

Estudio de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de metabolitos extracelulares de
Lactobacillus casei empleando lactosuero como fuente de carbono

Juliana Stephania Rengifo Mejía y Angie Natalia Medina Rueda

Trabajo de Grado para optar el título de Ingeniero Químico

Modalidad trabajo de investigación

Directora

Ph.D. Viviana Sánchez Torres

Codirector

Dr. Carlos Jesús Muvdi Nova

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2024

Agradecimientos

A nuestra directora de tesis, la Dra. Viviana Sánchez Torres, por su acompañamiento constante en cada etapa de este proyecto. Su dedicación y compromiso fueron indispensables, siempre dispuesta a revisar, comentar y mejorar cada aspecto de nuestro trabajo.

A nuestro codirector, el Dr. Carlos Muvdi Nova, por haber sido un ejemplo de excelencia profesional y humana. Su pasión por la investigación y su compromiso con la enseñanza nos inspiraron a dar siempre lo mejor de nosotras.

A la ingeniera María Angélica Angarita, M. Sc., cuya guía y apoyo han sido fundamentales para la realización de este proyecto. A pesar de sus propias responsabilidades académicas y personales, siempre estuvo dispuesta a compartir su tiempo, conocimientos y experiencia con nosotras.

A la escuela de Ingeniería química, a la Universidad Industrial de Santander, a los maestros y colegas de la facultad, por crear un ambiente donde la curiosidad y el conocimiento florecen.

A el grupo de investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos CICTA, por su invaluable ayuda con los reactivos y los análisis necesarios para esta tesis.

Al semillero de investigación en Agroindustria, Ciencia y tecnología de Alimentos AICT, por fomentar un ambiente de crecimiento y aprendizaje en torno a esta rama de nuestra carrera.

Juliana Stephania Rengifo Mejía y Angie Natalia Medina Rueda

Dedicatoria

Para mi Mamá, Papá, hermanos, primos y familiares que me han brindado su apoyo incondicional, consejos y amor en este proceso que estoy culminando. Este logro no hubiera sido posible sin su presencia, su fe en mí y su aliento constante en cada paso de este camino. Gracias por ser mi fuente de fortaleza y motivación.

A Sergio, por ser una inspiración constante y un ejemplo de dedicación y esfuerzo. Por enseñarme a amar la ciencia y la investigación, y por mostrarme que la curiosidad y el compromiso son claves para alcanzar cualquier meta.

Gracias a mis amigos del subgrupo 3, por compartir conmigo momentos inolvidables llenos de risas, aprendizaje y compañerismo. Por ser mi apoyo en las horas más difíciles y contribuir tanto a mi desarrollo académico como personal. Su amistad ha sido fundamental en este camino.

A la profesora Viviana Sánchez y al profesor Carlos Muvdi, por su guía, paciencia y apoyo incondicional. Sus enseñanzas y orientación fueron esenciales para que este trabajo se hiciera realidad.

Gracias a Angélica Angarita, quien nos instruyó y acompañó a lo largo de todo el proceso, por su disposición, paciencia y por compartir con nosotros su valioso conocimiento. Tu guía y generosidad fueron cruciales para completar este proyecto.

A todos aquellos que, de una u otra manera, han aportado su granito de arena en este proceso, mis más sinceros agradecimientos. Gracias por estar a mi lado y ayudarme a alcanzar esta meta.

Juliana Stephania Rengifo Mejía

Dedicatoria

A mi madre Melba, por su amor incondicional, por ser mi motor y mi inspiración, por cada consejo, abrazo y palabra de aliento.

A mis hermanos Cami y Leo, por darme las herramientas necesarias para crecer. Todo lo que soy se los debo a ustedes.

A Daniel, por su apoyo constante y ser mi fuente de alegría y fortaleza en esta travesía.

Angie Natalia Medina Rueda

Contenido

Introducción	14
1. Objetivos.....	17
1.1. Objetivo general	17
1.2. Objetivos específicos.....	17
2. Marco conceptual.....	18
2.1. <i>Lactobacillus casei</i>	18
2.2. Actividad antimicrobiana y antibiopelícula	19
3. Estado del arte.....	21
4. Metodología	24
4.1. Descripción experimental.....	24
4.2. Desarrollo experimental	24
4.2.1. Pretratamiento del lactosuero	24
4.2.2. Fase 1. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en medios formulados con lactosuero pretratado.	25
4.2.3. Fase 2. Efecto de las concentraciones de sobrenadante extracelular en las actividades antimicrobiana y antibiopelícula.....	28
4.2.4. Fase 3. Determinación del tiempo de fermentación más adecuado para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.....	29
4.3. Métodos experimentales y de caracterización.....	30
5. Análisis y discusión de resultados	31
5.1. Pretratamiento del lactosuero	31
5.2. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en medios formulados con lactosuero pretratado.	32
5.3. Evaluación del efecto de las concentraciones de sobrenadante extracelular en las actividades antimicrobiana y antibiopelícula.....	37

5.4. Determinación del tiempo de fermentación más adecuado para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.....	42
6. Conclusiones.....	46
7. Recomendaciones	47
Referencias bibliográficas.....	48
Apéndices.....	53

Lista de Tablas

Tabla 1. Diseño de experimento para diferentes formulaciones de medios de cultivo basados en lactosuero pretratado.	25
Tabla 2. Resultados lactosuero desproteinizado.....	31
Tabla 3. Resultados biomasa global y velocidad específica de crecimiento.....	32
Tabla 4. Análisis de varianza para la biomasa global y la velocidad de crecimiento máxima.	34
Tabla 5. Análisis de varianza para el conteo de unidades formadoras de colonia.	36
Tabla 6. Significancia estadística (valor p) de los factores que afectan la actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones de sobrenadante	38
Tabla 7. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana.	39
Tabla 8. Significancia estadística (valor p) de los factores que afectan el %inhibición a diferentes concentraciones de sobrenadante.....	41
Tabla 9. Análisis de varianza para el porcentaje de formación de biopelícula.	41
Tabla 10. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en medios formulados a lo largo del tiempo.	43
Tabla 11. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de <i>Lactobacillus casei</i> en medios formulados a diferentes tiempos de incubación.	43
Tabla 12. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.	44
Tabla 13. Medición del pH y producción de ácido láctico a las 72 h en diferentes medios.	45
Tabla 14. Recopilación de antecedentes científicos de la producción de metabolitos antimicrobianos y antibiopelícula de microorganismos probióticos en diversos sustratos.	53
Tabla 15. Medio ATCC 416 MRS para <i>Lactobacilos</i> Modificado sin Sorbitán Monooleato.	54
Tabla 16. Resultados curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	56

Tabla 17. Variación del pH durante el crecimiento de *Lactobacillus casei*. 56

Tabla 18. Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Lactobacillus casei*. 57

Tabla 19. Análisis de varianza para la biomasa global. 58

Tabla 20. Análisis de varianza para la velocidad máxima de crecimiento..... 58

Tabla 21. Resultados actividad antimicrobiana con variaciones en la concentración de sobrenadante extracelular..... 59

Tabla 22. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 5%. 59

Tabla 23. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 7,5%. 59

Tabla 24. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 10%. 60

Tabla 25. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 50%. 60

Tabla 26. Resultados de inhibición de la formación de biopelícula con variaciones en la concentración de sobrenadante extracelular..... 61

Tabla 27. Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 5%. 61

Tabla 28. Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 7,5%. 61

Tabla 29. Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 10%. 62

Tabla 30. Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 50%. 62

Tabla 31. Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana en el tiempo. 63

Tabla 32. Análisis de varianza de la formación de biopelícula en el tiempo. 63

Lista de Figuras

Figura 1. Secreción de diversos compuestos antimicrobianos por bacterias del género <i>Lactobacillus</i>	18
Figura 2. Diagrama metodología.	24
Figura 3. Diagrama del proceso experimental de la fase 1 para la evaluación de medios formulados con lactosuero pretratado.	27
Figura 4. Distribución de porcentajes de sobrenadante en actividades antimicrobianas y antibiopelículas.	28
Figura 5. Lactosuero antes y después del proceso de filtración.....	32
Figura 6. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	33
Figura 7. Efecto del extracto de levadura y lactosa en la biomasa global.	34
Figura 8. Conteo de las colonias de <i>Lactobacillus casei</i> a lo largo del tiempo.	35
Figura 9. Variación del pH a lo largo del periodo de fermentación.	36
Figura 10. Variación de pseudomonas aeruginosa con diferentes concentraciones de sobrenadante.	37
Figura 11. Porcentaje de inhibición de biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figura 12. Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> en medios formulados a lo largo del tiempo.	42
Figura 13. Actividad antimicrobiana (a) y antibiopelícula (b) de <i>Lactobacillus casei</i> en medios formulados a diferentes tiempos de incubación.....	44
Figura 14. Curva de calibración ácido láctico.	55
Figura 15. Curva de calibración lactosa.....	55

Lista de Apéndices

Apéndice A. Antecedentes de metabolitos extracelulares de <i>Lactobacillus</i>	53
Apéndice B. Formulación medio MRS.....	54
Apéndice C. Curva de calibración de ácido láctico y lactosa	55
Apéndice D. Resultados crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	56
Apéndice E. Resultados ANOVA crecimiento <i>Lactobacillus casei</i>	58
Apéndice F. Resultados ANOVA actividad antimicrobiana.....	59
Apéndice G. Resultados ANOVA formación de biopelícula	61
Apéndice H. Resultados ANOVA actividad antimicrobiana y antibiopelícula en el tiempo	63

Resumen

Título: Estudio de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de metabolitos extracelulares de *Lactobacillus casei* empleando lactosuero como fuente de carbono. *

Autor: Juliana Stephania Rengifo Mejía, Angie Natalia Medina Rueda **

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, lactosuero pretratado, actividad antimicrobiana, actividad antibiopelícula, metabolitos extracelulares.

Descripción: En este trabajo se investigó el aprovechamiento del lactosuero, un subproducto de la industria láctea que constituye hasta el 95% del volumen total de leche procesada y que, en su mayoría, es desechado, lo que genera un importante problema ambiental. Aunque el lactosuero contiene nutrientes valiosos como lactosa y proteínas, solo una pequeña fracción es reutilizada, lo que resalta la necesidad de buscar alternativas sostenibles para su valorización. En este estudio, se utilizó lactosuero pretratado como fuente de carbono para el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 393, analizando la actividad antimicrobiana y capacidad para inhibir biopelículas de sus metabolitos extracelulares. Se realizaron pruebas para evaluar el crecimiento de *L. casei* en medios formulados con lactosuero, así como la efectividad de los metabolitos obtenidos para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y la formación de biopelículas. Las formulaciones F2 (32,847 g/L de lactosa, 5 g/L de extracto de levadura) y F5 (22,847 g/L de lactosa, 10 g/L de extracto de levadura) demostraron ser las más efectivas, destacando la formulación F2, que logró un 82,97% de inhibición de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 a las 72 h al utilizar un 10% de sobrenadante extracelular. Estos resultados enfatizan el valor del lactosuero como un recurso sostenible y económico para la producción de compuestos con aplicaciones industriales, especialmente en la preservación de alimentos y el control de infecciones bacterianas, contribuyendo así a la reducción de residuos y al desarrollo de productos de mayor valor agregado.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: PhD. Viviana Sánchez Torres. Codirector: Dr. Carlos Jesús Muvdi Nova.

Abstract

Title: Study of the antimicrobial and anti-biofilm activity of extracellular metabolites of *Lactobacillus casei* using whey as a carbon source. *

Author: Juliana Stephania Rengifo Mejía, Angie Natalia Medina Rueda **

Keywords: *Lactobacillus casei*, pretreated whey, antimicrobial activity, anti-biofilm activity, extracellular metabolites

Description: This project investigates the use of whey, a by-product of the dairy industry that constitutes up to 95% of the total volume of milk processed and is mostly discarded, which generates an important environmental problem. Although whey contains valuable nutrients such as lactose and protein, only a small fraction is reused, highlighting the need to seek sustainable alternatives for its valorization. In this study, pretreated whey is used as a carbon source for the growth of *Lactobacillus casei* ATCC 393, analyzing the antimicrobial activity and ability to inhibit biofilms of its extracellular metabolites. Tests were performed to evaluate the growth of *L. casei* in media formulated with whey, as well as the effectiveness of the metabolites obtained to inhibit the growth of pathogenic microorganisms and the formation of biofilms. Formulations F2 (32.847 g/L lactose, 5 g/L yeast extract) and F5 (22.847 g/L lactose, 10 g/L yeast extract) proved to be the most effective, highlighting formulation F2, which achieved 82.97% inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms at 72 h when using 10% extracellular supernatant. These results emphasize the value of whey as a sustainable and economical resource to produce compounds with industrial applications, especially in food preservation and bacterial infection control, thus contributing to the reduction of waste and the development of higher value-added products.

* Degree work

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Ph.D. Viviana Sánchez Torres. Co-director: Dr. Carlos Jesús Muvdi Nova.

Introducción

El lactosuero es un subproducto de la industria láctea generado durante la separación del coágulo de leche en la producción de queso, yogur y otros productos (Poveda et al., 2013). Representa entre el 85% y el 95% del volumen total de la leche y retiene más de la mitad de sus nutrientes, principalmente lactosa y proteínas (Zambrano et al., 2021). Según la Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGÁN), en 2023 Colombia produjo aproximadamente 1.206 millones de litros de lactosuero (Fedegán, 2024b), exportándose solo 368 mil litros (Fedegán, 2024a), lo que equivale a menos del 0,1% de la producción total de lactosuero.

Durante el proceso de cuajado, el lactosuero constituye cerca del 90% del volumen total de leche utilizada, generando entre 9 y 10 kg de residuos por cada kg de queso producido (Ladino Carillo, 2021). Esto convierte a la industria láctea en una fuente significativa de aguas residuales, con un rango anual de entre 3.739 y 11.217 millones de metros cúbicos (Tirado et al., 2016). Estos volúmenes destacan la creciente preocupación por la contaminación del agua debido a la liberación de lactosuero en las aguas residuales (Corantioquia, 2016). En Colombia, el artículo 8 de la Resolución No. 2997 de 2001 prohíbe la adición de lactosuero en la producción de leche cruda, higienizada o en polvo, lo que resalta la necesidad de buscar alternativas para valorizar este subproducto mediante la creación de productos de mayor valor agregado que cumplan con la normativa vigente.

La valorización se puede abordar a través de dos enfoques principales: la recuperación de compuestos valiosos como proteínas y lactosa, y el uso en procesos de fermentación para obtener ácido láctico, ácidos orgánicos, biopolímeros, bacteriocinas, entre otros (Zambrano et al., 2021). Debido a su alta disponibilidad, bajo costo y composición rica en lactosa, el lactosuero se convierte en un sustrato óptimo para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales se utilizan

en la fermentación para producir diversos metabolitos de interés. Además, debido a su origen como subproducto generado de la industria láctea, el lactosuero se posiciona como una alternativa sostenible y respetuosa con el medio ambiente, contribuyendo así a la reducción de residuos y al aprovechamiento óptimo de los recursos disponibles. Así mismo, el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) ha explorado su valorización a través del procesamiento para su uso en la producción de ácido láctico (González Téllez, 2019). No obstante, aunque el lactosuero es rico en lactosa, presenta deficiencias en nitrógeno y otros nutrientes esenciales para el crecimiento de las bacterias, por lo que necesita ser suplementado para asegurar la producción de metabolitos (Sabo et al., 2018).

Entre los metabolitos producidos por bacterias ácido-lácticas con propiedades antimicrobianas y antibiopelículas, destacan las bacteriocinas y los biosurfactantes. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos con un espectro de actividad bactericida que se dirige principalmente contra bacterias patógenas (Soltani et al., 2021). Aunque diferentes microorganismos pueden producirlas, las BAL han recibido mayor atención por ser generalmente seguras (Sabo et al., 2018). Por otro lado, los biosurfactantes son compuestos microbianos con una estructura con propiedades antimicrobianas que los hacen útiles en la lucha contra bacterias patógenas y desempeñan un papel crucial en la prevención de la adhesión bacteriana a superficies, lo cual es fundamental para evitar la formación de biopelículas (Srivastava et al., 2022).

En el ámbito de la industria alimentaria, por ejemplo, los biosurfactantes se aplican de dos formas principales: en primer lugar, para limpieza o tratamiento de las superficies que están en proximidad directa con los productos; y, en segundo lugar, como aditivos que mejoran las propiedades de los alimentos, especialmente gracias a su capacidad emulsificante y antioxidante (Nitschke & e Silva, 2018). Por otro lado, las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas han

generado un gran interés debido a su potencial para la biopreservación, siendo especialmente efectivas en la carne, los alimentos envasados y los productos lácteos (Gutiérrez-Cortés et al., 2018).

En el grupo CICTA, se desarrolló un trabajo de investigación de producción de biosurfactantes de *Lactobacillus* a partir de hidrolizados de cáscara de cacao (Angarita Rangel, 2022). Se determinó que los *Lactobacillus* producen biosurfactantes extracelulares y asociados a la célula, con propiedades antimicrobianas e inhibitorias en la formación de biopelícula. A pesar de los resultados prometedores, se concluyó que era necesaria la búsqueda de una fuente de carbono de bajo costo con requerimientos de procesamiento menores para obtener los azúcares fermentables necesarios.

Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el lactosuero pretratado como una respuesta a la necesidad de encontrar una fuente de carbono económica y de fácil procesamiento para la producción de metabolitos extracelulares de *Lactobacillus*. Así, la pregunta de investigación es: ¿Cuál es la influencia del lactosuero pretratado como fuente de carbono en el crecimiento de *Lactobacillus casei* y cómo afecta a la producción de metabolitos extracelulares con actividad antimicrobiana y antibiopelícula?

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Estudiar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los metabolitos extracelulares de *Lactobacillus casei* producidos en medios de cultivo basados en lactosuero pretratado.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de *Lactobacillus casei* en medios de cultivo basados en lactosuero pretratado.
- Seleccionar el medio de cultivo y la concentración de sobrenadante que favorezca las actividades antimicrobiana y antibiopelícula de los metabolitos extracelulares de *Lactobacillus casei*.
- Determinar el tiempo de fermentación más adecuado para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula, considerando el medio y la concentración de sobrenadante más efectivos.

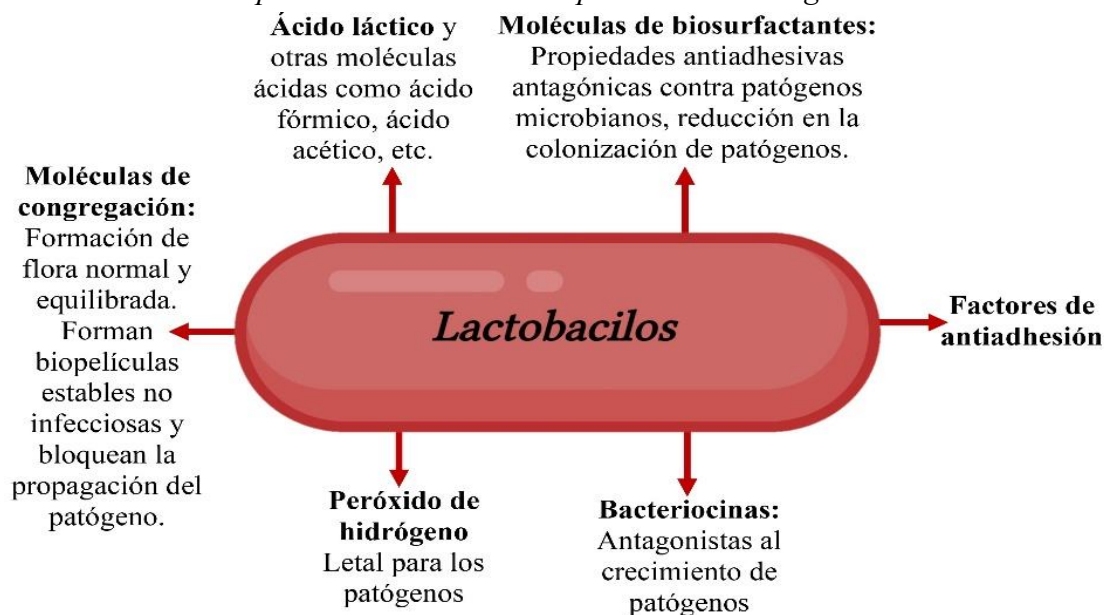
2. Marco conceptual

2.1. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un microorganismo productor de diversos metabolitos esenciales para la fermentación y la salud humana y animal (Kondybayev et al., 2022). Entre estos metabolitos se incluyen ácidos orgánicos, bacteriocinas, exopolisacáridos, biosurfactantes y enzimas (Orejuela Chirinos, 2023). Estos compuestos regulan respuestas inmunitarias, modulan el microbioma intestinal y dificultan el crecimiento de patógenos (Tang et al., 2023). Los ácidos orgánicos, como el ácido láctico, acidifican el entorno, limitando la proliferación de microorganismos no deseados (Kondybayev et al., 2022). Los exopolisacáridos, además de mejorar la textura de alimentos fermentados, influyen en la inmunomodulación y forman biopelículas protectoras en el tracto gastrointestinal (Spaggiari et al., 2024). En la Figura 1 se muestran los diferentes tipos de metabolitos producidos por *Lactobacillus*.

Figura 1.

Secreción de diversos compuestos antimicrobianos por bacterias del género *Lactobacillus*.



Nota: Tomado y adaptado de: (Satpute et al., 2016)

Asimismo, *L. casei* produce bacteriocinas, péptidos antimicrobianos que inhiben la proliferación de patógenos (Orejuela Chirinos, 2023). Estos compuestos, producidos por bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluidas las BAL, son resistentes a pH ácidos y a las temperaturas de pasteurización (Kondybayev et al., 2022). En la industria alimentaria, las bacteriocinas actúan como conservantes naturales. La nisina es la bacteriocina más utilizada debido a su amplio espectro antimicrobiano y su capacidad para ser degradada por enzimas digestivas, lo que la hace segura para el consumo (Tang et al., 2023).

La producción de metabolitos extracelulares en *L. casei* varía según la cepa y las condiciones ambientales. Factores como las fuentes de carbono y nitrógeno, la relación C: N y las condiciones físicoquímicas, incluyendo pH, temperatura y aireación, son determinantes. Estos metabolitos pueden obtenerse de materias primas residuales de bajo costo, como residuos alimentarios e industriales. El nitrógeno, esencial para el crecimiento microbiano y la síntesis de proteínas y enzimas, se obtiene del extracto de levadura, sales de amonio y urea (Srivastava et al., 2022).

2.2. Actividad antimicrobiana y antibiopelícula

Las BAL, como *L. casei*, son efectivas contra bacterias patógenas, incluidas aquellas resistentes a múltiples fármacos. La creciente resistencia a tratamientos tradicionales resalta la importancia de nuevos agentes antimicrobianos. Los probióticos, incluidas las BAL, ofrecen una opción prometedora al producir compuestos antimicrobianos, mejorar la función barrera de las mucosas y estimular el sistema inmunológico (Pazhoohan et al., 2020). Las BAL producen una variedad de compuestos antimicrobianos, incluidos ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, enzimas, bacteriocinas y biosurfactantes, efectivos contra bacterias patógenas y de deterioro de alimentos (Sharma & Singh Saharan, 2014).

Las BAL desempeñan un papel crucial en la prevención de la adhesión bacteriana a superficies, un paso clave en la formación de biopelículas, que ofrecen resistencia a agentes físicos y químicos. Las biopelículas se forman en un proceso de adhesión, maduración y dispersión. Los tratamientos para biopelículas buscan reducir la cantidad de patógenos en zonas infectadas y minimizar el riesgo de resistencia, haciendo que los microorganismos incrustados sean más sensibles a concentraciones menores de antimicrobianos (Chappell & Nair, 2020). Las BAL han demostrado una notable capacidad para inhibir el crecimiento, la formación y la viabilidad de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*, un efecto asociado a la acidificación del entorno generado durante su crecimiento. Este ambiente ácido, potenciado por la producción de ácidos láctico y acético, es fundamental para la inhibición de patógenos y la descomposición de biopelículas (Chappell & Nair, 2020).

3. Estado del arte

L. casei es conocida por su capacidad para sintetizar bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos que inhiben patógenos y evitan la formación de biopelículas, estructuras multicelulares que protegen a las bacterias de factores externos (Sharma & Singh Saharan, 2014). Aunque el lactosuero, se presente como un subproducto rico en nutrientes de la industria láctea, su uso como fuente de carbono en la producción de metabolitos extracelulares antimicrobianos por *L. casei* no ha sido ampliamente investigado. Pretratamientos como la desproteínización y clarificación mejoran su eficacia como sustrato (González Téllez, 2019), pero su impacto en la síntesis de metabolitos aún no ha sido investigado exhaustivamente. A pesar de que algunos estudios destacan la capacidad de *L. casei* para generar compuestos antimicrobianos utilizando otros sustratos (Angarita Rangel, 2022), el potencial del lactosuero sigue siendo un área poco explorada. En el Apéndice A se encuentra una recopilación de antecedentes científicos sobre la producción de metabolitos antimicrobianos y antibiopelícula en diversos sustratos.

En estudios previos, se evidenció que la cepa *Lactobacillus plantarum* ST16, cultivada en medio MRS con diferentes nutrientes, produce una bacteriocina con alta actividad antimicrobiana. Sin embargo, al cultivarse en suero de queso, aunque se generó una biomasa adecuada, no se produjo bacteriocina (Todorov et al., 2011). Posteriormente, se llevó a cabo un nuevo estudio para evaluar la capacidad de *L. plantarum* ST16Pa para producir bacteriocinas en suero de leche, buscando optimizar la producción económica mediante diferentes formulaciones de suero de leche en polvo suplementadas con carbono, nitrógeno y vitamina B₁₂. Los resultados fueron similares a los obtenidos en el medio MRS (Sabo et al., 2018).

Se ha postulado que la actividad probiótica de las BAL puede deberse a la inhibición del crecimiento microbiano, competencia por el espacio o nutrientes, actividad inmunomoduladora y

modulación de la barrera intestinal (Kang et al., 2017). Además, se ha encontrado que las BAL han mostrado dos mecanismos distintos para eliminar *Staphylococcus aureus*: la acidificación del medio y la secreción de proteínas específicas con actividad antimicrobiana (Kang et al., 2017).

Un estudio sobre la eficacia de los metabolitos producidos por *L. casei* y *Lactobacillus rhamnosus* empleó métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana, incluyendo la difusión en pocillos en agar y la determinación de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). Además, se llevaron a cabo ensayos de microtitulación para analizar la inhibición de biopelículas. Los resultados revelaron una inhibición efectiva contra *S. aureus* ATCC 33591. No obstante, la investigación concluyó que la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células se atribuía principalmente a la producción de ácidos orgánicos, en lugar de a la generación de bacteriocinas (Saidi et al., 2023).

Se ha evidenciado que los probióticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas asociadas a alimentos, como *Escherichia coli* y *Salmonella*. Por ejemplo, *L. rhamnosus* ha demostrado actividad antimicrobiana contra *Salmonella Typhimurium* y *S. aureus* (Lee et al., 2020). Asimismo, un estudio reveló que el pH bajo de los sobrenadantes de las BAL es un factor crucial para reducir la formación y viabilidad de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* PA14, actuando como un factor determinante en la eliminación de especies intolerantes al ácido (Chappell & Nair, 2020). Un estudio demostró que *L. casei* MRTL3 produce bacteriocinas y biosurfactantes que inhiben significativamente patógenos como *S. aureus* (Sharma & Singh Saharan, 2014).

Investigaciones del grupo CICTA han mostrado que el lactosuero desproteínizado puede ser utilizado como fuente de carbono para la producción de ácido láctico con *L. casei*. Se identificaron dos etapas clave: la precipitación térmica y ácida de las proteínas del lactosuero, y la

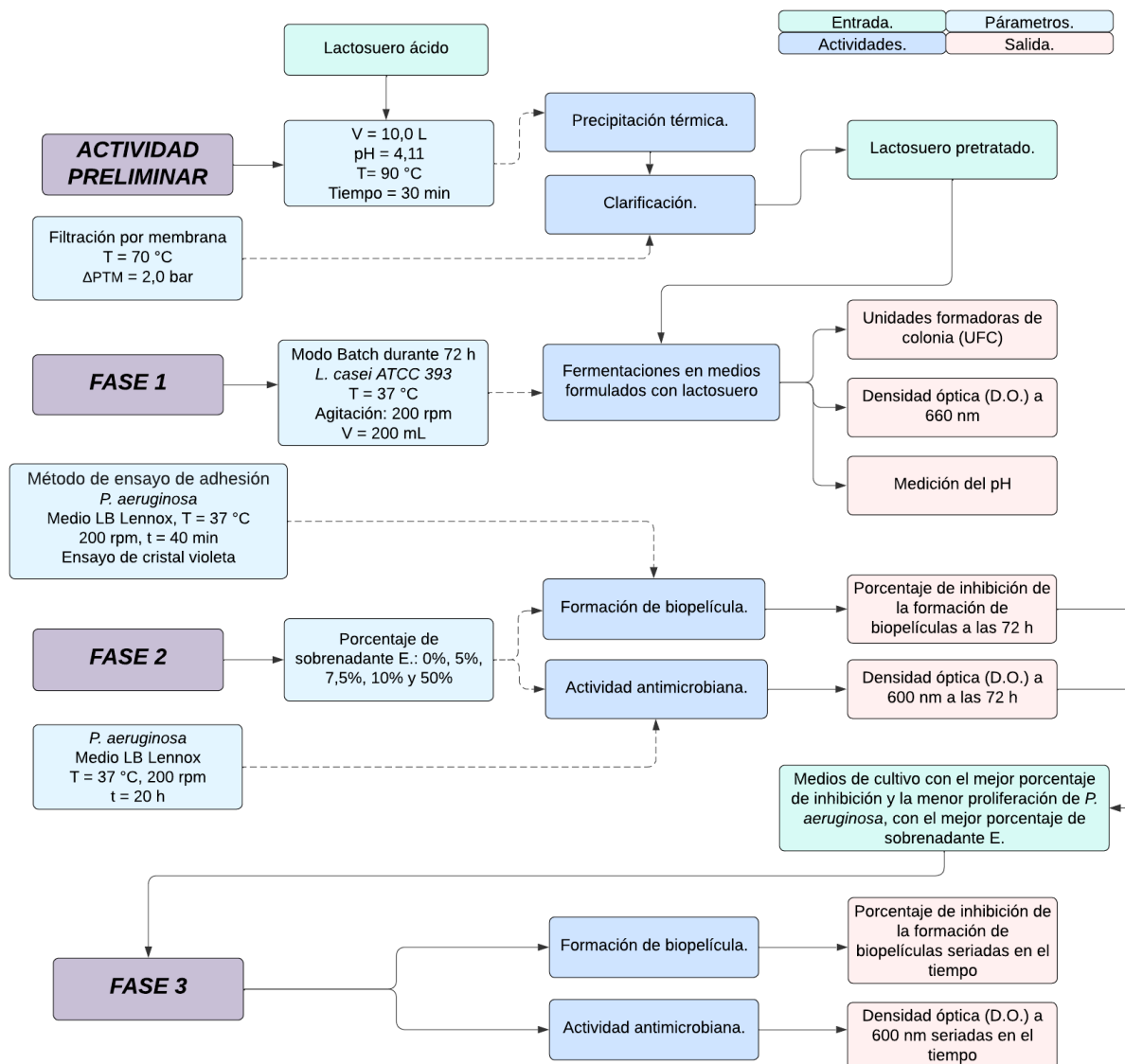
clarificación, que producen requesón y lactosuero clarificado (González Téllez, 2019). A pesar de estos avances, la capacidad de *L. casei* para producir metabolitos antimicrobianos a partir de lactosuero no se había explorado en el grupo CICTA. Por lo tanto, este estudio busca investigar la producción simultánea de metabolitos extracelulares con actividad antimicrobiana y antibiopelícula utilizando *L. casei* y lactosuero pretratado.

4. Metodología

4.1. Descripción experimental

Figura 2.

Diagrama metodología.



4.2. Desarrollo experimental

4.2.1. Pretratamiento del lactosuero

En esta actividad se acondicionó el lactosuero para lograr el desplazamiento de sus proteínas, mediante precipitación térmica. El lactosuero empleado fue obtenido de la empresa Yogatti Artesanal, especializada en la producción de yogurt griego natural con cultivos lácticos de

Streptococcus thermophilus y *Lactobacillus bulgaricus*. Se utilizaron 10 L de lactosuero, el cual fue descremado mediante la desnatadora Elecrem n°1. Posteriormente, se realizó un pretratamiento térmico manteniendo la temperatura a 90 °C en un baño térmico durante 30 min (González Téllez, 2019). Finalizado el baño térmico, se procedió a la clarificación, pasando el lactosuero a través de un sistema de filtración compuesto por ocho membranas cerámicas monotubulares con un umbral de corte de 100 nm. Estas membranas cuentan con un módulo de membrana de 1,0 metro de longitud y una superficie de 0,132 m². La filtración se llevó a cabo a una temperatura de 70 °C, con un gradiente de presión transmembrana (Δ PTM) de 2,0 bar (Muvdi Nova et al., 2022).

4.2.2. Fase 1. Crecimiento de *Lactobacillus casei* en medios formulados con lactosuero pretratado.

Se implementó un diseño de experimentos exponencial 3² por duplicado para evaluar el crecimiento de *L. casei* ATCC 393 en medios formulados con lactosuero pretratado. Los cultivos se realizaron en medios de fermentación basados en el lactosuero pretratado con la adición de citrato de amonio a 2,0 g/L, acetato de sodio a 5,0 g/L y Na₂HPO₄ a 2,0 g/L. Se llevó a cabo una evaluación de tres niveles y dos factores en la formulación de los medios de cultivo, como se detalla en la Tabla 1. Este diseño experimental tuvo como objetivo determinar cuál de los dos factores ejercía una influencia predominante en el crecimiento del microorganismo. Los valores de los componentes del medio se establecieron según la concentración de dichos componentes en el medio de cultivo ATCC Medio 416: *Lactobacillus* MRS Agar/Caldo (ATCC, 2024).

Tabla 1.

Diseño de experimento para diferentes formulaciones de medios de cultivo basados en lactosuero pretratado.

Nivel	Lactosa* [g/L]	Extracto de Levadura [g/L]
1	12,8	0,0
0	22,8	5,0
-1	32,8	10,0

*Cuantificación del lactosuero tratado mediante HPLC.

Los cultivos se llevaron a cabo durante 72 h utilizando nueve formulaciones, como se detalla en el diseño experimental de la Tabla 1, cada una por duplicado junto con un control negativo que correspondía al medio formulado con lactosuero sin inóculo. Inicialmente, se ajustó el pH de los medios de cultivo a 6,5 con NaOH 1N, y luego se distribuyeron 30 mL en viales de 100 mL, que fueron esterilizados en autoclave a 121 °C. El preinóculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MRS, y se incubó durante 18 h. Posteriormente, se añadió al medio formulado hasta alcanzar una densidad óptica inicial de 0,2 a 660 nm en un volumen de 35 mL. Los cultivos se realizaron en cinco viales, cada uno representando una muestra tomada.

Todos los cultivos se realizaron a 37 °C y 200 rpm en una incubadora con agitación orbital (Being, USA) a las 6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h de fermentación. En cada intervalo, se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y se midió la densidad óptica (D.O.) a 660 nm para evaluar la turbidez y se midió el pH. Luego, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm y 4 °C durante 15 min para separar las células del cultivo y obtener el sobrenadante con metabolitos extracelulares (Angarita Rangel, 2022). Además, se calculó la velocidad específica de crecimiento máxima Ecuación 1 durante las primeras 6 h de fermentación, correspondientes a la fase de crecimiento exponencial, y se determinó la producción de biomasa global Ecuación 2 de *L. casei*. El esquema de la fase 1 se presenta en la Figura 3. El análisis estadístico se realizó utilizando el software OriginLab, en su versión OriginPro Learning Edition.

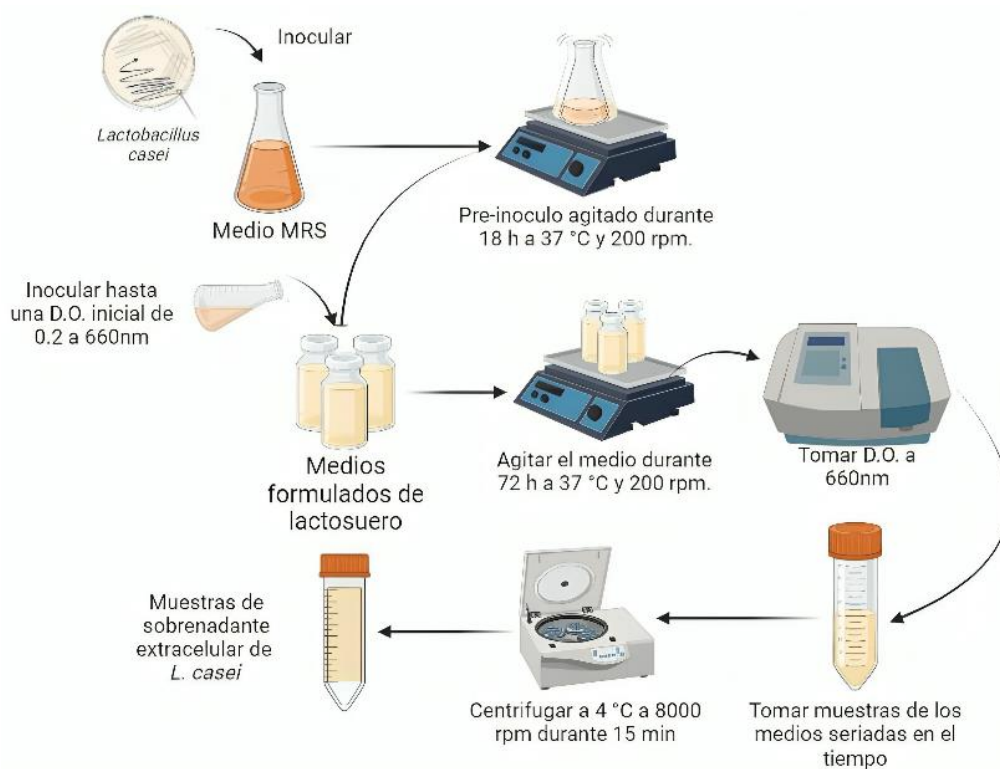
$$\ln(D.O._{660\text{ nm}}) = \mu_{MAX} * t + \ln(D.O._{660\text{ nm}_{i\text{ h}}}) [h^{-1}] \quad (\text{Ec. 1})$$

$$Biomasa_{global} = \frac{D.O._{660\text{ nm}_{f\text{ h}}} - D.O._{660\text{ nm}_{i\text{ h}}}}{t_{f\text{ h}} - t_{i\text{ h}}} \left[\frac{D.O._{660\text{ nm}}}{h} \right] \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde La Ecuación 1 estima la velocidad específica máxima de crecimiento $\mu_{MAX} [h^{-1}]$ durante la fase exponencial de *L. casei*. En ella, $Ln(D.O._{660nm})$ representa el logaritmo natural de la densidad óptica medida a 660 nm en un tiempo específico, mientras que $Ln(D.O._{660nm_{ih}})$ es el logaritmo natural de la densidad óptica en un tiempo inicial. La pendiente de la ecuación refleja la velocidad máxima de crecimiento. Por otro lado, la Ecuación 2 calcula la biomasa global producida, donde $D.O._{660nm_{fh}}$ es la densidad óptica al final de la fermentación y $D.O._{660nm_{ih}}$ corresponde a la medición inicial. La diferencia entre ambas se divide por el tiempo transcurrido $(t_f - t_i) [h]$, resultando en la tasa de producción de biomasa expresada en $\left[\frac{D.O. 660 nm}{h}\right]$.

Figura 3.

Diagrama del proceso experimental de la fase I para la evaluación de medios formulados con lactosuero pretratado.



4.2.3. Fase 2. Efecto de las concentraciones de sobrenadante extracelular en las actividades antimicrobiana y antibiopelícula

Se realizaron precultivos de *Pseudomonas aeruginosa* PA14 en viales de 100 mL con 20 mL de medio LB (Luria Bertani) (triptona 10 g/L; extracto de levadura: 5 g/L; NaCl: 5 g/L) durante 18 h a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana en una microplaca de 96 pozos con diferentes concentraciones de sobrenadante (0%, 5%, 7,5%, 10% y 50%), ajustando el volumen restante con medio LB inoculado con *P. aeruginosa* hasta completar un volumen total de 200 µL por pozo. El control negativo consistió en medio LB sin inocular, mientras que el control positivo fue el cultivo de *P. aeruginosa* sin sobrenadante. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h sin agitación, y se midió la densidad óptica a 600 nm. Luego, para la actividad antibiopelícula, se eliminaron las células no adheridas lavando las placas con agua destilada. Se incubaron 250 µL de cristal violeta (0,67% p/v) durante 40 min a temperatura ambiente. Después de retirar el cristal violeta mediante lavado de la placa, se añadió la misma cantidad de etanol 96% y se realizó una lectura de la densidad óptica a 570 nm. Los resultados se expresaron en términos de porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de sobrenadante mediante la Ecuación 3 (Angarita Rangel, 2022). La Figura 4 muestra la distribución de los porcentajes de sobrenadante en las pruebas de actividad antimicrobiana y de inhibición de biopelículas.

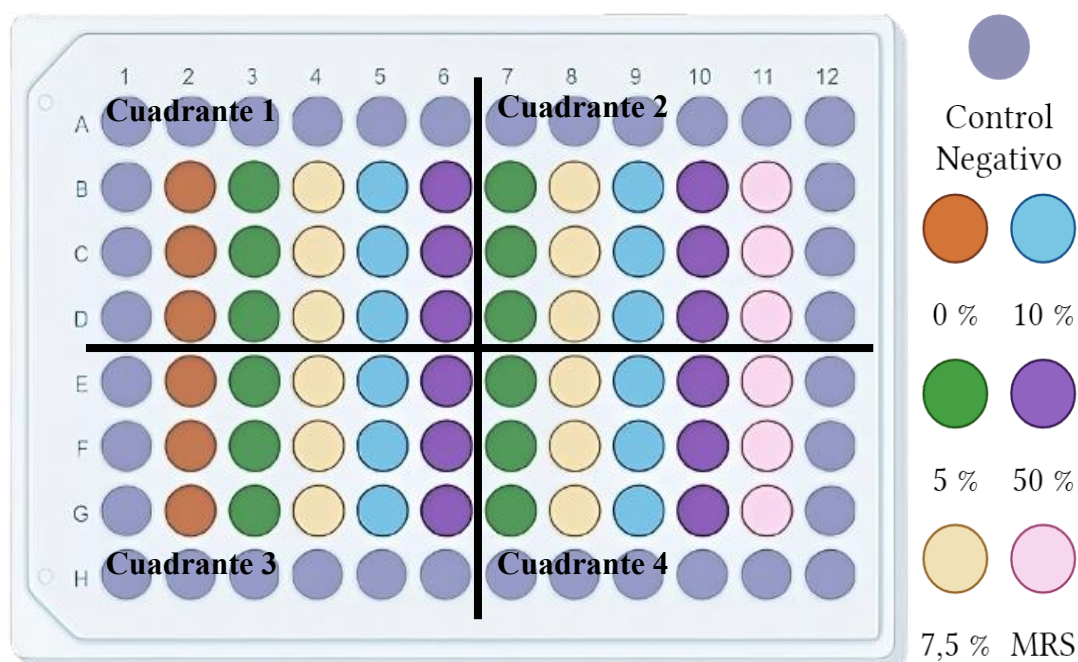
$$\% \text{Inhibición} = \left(1 - \frac{D.O. \text{con sobrenadante} - D.O. \text{control negativo}}{D.O. \text{sin sobrenadante} - D.O. \text{control negativo}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 3.})$$

En esta ecuación, *%Inhibición* representa el porcentaje de inhibición observado en relación con los controles establecidos, *D.O.con sobrenadante* es la densidad óptica medida en los pozos que contienen sobrenadante a una concentración específica, mientras que *D.O.control negativo* corresponde a la densidad óptica del control negativo, que consiste en medio

LB sin inocular. Por otro lado, $D.O_{sin\ sobrenadante}$ es la densidad óptica medida en el pozo que contiene el cultivo de *P. aeruginosa* sin ningún sobrenadante

Figura 4.

Distribución de porcentajes de sobrenadante en actividades antimicrobianas y antibiopelículas.



4.2.4. Fase 3. Determinación del tiempo de fermentación más adecuado para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.

Una vez determinado el medio más efectivo para reducir el crecimiento de *P. aeruginosa* y la formación de biopelículas en la Fase 2, se repitieron los ensayos de actividad antimicrobiana y antibiopelícula en un volumen de fermentación de 200 mL a 37 °C y 200 rpm. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 660 nm a las 6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h; el pH fue registrado a las 72 h y la concentración de ácido láctico se determinó en el tiempo y medio que mostró mayor reducción de *P. aeruginosa*. Las pruebas se realizaron por triplicado, tomando muestras de 1 mL, las cuales se centrifugaron a 8000 rpm y 4 °C durante 15 min, para luego filtrarlas con un filtro de 0,45 µm y eliminar impurezas.

4.3. Métodos experimentales y de caracterización

• Análisis bromatológico, °Brix, turbidez, conductividad, y pH. Se llevaron a cabo las pruebas bromatológicas de acuerdo con las normas establecidas: para el porcentaje de materia seca se siguió la norma A.O.A.C. 990.19; para la grasa mediante el método de Gerber se aplicó la norma A.O.A.C. 2000.18; para la ceniza en lácteos se utilizó la norma A.O.A.C. 945.46; para la humedad se empleó la norma N.T.C. 4979; y para la proteína en lácteos se aplicó la norma A.O.A.C. 991.20. Se utilizó un refractómetro portátil Fisher N° 13964. La turbidez se midió con un turbidímetro portátil Hanna HI98703, la conductividad con un conductímetro portátil Hanna HI 99300, y el pH con un pHmetro portátil Hanna HI991001. La determinación de la densidad del lactosuero se llevó a cabo utilizando un picnómetro con una capacidad de 24,55 mL,

• Cuantificación de lactosa y ácido láctico. Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se usó una columna Coregel 107 conectada a un equipo UFCL LC 20D de Shimadzu, junto con un detector de índice de refracción RID-10A. El análisis se llevó a cabo en modo isocrático a una temperatura de 30 °C, con un flujo de 0,6 cm³/min durante un período de 20 min. La fase móvil consistió en ácido sulfúrico (H₂SO₄) con una concentración de 8 mM

• Recuento de UFC/cm³. Se llevó a cabo el conteo de células viables en agar MRS tras una incubación de 24 a 48 h. Las muestras se sembraron en diferentes diluciones decimales seriadas, alcanzando un factor de dilución de 10⁻⁶. Para la preparación de las soluciones seriadas, se empleó una solución salina de NaCl al 0,9%, utilizando una proporción de 900 µL de solución salina y 100 µL de medio (González Téllez, 2019).

• Medición de D.O. Se empleó el espectrofotómetro UV-VIS Multiskan Go (Thermo Scientific, USA) para estimar la densidad de células en el cultivo. Además, se utilizó el medio de cultivo previo al inóculo como blanco de absorbancia (Angarita Rangel, 2022).

5. Análisis y discusión de resultados

5.1. Pretratamiento del lactosuero

La caracterización fisicoquímica del lactosuero pretratado se muestra en la Tabla 2. Además, en la Figura 5 se puede observar una comparación visual del lactosuero antes y después del proceso de clarificación, lo que evidencia los cambios obtenidos tras el tratamiento.

Tabla 2.
Resultados lactosuero desproteinizado.

Parámetros	Lactosuero desproteinizado
Humedad [%p/p]	94,347±0,01
Materia seca [%p/p]	5,653±0,01
Carbohidratos [%p/p]	4,593±0,010
Lactosa [g/L]	32,847±0,308
Proteína [%p/p]	0,326±0,005
Grasa [%p/p]	DLD*
Ceniza [%p/p]	0,733±0,002
Ácido láctico [g/L]	9,673±0,169
pH	4,11±0,01
°Brix	6,0±0,5
Turbidez [NTU]	22,1±0,1
Densidad [g/cm ³]	1,023±0,0002
Conductividad eléctrica [μS/cm]	3081±11,0

*DLD: Valor por debajo del límite de detección

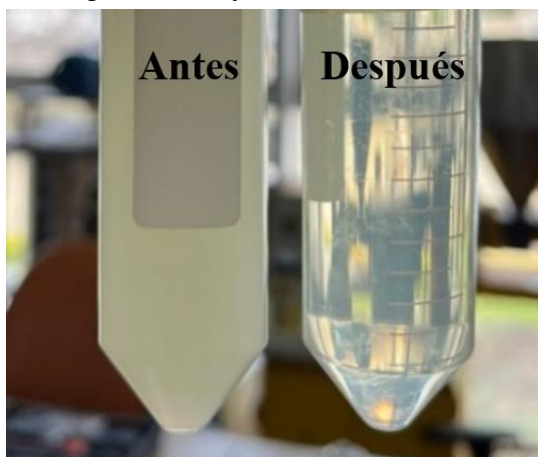
El porcentaje de ceniza en el lactosuero es un indicador de la presencia de minerales como fósforo, calcio y cloruro, que son los componentes minerales predominantes en este subproducto. En cuanto al contenido de proteínas, se distinguen diferentes tipos, siendo la β-lactoglobulina el principal componente, representando aproximadamente el 50%, seguida por la α-lactoalbúmina, que constituye el 20% de las proteínas solubles del suero, entre otras proteínas de interés (González et al., 2017).

En este estudio, se obtuvo un pH de 4,11±0,01 en el lactosuero pretratado, este alto nivel de acidez se atribuye a que el lactosuero usado provenía de la fabricación de yogurt griego, los cuales utilizan cultivos lácticos que producen ácido láctico como uno de sus principales metabolitos. Además, se observó que la cantidad de ácido láctico presente en este lactosuero fue

mayor en comparación con estudios previos, donde se reportó un contenido de ácido láctico de $5,50 \pm 1,50$ g/dm³ en suero de queso (González Téllez, 2019). Este incremento podría estar relacionado con el origen del lactosuero empleado, indicando una mayor actividad fermentativa de ácido láctico.

Figura 5.

Lactosuero antes y después del proceso de filtración.



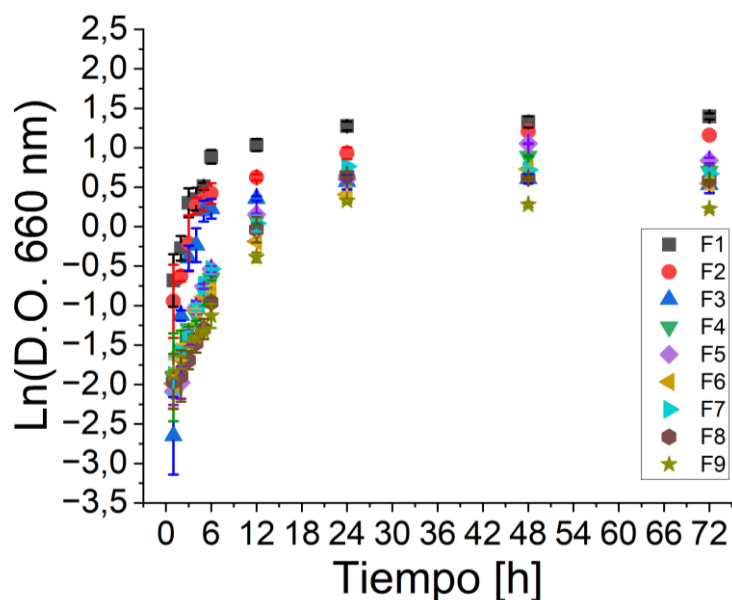
5.2. Crecimiento de *Lactobacillus casei* en medios formulados con lactosuero pretratado.

Las formulaciones evaluadas (F1-F9) para la producción de biosurfactantes mediante *L. casei* y lactosuero como medio de cultivo, variaron en las concentraciones de lactosa y extracto de levadura. La Tabla 3 presenta la velocidad específica de crecimiento (μ_{MAX}) y la biomasa total obtenida en cada formulación. Además, en la Figura 6 se encuentra la curva de crecimiento de *L. casei*.

Tabla 3.

Resultados biomasa global y velocidad específica de crecimiento.

Formulación	Lactosa [g/L]	E. de levadura [g/L]	μ_{MAX} [h ⁻¹]	R ²	Biomasa global [D.O. 660nm/h]
F1	32,847	10	0,293 ± 0,017	0,936	4,97E-02 ± 1,99E-04
F2	32,847	5	0,292 ± 0,116	0,932	3,92E-02 ± 2,59E-03
F3	32,847	0	0,231 ± 0,119	0,908	2,30E-02 ± 1,99E-03
F4	22,847	5	0,247 ± 0,117	0,987	2,62E-02 ± 3,39E-03
F5	22,847	10	0,337 ± 0,034	0,973	3,08E-02 ± 7,97E-04
F6	22,847	0	0,238 ± 0,060	0,957	2,24E-02 ± 2,39E-03
F7	12,847	10	0,274 ± 0,022	0,995	2,54E-02 ± 9,96E-04
F8	12,847	5	0,201 ± 0,058	0,969	2,33E-02 ± 4,98E-04
F9	12,847	0	0,141 ± 0,020	0,977	1,54E-02 ± 4,98E-04

Figura 6.*Curva de crecimiento de Lactobacillus casei.*

Se observa que la formulación F5 presentó la mayor velocidad específica de crecimiento, mientras que la formulación F9, que contenía la menor concentración de lactosa y extracto de levadura, mostró la velocidad específica de crecimiento más baja. En contraste con estos resultados, en estudios previos se ha reportado que, en medios de lactosuero de queso, la velocidad específica de crecimiento para lactosuero desproteinizado y clarificado es de $0,27 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$, con una concentración de $52,43 \pm 1,9 \text{ g/dm}^3$ de lactosa (González Téllez, 2019). Aunque no es posible realizar una comparación directa debido a las diferencias en el tiempo de evaluación de la velocidad específica de crecimiento, se observa que el crecimiento de *L. casei* en los medios formulados de lactosuero no presenta una clara dependencia de la concentración de nutrientes. De manera similar, la formulación F1 produjo la mayor biomasa global, en contraste con la formulación F9, que registró la menor biomasa global.

El análisis de varianza (ANOVA) presentado en la Tabla 4 revela que tanto la lactosa como el extracto de levadura tienen un efecto significativo en la producción total de biomasa. Además,

la interacción entre estos dos factores muestra una influencia positiva en el incremento de las concentraciones, como se evidencia en la Figura 7.

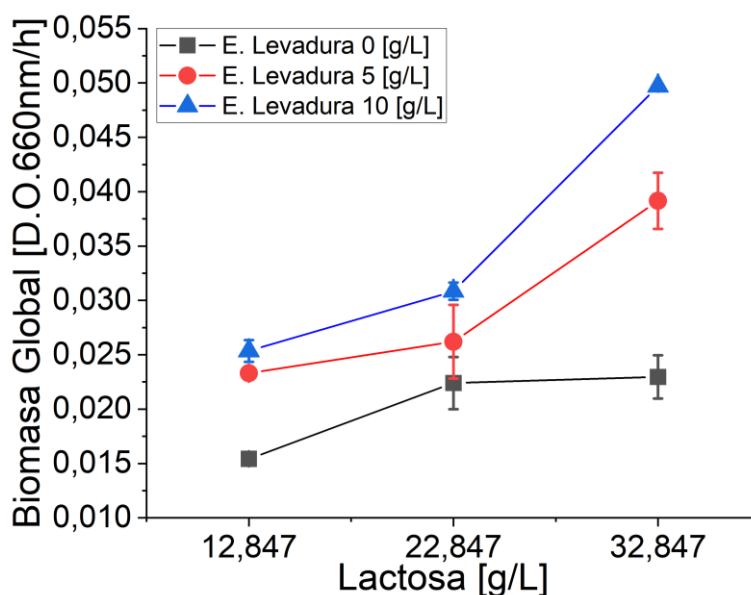
Tabla 4.

Análisis de varianza para la biomasa global y la velocidad de crecimiento máxima

	Biomasa global		μ_{MAX}	
	Valor p		Valor p	
Lactosa	<0,0001	Significativo	0,19914	No significativo
Extracto de levadura	<0,0001	Significativo	0,19752	No significativo
Interacción	3,79382E-4	Significativo	0,80323	No significativo

Figura 7.

Efecto del extracto de levadura y lactosa en la biomasa global.



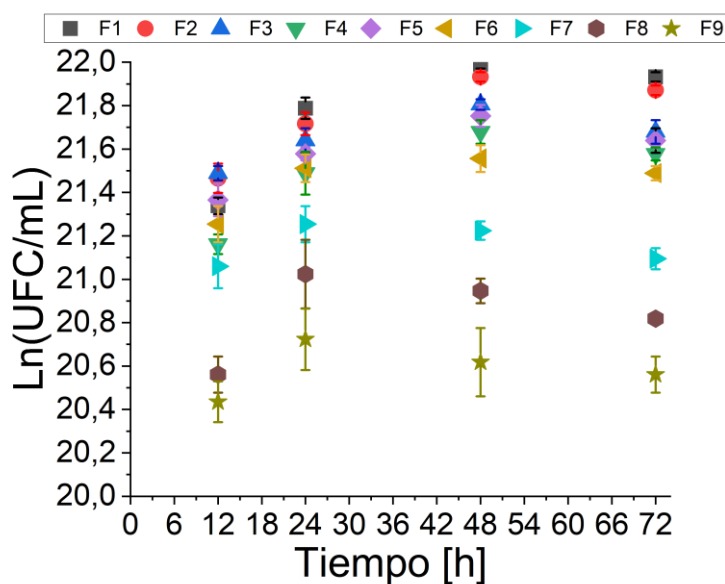
En contraste, los análisis para la velocidad máxima de crecimiento (μ_{MAX}) no revelan diferencias significativas relacionadas con los factores estudiados, se evidencia un efecto considerable en la biomasa global. Tal como se muestra en la Figura 7, el aumento en las concentraciones de lactosa y extracto de levadura genera un incremento notable en la biomasa producida, lo que sugiere una relación directa entre la disponibilidad de estos nutrientes y el crecimiento de *L. casei*.

La Figura 8 muestra la evolución del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en diferentes formulaciones de lactosuero, reflejando el crecimiento de *L. casei* a lo largo del tiempo. Se observa un aumento en el número de UFC en todas las formulaciones hasta las 48 h, seguido

de una estabilización o disminución en algunas. Las formulaciones con mayor concentración de lactosa (F1, F2, F3) exhiben un crecimiento más pronunciado, lo que indica que la lactosa promueve significativamente la proliferación de *L. casei*. Asimismo, las formulaciones con 10 g/L de extracto de levadura (F1, F5, F7) muestran conteos de UFC ligeramente superiores, sugiriendo que el extracto de levadura, rico en nutrientes, potencia el efecto de la lactosa y proporciona un entorno favorable para el crecimiento bacteriano. En estudios previos, se reportó un conteo de unidades formadoras de colonias de hasta $8,20 \cdot 10^{11}$ UFC/cm³ (González Téllez, 2019), mientras se alcanzó un recuento máximo de 10^8 UFC/mL, lo que sugiere que las condiciones del medio pueden haber influido en esta variación.

Figura 8.

Conteo de las colonias de Lactobacillus casei a lo largo del tiempo.



En la Tabla 5 se muestra el análisis de varianza correspondiente al conteo de unidades formadoras de colonias de *L. casei*. Los resultados indican que tanto la formulación del medio de cultivo como la duración de la fermentación influyen significativamente en el crecimiento de *L. casei*. Es notable que la formulación F1 registra el mayor conteo de colonias, mientras que la F9

presente el más bajo. Además, el crecimiento bacteriano alcanza su nivel máximo a las 48 h de fermentación, sugiriendo que este es el tiempo ideal para promover la proliferación de colonias.

Tabla 5.

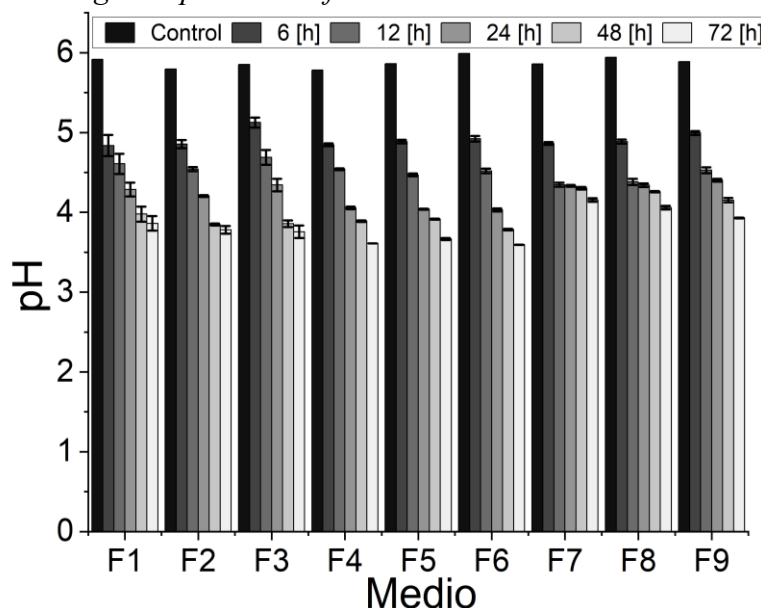
Análisis de varianza para el conteo de unidades formadoras de colonia.

Análisis de varianza para: UFC						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Formulación	11,13362	8	1,3917	275,3933	<0,0001	Significativo
Tiempo	1,43723	3	0,47908	94,8009	<0,0001	Significativo
Interacción	0,40242	24	0,01677	3,31798	5,76163E-4	Significativo
Error	0,18193	36	0,00505			
Corregido total	13,1552	71				

La variación del pH a lo largo del tiempo de fermentación se ilustra en la Figura 9. El pH es un parámetro crucial, ya que los cambios en el pH pueden afectar tanto la estabilidad del medio de cultivo como la actividad metabólica de *L. casei*. Se observa que el pH disminuye progresivamente conforme avanza el tiempo de fermentación, lo cual es esperado debido a la producción de ácido láctico como resultado del metabolismo bacteriano.

Figura 9.

Variación del pH a lo largo del periodo de fermentación.



Las formulaciones con menor lactosa (F7, F8, F9) muestran una caída más rápida del pH durante las primeras 24 h, este descenso se estabiliza en etapas posteriores, indicando una

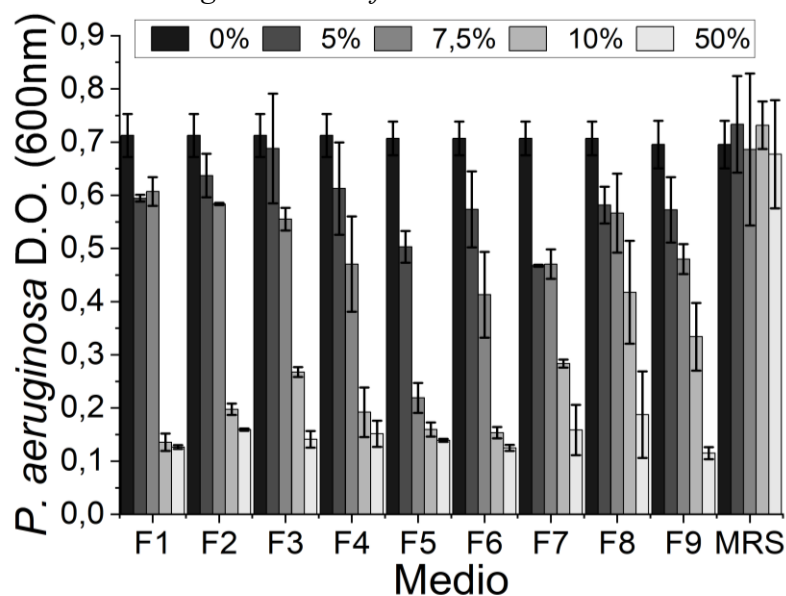
reducción en la producción de ácido láctico conforme se agotan los azúcares disponibles. Por otro lado, las formulaciones con mayor extracto de levadura (F1, F5, F7) mantienen un pH ligeramente más alto al final del proceso, lo que podría deberse a un efecto amortiguador del extracto de levadura. Este comportamiento sugiere que la concentración de extracto de levadura podría modular la velocidad de acidificación, permitiendo un entorno más favorable para el crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos extracelulares.

5.3. Evaluación del efecto de las concentraciones de sobrenadante extracelular en las actividades antimicrobiana y antibiopelícula.

Se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana y formación de biopelícula. La Figura 10 presenta los resultados de actividad antimicrobiana, mostrando los valores de densidad óptica (D.O.) a 600 nm del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio LB luego de adicionar diferentes concentración de los metabolitos extracelulares de *L. casei* obtenidos en las diferentes formulaciones de medio de cultivo basado en lactosuero pretratado. La Figura 10 ilustra estas diferencias, destacando que los datos se basan en muestras tomadas a las 72 h de fermentación.

Figura 10.

Variación de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes concentraciones de sobrenadante.



Los resultados indican que aumentar la concentración de sobrenadante de *L. casei* reduce la densidad óptica, lo que revelan un menor crecimiento de *P. aeruginosa*. Las concentraciones más bajas de sobrenadante (0%, 5%, 7.5%, 10%) muestran una disminución progresiva en la D.O., lo que sugiere que metabolitos como las bacteriocinas o los biosurfactantes podrían estar inhibiendo el crecimiento de *P. aeruginosa*. Sin embargo, el 50% de sobrenadante causa una reducción mucho más marcada en la D.O., posiblemente debido a una disminución significativa de nutrientes disponibles, como se observa en comparación con el medio MRS no inoculado.

Para evaluar el efecto combinado de la concentración de sobrenadante, lactosa y extracto de levadura sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* se requiere un análisis de varianza para entender cómo estas variables afectan la densidad óptica, ilustrado en la Tabla 6.

Tabla 6.

Significancia estadística (valor p) de los factores que afectan la actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones de sobrenadante

Concentración sobrenadante	Lactosa	Extracto de levadura	Interacción factores
5%	Significativo (0,00704)	Significativo (0,04929)	No significativo (0,43696)
7,5%	Significativo (1,5747E-4)	Significativo (0,01666)	Significativo (0,02675)
10%	Significativo (1,17005E-4)	Significativo (0,03098)	No significativo (0,1154)
50%	No significativo (0,72096)	No significativo (0,17334)	No significativo (0,70532)

Los resultados del análisis ANOVA para la actividad antimicrobiana muestran que la influencia de la lactosa, el extracto de levadura y su interacción depende de la concentración de sobrenadante de *L. casei*. A concentraciones de sobrenadante del 5% y 10%, tanto la lactosa como el extracto de levadura tienen un efecto significativo en la actividad antimicrobiana actuando de manera independiente, ya que su interacción no es significativa. Sin embargo, a una concentración del 7,5%, además de los efectos individuales de estos componentes, la interacción entre ellos también resulta significativa, lo que sugiere que su combinación es crucial en esta concentración. En contraste, a un 50% de sobrenadante, ninguno de los factores ni sus interacciones tiene un

efecto significativo, lo que sugiere que la actividad antimicrobiana en altas concentraciones de sobrenadante podría deberse más a la limitación de nutrientes para el crecimiento de *P. aeruginosa*.

La Tabla 7 muestra el análisis de varianza realizado para evaluar la actividad antimicrobiana en función de las diferentes formulaciones de medios de cultivo y porcentajes de sobrenadante. Los resultados indican que tanto la formulación del medio como el porcentaje de sobrenadante tienen un impacto significativo en la actividad antimicrobiana.

Tabla 7.
Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana.

Análisis de varianza para: Actividad antimicrobiana						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Formulación	0,15129	8	0,01891	8,0244	<0,0001	Significativo
%Sobrenadante	3,98488	4	0,99622	422,71264	<0,0001	Significativo
Interacción	0,29568	32	0,00924	3,92069	<0,0001	Significativo
Error	0,10605	45				
Corregido total	4,53791	89				

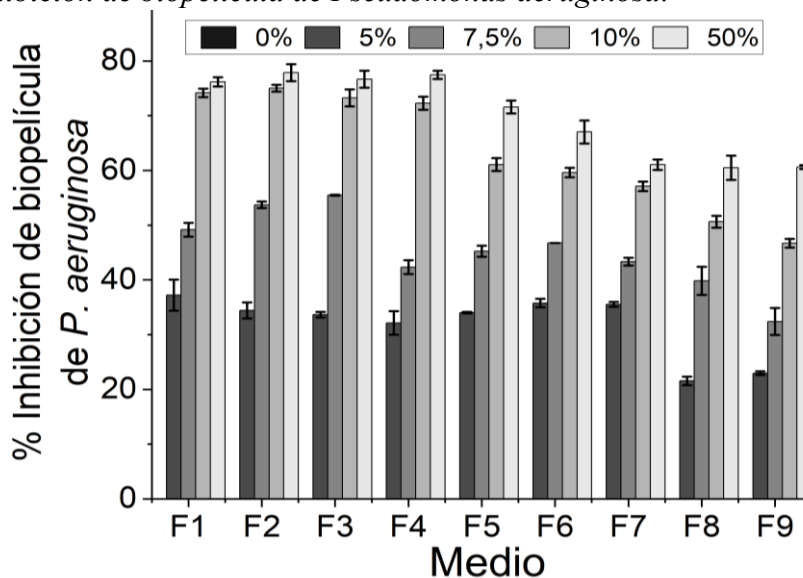
Se observó que las formulaciones F4, F5 y F6, combinadas con un 10% de sobrenadante, presentaron la mayor actividad antimicrobiana. Este hallazgo sugirió que estas formulaciones eran particularmente eficaces en la inhibición de microorganismos. De manera específica, la formulación F5, junto con el 10% de sobrenadante, destacó como la más eficiente en términos de actividad antimicrobiana.

Se ha encontrado que la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *L. casei* en medio MRS, evaluada mediante el método de difusión en agar, mostró una reducción significativa del crecimiento de *S. aureus* cuando el pH del sobrenadante no fue neutralizado. Esta disminución se atribuyó a la probable producción de ácidos orgánicos (Saidi et al., 2023). Estos hallazgos son consistentes con la tendencia observada en este estudio, donde las formulaciones F4, F5 y F6 también mostraron eficacia en la reducción del crecimiento de *P. aeruginosa*, así como en la obtención del menor pH a las 72 horas de fermentación.

La Figura 11 presenta los resultados de actividad antibiopelícula, mostrando el porcentaje de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* para diferentes formulaciones con variaciones en la concentración de sobrenadante.

Figura 11.

Porcentaje de inhibición de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*.



La inhibición de la formación de biopelículas aumenta con la concentración de sobrenadante y es particularmente efectiva en formulaciones con altas concentraciones de lactosa y extracto de levadura. Las formulaciones con las mayores concentraciones de lactosa (F1 y F2) demuestran la mayor eficacia en la reducción de biopelículas a todas las concentraciones de sobrenadante, evidenciando que mayores niveles de estos componentes mejoran la inhibición de la adhesión bacteriana.

La Tabla 8 presenta la significancia de los factores que influyen en el porcentaje de inhibición de biopelículas en función de las diferentes concentraciones de sobrenadante. Para concentraciones bajas (5% y 7,5%), tanto la lactosa como la interacción entre lactosa y extracto de levadura tienen un impacto significativo en la inhibición de biopelículas. Sin embargo, a una concentración de 7,5%, el extracto de levadura no muestra un efecto significativo. En contraste, las concentraciones de 10% y 50% demuestran los mejores resultados en la inhibición de

biopelículas, con la lactosa y el extracto de levadura siendo significativos en ambos casos. Estos hallazgos sugieren que las concentraciones más altas de sobrenadante (10% y 50%) son más efectivas para reducir la formación de biopelículas.

Tabla 8.

Significancia estadística (valor p) de los factores que afectan el %inhibición a diferentes concentraciones de sobrenadante.

Concentración sobrenadante	Lactosa	Extracto de levadura	Interacción factores
5%	Significativo (0,00119)	Significativo (2,549E-4)	Significativo (<0,0001)
7,5%	Significativo (<0,0001)	No significativo (0,46693)	Significativo (<0,0001)
10%	Significativo (<0,0001)	Significativo (<0,0001)	Significativo (<0,0001)
50%	Significativo (<0,0001)	Significativo (0,00349)	Significativo (0,00387)

La Tabla 9 muestra el análisis de varianza para el porcentaje de formación de biopelículas, revelando que tanto la formulación del medio como el porcentaje de sobrenadante tienen un impacto significativo en la formación de biopelículas.

Tabla 9.

Análisis de varianza para el porcentaje de formación de biopelícula.

Análisis de varianza para: Formación de biopelícula						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Formulación	2616,69237	8	327,08655	238,79435	<0.0001	Significativo
%Sobrenadante	55957,71033	4	13989,42758	10213,18748	<0.0001	Significativo
Interacción	1497,83041	32	46,8072	34,17229	<0.0001	Significativo
Error	61,63837	45	1,36974			
Corregido total	60133,87148	89				

De acuerdo con los resultados el porcentaje de inhibición de biopelículas aumenta a medida que se incrementa el porcentaje de sobrenadante. Estos hallazgos sugieren que mayores concentraciones de sobrenadante mejoran de forma notable la inhibición de biopelículas. En estudios previos con *L. casei* en medio MRS con el uso de un 5% de sobrenadante resultó en una inhibición del 80,14 %±0,01 de *P. aeruginosa* (Angarita Rangel, 2022). Sin embargo, se obtuvo una mayor inhibición de *P. aeruginosa* con porcentajes de sobrenadante de (10 % y 50 %), lo que resalta los metabolitos extracelulares obtenidos.

La formulación F2 es la que obtuvo mejores resultados en la inhibición de biopelículas de *P. aeruginosa* con un porcentaje de sobrenadante de 10 %, ya que los metabolitos extracelulares de *L. casei* producidos en este medio permitieron lograr un mayor porcentaje de inhibición de biopelículas.

5.4. Determinación del tiempo de fermentación más adecuado para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.

Se evaluó el efecto del tiempo sobre la actividad antimicrobiana y antibiopelícula, así como el crecimiento de *L. casei* en los medios formulados que presentaron los mejores resultados en la Fase 2 (F2 y F5). De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 10, se evidenció que el crecimiento alcanzó su máximo a las 72 h, destacando que el medio MRS exhibió un crecimiento inicial más acelerado durante las primeras 12 h en comparación con F2 y F5. No obstante, estas formulaciones lograron un crecimiento significativo después de 24 h. La Figura 12 ilustra la curva de crecimiento en los diferentes medios evaluados.

Figura 12.

Curva de crecimiento de Lactobacillus casei en medios formulados a lo largo del tiempo.

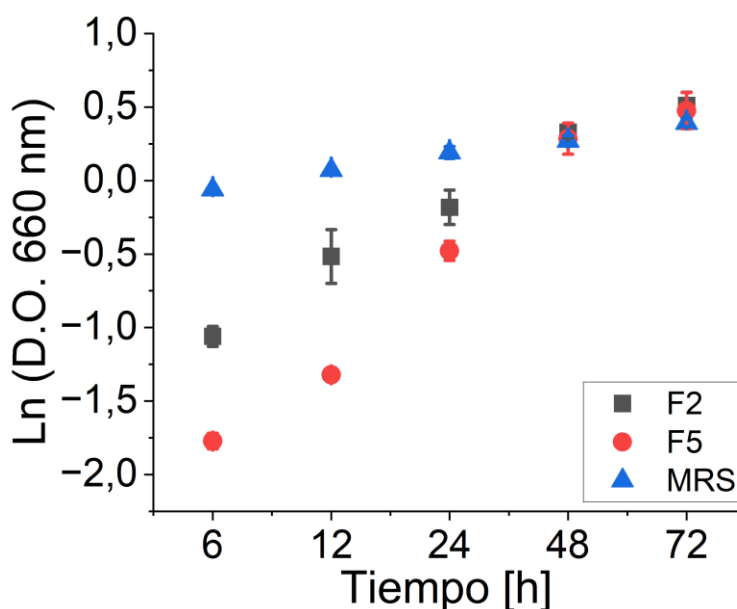


Tabla 10.*Crecimiento de Lactobacillus casei en medios formulados a lo largo del tiempo.*

Tiempo	D.O. 660 nm		
	F2	F5	MRS
6 [h]	0,347±0,068	0,210±0,053	0,940±0,020
12 [h]	0,597±0,182	0,267±0,038	1,073±0,012
24 [h]	0,833±0,117	0,620±0,066	1,210±0,040
48 [h]	1,390±0,036	1,330±0,106	1,310±0,035
72 [h]	1,667±0,091	1,610±0,123	1,480±0,026

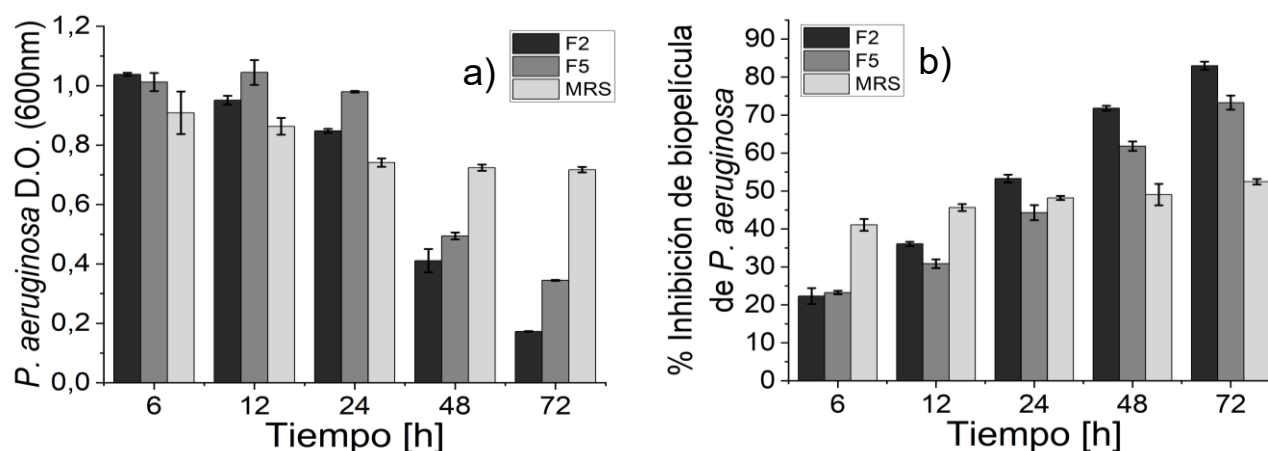
Según lo indicado en la Tabla 11, se observó que la actividad antimicrobiana disminuyó en todos los medios conforme avanzaba el tiempo, aunque la formulación F2 presentó los resultados más sobresalientes a las 72 h. En lo que respecta a la actividad antibiopelícula, F2 alcanzó un 82,97% de inhibición a las 72 h, superando a las demás formulaciones. Estos resultados son consistentes con estudios previos que demuestran que la mayor capacidad inhibitoria de *Lactobacillus casei* contra *Pseudomonas aeruginosa* se alcanza tras 72 horas de crecimiento. En estos estudios, se ha registrado un porcentaje de inhibición de hasta el 90%, con otros métodos de medición (Jamalifar et al., 2011). Por otro lado, el medio MRS no mostró cambios significativos en ninguna de las dos actividades a lo largo del tiempo. Estos hallazgos se representan en la Figura 13, donde se muestra la evolución de ambas actividades.

Tabla 11.*Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de Lactobacillus casei en medios formulados a diferentes tiempos de incubación.*

	6 [h]	12 [h]	24 [h]	48 [h]	72 [h]
Actividad antimicrobiana [D.O. 600 nm]					
F2	1,038±0,005	0,951±0,015	0,848±0,007	0,411±0,039	0,173±0,002
F5	1,012±0,031	1,044±0,042	0,980±0,003	0,494±0,011	0,345±0,002
MRS	0,909±0,071	0,863±0,028	0,741±0,014	0,724±0,010	0,717±0,009
Actividad antibiopelícula [% Inhibición]					
F2	22,31±2,08	36,05±0,55	53,26±1,04	71,80±0,63	82,97±1,08
F5	23,24±0,45	30,84±1,15	44,28±2,00	61,79±1,23	73,27±1,85
MRS	41,06±1,55	45,63±0,90	48,15±0,56	49,03±2,81	52,44±0,72

Figura 13.

Actividad antimicrobiana (a) y antibiopelícula (b) de *Lactobacillus casei* en medios formulados a diferentes tiempos de incubación.



El análisis estadístico presentado en la Tabla 12 demostró que tanto la formulación del medio como el tiempo de fermentación tuvieron un efecto significativo en la actividad antimicrobiana y en la capacidad de inhibición de biopelículas. Los resultados indican que el tiempo de fermentación influye de manera significativa en ambas actividades de los metabolitos extracelulares de *L. casei*.

Tabla 12.

Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana y antibiopelícula.

	Actividad antimicrobiana		Actividad antibiopelícula	
	Valor p		Valor p	
Formulación	<0.0001	Significativo	<0.0001	Significativo
Tiempo	<0.0001	Significativo	<0.0001	Significativo
Interacción	<0.0001	Significativo	<0.0001	Significativo

Los resultados obtenidos indican que el tiempo de fermentación influye de manera significativa en la actividad antimicrobiana y en la capacidad de inhibición de biopelículas de los metabolitos extracelulares de *L. casei*. La formulación F2 (32,8 g/L de lactosa, 5 g/L de extracto de levadura) y un periodo de fermentación de 72 h se identificaron como los más idóneos para ambas actividades.

En la Tabla 13 se presentaron los resultados del pH y la producción de ácido láctico a las 72 h de fermentación. Se evaluaron estas variables en el tiempo que mostró el menor crecimiento y el mayor porcentaje de inhibición de biopelículas de *P. aeruginosa*. La determinación del ácido láctico se realizó con el propósito de conocer la concentración de uno de los metabolitos extracelulares de interés.

Tabla 13.

Medición del pH y producción de ácido láctico a las 72 h en diferentes medios.

Medio	pH	Ácido láctico [g/L]
F2	3,589±0,002	30,847±0,622
F5	3,723±0,004	-
MRS	3,760±0,008	-

En la Tabla 13 se observa que el medio F2 presentó la mayor reducción de pH, alcanzando un valor de 3,589±0,002. Además, la concentración de ácido láctico obtenida en este medio fue de 30,847±0,622 g/L, con una producción neta de 20,914 g/L. En investigaciones previas realizadas con lactosuero pretratado al final de la fermentación, bajo diferentes condiciones de agitación, se reportó una producción de ácido láctico de 8,4 g/L (González Téllez, 2019).

Asimismo, se ha vinculado la actividad bacteriocina de los metabolitos extracelulares de *L. casei* con la producción de ácidos orgánicos. Se determinó que los ácidos orgánicos, a valores de pH similares, presentan una mayor actividad antimicrobiana en comparación con los ácidos minerales. En un estudio, se informó que la acidificación del cultivo (a pH 4,6) mediante ácido láctico redujo la biomasa de *S. aureus* en un 99% en comparación con el control (medio sin ácido láctico) (Saidi et al., 2023). Estos resultados sugieren que la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación es un factor clave para la inhibición efectiva de patógenos, destacando el potencial de *L. casei* en aplicaciones contra patógenos.

6. Conclusiones

Se evaluó el crecimiento de *L. casei* en medios formulados con lactosuero pretratado. Los resultados mostraron que la formulación F1, que contenía 32,847 g/L de lactosa y 10 g/L de extracto de levadura, promovió el mayor crecimiento bacteriano, alcanzando su punto máximo a las 48 h. Tanto la lactosa como el extracto de levadura demostraron tener un efecto significativo en el crecimiento de *L. casei*, lo que evidencia que las concentraciones de estos nutrientes impactan positivamente en el crecimiento bacteriano.

Se seleccionó el medio de cultivo y la concentración de sobrenadante más adecuados para optimizar las actividades antimicrobiana y antibiopelícula a las 72 h. Las formulaciones F2 y F5, combinadas con un 10% de sobrenadante, presentaron los mejores resultados en la inhibición de *P. aeruginosa* y biopelículas, respectivamente.

Se estableció que el tiempo de fermentación más idóneo para la actividad antimicrobiana y la inhibición de biopelículas fue de 72 h, coincidiendo con el pico del crecimiento bacteriano. A las 72 h, F2 alcanzó un 82,97% de inhibición de biopelículas y mantuvo los niveles más altos de actividad antimicrobiana. Estos hallazgos sugieren que, junto con la utilización del 10% de sobrenadante, el tiempo de fermentación de 72 h ofreció las condiciones más favorables para la producción de metabolitos extracelulares de *L. casei* con efectos antimicrobianos y de inhibición de biopelículas.

En conclusión, el uso de lactosuero pretratado como fuente de carbono ha demostrado ser eficaz para promover el crecimiento de *L. casei* y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana y antibiopelícula. Este enfoque sostenible no solo reduce el desperdicio industrial, sino que también impulsa el desarrollo de soluciones innovadoras alineadas con los principios de la economía circular.

7. Recomendaciones

Se recomienda explorar diversos factores que optimicen la producción de metabolitos extracelulares de *Lactobacillus casei* con actividad antimicrobiana y antibiopelícula. Entre estos factores, es esencial mejorar las condiciones de fermentación para reducir los tiempos de proceso y aumentar la inhibición de la proliferación de patógenos y biopelículas. Aunque en el presente trabajo no se estableció una correlación directa entre el pH y las actividades antimicrobiana y antibiopelícula, investigaciones previas sugieren que el pH de los metabolitos de bacterias ácido-lácticas podría jugar un papel crucial en la inhibición de patógenos. Por tanto, es fundamental investigar con mayor profundidad cómo el pH influye en este mecanismo de acción.

Además, se recomienda evaluar la viabilidad de implementar estos metabolitos en la industria, ya sea como conservantes naturales para alimentos o como ingredientes en productos de higiene personal. Es crucial investigar la estabilidad y eficacia de estos compuestos bajo diferentes condiciones de almacenamiento y uso, aspectos que presentan desafíos constantes en la industria.

Referencias bibliográficas

- Alkan, Z., Erginkaya, Z., Konuray, G., & Ünal Turhan, E. (2019). Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 43(5), 676–683.
- Angarita Rangel, M. A. (2022). *Producción de biosurfactantes de Lactobacillus empleando hidrolizados de cáscara de cacao como fuente de carbono*. Universidad Industrial de Santander.
- ATCC. (2024). *ATCC Medium: 416 Lactobacilli MRS Agar/Broth*.
<https://www.atcc.org/products/393#product-permits>
- Chappell, T. C., & Nair, N. U. (2020). Engineered lactobacilli display anti-biofilm and growth suppressing activities against *Pseudomonas aeruginosa*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 48.
<https://doi.org/10.1038/s41522-020-00156-6>
- Corantioquia. (2016). *Manual de gestión del recurso hídrico sector lácteo*. CORANTIOQUIA.
<https://www.corantioquia.gov.co/produccion-y-consumo-sostenible/>
- Cui, X., Shi, Y., Gu, S., Yan, X., Chen, H., & Ge, J. (2018). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China Against Enteropathogenic Bacteria. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 10(4), 601–610.
- De Giani, A., Bovio, F., Forcella Matilde and Fusi, P., Sello, G., & Di Gennaro, P. (2019). Identification of a bacteriocin-like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cells. *AMB Express*, 9(1), 88.
- Fedegán. (2024a). *Exportaciones Colombiana de leche y productos lácteos*.
https://public.tableau.com/shared/6YTPGKB7K?:display_count=y&:origin=viz_share_link&:embed=y

Fedegán. (2024b). *Producción del sector ganadero lechero y acopio por parte de la industria transformadora*. <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/produccion-0>

González, M. A., Castells, M. L., Di Risio, J., Juliano, P., García Flores, R., Rosenthal, A., Mellinger Silva, C., Richther Krolow, A. C., Zoccal, R., Walter, E., Dutra, A., Burbano Caicedo, I., Gutiérrez Castañeda, C. G., Quintero Peñaranda, R., Simancas Trujillo, R., Avellaneda, Y., Valderrama Salazar, P., Sepúlveda Valencia, J. U., Gutiérrez Álvarez, L. F., ... Mattos, C. (2017). *Valorización del lactosuero compilación Graciela Muset y María Laura Castells* (1st ed.).

González Téllez, J. C. (2019). *Estudio de la valorización de lactosuero ácido mediante pretratamiento basado en etapas de desproteínización, clarificación y concentración, para su uso como sustrato en la fermentación láctica*. Universidad Industrial de Santander.

Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. *Front Microbiol*, 9, 2952.

Jamalifar, H., Rahimi, H. R., Samadi, N., Shaverdi, A. R., Sharifian, Z., Hosseini, F., Eslahi, H., & Fazeli, M. R. (2011). Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(1). <https://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/view/80>

Jeong, D., Kim, D.-H., Song, K.-Y., & Seo, K.-H. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activities of *Lactobacillus kefiranofaciens* DD2 against oral pathogens. *J Oral Microbiol*, 10(1), 1472985.

Kang, M.-S., Lim, H.-S., Oh, J.-S., Lim, Y., Wuertz-Kozak, K., Harro, J. M., Shirliff, M. E., & Achermann, Y. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens and Disease*, 75(2), ftx009. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx009>

Kondybayev, A., Konuspayeva, G., Strub, C., Loiseau, G., Mestres, C., Grabulos, J., Manzano, M.,

Akhmetsadykova, S., & Achir, N. (2022). Growth and Metabolism of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactobacillus kefir* Isolated from Qymyz, a Traditional Fermented Central Asian Beverage. *Fermentation*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/fermentation8080367>

Ladino Carillo, G. A. (2021). *Evaluación técnico-económica preliminar de la producción industrial de una bebida láctea simbiótica fermentada a partir de suero lácteo suero lácteo*. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_alimentos/735/

Lee, J.-E., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2020). Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. *Food Sci Biotechnol*, 30(1), 97–106.

Muvdi Nova, C. J., Cáceres Roa, S. A., & Mora García, S. A. (2022). Effect of operating parameters and modes in the filtration of acid whey using ultra- and microfiltration ceramic membranes. *Ingeniería y Competitividad*, 25(1). <https://doi.org/10.25100/iyc.v25i1.12002>

Nitschke, M., & e Silva, S. S. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 631–638. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635>

Orejuela Chirinos, R. R. (2023). *Ecoeficiencia del aprovechamiento del lactosuero para la obtención de lactobacillus de acción bactericida*. <http://hdl.handle.net/20.500.14074/5916>

Pazhoohan, M., Sadeghi, F., Moghadami, M., Soltanmoradi, H., & Davoodabadi, A. (2020). Antimicrobial and antiadhesive effects of *Lactobacillus* isolates of healthy human gut origin on Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *Microbial Pathogenesis*, 148, 104271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104271>

Poveda, E., Dirigir, L., & Elpidia Poveda, D. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. In *Rev Chil Nutr* (Vol. 40).

Sabo, S. S., Converti, A., Ichiwaki, S., & Oliveira, R. P. S. (2018). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *J Dairy Sci*, *102*(1), 87–99.

Saidi, N., Saderi, H., Owlia, P., & Soleimani, M. (2023). Anti-Biofilm Potential of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* Cell-Free Supernatant Extracts against *Staphylococcus aureus*. *Adv Biomed Res*, *12*, 50.

Satpute, S. K., Kulkarni, G. R., Banpurkar, A. G., Banat, I. M., Mone, N. S., Patil, R. H., & Cameotra, S. S. (2016). Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology*, *56*(11), 1140–1158.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.201600143>

Sharma, D., & Singh Saharan, B. (2014). Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *Int J Microbiol*, *2014*, 698713.

Sheoran, P., & Tiwari, S. K. (2019). Anti-staphylococcal activity of bacteriocins of food isolates *Enterococcus hirae* LD3 and *Lactobacillus plantarum* LD4 in pasteurized milk. *3 Biotech*, *9*(1), 8.

Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P. D., Rebuffat, S., Said, L. Ben, Gaudreau H el ene and B edard, F., Biron, E., & Drider Djamel and Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiol Rev*, *45*(1).

Spaggiari, L., Pedretti, N., Ricchi, F., Pinetti, D., Campisciano, G., De Seta, F., Comar, M., Kenno, S., Ardizzoni, A., & Pericolini, E. (2024). An Untargeted Metabolomic Analysis of *Lacticaseibacillus* (L.) *rhamnosus*, *Lactobacillus* (L.) *acidophilus*, *Lactiplantibacillus* (L.) *plantarum* and *Limosilactobacillus* (L.) *reuteri* Reveals an Upregulated Production of Inosine from *L. rhamnosus*. *Microorganisms*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040662>

- Srivastava, R., Bothra, N., Singh, R., Sai, M., Nedungadi, S., & Sarangi, P. (2022). Microbial originated surfactants with multiple applications: a comprehensive review. *Archives of Microbiology*, 204. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03086-3>
- Tang, H., Huang, W., & Yao, Y.-F. (2023). The metabolites of lactic acid bacteria: classification, biosynthesis and modulation of gut microbiota. *Microbial Cell (Graz, Austria)*, 10(3), 49–62. <https://doi.org/10.15698/mic2023.03.792>
- Tirado, D., Gallo García, L., Acevedo Correa, D., & Mouthon, J. (2016). Biotratamientos de aguas residuales en la industria láctea. *Producción + Limpia*, 11, 171–184. <https://doi.org/10.22507/pml.v11n1a16>
- Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. G. M. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International*, 44(5), 1351–1363. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.027>
- Zambrano, W., Belén, M., Rivadeneira, D., & Alberto, A. (2021). *Alternativas para el aprovechamiento del lactosuero: Antecedentes investigativos y usos tradicionales*. 26, 39–50. <https://doi.org/10.33936/latécnica.v0i0.3490>

Apéndices

Apéndice A. Antecedentes de metabolitos extracelulares de *Lactobacillus*

Tabla 14.

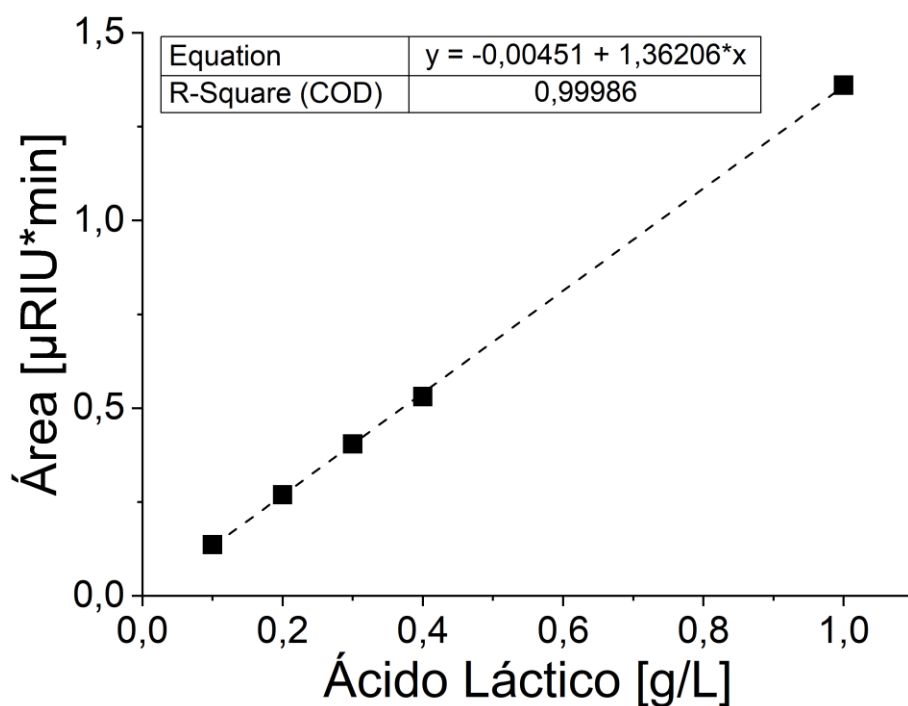
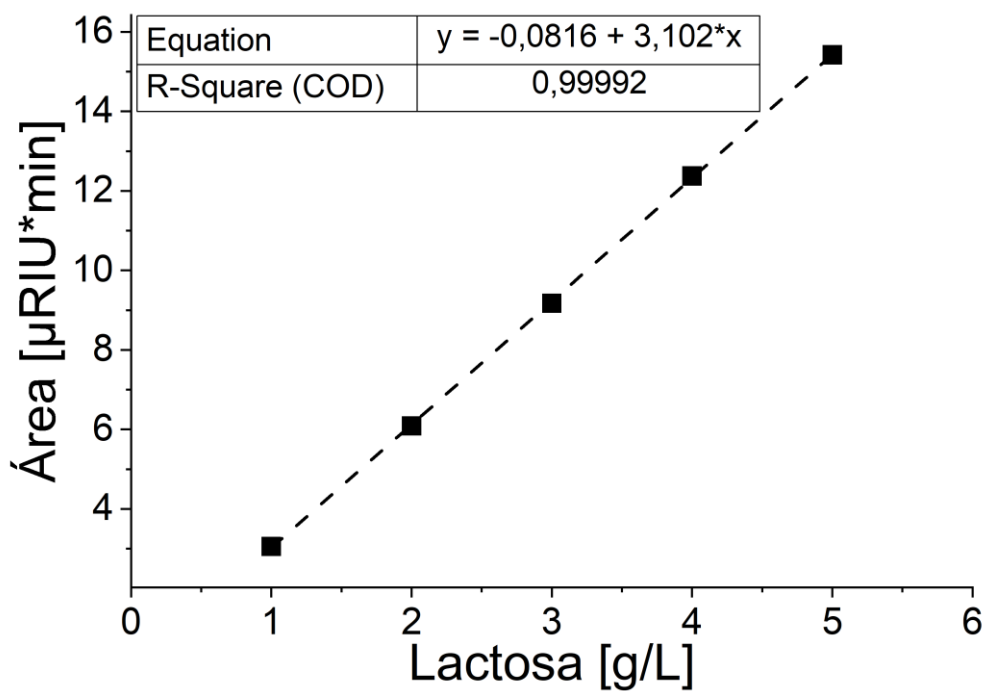
Recopilación de antecedentes científicos de la producción de metabolitos antimicrobianos y antibiopelícula de microorganismos probióticos en diversos sustratos.

Sustrato	Microorganismo probiótico	Metabolitos producidos	Patógeno objetivo	Aplicación	Referencia
Hidrolizado de cáscara de cacao	<i>L. rhamnosus</i> y <i>L. casei</i>	Biosurfactantes	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	Actividad antimicrobiana y actividad antibiofilm	(Angarita Rangel, 2022)
Suero de queso desproteinizado	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>	Biosurfactantes	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Actividad antibiofilm	(Alkan et al., 2019)
Cultivo a base de suero de queso	<i>Pediococcus pentosaceus</i> 147 en co-cultivo con <i>L. plantarum</i> LE27	Bacteriocinas	<i>Listeria monocytogenes</i> 104	Conservación de alimentos	(Gutiérrez-Cortés et al., 2018)
MRS	<i>L. kefiranofaciens</i> (DD2, DD5, DD6), <i>L. plantarum</i> ATCC 10012, <i>L. johnsonii</i> JCM 1022, <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	Bacteriocinas	<i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus sobrinus</i>	Inhibición de la formación de biopelículas orales	(Jeong et al., 2018)
MRS	<i>L. salivarius</i> y <i>L. fermentum</i>	Actividades bactericidas	<i>Staphylococcus aureus</i>	Actividad antimicrobiana	(Kang et al., 2017)
MRS	<i>L. plantarum</i> y <i>L. rhamnosus</i>	Bacteriocinas y péptidos antimicrobianos respectivamente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Actividad antimicrobiana y actividad antibiofilm	(Chappell & Nair, 2020)
MRS	<i>Lactobacillus plantarum</i> KU200656	Actividades bactericidas	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella Typhimurium</i>	Actividad antimicrobiana y actividad antibiofilm	(Lee et al., 2020)
MRS	<i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Ácido orgánico, peróxido de hidrógeno o bacteriocina	<i>Staphylococcus aureus</i> CMCC26003 y <i>Escherichia coli</i> CVCC230.	Actividad antimicrobiana y actividad antibiofilm	(Cui et al., 2018)
Formulación de suero en polvo suplementada	<i>L. plantarum</i> ST16Pa	Bacteriocinas	<i>Listeria innocua</i> 6a CLIST 2865	Bioconservante antimicrobiano	(Sabo et al., 2018)
MRS	<i>Enterococcus hirae</i> LD3 y <i>Lactobacillus plantarum</i> LD4	Bacteriocinas	<i>Staphylococcus aureus</i>	Actividad antimicrobiana	(Sheoran & Tiwari, 2019)
MRS	<i>Lactobacillus plantarum</i> PBS067	Bacteriocinas	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. faecium</i>	Actividad antimicrobiana en células intestinales	(De Giani et al., 2019)

Apéndice B. Formulación medio MRS**Tabla 15.***Medio ATCC 416 MRS para Lactobacilos Modificado sin Sorbitán Monooleato.*

Medio MRS	
Reactivo	Cantidad [g/L]
Peptona universal	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa (D-glucosa)	20
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
MnSO₄*H₂O	0,05
Na₂HPO₄	2

Apéndice C. Curva de calibración de ácido láctico y lactosa

Figura 14.*Curva de calibración ácido láctico.***Figura 15.***Curva de calibración lactosa.*

Apéndice D. Resultados crecimiento de *Lactobacillus casei***Tabla 16.***Resultados curva de crecimiento de Lactobacillus casei.*

Formulación	D.O. 660 nm									
	1 [h]	2 [h]	3 [h]	4 [h]	5 [h]	6 [h]	12 [h]	24 [h]	48 [h]	72 [h]
F1	0,520±0,170	0,765±0,120	1,365±0,247	1,425±0,205	1,670±0,071	2,430±0,212	2,820±0,212	3,585±0,205	3,780±0,269	4,050±0,156
F2	0,410±0,184	0,535±0,035	0,835±0,290	1,305±0,134	1,415±0,205	1,530±0,198	1,870±0,071	2,545±0,191	3,340±0,000	3,190±0,000
F3	0,075±0,035	0,325±0,021	0,675±0,106	0,800±0,170	1,225±0,163	1,260±0,156	1,430±0,042	1,770±0,170	1,840±0,113	1,705±0,177
F4	0,160±0,085	0,215±0,049	0,275±0,007	0,325±0,021	0,445±0,078	0,520±0,014	1,095±0,049	1,800±0,071	2,440±0,028	2,020±0,156
F5	0,125±0,021	0,140±0,028	0,245±0,021	0,360±0,028	0,470±0,014	0,585±0,021	1,170±0,014	1,830±0,042	2,860±0,014	2,315±0,078
F6	0,140±0,042	0,205±0,021	0,270±0,000	0,345±0,007	0,410±0,000	0,455±0,021	0,830±0,014	1,505±0,021	2,075±0,049	1,730±0,127
F7	0,155±0,035	0,205±0,007	0,250±0,014	0,360±0,014	0,475±0,049	0,585±0,007	1,045±0,106	2,150±0,071	2,055±0,049	1,955±0,035
F8	0,145±0,049	0,155±0,049	0,185±0,021	0,230±0,028	0,275±0,035	0,385±0,021	0,970±0,156	1,925±0,049	1,860±0,028	1,800±0,014
F9	0,155±0,007	0,180±0,014	0,225±0,007	0,245±0,007	0,265±0,007	0,325±0,049	0,680±0,042	1,385±0,035	1,320±0,042	1,250±0,042

Tabla 17.*Variación del pH durante el crecimiento de Lactobacillus casei.*

Formulación	pH					Control sin inóculo de <i>L. casei</i>
	6 [h]	12 [h]	24 [h]	48 [h]	72 [h]	
F1	4,8365±0,1322	4,607±0,1259	4,285±0,0863	3,978±0,0948	3,8615±0,0912	5,916
F2	4,8545±0,0502	4,5415±0,0262	4,204±0,0099	3,8475±0,0120	3,782±0,0481	5,795
F3	5,126±0,0622	4,688±0,0919	4,342±0,0792	3,8565±0,0417	3,756±0,0792	5,851
F4	4,8465±0,0163	4,5405±0,0106	4,056±0,0170	3,89±0,0099	3,6105±0,0007	5,78
F5	4,8865±0,0233	4,469±0,0184	4,0395±0,0064	3,914±0,0071	3,6655±0,0134	5,861
F6	4,9225±0,0346	4,5195±0,0290	4,0295±0,0191	3,784±0,0085	3,595±0,0014	5,988
F7	4,8615±0,0177	4,3465±0,0262	4,3315±0,0120	4,3025±0,0163	4,1545±0,0233	5,857
F8	4,8865±0,0247	4,3815±0,0375	4,3405±0,0219	4,258±0,0085	4,0585±0,0233	5,942
F9	4,995±0,0240	4,527±0,0382	4,402±0,0170	4,152±0,0269	3,9295±0,0035	5,887

Tabla 18.

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Lactobacillus casei*.

Formulación	Unidades formadoras de colonias [UFC/mL]			
	12 [h]	24 [h]	48 [h]	72 [h]
F1	1,85E+09±7,07E+07	2,18E+01±1,41E+08	2,20E+01±7,07E+07	2,19E+01±7,07E+07
F2	2,15E+01±1,41E+08	2,17E+01±1,41E+08	2,19E+01±7,07E+07	2,19E+01±7,07E+07
F3	2,15E+01±7,07E+07	2,16E+01±1,41E+08	2,18E+01±7,07E+07	2,17E+01±1,41E+08
F4	2,12E+01±7,07E+07	2,15E+01±2,12E+08	2,17E+01±1,41E+08	2,16E+01±7,07E+07
F5	2,14E+01±1,41E+08	2,16E+01±7,07E+07	2,18E+01±1,41E+08	2,16E+01±1,41E+08
F6	2,13E+01±1,41E+08	2,15E+01±1,41E+08	2,16E+01±1,41E+08	2,15E+01±7,07E+07
F7	2,11E+01±1,41E+08	2,13E+01±1,41E+08	2,12E+01±7,07E+07	2,11E+01±7,07E+07
F8	2,06E+01±7,07E+07	2,10E+01±2,12E+08	2,09E+01±7,07E+07	2,08E+01±0,00E+00
F9	2,04E+01±7,07E+07	2,07E+01±1,41E+08	2,06E+01±1,41E+08	2,06E+01±7,07E+07

Apéndice E. Resultados ANOVA crecimiento *Lactobacillus casei***Tabla 19.***Análisis de varianza para la biomasa global.*

Análisis de varianza para: biomasa global.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	7,9218E-4	2	3,9609E-4	118,77198	<0,0001	Significativo
Extracto de levadura	6,91796E-4	2	3,45898E-4	103,72141	<0,0001	Significativo
Interacción	2,16549E-4	4	5,41372E-5	16,23364	3,79382E-4	Significativo
Error	3,00139E-5	9	3,33488E-6			
Corregido total	0,00173	17				

Tabla 20.*Análisis de varianza para la velocidad máxima de crecimiento.*

Análisis de varianza para: μ_{MAX}.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	0,02432	2	0,01216	1,94101	0,19914	No significativo
Extracto de levadura	0,02446	2	0,01223	1,95269	0,19752	No significativo
Interacción	0,01006	4	0,00251	0,40134	0,80323	No significativo
Error	0,05637	9	0,00626			
Corregido total	0,11521	17				

Apéndice F. Resultados ANOVA actividad antimicrobiana**Tabla 21.**

Resultados actividad antimicrobiana con variaciones en la concentración de sobrenadante extracelular.

Formulación	Lactosa [g/L]	Extracto de levadura [g/L]	D.O 600 nm				
			Concentración de sobrenadante extracelular				
			0 %	5 %	7,5 %	10 %	50 %
F1	32,847	10	0,712±0,040	0,595±0,006	0,607±0,027	0,136±0,016	0,127±0,004
F2	32,847	5	0,712±0,040	0,637±0,041	0,584±0,002	0,198±0,011	0,160±0,002
F3	32,847	0	0,712±0,040	0,688±0,103	0,555±0,021	0,268±0,009	0,141±0,016
F4	22,847	5	0,712±0,040	0,613±0,087	0,471±0,090	0,192±0,047	0,152±0,025
F5	22,847	10	0,707±0,032	0,503±0,030	0,219±0,028	0,160±0,013	0,139±0,003
F6	22,847	0	0,707±0,032	0,574±0,071	0,413±0,081	0,154±0,011	0,125±0,006
F7	12,847	10	0,707±0,032	0,468±0,002	0,471±0,028	0,284±0,008	0,159±0,047
F8	12,847	5	0,707±0,032	0,582±0,035	0,567±0,074	0,418±0,097	0,188±0,081
F9	12,847	0	0,695±0,045	0,573±0,062	0,480±0,028	0,334±0,064	0,115±0,011
MRS	-	-	0,695±0,045	0,7330±0,091	0,686±0,143	0,732±0,045	0,677±0,102

Tabla 22.

Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 5%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 5%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	0,05451	2	0,02726	9,03915	0,00704	Significativo
Extracto de levadura	0,02584	2	0,01292	4,28434	0,04929	Significativo
Interacción	0,01258	4	0,00314	1,04295	0,43696	No significativo
Error	0,02714	9	0,00302			
Corregido total	0,12006	17				

Tabla 23.

Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 7,5%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 7,5%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	0,14166	2	0,07083	26,99778	1,5747E-4	Significativo
Extracto de levadura	0,03504	2	0,01752	6,67815	0,01666	Significativo
Interacción	0,04833	4	0,01208	4,60507	0,02675	Significativo
Error	0,02361	9	0,00262			
Corregido total	0,24864	17				

Tabla 24.

Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 10%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 10%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	0,1064	2	0,0532	29,14689	1,17005E-4	Significativo
Extracto de levadura	0,01913	2	0,00956	5,23929	0,03098	Significativo
Interacción	0,01835	4	0,00459	2,51391	0,1154	No significativo
Error	0,01643	9	0,00183			
Corregido total	0,16031	17				

Tabla 25.

Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana para la concentración de sobrenadante al 50%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 50%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	7,46333E-4	2	3,73167E-4	0,33936	0,72096	No significativo
Extracto de levadura	0,00471	2	0,00236	2,14273	0,17334	No significativo
Interacción	0,00241	4	6,02833E-4	0,54822	0,70532	No significativo
Error	0,0099	9	0,0011			
Corregido total	0,01777	17				

Apéndice G. Resultados ANOVA formación de biopelícula**Tabla 26.**

Resultados de inhibición de la formación de biopelícula con variaciones en la concentración de sobrenadante extracelular.

Formulación	Lactosa [g/L]	Extracto de levadura [g/L]	%Inhibición Concentración de sobrenadante E.				
			0 %	5 %	7,5 %	10 %	50 %
F1	32,847	10	0,00±0,00	37,24±2,84	49,17±1,25	74,17±0,78	76,18±0,86
F2	32,847	5	0,00±0,00	34,44±1,46	53,71±0,60	75,03±0,61	77,88±1,55
F3	32,847	0	0,00±0,00	33,65±0,52	55,50±0,09	73,26±1,55	76,66±1,55
F4	22,847	5	0,00±0,00	32,14±2,15	42,33±1,26	72,29±1,20	77,46±0,76
F5	22,847	10	0,00±0,00	34,04±0,14	45,23±1,03	61,09±1,17	71,59±1,16
F6	22,847	0	0,00±0,00	35,78±0,77	46,75±0,01	59,62±0,86	67,03±2,11
F7	12,847	10	0,00±0,00	35,54±0,43	43,35±0,71	57,10±0,86	61,05±0,96
F8	12,847	5	0,00±0,00	21,57±0,77	39,85±2,57	50,63±1,09	60,49±2,21
F9	12,847	0	0,00±0,00	22,96±0,34	32,40±2,46	46,69±0,79	60,63±0,34

Tabla 27.

Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 5%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 5%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	57,65027	2	28,82514	15,5974	0,00119	Significativo
Extracto de levadura	87,97301	2	43,9865	23,80127	2,54876E-4	Significativo
Interacción	199,78994	4	49,94748	27,02679	<0.0001	Significativo
Error	16,63266	9	1,84807			
Corregido total	362,04588	17				

Tabla 28.

Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 7,5%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 7,5%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	613,25032	2	306,62516	155,21713	<0.0001	Significativo
Extracto de levadura	3,27857	2	1,63928	0,82982	0,46693	No significativo
Interacción	184,72435	4	46,18109	23,37739	<0.0001	Significativo
Error	17,77914	9	1,97546			
Corregido total	819,03238	17				

Tabla 29.

Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 10%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 10%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	1552,01839	2	776,00919	736,90903	<0.0001	Significativo
Extracto de levadura	118,34996	2	59,17498	56,19338	<0.0001	Significativo
Interacción	187,4547	4	46,86367	44,50239	<0.0001	Significativo
Error	9,47754	9	1,05306			
Corregido total	1867,30059	17				

Tabla 30.

Análisis de varianza de la formación de biopelícula para la concentración de sobrenadante al 50%.

Análisis de varianza para: Concentración de sobrenadante al 50%.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Lactosa	827,38017	2	413,69009	208,98681	<0.0001	Significativo
Extracto de levadura	44,82609	2	22,41305	11,32256	0,00349	Significativo
Interacción	67,94617	4	16,98654	8,58121	0,00387	Significativo
Error	17,81553	9	1,9795			
Corregido total	957,96796	17				

Apéndice H. Resultados ANOVA actividad antimicrobiana y antibiopelícula en el tiempo**Tabla 31.***Análisis de varianza de la actividad antimicrobiana en el tiempo.*

Análisis de varianza para: Actividad antimicrobiana.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Tiempo	2,39135	4	0,59784	821,51644	<0.0001	Significativo
Formulación	0,0993	2	0,04965	68,22338	<0.0001	Significativo
Interacción	0,68604	8	0,08575	117,83952	<0.0001	Significativo
Error	0,02183	30	7,27723E-4			
Corregido total	3,19851	44				

Tabla 32.*Análisis de varianza de la formación de biopelícula en el tiempo.*

Análisis de varianza para: Actividad antibiopelícula.						
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p	
Tiempo	9911,15017	4	2477,78754	1253,92061	<0.0001	Significativo
Formulación	399,85319	2	199,9266	101,17578	<0.0001	Significativo
Interacción	2970,66021	8	371,33253	187,91825	<0.0001	Significativo
Error	59,28097	30	1,97603			
Corregido total	13340,94455	44				