



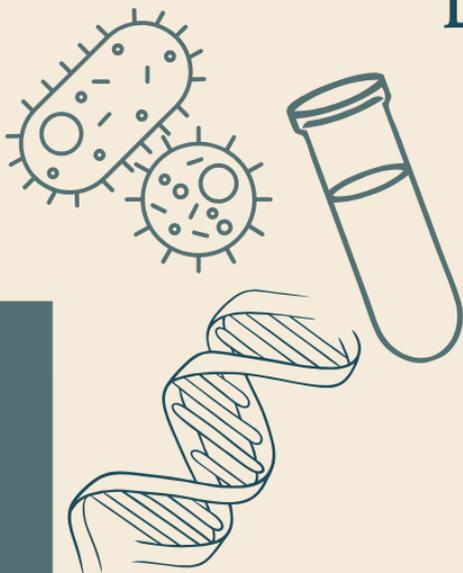
UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

---

TRABAJO FINAL

LABORATORIO DE  
PROCESOS  
BIOTECNOLÓGICOS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
LIC. EN BIOTECNOLOGÍA Y  
BIOLOGÍA MOLECULAR



PRESENTA  
GONZALO GUARAGLIA

DIRECTOR: DR. PABLO F. PÉREZ  
CO-DIRECTORA: DRA. JESSICA MINNAARD

BUENOS AIRES, LA PLATA, DICIEMBRE 2024

---

**“CULTIVO DE BIFIDOBACTERIAS PROBIÓTICAS EN  
MEDIOS ALTERNATIVOS Y SECADO POR  
CONVECCIÓN.”**

---

## Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>4</b>
1.1.    Objetivos específicos.....	10
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>11</b>
2.1.    Cepas de <i>Bifidobacterium</i> .....	11
2.2.    Cepa de <i>Bacillus cereus</i> .....	12
2.2.1.    Protocolo de obtención de esporos.....	12
2.2.2.    Recuento de esporos.....	13
2.3.    Cinética de crecimiento: MRS Biokar vs MRS Neogen.....	13
2.4.    Medios de cultivo alternativos.....	15
2.5.    Evaluación de crecimiento en medios alternativos.....	16
2.6.    Secado de la cepas por convección.....	16
2.7.    Co-incubación <i>Bifidobacterium</i> - <i>B.cereus</i> .....	17
2.8.    Análisis estadístico.....	17
<b>3. Resultados y discusión.....</b>	<b>18</b>
<b>4. Conclusión.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>33</b>

---

## **1. Introducción**

Los microorganismos probióticos son organismos vivos los cuales administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico al consumidor. Dentro de éstos, las bacterias ácido lácticas y las levaduras no patógenas son las más utilizadas. Dentro de los mecanismos de acción descritos para los probióticos se incluye la regulación de la homeostasis microbiana intestinal, la adhesión al epitelio intestinal y la interferencia con patógenos impidiendo su colonización e infección a la mucosa, la modulación de la respuesta inmune tanto local como sistémica, la estabilización y mantenimiento de la función de la barrera gastrointestinal, la inhibición de enzimas procarcinogénicas y la inducción de actividades enzimáticas que favorecen a la nutrición. En la Figura 1 se muestra un esquema general de los mecanismos. Las bacterias muertas y ciertos componentes moleculares bacterianos también pueden generar una respuesta probiótica al ejercer un efecto antibacteriano, antiinflamatorio e inmunomodulador, entre otros<sup>1,2</sup>.

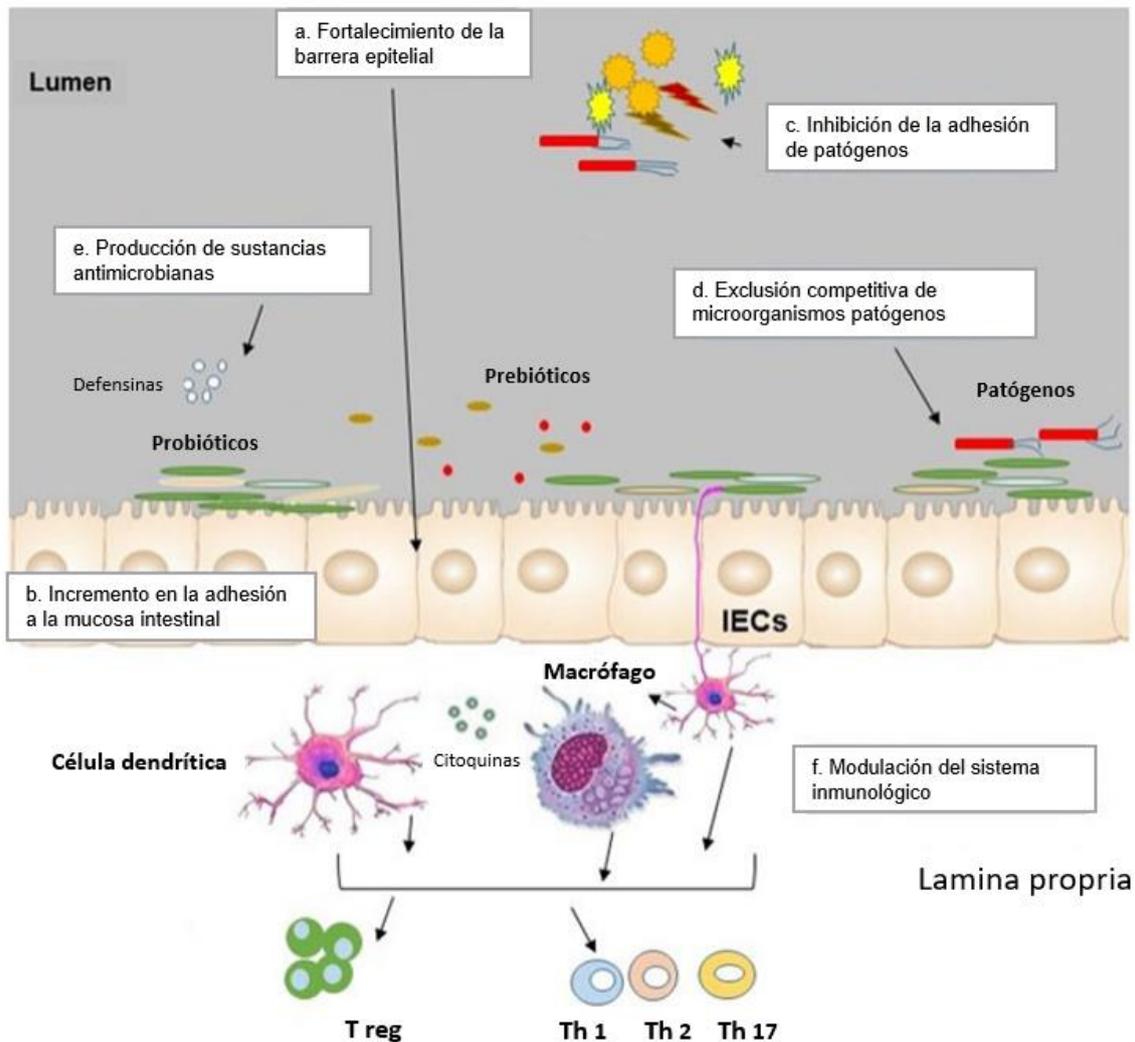


Figura 1. Mecanismos de acción de los probióticos. Figura adaptada de Yousefi *et al*, 2018<sup>2</sup>.

El uso de microorganismos probióticos tiene una extensa trayectoria en la historia de la humanidad como ingredientes de alimentos, suplementos nutricionales o medicamentos<sup>3</sup>. La evidencia clínica de la cual se dispone en la actualidad demuestra los efectos benéficos de los microorganismos probióticos para prevenir y/o tratar enfermedades gastrointestinales, alérgicas, cardiovasculares y metabólicas<sup>3-5</sup>, y se ha demostrado que agentes causantes de ETAs (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica var. Enteritidis* y *Bacillus cereus* son antagonizados por cepas probióticas<sup>6-9</sup>. *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (incluyendo los nuevos géneros definidos recientemente<sup>10</sup>) son los más usados en la formulación de productos a base de probióticos, destacándose por su

---

funcionalidad lo que da lugar a propiedades benéficas respaldadas por una nutrida bibliografía científica.

El estudio de cepas para formular alimentos funcionales requiere abordar numerosos aspectos, durante muchos años de investigación, con el fin de detectar las cepas con propiedades adecuadas para diferentes aplicaciones. Estas propiedades no son patrimonio de grupos amplios de bacterias, sino que están localizadas en especies y más aún en cepas determinadas, que se destacan por poseer mayor actividad que el resto<sup>11</sup>.

Conocidas las características probióticas de las cepas, muchas de las cuales son promisorias, resulta imprescindible la realización de ensayos con las bacterias incluidas en una preparación acorde con un potencial futuro producto que permita la aplicación de las cepas para consumo humano y/o animal. Esto implica encontrar formulaciones con características funcionales y de conservación compatibles con aspectos tecnológicos y de distribución de un alimento o aditivo alimentario. En este contexto, y teniendo como misión el escalado de la obtención de las cepas en una preparación (polvo, por ejemplo), es necesario encontrar un medio de cultivo con una relación adecuada costo/beneficio (el medio MRS usado en investigación posee un alto costo) para obtener la biomasa necesaria, y procesos de deshidratación de las cepas que permitan el apropiado mantenimiento de las propiedades probióticas.

Los productos alimenticios funcionales que contienen probióticos viables se han vuelto cada vez más populares, lo que ha incrementado la demanda de ingredientes probióticos que mantengan su viabilidad y estabilidad durante el procesamiento, el almacenamiento y la digestión gastrointestinal. Esto ha llevado a un aumento significativo en la investigación y desarrollo de probióticos deshidratados.

Las bacterias probióticas son susceptibles a diversos factores de estrés ambiental durante el procesamiento de alimentos, el almacenamiento y luego de la ingestión, lo que hace necesario el uso de materiales y procesos adicionales para preservar su actividad y garantizar su llegada en forma activa al sitio de acción.

---

Tanto la formulación como la tecnología de secado pueden influir en las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de los probióticos, por lo que es necesario analizar diversos métodos de secado térmicos y no térmicos evaluando su eficiencia en la preparación, como así también distintos componentes protectores que también favorezcan el proceso<sup>12</sup>.

En relación a la obtención de cepas deshidratadas, la liofilización y el secado en spray son los métodos más utilizados ya que han demostrado su eficacia para un gran número de cepas disponibles hoy en el mercado<sup>13-15</sup>. El secado en spray es usado en gran medida dado que permite obtener productos a un costo competitivo y con una adecuada vida útil<sup>16-18</sup>. Teniendo en cuenta diferentes escalas de producción, es importante considerar que ambos métodos requieren de un equipamiento costoso que no es accesible para todos los sectores interesados en la cadena de producción de alimentos, como emprendedores o pymes, por ejemplo.

Teniendo en cuenta lo descrito, el secado por convección forzada constituye una alternativa muy atractiva ya que se realiza en un horno (o deshidratador)<sup>19</sup>, un equipamiento de menor costo que los mencionados anteriormente y que, además, dada la versatilidad en su uso, suele estar disponible con mayor probabilidad en diferentes ámbitos productivos.

La bibliografía da cuenta de antecedentes del uso de este tipo de secado para microorganismos probióticos incluidos en alimentos<sup>19,20</sup>, pero no se ha indagado la posibilidad de deshidratar las cepas individuales para obtener polvos que permitan su uso posterior en un producto, o como aditivos. La exploración de esta alternativa de deshidratación permitirá la obtención de un polvo de manera más económica para escalas de producción más pequeñas, dando así la oportunidad de uso a otros productores.

En referencia a *Bifidobacterium*, es un género conformado por bacterias gram positivas, anaerobias estrictas, pertenecientes al *filum* Actinomycetota. Las mismas forman parte de la microbiota intestinal de humanos, donde predominan en infantes especialmente

---

en lactantes, mientras que en adultos los niveles son menores pero relativamente estables. La presencia de las diferentes especies cambia con la edad, donde *Bifidobacterium longum*, *B. breve* y *B. bifidum* predominan en la niñez mientras que *B. catenulatum*, *B. adolescentis* como así también *B. longum* prevalecen en la adultez<sup>21</sup>.

Como ya se ha mencionado respecto a los probióticos, las bifidobacterias han sido asociadas con la producción de un gran número de metabolitos de impacto positivo en la salud del huésped, como pueden ser ácidos grasos de cadena corta, ácido linoleico y bacteriocinas<sup>21</sup>.

Estos microorganismos presentan elevados requerimientos nutricionales que implican el uso de factores promotores del crecimiento<sup>22,23</sup>. El medio de cultivo mayormente utilizado es el MRS (Man, Rogosa, Sharpe), pero se encuentran en bibliografía otros medios basados en sustratos naturales como tomate o jugo de naranja, u otros medios de cultivos comerciales suplementados con diferentes factores, siendo el crecimiento dependiente de la cepa evaluada<sup>20,22,24</sup>. El permeado de suero, un subproducto de la industria láctea luego de la ultrafiltración para concentrar las proteínas<sup>22</sup>, es utilizado para el crecimiento de bacterias ácido lácticas dado que posee una alta concentración de lactosa<sup>22,25-27</sup>.

Las cepas *B. bifidum* CIDCA 5310 y *B. adolescentis* CIDCA 5317 fueron aisladas en el grupo de Microbiología del CIDCA a partir de heces de lactantes<sup>28</sup>. La selección de las mismas por su potencial probiótico se ha logrado luego de estudiar las propiedades superficiales y los mecanismos implicados, a partir de las interacciones de estos microorganismos y el hospedador a nivel intestinal<sup>28-34</sup>. Estudios recientes de estas cepas con acenocumarol (anticoagulante oral) demuestran un efecto bidireccional que influye en la concentración del medicamento y las propiedades inmunomoduladoras de las bifidobacterias<sup>35,36</sup>. En relación a microorganismos patógenos, particularmente microorganismos esporulados, ambas cepas han demostrado efecto antagónico sobre *Clostridoides difficile*<sup>37,38</sup> y capacidad de cambiar el ciclo biológico de la cepa *B. cereus* B10502, alterando la capacidad de germinación-esporulación (datos del grupo aún no publicados).

---

*Bacillus cereus* es un agente causante de infecciones tanto gastrointestinales como no gastrointestinales (las cuales son menos frecuentes pero suelen ocurrir en pacientes cuyo sistema inmune se encuentra debilitado)<sup>39</sup>. Este microorganismo es ubicuo en el medio ambiente y puede contaminar fácilmente cualquier sistema de producción o procesamiento de alimentos. Diferentes tipos de productos alimenticios pueden ser contaminados con *B.cereus* tanto en su forma vegetativa como esporulada, entre ellos pasta y arroz los cuales están asociados principalmente a una intoxicación emética (vómitos y náuseas severas), mientras que alimentos como productos lácteos, vegetales y carnes se relacionan con una intoxicación la cual deriva en diarreas<sup>40</sup>.

Mediante la formación de esporas, *B.cereus* es capaz de sobrevivir a procesos como la pasteurización, el calentamiento y son resistentes a la irradiación con rayos gamma, la cual es utilizada para reducir patógenos en alimentos. Los potenciales factores de virulencia de *B.cereus* incluyen enterotoxinas, toxina emética (cereulida), hemolisinas, fosfolipasa C, así como también diversas enzimas como beta-lactamasas, proteasas y colagenasas<sup>41</sup>.

El interés en *B. cereus* ha crecido recientemente debido a que las enfermedades relacionadas con este microorganismo, en particular las intoxicaciones alimentarias, parecen estar aumentando en incidencia<sup>42</sup>.

En relación a la cepa *B. cereus* B10502 es importante destacar que la misma estuvo implicada en un brote de intoxicación alimentaria en la región<sup>43,44</sup>.

Para lograr avanzar hacia el desarrollo de un posible producto que contenga las cepas probióticas mencionadas anteriormente, es necesario desafiar las mismas a diferentes procesos tecnológicos y lograr modos de obtención de biomasa con alto rendimiento, así como simplificar el ciclo de producción para promover el acceso a todos los productores de alimentos.

---

En este contexto el presente trabajo propone como **objetivo general** evaluar medios alternativos para el crecimiento de las bifidobacterias y determinar las condiciones de secado por convección forzada, así como sus propiedades probióticas.

### **1.1 Objetivos específicos:**

1. Evaluar el crecimiento de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 en medios formulados a base de permeado de suero.
2. Secar las cepas obtenidas utilizando diferentes termoprotectores y condiciones de funcionamiento del deshidratador con convección forzada.
3. Determinar la funcionalidad *in vitro* de las bacterias frente a esporas de *B. cereus* B10502.

---

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Cepas de *Bifidobacterium***

Se utilizaron las cepas *Bifidobacterium bifidum* CIDCA 5310 y *Bifidobacterium adolescentis* CIDCA 5317, las cuales pertenecen a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología en Alimentos (CIDCA) y la Cátedra de Microbiología General (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

#### **Preparación de los cultivos a utilizar:**

1. Se tomaron 100 µl del criovial conservado a -80 °C y se inocularon en un tubo de vidrio de 10 ml de caldo MRS (Man, Rogosa, Sharpe) (BIOKAR, Biokar Diagnostics, Beauvais, France), junto con 100 µl de cisteína 5% p/v. A partir de aquí, siempre que se mencione MRS (sea caldo o agar) este será suplementado con cisteína al 0,05 % p/v.
2. Se agitó en vortex y se dejó 48 h dentro de la jarra de anaerobiosis (Oxoid™ AnaeroJar™ de 2,5 l) a 37 °C. Para la generación del ambiente anaeróbico se utilizó virulana humedecida con una solución de SO<sub>4</sub>Cu\* a pH=2, y la generación de CO<sub>2</sub> a partir de HCO<sub>2</sub>Na (1 g), ácido cítrico (0,7 g) y H<sub>2</sub>O.
3. Luego de las 48 h se realizó una tinción de Gram (Figura 2).
4. Se agitó en vortex y se repicó 100 µl del cultivo crecido 48 h a nuevo medio MRS.
5. Se dejó creciendo durante 24 h nuevamente en jarra de anaerobiosis en las condiciones antes descritas. Se realizó tinción de Gram pasadas las 24 h.

\* Solución para anaerobiosis: 7,5 g/l SO<sub>4</sub>Cu.5H<sub>2</sub>O, 2,5 g/l Tween 80, 0,5ml/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

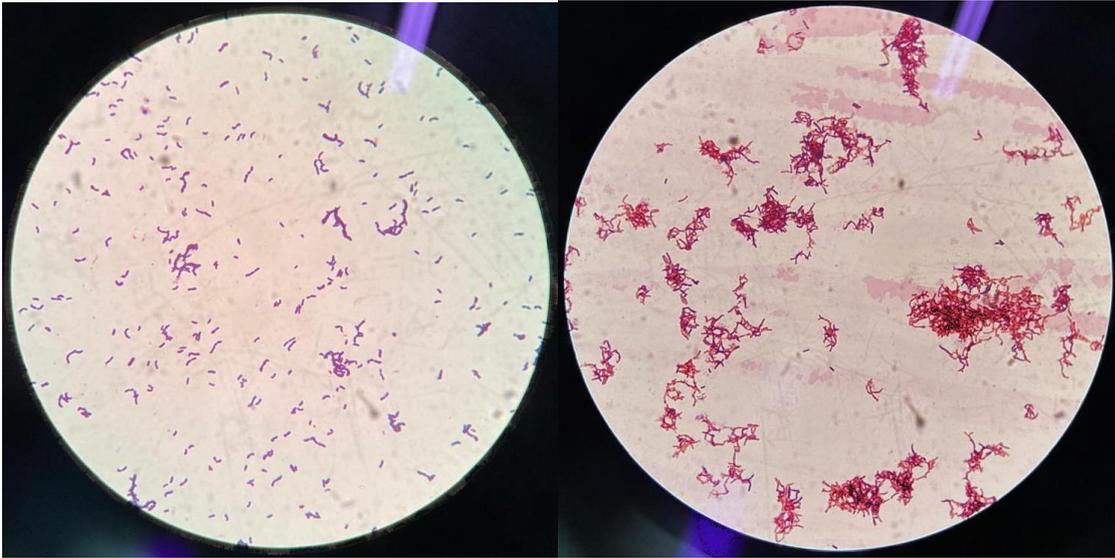


Figura 2. Microscopía óptica de las cepas CIDCA 5317 (izquierda) y CIDCA 5310 (derecha). Coloración de Gram (1000X).

## **2.2 Cepa de *Bacillus cereus***

Se utilizó la cepa *B.cereus* B10502 la cual ha sido aislada de un alimento implicado en una intoxicación alimentaria en la región, como se mencionó anteriormente.

La misma se reactivó en caldo BHI (BIOKAR, Biokar Diagnostics, Beauvais, France) a 32 °C en agitación durante 24 h desde el stock a -80 °C.

### **2.2.1 Protocolo para la obtención de esporos de *B.cereus*:**

1. Se reactivó la cepa en caldo BHI como se describió anteriormente.
2. Se inocularon 700 µl en botellas rectangulares de poliestireno (botellas de cultivo de células de 75 cm<sup>2</sup>) las cuales contenían 25 ml de agar nutritivo suplementado con MnSO<sub>4</sub> (20 mg/l). Se incubaron las botellas durante 14 días a 37 °C.
3. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se colectaron los esporos de la superficie del agar usando PBS y un rastrillo descartable.
  - a. Se centrifugó la suspensión de esporos a 7000g - 5 min.
  - b. Se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril, centrifugando entre cada uno en las condiciones especificadas en 3a.
  - c. Finalmente los esporos se suspendieron con agua destilada estéril en el mismo volumen de pellet obtenido.

- 
- d. Se fraccionó en alícuotas de 1 ml por eppendorf que se conservaron a -80 °C hasta su uso.

**PBS:** NaCl 9 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,144 g/l

### 2.2.2 Recuento de esporos

Se evaluaron microorganismos viables totales y termorresistentes (80 °C, 5 min).

1. Se realizaron diluciones seriadas en PBS de los esporos obtenidos partiendo del stock a -80 °C, habiendo asumido un rendimiento del orden de 10<sup>8</sup> ufc/ml de esporos.
2. Se realizó el recuento en placa de agar nutritivo depositando 10 µl de cada dilución en un extremo de la placa para posteriormente inclinar la misma de manera que la gota deslice para cubrir la mayor superficie posible.
3. Se incubaron las placas de Petri durante 16 h a 37 °C.
4. Se realizó el recuento de colonias.

### 2.3 Cinética de crecimiento: MRS Biokar vs MRS Neogen.

A partir de cultivos de 24 h de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 crecidas en las condiciones descritas en 2.1, se realizaron curvas de crecimiento:

1. Se inocularon tubos de 10 ml al 1% v/v de cada cepa en caldo MRS de ambas marcas, Biokar y Neogen.
2. Se ensayaron 4 puntos de la curva: 0 h, 7 h, 15 h y 24 h, donde de estudios previos sabemos que llegando a las 15 h el cultivo ya se encuentra en una fase estacionaria de crecimiento.
3. Se realizó el recuento en microgota de cada punto en el agar-MRS correspondiente (Biokar o Neogen).
4. Se incubaron las placas de Petri en cajas en condiciones de anaerobiosis (AnaeroPack™ anaerobic system, Mitsubishi Gas Chemical America, Inc.) durante 48 h a 37 °C para luego realizar el recuento de colonias.

---

A continuación se detalla la composición de cada medio:

Caldo MRS Biokar (composición en g/L):

Peptona	20,0
Extracto de levadura	5,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,0
Tween 80	1,08
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05

Caldo MRS Neogen (composición en g/L):

Peptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Extracto de carne	10,0
Glucosa	20,0
Fosfato dipotásico	2,0
Tween 80	1,08
Acetato de sodio	5,0
Citrato de amonio	2,0
Sulfato de magnesio	0,20
Sulfato de manganeso	0,05

---

## **2.4 Medios alternativos**

Se formularon los siguientes medios de cultivo para evaluar el crecimiento de las bifidobacterias en comparación al medio MRS.

A continuación se detallan la composición de cada uno:

### Medio A (composición en gramos):

Permeado de suero	20,0
Extracto de levadura	0,50
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	0,10
Clorhidrato de cisteína	0,05
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,02
Agua destilada csp	100 ml

### Medio B (composición en gramos):

Permeado de suero	20,0
Extracto de levadura	0,50
Sulfato de manganeso	0,05
Clorhidrato de cisteína	0,05
Puré de tomate	5,00
Agua destilada csp	100 ml

### Medio C (composición en gramos):

Permeado de suero	20,0
Triptona	0,50
Peptona de soja	0,50

---

Glucosa	0,50
Extracto de levadura	0,25
Tween 80	0,10
Clorhidrato de cisteína	0,05
Agua destilada csp	100 ml

### **2.5 Evaluación del crecimiento en medios alternativos**

1. Se partió de cultivos de ambas cepas de *Bifidobacterium* crecidas 24 h como se describió en la sección 2.1.
2. Se incubaron tubos de 10 ml de los medios alternativos y MRS Biokar (usado como control) al 1 % en anaerobiosis durante 24 h.
3. Se realizó el recuento en placa de agar MRS que se incubaron en anaerobiosis durante 48 h a 37°C para luego evaluar la cantidad de colonias.

### **2.6 Secado de las cepas por convección.**

Se partió de cultivos de ambas cepas (CIDCA 5310 y CIDCA 5317) crecidas en caldo MRS Biokar y en el medio alternativo seleccionado (según los resultados obtenidos en 2.5) durante 24 h a 37°C en anaerobiosis como ha sido descrito previamente.

1. Se centrifugó el cultivo durante 15' a 2900 rpm.
2. Se lavó dos veces el pellet obtenido con 1 ml de buffer PBS y se suspendió en el mismo volumen del buffer.
3. Se dispuso la suspensión en un soporte apropiado (placas de Petri de 75 mm de diámetro o placa de poliestireno de 12 pocillos) con previo agregado de termoprotector en una relación 1:1 (0,5 g termoprotector + 0,5 ml suspensión). Como termoprotectores se utilizaron leche en polvo (La Serenísima, descremada, 1% grasa), maltodextrina (Parafarm, Droguería Saporiti) o una combinación de ambos.

- 
4. Se procedió al secado en un deshidratador (Cobo, Modelo FA-10T) durante 1 o 2 h a 55°C.
  5. Se suspendió el polvo obtenido en buffer PBS.
  6. Se evaluó la viabilidad de las cepas mediante recuento en placa luego de transcurrido el tiempo de tratamiento, comparando con el recuento inicial.

### **2.7 Ensayo de funcionalidad *in vitro*.**

Se partió de ambas cepas de bifidobacterias crecidas tanto en caldo MRS Biokar como en el medio alternativo seleccionado durante 24 h a 37 °C en anaerobiosis.

1. A partir de la suspensión de esporos obtenida según lo descrito en la sección 2.2.1 se realizó una dilución 1/100 en buffer PBS.
2. Los cultivos de las bifidobacterias en ambos medios también se diluyeron en buffer PBS para obtener suspensiones de 10<sup>6</sup> UFC/ml.
3. Se inocularon 100 µl en 10 ml de caldo BHI, tanto de la dilución de esporos como de bifidobacterias.
4. Se incubaron los tubos durante 24 h a 37 °C en anaerobiosis.
5. Una fracción del cultivo se trató térmicamente a 80 °C durante 5’.
6. Se realizó el recuento en placa tanto de microorganismos viables totales (sin calentamiento) como termorresistentes.

### **2.8 Análisis estadístico.**

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student utilizando Microsoft Excel (Microsoft 365 MSO, versión 2211). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ .

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Cinética de crecimiento: MRS Biokar vs MRS Neogen.

En la fase inicial del estudio se evaluaron las cinéticas de crecimiento de ambas cepas de *Bifidobacterium* (cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317) en los dos medios de cultivo MRS propuestos.

Con las cepas en estudio reactivadas a partir de suspensiones congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  como se indicó, se inocularon diferentes tubos con MRS. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en anaerobiosis y a diferentes tiempos se realizaron recuentos en placa (ágar MRS).

Se obtuvieron las siguientes cinéticas para cada medio de cultivo:

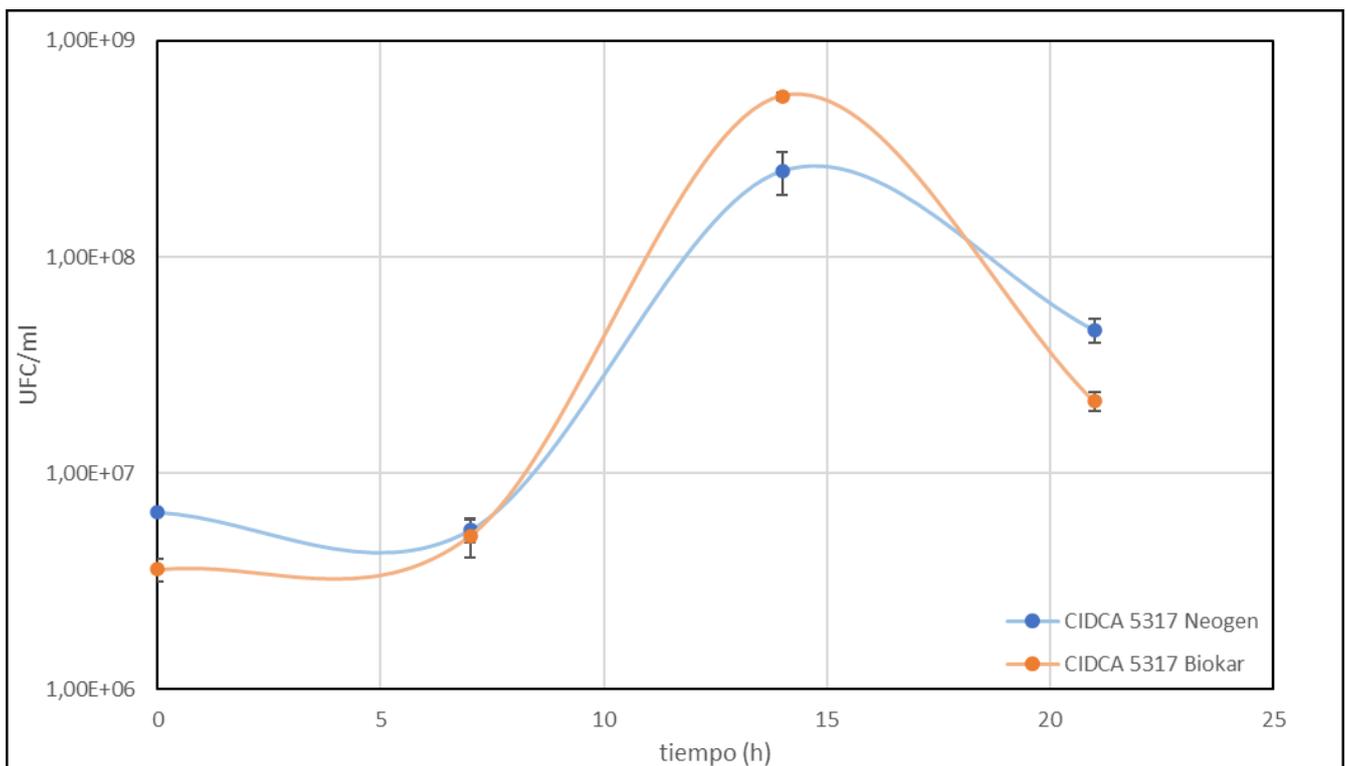


Figura 3. Cinética de crecimiento para *B.adolescentis* CIDCA 5317 en medios MRS de diferente origen. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2).

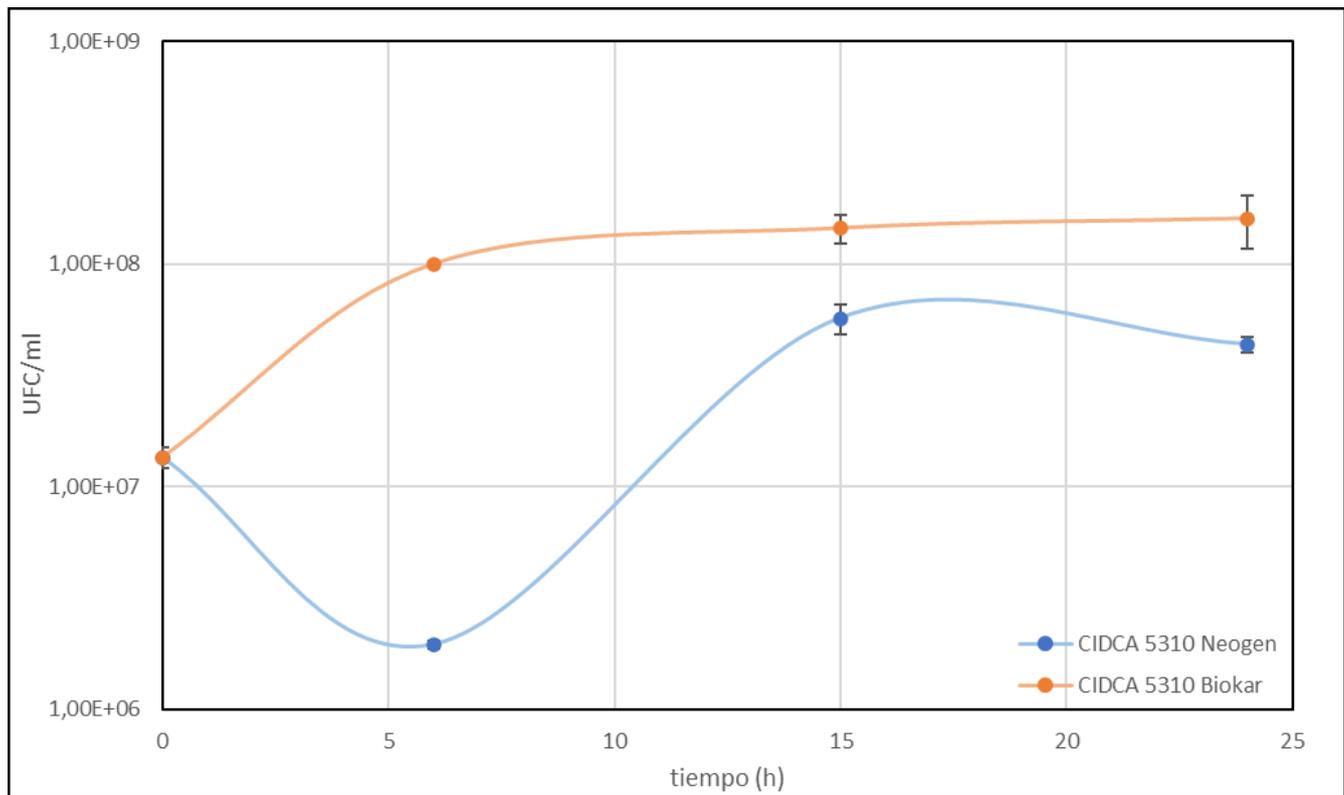


Figura 4. Cinética de crecimiento para *B. bifidum* CIDCA 5310 en medios MRS de diferente origen. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2).

Se observa un mayor crecimiento de la cepa CIDCA 5310 en el medio MRS Biokar en comparación con el medio MRS Neogen. Puede verse en la Figura 4, que la diferencia en el desarrollo entre ambos medios es de un orden de magnitud.

Con respecto a la cepa CIDCA 5317, no se observan diferencias significativas entre ambos medios MRS, el crecimiento en estos presenta la misma tendencia (Figura 3).

Estas diferencias podrían deberse a que el modo de obtención de los componentes de un medio complejo puede determinar la modificación de la concentración de compuestos importantes para el crecimiento. Esto está asociado a detalles de los procedimientos para obtener los ingredientes de los medios los cuales son patrimonio de cada uno de los fabricantes y son de difícil trazabilidad. Incluso el mismo medio de cultivo muestra diferencias de crecimiento dependiendo de las cepas evaluadas<sup>45</sup>. De estudios previos realizados por el grupo de investigación, se conoce que el crecimiento

tanto de las bifidobacterias como de las bacterias ácido lácticas en el medio MRS está estrechamente ligado a la marca del mismo.

Además del comportamiento de la cinética, es importante resaltar que las cepas no crecieron adecuadamente en el medio Neogen a partir del stock de  $-80^{\circ}\text{C}$ , es por ello que se decidió utilizar en todos los experimentos llevados a cabo el medio MRS de marca Biokar.

### 3.2 Crecimiento en medios alternativos.

Se evaluó el crecimiento de ambas cepas en los diferentes medios formulados, los cuales podrían ser una alternativa tanto económica como eficiente para el cultivo de las bifidobacterias, considerando un posible escalado industrial. Esto se debe a que el medio convencionalmente utilizado (caldo MRS) daría lugar a productos de alto costo.

Conociendo, gracias a las cinéticas realizadas, que a las 24 h los cultivos se encuentran en una fase estacionaria con un título de aproximadamente  $10^7$ - $10^8$  UFC/ml, se realizaron las diluciones pertinentes para realizar el recuento en placa.

Se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 5.

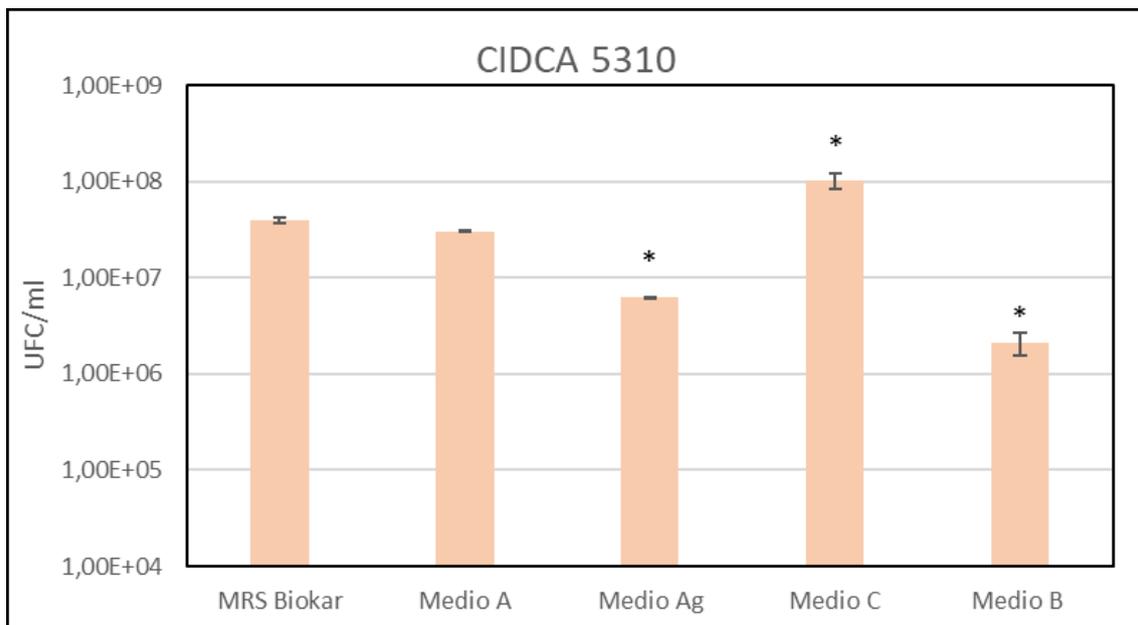


Figura 5a. Crecimiento de la cepa CIDCA 5310 en diferentes medios. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2). \*Diferencias significativas respecto al control en MRS, p < 0,05.

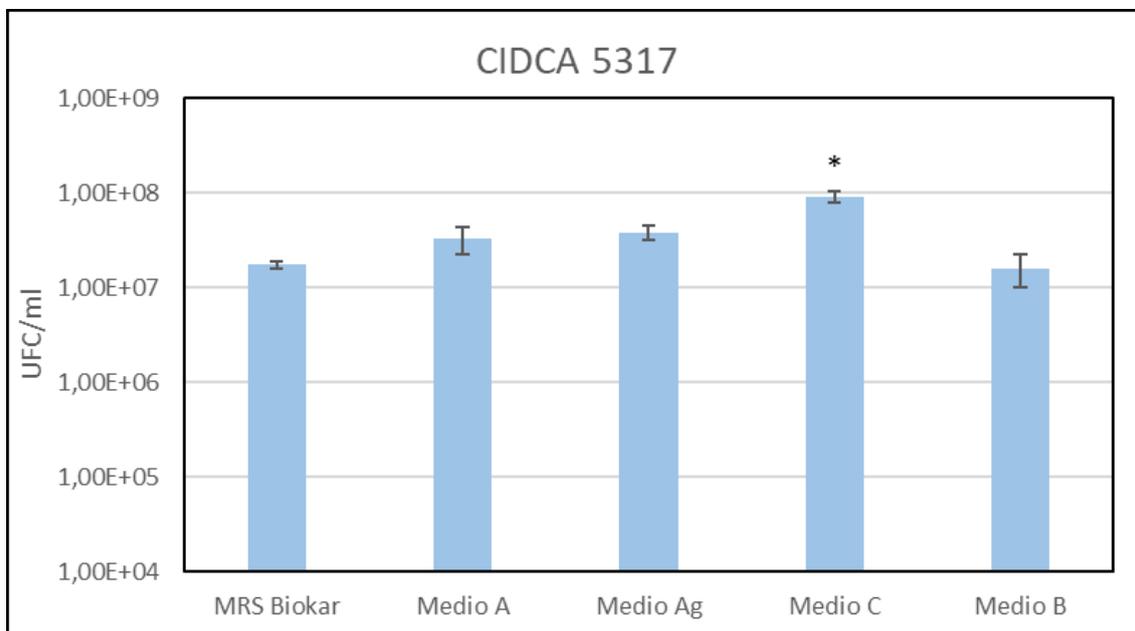


Figura 5b. Crecimiento de la cepa CIDCA 5317 en diferentes medios. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2). \*: Diferencias significativas respecto al control en MRS, p < 0,05.

Luego de realizar réplicas biológicas de los ensayos en los diferentes medios estudiados se observó la misma tendencia, donde estos mostraron una respuesta prometedora con respecto al crecimiento de las bifidobacterias.

Se observó que la cepa CIDCA 5310 tuvo un buen crecimiento en los medios A y C comparando respecto al control en MRS Biokar. El medio A no mostró diferencia significativa mientras que el medio C mostró mayor crecimiento. A su vez el fenotipo observado fue el característico de esta cepa en todos los medios, creciendo adherida al vidrio del tubo (Figura 6). En función de estos resultados se decidió continuar los trabajos con el medio A debido a su menor cantidad de componentes lo que facilita su preparación pensando en una producción a gran escala, además del mayor costo que implicaría formular un medio con mayor cantidad de componentes como el medio C.

Con respecto a la cepa CIDCA 5317 no se observaron diferencias significativas en ninguno de los medios excepto en el medio C, en el cual mostró mayor crecimiento al

---

igual que la cepa CIDCA 5310. Se observó también que la cepa presentó su fenotipo característico, creciendo en suspensión en el medio líquido (Figura 6).

Teniendo en cuenta lo observado para ambas cepas y las consideraciones efectuadas anteriormente, se seleccionó el medio A para posteriores ensayos.



Figura 6. Aspecto del desarrollo microbiano de las cepas CIDCA 5310 y 5317 en diferentes medios. 1: CIDCA 5310 en MRS, 2: CIDCA 5317 en MRS, 3: MRS control, 4: CIDCA 5310 en medio A, 5: CIDCA 5317 en medio A, 6: medio A control.

En relación al medio B, este no fue tenido en cuenta para la cepa 5317 debido a que en su formulación se usó jugo de tomate preparado a partir de tomate natural lo que conlleva a una fluctuación en las propiedades del producto debido a las diferencias estacionales y esto sería una debilidad al momento de la transferencia.

Otra factor a tener en cuenta es que el medio B tampoco contiene Tween 80, el cual sí está presente en los demás medios de cultivo, tanto los alternativos como el MRS dado

---

que es fuente de ácido oleico, lo que podría ser una explicación del menor desarrollo de la cepa CIDCA 5310 en este medio.

Dados los resultados obtenidos, decidimos evaluar un nuevo medio el cual denominamos "medio Ag" debido a que su formulación se basa en la misma composición que el medio A (sección 2.3) pero con el agregado de glucosa como fuente de carbono (2 % p/v), ya que el medio MRS contiene dicha concentración de azúcar y podría ser una mejora para nuestro medio alternativo A, mejorando aún más el crecimiento de las cepas.

Notamos que esta incorporación tampoco resultó en una mejora ya que los recuentos obtenidos fueron similares a los que mostró el medio A respecto al crecimiento de la cepa CIDCA 5317 y fue significativamente menor para la cepa CIDCA 5310 (Figura 5).

Los resultados obtenidos están de acuerdo con diferentes investigaciones donde se enfrentaron cepas de bifidobacterias, como lo es la cepa *B.bifidum*, y diferentes especies del género *Lactobacillus* ante medios de cultivo más simples y económicos que el medio MRS utilizado en investigación<sup>22,24</sup>. Algunos ejemplos fueron jugos o extractos naturales de naranja, tomate y pepino suplementado con factores nutricionales necesarios para el óptimo crecimiento de estas bacterias los cuales también se encuentran dentro de la composición del medio MRS, como así también suero obtenido de industrias lácteas suplementado con diferentes componentes indispensables para el crecimiento de las bacterias (entre ellos: extracto de levadura, peptona, glucosamina) obteniéndose recuentos de hasta  $2,0 \cdot 10^7$  UFC/ml<sup>46</sup>.

### **3.3 Secado de las cepas por convección.**

Una vez escogido el nuevo medio de cultivo a base de permeado de suero exploramos diferentes variables y condiciones de secado por convección con el propósito de encontrar aquella que nos permita obtener un producto deshidratado en polvo el cual además contenga bacterias viables. Para ello se ensayaron diferentes tiempos (1h-4h) y

---

temperaturas (40°C-55°C) y se realizaron los recuentos en placa de agar tanto previos como posteriores al tratamiento térmico.

Para realizar los ensayos se partió de cultivos de ambas cepas crecidos durante 24 h en anaerobiosis a 37°C tanto en el medio MRS Biokar como en el medio alternativo A.

Primero se analizó la posibilidad de cargar las placas de Petri con una cantidad de cultivo que permita formar una delgada capa de líquido para exponerla a una temperatura de secado de 40°C durante 4 h, pero los resultados no fueron los esperados ya que ambos medios de cultivo mostraron un comportamiento similar ante el secado formando una lámina pegajosa y adherida a la superficie, lo cual sería difícilmente extrapolable a un proceso productivo.

Por tal motivo decidimos incorporar termoprotectores los cuales además de proteger a los microorganismos, podrían otorgarle a la muestra a secar propiedades tales que el producto obtenido sea más apropiado para su posterior escalado y uso. De esta manera ensayamos diferentes condiciones de secado con el agregado de leche en polvo, maltodextrina o una combinación de ambos. Utilizando una composición de sólidos 1:1 (0,25 g de leche en polvo + 0,25 g de maltodextrina) y disponiendo la suspensión de bacterias sobre la superficie cubierta por los termoprotectores se logró una fina capa de líquido embebido en los sólidos la cual mostró resultados prometedores a las 2 h de secado a 55°C, obteniendo un polvo fácilmente manipulable post-secado.

Como soporte se utilizaron tanto placas de 22 mm de diámetro (placa de 12 pocillos) como placas de 75 mm de diámetro (caja de Petri), seleccionando estas últimas debido a su mayor superficie para contener los termoprotectores. La placa de 12 fosas, debido a su menor diámetro, presentó una mayor dificultad para encontrar una relación de sólidos a la cual agregar la suspensión de bacterias y obtener un producto seco de fácil manipulación (Figura 7).

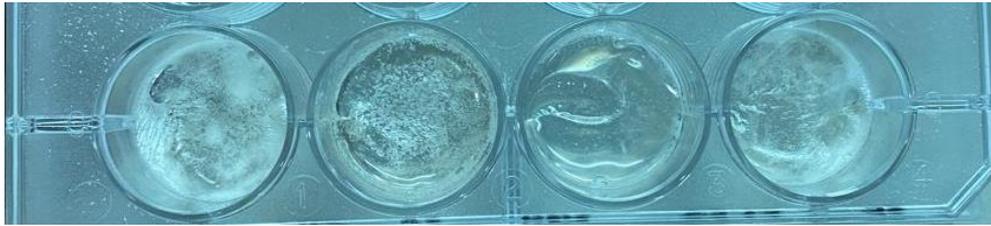


Figura 7. Aspecto de las muestras luego del secado en maltodextrina en placas de 12 pocillos a 55°C durante 2 h. De izquierda a derecha: cepa CIDCA 5310 crecida en MRS, cepa CIDCA 5310 crecida en medio A, cepa CIDCA 5317 crecida en MRS, cepa CIDCA 5317 crecida en medio A.

La utilización sólo de leche en polvo o maltodextrina dificultó la manipulación del producto obtenido al final del tratamiento, siendo este difícil de desprender de la superficie y de suspender en el buffer utilizado. Al utilizar solo leche en polvo, no se obtuvo un polvo sino más bien una especie de masa húmeda difícil de manipular mientras que al usar maltodextrina el producto obtenido luego del secado presentó una consistencia de gel difícil de recuperar y suspender en el medio líquido del buffer (Figura 7 y 8).



Figura 8. Aspecto del producto obtenido luego del secado en maltodextrina.

En contraste, al usar la mezcla de ambos protectores, luego del secado se obtuvo un producto que se desprendió uniformemente de la superficie de la placa, siendo este fácilmente manipulable (Figura 9).



Figura 9. Productos obtenidos luego del secado 2h a 55°C utilizando leche + maltodextrina.

Al evaluar los resultados con leche en polvo de la cepa CIDCA 5310 crecida en MRS, se observó que disminuyó dos órdenes de magnitud respecto al control luego de 1 h de tratado térmico. Al transcurrir 2 h a 55°C se vió la disminución de un orden más.

Con respecto a la cepa CIDCA 5317 crecida en MRS, se observó una disminución de tres órdenes de magnitud tanto a la hora de tratamiento como a las 2h.

Con respecto al secado con maltodextrina, se observó que la cepa CIDCA 5310 crecida en MRS disminuyó en tres órdenes al transcurrir 1 h a 55°C mientras que a las 2 h se vió una disminución en dos órdenes. Por otro lado, al crecer en el medio A, se vió una disminución en un solo orden para ambos tiempos evaluados.

La cepa CIDCA 5317 crecida en MRS mostró un recuento dos órdenes menores luego de transcurrida la primera hora de tratamiento, mientras que a las dos horas se observó la disminución de un orden de magnitud más. Al crecer en medio A, se observó una disminución en dos y cuatro órdenes de magnitud para la primera y segunda hora de tratamiento térmico, respectivamente.

Luego de realizar las pruebas necesarias se vió que la condición más apropiada para obtener un producto en polvo sería al utilizar ambos termoprotectores y exponerlos, una vez humedecidos, a un secado a 55°C durante 2 h. Por este motivo no se ensayó una sola hora de tratamiento térmico.

Al evaluar los resultados obtenidos, la cepa CIDCA 5310 crecida tanto en MRS como en el medio A disminuyó en cuatro órdenes de magnitud. En cambio la cepa CIDCA 5317 mostró una disminución de dos órdenes para el crecimiento en MRS y tres para la condición crecida en medio A.

En la tabla 1 se muestra un panorama general de los resultados obtenidos en las experiencias de secado.

**Tabla 1.** Resultados de las condiciones de secado ensayadas, expresadas en  $\log_{10}$  UFC/ml. Se muestra el valor medio de dos réplicas  $\pm$  desviación estándar. Los valores de los tratamientos térmicos presentaron diferencias significativas con el control con un  $p < 0,05$ . ND: no determinado.

Cepas/medio	Leche en polvo			Maltodextrina			L+M	
	Control	55°C 1h	55°C 2h	Control	55°C 1h	55°C 2h	Control	55°C 2h
5310 MRS	7,67 $\pm$ 0,11	5,58 $\pm$ 0,02	4,30 $\pm$ 0,60	7,60 $\pm$ 0,02	4,70 $\pm$ 0,018	5,40 $\pm$ 0,08	7,73 $\pm$ 0,10	3,0 $\pm$ 0,0
5310 A	ND	ND	ND	7,48 $\pm$ 0,01	6,66 $\pm$ 0,07	6,25 $\pm$ 0,23	7,97 $\pm$ 0,16	3,70 $\pm$ 0,30
5317 MRS	8,73 $\pm$ 0,01	5,77 $\pm$ 0,23	5,69 $\pm$ 0,03	7,22 $\pm$ 0,20	5,39 $\pm$ 0,012	4,38 $\pm$ 0,18	8,95 $\pm$ 0,02	6,44 $\pm$ 0,02
5317 A	ND	ND	ND	7,51 $\pm$ 0,14	< 5,00	3,82 $\pm$ 0,74	8,19 $\pm$ 0,01	4,76 $\pm$ 0,09

En todas las condiciones ensayadas observamos una disminución en los recuentos luego del tratamiento térmico, bajando desde 2 hasta 4 órdenes de magnitud. Estos resultados se deben a las condiciones a las que se someten a las cepas, donde las altas temperaturas con la consecuente pérdida de humedad y las condiciones aeróbicas explican esta pérdida en microorganismos viables. Numerosos trabajos respaldan estos resultados donde se utilizan diversas técnicas de deshidratación, demostrando que la mayor pérdida de microorganismos se da al utilizar condiciones de secado tan estresantes como lo es el secado por convección<sup>47-49</sup>.

A pesar de las pérdidas de viabilidad a causa del proceso al que se someten las cepas, se mantiene un nivel de microorganismos que podría ser compatible con la formulación de un producto. Por otro lado, es importante destacar que se logró una consistencia de polvo en el producto, que facilita la manipulación del mismo.

### 3.4 Obtención de esporos de *B.cereus*.

Los resultados obtenidos del recuento en placa de agar nutritivo de esporos totales y termorresistentes se muestran en la Figura 10.

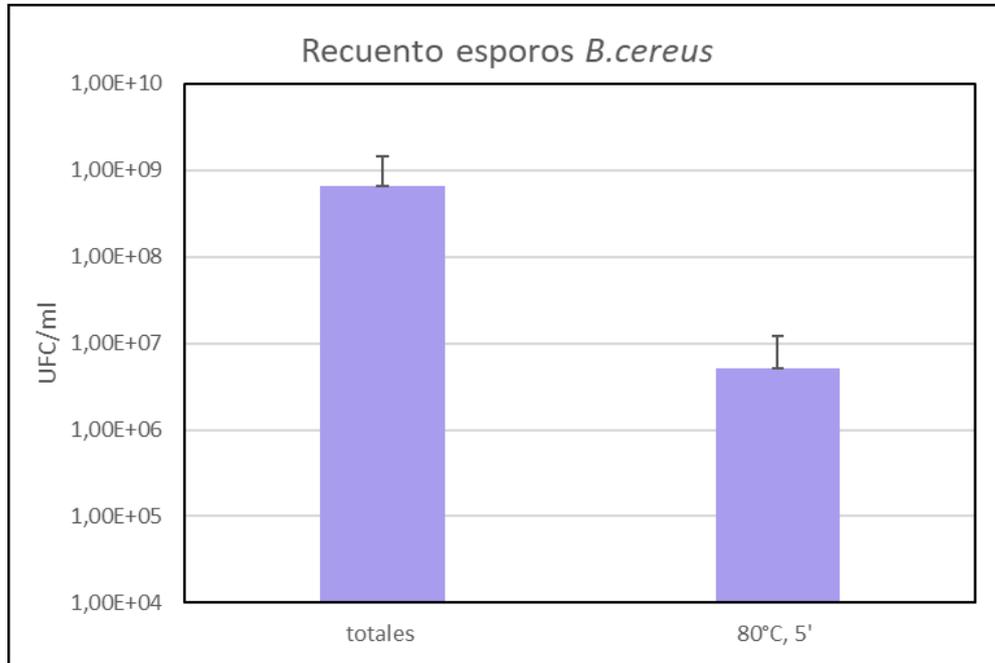


Figura 10. Recuento de la cepa B10502 de *B.cereus* tanto totales como termorresistentes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2).

Observamos que se obtiene un buen rendimiento de esporos totales y el tratamiento térmico disminuye la cantidad en 2 órdenes de magnitud, lo que es un parámetro de la calidad de los esporos obtenidos. Como demuestran otros trabajos de investigación, la utilización de manganeso permite obtener un buen rendimiento de esporos<sup>50,51</sup>.

### 3.5 Ensayo de funcionalidad *in vitro*.

Con el objetivo de evaluar un aspecto de las capacidades probióticas de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317 crecidas en el medio alternativo A, estas se co-incubaron junto con los esporos de *B.cereus* durante 24 h a 37°C y posteriormente se efectuó un recuento de colonias de esta bacteria en placa de agar nutritivo.

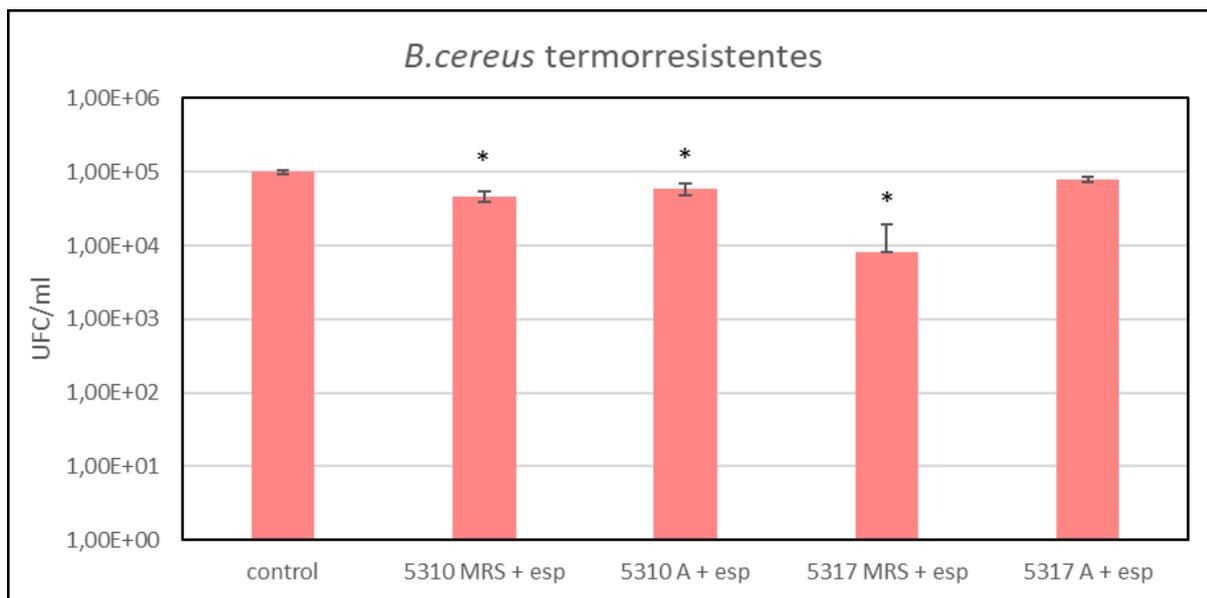


Figura 11a. Recuentos de formas termorresistentes de la cepa B10502 de *B.cereus* coincubada con bifidobacterias (CIDCA 5310 y CIDCA 5317) provenientes de MRS o medio alternativo A. Como control, se utilizó medio BHI. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2). \*: Diferencias significativas respecto al control en BHI,  $p < 0,05$ .

Se vio que la coincubación de la cepa CIDCA 5310 en ambos medios de cultivo y la cepa CIDCA 5317 crecida en MRS dieron lugar a una disminución en la concentración de formas termorresistentes respecto al control en BHI, lo cual no fue observado cuando esta última cepa provenía del medio A (Figura 11a).

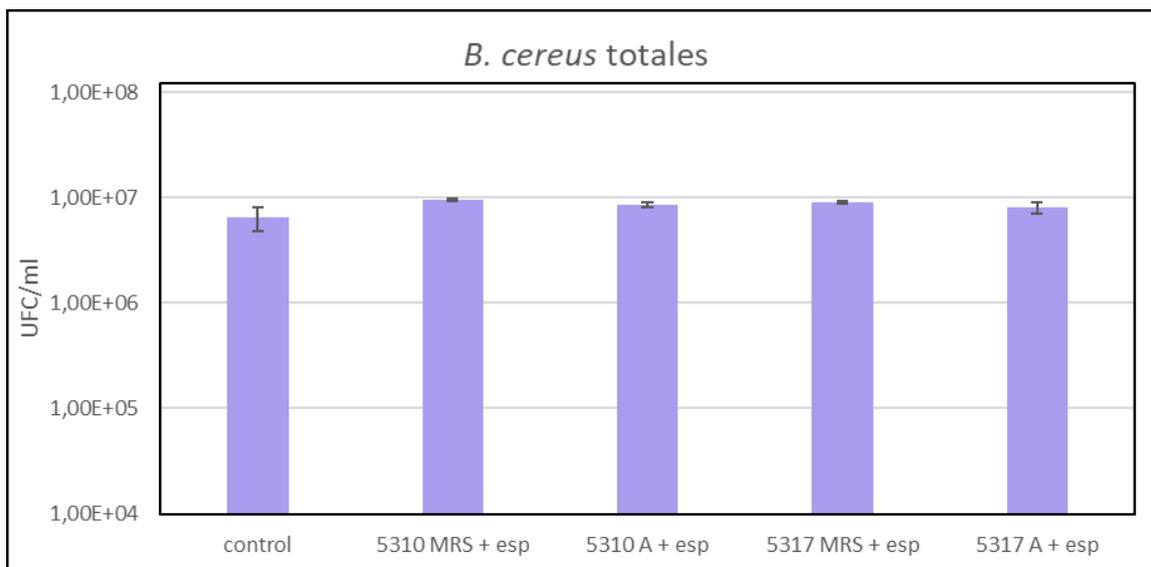


Figura 11b. Recuentos de la cepa B10502 de *B. cereus* viables totales luego de ser coincubado con bifidobacterias (CIDCA 5310 y CIDCA 5317) provenientes de medio MRS o medio alternativo A. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=2).

Se observó que los recuentos de formas viables totales de *B. cereus* B10502 para el control y las diferentes coincubaciones no mostraron diferencias significativas (Figura 11b).

---

## **4. Conclusión**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que es posible utilizar medios de cultivo formulados a base de permeado de suero para el crecimiento de bifidobacterias y obtener un buen desarrollo bacteriano. Estos medios podrían ser utilizados en la producción a gran escala debido a la ventaja económica que presentan frente a los medios utilizados en el ámbito de la investigación.

Se encontró un protocolo de secado orientado al uso de equipamiento de menor complejidad, el cual permite obtener un producto final versátil para posibles usos como aditivo o preparaciones alimentarias.

Por último, los resultados obtenidos con los cocultivos de *B. cereus* y las bifidobacterias crecidas en medios alternativos, sugieren que el crecimiento en estos permite obtener bacterias con funcionalidad apropiada para su utilización en la formulación de alimentos probióticos.

Los resultados presentados en este trabajo final de grado resultan relevantes, no solo por su contribución a la ciencia, sino porque marcan el inicio del estudio de aspectos tecnológicos de las cepas CIDCA 5310 y CIDCA 5317, imprescindibles para una posible transferencia al sector productivo.

---

## **5. Bibliografía**

1. E. M. Quigley, *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11, 593–603.
2. B. Yousefi, M. Eslami, A. Ghasemian, P. Kokhaei, A. Salek Farrokhi and N. Darabi, *J Cell Physiol*, 2019, 234, 8008–8018.
3. E. C. Vasquez, T. M. C. Pereira, V. A. Peotta, M. P. Baldo and M. Campos-Toimil, *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019, 1–11.
4. O. O. Erejuwa, S. A. Sulaiman and M. S. Ab Wahab, *Int J Mol Sci*, 2014, 15, 4158–4188.
5. A. Hassan, A. U. Din, Y. Zhu, K. Zhang, T. Li, Y. Wang, Y. Luo and G. Wang, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 5993–6006.
6. A. Londero, C. Iraporda, G. L. Garrote and A. G. Abraham, *Int J Dairy Technol*, 2015, 68, 118–126.
7. M. A. Golowczyc, P. Mobili, G. L. Garrote, A. G. Abraham and G. L. De Antoni, *Int J Food Microbiol*, 2007, 118, 264–273.
8. K. M. Burkholder and A. K. Bhunia, *Gut Pathog*, 2009, 1, 14.
9. A. A. Hugo, E. Kakisu, G. L. De Antoni and P. F. Pérez, *Lett Appl Microbiol*, 2008, 46, 613–619.
10. J. Zheng, S. Wittouck, E. Salvetti, C. M. A. P. Franz, H. M. B. Harris, P. Mattarelli, P. W. O’toole, B. Pot, P. Vandamme, J. Walter, K. Watanabe, S. Wuyts, G. E. Felis, M. G. Gänzle and S. Lebeer, *Int J Syst Evol Microbiol*, 2020, 70, 2782–2858.
11. A. Wang and Q. Zhong, *COMPREHENSIVE REVIEW*, 2024, 23, e13287, DOI:10.1111/1541-4337.13287
12. S. Auger, N. Ramarao, C. Faille, A. Fouet, S. Aymerich and M. Gohar, *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75, 6616–6618.
13. L. Lavari, P. Burns, R. Páez, J. Reinheimer and G. Vinderola, 2017, *J Appl Microbiol*, DOI: 10.1111/jam.13567.
14. M. Teijeiro, P. F. Pérez, G. L. De Antoni and M. A. Golowczyc, *Food Research International*, 2018, 112, 169–174.

- 
15. P. A. Bolla, M. De Los, A. Serradell, P. J. De Urraza and G. L. De Antoni, *J Dairy Research*, 2011, 78, 15–22.
  16. G. Quintana, E. Gerbino and A. Gómez-Zavaglia, *Front Microbiol*, 2017, 8, 1–9.
  17. S. L. Liu, C. Y. Chen and Y. S. Chen, *J Biosci Bioeng*, 2022, 133, 250–257.
  18. N. Fu, S. Huang, J. Xiao and X. D. Chen, *Producing Powders Containing Active Dry Probiotics With the Aid of Spray Drying*, Elsevier Inc., 1st Ed., 2018, vol. 85.
  19. L. Anghel, A. Ștefania Milea, O. E. Constantin, V. Barbu, C. Chițescu, E. Enachi, G. Râpeanu, G. D. Mocanu and N. Stănciuc, *Food Chem X*, DOI:10.1016/j.fochx.2023.100777.
  20. G. D. Mocanu, A. C. Chirilă, A. M. Vasile, D. G. Andronoiu, O. V. Nistor, V. Barbu and N. Stănciuc, *Foods*, DOI:10.3390/foods9111611.
  21. S. Arboleya, C. Watkins, C. Stanton and R. P. Ross, *Front Microbiol*, 2016, 7, 1–9.
  22. Y. Doleyres, C. Paquin, M. LeRoy and C. Lacroix, *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60, 168–173.
  23. M. Sharma, A. Wasan and R. K. Sharma, *Food Biosci*, DOI:10.1016/j.fbio.2021.100993.
  24. H. García, A. M. Lorenzo and M. Núñez de Villavicencio, *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2006, 16, 11-13.
  25. R. R. Gamba, C. N. Colo, M. Correa, A. Astoreca, T. Alconada, G. De Antoni, A. L. Peláez, C. Nicolo, M. Correa, A. Astoreca, T. Alconada, G. De Antoni and A. L. Peláez, *Adv Microbiol*, 2015, 05, 479–492.
  26. A. A. Hugo, F. Bruno and M. A. Golowczyc, *LWT*, 2016, 69, 185–190.
  27. M. Golowczyc, C. Vera, M. Santos, C. Guerrero, P. Carasi, A. Illanes, A. Gómez-Zavaglia and E. Tymczyszyn, *J Dairy Res*, 2013, 80, 374–81.
  28. P. F. Pérez, Y. Minnaard, E. A. Disalvo and G. L. De Antoni, *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64, 21–26.
  29. G. Kociubinski, A. Gomez Zavaglia, P. Pérez, E. and Disalvo and G. De Antoni, *Journal of Dairy Research*, 2002, 69, 293–302.
  30. A. Gomez Zavaglia, G. Kociubinski, P. Perez, E. Disalvo and G. De Antoni, *J Appl Microbiol*, 2002, 93, 794–799.

- 
31. R. Bibiloni, P. F. Pérez, G. L. Garrote, E. A. Disalvo and G. L. De Antoni, *Methods Enzymol*, 2001, 336, 411–427.
  32. F. M. Trejo, J. Minnaard, P. F. Perez and G. L. De Antoni, *Anaerobe*, 2006, 12, 186–193.
  33. P. Ruas-Madiedo, M. Medrano, N. Salazar, C. G. De Los Reyes-Gavilán, P. F. Pérez and A. G. Abraham, *J Appl Microbiol*, 2010, 109, 2079–2086.
  34. S. E. Assad, I. S. Rolny, J. Minnaard and P. F. Pérez, *J Appl Microbiol*, 2020, doi:10.1111/jam.14861.
  35. S. E. Assad, M. Fragomeno, M. Rumbo, J. Minnaard and P. F. Pérez, *Food Biosci*, 2023, doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102473
  36. M. Fragomeno, S. Assad, P. Mobili, P. J. Peruzzo, J. Minnaard and P. F. Pérez, *FEMS Microbiol Lett*, 2021, 368, 1–10.
  37. F. M. Trejo, P. F. Pérez and G. L. De Antoni, *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98, 19–29.
  38. F. M. Trejo, G. L. De Antoni and P. F. Pérez, *J Dairy Res*, 2013, 80, 263–9.
  39. E. J. Bottone, *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23, 382–398.
  40. J. Jovanovic, V. F. M. Ornelis, A. Madder and A. Rajkovic, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2021, 20, 3719–3761.
  41. L. P. Stenfors Arnesen, A. Fagerlund and P. E. Granum, *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32, 579–606.
  42. A. Kotiranta, K. Lounatmaa and M. Haapasalo, *Microbes and Infection*, , 2000, 2, 189–198.
  43. I. S. Rolny, J. Minnaard, S. M. Racedo and P. F. Perez, *J Med Microbiol*, 2014, 63, 1741–1749.
  44. J. Minnaard, L. Delfederico, V. Vasseur, A. Hollmann, I. Rolny, L. Semorile and P. F. Pérez, *Int J Food Microbiol*, 2007, 116, 197–206.
  45. R. I. Dave and N. P. Shah, *J Dairy Sci*, 1996, 79, 1529–1536.
  46. R. Mahalakshmi and V. Murthy, *J Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 25, 177-179.

- 
47. G. Trujillo-de Santiago, C. P. Sáenz-Collins and C. Rojas-de Gante, *J Dairy Sci*, 2012, 95, 6897–6904.
  48. L. Zura-Bravo, A. Rodríguez, K. Stucken, L. Castillo, K. S. Ah-Hen, P. García-Segovia and A. Vega-Gálvez, *Food Chem*, DOI:10.1016/j.foodchem.2019.125117.
  49. C. G. Burca-Busaga, N. Betoret, L. Seguí, E. Betoret and C. Barrera, *Microorganisms*, 2020, 8, 1–15.
  50. E. D. Weinberg, *Appl Microbiol*, 1964, 12, 436-441.
  51. M. T. Sinnelä, Y. K. Park, J. H. Lee, K. C. C. Jeong, Y. W. Kim, H. J. Hwang and J. H. Mah, *Foods*, DOI:10.3390/foods8040119.