1112. <https://doi.org/10.1111/jam.12587>

Karanth, S., Feng, S., Patra, D., & Pradhan, A. K. (2023). Linking microbial contamination to food spoilage and food waste: The role of smart packaging, spoilage risk assessments, and date labeling. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1198124>

Kaur, J., Lee, S., Park, Y., & Sharma, A. (2017). RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.078>

Ledenbach, L., & Marshall, R. T. (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. En *Springer eBooks*, (pp. 41-67). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2

Lee, S., & Lee, D. K. (2018). What is the proper way to apply the multiple comparison test? *Korean Journal Of Anesthesiology*, 71(5), 353-360. <https://doi.org/10.4097/kja.d.18.00242>

Lonvaud-Funel, A. (2014). *Leuconostocaceae family*. En *Elsevier eBooks* (pp. 455-465). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00185-3>

MacDonald, R. S., & Reitmeier, C. A. (2017). Food processing. En *Elsevier eBooks* (pp. 179-225). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804445-2.00006-5>

Maillard, J. (2018). Resistance of Bacteria to Biocides. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0006-2017>

Martin, N. H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2021). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. *Journal of Dairy Science*, 104(2). <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130>

Moore, S. (2021, 14 enero). Biochemical Tests for Microbial Identification. News-Medical. Recuperado 2 de febrero de 2024, de <https://www.news-medical.net/life-sciences/Biochemical-Tests-for-Microbial-Identification.aspx>

Nkemngong, C., & Teska, P. (2024). Biofilms, mobile genetic elements and the persistence of pathogens on environmental surfaces in healthcare and

food processing environments. *Frontiers In Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1405428>

Nutryplus. (s. f.). Lactiplus (Conservador). Recuperado 4 de noviembre de 2023, de <https://nutryplus.com/productos/alimenticia/conservadores/lactiplus/>

Nykrýnová, M., Bartoň, V., Bezdíček, M., Lengerová, M., & Škutková, H. (2022). Identification of highly variable sequence fragments in unmapped reads for rapid bacterial genotyping. *BMC Genomics*, 23(3). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08550-4>

Ochoa-Díaz, M. M., Daza-Giovannetty, S., & Gómez-Camargo, D. (2017). Bacterial Genotyping Methods: From the Basics to Modern. En *Methods in molecular biology* (pp. 13-20). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7604-1_2

Onyeaka, H. N., & Nwabor, O. F. (2022). Food ecology and microbial food spoilage. En Elsevier eBooks (pp. 3-18). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85700-0.00018-6>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (s. f.). Leche y productos lácteos. FAO. Recuperado 4 de agosto de 2023, de <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/es/>

Pan, X., Liu, W., Du, Q., Zhang, H., & Han, D. (2023). Recent Advances in Bacterial Persistence Mechanisms. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(18), 14311. <https://doi.org/10.3390/ijms241814311>

Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Microbial Spoilage of Foods. En *The Microbiological Quality of Food. Foodborne Spoilers* (pp. 1-21). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100502-6.00002-9>

Ranadheera, R., Baines, S., & Adams, M. (2009). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>

Ranaei, V., Pilevar, Z., Khanegah, A. M., & Hosseini, H. (2020). Propionic acid. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 115-127. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6356>

Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), www.pelagiaresearchlibrary.com.

Rebezov, M., Chughtai, M. F. J., Mehmood, T., Khaliq, A., Tanweer, S., Semenova, A., Khayrullin, M., Dydykin, A., Burlakov, S. P., Thiruvengadam, M., Shariati, M. A., & Lorenzo, J. M. (2021). *Novel techniques for*

microbiological safety in meat and fish industries. Applied Sciences, 12(1), 319. <https://doi.org/10.3390/app12010319>

Serrano, S., Grujović, M. Ž., Marković, K. G., Barreto-Crespo, M. T., & Semedo-Lemsaddek, T. (2025). From Dormancy to Eradication: Strategies for Controlling Bacterial Persisters in Food Settings. *Foods, 14(6), 1075.* <https://doi.org/10.3390/foods14061075>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2024). Panorama Agroalimentario 2018-2024: Leche de bovino. En *Gobierno de México.*

<https://www.gob.mx/agricultura/dgsiap/acciones-y-programas/panorama-agroalimentario-258035>

Setiarto, R. H. B., Anshory, L., & Wardana, A. A. (2023). Biosynthesis of nisin, antimicrobial mechanism and its applications as a food preservation: A review. *IOP Conference Series Earth And Environmental Science, 1169(1), 012105.* <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1169/1/012105>

Sevindik, M., & Uysal, I. (2021). Food spoilage and Microorganisms. *Turkish Journal of Agriculture, 9(10).* <https://doi.org/10.24925/turjaf.v9i10.1921-1924.4658>

Sharma, A., Kaur, J., Lee, S., & Park, Y. (2016). RAPD typing of *Lactobacillus brevis* isolated from various food products from Korea. *Food Science and Biotechnology, 25(6), 1651-1655.* <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0254-9>

Sharma, A., Kaur, J., Lee, S., & Park, Y. (2019). Tracking of intentionally inoculated lactic acid bacteria strains in yogurt and probiotic powder. *Microorganisms, 8(1), 5.* <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010005>

Shi, C., & Matabdar, M. (2022). Lactic Acid Bacteria as Biopreservation Against Spoilage Molds in Dairy Products – A Review. *Frontiers in Microbiology, 12.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.819684>

Shin, S., & Han, N. S. (2015). *Leuconostoc spp.* as starters and their beneficial roles in fermented foods. En *Microbiology monographs* (pp. 111-132). https://doi.org/10.1007/978-3-319-23177-8_5

Singh, R. P., & Desrosier, N. W. (2023, 8 Agosto). Food Preservation. *Encyclopedia Britannica.* <https://www.britannica.com/topic/food-preservation>

Somengil. (2022, 4 Agosto). Food disinfectants: what are they, why they are important and how to pick one. *Blog - Somengil: Soluções Para Lavagem Industrial de Alta Performance.* <https://blog.somengil.com/food-disinfectants/>

Sperber, W. H. (2009). Introduction to the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. En *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (pp. 1-40). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_1

Thapa Magar, S. (2022, 24 Marzo). Microbial Spoilage of Milk and Milk Products (Cream, Butter, Cheese, Yoghurt, Ice-cream) (S. Aryal, Ed.). *Microbe Notes*. Recuperado 21 de Agosto, 2023, de <https://microbenotes.com/spoilage-of-milk-and-milk-products>

Tokuda, E. K., Comin, C. H., & Da F Costa, L. (2021). Revisiting agglomerative clustering. *Physica A Statistical Mechanics And Its Applications*, 585, 126433. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2021.126433>

Toledano, A., Jordano, R., López, C., & Medina, L. (2011). Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria Strains and Fungal Biota for Potential Use as Starter Cultures in Dry-Cured Ham. *Journal Of Food Protection*, 74(5), 826-829. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-10-471>

Trejo-Flores, P. G., Santiago-Rodríguez, L. A., Domínguez-Espinosa, M. E., Cruz-Salomón, A., Velázquez-Jiménez, P. E., Hernández-Méndez, J. M. E., Morales-Ovando, M. A., Del Carmen Cruz-Salomón, K., Del Carmen Hernández-Cruz, M., Vázquez-Villegas, P. T., Cruz-Rodríguez, R. I., Del Pilar Serrano-Ramírez, R., Sánchez-Roque, Y., & Vilchis-Bravo, H. (2023). Sustainable Ice Cream Base: Harnessing Mango Seed Kernel (*Mangifera indica* L. var. Tommy Atkins) Waste and Cheese Whey. *Sustainability*, 15(19), 14583. <https://doi.org/10.3390/su151914583>

Wang, L., Dekker, M., Heising, J., Zhao, L., & Fogliano, V. (2023). Food matrix design can influence the antimicrobial activity in the food systems: A narrative review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 64(25), 8963-8989. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2205937>

Wang, Y., Dai, A., Huang, S., Kuo, S., Shu, M., Tapia, C., Yu, J., Two, A., Zhang, H., Gallo, R., & Huang, C. (2014). Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Beneficial Microbes*, 5(2), 161-168. <https://doi.org/10.3920/bm2013.0031>

Wang, Y., Wu, J., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Webster, M. (2023). Deterioration. *Merriam-Webster.com Dictionary*. Recuperado 11 de agosto de 2023, de <https://www.merriam-webster.com/dictionary/deterioration>

Windels, E. M., Michiels, J. E., Fauvert, M., Wenseleers, T., Van Den Bergh, B., & Michiels, J. (2019). Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *The ISME Journal*, 13(5), 1239-1251. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0344-9>

Xu, Z., Luo, Y., Mao, Y., Peng, R., Chen, J., Soteyome, T., Bai, C., Chen, L., Liang, Y., Su, J., Wang, K., Liu, J., & Kjellerup, B. V. (2020). Spoilage lactic acid bacteria in the brewing industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 955-961. <https://doi.org/10.4014/jmb.1908.08069>

Zarour, K., Zeid, A. F., Mohedano, M. L., Prieto, A., Kihal, M., & López, P. (2024). *Leuconostoc mesenteroides* and *Liquorilactobacillus mali* strains, isolated from Algerian food products, are producers of the postbiotic compounds dextran, oligosaccharides and mannitol. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 40(4). <https://doi.org/10.1007/s11274-024-03913-3>

Zhou, H., Fang, J., Tian, Y., & Lu, X. Y. (2013). Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Annals Of Microbiology*, 64(2), 413-420. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0679-9>