



---

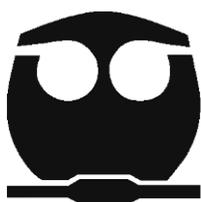
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN EN  
PANORAMA ACTUAL DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE  
BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS Y DE LAS COLECCIONES DE  
MICROORGANISMOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CARLOS GONZÁLEZ PÉREZ



CDMX

2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>DÍAZ RUIZ GLORIA</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>RUIZ TERÁN FRANCISCO</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>MINA CETINA ALEIDA</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>CRUCES MARTÍNEZ ANA LILIA</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>MARTÍNEZ CASTAÑEDA FERNANDO</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LAB.324, ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESORA DEL TEMA:**

**DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ**

**SUSTENTANTE:**

**CARLOS GONZÁLEZ PÉREZ**

# Agradecimientos

Queridos amigos, familiares, profesores:

En este importante momento de mi vida, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a cada uno de ustedes. Ha sido un largo y desafiante camino llegar hasta aquí, pero no habría sido posible sin su apoyo, amor y guía. Todos ustedes han dejado una huella imborrable en mi corazón y en mi trayectoria académica.

A mis amigos, quienes han sido mi red de apoyo y compañía durante este camino, quiero agradecerles por sus palabras de motivación y por estar a mi lado en los momentos de dificultad.

A mi amada familia, no puedo encontrar las palabras suficientes para expresar mi gratitud. Su amor incondicional y su apoyo constante han sido mi mayor fortaleza. Desde el inicio de mi carrera académica, han estado a mi lado, animándome y creyendo en mí incluso cuando dudaba de mis propias capacidades.

A mis profesores, quienes me han guiado con sabiduría y paciencia, quiero agradecerles por su dedicación y compromiso. Su pasión por enseñar y su conocimiento profundo en sus respectivas áreas han dejado una marca permanente en mí.

Quiero dedicar este logro a cada uno de ustedes. Su amor, apoyo y fe en mí han sido los pilares fundamentales en mi camino hacia el éxito. Sin su presencia, no sería lo que soy. Gracias, de todo corazón, por estar siempre a mi lado.

Con gratitud eterna,

Carlos

# Índice de contenido

1. Resumen	5
2. Justificación	6
3. Objetivo	7
4. Metodología	7
5. La fermentación en la industria alimentaria	8
I. Características de las BAL	8
Fuentes de BAL	10
Especies de BAL y su importancia en alimentos y la salud	11
II. Cultivos iniciadores	17
III. Aplicaciones potenciales de las BAL en otras áreas	19
6. Conservación de microorganismos	22
I. Métodos de conservación convencionales	23
Crioconservación	23
Liofilización	24
Cambios fisicoquímicos ocurridos durante la congelación.	25
II. Métodos de conservación alternativos	27
Secado por aspersion	27
Secado en lecho fluidizado	38
Secado al vacío	39
7. Colecciones microbianas	42
I. Colecciones internacionales	45
II. Colecciones nacionales	48
8. Discusión de resultados	49
9. Conclusiones y perspectivas	54
10. Bibliografía	56

# 1. Resumen

Los microorganismos son esenciales para la producción de vitaminas, hormonas, nuevas biomoléculas, antibióticos, probióticos, biopesticidas, biofertilizantes y son imprescindibles para la salud y el crecimiento de las plantas. Afectan el suministro mundial de alimentos al afectar la salud de las plantas y la productividad de los cultivos, además de ser indispensables para la producción de alimentos fermentados o alimentos que necesiten algún tratamiento enzimático (jugos clarificados, leche y productos lácteos, etc.). Las bacterias ácido-lácticas (BAL), son consideradas las bacterias más relevantes en el área de los alimentos debido a su diversidad de aplicaciones. El término se refiere a su actividad metabólica. Se definen como una familia ubicua y heterogénea de microorganismos que pueden fermentar varios nutrientes en ácido láctico, principalmente. Residen en una amplia variedad de ambientes, como la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, así como productos lácteos y cárnicos y vegetales procesados.

La conservación o preservación de microorganismos busca mantener la morfología, fisiología y el material genético del cultivo. Por lo anterior, las colecciones microbianas buscan obtener, preservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible, un acervo de cultivos microbianos auténticamente puros, estables, bien clasificados y de interés específico, los cuales generan toda una serie de información especializada de relevancia en diferentes ámbitos como la salud, agricultura, biotecnología, investigación y docencia. Las técnicas de conservación se clasifican en función del tiempo que pueden almacenarse ya sea a corto, mediano y largo plazo. Por lo anterior, se revisaron los aspectos más relevantes en los métodos de conservación a largo plazo más utilizados en dichos microorganismos, los métodos alternativos o no tradicionales y sus aplicaciones en la industria de alimentos, así como las colecciones microbianas nacionales e internacionales de mayor relevancia.

## 2. Justificación

Las BAL se encuentran presentes en una variedad de ambientes como la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y respiratorio, así como en plantas y en alimentos como los productos cárnicos y lácteos y vegetales procesados. Tienen un papel fundamental en muchos procesos de fermentación artesanal e industrial y recientemente en la nutrición humana. Debido a su presencia en el tracto gastrointestinal, algunos miembros se han catalogado como probióticos por conferir beneficios a la salud humana e incluso animal (Sun *et al.*, 2014). Por otro lado, pueden descomponer las macromoléculas de los alimentos, como polisacáridos no digeribles (fibra dietética) y compuestos saborizantes indeseables. Además, pueden producir una variedad de productos que incluyen ácidos grasos de cadena corta, aminas, bacteriocinas, vitaminas y exopolisacáridos durante el metabolismo. Por un lado, se utilizan para mejorar el sabor de los alimentos fermentados, aumentar la calidad nutritiva de los alimentos, reducir compuestos nocivos, aumentar la vida útil, etc. (Wang *et al.*, 2021). La pérdida de diversidad microbiana implica la pérdida de recursos potencialmente valiosos de los que depende la población humana. Sin embargo, la atención hacia este tema no ha recibido mucho ímpetu. Los microorganismos evolucionan rápidamente y tienen tendencia a intercambiar información genética (Sharma *et al.*, 2018). Por lo anterior, surge la necesidad de conocer cuáles son los fundamentos, aspectos tecnológicos de la conservación de microorganismos y algunos de sus aspectos relacionados.

### 3. Objetivo

Revisar la definición, clasificación y características metabólicas de las BAL de importancia en alimentos y sus potenciales nuevas aplicaciones en biotecnología; investigar los fundamentos y aspectos tecnológicos de los métodos de conservación convencionales y no convencionales más utilizados en las BAL y, por último, examinar algunas de las colecciones microbianas más relevantes a nivel nacional e internacional.

### 4. Metodología

Se consultaron las bases de datos disponibles en la biblioteca digital de la UNAM: Science Direct, Scopus, Springer, Taylor & Francis Group, Wiley Online Library, y otros buscadores como Google Scholar y páginas oficiales. Se utilizaron las siguientes palabras clave: microorganismos, conservación, preservación, técnicas, métodos. Se seleccionaron los artículos más recientes y que tuvieran la información relacionada al tema, se obtuvieron un total de 60 fuentes, tanto de libros, artículos y páginas de internet y se procedió con la elaboración del trabajo.

## 5. La fermentación en la industria alimentaria

### I. Características de las BAL

De todas las bacterias utilizadas para uso doméstico, las BAL son las más estudiadas y explotadas en numerosas aplicaciones industriales que van desde cultivos iniciadores en la industria láctea hasta probióticos en suplementos alimenticios, entre otras aplicaciones. Las BAL son un grupo diverso de microorganismos Gram (+), con ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Producen ácido láctico como principal producto del metabolismo de carbohidratos, tienen forma de bacilos y cocos, catalasa negativos (aunque algunas cepas pueden producir pseudocatalasa), anaerobios o microaerófilos, tolerantes a los ácidos y no esporuladas. Aunque tradicionalmente se asociaban con la descomposición de alimentos y piensos, cada vez más se consideran como microorganismos beneficiosos o probióticos, es decir, microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped (Xiao *et al*, 2014). Las BAL muestran una serie de actividades funcionales clave que son particularmente relevantes para su uso como cultivos iniciadores en fermentaciones y alimentos que requieran algún tratamiento enzimático. Estos incluyen capacidades metabólicas específicas tales como el tipo de ácido láctico producido que se puede extraer y determinar su capacidad de rotar ópticamente la luz. Si la rotación es a la derecha, se denomina dextrógiro (D); si está a la izquierda, se denomina levorrotatorio (L), o, si hay una mezcla de D y L, se denomina mezcla racémica (DL); la capacidad de fermentar la lactosa (el azúcar de la leche), su tolerancia a diferentes niveles de pH, así como otras características, como la resistencia a los bacteriófagos y son esenciales para garantizar una fermentación exitosa (Mahony *et al.*, 2019). En la tabla 1, se muestran los géneros más comunes de las BAL y sus características diferenciales.

Las BAL pertenecen al phylum *Firmicutes*. Dentro de los *Firmicutes*, las BAL pertenecen al orden *Lactobacillales* e incluyen los géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*, todos ellos son organismos con bajo contenido de guanina-citosina (31–49 %). Los géneros de las BAL que se asocian a los alimentos son *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*,

*Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Filogenéticamente, todos los géneros mencionados anteriormente forman una clase perteneciente a la rama clostridial de bacterias Gram (+) con bajo contenido de guanina-cistina (<50 %). Esta propiedad distanció a las BAL de las bifidobacterias que tienen más del 55% de contenido de guanina-cistina y pertenecen al phylum *Actinomyces*. Sin embargo, el género *Bifidobacterium* también se revisará debido a sus propiedades fisiológicas y bioquímicas similares a las BAL y porque comparten algunos nichos ecológicos comunes de importancia en alimentos y nutrición, como el tracto gastrointestinal (Liu *et al.*, 2014).

**Tabla 1. Géneros de las BAL asociadas a alimentos y sus características fisiológicas**

Género	Características								
	Forma	Producción de CO <sub>2</sub>	Temp. de crecimiento (°C)		Crecimiento en		Crecimiento en pH de		Tipo de ácido láctico
			10	45	6.5% NaCl	18% NaCl	4.4	9.6	
<i>Aerococcus</i>	C (tétradas)	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	B	-	+	-	ND	-	ND	-	L
<i>Enterococcus</i>	C	-	+	+	+	-	+	-	L
<i>Tetragenococcus</i>	C (tétradas)		+	-	+	+	V	+	L
<i>Vagococcus</i>	C		+	-	-	-	ND	-	L
<i>Pediococcus</i>	C (tétradas)	-	V	V	V	-	+	-	D, L, DL
<i>Lactobacillus</i>	B	V	V	V	V	-	ND		D, L, DL
<i>Leuconostoc</i>	C	+	+	-	V	-	V	-	D
<i>Oenococcus</i>	C	+	+	-	V	-	V	-	D
<i>Weissella</i>	C <sup>a</sup>	+	+	-	V	-	V	-	D, DL
<i>Lactococcus</i> <sup>b</sup>	C	-	+	-	-	-	V	-	L
<i>Streptococcus</i>	C	-	-	V	-	-	-	-	L

Coco (C), Bacilo (B), Variable (V), No determinado (ND)

<sup>a</sup> Algunas cepas de *Weissella* tienen forma de bacilo

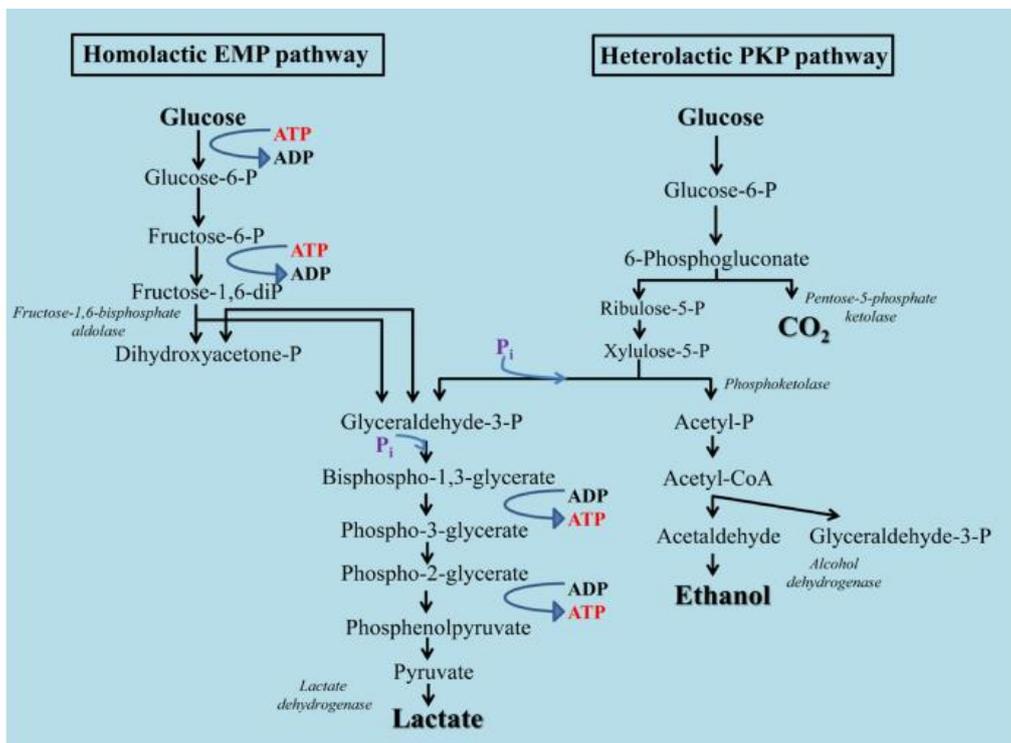
<sup>b</sup> En la literatura antigua, las especies de *Lactococcus* se conocen como estreptococos del grupo N.

Adaptado de Wright y Axelsson (2019).

Las BAL obtienen su energía por fosforilación a nivel de sustrato debido a que no poseen un sistema respiratorio funcional. Como se puede ver en la imagen 1. Se utilizan dos rutas fermentativas básicas de hexosa. La vía homofermentativa se basa en la vía Embden-Meyerhof-Parnas y produce prácticamente solo ácido láctico como

producto final. La ruta heterofermentativa (también conocida como la ruta de la pentosa fosfocetolasa, la derivación de la hexosa monofosfato o la ruta del 6-fosfogluconato) produce no solo ácido láctico como producto final, sino también cantidades significativas de CO<sub>2</sub> y etanol o acetato (Mahony *et al*, 2019).

**Imagen 1. Vías de fermentación homofermentativa y heterofermentativa de glucosa empleadas por diferentes BAL.**



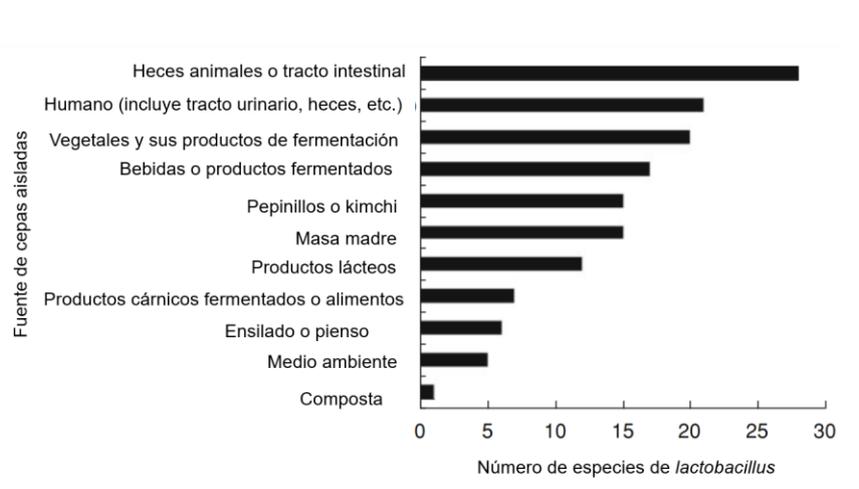
Adaptado de Mahony *et al* (2019)

## Fuentes de BAL

En cuanto a su aislamiento, el género *Lactobacillus* es el género más abundante de las BAL (actualmente cuentan con más de 200 especies), estas se encuentran en sustratos ricos en carbohidratos. Están estrechamente asociados con los animales terrestres y marinos, su entorno y su alimento y se encuentran más comúnmente en las cavidades corporales de humanos y animales. Como se puede ver en la imagen 2, la mayoría de las especies (casi un tercio de las descritas) se aislaron del tracto intestinal y las heces de humanos y animales. En segundo lugar, se encuentran los vegetales y sus productos de fermentación (incluidos el pepinillo y el kimchi, la masa

madre, etc.). Especies de otros géneros como *Enterococcus* también se aislaron principalmente del tracto intestinal, las heces y la piel de animales o humanos (Liu *et al.*, 2014).

Imagen 2. Fuentes de donde se han aislado especímenes de la especie *Lactobacillus*.



Adaptado de Liu *et al* (2014).

## Especies de BAL y su importancia en alimentos y la salud

La monografía de Orla-Jensen formó la base de la clasificación actual de las BAL. Los criterios utilizados por Orla-Jensen (morfología celular, modo de fermentación de la glucosa, rangos de temperatura de crecimiento y patrones de utilización de azúcar) siguen siendo muy importantes para la clasificación de las BAL, aunque la llegada de herramientas taxonómicas más modernas, especialmente métodos de biología molecular, han aumentado considerablemente el número de géneros, de los cuatro originalmente reconocidos por Orla-Jensen (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*). De acuerdo con Liu *et al* (2014), se han publicado y validado más de 50 géneros de BAL, pero en alimentos los géneros más relevantes son: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, y “el género” *Bifidobacterium* que como ya hemos revisado no es parte de las BAL, pero generalmente se incluyen en la mayoría de la literatura disponible. A continuación, se revisan con más detalle dichos géneros y su importancia en alimentos.

## *Enterococcus*

El género *Enterococcus*, constituye uno de los géneros más importantes dentro de las BAL. Actualmente contiene 58 especies válidamente descritas, las cuales fueron asignadas taxonómicamente sobre la base de varios tipos de identificación, incluido el análisis genómico. Debido a que no hay características fenotípicas para separar el género *Enterococcus* de otros géneros de cocos Gram (+), catalasa-negativos, la taxonomía de este grupo de bacterias era vaga hasta que se dispuso de herramientas moleculares. Sin embargo, las características fisicoquímicas del crecimiento a diferentes temperaturas, el tipo de fermentación de carbohidratos y el tipo de peptidoglicano de la pared celular siguen siendo efectivos para distinguir entre especies de *Enterococcus* (Lauková, 2019; Liu *et al*, 2014).

El uso de enterococos como probióticos es un tema de discusión abierto; como en el caso de cualquier probiótico debe juzgarse cepa por cepa considerando los factores de virulencia (hemolisina, gelatinasa, proteína Esp, etc.) así como las propiedades beneficiosas atribuidas a actividades proteolíticas y lipolíticas de la cepa, especialmente en aislados de alimentos. El interés reciente en este género se debe a que algunas cepas además de ser buenos candidatos para ser probióticos también producen bacteriocinas, esta característica metabólica permite su aprovechamiento en la nutrición animal y en la conservación de alimentos como bioprotectores. De las 58 especies, solo *E. faecalis* y *E. faecium* se usan como probióticos para animales y humanos, y solo *E. faecalis* se usa principalmente como probiótico humano. Además, la producción de péptidos bioactivos por enterococos es un concepto relativamente reciente que pueden tener importantes implicaciones en la nutrición y la salud humanas y ofrecer nuevas oportunidades para el desarrollo de ingredientes alimentarios funcionales y nutracéuticos. (Lauková, 2019; Liu *et al*, 2014; Graham *et al*, 2020).

## *Lactobacillus*

Los miembros del género *Lactobacillus* son bacterias Gram (+), anaerobias o aerobias, con forma de bacilo. Su metabolismo se clasifica comúnmente como homofermentativo obligado o heterofermentativo facultativo/obligatorio. Este género es el grupo más grande de las BAL e incluye algunas de las especies más importantes

involucradas en la microbiología alimentaria y la nutrición humana (Ibrahim y Ouwehand, 2019); varias especies de *Lactobacillus* son esenciales en la producción de alimentos fermentados y se utilizan como cultivos iniciadores o conservadores de alimentos. Además, ciertas especies de origen humano son aprovechadas como probióticos. Entre las especies comercialmente relevantes se encuentran *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius*. Este género incluye una gran cantidad de especies GRAS (generalmente reconocidas como seguras). El número de especies descritas ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a los avances en el desarrollo de técnicas moleculares y su aplicación a la taxonomía e identificación microbiana. Se encuentran comúnmente en una diversidad de ambientes ricos en nutrientes, incluidos los ambientes lácteos, de los cuales derivan su nombre, hábitats de huéspedes microbianos como las superficies mucosas de humanos y otros mamíferos, así como nichos ecológicos naturales como material vegetal en descomposición. Como mencionamos anteriormente la clasificación Orla-Jensen se sigue utilizando ya que resulta muy útil para la producción de alimentos que requieran algún proceso enzimático. En dicha clasificación los lactobacilos se dividen en tres grupos: las termobacterias, las estreptobacterias y las betabacterias, según la temperatura de crecimiento y pruebas bioquímicas. El género *Lactobacillus* pertenece a la familia *Lactobacillaceae*. Recientemente, la familia *Leuconostocaceae* se fusionó dentro de la familia *Lactobacillaceae*, esta reclasificación propone 25 géneros de *Lactobacillus* de los cuales 23 son nuevos. Sin embargo, el término "lactobacilos" seguirá siendo útil para designar todos los microorganismos que se clasificaron dentro de la familia *Lactobacillaceae* hasta 2020 (Zheng *et al*, 2020). En la Tabla 2 se muestran los subgrupos mencionados y sus diferencias.

Tabla 2. Los subgrupos de *Lactobacillus*: Streptobacteria, Betabacteria y Termobacteria

Subgrupo	Temperatura de crecimiento (°C)		Producción de CO <sub>2</sub> a partir de glucosa	Producción de CO <sub>2</sub> a partir de gluconato	Arginina hidrolizada	Fermentación de pentosa	Requerimientos de tiamina	Tipo de ácido láctico	Producción de manitol
	15	45							
Termobacteria	-	+	-	-	-	-	-	L, DL	-
Estreptobacterias	+	V*	-	+	-	+	-	L, DL	-
Betabacteria	+	V*	+	+	+	+	+	DL	+

\*Variable. Adaptado de Steinkraus (2002)

### *Lactococcus*

El género *Lactococcus* (antes “estreptococos del grupo N”) comprende 13 especies. La identificación de especies se basa en criterios fisiológicos, quimiotaxonómicos y de biología molecular. Morfológicamente, los lactococos son cocos Gram (+) de 0.5 a 1.5 µm de tamaño, que forman cadenas cortas. Son mesófilos, con la excepción de *L. piscium psicrófila*, fermentan hexosas de manera homofermentativa produciendo ácido láctico L (+) y tienen requisitos de crecimiento complejos (Wright, 2019).

*Lactococcus lactis* se ha utilizado durante siglos en la fermentación de alimentos, especialmente queso, yogur, etc., lo que le ha valido el estatus de (GRAS). Además de dar sabor algunas cepas producen bacteriocinas, lo que también permite su aprovechamiento como bioconservador (Ai-Lian Song *et al*, 2017).

### *Leuconostoc*

El género forma parte de la familia *Leuconostocaceae* que como ya mencionamos anteriormente se fusionó dentro de la familia *Lactobacillaceae*. Son bacterias Gram (+), inmóviles y no esporuladas, cuyas células son de elipsoidales a esféricas, a menudo alargadas y, por lo general, se presentan en pares o cadenas. Cuando se cultivan en un medio sólido, las células se alargan y pueden confundirse con bacilos. No se forman verdaderas cápsulas celulares, pero muchos producen dextrano extracelular que forma una capa densa en electrones en la superficie celular. Son anaerobios facultativos y catalasa negativos. Los leuconostocs no pueden hidrolizar la arginina y no reducen el nitrato. Son no proteolíticos y no hemolíticos. No forman indol. Aunque el crecimiento puede ocurrir a un pH de 4.5, prefieren un medio de pH inicial de 6.5. La temperatura óptima de crecimiento está entre 20°C y 30°C. Aunque las especies psicrotóxicas *L. carnosum*, *L. gelidum* y *L. inhae* crecen a temperaturas de refrigeración (Säde y Björkroth, 2019).

El papel de las especies de *Leuconostoc* en los alimentos puede ser tanto positivo como negativo. En cuanto a los efectos positivos las especies de *Leuconostoc* son responsables del aroma a mantequilla, una característica deseable para muchos productos lácteos. Actualmente, las especies de *Leuconostoc* se utilizan como cultivos iniciadores en la fabricación de alimentos lácteos, vegetales y cereales fermentados junto con la especie productora de ácido *Lactobacillus lactis*. El efecto

negativo de algunas especies de *Leuconostoc* es el deterioro de los alimentos. Se han descrito varias especies implicadas en el deterioro de los alimentos envasados y refrigerados, en particular la carne y los productos cárnicos (Liu *et al*, 2014).

### *Pediococcus*

El género *Pediococcus* a diferencia de otras BAL con forma de coco no forman cadenas de células, sino que se presentan en tétradas, en pares o individualmente. Algunas cepas pueden exhibir actividad pseudocatalasa y descomponer peróxidos en medios con bajo contenido de carbohidratos al producir catalasa que no contiene grupo hemo. La mayoría de las especies crecen bien en un rango de temperatura de 25°C a 37°C, pero algunas cepas crecen a 45°C o incluso hasta 50°C. El pH óptimo para el crecimiento está entre 6.0 y 6.5, y se informa que la mayoría de las especies inician el crecimiento a un pH de 4.5 o incluso inferior. Los pediococos son homofermentadores, anaerobios facultativos o microaerófilos que producen principalmente ácido láctico a partir de la glucosa. Los pediococos producen ácido láctico DL, excepto las cepas de *Pediococcus clausenii*, que convierten la glucosa en ácido L (+)-láctico. La fructosa y la celobiosa son fermentadas por todas las especies. La mayoría de las especies también fermentan galactosa y maltosa. No reducen el nitrato ni producen indol a partir del triptófano (Säde y Björkroth, 2019).

Cuentan con 12 especies, y generalmente se encuentran en hábitats similares a los de otras BAL como *Lactobacillus* y *Leuconostoc*; es decir, plantas y material vegetal fermentado, alimentos y piensos, y en el tracto intestinal de animales y humanos. Además de sus aplicaciones en las industrias del queso, el vino y los piensos, los pediococos se explotan más comúnmente como cultivos iniciadores en productos cárnicos. Más concretamente, cepas seleccionadas de *P. pentosaceus* y *P. acidilactici* se utilizan para producir salchichas secas debido a su capacidad para controlar el desarrollo de bacterias patógenas e indeseables. En contraste, otros pediococos muestran propiedades indeseadas. Debido a su resistencia típica al lúpulo, especialmente *Pediococcus damnosus* ha sido reconocido como un importante contaminador de la cerveza que causa turbidez, sabores ácidos y sabores adversos debido a la formación de diacetilo. Al igual que otras BAL, algunos pediococos producen bacteriocinas que como ya mencionamos permite su uso o al menos su uso

potencial como bioconservador en la industria de alimentos (Säde y Björkroth, 2019; Porto *et al*, 2017).

### *Streptococcus*

El género *Streptococcus* ha sido revisado constantemente desde sus orígenes pues fueron de las primeras bacterias reconocidas por los microbiólogos debido a su participación en un gran número de enfermedades humanas y animales. La primera clasificación destacable para los estreptococos fue la propuesta por Orla-Jensen que como ya mencionamos utilizó las características de fermentación, la tolerancia a la temperatura y al cloruro de sodio, los límites de temperatura de crecimiento y la morfología celular para la clasificación de las cepas. Sin embargo, fue Sherman en 1937 quien produjo la primera clasificación sistemática integral de aislados de estreptococos de fuentes ambientales, comensales y asociadas a enfermedades. Sherman propuso cuatro divisiones primarias sobre la base de su actividad hemolítica, antígenos de carbohidratos de grupo, gran capacidad reductora, capacidad de crecer a 10°C y 45°C, capacidad de sobrevivir al calentamiento a 60°C durante 30 minutos y crecimiento a pH de 9.6 o en presencia de azul de metileno al 0.1% o en cloruro de sodio al 6.5%. Las divisiones se denominan: "piógena", "enterococo", "láctica" y "viridans". La designación de estreptococos "lácticos", no es clara ya que todos los estreptococos producen ácido láctico, pero se adoptó para las especies *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*, ya que estos estreptococos se han denominado durante mucho tiempo "estreptococos del ácido láctico" y todos expresaron el antígeno del grupo N de Lancefield. Este esquema de clasificación de Sherman con base fisiológica/bioquímica, aumentado por la caracterización serológica clásica, fue ampliamente aceptado durante muchos años hasta que fue reemplazado más recientemente por un esquema basado en la aplicación de metodologías moleculares (Tagg *et al*, 2019).

Los miembros del género *Streptococcus* son bacterias Gram (+), catalasa-negativas, citocromo negativas, anaerobias facultativas, esféricas u ovoides, de menos de 2 µm de diámetro y con un contenido de guanina-citosina relativamente bajo (34-46%). La división a lo largo de un solo eje hace que las células estreptocócicas crezcan como cadenas, particularmente en cultivos líquidos, y algunas cadenas pueden contener 50 o más unidades celulares. Tiene 82 especies y la mayoría están asociadas con

enfermedades humanas y animales (Liu *et al.*, 2014). *Streptococcus thermophilus* es una excepción ya que es un cultivo iniciador importante. Es ampliamente utilizado en combinación con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* y/o *Lactobacillus helveticus*, como cultivo iniciador para yogur y productos lácteos fermentados relacionados, así como quesos de tipo suizo e italiano.

## II. Cultivos iniciadores

Los alimentos fermentados son sustratos alimentarios que son inoculados por microorganismos comestibles cuyas enzimas, particularmente amilasas, proteasas y lipasas hidrolizan los polisacáridos, proteínas y lípidos, en productos no tóxicos con sabores, aromas y texturas agradables y atractivos para el consumidor humano. Si los productos de las actividades enzimáticas tienen olores desagradables o sabores indeseables y poco atractivos o los productos son tóxicos o producen enfermedades, los alimentos se describen como descompuestos.

La fermentación desempeña al menos cinco funciones en el procesamiento de alimentos: (1) Enriquecimiento de la dieta humana mediante el desarrollo de una amplia diversidad de sabores, aromas y texturas en los alimentos; (2) Conservación de cantidades sustanciales de alimentos a través de fermentaciones de ácido láctico, alcohólico, ácido acético, alcalinas y con alto contenido de sal; (3) Enriquecimiento biológico de sustratos alimentarios con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales; (4) Desintoxicación durante el procesamiento de la fermentación de los alimentos y (5) Disminución en los tiempos de cocción y los requisitos de combustible (Steinkraus, 2002).

Es notable que el éxito de una actividad tan grande y diversa depende fundamentalmente de las levaduras y las BAL. Las BAL son principalmente utilizadas para la producción de una amplia gama de leche y productos lácteos fermentados, carne, vegetales, soya y otros productos. Estos son los microorganismos que acuñaron específicamente el término "cultivo iniciador o iniciadores", ya que se agregan deliberadamente a un sustrato para iniciar un proceso de fermentación determinado. Las BAL se han utilizado durante milenios en varios procesos de fermentación para la producción de alimentos y bebidas fermentados, como queso, yogurt, vino y pan de masa madre. Además, se agregan como aditivos alimentarios

en una variedad de productos procesados, ya que se asumen como seguros en la mayoría de los casos. El desarrollo de los cultivos iniciadores comenzó con la fabricación de queso, donde se observó que la producción no podía depender de la microbiota proveniente de la leche utilizada, fue así como empezó a agregarse una muestra del lote anterior (para el caso del queso, una muestra del suero) para favorecer la fermentación del nuevo proceso. Posteriormente se desarrollaron métodos para secar al horno cultivos de leche o para producir preparaciones congeladas de manera que permitieran la viabilidad de las BAL. Estos tenían la ventaja de proporcionar material fácil de manejar. Otro desarrollo importante fue la aplicación de la liofilización a la producción comercial de BAL; lo que evitaba la necesidad de propagar el cultivo iniciador en la planta de fabricación (Mahony *et al.*, 2019). Estas tecnologías ahora se emplean casi universalmente para la preparación de cultivos iniciadores, y un número relativamente pequeño de empresas comerciales suministra la mayoría de los cultivos del mundo.

Los miembros del grupo BAL desempeñan un papel esencial en la industria de procesamiento de alimentos, donde se utilizan como cultivos iniciadores o complementarios para la producción de lácteos fermentados, carne y alimentos derivados de plantas. Las propiedades tecnológicas asociadas con las diferentes especies son fundamentales para su selección como iniciadores adaptados para cumplir con los requisitos particulares del producto. Varias especies de *Lactobacillus* se emplean como cultivos iniciadores en la fabricación de carnes fermentadas. Estos incluyen a *Lb. pentosus*, *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*. Las especies de *Pediococcus*, incluidas *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*, también pueden usarse en fermentaciones de carne. Las BAL como *Leuconostoc* y *Lactobacillus* son responsables de la fermentación de la col para producir chucrut. Los iniciadores empleados en la producción de masa madre en la elaboración de pan, suelen incluir *Lactobacillus sanfranciscensis*. Finalmente, *Oenococcus oeni* es una BAL asociada al vino, responsable de la fermentación maloláctica, en la que el ácido málico se convierte en ácido láctico de sabor más suave (Mahony *et al.*, 2019), en la tabla 3 se resumen algunas de las aplicaciones mencionadas.

**Tabla 3. Lista de las principales BAL y sus aplicaciones en la fermentación de alimentos.**

BAL	Aplicaciones
<i>Lactococcus lactis</i>	Cultivo iniciador utilizado en la producción de productos lácteos fermentados, e.g., queso, crema, mantequilla y suero de leche.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Cultivo iniciador utilizado en la producción de productos lácteos fermentados, e.g., queso y yogur.
<i>Lactobacillus</i> spp.	Cultivos iniciadores y complementarios utilizados en la producción de productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados, e.g., queso, yogurt, chucrut, kimchi y salchichas fermentadas.
<i>Weissella</i> spp.	Presente en fermentaciones espontáneas, por ejemplo, producción de kimchi y chucrut. No se agregan deliberadamente como cultivo iniciador debido al vínculo con la producción de aminas biogénicas.
<i>Pediococcus</i> spp.	Fermentación de carne y vegetales
<i>Leuconostoc</i> spp.	Fermentación de carne y leche

Adaptado de Mahony *et al.* (2019)

### III. Aplicaciones potenciales de las BAL en otras áreas

Las BAL utilizadas durante la fermentación deben tener varias características metabólicas importantes, como la capacidad de producir ácido y compuestos saborizantes, la capacidad de hidrolizar proteínas, la capacidad de producir exopolisacáridos viscosos y la capacidad de inhibir bacterias (producción de bacteriocinas). En general, sus aplicaciones se pueden dividir en dos grandes características metabólicas, que son la degradación y biosíntesis. Aunque las BAL se han utilizado en productos de fermentación durante mucho tiempo, las BAL funcionan en una amplia gama de formas, por lo que sus características funcionales son bastante diferentes. En la industria alimentaria, una variedad de bacterias puede fermentar una diversidad de sustratos en productos o producir una variedad de materias primas industriales durante el proceso de fermentación. Debido a la producción limitada de sus productos, a pesar de que algunos de los productos son valiosos, es posible que algunas BAL no sean suficientes para usarse como bacterias de grado industrial. Por lo tanto, el uso de la biotecnología para llevar a cabo la transformación específica de cepas puede ayudar a sintetizar ciertos productos con un alto rendimiento. El desarrollo de la biotecnología moderna, la tecnología multiómica y otras técnicas de biología molecular, pueden producir cepas mejoradas

que pueden aumentar la producción de ácidos orgánicos como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico y el ácido láctico, exopolisacáridos, vitaminas y otros productos, y también se pueden usar para expresar enzimas que descomponen proteínas y polisacáridos. Entre ellos, *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* y otras cepas de ácido láctico en las que se ha realizado un excelente trabajo de ingeniería metabólica (Wang *et al.*, 2021). Además, el uso de residuos industriales como el suero de leche, como sustratos de producción también es una forma importante de paliar la situación actual de escasez de recursos. En las tablas 4 y 5 se muestran de manera resumida las aplicaciones de las BAL en la industria alimentaria. Muchas de estas aplicaciones son beneficiosas para la salud humana por lo que su aplicación se puede ampliar a áreas como la medicina y sus áreas relacionadas.

**Tabla 4. La degradación de macromoléculas en los alimentos por las BAL.**

Sustrato	Aplicaciones	Cepa
Polisacáridos	Hidrolizar almidón o fructanos en masa madre	<i>Weissella</i> spp., <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Proteínas y aminoácidos relacionados	Hidrolizar eficazmente la proteína en la leche	<i>Enterococcus faecium</i>
	Mejorar la digestibilidad <i>in vitro</i> de proteína de productos de cereales	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Otros compuestos no nutritivos y/o dañinos	Descomponer el ácido fítico en el proceso de fermentación de alimentos	<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	Hidrolizar péptidos amargos en la producción de queso	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Adaptado de Wang *et al.* (2021)

**Tabla 5. Sustancias sintetizadas en los alimentos por las BAL.**

Productos	Aplicaciones	Cepa
Ácido láctico	Utilizar los residuos de la industria láctea como sustrato para reducir costos	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Lactocaseibacillus casei</i> , <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> y <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i>
Otros ácidos orgánicos	Detección de ácidos orgánicos producidos por bacterias del ácido láctico y mejora de la calidad y seguridad alimentaria	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	El ácido 3-hidroxipropiónico es un importante precursor de polímeros plásticos	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
Bacteriocinas	Inhibir el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en carne picada cruda y dorada	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactilactobacillus sakei</i>
Vitaminas	Sintetizar ácido fólico en productos lácteos	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
	Inducir la sobreexpresión de la biosíntesis de riboflavina	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Polisacáridos extracelulares	Sintetizar isomalto-/malto-polisacáridos usando diferentes sustratos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Limosilactobacillus reuteri</i>
	Aumentar el contenido de polisacáridos extracelulares del yogurt	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
ácido aminobutírico	γ- Aumentar el contenido de GABA en cereales fermentados	<i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i>
Compuestos saborizantes	Producir sustancias aromáticas en vino, vinagre, pan, masa madre y queso	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Antioxidantes	Producir antioxidantes (metabolitos de fenol activo, glucósido de ácido clorogénico, sulforafano) tiene una variedad de efectos beneficiosos en el cuerpo humano	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> y, <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	Reducir el daño de los compuestos fenólicos a la membrana plasmática y la pared celular de las BAL	<i>Levilactobacillus brevis</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> y <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>

Adaptado de Wang *et al.* (2021)

## 6. Conservación de microorganismos

El objetivo de la conservación o preservación de los microorganismos es proteger a los microorganismos para evitar su pérdida o daño. Se busca mantener la morfología, fisiología y recientemente también el material genético de los mismos. Los microorganismos dominan la vida en la Tierra; además, la diversidad microbiana tiene enormes recursos de valor para las industrias farmacéutica, biotecnológica y alimentaria. La pérdida de esta diversidad implica la pérdida de recursos potencialmente valiosos de los que depende la población humana. Sin embargo, la atención hacia la conservación de microorganismos no ha recibido mucho ímpetu (Van Hop, 2018).

El aumento de la conciencia sobre la diversidad cultivable y el desarrollo de enfoques de cultivo modernos aumenta constantemente el número de registros de microorganismos nuevos y no cultivados previamente en las colecciones de cultivo. El cultivo y caracterización de microorganismos por sí solo no es adecuado sin técnicas de conservación que no alteren la morfología, fisiología o genética de las cepas aisladas. La conservación es necesaria para futuras investigaciones, para la docencia y para aplicaciones industriales (Prakash *et al.*, 2013; Van Hop, 2018).

Hay dos tipos de estrategias, conservación *in situ* y conservación *ex situ*, que ayudan a mejorar la incorporación de comunidades y ecosistemas microbianos en la agenda de conservación. El aislamiento, manejo y reserva de microorganismos en las colecciones de cultivos se conoce como conservación *ex situ*, que se sigue ampliamente en todo el mundo (Sharma *et al.*, 2018). Es llevada a cabo por parte de individuos e instituciones. El mantenimiento y la conservación adecuados de los microorganismos *ex situ* requieren una instalación de laboratorio compleja con todos los equipos necesarios. Esta estrategia incluye los bancos de genes, las colecciones de cultivos y los centros de recursos microbianos que forman el repositorio de los aislados microbianos y evita los prolongados protocolos de reaislamiento. Las colecciones *ex situ* de microorganismos son un recurso esencial para el futuro ya que están vinculadas a los programas de investigación y desarrollo de un país.

## I. Métodos de conservación convencionales

Se conocen varios métodos de conservación de microorganismos, los cuales se diferencian sobre todo por el tiempo de duración. Los métodos de conservación a largo plazo más utilizados tanto en las colecciones de cultivos como en el sector industrial son la crioconservación y liofilización (Prakash *et al.*, 2013).

### Crioconservación

Los métodos de conservación a bajas temperaturas se diferencian en la temperatura utilizada y en el uso o no de crioprotectores. Los crioprotectores son agentes que evitan o disminuyen el daño celular durante la congelación. En la tabla 6 se pueden observar las temperaturas de trabajo reportadas para cada método. Generalmente se utilizan crioprotectores a temperaturas menores a las de refrigeración. Además, se recomiendan temperaturas menores a  $-20^{\circ}\text{C}$  para conservación a largo plazo.

**Tabla 6. Temperaturas reportadas en cada método de crioconservación**

Método de conservación	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
Congelación	0 a -20
Ultracongelación CO <sub>2</sub> sólido	$\leq -80$
N <sub>2</sub> líquido	$\leq -130$

Adaptado de Sharma *et al.* (2017).

Se han utilizado casi el mismo tipo de protocolos para la crioconservación de diferentes categorías de microorganismos con algunas modificaciones en la concentración y el tipo de crioprotectores. Generalmente se prefieren células menos estresadas y más activas de la fase logarítmica media o tardía del cultivo. El método consiste en cultivar el microorganismo en medio sólido o en caldo y cosechar desde la fase de logarítmica media o tardía. Suspender las células en crioprotectores adecuados (generalmente 10–50 % de glicerol o 5–10 % de dimetilsulfóxido) y someterlas a congelación rápida o controlada (se ha reportado que la tasa de enfriamiento de  $1\text{--}5^{\circ}\text{C}$  por minuto es óptima). Para la activación, se retira los crioviales almacenados, se descongelan rápidamente en un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$  y

se resuspenden o siembran en un medio de activación adecuado para el crecimiento (Sharma *et al.*, 2018).

La temperatura baja protege las proteínas y el ADN de la desnaturalización y el daño y ralentiza el movimiento del agua celular. En consecuencia, el metabolismo de las células y cambios en su fisiología se detienen esencialmente y las células quedan protegidas durante largos períodos de tiempo. La conservación a -80 °C es adecuada, pero se considera ideal a -196 °C porque las posibilidades de mutaciones en el ADN son casi nulas a esa temperatura. Durante la criopreservación, los crioviales se pueden almacenar sumergidos en nitrógeno líquido (a -196 °C) o en su fase de vapor (-135 a -150 °C). El almacenamiento en fase de vapor se considera mejor porque evita la entrada de nitrógeno en fase líquida en los crioviales, lo que protege contra el estallido y contaminación (Prakash *et al.*, 2013). La principal desventaja de este método es el uso de equipos y reactivos costosos que en el caso del N<sub>2</sub> líquido requieren un suministro constante.

## Liofilización

En este método se utilizan protocolos similares para la conservación de diferentes grupos de microorganismos con muy pocas modificaciones en la naturaleza del medio de los lioprotectores. Los lioprotectores, de manera análoga a la criopreservación, son agentes protectores utilizados durante la liofilización para evitar o disminuir el daño celular durante dicho proceso. En la liofilización, la selección del tipo correcto de medio de suspensión y lioprotectores sigue siendo un tema de investigación y necesita ser optimizado en el futuro utilizando diferentes grupos de microorganismos. En este proceso, el material se congela, el hielo formado después de congelar se remueve por sublimación (conversión de sólido a vapor) y el material resultante se guarda al vacío. Generalmente se recomienda el uso de cultivos en fase estacionaria [la síntesis de proteínas de estrés depende de la fase de crecimiento, aunque en un inicio se creía que solo las células en fase exponencial eran capaces de generar respuestas adaptativas, otros estudios reportan la síntesis de proteínas de estrés durante la fase estacionaria (Carvalho *et al.*, 2004)], un contenido de humedad final del 1% al 2% y el almacenamiento a 4°C en la oscuridad para lograr una mayor viabilidad celular y una estabilidad más prolongada (Sharma *et al.*, 2018).

Tanto la crioconservación como la liofilización tienen ventajas y desventajas. Por un lado, las temperaturas muy bajas de transporte y almacenamiento son las principales desventajas comerciales de los cultivos iniciadores congelados. Además del riesgo de descongelación, los altos costos de transporte pueden limitar el uso de cultivos iniciadores congelados en áreas o países distantes. Por lo tanto, la liofilización es más cómoda y sencilla, ya que no requiere condiciones de congelación durante la distribución. Aunque la liofilización es la técnica de secado convencional utilizada comercialmente por los fabricantes de cultivos iniciadores, es más tardada y costosa que otros procesos de secado y la respuesta de conservación varía según la especie (Peighambardoust *et al.*, 2011). Incluso diferentes cepas de la misma especie pueden responder de manera diferente al mismo método de conservación. La viabilidad y longevidad de los microorganismos bajo conservación depende de algunos factores críticos: (1) composición del medio de suspensión y rehidratación, (2) tipo de crioprotector utilizado, (3) tasa de enfriamiento y descongelación, (4) etapa de crecimiento del cultivo, (5) tamaño y tipo celular, contenido de lípidos, contenido de agua y densidad inicial de las células (Prakash *et al.*, 2013).

### **Cambios fisicoquímicos ocurridos durante la congelación.**

Durante la congelación se produce la concentración de los solutos que se disuelven en la fase líquida restante. La incidencia de lesiones por congelación ha sido una gran preocupación y se ha desarrollado la opinión general de que la formación de hielo intracelular es dañina, mientras que la congelación extracelular es comparativamente inofensiva. Se sabe que los cristales de hielo perforan a través de las células, destruyéndolas directa o indirectamente a través de cambios en la composición de la fase líquida. La formación de hielo extracelular a veces se vuelve dañina ya que las células densamente empaquetadas son propensas a sufrir daños por tensiones mecánicas dentro de los canales donde están secuestradas. Sin embargo, se prefiere, para asegurar la viabilidad y evitar daños en la estructura del complejo extracelular. La formación de hielo se puede evitar hasta cierto punto mediante la vitrificación, pero la toxicidad debido a la concentración de solutos es la principal preocupación. Por lo anterior, siempre existe la necesidad de mejorar y optimizar el protocolo de conservación, ya que un método único puede no ser aplicable a todos los tipos de microorganismos (Singh y Baghela, 2017).

Los crioprotectores generalmente presentan grupos ionizables o capaces de formar puentes de hidrógeno que les permiten estabilizar las membranas y prevenir en cierta manera los daños durante el proceso de congelación. Son considerados como la fuerza motriz del movimiento del agua por ósmosis y de los solutos por difusión. Estos crioprotectores se clasifican de acuerdo con su poder de penetración, en la tabla 7 se muestra una breve clasificación de los crioprotectores más comunes. Recientemente, se siguen desarrollando moléculas inhibitoras del hielo, como proteínas anticongelantes, polímeros sintéticos, nanomateriales e hidrogeles. Además de otras estrategias de ingeniería avanzada, como la administración de trehalosa, la encapsulación celular y el diseño de recubrimientos que impidan la propagación y formación de cristales de hielo (Chang y Zhao, 2021).

**Tabla 7. Breve clasificación de los crioprotectores más comúnmente utilizados**

Agentes penetrantes	Agentes no penetrantes	
Moléculas pequeñas	Azúcares	Polímeros
Dimetilsulfóxido	Sacarosa	Polietilenglicol
Etilenglicol	Trehalosa	Polivinilpirrolidona
Propilenglicol	Rafinosa	Hidroxietilalmidón
Glicerol	Manitol	Ficol
Metanol	Glucosa	Proteínas del suero
Etanol	Galactosa	Proteínas de la leche
Glicina betaína		

Adaptado de Chang y Zhao (2021).

En general, el daño por congelación puede dividirse en hielo extracelular e intracelular durante el proceso del ciclo de congelación-descongelación. Se sabe que la supervivencia de las células depende en gran medida de las velocidades de enfriamiento, que pueden definirse como congelación lenta y congelación rápida o vitrificación. Durante la congelación lenta, la mayor parte del agua intracelular fluye hacia afuera porque el potencial químico del agua intracelular es mayor que el de la fase de hielo extracelular, lo que provoca la deshidratación de las células y, por lo tanto, se forma hielo extracelular y causa daños por presión osmótica para la célula. Con el aumento de la velocidad de enfriamiento, el agua intracelular no puede salir tan rápidamente, formando así hielo intracelular y provocando daños por congelación

fatales a las células en el proceso de congelación. En resumen, independientemente de que la congelación sea lenta o rápida, la formación de cristales de hielo es inevitable, por lo que es crucial optimizar el proceso de enfriamiento y minimizar el daño por congelación. En particular, la criopreservación por vitrificación puede evitar la lesión por hielo durante el proceso de congelación debido al estado libre de hielo de la solución con la ayuda de una alta concentración de agentes crioprotectores. Sin embargo, la desvitrificación y la recristalización que se producen durante la fase de descongelación pueden causar daños mortales a las células. Además, la toxicidad de la alta concentración de crioprotectores también es un problema importante y una limitación para la estrategia de criopreservación por vitrificación. En conclusión, la formación de núcleos de hielo, el crecimiento de cristales de hielo y la recristalización/desvitrificación del hielo son los tres factores principales que limitan la eficacia y la calidad de la criopreservación (Chang y Zhao, 2021). Por tanto, el método óptimo es un procedimiento de congelación de varias etapas que implica congelación lenta al principio hasta que se produce la formación de hielo extracelular. Luego se mantiene una temperatura constante hasta lograr la deshidratación óptima. Al final sigue la congelación rápida hasta completar la vitrificación (Singh y Baghela, 2017).

## II. Métodos de conservación alternativos

En contraste con la temperatura muy baja aplicada en los métodos de crioconservación, los procesos de secado alternativos se pueden dividir en dos grupos principales relacionados con la temperatura de secado: (I) procesos que trabajan a una temperatura alta, como el secado por aspersion, y (II) procesos que trabajan por debajo de temperaturas extremas como el secado en lecho fluidizado y el secado al vacío.

### Secado por aspersion

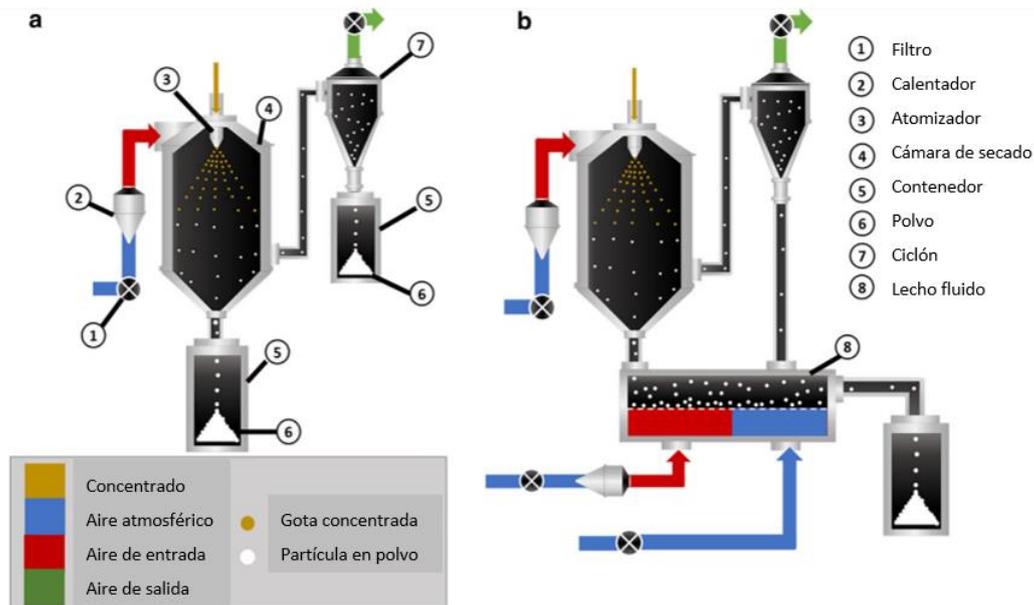
El secado por aspersion es un proceso único en el que se forman partículas al mismo tiempo que se secan. Es muy adecuado para la producción continua de sólidos secos en forma de polvo, granulado o aglomerado a partir de materias primas líquidas como soluciones, emulsiones y suspensiones bombeables. El producto final del secado por aspersion debe cumplir con estándares de calidad precisos con respecto a la

distribución del tamaño de las partículas, el contenido de humedad residual, la densidad aparente y la forma de las partículas (Peighambardoust *et al.*, 2011). El creciente interés en el secado por aspersión puede explicarse por el hecho de que consume hasta 10 veces menos energía que la liofilización y puede realizarse de forma continua. Además, estudios recientes han sugerido que algunos cultivos secados por aspersión se pueden almacenar a temperatura ambiente y, por lo tanto, reducir el costo de refrigeración (Moreira *et al.*, 2021). Los pasos involucrados en este proceso generalmente consisten en la preparación de soluciones concentradas de BAL con o sin la adición de agentes protectores, encapsulantes; atomización del alimento, evaporación de la humedad y finalmente, recolección del producto secado por aspersión. En general, las células encapsuladas sobreviven más que las células libres, razón por la cual en la mayoría de los casos se utilizan agentes encapsulantes en combinación con agentes protectores, de manera que el producto obtenido son células encapsuladas o de lo contrario, se obtienen células concentradas en polvo. A continuación, se revisarán algunos de los aspectos tecnológicos y fisicoquímicos más relevantes de este método.

### Equipo y operaciones

Un secador por aspersión se compone de una bomba de alimentación, un atomizador, una cámara de secado y un ciclón, como se puede ver en la imagen 3A. En ciertos casos, esta configuración básica se puede acoplar a un lecho fluido integrado como se puede ver en la imagen 3B.

**Imagen 3. Representación esquemática de secadores por aspersión. (A) Secador por aspersión de ciclo abierto; (B) Secador por aspersión con lecho fluidizado integrado.**



Adaptado de Moreira *et al* (2021).

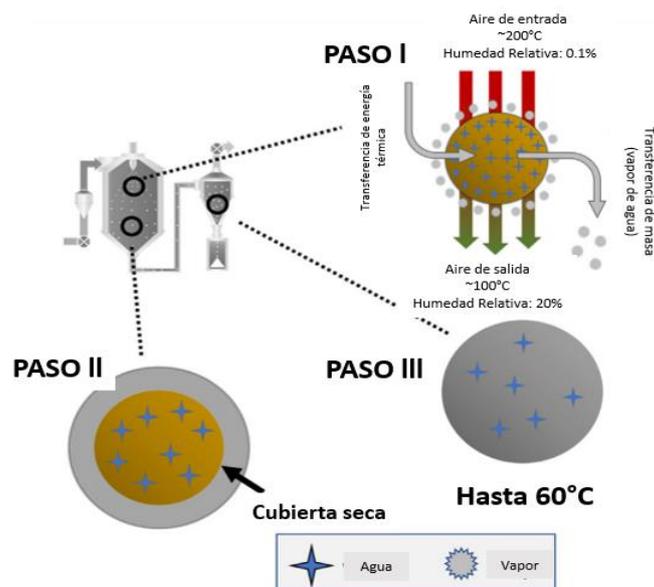
El secado por aspersión se lleva a cabo en pasos consecutivos que convierten un fluido con una alta concentración de sólidos en partículas individuales, que varían en tamaño de 11 a 200  $\mu\text{m}$ . El producto inicial se denomina concentrado. El secador por aspersión que se muestra en la imagen 3A funciona en el modo por lotes y el concentrado de polvo permanece en contacto con el aire de salida durante todo el proceso. En configuraciones más complejas como se muestra en la imagen 3B, se utiliza un proceso de secado en dos etapas: las gotas se deshidratan inicialmente dentro de la cámara de secado y el polvo resultante tiene un alto contenido de agua. Se produce una segunda etapa de secado en un lecho fluido para ajustar el contenido final de agua de las partículas de polvo. Esta segunda etapa se revisará con más detalle en la siguiente sección.

### Cambios fisicoquímicos ocurridos durante el secado por aspersión

Las gotas se atomizan en la cámara de secado, donde entran en contacto con un flujo de aire caliente y temperaturas que oscilan entre los 115 y los 200°C (Cotabarren *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2015). La evaporación instantánea del agua de las gotitas provoca

una rápida transferencia de calor del aire al concentrado con una subsiguiente transferencia de masa (agua) del concentrado al aire. Las gotitas secas se convierten en partículas de polvo y caen al fondo de la cámara de secado donde se recogen en un recipiente como se muestra en la imagen 3A. Las partículas más ligeras son transportadas por la corriente de aire al ciclón del secador por aspersion, donde se separan del aire y se almacenan en otro recipiente colector. El proceso se puede dividir en 3 etapas que se muestran en la imagen 4, a continuación, se revisará cada etapa con más detalles:

**Imagen 4. Eventos que ocurren dentro del secador durante un proceso de secado.**



Adaptado de Moreira *et al* (2021).

- Paso I: Las gotas de concentrado entran en contacto con el aire de entrada cuando salen del atomizador

Cuando las gotas se atomizan por primera vez, las que tienen un alto contenido de agua y baja temperatura se dispersan en el flujo de aire con baja humedad y alta temperatura como se puede ver en la imagen 4, Paso I. De acuerdo con la ley de Fourier, la diferencia de temperatura entre las gotas y el aire promueve el intercambio de energía térmica del aire a las gotas. Al mismo tiempo, se produce una transferencia de masa (vapor de agua) de las gotas al aire debido a sus diferencias de humedad.

En este momento, las superficies de las gotas están cubiertas por moléculas de agua sueltas que consumen la mayor parte del calor del aire y se evaporan instantáneamente (Deeth y Hartanto, 2009). En este caso, las gotas no se sobrecalientan, aunque el proceso requiere altas temperaturas del aire de entrada ( $\sim 200^{\circ}\text{C}$ ). Durante esta etapa, la evaporación consume alrededor de  $2700 \text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$  de agua evaporada, y las gotas alcanzan la temperatura de bulbo húmedo ( $\sim 45^{\circ}\text{C}$ ) (Huang *et al.*, 2017). En pocas palabras, este proceso permite la evaporación del agua a bajas temperaturas y evita el sobrecalentamiento de las gotas.

- Paso II: Las partículas caen al fondo de la cámara de secado

En el segundo paso del secado como se puede ver en la imagen 4, Paso II, el aire se enfría y se vuelve más húmedo. La superficie de la gota permanece seca y forma una capa alrededor de la partícula de polvo que dificulta la evaporación interna del agua (Wei *et al.*, 2019). A medida que la gota se aleja de la boquilla, su fracción de agua y la tasa de evaporación se reducen considerablemente (Tran *et al.*, 2017), y la energía térmica del aire caliente promueve un aumento en la temperatura de la gota (ahora una partícula). El aumento de la temperatura de la partícula depende del diámetro de la partícula, así como de la trayectoria de la partícula que sigue en la cámara de secado. Cuando las partículas se calientan en este paso, las BAL se someten a temperaturas más altas ( $\sim 60^{\circ}\text{C}$ ) durante varios segundos y a un estrés térmico significativo (Huang *et al.*, 2017; Peighambardoust *et al.*, 2011). El efecto del calor del secador por aspersion en las BAL depende del tiempo que las partículas permanecen en la cámara de secado según el tamaño y las condiciones de funcionamiento del equipo.

- Paso III: Las partículas son impulsadas por el aire de salida hacia el ciclón o el lecho fluido

En el tercer paso como se puede ver en la imagen 4, Paso III, las partículas que se han formado son sopladas por un flujo de aire que tiene una temperatura más alta que la del aire de salida lo que aumenta el riesgo de daño térmico. La temperatura ideal del aire de salida para las BAL varía de un secador por aspersion a otro. Se han informado temperaturas óptimas del aire de salida a  $65^{\circ}\text{C}$  y  $89^{\circ}\text{C}$  para *Lactococcus lactis* (Ghandi *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2019).

En un sistema de secado por aspersión de dos etapas, las partículas se secan a temperaturas de aire más bajas y luego se enfrían (área de enfriamiento) para reducir el riesgo de daño térmico. El proceso de dos etapas lleva más tiempo, pero parece ser más adecuado para la producción de células deshidratadas. Aunque este proceso se discutirá más adelante.

### Parámetros críticos del secado por aspersión

El secado por aspersión presenta una serie de desafíos. Como ya hemos revisado el proceso depende de las condiciones del secado, pero también de otros factores como la tolerancia intrínseca de las cepas y la adición de agentes encapsulantes y protectores apropiados, estos parámetros se revisarán con más detalle a continuación.

### Condiciones de secado

La historia temperatura/tiempo de las partículas se puede dividir en dos períodos. Como ya mencionamos anteriormente, en un inicio las gotas no se sobrecalientan, aunque el proceso requiere altas temperaturas del aire de entrada, se conoce como período de tasa de secado constante en donde la temperatura del producto y la inactivación por calor se limitan a la temperatura de bulbo húmedo. Posteriormente se inicia el período de velocidad decreciente, la superficie de las partículas se seca y la temperatura del producto aumenta según la configuración del secador. Durante esta etapa, el grado de inactivación térmica depende de los parámetros de secado, como la temperatura de salida, el tiempo de residencia y la velocidad de alimentación. El período de velocidad decreciente es importante para la inactivación por calor y, por lo tanto, el tiempo de residencia óptimo es el tiempo para la eliminación completa de la humedad con un aumento mínimo en la temperatura de los productos secos (Santivarangkna *et al.*, 2008).

### Tolerancia intrínseca de las cepas

La supervivencia de distintas especies de un género determinado o incluso de distintas cepas de una especie determinada difiere bajo las mismas condiciones de secado o almacenamiento (Lian *et al.*, 2002). Por ejemplo, en comparación con *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Bifidobacteria*, *Propionibacterium* suele mostrar una

mayor tolerancia debido a sus mayores capacidades de adaptación ambiental, ya sea a través de su metabolismo o de una respuesta de tolerancia múltiple (Huang *et al.*, 2016, Leverrier *et al.*, 2004). Otro caso es el del género *Streptococcus* que suele ser más resistente que *Lactobacillus* al secado. La temperatura umbral a la que se causa daño a las células microbianas suele estar dentro del rango del límite superior de temperatura de crecimiento de las especies microbianas. Por lo tanto, la resistencia al secado de *S. thermophilus* probablemente esté relacionada con su mayor tolerancia al calor (termotolerancia).

Aunque la especie puede reflejar generalmente la aparente resistencia de diferentes bacterias, el éxito del método parece depender sobre todo de la cepa. Es probable que dicha variabilidad esté relacionada con el entorno de la fuente original, la presencia de genes específicos, las interacciones con la matriz extracelular o la capacidad de acumulación de polifosfato intracelular y producción de exopolisacáridos, etc. Dado que la susceptibilidad tanto al proceso como al entorno depende de la cepa, las condiciones de secado deben adaptarse teniendo en cuenta lo último y no transponerse directamente de una cepa a otra (Huang *et al.*, 2017).

### Agentes encapsulantes y protectores

Como ya hemos mencionado, las células encapsuladas sobreviven más que las células libres. Es por eso que la elección de agentes encapsulantes y protectores adecuados es crucial durante todo el proceso y almacenamiento posterior. Las soluciones de leche descremada en polvo, maltodextrina, almidón soluble, goma arábica, suero de leche y gredina se han utilizado como los agentes encapsulantes más comunes, sobre todo la leche descremada es el medio de secado más utilizado en las BAL (Freixo *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2002).

Al igual que en los métodos de conservación convencionales, la adición de agentes protectores es muy común para proteger los cultivos iniciadores durante el secado y el almacenamiento. Los agentes protectores pueden ser componentes simples o complejos. Se han investigado diferentes azúcares (e.g., glucosa, fructosa, lactosa, manosa, sacarosa, sorbitol, adonitol, trehalosa) y compuestos como, el glutamato monosódico y oligosacáridos por sus propiedades protectoras sobre las células bacterianas durante el secado (Peighambardoust *et al.*, 2011). Se han usado solos o mezclados con otros agentes, debido a su probable efecto sinérgico al utilizarse en

mezcla y aumentar la supervivencia de las cepas. Además, se sigue explorando la posibilidad de utilizar nuevos agentes, recientemente se ha explorado el uso de ingredientes alimentarios como el jugo de frutas, mucílago y proteínas solubles de semilla de chía y linaza, etc. (Barbosa y Teixeira, 2016; Bustamante *et al.*, 2015; Bustamante *et al.*, 2017), de estos nuevos agentes se profundizará más adelante.

La trehalosa es el agente protector más estudiado, debido a su efecto protector en ambientes anhidros; de acuerdo con Chávez y Ledebøer (2007), la razón de su efecto protector es que los azúcares pueden reemplazar las moléculas de agua y preservar las estructuras de la membrana, además de que también retardan la desnaturalización de las proteínas (preservan la estructura celular) al formar enlaces de hidrógeno con las proteínas. Se propusieron dos hipótesis, denominadas reemplazo de agua y vitrificación, para explicar el mecanismo de estabilización de la membrana por parte de los azúcares. La hipótesis de la vitrificación se basa en la formación de vidrio en estado seco por azúcares. De acuerdo con la hipótesis de reemplazo de agua, se requieren interacciones específicas y particulares entre los fosfolípidos y los azúcares para el efecto protector. Las interacciones ocurren a través del enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares y el grupo fosfato en la superficie de la bicapa. Por otro lado, las proteínas de la leche pueden prevenir el daño celular al estabilizar los constituyentes membranales. Además, pueden formar una capa protectora en la pared celular bacteriana al interactuar con el calcio de la leche, mientras que la lactosa puede desempeñar un papel similar al de la trehalosa (Huang *et al.*, 2017).

En la tabla 8 se muestran algunas de las cepas con buenos porcentajes de supervivencia tras el secado por aspersion. A pesar de las ventajas de este método, los procesos de crecimiento y secado aún necesitan adaptarse y optimizarse para cada cepa, y mejorar el medio de secado y la adición de agentes protectores.

**Tabla 8. Revisión de los factores clave que determinan la supervivencia de las BAL y otras bacterias después del secado por aspersión.**

Bacteria	Medio de cultivo	Condiciones de secado			Contenido de humedad final (%)	Supervivencia (%)
		Medio de secado	T <sub>EN</sub>	T <sub>SA</sub>		
<i>S. thermophilus</i> MK-10	Leche condensada descremada (18% p/p)	Medio de cultivo fermentado (18 % p/p)	NR	60	10	69.5
<i>B. longum</i> ATCC 15708	Caldo MRS con cisteína al 0.05 %	Grenetina (10%)	100	50	10	54.3
<i>B. longum</i> B6					7.8	63.7
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB12		Leche descremada (20% p/v)	170	85-90	3.2	79
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Caldo MRS suplementado con trehalosa (1.25 % p/v)	Trehalosa (20% p/p) + Glutamato monosódico	NR	65-70	3.8	80.8
<i>Lb. rhamnosus</i> E800					4.1	89.3
<i>P. acidipropionici</i>	Permeado de suero ácido (10 % p/v) con maceración de maíz (2,5 % p/v) y extracto de levadura (1 % p/v)	Suero dulce (~50% p/p)	130	60	~3	100
<i>Lb. acidophilus</i> La-5	Caldo MRS	Leche descremada (30%)	180	85-95	4.3	77.7
<i>Lb. casei</i> 431		Aislado de proteína de suero, aceite de atún y goma arábiga (mezcla 3:2:1, ~10 % p/p)	180	80	3.19	56.2
<i>P. freudenreichii</i> ITG P20	Suero dulce (30% p/p) con peptona casei (0.5% p/p)	Medio de cultivo fermentado	180	73	6	70
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> A17	Caldo MRS	Aislado de proteína de suero	110	68-70	5.6	69
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	Caldo MRS	Maltodextrina, mucílago de semilla de chía y proteína soluble de semilla de chía (mezcla 7,5:0,6:7,5, ~15 % p/v)	110	75-80	a <sub>w</sub> ~0.24	98

*Lb*: *Lactobacillus*, *Lc*: *Lactococcus*, *S*: *Streptococcus*, *B*: *Bifidobacterium*, *P*: *Propionibacterium*, NR: No Reportado, T<sub>EN</sub> y T<sub>SA</sub>: Temperatura de entrada y salida, respectivamente.

Adaptado de Huang *et al* (2017)

## Encapsulación de microorganismos probióticos

Como ya hemos revisado, algunas de las BAL además de sus usos como cultivos iniciadores y otros usos potenciales en la industria, se han catalogado como probióticos, es decir, microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped. Por lo que se han venido adicionando cada vez más en productos alimentarios. Sin embargo, el mayor problema se presenta durante el proceso y almacenaje e incluso en etapas posteriores a su consumo, esto es, las condiciones gastrointestinales (e.g.: aumento de la temperatura, cambios de pH y aumento de la cantidad de oxígeno, etc.) al momento de ser ingeridos, ya que se reduce la viabilidad. La encapsulación de microorganismos probióticos se ha estudiado con el fin de proteger y mejorar la viabilidad de dichos microorganismos (Krasaekoop *et al.*, 2003).

El secado por aspersion es uno de los métodos más comunes para la microencapsulación de probióticos. Esta técnica permite que los microorganismos queden atrapados dentro del material de encapsulación, lo que lleva a la formación de cápsulas. Diferentes estudios han reportado la efectividad de esta técnica en la microencapsulación de probióticos, incluyendo sobre todo a las BAL (Russo *et al.*, 2022). Como vimos anteriormente en la mayoría de los casos es necesaria la adición de agentes protectores, entre los agentes protectores más relevantes que se han utilizado recientemente, se encuentran los prebióticos, estos son ingredientes alimentarios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de especies bacterianas que ya residen en el colon y así intentar mejorar la salud del huésped. Los prebióticos son a menudo carbohidratos de cadena corta y bajo peso molecular que pueden penetrar fácilmente a través del intestino grueso, específicamente el colon y pueden actuar como sustratos para la población bacteriana endógena del colon. Generalmente, se obtienen a partir de polisacáridos vegetales, por ejemplo, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomaltooligosacáridos (IMO), xilooligosacáridos (XOS), así como los polisacáridos de la pared celular provenientes de diferentes partes de plantas (Ashwini *et al.*, 2019).

Por lo anterior, se busca añadir prebióticos para mejorar la capacidad y la sostenibilidad de los probióticos. Fritzen-Freire *et al.* (2012) evaluaron la viabilidad y

las propiedades físicas de encapsulados de *Bifidobacterium* BB-12 obtenidos mediante secado por aspersion con reemplazo parcial de leche descremada reconstituida (LDR), como agente encapsulante prebiótico, agregaron: inulina, oligofructosa e inulina enriquecida con oligofructosa. Los recuentos de células viables de las microcápsulas se determinaron durante el almacenamiento durante 180 días a 4°C y a -18°C. Todas las cápsulas producidas en este estudio mostraron una alta tasa de supervivencia durante el almacenamiento en ambas temperaturas. La sustitución parcial de LDR por inulina y la sustitución parcial de LDR por inulina enriquecida con oligofructosa aumentaron el recuento inicial de bifidobacterias en las microcápsulas. Por otro lado, las microcápsulas producidas con inulina enriquecida con oligofructosa y las producidas con oligofructosa mostraron una mejor protección para las bifidobacterias durante el almacenamiento. Por otro lado, Russo *et al.* (2022) evaluaron la supervivencia y el mantenimiento de la actividad de feruloil esterasa (FE) durante el almacenamiento a 4°C y en condiciones GI simuladas de cápsulas de cepas de *Lactobacillus* (Lb.) productoras de FE obtenidas mediante secado por aspersion. Las FEs son enzimas hidrolíticas que liberan ácido ferúlico (AF) de sus formas esterificadas presentes de forma natural en vegetales, frutas y cereales, así como de sustratos sintéticos. El AF es un compuesto fenólico con demostradas actividades antioxidantes, hipoglucemiantes e hipolipemiantes. Se ha demostrado que las BAL con actividad FE aumentan la biodisponibilidad de AF en el intestino y mejoran los estados oxidativo y metabólico en ratones por lo que el uso de probióticos con actividad FE se ha propuesto como una alternativa para mejorar la salud en individuos con enfermedades metabólicas. En dicho estudio, se encontró que las cápsulas de *Lb. fermentum* CRL1446 y *Lb. johnsonii* CRL1231 obtenidas mediante secado por aspersion utilizando una mezcla de alginato, inulina y maltodextrina como material de recubrimiento se pueden almacenar en condiciones de refrigeración hasta por 12 meses, manteniendo la viabilidad en niveles adecuados, y conservando la actividad de la FE. Además, estas mismas demostraron ser capaces de resistir condiciones simuladas del tracto GI, retener su actividad FE y conservar su potencial probiótico. Sin embargo, aún se necesita más investigación para determinar si se mantienen viables en condiciones *in vivo*, el efecto de su administración a corto y largo plazo y optimizar las concentraciones de los agentes protectores y encapsulantes utilizados. En la tabla 9 se muestran algunos probióticos encapsulados

mediante secado por aspersión utilizando diferentes agentes encapsulantes y protectores y/o prebióticos.

**Tabla 9. Probióticos encapsulados mediante secado por aspersión**

Producto	Probiótico	Agente encapsulante y/o protector	Condiciones	Observaciones
Jugo de naranja	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 299v y <i>Pediococcus acidilactici</i> HA-6111-2	Lactosa, glucosa y fructosa (para el crecimiento de cultivos)	T <sub>FI</sub> : 25 mL/min T <sub>EN</sub> : 150°C T <sub>SA</sub> : 70°C	Se encontró que el polvo de jugo de naranja con características probióticas tiene una vida útil de 12 meses.
NA	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Leche descremada, almidón y aislado de proteína de suero	T <sub>EN</sub> : 175°C T <sub>SA</sub> : 85°C	El tratamiento térmico antes del secado podría mejorar la resistencia a la digestión gastrointestinal, así como la viabilidad durante el almacenamiento. La funcionalidad celular podría mejorarse mediante el secado por pulverización, pero depende de la tensión.
NA	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Almidón de arroz nativo e inulina	T <sub>FI</sub> : 14g/min T <sub>EN</sub> : 135°C T <sub>SA</sub> : 155°C	Se logró una mayor viabilidad en el almidón de arroz nativo (65 %–74 %) en comparación con la inulina (43 %–54 %).
NA	<i>Bifidobacterium</i> BB-12	Suero dulce y prebióticos (inulina y polidextrosa)	T <sub>EN</sub> : 150°C T <sub>SA</sub> : 50°C	La estabilidad de las microcápsulas se mejoró mediante el uso de prebióticos.
Leche de cabra	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 y <i>Propionibacterium jensenii</i> 702		T <sub>EN</sub> : 195°C T <sub>SA</sub> : 85°C	El recuento viable disminuyó después del secado por aspersión, pero retuvo niveles de viabilidad satisfactorios y durante el almacenamiento.

T<sub>EN</sub> y T<sub>SA</sub>: Temperatura de entrada y salida respectivamente, T<sub>FI</sub> tasa de flujo, NA: no aplica.

Adaptado de Sehwat *et al* (2022)

## Secado en lecho fluidizado

Un lecho fluidizado es un lecho de partículas sólidas con una corriente de aire o gas que sopla hacia arriba a través de las partículas a una velocidad lo suficientemente alta como para ponerlas en movimiento. A medida que el aire viaja a través del lecho de partículas, imparte un comportamiento fluido al lecho y proporciona una mezcla rápida de sólidos. Las partículas se suspenden libremente en la corriente de aire y se deshidratan simultáneamente mediante un rápido intercambio de calor y masa con el aire. Los costos del secado en lecho fluidizado son comparables o ligeramente inferiores a los del secado por aspersión, y el proceso también es viable para la

producción continua a gran escala. El tiempo de secado en lecho fluidizado (de 1 min a 2 h) es más prolongado que el del secado por aspersión, pero la inactivación por calor se puede minimizar y controlar más fácilmente utilizando temperaturas del aire relativamente bajas. Sin embargo, el uso de secadores de lecho fluidizado para muchos tipos de alimentos está limitado debido al tamaño irregular de las partículas y la naturaleza pegajosa de los materiales granulados, lo que puede generar un lecho no homogéneo, partículas aglomeradas y una velocidad de secado reducida. El secado en lecho fluidizado de microorganismos se ha estudiado en levaduras y el proceso se emplea con éxito en la producción de levadura comercial, pero se han realizado unos pocos estudios en cultivos de BAL (Santivarangkna *et al.*, 2007).

Cuando se utiliza un secador de lecho fluido, los probióticos deben mezclarse con portadores o moléculas de matriz a las que puedan adherirse. Estudios recientes mostraron el uso de partículas de caseína, maltodextrina, celulosa, lactosa o NaCl como partículas transportadoras apropiadas. Como los materiales de soporte se agregan junto con las células, deben adaptarse a los alimentos a fermentar; e.g., alginato o leche descremada para leche fermentada, maltodextrina para embutidos fermentados y almidón o harina para pan de masa madre. Por lo general, el material de soporte se lleva primero al secador de lecho fluido y luego la suspensión se rocía sobre los soportes fluidizados usando una boquilla. Alternativamente, el sedimento bacteriano también se puede obtener primero mediante liofilización o secado por aspersión, después de lo cual las partículas se pueden encapsular con una cubierta protectora utilizando un secador de lecho fluido para mejorar la supervivencia. Esta cápsula protectora puede consistir en grasas, proteínas, carbohidratos u otro material de recubrimiento para mejorar la estabilidad y/o viabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Puede verse como una capa adicional alrededor de los probióticos que los protege contra las influencias perjudiciales de la conservación a largo plazo (Broeckx *et al.*, 2016). Al igual que con otras técnicas de secado, la viabilidad se mejora mediante la adición de protectores, el control de los parámetros del proceso y la inducción de respuestas de estrés antes del secado.

## Secado al vacío

El secado al vacío es bien conocido como un proceso adecuado para materiales sensibles al calor. Dado que el secado opera al vacío, se puede eliminar la humedad

de los materiales a baja temperatura. Además, las reacciones de oxidación durante el secado pueden minimizarse para las bacterias del ácido láctico sensibles al oxígeno. El secador de vacío básico consta de una cámara que contiene estantes calientes. Las bandejas que contienen los materiales húmedos se colocan en los estantes y el agua se extrae en una bomba de vacío y se condensa en un condensador. Los estudios sobre el uso de este proceso en cultivos de BAL son raros. Otro inconveniente es su tiempo de secado relativamente largo en comparación con el secado por aspersion o lecho fluidizado (que oscila entre 20 y más de 100 h). Sin embargo, estas desventajas posiblemente se pueden superar mediante el uso de un secador de vacío continuo. Los productos secos casi no se ven afectados por la oxidación y son fáciles de dispersar. Los secadores continuos al vacío ya están disponibles a escala industrial para la fabricación de aditivos alimentarios, enzimas y productos farmacéuticos (Peighambardoust *et al.*, 2011).

Las principales estrategias para proteger los probióticos contra el secado al vacío incluyen la adición de agentes protectores o la alteración de los parámetros del proceso. Hasta donde sabemos, aún no se han publicado estudios sobre el pretratamiento de células con un estrés subletal antes del secado al vacío. Sin embargo, dado que el secado al vacío es similar al secado por congelación, es posible que el pretratamiento de los probióticos antes del proceso de secado pueda mejorar su viabilidad (Broeckx *et al.*, 2016).

En la tabla 10 se muestran de manera resumida el efecto de diferentes tipos de agentes protectores y encapsulantes en el secado por lecho fluido y al vacío de las BAL, como se puede ver aún se necesita optimizar los procesos para ser consideradas una alternativa viable a los métodos de conservación convencionales.

**Tabla 10. Efectos de diferentes agentes protectores y encapsulantes en las BAL durante el secado a diferentes condiciones.**

Método de secado	Cepas	Agentes protectores o vehículos	Condiciones de secado	Viabilidad (%)	Contenido de humedad (%)	Comentarios
Lecho fluido	<i>L. acidophilus</i>	LDP	lecho: 45-50 °C tiempo: 45 min	23.5	$a_w = 0.25$	
	<i>L. casei</i> <i>L. casei</i> ssp. <i>pseudocasei</i> <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. plantarum</i>	0.5 M ribitol, betaína, glicerol; 10% LDP	lecho: 5 °C tiempo: 3 h	(85-100) <i>b</i> (30-85) <i>b</i> (50-95) <i>b</i> (25-95) <i>b</i> (60-90) <i>b</i>	25.4 <i>d</i> 25.4 25.4 25.4 25.4	-las células se inmovilizaron en perlas de gel de alginato antes de suspenderlas en los protectores -HR aire: 55 %
	<i>L. helveticus</i>	0.5 M adonitol, betaína, glicerol; 10% LDP	lecho: 5 °C tiempo: 6 h	3.7-70.7	(11.5-24.2) <i>d</i>	-las células se inmovilizaron en perlas de gel de alginato antes de suspenderlas en los protectores -HR aire: 55 %
	<i>L. oenos</i>	almidón soluble	lecho: 30, 40 °C tiempo: 25-75 min	(1-10) <i>b</i>	9.2-27.6	Viabilidades después del secado reducidas aproximadamente 1-2 ciclos log
	<i>L. plantarum</i>	sacarosa, maltosa, lactosa, trehalosa, glucosa, fructosa, sorbitol	lecho: 30 °C tiempo: 10-240 min	(0.45-0.76) <i>c</i>	9.1 <i>d</i>	Almidón nativo de papá como agente encapsulante
vacío	<i>L. acidophilus</i>	glicerol; solución de sacarosa, $NH_4Cl$ and ácido ascórbico; $CaCO_3$	temp de secado: 40-45 °C vacío: - tiempo: - temp de secado: -2-(-3) °C vacío: - tiempo: -	15.4-30.4 50.0-74.6	5 5	-control =LPD - $CaCO_3$ fue agregado al medio de crecimiento (sin LPD)
	<i>L. acidophilus</i>	trehalosa (20%), trehalosa (20%) y borato (0.1, 0.3 mol/mol t rehalosa)	temp de secado: - vacío: 0.1 mbar tiempo: 4 d	15.9-35.7	-	viabilidades sin agente protector = 18.9%, control industrial = 4.6%

Lecho = temperatura de secado del lecho fluidizado; - = no mencionado. *b* Valores aproximados estimados a partir de los datos en cifras. *c* Proporción de la actividad de fermentación después del secado a la actividad antes del secado. *d* El porcentaje de contenido de humedad en base húmeda se obtuvo a partir del contenido de humedad en base seca. LDP: Leche descremada en polvo.

Adaptado de Santivarangkna *et al.* (2007)

## 7. Colecciones microbianas

Las colecciones de cultivos microbianos, colecciones microbianas (CM), o también conocidos como centros de recursos biológicos (CRB) son entidades cuyo objetivo es el obtener, preservar, clasificar, estudiar y documentar de manera completa y accesible, un acervo de cultivos de microorganismos auténticamente puros, estables y bien clasificados de interés específico, los cuales generan toda una serie de información especializada, de relevancia en diferentes ámbitos como la salud, agricultura, biotecnología, investigación y docencia (UAM-Cuajimalpa, CINVESTAV-IPN, 2023). Por lo anterior, se han establecido requisitos específicos para mantener y garantizar la calidad y difusión de todos estos servicios, dichos requisitos pueden dividirse en cuatro categorías. La primera categoría es la caracterización y la autenticación del cultivo microbiano (a), que tiene el propósito de la identificación de la cepa, así como su preservación. Esto debería garantizar cultivos libres de contaminación, la supervivencia de al menos el 70% de las células y el mantenimiento estable de los microorganismos conservados. La segunda categoría es el establecimiento de protocolos (b), que se centra en la estandarización de los protocolos para la operación de colecciones de cultivo, desde la preservación de diferentes tipos de microorganismos hasta el mantenimiento de equipos especializados. Además, es necesario tener personal capacitado en tecnologías de vanguardia para la preservación, crecimiento e identificación microbiana. La tercera categoría es la difusión (c), que se centra en todos los aspectos relacionados con el logro de un mayor alcance y accesibilidad de la información generada (documentación y catálogos) al público en general. La última categoría son las políticas y estándares (d), que busca el cumplimiento de las leyes, regulaciones y políticas nacionales e internacionales sobre la seguridad, el envío, el intercambio de microorganismos y otros asuntos (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2021).

En la actualidad, la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (FMCC) es la principal organización que coordina las actividades de las CM a nivel mundial. Su objetivo es promover y apoyar el establecimiento y seguimiento de las CM, proporcionando una red de información entre las colecciones afiliadas y los usuarios. La FMCC apoya al Centro Mundial de Datos de Microorganismos (CMDM) para la compilación de datos de recolección de cultivos, gestión, servicios proporcionados e

investigaciones más recientes con una base de datos internacional en línea. Estas CM brindan diferentes servicios, tales como: consultoría, distribución de cepas, identificación de cepas, depósitos de patentes, servicio de almacenamiento y capacitación. La FMCC recomienda que toda colección de cultivos se registre en la base de datos antes de prestar servicios públicos. La FMCC asigna un número de identificación único a cada colección. Además del número FMCC, se incluye información sobre el acrónimo de la colección de cultivos, que normalmente es la abreviatura del nombre de la colección microbiana, por ejemplo, “ATCC” para la “American Type Culture Collection” y “JCM” para “Japan Collection of Microorganisms”. La FMCC asegura que el acrónimo sea único porque el acrónimo junto con un número sistemático asignado a las cepas conservadas en la colección de cultivos proporciona el identificador único para cada cepa conservada, “ATCC 6051” y “JCM 1002”, por ejemplo. Un número de cepa único es crucial para identificar la cepa globalmente, rastrear su uso y extraer la utilización de la cepa a través de varios recursos de datos (Wu *et al*, 2017). Asimismo, la FMCC ha elaborado un catálogo de cepas de referencia de fácil acceso, las cuales son recomendadas para su uso en control de calidad, regulado por diferentes normas ISO (Díaz-Rodríguez *et al*, 2021). Actualmente, la FMCC tiene el registro de 830 colecciones en 78 regiones. Como se puede ver en la tabla 11, América es la tercera región con más cultivos registrados por la FMCC. Por otro lado, en la tabla 12 se muestra que México ocupa el 5° lugar en el número de CM registrados en la región de América. Las CM registradas por la FMCC tienen financiamiento por parte de universidades (351), financiamiento gubernamental (310) y semigubernamental (65), mientras que el resto tienen financiamiento privado (60) e industrial (25). En la tabla 13 se muestran las CM de las que se tiene registro en México. Desafortunadamente no todas ellas cuentan con una fuente de información automatizada que permita conocer su progreso, limitaciones, esfuerzos e iniciativas (Díaz-Rodríguez *et al*, 2021).

**Tabla 11. Número de colecciones registrados en FMCC por continente**

Asia	305
Europa	263
América	209
Oceanía	42
África	22

Datos obtenidos de WDCM (2020)

**Tabla 12. Número de colecciones registradas en América**

País	Colecciones	Cultivos
USA	37	343,835
Brasil	90	137,312
Canadá	20	88,741
Argentina	15	10,283
México	18	9,757

Datos obtenidos de WDCM (2020)

**Tabla 13. Colecciones registradas en México de acuerdo con la FMCC**

Acrónimo	Número	Colección	Ubicación
CDBB	WDCM 500	Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares	CDMX
CENACUMI	WDCM 757	Centro Nacional de Cultivos Microbianos	CDMX
CFQ	WDCM 100	Cepario de la Facultad de Química	CDMX
ENCB-IPN	WDCM 449	Colección de Cultivos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas	CDMX
FLACC	WDCM 584	Free-Living Amoebae Culture Collection	CDMX
IIBM-UNAM	WDCM 48	Industrial Culture Collection	CDMX
INDRE	WDCM 121	Pathogen Fungi and Actinomycetes Collection	CDMX
INIF	WDCM 104	Colección de Microhongos	CDMX
LIH-UNAM	WDCM 817	Culture Collection of Histoplasma capsulatum Strains from the Fungal Immunology Laboratory of the Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, UNAM	CDMX
MCCBGHO	WDCM 971	Banco de Germoplasma de hongos micorrízicos orquideoides	CDMX
CISM	WDCM 95	Verticillium dahliae from cotton	Coahuila
CHE-CNRCB	WDCM 1034	Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico	Colima
ITD	WDCM 99	Colección de Cepas Microbianas	Durango
CBA	WDCM 1047	Colección de microorganismos biorracionales	Guanajuato
CM-CNRG	WDCM 1006	Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos	Jalisco
CAIM	WDCM 813	Collection of Aquatic Important Microorganisms	Sinaloa
IE	WDCM 782	Cepario de Hongos del Instituto de Ecología	Veracruz

Datos obtenidos de WDCM (2020)

## I. Colecciones internacionales

En general, diversos grupos de microorganismos son depositados en las CM para su conservación *ex situ*. Las CM actúan como depósitos que adquieren, autentican, conservan, catalogan, suministran cultivos viables de microorganismos estándar de referencia y brindan servicios relacionados a los institutos de investigación, universidades y colegios. Además, las CM tienen un papel crucial que desempeñar como parte de los depósitos de patentes, brindando servicios confidenciales para la investigación y las industrias. En la mayoría de los casos, los microorganismos reportados en los artículos científicos requieren el envío previo de cultivos a una CM que revalida la autenticidad del cultivo obtenido de los investigadores (Sharma *et al.*, 2017).

A nivel mundial, algunas de las CM adquirieron el estatus de Autoridad Depositaria Internacional (ADI) a efectos de patente en virtud de la regla 13.2(a) de las normas del Tratado de Budapest. Actualmente, en el mundo existen 49 centros de recolección de cultivos, cuya lista y detalles están disponibles en el sitio web de la FMCC. En México solo la Colección de Microorganismos del CNRG (CM-CNRG) tiene el estatus de ADI. Algunas de las CM más conocidas se discutirán más adelante.

### American Type Culture Collection (ATCC)

La colección americana de cultivos tipo (ATCC por sus siglas en inglés) es un CRB independiente, privado y sin fines de lucro y una organización de investigación establecida en 1925. Actualmente ubicada en la ciudad de Manassas, Virginia. La ATCC ha sido un innovador líder en el descubrimiento científico microbiano y un recurso confiable de materiales microbiológicos. Se encargan de adquirir, autenticar, preservar, desarrollar y distribuir materiales biológicos, información, tecnología, propiedad intelectual y estándares para el avance y la aplicación del conocimiento científico. Como principal fuente de materiales de referencia microbianos para la comunidad de investigación científica, aplican los más altos estándares en la producción de materiales de calidad, en los que se puede confiar para obtener resultados reproducibles. Actualmente ofrecen colecciones microbianas de bacterias y arqueas (17000), virus (2900), hongos y levaduras (53000), protozoos, algas, ácidos nucleicos, etc. (ATCC, 2022; Sharma *et al.*, 2017; Smith, 2012).

## Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)

El Instituto Leibniz DSMZ–Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares cuenta con el CRB más diversa del mundo. Ubicado en Braunschweig, Alemania. Todos los materiales biológicos aceptados en la colección DSMZ están sujetos a un amplio control de calidad y caracterización fisiológica y molecular. Además, el instituto DSMZ proporciona una extensa documentación e información de diagnóstico detallada sobre los materiales biológicos. La diversidad sin precedentes y la gestión de calidad de sus biorrecursos convierten a DSMZ en un proveedor de renombre internacional para la ciencia, los laboratorios de diagnóstico, los centros nacionales de referencia y los socios industriales. Los microorganismos y cultivos se recolectan, investigan y archivan en el DSMZ. El DSMZ fue la primera colección registrada en Europa y está certificado según la norma de calidad ISO 9001:2015. Cuenta con estatus de ADI. Cuenta con una colección de 30000 microorganismos, bacterias y arqueas (27000), hongos y levaduras (2700), bacteriofagos (700), etc.

La investigación transectorial del DSMZ se centra en (1) la diversidad microbiana y los mecanismos evolutivos subyacentes (evolución del genoma, genética de poblaciones), (2) métodos mejorados para el acceso y la conservación *ex situ* de la biodiversidad, así como (3) análisis molecular de mecanismos de interacciones biológicas (simbiosis, mecanismos de enfermedad, cáncer). DSMZ mantiene experiencia específica y ofrece asesoramiento en las áreas: (1) taxonomía microbiana, filogenia y descripción de especies, (2) estandarización y garantía de calidad de los recursos biológicos, (3) bioseguridad y biocustodia, y (4) marco legal para la explotación de los recursos biológicos (patentes, convención sobre diversidad biológica, acceso y distribución de beneficios) (Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, 2023; Sharma *et al*, 2017; Smith, 2012).

## Commonwealth Agricultural Bureau International (CABI)

El departamento agrícola de la Commonwealth Internacional (CABI por sus siglas en inglés) es una organización internacional sin fines de lucro que mejora la vida de las personas al proporcionar información y aplicar la experiencia científica para resolver problemas en la agricultura y el medio ambiente. Además del intercambio de

conocimientos y la ciencia, el CABI ayuda a abordar problemas de interés mundial, como mejorar la seguridad alimentaria mundial y salvaguardar el medio ambiente. Lo hacen ayudando a los agricultores a cultivar más y a tener menos pérdidas, combatiendo las amenazas a la agricultura y el medio ambiente de las plagas y enfermedades, protegiendo la biodiversidad de las especies invasoras y mejorando el acceso al conocimiento científico agrícola y ambiental. El CABI tiene 49 países miembros y sus áreas de trabajo son proyectos de desarrollo e investigación, publicaciones científicas y servicios microbianos. Su domicilio social se encuentra en Egham, Inglaterra. El CABI cuenta con una colección de más de 28000 cepas de 142 naciones, es una de las colecciones de recursos genéticos más grandes del mundo. El CABI es miembro de la Red de Centros de Recursos Biológicos del Reino Unido (UKBRCN por sus siglas en inglés), y cuenta con el estatus de ADI (CABI, 2021; Sharma *et al*, 2017; Smith, 2012).

#### China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)

El Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC por sus siglas en inglés) es una organización sin fines de lucro financiada por la Academia de Ciencias de China. Fue fundada en 1979 como la colección de cultivos central en la red cooperativa de varias colecciones en China. Ubicado en Beijing, China el CGMCC ha comenzado tareas como la organización depositaria de China, designada por la Oficina de Patentes de China desde 1985 y ADI bajo las regulaciones del Tratado de Budapest desde 1995. El enfoque principal del CGMCC es preservar, suministrar y mantener recursos microbianos vivos y tiene como objetivo contribuir a las comunidades científicas sirviendo recursos microbianos de alta calidad, útiles para varios campos de investigación. El CGMCC mantenía aproximadamente 40000 cepas a fines de 2013, incluidas arqueas, bacterias, actinomicetos y las levaduras. La información de las cepas disponibles está abierta al público a través de la base de datos del catálogo en línea del CGMCC. Al mismo tiempo, se han depositado en el CGMCC aproximadamente 8700 materiales biológicos con fines de patente.

Para mejorar y expandir la colección continuamente, el CGMCC está explotando nuevos recursos microbianos de varios entornos naturales, describiendo nuevos taxones microbianos y aceptando microorganismos potencialmente útiles de investigadores en los sectores académicos y de aplicación. El CGMCC ha obtenido la

certificación ISO 9001, ISO 14001 y GB/T 28001 para su sistema de gestión de calidad, medio ambiente, seguridad y en la mejora de la calidad de su servicio. Todas las cepas microbianas aceptadas en el CGMCC están sujetas a un amplio control de calidad (China General Microbiological Culture Collection Center, 2023; Sharma *et al*, 2017; Smith, 2012).

### Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

La CECT ofrece material microbiológico de referencia y sus datos asociados; provee servicios relacionados con la conservación, identificación y caracterización de microorganismos; ofrece formación, consultoría y consejo en todos los aspectos relacionados con el manejo y uso de recursos microbianos, incluyendo aspectos legales. Realiza investigación y desarrollo con los recursos microbianos; mantiene altos niveles de funcionamiento siguiendo estándares y recomendaciones internacionales. Adquirió el estatus de ADI en 1991 para fines de patentes según el tratado de Budapest. Se encuentra registrada en la CMDM (número 412) y es miembro del FMCC desde 1977. Actualmente contiene más de 8200 cepas (2015). La CECT dispone del certificado ISO 900 y cumple con las Directrices de Buenas Prácticas para CRBs de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos); está ubicada en las instalaciones del Parque Científico de la Universidad de Valencia. La CECT participa activamente en iniciativas europeas e internacionales trabajando junto con otros CRBs para compartir buenas prácticas y experiencia con el fin de satisfacer la demanda de las comunidades académicas e industriales (Colección Española de Cultivos Tipo, 2022).

## II. Colecciones nacionales

### Colección de Microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG)

El Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), es un centro interdisciplinario de investigación del INIFAP dedicado a la conservación de los recursos genéticos de México.

El principal objetivo de esta colección es conservar la diversidad de microorganismos provenientes de diferentes actividades en las industrias alimentaria, agrícola y pecuaria, así como la prestación de servicios de análisis microbiológicos, depósito y

suministro de cultivos, identificación, entre otros, a diferentes sectores. En esta colección se realiza la preservación a largo plazo de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras, entre otros) mediante liofilización y criopreservación (-80 °C a -196 °C), es la segunda colección en Latinoamérica reconocida como ADI. Cuenta con un total de 600 cepas entre bacterias, hongos filamentosos, levaduras, microalgas (Gobierno de México, 2021).

### Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CDBB)

La Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Cinvestav, es considerada un CRB por la Comisión Nacional para Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Conabio, y reservorio de cultivos microbianos *ex situ* en México y cuyo acervo microbiano está conformado por cepas bacterianas (729), hongos filamentosos (731) y levaduras (509). La Colección es un organismo reconocido a nivel nacional dedicado al mantenimiento, distribución y depósito de cultivos microbianos para actividades de investigación de diferentes instituciones educativas nacionales, que apoyen el desarrollo de actividades científicas, actividades en laboratorios de servicio, centros de enseñanza e industria. En el ámbito internacional, la Colección es reconocida como una autoridad en mantenimiento, depósito y conservación de cepas microbianas puras y un medio para establecer colaboración con colecciones microbianas de diferentes países. Su acrónimo se debe a que anteriormente se conocía como la Colección del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería (UAM-Cuajimalpa y CINVESTAV-IPN, 2016).

## 8. Discusión de resultados

Los microorganismos desempeñan un papel fundamental, de manera indirecta o directa, en la producción de alimentos. Las BAL son microorganismos indispensables para la producción de alimentos fermentados y que requieran algún tipo de tratamiento enzimático (Mahony *et al.*, 2019), aunque están presentes en una variedad de alimentos, la mayoría de investigaciones que se han realizado son sobre sus aplicaciones o el papel que desempeñan en la producción, conservación y descomposición de leche, productos lácteos, carne y productos cárnicos y algunos alimentos vegetales como la masa madre, los estudios más recientes se centran en

el papel que desempeñan en la microbiota intestinal en humanos y animales ya que algunas cepas han demostrado ser probióticos o al menos excelentes candidatos; por otro lado se están explorando nuevas aplicaciones biotecnológicas debido a sus características metabólicas de síntesis y degradación, como por ejemplo; la producción de bacteriocinas, vitaminas, exopolisacáridos, etc.; y su capacidad para degradar compuestos saborizantes indeseables, proteínas y polisacáridos (Wang *et al.*, 2021).

La conservación microbiana en sus inicios buscaba mantener la fisiología y morfología celular, actualmente también busca mantener el material genético de las células (Sharma *et al.*, 2018). Las BAL a diferencia de otros microorganismos no producen estructuras resistentes (esporas) por lo que para su conservación se busca reducir su actividad metabólica al mínimo. Los métodos más efectivos para dicho fin son la criopreservación y la liofilización (Santivarangkna *et al.*, 2007). En la criopreservación los microorganismos se mantienen a temperaturas de congelación o menores, mientras que en la liofilización las células se congelan y el hielo formado después de congelar se remueve por sublimación. Aunque se conozcan los protocolos y parámetros críticos en ambos procesos; el uso de agentes protectores y encapsulantes, los mecanismos del daño por congelación, secado, almacenamiento, descongelación, condiciones de crecimiento y la tolerancia intrínseca de cada cepa siguen siendo objeto de estudio y por tanto áreas de oportunidad para optimizar los procesos ya existentes o bien para la creación de nuevos protocolos (Smith, 2012).

La criopreservación y la liofilización como ya hemos visto, son los métodos más estudiados y utilizados a nivel industrial y para fines de investigación. Sin embargo, la criopreservación tiene la desventaja de requerir temperaturas de transporte o almacenamiento muy bajas, como -20 a -40°C. Además del riesgo de descongelación, los elevados costes de transporte pueden limitar la distribución en zonas o países distantes. Por ello, la liofilización es más cómoda y sencilla, ya que no requiere condiciones de congelación durante la distribución. Sin embargo, es un proceso más largo y caro que otros procesos de secado (Santivarangkna *et al.*, 2007). Por lo que se ha buscado desarrollar métodos que produzcan resultados cuando menos similares a los métodos mencionados anteriormente en términos de viabilidad y estabilidad, pero sin las desventajas de estos.

Durante el secado, las células están expuestas a diversos factores de estrés, como la deshidratación excesiva y el estrés térmico, mecánico, osmótico y oxidativo. El secado por aspersión, parece ser la alternativa más viable, ya que además de ser el método alternativo más estudiado presenta una serie de ventajas: se trata de un proceso rápido y continuo que resulta rentable y relativamente fácil de ampliar. Pero lo más importante es que las características de las partículas pueden controlarse fácilmente, lo que permite fabricar un polvo con las propiedades deseadas, como el contenido de humedad, las propiedades de flujo, la forma y la distribución de tamaños. Sin embargo, el estrés térmico y la deshidratación se consideran las principales causas de la pérdida de viabilidad durante el secado, las altas temperaturas pueden desnaturalizar las proteínas y desestabilizar las membranas, lo que a su vez conduce a la muerte celular. Al mismo tiempo, las temperaturas más elevadas provocan una disminución del  $a_w$  de las muestras secadas, lo que se traduce en una mayor estabilidad de almacenamiento. Por lo tanto, a la hora de elegir los parámetros de secado por aspersión, es importante determinar una temperatura óptima que sea lo suficientemente alta para que las muestras secadas tengan un valor de  $a_w$  bajo y, por otro lado, lo suficientemente baja para evitar el daño celular, por otro lado, durante la deshidratación se limitan las reacciones químicas y la actividad metabólica. Sin embargo, dado que el agua es esencial para la estabilización de diversos componentes de la célula, su eliminación puede provocar una pérdida de la integridad y cambios en la estructura celular y daños en el sistema enzimático (Broeckx *et al*, 2016; Freixo *et al*, 2011; Moreira *et al*, 2021; Kieps y Dembczyński, 2022).

En cuanto al secado por lecho fluido, los costos son comparables o ligeramente inferiores a los del secado por aspersión, el proceso es viable para la producción continua a gran escala y la inactivación térmica puede minimizarse y controlarse más fácilmente utilizando temperaturas del aire relativamente bajas. Sin embargo, el tiempo de secado en lecho fluidizado (de 1 minuto a 2 horas) es mayor que el del secado por aspersión, además, ciertos factores causan pérdidas de viabilidad, principalmente por estrés osmótico, deshidratación excesiva y estrés oxidativo. El estrés osmótico aumenta la concentración del contenido intracelular y reduce el volumen del citoplasma. Se produce una pérdida de turgencia y muerte por lisis celular, lo que, como consecuencia, conduce a una pérdida de viabilidad. El estrés oxidativo está causado por el oxígeno contenido en el aire y disuelto en la suspensión

celular. La tolerancia de las BAL al oxígeno es variada, el estrés oxidativo está causado por partículas reactivas de oxígeno que interactúan con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Como resultado, se produce la desnaturalización de las proteínas y la oxidación de los lípidos, lo que conduce a daños en la membrana y muerte celular; Se cree que la amenaza de choque térmico a las temperaturas utilizadas en el secado de microorganismos en lecho fluidizado es insignificante hasta un nivel de humedad del material del 15% y aumenta a medida que disminuye la  $a_w$  del material secado (Broeckx *et al*, 2016; Kieps y Dembczyński, 2022; Santivarangkna *et al*, 2007). Finalmente, dado que el secado al vacío se aplica para materiales termosensibles, es un proceso más suave en cuanto a los efectos de las altas o bajas temperaturas sobre las células. Además, la falta de oxígeno en el entorno puede reducir el estrés oxidativo, especialmente cuando se secan bacterias sensibles a este. Sin embargo, el estrés por deshidratación se considera el principal factor de pérdida de viabilidad durante este proceso, además de ser un proceso largo (20-100h) y que se produce en lotes. Aunque el secado por aspersión sea un método muy estudiado, el secado por lecho fluido y al vacío continúan siendo métodos poco estudiados ((Broeckx *et al*, 2016; Kieps y Dembczyński, 2022); Santivarangkna *et al*, 2007). Entre las formas de mejorar los procesos más utilizadas se encuentran: la adición de agentes protectores (sacáridos, leche descremada, proteínas del suero, inulina, trehalosa y oligosacáridos, y polímeros e.g: goma arábica), la optimización del tiempo y la temperatura de secado (que generalmente son los más parámetros más importantes que se toman en cuenta para optimizar el proceso), la adaptación de las células a los factores de estrés antes del secado como la exposición a niveles bajos de pH, choque térmico, modificación del medio de cultivo (como la exposición a cloruro sódico y glutamato monosódico, adición de sacáridos), y el uso de células en fase estacionaria que se cree que sobreviven mejor que las de fase logarítmica son las principales estrategias para mejorar la viabilidad de los métodos de conservación alternativos, la efectividad de cada estrategia varía con cada cepa y generalmente se aplican en conjunto, y continúan siendo objeto de estudio y mejora (Kieps y Dembczyński, 2022).

La conservación y las CM surgen al mismo tiempo que la microbiología. Las funciones básicas de estas no han cambiado mucho a lo largo de los años; proporcionan un mecanismo para la conservación *ex situ* de microorganismos, mantienen recursos nacionales que sirven para la investigación y desarrollo; son depósitos de cepas

sujetas a publicación; y llevan a cabo un depósito seguro, confidencial y patentado. Las CM, independientemente de su tamaño, forma u objetivos institucionales, desempeñan un papel fundamental en la microbiología, ya que proporcionan recursos para la investigación, el desarrollo y la innovación. Por lo anterior, la mejora y creación de nuevas colecciones es un factor determinante para el desarrollo de la microbiología y sus áreas relacionadas a corto y largo plazo. Las CM existentes no son suficientes para almacenar la diversidad microbiana existente ni la que falta por descubrir. Sin embargo, es evidente que para mejorar el aprovechamiento es necesario una estrategia común y compartir la carga de trabajo, los recursos y la experiencia entre instituciones. Hay varias cuestiones por resolver; por ejemplo, es necesario cambiar el hecho de que muy pocas de las cepas citadas en la literatura están aseguradas para su uso futuro (Smith, 2012), por lo que el acceso a esas nuevas propiedades, descubrimientos y datos no se encuentra garantizado. En el caso de México, a pesar de que se cuente con CM en diferentes locaciones éstas siguen siendo relativamente pequeñas y lamentablemente la mayoría de ellas no cuentan con una base de datos o información que permita conocer su progreso, limitaciones, esfuerzos e iniciativas, ni tampoco poseen comunicación con otras instituciones o colecciones (González y Jiménez, 2013). Por lo que es evidente que se necesita la cooperación entre diferentes organismos e instituciones, lo que facilitará la investigación, el desarrollo y la docencia en microbiología y sus áreas relacionadas.

## 9. Conclusiones y perspectivas

- Las BAL son un grupo heterogéneo de microorganismos, descritas como bacterias Gram (+), no esporuladas, anaerobias, con forma de bacilo o coco y que producen ácido láctico como principal producto del metabolismo de carbohidratos. *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* son los géneros de mayor importancia en alimentos, nutrición y biotecnología, debido a su papel en la producción de ácidos orgánicos, exopolisacáridos, bacteriocinas, compuestos saborizantes y su efecto probiótico. Se espera que los avances en biotecnología permitan la obtención de cepas con nuevas aplicaciones comerciales.
- La conservación busca mantener la fisiología, morfología y el material genético celular. La criopreservación y la liofilización son los métodos de conservación tradicionales más estudiados y utilizados a nivel industrial y con fines de investigación. Sin embargo, no todas las cepas se adaptan bien a los mismos protocolos y, por tanto, necesitan adecuarse. Esto se logra mediante la modificación de parámetros del proceso (velocidad y temperatura de congelación y descongelación), modificación de las condiciones de crecimiento y la adición de agentes protectores y/o encapsulantes.
- El secado por aspersión es el método alternativo de mayor aplicación y con mejores resultados, mientras que en el caso del secado por lecho fluidizado y al vacío los estudios continúan siendo escasos. Además, existe mucha variación entre estos estudios, en cuanto a condiciones de proceso, crecimiento, agentes protectores, etc. Por lo que es necesario estandarizar y documentar mejor las investigaciones futuras.
- La adición de agentes protectores, la optimización de los parámetros del proceso, la adaptación de las células a los factores de estrés antes del proceso, y el uso de células en fase estacionaria son las estrategias más utilizadas para mejorar la viabilidad de los métodos de conservación alternativos, la efectividad de cada estrategia varía con cada cepa y generalmente se aplican en conjunto, continúan siendo objeto de estudio y de mejora tanto para los métodos de conservación tradicionales como alternativos.

- Las CM sin importar su origen, tamaño u objetivos son fundamentales en el desarrollo de la microbiología y sus áreas relacionadas. A pesar de los esfuerzos, las CM existentes continúan siendo insuficientes para conservar y garantizar el acceso a la diversidad microbiana que se conoce y que falta por descubrir. En el caso de la CM nacionales, estas continúan siendo relativamente pequeñas y no cuentan con una base de datos que permita conocer su progreso, iniciativas y/o catálogo de microorganismos ni tampoco poseen comunicación con otras instituciones o colecciones. Por lo que es necesario la cooperación con otras instituciones y la creación de bases de datos que permitan el acceso a la información. Esto facilitará la investigación, el desarrollo y la docencia de la microbiología y sus áreas relacionadas.

## 10. Bibliografía

Ashwini, A., H. N. Ramya, C. Ramkumar, K. R. Reddy, R. V. Kulkarni, V. Abinaya, S. Naveen, y A. V. Raghu. (2019). Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health: Review. *Journal of Microbiological Methods* 159:128–37.

Ai-Lian Song, A., In, L. L. A., Erin Lim, S. H., y Abdul Rahim, R. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*, 16(April), 15. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s12934-017-0669-x>

ATCC. 2022. *Microbe Products*. [En línea]. Disponible en: <https://www.atcc.org/microbe-products#t=productTab&numberOfResults=24> [último acceso el 11 de febrero de 2023]

Chávez B.E. y Ledebøer A. M. (2007). Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, 25, 1193-1201. <https://doi.org/10.1080/07373930701438576>

Barbosa J. y Teixeira. P. (2016). Development of probiotic fruit juice powders by spray drying: A review. *Food Reviews International*, 33 (4), 335-358. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/87559129.2016.1175016>

Broeckx, G., Vandenneuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S., y Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 303–318. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.ijpharm.2016.04.002>

Bustamante M., Oomah B. D., Rubilar M., y Shene C. (2017). Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. *Food Chemistry*, 216, 97-105. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.foodchem.2016.08.019>

Bustamante M., Villarroel M., Rubilar M., y Shene C. (2015). *Lactobacillus acidophilus* La-05 encapsulated by spray drying: Effect of mucilage and protein from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 62 (2) , 1162-1168 <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.lwt.2015.02.017>

CABI. 2021. *Culture collection: Microorganism supply and deposit*. [En línea]. Disponible en: <https://www.cabi.org/products-and-services/bioscience-services/microorganism-supply-services/> [Último acceso el 11 de marzo de 2023]

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., y Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International dairy journal*, 14(10), 835-847. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.001>

Chang, T., y Zhao, G. (2021). Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced Science*, 8(6),. <https://doi.org/10.1002/advs.202002425>

China General Microbiological Culture Collection Center. *About us*. [En línea]. Disponible en: <https://www.cgmmc.net/english/product> [Último acceso el 11 de marzo de 2023]

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), 2022. Presentación. [En Línea]. Disponible en: <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/cect/presentacion/presentacion-1285964804648.html> [Último acceso en 22 de febrero de 2023].

Cotabarren, I. M., Bertín, D., Razuc, M., Ramírez-Rigo, M. V., y Piña, J. (2018). Modelling of the spray drying process for particle design. *Chemical Engineering Research and Design*, 132, 1091–1104. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.01.012>

Deeth, H.C. y Hartanto, J. (2009). Chemistry of Milk – Role of Constituents in Evaporation and Drying. En: A.Y. Tamime. Eds. *Dairy Powders and Concentrated Products*, <https://doi.org/10.1002/9781444322729.ch1>

Díaz-Rodríguez, A. M., Salcedo Gastelum, L. A., Félix Pablos, C. M., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., Puente, M. L. y de los Santos-Villalobos, S. (2021). The Current and Future Role of Microbial Culture Collections in Food Security Worldwide. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4. <https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fsufs.2020.614739>

Freixo R., Teixeira P., Silva J. y Gibbs P. (2011). Spray-drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 321–335.

Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N. y Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of Bifidobacteria by Spray Drying in the Presence of Prebiotics. *Food Research International*, 45, 306–312. DOI: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.foodres.2011.09.020>.

Ghandi, A., Powell, I. B., Chen, X. D., y Adhikari, B. (2012). The effect of dryer inlet and outlet air temperatures and protectant solids on the survival of *Lactococcus lactis* during spray drying. *Drying Technology*, 30(14), 1649–1657. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.703743>

Gobierno de México. 2021. [En línea]. Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) REPORTE ANUAL DE ACTIVIDADES 2021. Disponible en: <https://www.gob.mx/inifap/acciones-y-programas/centro-nacional-de-recursos-geneticos-cnrg> [Último acceso el 11 de marzo de 2023]

González, D. M., y Jiménez, J. N. (2013). Colecciones microbianas: Importancia, establecimiento y regulación. *Hechos Microbiológicos*, 4(1), 23-33. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.20093>

Graham, K., Stack, H., y Rea, R. (2020). Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications - a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 60(22), 3836–3861. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/10408398.2019.1709800>

Huang, S., Vignolles, M.-L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., y Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 1–17. <https://doi->

[org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.tifs.2017.02.007](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007)

Ibrahim, F. y Ouwehand, A. C. (2019). The Genus *Lactobacillus*. **En:** A. von Wright, G. Vinderola, A. Ouwehand, y S. Salminen. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5° ed.). Taylor & Francis Group, 4.

Kieps, J., y Dembczyński, R. (2022). Current trends in the production of probiotic formulations. *Foods*, 11(15), 2330. <https://doi.org/10.3390/foods11152330>

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)

Lauková, A. (2019). Probiotic *Enterococci*, Their Enterocins and Their Use in Animals. **En:** A. von Wright, G. Vinderola, A. Ouwehand, & S. Salminen. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5° ed.). Taylor & Francis Group, 8.

Leibniz Institute DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. 2023. *Catalogue*. [En línea]. Disponible en: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue> [Último acceso el 17 de marzo de 2023]

Lian, W. C., Hsiao, H. C., y Chou, C. C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 79-86. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00733-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00733-4)

Liu, W., Chen, X. D., y Selomulya, C. (2015). On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*, 22, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2015.04.001>

Liu, W., Pang, H., Zhang, H., y Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. **En:** H. Zhang y Y. Cai. Eds. *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Dordrecht, 103-203. [https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-017-8841-0\\_2](https://doi.org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-017-8841-0_2)

Mahony, J., McAuliffe, O., Cotter, P.D. y Fitzgerald, G.F. (2019). Starter Cultures. **En:** M.P. Doyle, F. Diez-Gonzalez y C. Hill. Eds. *Food Microbiology: Fundamentals And Frontiers*, ASM Press, 787-813. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch30>

Martins, E., Cnossen, D. C., Silva, C. R. J., Vakarelova, M., y Carvalho, A. F. (2019). Short communication: Effect of lactose on the spray drying of *Lactococcus lactis* in dairy matrices. *Journal of Dairy Science*, 102(11), 9763–9766. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16939>

Moreira, M. T. C., Martins, E., Perrone, A. T., Freitas, R., Queiroz, L. S., y Carvalho, A. F. (2021). Challenges associated with spray drying of lactic acid bacteria: understanding cell viability loss. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 20(4), 3267–3283. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/1541-4337.12774>

Leverrier P., Vissers J.P.C., Rouault A., Boyaval P., y Jan G. (2004). Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in *Propionibacterium freudenreichii*. *Archives of Microbiology*, 181 (3), 215-230. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s00203-003-0646-0>

Peighambardoust, S. H., Tafti, A. G., y Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 22(5), 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009>

Porto, M. C. W., Kuniyoshi, T. M., Azevedo, P. O. S., Vitolo, M., y Oliveira, R. P. S. (2017). *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35(3), 361–374. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>

Prakash, O., Nimonkar, Y., y Shouche, Y. S. (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS Microbiology Letters*, 339(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12034>

S. Huang, H. Rabah, J. Jardin, V. Briard-Bion, S. Parayre, M.-B. Maillard, y G. Jan. (2016). Hyperconcentrated sweet whey: A new culture medium that enhances *Propionibacterium freudenreichii* stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (15), 4641-4651. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/AEM.00748-16>

Säde, E. y Björkroth, J. (2019). Introduction to the Genera *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, and *Carnobacterium*. **En:** A. von Wright, G. Vinderola, A. Ouwehand, & S. Salminen. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5° ed.). Taylor & Francis Group, 6.

Santivarangkna, C., Kulozik, U., y Foerst, P. (2007). Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. *Biotechnology progress*, 23(2), 302-215. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1021/bp060268f>

Santivarangkna, C., Kulozik, U., y Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>

Sehrawat, R., Abdullah, S., Khatri, P., Kumar, L., Kumar, A., y Mujumdar, A. S. (2022). Role of drying technology in probiotic encapsulation and impact on food safety. *Drying Technology*, 40(8), 1562-1581–1581. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1080/07373937.2022.2044844>

Sharma, R., Nimonkar, Y., Sharma, A., Rathore, R.S., y Prakash, O. (2018). Concept of Microbial Preservation: Past, Present and Future. **En:** S. Sharma, y A. Varma. Eds. *Microbial Resource Conservation. Soil Biology*, 54. Springer, Cham, 35-54. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_2)

Sharma, S.K., Kumar, R., Vaishnav, A., Sharma, P.K., Singh, U.B., y Sharma, A.K. (2017). Microbial Cultures: Maintenance, Preservation and Registration. **En:** Varma, A., Sharma, A. Eds. *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Springer, Cham. 335-367. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4\\_22](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_22)

Singh, S.K., y Baghela, A. (2017). Cryopreservation of Microorganisms. **En:** A. Varma y A. Sharma. Eds. *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Springer, Cham, 321-333. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4_21)

Smith, D. (2012). Culture collections. **En** S. Sariaslani y G. M. Gadd. Eds. *Advances in applied microbiology*, vol 79. Academic Press, 73-118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8>

Steinkraus, K. H. (2002). Fermentations in world food processing. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 1(1), 23-32. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2002.tb00004.x>

Sun, Z., Yu, J., Dan, T., Zhang, W., y Zhang, H. (2014). Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. **En:** H. Zhang y Y. Cai. Eds. *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Dordrecht, 1-101. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-017-8841-0\\_1](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-017-8841-0_1)

Tagg, J. R., Wescombe, P. A., Hale, J. D. F. y Burton, J. P. (2019). *Streptococcus*. **En:** A. von Wright, G. Vinderola, A. Ouwehand, & S. Salminen. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5° ed.). Taylor & Francis Group, 7.

Tran, T. T. H., Jaskulski, M., y Tsotsas, E. (2017). Reduction of a model for single droplet drying and application to CFD of skim milk spray drying. *Drying Technology*, 35(13), 1571–1583. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1263204>

UAM-Cuajimalpa y CINVESTAV-IPN, 2016. *Colección de Cultivos Microbianos. Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares*. [En línea]. Disponible en: <http://cdbb.cinvestav.mx/cdbb/index.html> [Último acceso el 22 de febrero de 2023].

Van Hop, D. (2018). Establishment and Management of Culture Collections of Microorganisms (mBRC): An Overview. **En:** S. Sharma y A. Varma, A. Eds. *Microbial Resource Conservation. Soil Biology*, vol 54. Springer, Cham, 55-109. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96971-8_3)

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J. 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>

Wei, Y., Woo, M. W., Selomulya, C., Wu, W. D., Xiao, J., y Chen, X. D. (2019). Numerical simulation of mono-disperse droplet spray dryer under the influence of nozzle motion. *Powder Technology*, 355, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.07.017>

World Data Center for Microorganism (WDCM), Word Federation for Culture Collection. 2020. *Statics*. [En línea]. Disponible en: <https://ccinfo.wdcm.org/statistics> [Último acceso el 22 de febrero de 2023]

Wright, A. (2019). Genus *Lactococcus*. **En:** A. von Wright, G. Vinderola, A. Ouwehand, y S. Salminen. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5° ed.). Taylor & Francis Group, 3.

Wright, A. y Axelsson, L. (2019). Lactic Acid Bacteria An Introduction. **En:** A. von Wright, G. Vinderola, A. Ouwehand, & S. Salminen. Eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (5° ed.). Taylor & Francis Group, 1.

Wu, L., Sun, Q., Desmeth, P., Sugawara, H., Xu, Z., McCluskey, K., y Ma, J. (2017). World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and

utilize preserved microbial strains worldwide. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), 611-D618. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw903>

Xiao, J., Zhang, Y., Yang, Z. (2014). Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. **En:** H. Zhang y Y. Cai (eds) *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Dordrecht, 303 -374. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-017-8841-0\\_5](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/978-94-017-8841-0_5)

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., ... y Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>