



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud
Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías
Instituto de Ciencias Agropecuarias

**“Impacto del jugo de zarzamora fermentado con bacterias ácido lácticas y
suero de leche para el control de la infección por *Helicobacter pylori*”**

Tesis que para obtener el grado de:
Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana

Presenta:

M en C. LILIANA LUGO ZARATE

Directora de Tesis

Dra. Angélica Saraf Jiménez Osorio

Codirector de Tesis

Dr. Luis Delgado Olivares

Asesores:

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino

Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Mayo 2026



Asunto: Autorización impresión de tesis

MTRA. OJUKI DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH
PRESENTE

Por medio de la presente se informa que el comité tutorial del trabajo de tesis titulado "Impacto del jugo de zarzamora fermentado con bacterias ácido lácticas y suero de leche para el control de la infección por *Helicobacter pylori*", realizado por la sustentante Liliana Lugo Zarate, con número de cuenta 279379, perteneciente al programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana (DCASH), una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado tiene a bien extender la presente **AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**. Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y continuar con lo establecido en el proceso de grado vigente.

ATENTAMENTE

Profesor		Firma
Dra. Angélica Saraí Jiménez Osorio	Directora	
Dr. Luis Delgado Olivares	Codirector	
Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino	Asesora	
Dra. Nayeli Shantal Castrejón Jiménez	Asesora	

San Agustín Tlaxiaca, Hgo., a 29 de abril de 2026

M. C. José Antonio Hernández Vera
Director del Instituto de Ciencias de la Salud
Dean

Dra. Lydia López Pontigo
Coordinadora del Posgrado ICSa

Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino
Jefa del Área Académica de Nutrición
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Eva María Santos López
Coordinadora del Programa
DCASH

Agradecimientos

Con profunda estima, extiendo mi agradecimiento a cada uno de mis asesores al Dr. Luis, Dra. Nelly y la Dra. Nayeli, por ser los guías en la ejecución de este trabajo. En especial a la Dra. Angelica, quien me dio la oportunidad de ser su alumna. Su experiencia y sabiduría fueron fundamentales para mi crecimiento profesional y personal.

Además, expreso mi reconocimiento al Dr. Luis Guillermo Gonzales, Dra. Araceli Castañeda, Dr. Emanuel Pérez, Dr. Guillermo Aguilar, Dra. Maria Guadalupe Herrera, Dr. José Pedraza, Mtro. Omar Medina, Dra. Norma Velazquez, por todas sus aportaciones de enriquecimiento y apoyo en la ejecución metodológica de este proyecto.

Agradezco a todos mis compañeros, a Ivan, Araceli, Lis, Tania, Mariel, Ale, Fer, Iracema, Carmina, Quina, Liz, Diana, Vania y Alicia, quienes me acompañaron, escucharon y apoyaron durante estos años.

Reconozco el apoyo de mi familia, quienes me impulsaron todos los días con palabras de aliento, esperando contar siempre con su invaluable apoyo.

Finalmente agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitir que mi formación académica fuera con ustedes. También me permito hacer una mención especial a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por la beca otorgada durante los estudios de doctorado.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
 CAPÍTULO I.....	 3
1.1 Introducción a la investigación.....	3
1.2 Planteamiento del problema.....	4
1.3 Justificación.....	5
1.4 Hipótesis.....	6
1.5 Objetivos.....	7
1.5.1 Objetivo general.....	7
1.5.2 Objetivos específicos.....	7
1.6 Diagrama metodológico.....	8
1.7 Preparación de los jugos.....	9
1.7.1 Cultivos bacterianos.....	9
1.7.2 Preparación del jugo de zarzamora.....	9
1.7.3 Proceso de fermentación.....	9
1.8 Referencias.....	10
 CAPÍTULO II. Bebidas fermentadas con bacterias ácido-lácticas a base de frutas.....	 12
2.1 Introducción.....	12
2.2 Bacterias ácido lácticas.....	13
2.2.1 Fermentación láctica.....	14
2.3 Metabolismo de las BAL y metabolitos secundarios.....	14
2.3.1 Propiedades del sustrato y vías metabólicas de la fermentación de BAL.....	14
2.3.1 Glucólisis.....	15
2.3.2 Proteólisis.....	18
2.3.3 Lipólisis.....	19
2.4. Propiedades antibacterianas de los metabolitos de jugos de frutas fermentados	19
2.4.1 Efecto antimicrobiano de los antioxidantes.....	22
2.4.2 Ácidos orgánicos.....	23
2.4.3 Péptidos antimicrobianos: Bacteriocinas.....	24
2.5. Evidencia in vivo del efecto antimicrobiano.....	25
2.6. Jugo de zarzamora fermentado con BAL.....	29
2.7. Suero de leche como sustrato complementario.....	30
2.8. Conclusión.....	30
2.9. Referencias.....	31
 CAPÍTULO III. Fermentación del jugo de zarzamora con dos consorcios de bacterias lácticas y suero aislado de leche: propiedades fisicoquímicas y antioxidantes durante el almacenamiento.....	 43
3.1. Introducción.....	43
3.2. Referencias.....	44

CAPÍTULO IV. Análisis del perfil proteolítico y de la actividad antioxidante del jugo de zarzamora fermentado con suero de leche y las BAL en consorcio.....	67
4.1. Introducción.....	67
4.2. Referencias.....	68

CAPÍTULO V. Propiedades probióticas de las BAL y su actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	86
5.1. Introducción.....	86
5.2. Materiales y métodos.....	87
5.2.1. Materiales.....	87
5.2.2. Preparación de cultivos bacterianos.....	87
5.2.3. Ensayo de autoagregación.....	87
5.2.4. Hidrofobicidad.....	87
5.2.5. Sobrevivencia al paso por condiciones del tracto gastrointestinal.....	88
5.2.6. Antibiograma.....	88
5.2.7. Producción de exopolisacáridos.....	89
5.2.8. Actividad antimicrobiana.....	89
5.2.9. Análisis estadístico.....	90
5.3. Resultados.....	90
5.3.1. Capacidad de autoagregación e hidrofobicidad.....	90
5.3.2. Sobrevivencia al paso por condiciones del tracto gastrointestinal.....	92
5.3.3. Resistencia a antibióticos.....	92
5.3.4. Producción de exopolisacáridos.....	94
5.3.5. Propiedades antimicrobianas.....	94
5.4. Discusión.....	96
5.4.1. Auto-agregación e hidrofobicidad.....	96
5.4.2. Digestión <i>in vitro</i>	97
5.4.3. Resistencia a los antibióticos.....	98
5.4.4. Exopolisacáridos.....	99
5.4.5. Propiedades antimicrobianas.....	100
5.5. Conclusiones.....	101
5.6. Referencias.....	101

CAPÍTULO VI. Evaluar la capacidad antimicrobiana de la bebida fermentada sobre <i>H. pylori</i> , mediante pruebas de letalidad en medios líquidos y sólidos.....	105
6.1. Introducción.....	105
6.2. Metodología.....	106
6.2.1. Cultivos microbiológicos.....	106
6.2.2. Obtención del jugo fermentado.....	106
6.2.3. Crecimiento y mantenimiento de <i>H. pylori</i>	106
6.2.4. Pruebas de identificación para <i>H. pylori</i>	107
6.2.4.1. Tinción de Gram.....	107
6.2.4.2. Prueba de oxidasa.....	107
6.2.4.3. Prueba de catalasa.....	107
6.2.4.4. Prueba de ureasa.....	107

6.2.5. Concentración mínima inhibitoria.....	108
6.2.6. Cinética de muerte de <i>H. pylori</i> en medio líquido.....	108
6.2.7. Cuantificación relativa de cDNA de <i>H. pylori</i>	109
6.2.8. Cinética de muerte de <i>H. pylori</i> en simulación gástrica <i>in vitro</i>	109
6.2.9. Cinética de muerte de <i>H. pylori</i> en simulación gástrica <i>in vitro</i> en combinación con antibióticos.....	110
6.2.10. Actividad bactericida en medio sólido.....	110
6.3. Resultados.....	111
6.3.1. Concentración mínima inhibitoria.....	111
6.3.2. Cinética de muerte en medio líquido.....	112
6.3.3. Cuantificación de cDNA de <i>H. pylori</i> mediante RT-qPCR.....	115
6.3.4. Cinética de muerte en simulación gástrica.....	117
6.3.5. Cinética de muerte en simulación gástrica en mezcla con antibióticos.....	119
6.3.6. Actividad bactericida en medio sólido.....	120
6.4. Discusión.....	120
6.5. Conclusiones.....	124
6.6. Referencias.....	125

Capítulo VII. Efecto del jugo de zarzamora fermentado con BAL en un modelo *in vivo* utilizando el nematodo *Caenorhabditis elegans* infectado con *S. aureus* y *H. pylori*..... 128

7.1. Introducción.....	128
7.2. Estrategia metodológica.....	130
7.2.1. Cepas y preparación del jugo.....	130
7.2.2. Adquisición y mantenimiento de <i>C. elegans</i>	130
7.2.3. Sincronización de la etapa larvaria.....	130
7.2.4. Ensayo de toxicidad aguda.....	131
7.2.5. Ensayo de vida útil (lifespan).....	131
7.2.6. Ensayo de producción de progenie.....	132
7.2.7. Ensayo de bombeo faríngeo.....	132
7.2.8. Ensayo de locomoción.....	132
7.2.9. Ensayo de estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂	133
7.2.10. Ensayos de exposición a <i>S. aureus</i>	133
7.2.11. Ensayos de exposición a <i>Helicobacter pylori</i>	136
7.2.12. Análisis estadístico.....	138
7.3. Resultados.....	138
7.3.1. Toxicidad aguda del jugo fermentado.....	138
7.3.2. Lifespan de las cepas individuales y en el jugo fermentado.....	139
7.3.3. Parámetros de bienestar por el consumo de jugo fermentado.....	141
7.3.3. Estrés oxidativo.....	143
7.3.4. Exposición de <i>Caenorhabditis elegans</i> a <i>Staphylococcus aureus</i>	145
7.3.5. Exposición a <i>Helicobacter pylori</i>	148
7.4. Discusión.....	151
7.4.1. Toxicidad del jugo en <i>C. elegans</i>	151
7.4.2. Efecto del consumo del jugo fermentado en la supervivencia de <i>C. elegans</i>	152

7.4.3. Efecto del consumo del jugo en los parámetros de bienestar en <i>C. elegans</i> ..	153
7.4.4. Efecto del consumo del jugo fermentado en la resistencia de <i>C. elegans</i> al estrés oxidativo.....	154
7.4.5. Efecto del consumo del jugo en <i>C. elegans</i> frente <i>S. aureus</i>	155
7.4.6. Efecto del consumo del jugo en <i>C. elegans</i> frente <i>H. pylori</i>	157
7.5. Conclusión.....	158
7.6. Referencias.....	158
Perspectivas.....	162

Índice de figuras

Figura 1.1 Diagrama metodológico.

Figura 5.1. Autoagregación de bacterias ácido-lácticas en monocultivo y cocultivo

Figura 5.2. Hidrofobicidad de bacterias ácido-lácticas en monocultivo y cocultivo.

Figura 5.3 Producción de exopolisacáridos por bacterias ácido-lácticas en monocultivo y cocultivo.

Figura 5.4. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido-lácticas en medio MRS contra *E. coli* y *S. aureus*, y del jugo de zarzamora con suero de leche fermentado con *E. coli* y *S. aureus*.

Figura 6.1 Densidad óptica del jugo de zarzamora fermentado en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) y en cocultivo (C2: *L. casei* + *L. rhamnosus*) contra *H. pylori*.

Figura 6.2. Micrografías y análisis semicuantitativo de la actividad antimicrobiana contra *H. pylori* en un medio líquido.

Figura 6.3 Densidad óptica del jugo de zarzamora fermentado en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) y en cocultivo (C2: *L. casei* + *L. rhamnosus*) contra *H. pylori* en una simulación de digestión gástrica.

Figura 6.4. Micrografías y análisis semicuantitativo de la actividad antimicrobiana contra *H. pylori* en la simulación de digestión *in vitro*.

Figura 6.5. Actividad antimicrobiana del jugo fermentado digerido a diferentes tiempos contra *H. pylori*.

Figura 7.1. Estrategia experimental usando como modelo *C. elegans* tratado con jugo fermentado y preinfectado por *S. aureus*.

Figura 7.2. Estrategia experimental utilizando *Caenorhabditis elegans* bajo un tratamiento post-infección por *Staphylococcus aureus*.

Figura 7.3. Estrategia experimental utilizando como modelo *Caenorhabditis elegans*, bajo un esquema de tratamiento previo a la infección por *Helicobacter pylori*.

Figura 7.4. Toxicidad aguda de 24 h en *C. elegans* alimentado con jugo, suero y su combinación.

Figura 7.5. *Lifespan* de *C. elegans* alimentadas con cada una de las cepas de BAL utilizadas en esta investigación.

Figura 7.6. Supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentado con OP50 (control) y los jugos en cocultivo C2 (jugo fermentado con suero y *L. casei* + *L. rhamnosus*) y C- (jugo con suero sin inóculo) a 20 °C

Figura 7.7. Parámetros de bienestar de *Caenorhabditis elegans*

Figura 7.8. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* al estrés oxidativo (H₂O₂ 8 mM), posterior a 4 días de alimentación con las cepas de bacterias ácido-lácticas o con el alimento (OP50).

Figura 7.9. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* al estrés oxidativo (H₂O₂ 8 mM).

Figura 7.10. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* en las tres estrategias de infección por *S. aureus*.

Figura 7.11. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* frente a *Helicobacter pylori*.

Índice de tablas

Tabla 2.1. Bebidas vegetales fermentadas con BAL y sus metabolitos.

Tabla 2.2 Actividad antimicrobiana de jugos fermentados con LAB en monocultivo y cocultivo.

Tabla 2.3. Efectos antimicrobianos de bebidas fermentadas en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Tabla 5.1. Propiedades probióticas de BAL en monocultivo y cocultivo.

Tabla 6.1 Concentración mínima inhibitoria del jugo de zarzamora fermentada contra *H. pylori* en monocultivo y cocultivo.

Tabla 6.2 Cuenta viable de *H. pylori* (Log UFC/mL) en presencia de jugo fermentado con BAL.

Tabla 6.3 Viabilidad de *H. pylori* en un ensayo de cinética de muerte en contacto con jugo fermentado con BAL.

Tabla 6.4. Análisis semicuantitativo de la inhibición de *H. pylori* por la actividad de bebidas fermentadas en combinación con antibióticos.

Tabla 7.1. Parámetros de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentados con OP50 (control) y con los jugos en cocultivo C2 y C- al 50 % y al 75 %.

Tabla 7.2. Parámetros de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentados con OP50 (control) y con los jugos en cocultivo C2 y C- al 25, 50 y 75%.

Tabla 7.3. Parámetros de supervivencia a 25 °C de *Caenorhabditis elegans* alimentado con OP50 (control) y jugo fermentado en cocultivo (C2) y sin inóculo (C-) frente a la infección con *Staphylococcus aureus*.

Tabla 7.4. Cuenta viable de *S. aureus* en diferentes tratamientos con jugo fermentado

Tabla 7.5. Parámetros de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentado con OP50 (control), con jugo fermentado en cocultivo (C2) y sin inóculo (C-) frente a la infección por *Helicobacter pylori*.

Abreviaturas

Abs: absorbancia

AO: Ácidos orgánicos

AMX: Amoxicilina

BAL: Bacterias ácido-lácticas

CMI: Concentración mínima inhibitoria

C1: Jugo de zarzamora con suero de leche fermentado con *L. plantarum*, *L. brevis* y *P. acidilactici*

C2: Jugo de zarzamora fermentado con suero de leche *L. casei* y *L. rhamnosus*

C-: Jugo de zarzamora con suero de leche sin inóculo

Log UFC/mL: Logaritmo de Unidades Formadoras de colonias por mililitro

MRS: Man Rogosa Sharpe

MTZ: Metronidazol

NGM: Medio de Crecimiento para Nematodos

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública, considerado una pandemia silenciosa. Se estima que para el 2050 habrá más de 39 millones de muertes relacionadas con infecciones causadas por microorganismos multirresistentes. Una de esas bacterias es *Helicobacter pylori*, clasificada como carcinogénico tipo 1. Una terapia alternativa es el uso de probióticos, principalmente de alimentos fermentados, con la finalidad de consumir los productos del metabolismo bacteriano. Estos productos se proponen como coadyuvantes debido a sus propiedades antimicrobianas y moduladoras de la disbiosis gastrointestinal. Por ello, el objetivo del presente proyecto fue evaluar una bebida a base de zarzamora fermentada con suero de leche y bacterias ácido-lácticas (*Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lacticaseibacillus casei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*) en cocultivo contra *H. pylori* en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos mostraron cambios fisicoquímicos relacionados con la fermentación como la síntesis de ácido láctico, la biotransformación de compuestos fenólicos, reflejados en la actividad antioxidante determinada con los radicales ABTS y DPPH. Se determinó la producción de metabolitos antimicrobianos como ácido láctico, ácido acético y péptidos de bajo peso molecular. La bebida C2 (*L. casei* y *L. rhamnosus*) presentó las mejores propiedades probióticas y fue usada contra *H. pylori*. Se observó un efecto bactericida y de lisis en cepas patógenas de *H. pylori* en modelos *in vitro*. Finalmente, el análisis *in vivo* se realizó en un modelo de *Caenorhabditis elegans* de infección con *Staphylococcus aureus* y *H. pylori*, mayor esperanza de vida y mejores características de salud se presentaron con la suplementación del jugo C2. Estos resultados muestran el efecto antimicrobiano y modulador del jugo C2 y cómo podría contribuir como coadyuvante en el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus* y *H. pylori*.

Abstract

Antimicrobial resistance is a public health problem, considered a silent pandemic. It is estimated that by 2050 there will be more than 39 million deaths related to infections caused by multidrug-resistant microorganisms. One of these bacteria is *Helicobacter pylori*, classified as a Group 1 carcinogen. An alternative therapy is the use of probiotics, primarily from fermented foods, to consume the products of bacterial metabolism. These products are proposed as adjuvants due to their antimicrobial properties and their ability to modulate gastrointestinal dysbiosis. Therefore, the objective of this project was to evaluate a blackberry-based beverage fermented with whey and lactic acid bacteria (*Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactocaseibacillus casei*, and *Lactocaseibacillus rhamnosus*) in co-culture against *H. pylori* in in vitro and in vivo models. The results obtained showed physicochemical changes related to fermentation, such as lactic acid synthesis and the biotransformation of phenolic compounds, reflected in the antioxidant activity determined using ABTS and DPPH radicals. The production of antimicrobial metabolites such as lactic acid, acetic acid, and low molecular weight peptides was also determined. The C2 beverage (*L. casei* and *L. rhamnosus*) exhibited the best probiotic properties and was used against *H. pylori*. A bactericidal and lysis effect was observed on pathogenic strains of *H. pylori* in in vitro models. Finally, in vivo analysis was performed on a *Caenorhabditis elegans* model infected with *Staphylococcus aureus* and *H. pylori*; longer lifespan and improved health characteristics were observed with C2 juice supplementation. These results show the antimicrobial and modulating effect of C2 juice and how it could contribute as an adjunct in the treatment of infections caused by *S. aureus* and *H. pylori*.

CAPÍTULO I

1.1 Introducción a la investigación

La resistencia a los antimicrobianos es un mecanismo de supervivencia de los microorganismos, siendo parte de la sobreexposición a antibióticos. Es un efecto indeseable que se asocia con una mayor mortalidad, morbilidad y coste del tratamiento farmacológico en personas enfermas (1). Se ha observado un aumento exponencial en la cantidad de bacterias resistentes que colonizan al ser humano (2) sin tratamiento farmacológico eficaz.

En relación con ello, la síntesis de nuevos esquemas farmacológicos con mecanismos de acción diferentes son necesarios. Se ha demostrado que los alimentos contienen metabolitos antimicrobianos como los ácidos orgánicos (AO) y antioxidantes (polifenoles), que actúan como coadyuvantes en este tipo de enfermedades (3–5). Al respecto, los alimentos fermentados con bacterias ácido-lácticas (BAL), se conocen por sus efectos benéficos a la salud humana, ya que modulan la microbiota intestinal y sintetizan metabolitos con propiedades antimicrobianas, como los AO y los péptidos. Además, las BAL presentan características adaptativas a diferentes matrices alimentarias; por lo que han sido identificadas y aisladas de productos lácteos (6,7), verduras (8), cereales y frutas (9).

La fermentación láctica es una alternativa industrial y ancestral de conservación de alimentos, permitiéndoles incrementar su vida de anaquel (10). Entre estos alimentos las frutas suelen ser muy utilizadas por su destacado potencial antioxidante, su contenido en fibra dietética y en carbohidratos, siendo un sustrato ideal para la fermentación ácido-láctica (9). No obstante, la evidencia es débil acerca de la caracterización y la posterior evaluación de las propiedades de los jugos de frutas fermentados con BAL, así como su impacto en la salud humana. Lo anterior debido a la complejidad del sustrato y la singularidad metabólica de las cepas involucradas en la fermentación, lo que dificulta generalizar los efectos de las BAL en monocultivo o cocultivo (11).

Por otro lado, la adición de otros nutrientes, como las proteínas, permite una mayor producción de biomasa bacteriana y metabolitos de interés, como AO, bacteriocinas y péptidos de bajo peso molecular. Por tanto, se recomienda adicionar otras materias primas como cereales (12), verduras (13), suero de leche (14), entre otros.

Por lo anterior, en el presente proyecto se planteó la caracterización fisicoquímica, antioxidante y peptídica de una bebida de zarzamora con suero de leche fermentada con cepas en cocultivo de BAL, las cuales fueron analizadas sobre sus posibles propiedades probióticas. Posteriormente, en relación con el efecto de la resistencia a los antibióticos

se decidió determinar las propiedades antimicrobianas con cepas patógenas de referencia, seguido de *Helicobacter pylori*, una cepa prioritaria causante de gastritis crónica, úlceras pépticas, linfoma del tejido linfoide y cáncer gástrico (15).

Se sabe de los posibles efectos benéficos a la salud de este tipo de alimentos, pero pocos son los que abordan su impacto en modelos *in vivo*, en relación con ello, el modelo *Caenorhabditis elegans* ha demostrado ser un modelo eficaz que relaciona el efecto microbio-huésped (16), siendo este nematodo utilizado para los ensayos de actividad antimicrobiana.

1.2 Planteamiento del problema

La resistencia a los antibióticos se considera una crisis sanitaria global, por su uso desmedido. Este tipo de medicamentos se han vuelto ineficaces para el tratamiento de infecciones y convirtiendo a las enfermedades difíciles de tratar con una primera terapia (17). Su descontrol prevé que, para el 2050, estas infecciones sean la primera causa de muerte (18). Por otro lado, la población ha generado una preocupación por los alimentos que se consumen, tratando de disminuir los contaminantes industriales y optando por la medicina tradicional.

Haciendo énfasis en los posibles alimentos con propiedades antimicrobianas, destacan los productos fermentados con microorganismos probióticos, como las BAL, las cuales son generalmente reconocidas como seguras para el consumo humano (del inglés Generally Recognized As Safe-GRAS) (19). Entre sus efectos positivos a la salud destacan su capacidad de modulación de la microbiota y actividad antimicrobiana. Sin embargo, la información sobre bebidas a base de frutas fermentadas con BAL y sus propiedades bactericidas aún es escasa, ya que se modifican por el tipo de sustrato e inóculo (20).

Las bebidas a base de frutas fermentadas se proponen como un alimento en el esquema preventivo o como una alternativa coadyuvante en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos resistentes, como *H. pylori* (21). Esta bacteria se aloja principalmente en el estómago o en el duodeno del huésped. Causa gastritis, úlceras duodenales y gástricas, enfermedad peptídica y, cuando la infección es persistente, puede ocasionar cáncer gástrico, por lo cual es considerado un carcinogénico de tipo 1 por la Organización Mundial de la Salud (22).

Se estima que el 50% de la población infantil mundial está infectada con *H. pylori* y en un 70% en personas adultas (23). Esta infección representa el 90% de los casos de cáncer gástrico a nivel mundial (24). La terapia farmacológica tiene una efectividad mayor

al 75%; sin embargo, la alta resistencia a metronidazol y claritromicina ha reducido significativamente la tasa de erradicación, lo cual suele provocar la reinfección y en ocasiones se requiere una segunda terapia de antibióticos (25).

Por lo anterior, el uso de coadyuvantes se ha vuelto una alternativa, la cual es de interés para el desarrollo de este proyecto, incorporando evidencia científica en modelos de experimentación que permitan dilucidar sus efectos y mecanismos antibacterianos para poder escalar la evidencia a los estudios preclínicos y clínicos.

1.3 Justificación

El uso de coadyuvantes como los alimentos fermentados en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos patógenos de características resistentes a los antibióticos ha ganado importancia. Pues la evidencia apunta a una mejor respuesta al tratamiento, la disminución de efectos adversos relacionados a la terapia de antibióticos como la disbiosis intestinal. Además, algunos pacientes suelen abandonar el tratamiento con antibióticos o introducen coadyuvantes que consideran seguros por ser naturales, sin tener base científica. Por tanto, resulta preponderante demostrar experimentalmente que los productos fermentados a base de frutas pueden proveer metabolitos con propiedades no solo antimicrobianas, sino también sobre la respuesta antioxidante, de forma que contribuya a mejorar la salud humana.

Por otro lado, la infección por *H. pylori* va en aumento, principalmente en países en desarrollo, y su erradicación mediante terapia farmacológica no se ha logrado. La terapia a base de microorganismos probióticos, como las BAL y sus metabolitos generados en el proceso de fermentación ha tenido efectos positivos, pero aún no son claros sobre el control del *H. pylori*, y el restablecimiento de la disbiosis ocasionada por la infección. Se sabe que los probióticos metabólicamente activos se encuentran en derivados lácteos fermentados y que su consumo es bajo debido a la intolerancia a sus componentes proteicos.

Por lo anterior, en el presente proyecto se propone caracterizar un jugo de zarzamora con suero de leche fermentado con consorcios de BAL aisladas de pulque, zarzamora y aguamiel que, en ensayos anteriores, presentaron efectos antimicrobianos contra *H. pylori*. Un producto de este tipo puede ser un coadyuvante en el tratamiento de las personas vulnerables a la infección por *H. pylori* y que permita la disminución de efectos secundarios. Además, promover la adquisición y el consumo del fruto para proteger del estrés oxidativo gracias a los compuestos bioactivos que presenta en su composición química.

1.4 Hipótesis

El jugo de zarzamora fermentado con suero de leche y bacterias ácido-lácticas en cocultivo presentará actividad antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* *in vitro* e *in vivo*, gracias a sus metabolitos, propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de una bebida a base de zarzamora fermentada con suero de leche y bacterias ácido-lácticas en cocultivo contra *Helicobacter pylori* en modelos *in vitro* e *in vivo*.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Identificar los cambios en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida fermentada con BAL y suero de leche durante el almacenamiento en refrigeración, mediante la determinación de la viabilidad bacteriana, el pH, el porcentaje de ácido láctico, el color, la viscosidad y la estabilidad.
2. Determinar el contenido y la capacidad antioxidante total de la bebida fermentada con BAL y suero de leche en almacenamiento mediante técnicas espectrofotométricas.
3. Cuantificar el contenido de polifenoles y ácidos orgánicos en el jugo de zarzamora fermentado con BAL mediante cromatografía líquida y de gases.
4. Determinar las propiedades prebióticas de la bebida fermentada con un método de digestión *in vitro*.
5. Analizar las propiedades probióticas de las BAL a través de la determinación de hidrofobicidad, autoagregación, producción de exopolisacáridos, sobrevivencia en el tracto gastrointestinal, actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*, así como la resistencia a antibióticos.
6. Describir el perfil proteolítico de los inóculos de las BAL en la bebida, a partir de su purificación y electroforesis SDS-PAGE y la identificación de grupos aminos libres.
7. Evaluar la capacidad antimicrobiana de la bebida fermentada sobre *H. pylori*, mediante pruebas de letalidad en medios líquidos y sólidos.
8. Determinar el efecto del jugo de zarzamora fermentado con BAL en un modelo *in vivo* utilizando el nematodo *Caenorhabditis elegans* infectado con *S. aureus* y *H. pylori*.

1.6 Diagrama metodológico

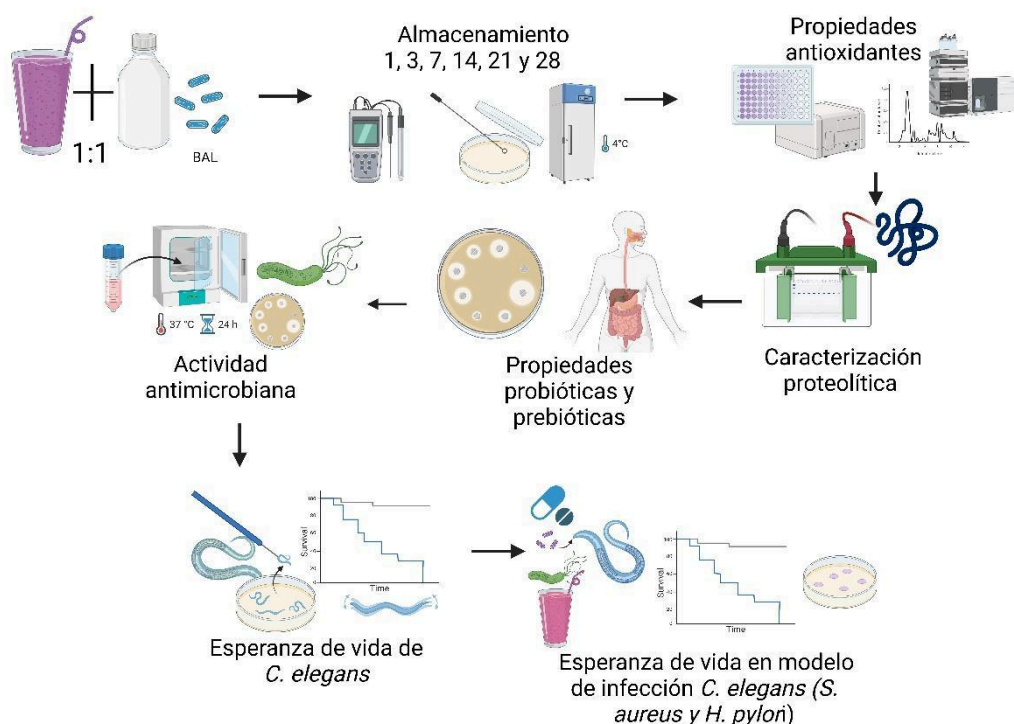


Figura 1.1 Diagrama metodológico.

El jugo de zarzamora se preparó a una concentración de 1:1 con suero de leche y fue inoculado con dos consorcios de BAL (C1: *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*; C2: *Lacticaseibacillus casei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*). Posteriormente, se determinaron sus propiedades fisicoquímicas y de viabilidad celular durante el almacenamiento de 28 días (capítulo III), seguido de la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides, así como su actividad antioxidante por diferentes métodos y su caracterización proteica durante el tiempo de fermentación (capítulo III). Se determinaron las propiedades probióticas de las BAL crecidas en medio MRS, que consisten en la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal, antibiograma, capacidad de agregación e hidrofobicidad y propiedades antimicrobianas (capítulo IV). Para determinar las propiedades antimicrobianas contra *H. pylori*, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y, a partir de ella, realizaron ensayos *in vitro* sobre la sobrevivencia de *H. pylori* y lisis de los mismos en un medio sólido, en comparación con antibióticos de referencia (capítulo V). Después, se observó el efecto del jugo fermentado sobre el modelo de *C. elegans* (capítulo VI), seguido de determinar las propiedades antimicrobianas del mismo jugo en el modelo de infección por *S. aureus* y *H. pylori* en *C. elegans* (capítulo VII).

1.7 Preparación de los jugos

1.7.1 Cultivos bacterianos

Las cepas de BAL fueron aisladas de aguamiel (*L. plantarum* y *P. acidilactici*), de pulque (*L. brevis*) y de leches fermentadas (*L. rhamnosus* y *L. casei*) como previamente fue descrito (26).

Los inóculos en monocultivo (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* y *L. casei*) y los cocultivos C1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici* y *L. brevis*) y C2 (*L. rhamnosus* y *L. casei*) fueron activados en agar MRS y sincronizados en caldo MRS a 37 °C por 24 h (Felisa FE-133D, Feligneo, México) en cada paso y se consideraron como cultivos frescos.

1.7.2 Preparación del jugo de zarzamora

Las zarzamoras (*Rubus fruticosus*) se obtuvieron localmente en Atotonilco el Grande, Hidalgo, México. Se siguió el método descrito por Cervantes-Elizarrarás (2017) (27) para obtener jugo clarificado. Las frutas se lavaron, se desinfectaron, se molieron y se filtraron con un colador convencional. El jugo se clarificó mediante centrifugación (10 000 rpm durante 30 min a 4 °C) y se esterilizó mediante termoultrasonido (50 ± 1 °C, 17 ± 1 min al 80 % de amplitud). Después del procesamiento, el jugo se congeló a -35 °C hasta su uso. El suero de leche (Holixlab) se preparó disolviendo 9,3 g/L en agua y se esterilizó a 121 °C durante 15 min antes de su uso.

1.7.3 Proceso de fermentación

El jugo clarificado de zarzamora y el suero estéril se mezclaron en una proporción 1:1 para producir una solución, ajustando el pH a 6 con NaOH 1 M. Las muestras se inocularon con el cultivo fresco de BAL. La biomasa se recolectó por centrifugación (10,000 rpm durante 15 min) y se resuspendió en la preparación del jugo, con un recuento inicial aproximado de 9 log UFC/10 mL. Las muestras utilizadas en todos los experimentos fueron las siguientes:

1. Cocultivo 1 (C1): inoculado con *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *L. brevis*.
2. Cocultivo 2 (C2): inoculado con *L. rhamnosus* y *L. casei*.
3. Control negativo (C-): sin inóculo.

Posterior a la inoculación, las muestras se incubaron a 37 °C durante 16 h (tiempo estimado en los ensayos experimentales, capítulo III).

El proceso descrito anteriormente fue el utilizado para la elaboración de la bebida en los diferentes ensayos realizados.

1.8 Referencias

1. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):692-9. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004
2. Nesme J, Cécillon S, Delmont TO, Monier JM, Vogel TM, Simonet P. Large-Scale Metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. *Current Biology*. 2014;24(10):1096-100. doi:10.1016/j.cub.2014.03.036
3. Timilsena YP, Phosanam A, Stockmann R. Perspectives on Saponins: Food Functionality and Applications. *Int J Mol Sci*. 2023;24(17):13538. doi:10.3390/ijms241713538
4. Anzano A, de Falco B, Ammar M, Ricciardelli A, Grauso L, Sabbah M, et al. Chemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* Lam. Leaves and Seeds. *Molecules*. 2022;27(24):8920. doi:10.3390/molecules27248920
5. Taleghani A, Eghbali S, Moghimi R, Mokaber-Esfahani M. *Crataegus pentagyna* willd. Fruits, leaves and roots: phytochemicals, antioxidant and antimicrobial potentials. *BMC Complement Med Ther*. 2024;24(1):126. doi:10.1186/s12906-024-04430-4
6. Cuevas-González PF, Reyes-Díaz R, Santiago-López L, Vallejo-Cordoba B, Hernández-Mendoza A, Beltrán-Barrientos LM, et al. Microbiological quality and native lactic acid bacteria diversity of artisanal Mexican cheeses: A review. *Food Res Int*. 2024;194:114876. doi:10.1016/j.foodres.2024.114876
7. Taye Y, Degu T, Fesseha H, Mathewos M. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *ScientificWorldJournal*. 2021;2021:4697445. doi:10.1155/2021/4697445
8. Alameri F, Tarique M, Osaili T, Obaid R, Abdalla A, Masad R, et al. Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Vegetable Products: Potential Probiotic and Postbiotic Characteristics Including Immunomodulatory Effects. *Microorganisms*. 2022;10(2):389. doi:10.3390/microorganisms10020389
9. Huang W, Dong A, Pham HT, Zhou C, Huo Z, Wätjen AP, et al. Evaluation of the fermentation potential of lactic acid bacteria isolated from herbs, fruits and vegetables as starter cultures in nut-based milk alternatives. *Food Microbiol*. 2023;112:104243. doi:10.1016/j.fm.2023.104243
10. Aguirre-Garcia YL, Nery-Flores SD, Campos-Muzquiz LG, Flores-Gallegos AC, Palomo-Ligas L, Ascacio-Valdés JA, et al. Lactic Acid Fermentation in the Food Industry and Bio-Preservation of Food. *Fermentation*. 2024;10(3):168. doi:10.3390/fermentation10030168
11. Sionek B, Szydłowska A, Küçükgöz K, Kołożyn-Krajewska D. Traditional and New Microorganisms in Lactic Acid Fermentation of Food. *Fermentation*. 2023;9(12):1019. doi:10.3390/fermentation9121019
12. Lingua MS, Gies M, Descalzo AM, Servent A, Páez RB, Baroni MV, et al. Impact of storage on the functional characteristics of a fermented cereal product with probiotic potential, containing fruits and phytosterols. *Food Chemistry*. 2022;370:130993. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130993
13. Paredes JL, Escudero-Gilete ML, Vicario IM. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. *LWT*. 2022;154:112728. doi:10.1016/j.lwt.2021.112728
14. Kotsaki P, Aspri M, Papademas P. Novel Whey Fermented Beverage Enriched with a Mixture of Juice Concentrates: Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant, and Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory (ACE) Activities Before and After Simulated

- Gastrointestinal Digestion. Microorganisms. 2025;13(7):1490. doi:10.3390/microorganisms13071490
15. Hasanuzzaman M, Bang CS, Gong EJ. Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori*: Mechanisms and Clinical Implications. *J Korean Med Sci*. 2024;39(4):e44. doi:10.3346/jkms.2024.39.e44
 16. Kim DH, Flavell SW. Host-microbe interactions and the behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neurogenetics*. 2020;34(3-4):500-9. doi:10.1080/01677063.2020.1802724
 17. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos [Internet]. 2020 [citado 22 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
 18. Camacho Silvas LA. Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Rev Esp Salud Publica*. 97:e202302013.
 19. USDA. FDA [Internet]. FDA; 2024 [citado 22 de abril de 2026]. Generally Recognized as Safe (GRAS). Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>
 20. Ruiz Rodríguez LG, Pescuma M, Van Nieuwenhove C, Mozzi F. A mini-review on health benefits and modulation of the gut microbiota by fermented fruit juices using lactic acid bacteria. *Food Bioscience*. 2025; 74:108011. doi:10.1016/j.fbio.2025.108011
 21. Nair MRB, Chouhan D, Sen Gupta S, Chattopadhyay S. Fermented Foods: Are They Tasty Medicines for *Helicobacter pylori* Associated Peptic Ulcer and Gastric Cancer? *Front Microbiol*. 2016; 7:1148. doi:10.3389/fmicb.2016.01148
 22. Instituto Nacional del Cáncer. *Helicobacter pylori* y el cáncer [Internet]. 2023 [citado 22 de abril de 2026]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/h-oja-informativa-h-pylori>
 23. Urrutia-Baca VH, Gonzalez Brosig KI, Salazar-Garza AA, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P, De La Garza-Ramos MA. Prevalence of Oral *Helicobacter pylori* Infection in an Indigenous Community in Southwest Mexico. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2023; 16:173-80. doi:10.2147/CEG.S424559
 24. Thrift AP, Wenker TN, El-Serag HB. Global burden of gastric cancer: epidemiological trends, risk factors, screening and prevention. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(5):338-49. doi:10.1038/s41571-023-00747-0
 25. Remes-Troche JM, Bosques-Padilla F, Cano-Contreras AD, Velarde-Ruiz Velasco JA, Bielsa-Fernández MV, Camorlinga Ponce M, et al. V consenso mexicano sobre el diagnóstico y tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Gastroenterol Mex*. 2026; 91(1):89-114. doi:10.1016/j.rgmex.2025.10.001
 26. Cervantes-Elizarrarás A, Cruz-Cansino N del S, Ramírez-Moreno E, Vega-Sánchez V, Velázquez-Guadarrama N, Zafra-Rojas QY, et al. In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. *Applied Sciences*. 2019;9(3):601. doi:10.3390/app9030601
 27. Cervantes-Elizarrarás A, Piloni-Martini J, Ramírez-Moreno E, Alanís-García E, Güemes-Vera N, Gómez-Aldapa CA, et al. Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017;34:371-9. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.009

CAPÍTULO II. Bebidas fermentadas con bacterias ácido-lácticas a base de frutas

2.1 Introducción

Existe un creciente interés en mejorar el estilo de vida a través de una nutrición de alta calidad, lo que está impulsando la demanda de productos alimenticios saludables, ricos en nutrientes naturales con actividad biológica. La elección de productos por parte de los consumidores a menudo está influida por el marketing, la información nutricional, las propiedades organolépticas y los beneficios percibidos para la salud (1).

La industria alimentaria ha respondido desarrollando productos menos procesados enriquecidos con compuestos bioactivos que reemplazan los aditivos artificiales (2). Los compuestos bioactivos ofrecen beneficios antioxidantes, antitrombóticos, inmunomoduladores, anticancerígenos, hipoglucemiantes y antimicrobianos, lo que impacta positivamente en el estilo de vida y la salud (3–5). En este sentido, la población considera como naturales aquellos alimentos que no han sufrido modificaciones fisicoquímicas, siendo los de mayor interés las frutas, verduras, cereales, granos y leguminosas.

Las frutas son alimentos perecederos de los cuales se conoce que generan grandes cantidades de desechos, relacionados con su mal manejo en la cadena de suministro, el almacenamiento inadecuado, la mala planeación en la compra y el consumo en los hogares, y con altos costos para aquellas frutas que no son de temporada. Si bien la conservación de frutas en cadena de frío es el método de elección de los productores, las frutas no climatéricas representan un mayor reto debido a su corta vida de anaquel, por lo que se emplean métodos biorracionales o la revalorización de los residuos.

Un método ancestral para la conservación de alimentos es la fermentación con microorganismos como levaduras y BAL. Su inoculación en los alimentos potencia las propiedades benéficas de los frutos, como la producción de metabolitos con propiedades antimicrobianas, así como los de origen antioxidante, ácidos orgánicos y de origen peptídico. Los estudios sobre las impresiones de los consumidores y la necesidad percibida de alimentos funcionales han informado que los probióticos son una alternativa elegida para tratar enfermedades gastrointestinales (6), así como para proporcionar actividad bactericida o bacteriostática (7) y propiedades antimicrobianas. Por tanto, la formulación de productos fermentados a partir de frutas ofrece una solución potencial considerada natural por los consumidores actuales (8–11).

Las BAL fermentativas utilizan principalmente carbohidratos y proteínas para producir metabolitos con propiedades organolépticas y antimicrobianas, entre ellos ácidos

grasos de cadena corta, bacteriocinas y exopolisacáridos (12). Además, son consideradas saludables para el consumo humano (13).

2.2 Bacterias ácido lácticas

Las BAL se clasifican como bacterias Gram-positivas (14), se caracterizan por la producción de ácido láctico (15). Se encuentran en una diversidad de alimentos y se han utilizado en la cocina tradicional como preservantes de alimentos naturales. Actualmente, a nivel científico, han ganado la atención por su capacidad para degradar polisacáridos y eliminar alérgenos (16), sintetizar péptidos bioactivos (17) y producir ácidos orgánicos de interés para la salud (18).

Estas bacterias se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas. Las homofermentativas utilizan lactosa para convertir el ácido pirúvico en ácido láctico e incluyen los géneros: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactobacillus helveticus*, mientras que las BAL heterofermentativas producen compuestos adicionales como dióxido de carbono y etanol a través de la vía de la fosfocetolasa. Las heterofermentativas obligatorias son *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus reuteri*, entre otras (19).

Las BAL también forman parte de la microbiota intestinal humana y presentan características probióticas, ofreciendo beneficios en condiciones como la diarrea y las infecciones (20,21). Las unidades terapéuticas mínimas de LAB con efecto probiótico se han reportado entre 6 y 9 log₁₀ UFC/mL (22). Además, se ha documentado que están involucradas en acciones como la resistencia a la colonización, la producción de ácidos grasos de cadena corta y la exclusión competitiva de patógenos (15,23).

Los ejemplos de cepas de BAL utilizadas en la fermentación de alimentos son *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* (23), las cuales se han documentado que exhiben efectos anticancerígenos (24,25), antimicrobianos (26), antidiabéticos (27), antiinflamatorios (16) (14), antialérgicos (28) y neuroprotectores (29,30).

Las BAL utilizan carbohidratos para la producción de energía y la síntesis de metabolitos secundarios y requieren nutrientes como aminoácidos, péptidos y vitaminas (31). Estos metabolitos se obtendrán del sustrato durante la fermentación, por lo que la cantidad y disponibilidad de cada nutriente en matrices complejas, como las bebidas de frutas, podrían limitar el tiempo de fermentación y la producción de metabolitos secundarios.

2.2.1 Fermentación láctica

La fermentación es un proceso antiguo que mejora el valor nutricional, la conservación y las propiedades organolépticas de los alimentos mediante la síntesis de compuestos volátiles como cetonas, aldehídos y alcoholes (32,33). Esta práctica se ha aplicado a diversas fuentes de alimentos, incluidos productos animales (34), cereales (35), verduras y frutas (36), ocurre a menudo de forma espontánea debido al metabolismo de los microorganismos de la superficie (37).

La fermentación en bebidas ha ganado atención por su valor nutricional, su mayor vida útil y la liberación de compuestos bioactivos, como antioxidantes y ácidos orgánicos (38). La fermentación láctica permite a las BAL obtener energía de los carbohidratos en condiciones favorables de pH, oxígeno, temperatura, entre otros factores (39). Son nativas de las frutas (10) y pueden prosperar en matrices vegetales desafiantes, como la acidez, los polisacáridos difíciles de digerir y los compuestos fenólicos antimicrobianos(40).

Las cepas de *Lactobacillus* son las que más se han utilizado en la fermentación de alimentos como las zanahorias, la col rizada y los zumos de frutas (41). Las cepas de *L. plantarum*, *L. sakei* y *L. coryniformis* se han aislado en jugo de col rizada fermentada sin aditivos. La cepa *L. plantarum* tiene la mejor actividad antimicrobiana y supervivencia a valores de pH bajos entre 2 y 3 (42). En los frutos de acaí amazónicos, el 48% de las cepas aisladas pertenecían a *Lactiplantibacillus* y *Pediococcus*, con actividad antimicrobiana contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* (43). Las cepas *L. brevis* y *L. plantarum* se han utilizado en el jugo de naranja fermentado, obteniendo actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* (44).

2.3 Metabolismo de las BAL y metabolitos secundarios

2.3.1 Propiedades del sustrato y vías metabólicas de la fermentación de BAL

Los sustratos ideales para el aumento de la biomasa bacteriana son los carbohidratos como la glucosa, la sacarosa y la fructosa, así como las proteínas como la caseína. El número de células viables de BAL depende principalmente de factores de crecimiento como el pH, la temperatura, el tiempo y el sustrato (45–47). Específicamente en las frutas, su contenido de carbohidratos, polifenoles, fibra dietética y micronutrientes les confiere un buen sustrato para la fermentación (48–52).

La madurez, la variedad y la estacionalidad de las frutas determinan su idoneidad para la fermentación (53), debido a su contenido de fibras solubles, pectinas y componentes de bajo peso molecular, como los ácidos orgánicos (52). Este grupo de alimentos se puede emplear en una amplia gama de compuestos para satisfacer las

necesidades nutricionales durante la fermentación (54). La Tabla 2.1 muestra algunos efectos de la fermentación ácido-láctica en jugos de fruta.

El jugo de aronia parece ser un sustrato adecuado para la fermentación mediada por *L. paracasei*, manteniendo la viabilidad celular incluso durante las tres semanas posteriores al término de la fermentación (55). Además, la fermentación láctica mejora las propiedades sensoriales mediante la producción de compuestos volátiles como aldehídos, ácidos, ésteres, cetonas, fenoles y terpenos en jugos de frutas mixtas (piña, melón de invierno y jugo de miel de longan) (32), en jugo de sandía (55) y en jugo de cereza (56). Los compuestos bioactivos de la mezcla de repollo, brócoli, zanahoria y betabel se relacionan con las propiedades antioxidantes después de la fermentación con *C. allii* y *L. lactis* (57). Otros metabolitos que mejoran con el proceso metabólico de las BAL son la síntesis de minerales y proteínas en el jugo de fresa, destacando su contenido de alanina, prolina, calcio, potasio, entre otros (58).

La producción de amilasas, proteasas y lipasas por las BAL promueve la escisión de sustratos complejos, facilitando así la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad de los metabolitos resultantes, como los ácidos grasos de cadena corta y los compuestos fenólicos (59).

Las principales vías metabólicas de las LAB son la glucólisis, la proteólisis y la lipólisis (19).

2.3.1 Glucólisis

La glucólisis ó vía de Embden-Meyerhof-Parnas es la principal vía del metabolismo de carbohidratos mediante un proceso enzimático anaeróbico para la producción de energía en las BAL (62). La glucosa se transporta a través de la pared celular mediante el sistema de fosfotransferasas (PTS) (63), el casete de unión a ATP (ABC) y los transportadores glucósido-pentósido-hexurónido (64), y se convierte en piruvato, seguido del lactato.

En consecuencia, la producción de ácido láctico por la lactato deshidrogenasa provoca una disminución del pH (65). Además, se producen otros ácidos orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, entre otros) (53) que facilitan la síntesis de acetato, etanol, CO₂ y exopolisacáridos como compuestos bioactivos (64).

La disminución de carbohidratos (fructosa y sacarosa) durante la fermentación del jugo de naranja con BAL (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* y *L. paracasei*) se relaciona con el aumento de la síntesis de ácido láctico (66). La fermentación de jugo de manzana con *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum*, se sintetizaron ácidos orgánicos (ácido málico, ácido láctico y ácido cítrico), los cuales se relacionan con las propiedades antimicrobianas contra *E. coli* y *S. aureus* (67).

Tabla 2.1. Bebidas vegetales fermentadas con BAL y sus metabolitos

Jugo frutal	Sustrato	Inóculo	Biomasa obtenida	Metabolitos identificados después de la fermentación	Efectos del producto final	Referencia
Aronia	Glucosa, fructosa, sorbitol	<i>L. paracasei</i> SP5	9.5 Log UFC/mL	Ácido láctico, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos orgánicos	Incremento de las propiedades antioxidantes y alta viabilidad celular en almacenamiento	(55)
Repollo, brócoli, zanahoria y betabel	Carbohidratos, proteína, fibra cruda y grasas	<i>C. allii</i> WiKim39, <i>L. lactis</i> WiKim0124	8 Log UFC/mL	Ácido láctico, cítrico, D-Leucídico, ácido 3-feniláctico y glucónico	Las fuentes bioactivas tienen una correlación positiva con las propiedades antioxidantes.	(57)
Piña, melón de invierno, miel longan	Glucosa y sucrosa	<i>L. plantarum</i> TISTR 1465, <i>L. salivarius</i> TISTR 1112, <i>S. boulardii</i> CNCM I-745	7.9 Log UFC/mL	Ácido láctico, alcohol, aldehídos, ésteres, cetonas, fenol y terpeno	La actividad anti-salmonella aumenta la capacidad antioxidante y obtiene una puntuación superior a 7 sobre 9 en la evaluación sensorial.	(32)
Sandía	NR	<i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> y <i>L. rhamnosus</i>	8 – 9 log UFC/mL	Sulcatona, 1-hexanol, 2-pentilfurano, 2-nonen-1-ol, 2,6 nonadien-1-ol, geranil acetona	Vinculación de la fermentación entre los perfiles sensoriales y volátiles	(60)
Cereza dulce	Azúcares, ácido cítrico y ácido málico	<i>L. acidophilus</i> JYLA-16, <i>L. plantarum</i> JYLP-375 y <i>L. rhamnosus</i> GG JYLR-005	8.5 Log UFC/mL	Ácidos láctico, málico, cítrico, L-ascórbico, shikímico y fumárico, ácido succínico, aldehídos, alcoholes y ésteres.	La fermentación mejora el sabor	(16)

Mango	Pasta de mango, sacarosa y glicerol	<i>L. plantarum</i> MGL-8.	NR	Biosurfactante de glicoproteína	Producción mejorada de biosurfactantes a partir de residuos de mango	(61)
Fresa con leche de oveja semidesnatada	Inulina de sacarosa y almidón de patata	<i>L. plantarum</i> CECT_8328	9 Log UFC/mL	Ala, Arg, Cys, His, Met, Phe, Pro, Ser, Val, calcio, magnesio, fósforo, zinc, potasio	Fuente de minerales y proteínas	(58)

NR: no reportado; Log UFC/mL: Logaritmo Unidades Formadoras de Colonias sobre un mililitro; Ala: Alanina; Arg: Arginina; Cys: cisteína; His: Histidina; Met: Metionina; Phe: Fenilalanina; Pro: Prolina; Ser: Serina; Val: Valina.

2.3.2 Proteólisis

Las BAL utilizan enzimas proteolíticas para obtener los compuestos nitrogenados necesarios para su crecimiento, e incluyen serin-proteinasas, cisteína proteinasas, aspartil proteinasas, metaloproteinasas y treonina peptidasas (68). La degradación de proteínas comienza con la actividad de las proteinasas de membrana celular (PrtP), donde grandes dominios proteicos se descomponen en oligopéptidos. Estos oligopéptidos son transportados al espacio intracelular por la permeasa de oligopéptidos, un transportador de iones, y por el sistema ABC (DtpT y Opp). Entre las endopeptidasas celulares, las aminopeptidasas (PepN y PepC) y la X-propil dipeptidil aminopeptidasa (PepX) descomponen los oligopéptidos en péptidos más pequeños, seguidas de las dipeptidasas y tripeptidasas, que producen aminoácidos individuales (69). Estos últimos son los encargados de aportar el sabor al producto final, como es el caso de la metionina y la cisteína (65).

El sistema proteolítico está regulado por diversos factores fisicoquímicos que afectan principalmente al crecimiento celular, incluyendo el pH y la temperatura en las proteínas de la pared celular. Se ha documentado que, de forma general, en medios de cultivo específicos o matrices alimentarias, las condiciones óptimas de pH se encuentran, en promedio, entre 5.5 y 7.0 y un rango de temperatura entre 30 y 50 °C (70). Específicamente, en *L. plantarum* en agar MRS, el rango óptimo de pH es de 8.0 y 40 °C de temperatura de fermentación (71); para *L. rhamnosus* en agar MRS, se ha documentado un pH óptimo de 6.5 y 44 °C de temperatura (72), mientras que 7.2 y 37-42 °C para *L. paracasei* (73), respectivamente.

La actividad proteolítica depende en mayor medida de la cepa utilizada (74). Las diferencias pueden deberse a diferentes factores: los cambios y mutaciones en genes involucrados en la síntesis de proteínas extracelulares, las condiciones en las que se lleva a cabo la actividad enzimática (75).

En salchichas inoculadas con *L. plantarum*, se encontraron un total de 26 péptidos con secuencias de aminoácidos de entre 5 y 27 aminoácidos de longitud menores de 3 kDa, siendo actina y miosina los principales aminoácidos, estos mismos presentaron actividad antioxidante (76), así como con capacidad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) en leche de cabra (77). *L. brevis* KT16-2-CFS se ha utilizado para hidrolizar gluten de trigo, produciendo péptidos hidrolizados de entre 28 y 66 kDa con efecto antimicrobiano contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *P. aeruginosa*) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *M. luteus*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecium* y *Bacillus cereus*) (78).

2.3.3 Lipólisis

Las BAL poseen esterasas en el citoplasma que hidrolizan el enlace éster carboxílico de los ácidos grasos de cadena corta y larga (79), liberando ácidos grasos libres importantes para la industria láctea, como ésteres y ácidos grasos de cadena ramificada (80). Sin embargo, la mayoría de las BAL contienen esterasas en su espacio intracelular (81), permitiendo la síntesis de ésteres aromáticos a partir de ácidos grasos de cadena corta (82), como Ip_3561 en *L. plantarum* WCFS1 (83). En cepas de *Lactococcus* y *Lactobacillus*, las esterasas intracelulares se encuentran en concentraciones más altas que en otras BAL (81,83).

El contenido de lípidos en las frutas es inferior al 1%, por lo que el uso de este nutriente en la fermentación de las BAL no es significativo. Sin embargo, algunos estudios han reportado un aumento de los compuestos volátiles de origen lipídico tras la fermentación. En un jugo de “fruta de serpiente” (*Salacca zalacca*) fermentado con *L. plantarum*, se encontró que la presencia de los ésteres metílicos de ácidos grasos, hexanoico y caproico, y de metilo es responsable del olor afrutado (84).

La actividad antimicrobiana de los lípidos o de sus metabolitos se ha estudiado de forma limitada, pero se conoce que su interacción con péptidos forma compuestos con propiedades antimicrobianas. Por ejemplo, el lipopéptido Anti-LM7 sintetizado por *Bacillus* sp. aislado de soja fermentada (Chungkookjang) demostró actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *E. faecalis* y cepas fúngicas (*Aspergillus clavatus* y *Fusarium moniliforme*) (85).

2.4. Propiedades antibacterianas de los metabolitos de jugos de frutas fermentados

Los fermentos son alimentos de fácil preparación, con estabilidad, capacidad de producción de biomasa, bajo impacto en propiedades sensoriales indeseables y de larga vida útil (86). Los jugos de fruta fermentados con BAL son matrices complejas si nos enfocamos en su composición, por lo que el potencial antibacteriano de estas matrices no depende de un único metabolito. Si se enlistan los posibles metabolitos antimicrobianos, las BAL sintetizan peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido acético y sustancias de bajo peso molecular (diacetilo, ácidos grasos, reuterina, reuteriicina), compuestos antifúngicos (lactato de fenilo, propionato, lactato de hidroxifenilo) y bacteriocinas (87).

Por ejemplo, el ácido láctico y componentes bioactivos (fenoles y ácido ascórbico) de la fruta en el jugo de maracuyá mezclado con coco y fermentado con *L. plantarum*, mostró actividad antimicrobiana frente a *S. enterica* serovar Typimorium, *E. coli* y *B. cereus* (88), y el jugo de albaricoque japonés fermentado con *L. acidophilus* mantuvo la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* y su actividad se

podría relacionar con la síntesis de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, dióxido de carbono, bacteriocinas (89). Se observó un efecto sinérgico entre los diferentes compuestos sintetizados durante la fermentación (ácidos orgánicos y metabolitos bacterianos) y los compuestos inherentes a la propia matriz (compuestos bioactivos).

Entre los metabolitos más notables con actividad antimicrobiana en los jugos fermentados de frutas se encuentran el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, polifenoles y péptidos, entre ellos las bacteriocinas (Tabla 2.2)

Tabla 2.2 Actividad antimicrobiana de jugos fermentados con BAL en monocultivo y cocultivo.

Jugo de fruta	Inóculo	Metabolito de interés antimicrobiano	Actividad antimicrobiana contra	Inhibición	Referencia
Monocultivo					
Higo	<i>L. plantarum</i>	Flavonoides y carotenoides	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>L. monocytogenes</i>	13.3-19.67 mm	(90)
Sandía	<i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> y <i>P. pentosaceus</i>	Ácidos orgánicos	<i>Salmonella</i> spp. y <i>E. coli</i>	Cuenta viable <10 UFC/mL	(60)
Fruta de la pasión y coco	<i>L. plantarum</i>	Ácidos orgánicos y péptidos bioactivos	<i>S. enterica</i> y <i>E. coli</i>	25-30 mm	(88)
Co-cultivo					
Caña	<i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> (5% en 50 mL)	Ácido láctico	<i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	13.0-17.3 mm	(91)
Arandano	<i>B. coagulans</i> , <i>L. plantarum</i> , y <i>S. cerevisiae</i> (5)	Ácidos orgánicos	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	30 mm	(92)
Albaricoque japonés	<i>L. acidophilus</i> y <i>T. delbrueckii</i> (5)	Ácidos orgánicos	<i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	MIC 990 ul/mL	(89)

2.4.1 Efecto antimicrobiano de los antioxidantes

Los antioxidantes de las frutas son principalmente polifenoles, aunque algunos ácidos orgánicos, oligosacáridos, péptidos y ácidos grasos podrían aumentar la capacidad antioxidante del zumo de fruta. Los mecanismos antioxidantes incluyen la conversión de radicales en especies no radicales, la reducción total de especies incompletamente reducidas, así como la interrupción de la reacción en cadena tras la acción de especies reactivas (93). Sin embargo, la actividad antimicrobiana derivada de la acción antioxidante se asocia con la interferencia en la formación de biopelículas por bacterias patógenas (94), la reducción del pH, con la consiguiente alteración de la permeabilidad de la membrana (90), y la alteración de la función de barrera, lo que resulta en la fuga de materiales intracelulares (95).

Se ha demostrado que la epigallocatequina-3-galato y la 3-O-octanoil-epicatequina también causan agregación celular patógena, reduciendo la absorción de nutrientes y mostrando un efecto bactericida (96). Además, la floretina y la flavanona presentan actividad antibiofilm contra *Vibrio parahaemolyticus*, inhibiendo el crecimiento de células planctónicas al actuar directamente sobre la biosíntesis de señales de quórum-sensing, reduciendo así la formación de biofilm (97).

En el jugo de espino amarillo, un alimento usado en la medicina tradicional China, sus propiedades antibacterianas y antifúngicas se asociaron a su contenido de polifenoles, flavonoides y ácidos orgánicos, demostrando una supresión del 70 % contra *E. coli*, *S. aureus* y *Botrytis cinerea*, respectivamente. Tras la fermentación con *L. plantarum*, el porcentaje de inhibición aumentó al 90 %; este aumento se relacionó con la síntesis de proteínas bacteriostáticas y de ácidos orgánicos (98).

Algunos antioxidantes también aumentan la permeabilidad de la membrana, elevan la presión osmótica intracelular, modifican el potencial redox y dificultan la producción de nutrientes, lo que provoca cambios en la morfología celular (ruptura, picadura y colapso). En jugo de higo fermentado con *L. plantarum*, se detectó, mediante el aumento del contenido de flavonoides y carotenoides tras la fermentación, un efecto inhibidor contra *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (90).

Adicionalmente, se ha analizado la eficacia antibacteriana de las fracciones de antocianinas y de las sustancias fenólicas del jugo de aronia, así como del jugo completo, contra *Bacillus cereus*. Los científicos demostraron que las fracciones de antocianina fueron más eficaces que el jugo completo para reducir la viabilidad de *B. cereus* (61 % frente a 50 %, respectivamente) (99). Por lo tanto, la cantidad de compuestos fenólicos en el jugo de fruta y su interacción entre sí pueden limitar la eficacia antibacteriana general del producto.

El contenido de antioxidantes de los jugos de fruta podría considerarse un factor limitante en el crecimiento de BAL durante la fermentación y el almacenamiento. Sin embargo, se ha demostrado la adaptación de las BAL a este tipo de sustrato (jugos con alto contenido de antioxidantes), relacionada con el contenido de carbohidratos y el metabolismo de los antioxidantes, y han observado que la bioconversión-metabolismo de compuestos fenólicos está estrechamente relacionada con el sustrato y la cepa de BAL (100), lo que permite el crecimiento durante la fermentación, así como su viabilidad durante el almacenamiento. Por ejemplo, en el jugo de naranja, la viabilidad de *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *B. longum*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. acidophilus* aumentó en un log UFC/mL después de la fermentación. Sin embargo, sólo los jugos fermentados con las cepas *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. paracasei* mostraron mayor actividad antioxidante medida por el método del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), posiblemente debido a la mayor disponibilidad y al contenido de compuestos con capacidad donadora de protones, como la vitamina C, que también se incrementó (66).

Los polifenoles se metabolizan en las BAL mediante la acción de la polifenol oxidasa y las peroxidasas para reducir las especies reactivas de oxígeno, con una acción desintoxicante colateral, aumentando así la viabilidad de las BAL. Por ejemplo, en la fermentación de jugo de chirimoya con *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. rhamnosus*, el aumento de la actividad antioxidante, medida mediante DPPH y ORAC, no afectó la viabilidad de las BAL (8).

2.4.2 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son compuestos hidrosolubles que contienen uno o más grupos carboxilo (101). La fermentación láctica de frutas y verduras para la elaboración de jugos produce AO como ácido láctico, ácido málico y ácido acético (55,56,102,103). Los AO tienen actividad bioconservante y antimicrobiana debido a la reducción del pH extracelular, alterando el potencial de membrana y afectando su permeabilidad, previniendo así el crecimiento y la proliferación de microorganismos patógenos (104).

La fermentación de jugo de sandía con monocultivo de *L. brevis*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *P. pentosaceus* redujo el pH de 4.4 a 3.3, incrementando la síntesis de ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico. Los recuentos de *E. coli* y de *Salmonella* spp. fueron menores a 10^3 UFC/mL y 10^2 UFC/mL, respectivamente, inferiores a los establecidos por el Reglamento de la Comisión Europea (60).

En jugo de arándano fermentado utilizando un consorcio de *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidipiscis* y *S. cerevisiae*, aumentó la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. enterica* serovar Typhimurium (36.6 mm de zona de inhibición, en promedio), relacionado con la síntesis AO como ácido

cítrico, láctico, tartárico, acético y fumárico, al comparar con la muestra no fermentada, la actividad antimicrobiana se perdió (92). Este efecto también se observó en jugo de caña de azúcar fermentado con *Lactococcus* y *Lactobacillus*, con una zona de inhibición de 13.0 – 17.3 mm, cuando se expuso a *Salmonella*, *E. coli* y *S. aureus* (91). El efecto antimicrobiano se asoció con la reducción del pH (<5.0) por la síntesis de ácido acético, ácido láctico y ácido propiónico. Por lo tanto, el pH bajo es un factor clave para la actividad antibacteriana de los AO; su eficacia está relacionada con valores de pKa de 3.0-5.0, así como con la concentración de AO tras la fermentación, las propiedades de la matriz y el tiempo de exposición. La fracción no disociada a valores de pH de 3.0 a 5.0 conduce a una mayor permeabilidad de la pared celular (105). Este fenómeno provoca un mayor gasto de ATP para restablecer el equilibrio del pH citoplasmático, lo que resulta en un desequilibrio metabólico (106).

2.4.3 Péptidos antimicrobianos: Bacteriocinas

Las cepas de *Lactobacillus* exhiben actividad antimicrobiana mediante la producción de subproductos metabólicos peptídicos, como las bacteriocinas (107). compuestos por 30 a 60 aminoácidos (31). Se producen de forma natural y actúan como un eficaz sistema de defensa antagónico, inhibidor y antimicrobiano contra microorganismos patógenos (108). Además, controlan las bacterias patógenas resistentes a los antibióticos, lo cual es un efecto indeseable de la automedicación (15).

En cuanto a sus mecanismos de acción, estos incluyen la degradación de componentes celulares como la síntesis de peptidoglicanos, la inhibición de moléculas secretadas por las paredes celulares, proteínas o ácidos nucleicos, y la degradación de membranas (109). Las investigaciones sobre *H. pylori* para probar la eficacia de la bacteriocina PLNC8 demostraron que puede actuar a través de tres mecanismos diferentes: colapsando la estructura de la membrana, rompiendo los niveles de ATP reduciendo su energía e impidiendo su crecimiento, y disminuyendo su viabilidad en mezcla con peróxido de hidrógeno, posiblemente por la lisis bacteriana y en consecuencia la pérdida de actividad de la catalasa, una enzima importante para la supervivencia de *H. pylori* (110).

La generación de bacteriocinas durante la fermentación de jugos de fruta puede ser difícil debido a la complejidad de los sustratos y de los metabolitos de fermentación que se generan, los cuales pueden restringir su supervivencia (111). La adopción de nuevas tecnologías puede abordar este problema si se reemplaza el medio fresco de BAL. Las tecnologías basadas en la perfusión de flujo tangencial alterno (ATF) permiten que los metabolitos puedan drenarse continuamente. Este sistema se ha utilizado para aumentar la producción de la bacteriocina CLK_01, que demostró actividad

antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *M. luteus* y *S. argenteus*) y gramnegativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*). Esta estrategia disminuye los efectos perjudiciales de los metabolitos secundarios en la supervivencia de *L. rhamnosus*, cuando se cultiva en un medio MRS 2X en un sistema de perfusión de lotes alimentados (112).

Además, se ha observado que una respuesta defensiva de las bacterias ante la presencia de patógenos estimula la producción de bacteriocinas (113). Por lo tanto, es importante evaluar la síntesis de bacteriocinas en zumos de fruta mediante investigaciones *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, no debe ignorarse la estimulación de variantes de bacteriocinas con propiedades ventajosas. Por ejemplo, se ha demostrado que, en presencia de *Lactococcus monocytogenes*, *Lactococcus lactis* produce la variante de bacteriocina nisina Z, la cual presenta mejor difusión y mayor solubilidad a pH neutro (114).

Las bacteriocinas también pueden ejercer sinergia con algunos antibióticos, como la penicilina (115) y la oxacilina (116), con compuestos antimicrobianos como el ácido láctico o el ácido cítrico (117), o con antioxidantes como la curcumina (118). La sinergia entre las bacteriocinas y otros antibióticos podría prevenir la resistencia a los antibióticos (115,119), lo que sugiere su posible uso como coadyuvantes durante la terapia con antibióticos.

2.5. Evidencia *in vivo* del efecto antimicrobiano

Las bebidas fermentadas están ganando cada vez más reconocimiento por sus beneficios más allá de la nutrición básica, con un énfasis creciente en una vida saludable. Por lo tanto, es necesario analizar sus efectos *in vivo* para evaluar su eficacia y seguridad. El efecto antimicrobiano de las bebidas fermentadas de frutas con BAL se ha estudiado en modelos celulares, en animales de experimentación y en ensayos clínicos (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Efectos antimicrobianos de bebidas fermentadas en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Jugo de frutas	Modelo	Diseño del estudio	Parámetros evaluados	Efecto	Referencia
Modelos <i>in vitro</i>					
Pera	Células de la monocapa Caco-2	Se añadieron 8 Log UFC/mL de cada inóculo <i>Lactobacillus</i> vs <i>Shigella flexneri</i>	Antiadherencia de <i>S. flexneri</i>	El valor de adhesión de <i>S. flexneri</i> disminuyó y <i>L. acidophilus</i> (22.37%) presentó un mayor efecto inhibidor que <i>L. fermentum</i> (18.13%).	(120)
<i>In vivo</i> models					
Arándano	Ratones machos C57BL/6 HFD.	Cultivo: <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidipiscis</i> y <i>S. cerevisiae</i> (70:18:6:3:1:2), diluidos 1:10 en agua ad libitum por 17 semanas.	Acumulación de grasa, composición de la microbiota	↓ Acumulación de grasa, ↑ Homeostasis de glucosa Baja abundancia de <i>Firmicutes</i> y abundancia relativa aumentada de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>	(11)
Huyou	Ratones con obesidad (C57BL/6J) inducidos por HFA–HFD	100 ml de HJ fueron inoculados con <i>L. plantarum</i> L1 y <i>L. fermentum</i> L2, se administraron 10 ml/kg de peso por 8 semanas.	Abundancia relativa de la flora intestinal	Abundancia relativa de Bacteroidetes en el grupo de FHJ, incremento de 22.43% a 33.75%.	(121)
Piña	Ratón HFD–C57BL/6	Jugo fermentado con <i>L. pseudomesenteroides</i> y <i>L. plantarum</i> , ad libitum por 6 semanas y HFD.	Peso y parámetros sanguíneos relacionados con la homeostasis de la glucosa	Mejora la regulación de la glucosa en sangre, la preservación de los niveles de triglicéridos y la modificación de las especies bacterianas (<i>E. faecalis</i>).	(122)

Granada	Ratón HFD–C57BL/6	PJ fermentado con <i>L. paraplantarum</i> Dieta alta en grasa por 8 semanas	Parámetros sanguíneos relacionados con la homeostasis de la glucosa y el estrés oxidativo	Disminución de triglicéridos y citocinas proinflamatorias y biomarcadores oxidativos.	(8)
Pitanga	Larva Tenebrio molitor	Jugo de <i>E. uniflora</i> fermentado con <i>L. fermentum</i> , expuesto a Tenebrio infectado con <i>E. coli</i> 042	Esperanza de vida	Tasa de supervivencia superior al 80% en el papel infeccioso con <i>E. coli</i>	(123)

FHJ: Jugo fermentado de Huyon, HFA: asociado a la flora humana; HFD: dieta alta en grasas, HJ: jugo de Huyou; Log UFC/mL: logaritmo Unidades Formadoras de Colonias en un mililitro.

La evaluación de los efectos antimicrobianos en matrices complejas, como los zumos de fruta, limita su uso directo en modelos celulares. En este contexto, el zumo de melocotón fermentado con *L. acidophilus* y *L. fermentum*, a partir de 4.2 log UFC/mL e incubado anaeróbicamente a 37 °C durante 48 h, mostró un efecto inhibitor sobre *Shigella flexneri* cuando las cepas se coincubaron. En células de adenocarcinoma colorrectal CaCo-2, la cepa *L. acidophilus* presentó un mayor efecto inhibitor frente a *S. flexneri* que frente a *L. fermentum* (22.37 % frente a 18.13 %) (120).

En estudios *in vitro*, el sobrenadante libre de células de *L. brevis* tuvo acción antidiabética, inhibiendo la acción de la α -glucosidasa en un 85.8 % y de la α -amilasa en un 75.8 % (124). Utilizando un método de microdilución en caldo, el sobrenadante libre de células de col rizada fermentada mostró efecto antimicrobiano contra bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium perfringens*) y bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *S. enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *P. aeruginosa*) (42).

En modelos animales, el interés de la investigación se ha centrado en el efecto probiótico de los jugos de fruta sobre la microbiota intestinal y en el control de enfermedades cardiometabólicas. El estudio con animales, la cepa de *L. plantarum* demostró un efecto hipocolesterolémico (reducción del colesterol del 23.33% al 40.23%) en un modelo de rata con hiperlipidemia (125). Además, se ha observado la regulación de la microbiota intestinal después de la suplementación con jugo de manzana turbio fermentado en un modelo de ratón obeso, disminuyendo la proporción de Firmicutes/Bacteroidetes y aumentando la presencia de Akkermansia y Bacteroides, asociados positivamente con la producción de ácidos grasos de cadena corta (126).

En ratones macho con dieta alta en grasas, el tratamiento con jugo de arándano y jugo de arándano fermentado (*L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. acidipiscis* y *S. cerevisiae*, 70:18:6:3:1:2) redujo los parámetros de obesidad, incluyendo la acumulación de grasa en el hígado y los tejidos grasos, el aumento de la sensibilidad a la insulina, la actividad hipoglucémica y la abundancia relativa de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (121). Estos cambios en la microbiota intestinal también se observaron en ensayos con ratones C57BL/6J con obesidad inducida por la inoculación de microbiota humana, y dieta rica en grasas, los cuales fueron alimentados con zumo de Huyou fermentado con *L. plantarum* y *L. fermentum* (121). Guérin et al. (2023) (122) también probaron el jugo de piña fermentado con *L. pseudomesenteroides* y *L. plantarum* en ratones HFD C57BL/6. A pesar de su alto

contenido de azúcar, los resultados mostraron que el consumo de esta bebida no altera la homeostasis de la glucosa ni la dislipidemia.

Una limitación del uso de modelos murinos es que no se han evaluado directamente los efectos antimicrobianos. Por lo tanto, se podrían exponer modelos de invertebrados a patógenos bacterianos para evaluar su efecto antimicrobiano. Por ejemplo, larvas de *Tenebrio molitor* infectadas con *E. coli* se alimentaron con jugo de *Eugenia uniflora* fermentado con *L. fermentum*. La tasa de supervivencia aumentó en comparación con las larvas no alimentadas y se observó un efecto antimicrobiano contra *E. coli* (123).

2.6. Jugo de zarzamora fermentado con BAL

Los frutos poco usados como sustrato para la fermentación con BAL son los de la familia de las moras. Este tipo de frutos se caracteriza principalmente por su contenido en antioxidantes del tipo antocianinas, de los cuales se conoce que tienen efectos benéficos para la salud (127). Sin embargo, son alimentos perecederos, limitando su consumo por el corto tiempo de almacenamiento; por ello, una alternativa de conservación es la fermentación ácido láctica. Además de ser usados como sustituto de alimentos lácteos fermentados (128). Los azúcares en esta familia se encuentran en menor concentración, por lo que añadir sacarosa u otras matrices alimentarias (como las ricas en proteína) es un enfoque eficaz para mejorar las cualidades y obtener un sustrato con efectos sinérgicos o aditivos (129). Además, el uso de berries en la elaboración de productos fermentados es una alternativa para combatir el deterioro de los alimentos y aumentar su aprovechamiento, haciendo biodisponibles los compuestos bioactivos para el consumidor (130).

Las zarzamoras (*Rubus fruticosus*) son frutos de la familia de las berries y se componen mayormente de agua (88%), seguidos de los carbohidratos (9.6 g/100 g), proteínas (1.39 g/100 g), grasas (0.49 g/100 g) y fibra dietética (5.3 g/100 g) (131). Se caracteriza por su contenido en antocianinas que otorgan el color y olor característicos del fruto (132,133). Su fermentación aumenta el contenido de polifenoles y flavonoides, aumentando su contenido en terpenos y ésteres, lo cual modifica sus propiedades sensoriales. Este efecto fue reportado en el jugo elaborado de una mezcla de moras (frambuesa, mora y mora) e inoculado con *L. fermentum* FUA033 (134) en la mezcla de jugo de zarzamora kiowa y pera fermentado con *L. helveticus* y *B. longum* (130) en el simbiótico de jugo de zarzamora con suero de leche inoculados con dos consorcios de BAL (C1: *L. plantarum*, *L. brevis* y *P. acidilactici*; C2: *L. rhamnosus* y *L. casei*) (135) y la adición de zarzamora en el hidromiel fermentado con *L. plantarum* (136).

Por otro lado, los jugos de berries fermentados se han propuesto como productos con posibles propiedades antibacterianas, por sus metabolitos sintetizados durante la fermentación. La fermentación de 60 días, con inóculos caseros de jugo de mora, tuvo propiedades antimicrobianas contra *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* mediante una técnica de difusión en disco con diámetros de 10-35 mm, en promedio (92). En el jugo de frambuesa fermentado con *Limosilactobacillus fermentum*, determinaron propiedades benéficas para la microbiota colónica en un modelo *in vitro* de fermentación colónica, efecto relacionado con la promoción de la abundancia de géneros benéficos (*Lactobacillaceae* y *Prevotellaceae*) y la síntesis de metabolitos antimicrobianos como el ácido láctico (134).

Aún se requieren mayores análisis en los jugos de zarzamora y sus mezclas con otras matrices alimentarias para determinar su estabilidad fisicoquímica durante la fermentación y almacenamiento, la sobrevida y funcionalidad de las BAL, y determinar si sus efectos antimicrobianos no impactan negativamente a la salud del huésped.

2.7. Suero de leche como sustrato complementario

El suero de leche es un subproducto que se obtiene después de la coagulación y el filtrado de la cuajada en la producción de queso (137). Su producción mundial supera los 200 millones de toneladas al año (138) y plantea un desafío ambiental, debido a su alta carga orgánica y su poca difusión sobre su uso (139). Además, es reconocido como una fuente de proteínas de alto valor biológico, como la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina, también se caracteriza por su contenido en aminoácidos libres (140).

En relación a lo anterior, el suero de leche se ha propuesto como un sustrato para la fermentación por BAL, ofreciendo una alternativa para la mitigación de residuos contaminantes y la producción de metabolitos de interés biotecnológico y para la salud humana (141). Durante la fermentación del suero de leche se han identificado una diversidad de compuestos, destacando los ácidos orgánicos, exopolisacáridos, enzimas, péptidos, bacteriocinas (142). Se ha observado que la suplementación del suero favorece el aumento de biomasa bacteriana (141).

Ejemplo de ello, es la inoculación de *L. casei* en suero de leche y su posterior aplicación en un queso fresco mexicano, se identificaron al ácido láctico y ácido acético como los principales metabolitos antibacterianos contra las cepas *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (143).

2.8. Conclusión

El consumo de probióticos ha aumentado en la última década debido al creciente conocimiento sobre la regulación de la microbiota en el contexto de la salud

y la enfermedad. La producción de bebidas fermentadas con bacterias lácticas (BAL) también contribuye a incrementar el uso de frutas en la industria alimentaria para su conservación, como un proceso sostenible. Los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación de la fruta con BAL, como los ácidos orgánicos, los polifenoles y los péptidos bioactivos, potencian su actividad antimicrobiana contra patógenos de interés, incluidas las bacterias resistentes a los antibióticos. Sin embargo, la evidencia actual de su efecto *in vivo* se ha limitado a estudios preclínicos en animales, centrados en rasgos metabólicos. Por lo tanto, consideramos que la investigación sobre los efectos *in vivo* de los zumos de frutas fermentados con BAL constituye un amplio campo de investigación en la actualidad. Además, la incorporación de la ómica para dilucidar los mecanismos antimicrobianos resultantes de la interacción de diversas cepas de BAL representa un área de investigación prometedora para el desarrollo de productos seguros para la sociedad.

2.9. Referencias

1. Topolska K, Florkiewicz A, Filipiak-Florkiewicz A. Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021;18(10). doi:10.3390/ijerph18105327
2. Anil P, Nitin K, Kumar S, Kumari A, Chhikara N. Food Function and Health Benefits of Functional Foods. En: *Functional Foods*. John Wiley & Sons, Ltd; 2022. p. 419-41. doi:10.1002/9781119776345.ch12
3. Konstantinidi M, Koutelidakis AE. Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. *Medicines*. 2019;6(3). doi:10.3390/medicines6030094
4. Serafini M, Peluso I. Functional Foods for Health: The Interrelated Antioxidant and Anti-Inflammatory Role of Fruits, Vegetables, Herbs, Spices and Cocoa in Humans. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(44):6701-15. doi:10.2174/1381612823666161123094235
5. Vega-Galvez A, Rodríguez A, Stucken K. Antioxidant, functional properties and health-promoting potential of native South American berries: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2021;101(2):364-78. doi:10.1002/jsfa.10621
6. Landström E, Hursti UKK, Magnusson M. «Functional foods compensate for an unhealthy lifestyle». Some Swedish consumers' impressions and perceived need of functional foods. *Appetite*. 2009;53(1):34-43. doi:10.1016/j.appet.2009.04.219
7. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol*. 2020;88(1):26-40. doi:10.1007/s00239-019-09914-3
8. Isas AS, Mariotti Celis MS, Pérez Correa JR, Fuentes E, Rodríguez L, Palomo I, et al. Functional fermented cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) juice using autochthonous lactic acid bacteria. *Food Research International*. 2020;138:109729. doi:10.1016/j.foodres.2020.109729

9. Park S, Son HK, Chang HC, Lee JJ. Effects of Cabbage-Apple Juice Fermented by *Lactobacillus plantarum* EM on Lipid Profile Improvement and Obesity Amelioration in Rats. *Nutrients*. 2020;12(4):4. doi:10.3390/nu12041135
10. Verón HE, Cano PG, Fabersani E, Sanz Y, Isla MI, Espinar MTF, et al. Cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice fermented with autochthonous *Lactobacillus plantarum* S-811. *Food Funct*. 20 de febrero de 2019;10(2):1085-97. doi:10.1039/C8FO01591K
11. Zhong H, Abdullah, Deng L, Zhao M, Tang J, Liu T, et al. Probiotic-fermented blueberry juice prevents obesity and hyperglycemia in high fat diet-fed mice in association with modulating the gut microbiota. *Food Funct*. 2020;11(10):9192-207. doi:10.1039/D0FO00334D
12. Wang Y, Wu J, Lv M, Shao Z, Hungwe M, Wang J, et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9. doi:10.3389/fbioe.2021.612285
13. Ruiz Rodríguez LG, Zamora Gasga VM, Pescuma M, Van Nieuwenhove C, Mozzi F, Sánchez Burgos JA. Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages. *Food Research International*. 2021;140:109854. doi:10.1016/j.foodres.2020.109854
14. Picon A. Cheese Microbial Ecology and Safety. En: *Global Cheesemaking Technology*. John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [citado 3 de julio de 2025]. p. 71-99. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119046165.ch0d> doi:10.1002/9781119046165.ch0d
15. Ayivi RD, Gyawali R, Krastanov A, Aljaloud SO, Worku M, Tahergorabi R, et al. Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*. 2020;1(3):3. doi:10.3390/dairy1030015
16. Wang D, Fan H, Wang B, Liu L, Shi Y, Zhang N. Effects of lactic acid bacteria fermentation on the physicochemical and structural characteristics of starch in blends of glutinous and japonica rice. *Journal of Food Science*. 2023;88(4):1623-39. doi:10.1111/1750-3841.16524
17. Cruz-Casas DE, Aguilar CN, Ascacio-Valdés JA, Rodríguez-Herrera R, Chávez-González ML, Flores-Gallegos AC. Bioactive protein hydrolysates obtained from amaranth by fermentation with lactic acid bacteria and *Bacillus* species. *Heliyon*. 2023;9(2). doi:10.1016/j.heliyon.2023.e13491
18. De Vuyst L, Leroy F. Functional role of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa fermentation processes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2020;44(4):432-53.
19. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol*. 2018;4(4):665-84. doi:10.3934/microbiol.2018.4.665
20. Hayek SA, Ibrahim SA. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*. 2013;4(11):73-87.
21. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(4):658-72.
22. Neffe-Skocińska K, Rzepkowska A, Szydłowska A, Kołożyn-Krajewska D. Chapter 3 - Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. En: Holban AM, Grumezescu AM, editores. *Alternative and Replacement Foods*. Academic Press; 2018 [citado 3 de julio de 2025]. p. 65-94. (Handbook of Food Bioengineering). Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128114469000034>

doi:10.1016/B978-0-12-811446-9.00003-4

23. Oliveira G, González-Molero I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*. 2016;63(9):482-94. doi:10.1016/j.endonu.2016.07.006
24. Bautista-Gallego J, Ferrocino I, Botta C, Ercolini D, Cocolin L, Rantsiou K. Probiotic potential of a *Lactobacillus rhamnosus* cheese isolate and its effect on the fecal microbiota of healthy volunteers. *Food Research International*. 2019;119:305-14. doi:10.1016/j.foodres.2019.02.004
25. Tarrah A, Castilhos J de, Rossi RC, Duarte V da S, Ziegler DR, Corich V, et al. In vitro Probiotic Potential and Anti-cancer Activity of Newly Isolated Folate-Producing *Streptococcus thermophilus* Strains. *Front Microbiol*. 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.02214
26. Pessione E, Cirrincione S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front Microbiol*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.00876
27. Huligere SS, Chandana Kumari VB, Alqadi T, Kumar S, Cull CA, Amachawadi RG, et al. Isolation and characterization of lactic acid bacteria with potential probiotic activity and further investigation of their activity by α -amylase and α -glucosidase inhibitions of fermented batters. *Front Microbiol*. 2023;13. doi:10.3389/fmicb.2022.1042263
28. Henrick BM, Rodriguez L, Lakshmikanth T, Pou C, Henckel E, Arzoomand A, et al. Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell*. 2021;184(15):3884-3898.e11. doi:10.1016/j.cell.2021.05.030
29. McGuinness AJ, Davis JA, Dawson SL, Loughman A, Collier F, O'hely M, et al. A systematic review of gut microbiota composition in observational studies of major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2022;27(4):1920-35.
30. Olorocisimo JP, Diaz LA, Co DE, Carag HM, Ibana JA, Velarde MC. *Lactobacillus delbrueckii* reduces anxiety-like behavior in zebrafish through a gut microbiome – brain crosstalk. *Neuropharmacology*. 2023;225:109401. doi:10.1016/j.neuropharm.2022.109401
31. Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*. 2017;22(8):8. doi:10.3390/molecules22081255
32. Laosee W, Kantachote D, Chansuwan W, Sirinupong N. Effects of Probiotic Fermented Fruit Juice-Based Biotransformation by Lactic Acid Bacteria and *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on Anti-Salmonella and Antioxidative Properties. *J Microbiol Biotechnol*. 2022;32(10):1315-24. doi:10.4014/jmb.2206.06012
33. Sevindik O, Guclu G, Agirman B, Selli S, Kadiroglu P, Bordiga M, et al. Impacts of selected lactic acid bacteria strains on the aroma and bioactive compositions of fermented gilaburu (*Viburnum opulus*) juices. *Food Chemistry*. 2022;378:132079. doi:10.1016/j.foodchem.2022.132079
34. Bhattacharya D, Nanda PK, Pateiro M, Lorenzo JM, Dhar P, Das AK. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products. *Microorganisms*. 2022;10(10):10. doi:10.3390/microorganisms10102058

35. Petrova P, Petrov K. Lactic Acid Fermentation of Cereals and Pseudocereals: Ancient Nutritional Biotechnologies with Modern Applications. *Nutrients*. 2020;12(4):4. doi:10.3390/nu12041118
36. Rajendran S, Silcock P, Bremer P. Flavour Volatiles of Fermented Vegetable and Fruit Substrates: A Review. *Molecules*. 2023;28(7):7. doi:10.3390/molecules28073236
37. Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*. 2013;33(1):1-10. doi:10.1016/j.fm.2012.09.003
38. Şanlıer N, Gökçen BB, Sezgin AC. Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;59(3):506-27. doi:10.1080/10408398.2017.1383355
39. Solomons NW. Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(4):S50-5. doi:10.1038/sj.ejcn.1601663
40. Torres S, Verón H, Contreras L, Isla MI. An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*. 2020;9(2):112-23. doi:10.1016/j.fshw.2020.02.006
41. Wuyts S, Van Beeck W, Oerlemans EF, Wittouck S, Claes IJ, De Boeck I, et al. Carrot juice fermentations as man-made microbial ecosystems dominated by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2018;84(12):e00134-18.
42. Szutowska J, Rybicka I, Pawlak-Lemańska K, Gwiazdowska D. Spontaneously fermented curly kale juice: Microbiological quality, nutritional composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Journal of Food Science*. 2020;85(4):1248-55. doi:10.1111/1750-3841.15080
43. Abe Sato ST, Marques JM, da Luz de Freitas A, Sanches Progenio RC, Nunes MRT, Mota de Vasconcelos Massafra J, et al. Isolation and Genetic Identification of Endophytic Lactic Acid Bacteria From the Amazonian Açaí Fruits: Probiotics Features of Selected Strains and Their Potential to Inhibit Pathogens. *Front Microbiol*. 2021;11. doi:10.3389/fmicb.2020.610524
44. Pérez MB, Argañaraz Martinez E, Babot JD, Pérez Chaia A, Saguir FM. Growth studies of dominant lactic acid bacteria in orange juice and selection of strains to ferment citric fruit juices with probiotic potential. *Braz J Microbiol*. 2022;53(4):2145-56. doi:10.1007/s42770-022-00830-1
45. Kaewarsar E, Chaiyasut C, Lailerd N, Makhamrueang N, Peerajan S, Sirilun S. Optimization of Mixed Inulin, Fructooligosaccharides, and Galactooligosaccharides as Prebiotics for Stimulation of Probiotics Growth and Function. *Foods*. 2023;12(8):8. doi:10.3390/foods12081591
46. Manzoor A, Qazi JI, Haq I ul, Mukhtar H, Rasool A. Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *J Biol Eng*. 2017;11(1):17. doi:10.1186/s13036-017-0059-2
47. Ren H, Zentek J, Vahjen W. Optimization of Production Parameters for Probiotic *Lactobacillus* Strains as Feed Additive. *Molecules*. 2019;24(18):18. doi:10.3390/molecules24183286
48. Charlton K, Kowal P, Soriano MM, Williams S, Banks E, Vo K, et al. Fruit and Vegetable Intake and Body Mass Index in a Large Sample of Middle-Aged Australian Men and Women. *Nutrients*. 2014;6(6):6. doi:10.3390/nu6062305

49. Karoline Ferreira Leite A, Vidal Fonteles T, Godoy Alves Filho E, Andrea da Silva Oliveira F, Rodrigues S. Impact of orange juice containing potentially prebiotic ingredients on human gut microbiota composition and its metabolites. *Food Chemistry*. 30 de marzo de 2023;405:134706. doi:10.1016/j.foodchem.2022.134706
50. Maldonado-Celis ME, Yahia EM, Bedoya R, Landázuri P, Loango N, Aguillón J, et al. Chemical Composition of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit: Nutritional and Phytochemical Compounds. *Front Plant Sci*. 2019;10. doi:10.3389/fpls.2019.01073
51. Stavitskaya Z, Dudareva L, Rudikovskii A, Garkava-Gustavsson L, Shabanova E, Levchuk A, et al. Evaluation of the Carbohydrate Composition of Crabapple Fruit Tissues Native to Northern Asia. *Plants*. 2023;12(19):19. doi:10.3390/plants12193472
52. Wibowo S, Essel EA, De Man S, Bernaert N, Van Droogenbroeck B, Grauwet T, et al. Comparing the impact of high pressure, pulsed electric field and thermal pasteurization on quality attributes of cloudy apple juice using targeted and untargeted analyses. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2019;54:64-77. doi:10.1016/j.ifset.2019.03.004
53. Mojikon FD, Kasimin ME, Molujin AM, Gansau JA, Jawan R. Probiotication of Nutritious Fruit and Vegetable Juices: An Alternative to Dairy-Based Probiotic Functional Products. *Nutrients*. 2022;14(17):17. doi:10.3390/nu14173457
54. Linares-Morales JR, Cuellar-Nevárez GE, Rivera-Chavira BE, Gutiérrez-Méndez N, Pérez-Vega SB, Nevárez-Moorillón GV. Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fresh Fruits and Vegetables Based on Their Antimicrobial and Enzymatic Activities. *Foods*. 2020;9(10):10. doi:10.3390/foods9101399
55. Bontsidis C, Mallouchos A, Terpou A, Nikolaou A, Batra G, Mantzourani I, et al. Microbiological and Chemical Properties of Chokeberry Juice Fermented by Novel Lactic Acid Bacteria with Potential Probiotic Properties during Fermentation at 4 °C for 4 Weeks. *Foods*. 2021;10(4):768. doi:10.3390/foods10040768
56. Wang J, Wei BC, Wang X, Zhang Y, Gong YJ. Aroma profiles of sweet cherry juice fermented by different lactic acid bacteria determined through integrated analysis of electronic nose and gas chromatography-ion mobility spectrometry. *Front Microbiol*. 2023;14:1113594. doi:10.3389/fmicb.2023.1113594
57. Lee M, Song JH, Choi EJ, Yun YR, Lee KW, Chang JY. UPLC-QTOF-MS/MS and GC-MS Characterization of Phytochemicals in Vegetable Juice Fermented Using Lactic Acid Bacteria from Kimchi and Their Antioxidant Potential. *Antioxidants*. 2021;10(11):11. doi:10.3390/antiox10111761
58. Balthazar CF, Santillo A, Guimarães JT, Capozzi V, Russo P, Caroprese M, et al. Novel milk–juice beverage with fermented sheep milk and strawberry (*Fragaria × ananassa*): Nutritional and functional characterization. *Journal of Dairy Science*. 2019;102(12):10724-36. doi:10.3168/jds.2019-16909
59. Ho JCK, Yin Sze L. Isolation, identification and characterization of enzyme-producing lactic acid bacteria from traditional fermented foods. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*. 2018;11:hzy004. doi:10.1093/biohorizons/hzy004
60. Mandha J, Shumoy H, Devaere J, Schouteten JJ, Gellynck X, de Winne A, et al. Effect of lactic acid fermentation of watermelon juice on its sensory acceptability and volatile compounds. *Food Chem*. 2021;358:129809. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129809

61. Sittisart P, Gasaluck P. Biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum* MGL-8 from mango waste. *J Appl Microbiol.* 2022;132(4):2883-93. doi:10.1111/jam.15452
62. Wu C, Li T, Qi J, Jiang T, Xu H, Lei H. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. *LWT.* 2020;122:109064. doi:10.1016/j.lwt.2020.109064
63. Kim BH, Gadd GM. *Prokaryotic Metabolism and Physiology*. Cambridge University Press; 2019. 509 p.
64. Mayo B, Aleksandrak-Piekarczyk T, Fernández M, Kowalczyk M, Álvarez-Martín P, Bardowski J. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. En: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd; 2010 [citado 7 de julio de 2025]. p. 3-33. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780813820866.ch1> doi:10.1002/9780813820866.ch1
65. Harper AR, Dobson RCJ, Morris VK, Moggré GJ. Fermentation of plant-based dairy alternatives by lactic acid bacteria. *Microbial Biotechnology.* 2022;15(5):1404-21. doi:10.1111/1751-7915.14008
66. Quan Q, Liu W, Guo J, Ye M, Zhang J. Effect of Six Lactic Acid Bacteria Strains on Physicochemical Characteristics, Antioxidant Activities and Sensory Properties of Fermented Orange Juices. *Foods.* 2022;11(13):13. doi:10.3390/foods11131920
67. Yang J, Sun Y, Gao T, Wu Y, Sun H, Zhu Q, et al. Fermentation and Storage Characteristics of “Fuji” Apple Juice Using *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*: Microbial Growth, Metabolism of Bioactives and in vitro Bioactivities. *Front Nutr.* 2022;9. doi:10.3389/fnut.2022.833906
68. Kieliszek M, Pobiega K, Piwowarek K, Kot AM. Characteristics of the Proteolytic Enzymes Produced by Lactic Acid Bacteria. *Molecules.* 2021;26(7):7. doi:10.3390/molecules26071858
69. Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;71(4):394-406. doi:10.1007/s00253-006-0427-1
70. Ji D, Ma J, Xu M, Agyei D. Cell-envelope proteinases from lactic acid bacteria: Biochemical features and biotechnological applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2021;20(1):369-400. doi:10.1111/1541-4337.12676
71. Chen H, Huang J, Cao B, Chen L, Song N, Lei N. Study of Extraction and Enzymatic Properties of Cell-Envelope Proteinases from a Novel Wild *Lactobacillus plantarum* LP69. *Catalysts.* 2018;8(8):8. doi:10.3390/catal8080325
72. Guo T, Ouyang X, Xin Y, Wang Y, Zhang S, Kong J. Characterization of a New Cell Envelope Proteinase PrtP from *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC11055. *J Agric Food Chem.* 2016;64(37):6985-92. doi:10.1021/acs.jafc.6b03379
73. Hadji Sfasi I, El-Ghaish S, Ahmadova A, Rabesona H, Haertlé T, Chobert JM. Characterization of new strain *Lactobacillus paracasei* I-N-10 with proteolytic activity: Potential role in decrease in β -casein immuno-reactivity. *Eur Food Res Technol.* 2012;235(3):447-55. doi:10.1007/s00217-012-1772-1
74. Olvera-Rosales LB, Pérez-Escalante E, Castañeda-Ovando A, Contreras-López E, Cruz-Guerrero AE, Regal-López P, et al. ACE-Inhibitory Activity of Whey Proteins Fractions Derived of Fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102. *Foods.* 2023;12(12):2416. doi:10.3390/foods12122416

75. Jensen MP, Ardö Y. Variation in aminopeptidase and aminotransferase activities of six cheese related *Lactobacillus helveticus* strains. *International Dairy Journal*. 2010;20(3):149-55. doi:10.1016/j.idairyj.2009.09.007
76. Luan X, Feng M, Sun J. Effect of *Lactobacillus plantarum* on antioxidant activity in fermented sausage. *Food Res Int*. 2021;144:110351. doi:10.1016/j.foodres.2021.110351
77. Shu G, Huang J, Chen L, Lei N, Chen H. Characterization of Goat Milk Hydrolyzed by Cell Envelope Proteinases from *Lactobacillus plantarum* LP69: Proteolytic System Optimization, Bioactivity, and Storage Stability Evaluation. *Molecules*. 2018;23(6):1317. doi:10.3390/molecules23061317
78. Kunduhoglu B, Hacıoglu S. Probiotic Potential and Gluten Hydrolysis Activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2021;13(3):720-33. doi:10.1007/s12602-020-09723-x
79. García-Cano I, Rocha-Mendoza D, Ortega-Anaya J, Wang K, Kosmerl E, Jiménez-Flores R. Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103(13):5243-57. doi:10.1007/s00253-019-09844-6
80. Shan K, Yao Y, Wang J, Zhou T, Zeng X, Zhang M, et al. Effect of probiotic *Bacillus cereus* DM423 on the flavor formation of fermented sausage. *Food Res Int*. 2023;172:113210. doi:10.1016/j.foodres.2023.113210
81. Chen C, Zhao S, Hao G, Yu H, Tian H, Zhao G. Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavour: A review. *International Journal of Food Properties*. 2017;20(sup1):S316-30. doi:10.1080/10942912.2017.1295988
82. Sumbay KM, Grbin PR, Jiranek V. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. [citado 15 de febrero de 2026]. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1111/jam.12060>
83. Esteban-Torres M, Reverón I, Santamaría L, Mancheño JM, de Las Rivas B, Muñoz R. The Lp_3561 and Lp_3562 Enzymes Support a Functional Divergence Process in the Lipase/Esterase Toolkit from *Lactobacillus plantarum*. *Front Microbiol*. 2016;7:1118. doi:10.3389/fmicb.2016.01118
84. Alwi ANS, Rahayu ES, Utami T, Yanti R, Suroto DA. Formulation of Fruit-Based Probiotic Drink from Snake Fruit (*Salacca zalacca*) and *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* Dad-13 ". *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*. 2023;11(1):351-9.
85. Lee MH, Lee J, Nam YD, Lee JS, Seo MJ, Yi SH. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food. *Int J Food Microbiol*. 2016;221:12-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.010
86. Figueroa RHH, López-Malo A, Mani-López E. Antimicrobial activity and applications of fermentates from lactic acid bacteria – a review. *Sustainable Food Technol*. 2024;2(2):292-306. doi:10.1039/D3FB00241A
87. Zapaśnik A, Sokołowska B, Bryła M. Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*. 2022;11(9):1283. doi:10.3390/foods11091283
88. Tenea GN, Perugachi E. Innovative functional juice enriched with native probiotics for enhanced nutrition and antimicrobial properties. *Front Nutr*. 2025;12:1552745. doi:10.3389/fnut.2025.1552745

89. Papun B, Wongputtisin P, Kanpiengjai A, Pisithkul T, Manochai P, Manowan K, et al. Fermentative Characteristics and Metabolic Profiles of Japanese Apricot Juice Fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Torulaspora delbrueckii*. *Foods*. 2024;13(21):3455. doi:10.3390/foods13213455
90. Wang C, Wu C, Li Q, Zhang T, Lei H. Bioactive compounds, volatile compounds, rheological properties and bacteriostatic activities of fig juices with oligosaccharides supplementation fermented by *Lactiplantibacillus plantarum*. *Food Bioscience*. 2024;61:104621. doi:10.1016/j.fbio.2024.104621
91. Qiao H, Chen L, Yang J, Zhi W, Chen R, Lu T, et al. Effect of Lactic Acid Bacteria on Bacterial Community Structure and Characteristics of Sugarcane Juice. *Foods*. 2022;11(19):19. doi:10.3390/foods11193134
92. Zhong H, Abdullah null, Zhao M, Tang J, Deng L, Feng F. Probiotics-fermented blueberry juices as potential antidiabetic product: antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potentials. *J Sci Food Agric*. 2021;101(10):4420-7. doi:10.1002/jsfa.11083
93. Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules*. 2019;24(22):4132. doi:10.3390/molecules24224132
94. Chagas M do SS, Behrens MD, Moragas-Tellis CJ, Penedo GXM, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF. Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxid Med Cell Longev*. 2022;2022:9966750. doi:10.1155/2022/9966750
95. Renzetti A, Betts JW, Fukumoto K, Rutherford RN. Antibacterial green tea catechins from a molecular perspective: mechanisms of action and structure-activity relationships. *Food Funct*. 2020;11(11):9370-96. doi:10.1039/d0fo02054k
96. Lobiuc A, Pavăl NE, Mangalagiu II, Gheorghită R, Teliban GC, Amăriucăi-Mantu D, et al. Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules*. 2023;28(3):1114. doi:10.3390/molecules28031114
97. Faleye OS, Lee JH, Lee J. Los flavonoides seleccionados exhiben efectos antibiofilm y antibacterianos contra *Vibrio* al alterar la integridad de la membrana, la virulencia y las actividades metabólicas. *Biofilm*. 2023;6:100165. doi:10.1016/j.biofilm.2023.100165
98. Liu X, Lv M, Maimaitiyiming R, Chen K, Tuerhong N, Yang J, et al. Development of fermented sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice and investigation of its antioxidant and antimicrobial activity. *Front Nutr*. 2023;10:1120748. doi:10.3389/fnut.2023.1120748
99. Królak K, Ścieszka S, Kordialik-Bogacka E, Oracz J, Ditrych M, Szczygieł T, et al. Antibacterial efficacy of berry juices against *Bacillus cereus* relative to their phytochemical composition and antioxidant properties. *Sci Rep*. 2024;14(1):28298. doi:10.1038/s41598-024-79155-y
100. Filannino P, Bai Y, Di Cagno R, Gobbetti M, Gänzle MG. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*. 2015;46:272-9. doi:10.1016/j.fm.2014.08.018
101. Qiu X, Zhang Y, Zhou Y, Li GH, Feng XS. Progress in pretreatment and analysis of organic Acids: An update since 2010. *Food Chem*. 2021;360:129977. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129977
102. Mantzourani I, Bontsidis CA, Plessas S, Alexopoulos A, Theodoridou E, Tsigalou C, et al. Comparative Susceptibility Study Against Pathogens Using

- Fermented Cranberry Juice and Antibiotics. *Front Microbiol.* 2019;10. doi:10.3389/fmicb.2019.01294
103. Zhao X, Tang F, Cai W, Peng B, Zhang P, Shan C. Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *LWT.* 2023;184:114884. doi:10.1016/j.lwt.2023.114884
 104. Pernin A, Guillier L, Dubois-Brissonnet F. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiol.* 2019;80:18-24. doi:10.1016/j.fm.2018.12.010
 105. Coban HB. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2020;43(4):569-91. doi:10.1007/s00449-019-02256-w
 106. Mani-López E, Arriola-Bretón D, López-Malo A. The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2022;21(1):604-41. doi:10.1111/1541-4337.12872
 107. Zimina M, Babich O, Prosekov A, Sukhikh S, Ivanova S, Shevchenko M, et al. Overview of Global Trends in Classification, Methods of Preparation and Application of Bacteriocins. *Antibiotics.* 2020;9(9):9. doi:10.3390/antibiotics9090553
 108. Perez RH, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microb Cell Fact.* 2014;13(1):S3. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3
 109. Heilbronner S, Krismer B, Brötz-Oesterhelt H, Peschel A. The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(11):726-39. doi:10.1038/s41579-021-00569-w
 110. Liang Y, Yan J, Chen Z, Gu Q, Li P. Antibacterial Effects of Bacteriocin PLNC8 against *Helicobacter pylori* and Its Potential Mechanism of Action. *Foods.* 2022;11(9):9. doi:10.3390/foods11091235
 111. Selder L, Sabra W, Jürgensen N, Lakshmanan A, Zeng AP. Co-cultures with integrated in situ product removal for lactate-based propionic acid production. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2020;43(6):1027-35. doi:10.1007/s00449-020-02300-0
 112. Chen SY, Yang RS, Ci BQ, Xin WG, Zhang QL, Lin LB, et al. A novel bacteriocin against multiple foodborne pathogens from *Lactocaseibacillus rhamnosus* isolated from juice ferments: ATF perfusion-based preparation of viable cells, characterization, antibacterial and antibiofilm activity. *Curr Res Food Sci.* 2023;6:100484. doi:10.1016/j.crfs.2023.100484
 113. Meskhi B, Todorov SD, Rudoy D, Olshevskaya A, Shevchenko V, Maltseva T, et al. Bacteriocins, a New Generation of Sustainable Alternatives to Antibacterial Agents in Primary Food Production Systems. *Molecules.* 2026;31(2):356. doi:10.3390/molecules31020356
 114. Piras C, Soggiu A, Greco V, Di Ciccio PA, Bonizzi L, Procopio AC, et al. Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins for Applications in Food Safety Against *Listeria monocytogenes*. *Antibiotics (Basel).* 2025;14(6):572. doi:10.3390/antibiotics14060572
 115. Ovchinnikov KV, Kranjec C, Thorstensen T, Carlsen H, Diep DB. Bacteriocins Revitalize Non-Effective Penicillin G to Overcome Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Antibiotics.* 2022;11(12):12. doi:10.3390/antibiotics11121691

116. Wang J, Ma X, Li J, Shi L, Liu L, Hou X, et al. The Synergistic Antimicrobial Effect and Mechanism of Nisin and Oxacillin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6697. doi:10.3390/ijms24076697
117. Soltani S, Biron E, Ben Said L, Subirade M, Fliss I. Bacteriocin-based synergetic consortia: a promising strategy to enhance antimicrobial activity and broaden the spectrum of inhibition. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(1):e00406-21.
118. Ibarra-Martínez D, Muñoz-Ortega MH, Quintanar-Stephano A, Martínez-Hernández SL, Ávila-Blanco ME, Ventura-Juárez J. Antibacterial activity of supernatants of *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* and curcumin against *Aeromonas hydrophila*. In vitro study. *Vet Res Commun*. 2022;46(2):459-70. doi:10.1007/s11259-021-09871-7
119. Telhig S, Ben Said L, Torres C, Rebuffat S, Zirah S, Fliss I. Evaluating the potential and synergetic effects of microcins against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Microbiology spectrum*. 2022;10(3):e02752-21.
120. Hashemi SMB, Jafarpour D, Jouki M. Improving bioactive properties of peach juice using *Lactobacillus* strains fermentation: Antagonistic and anti-adhesion effects, anti-inflammatory and antioxidant properties, and Maillard reaction inhibition. *Food Chemistry*. 2021;365:130501. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130501
121. Yan X, Wang F, Weng P, Wu Z. The effect of fermented Huyou juice on intestinal microbiota in a high-fat diet-induced obesity mouse model. *Journal of Food Biochemistry*. 2020;44(12):e13480. doi:10.1111/jfbc.13480
122. Guérin M, Remize F, Bringart M, Planesse C, Rondeau P, Robert-Da Silva C, et al. Fermented Pineapple Juice Consumption Limits Metabolic Disorders Associated to Sugary Drinks on High-Fat Diet-Fed Mice. *Mol Nutr Food Res*. 2023;67(11):e2200670. doi:10.1002/mnfr.202200670
123. Costa Dos Santos GD, da Silva Pereira CD, da Silva CC, Silva MA, Silva LDS, da Silva Cutrim B, et al. *Eugenia uniflora* (pitanga) juice as a new alternative vehicle for *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271: evaluation of antioxidant and anti-infective effects. *Braz J Microbiol*. 2024;55(2):1279-86. doi:10.1007/s42770-024-01329-7
124. Kumari V. B. C, Huligere SS, Alotaibi G, Al Mouslem AK, Bahauddin AA, Shivanandappa TB, et al. Antidiabetic Activity of Potential Probiotics *Limosilactobacillus* spp., *Levilactobacillus* spp., and *Lacticaseibacillus* spp. Isolated from Fermented Sugarcane Juice: A Comprehensive In Vitro and In Silico Study. *Nutrients*. 2023;15(8):8. doi:10.3390/nu15081882
125. Guan X, Xu Q, Zheng Y, Qian L, Lin B. Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. *Braz J Microbiol*. 2017;48:730-9. doi:https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.011
126. Han M, Zhang M, Wang X, Bai X, Yue T, Gao Z. Cloudy Apple Juice Fermented by *Lactobacillus* Prevents Obesity via Modulating Gut Microbiota and Protecting Intestinal Tract Health. *Nutrients*. 2021;13(3):971. doi:10.3390/nu13030971
127. Yin S, Niu L, Zhang J, Yang W, Liu Y. Berry beverages: From bioactives to antidiabetes properties and beverage processing technology. *Food Frontiers*. 2024;5. doi:10.1002/fft2.399
128. Roland N, Spatz M, Le-Loir Y, Steyer JP, Schbath S, Beney L, et al. Beneficios de los alimentos fermentados, del empirismo a la evidencia científica: La contribución de *Ferments du Futur*. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2026. doi:10.1016/j.cnd.2026.03.002

129. Coronel-León J, Maza D, García-Álvarez de Toledo I, Jofré A, Martín B, Serra X, et al. Fermentation Technologies to Produce and Improve Alternative Protein Sources. *Foods*. 2025;15(1):117. doi:10.3390/foods15010117
130. Pucel N, Sarkar D, Labbe RG, Khanongnuch C, Shetty K. Improving Health Targeted Food Quality of Blackberry: Pear Fruit Synergy Using Lactic Acid Bacterial Fermentation. *Front Sustain Food Syst*. 2021;5. doi:10.3389/fsufs.2021.703672
131. Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De Feo V, Jaafar HZE, Moga M. *Rubus Fruticosus* L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses. *Molecules*. 2014;19(8):10998-1029. doi:10.3390/molecules190810998
132. Verma R, Gangrade T, Punasiya R, Ghulaxe C. *Rubus fruticosus* (blackberry) use as an herbal medicine. *Pharmacogn Rev*. 2014;8(16):101-4. doi:10.4103/0973-7847.134239.
133. Čechovičienė I, Šlepetienė A, Gumbytė M, Paulauskienė A, Tarasevičienė Ž. Composition and Physicochemical Properties of Pomace of Various Cultivars of Blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Horticulturae*. 2024;10(1):38. doi:10.3390/horticulturae10010038
134. Hua Z, Bian Y, Lu F, Liu S, Ma W, Chen T, et al. Changes in antioxidant and flavor profiles of raspberry, blackberry, and mulberry juices fermented by urolithin A-producing *Limosilactobacillus fermentum* FUA033. *Food Bioscience*. 2025;65:106131. doi:10.1016/j.fbio.2025.106131
135. Lugo-Zarate L, Delgado-Olivares L, Cruz-Cansino N del S, González-Olivares LG, Castrejón-Jiménez NS, Estrada-Luna D, et al. Blackberry Juice Fermented with Two Consortia of Lactic Acid Bacteria and Isolated Whey: Physicochemical and Antioxidant Properties during Storage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(16):8882. doi:10.3390/ijms25168882
136. Savić A, Velemir A, Papuga S, Stojković M. Influence of blackberry juice addition on mead fermentation and quality. *Foods and Raw Materials*. 2021;9(1):146-52. doi:10.21603/2308-4057-2021-1-146-152
137. Kaminarides S, Zagari H, Zoidou E. Effect of whey fat content on the properties and yields of whey cheese and serum. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2020;71(2):2149-56. doi:10.12681/jhvms.23640
138. Czarniecka-Skubina E, Pielak M, Neffe-Skocińska K, Kajak-Siemaszko K, Karp-Paździerska S, Głuchowski A, et al. Whey—A Valuable Technological Resource for the Production of New Functional Products with Added Health-Promoting Properties. *Foods*. 2025;14(24):4258. doi:10.3390/foods14244258
139. Uribe-Velázquez T, Najar-Almanzor CE, Osuna-Orozco FR, Arto-Paz F, Valdés C, Garcia-Amezquita LE, et al. Cheese Whey Valorization via Microbial Fermentation (Lactic Acid Bacteria, Yeasts/Fungi, and Microalgae), Postbiotic Production, and Whey-Based Encapsulation Strategies. *Fermentation*. 2026;12(1):42. doi:10.3390/fermentation12010042
140. Zhao C, Ashaolu TJ. Bioactivity and safety of whey peptides. *LWT*. 2020;134:109935. doi:10.1016/j.lwt.2020.109935
141. Malos IG, Ghizdareanu AI, Vidu L, Matei CB, Pasarin D. The Role of Whey in Functional Microorganism Growth and Metabolite Generation: A Biotechnological Perspective. *Foods*. 2025;14(9):1488. doi:10.3390/foods14091488
142. Zeng X, Wang Y, Yang S, Liu Y, Li X, Liu D. The functionalities and applications of whey/whey protein in fermented foods: a review. *Food Sci Biotechnol*. 2023;33(4):769-90. doi:10.1007/s10068-023-01460-5

143. Vera-Santander VE, Hernández-Figueroa RH, Arriola-Bretón D, Jiménez-Munguía MT, Mani-López E, López-Malo A. Utilization of Whey for Eco-Friendly Bio-Preservation of Mexican-Style Fresh Cheeses: Antimicrobial Activity of *Lactobacillus casei* 21/1 Cell-Free Supernatants (CFS). *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2024;21(5):560. doi:10.3390/ijerph21050560

CAPÍTULO III. Fermentación del jugo de zarzamora con dos consorcios de bacterias lácticas y suero aislado de leche: propiedades fisicoquímicas y antioxidantes durante el almacenamiento

3.1. Introducción

Las bebidas fermentadas a base de frutas han ganado importancia en la elección de bebidas saludables por parte de los consumidores, debido al rescate de prácticas ancestrales, su proceso de conservación y sus propiedades nutricionales, que las BAL tomarán como sustrato para producir metabolitos secundarios de interés para la salud humana (1). Como se mencionó en el capítulo anterior, las frutas pueden ser muy buen sustrato para la fermentación por las BAL por su contenido de azúcares, siempre y cuando el pH, la cantidad de oxígeno, la temperatura y el tiempo de fermentación sean optimizados. Sin embargo, en el diseño de bebidas fermentadas con alto contenido de compuestos bioactivos, ácidos orgánicos y la producción de péptidos bioactivos, es importante adicionar componentes que permitan la síntesis de metabolitos secundarios con actividades biológicas de interés en la salud.

Por lo anterior, en este capítulo experimental se aborda la estandarización del proceso de fermentación de una bebida a partir de zarzamora (*Rubus Fruticosus*). Primeramente, se determinó el conteo bacteriano al inicio de la fermentación, a las 24 y 48 horas con suero de leche, inoculando cada una de las BAL incluidas en este estudio: *L. brevis*, *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. casei* y *L. rhamnosus*. Posteriormente, se analizó el conteo bacteriano cuando se agrega únicamente jugo de zarzamora e inoculando con cada una de las BAL incluidas. Finalmente, se determinó si la mezcla de jugo de zarzamora con suero de leche (1:1), representa mejor sustrato para la fermentación analizando cada una de las BAL y en consorcio (consorcio 1: *L. brevis*, *L. plantarum* y *P. acidilactici*; consorcio 2: *L. casei* y *L. rhamnosus*).

A partir de los resultados de la primera etapa, se trabajó con los consorcios 1 y 2, así como el jugo de zarzamora con suero de leche sin inóculo, como control positivo. Se prosiguió a caracterizar la cinética de crecimiento, el pH, el porcentaje de ácido láctico, los sólidos solubles y azúcares reductores en los consorcios con suero, o con jugo, o con la mezcla de suero y jugo.

Dado que se encontró que a las 16 h de fermentación es el tiempo óptimo para la supervivencia de las BAL, se obtuvo el porcentaje de ácido láctico, el pH, la cantidad de sólidos solubles, la estabilidad, viscosidad, los parámetros de color, así como el contenido de compuestos fenólicos, antocianinas y capacidad antioxidante total. Estos

parámetros se evaluaron al inicio de la fermentación, a las 16 horas y a los 28 días de almacenamiento de las mezclas a 4 °C.

Se encontró que la incorporación de suero de leche al jugo permite incrementar significativamente el conteo de BAL a las 16 horas a 37 °C, lo que permite que incluso su almacenamiento a 4 °C durante los primeros 28 días, ambos consorcios mantengan la estabilidad, el color, el pH y aumente la producción de ácido láctico, compuestos fenólicos y antocianinas, que le proveen buena capacidad antioxidante total. Los resultados anteriores fueron comunicados en la revista “International Journal of Molecular Sciences” (2), con acceso abierto.

3.2. Referencias

1. Szutowaska J, Rybicka I, Pawlak-Lemańska K, Gwiazdowska D. Spontaneously fermented curly kale juice: Microbiological quality, nutritional composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Journal of Food Science*. 2020;85(4):1248-55. doi:10.1111/1750-3841.15080
2. Lugo-Zarate L, Delgado-Olivares L, Cruz-Cansino N del S, González-Olivares LG, Castrejón-Jiménez NS, Estrada-Luna D, et al. Blackberry Juice Fermented with Two Consortia of Lactic Acid Bacteria and Isolated Whey: Physicochemical and Antioxidant Properties during Storage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(16):8882. doi:10.3390/ijms25168882



Article

Blackberry Juice Fermented with Two Consortia of Lactic Acid Bacteria and Isolated Whey: Physicochemical and Antioxidant Properties during Storage

Liliana Lugo-Zarate ^{1,2}, Luis Delgado-Olivares ² , Nelly del Socorro Cruz-Cansino ² ,
Luis Guillermo González-Olivares ³ , Nayeli Shantal Castrejón-Jiménez ⁴ , Diego Estrada-Luna ¹
and Angélica Sarai Jiménez-Osorio ^{1,*}

- ¹ Área Académica de Enfermería, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Actopan Tilcuautla s/n. Ex Hacienda La Concepción, San Agustín Tlaxiaca 42160, Hidalgo, Mexico; lu279379@uaeh.edu.mx (L.L.-Z.); destrada_luna@uaeh.edu.mx (D.E.-L.)
- ² Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Actopan Tilcuautla s/n. Ex Hacienda La Concepción, San Agustín Tlaxiaca 42160, Hidalgo, Mexico; ldelgado@uaeh.edu.mx (L.L.-O.); ncruz@uaeh.edu.mx (N.d.S.C.-C.)
- ³ Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma 42184, Hidalgo, Mexico; lgonzales@uaeh.edu.mx
- ⁴ Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad km 1 Ex Hacienda de Aquetzalpa A.P. 32, Tulancingo 43600, Hidalgo, Mexico; nayeli_castrejon@uaeh.edu.mx
- * Correspondence: angelica_jimenez@uaeh.edu.mx; Tel.: +52-7717172000 (ext. 4323)



Citation: Lugo-Zarate, L.; Delgado-Olivares, L.; Cruz-Cansino, N.d.S.; González-Olivares, L.G.; Castrejón-Jiménez, N.S.; Estrada-Luna, D.; Jiménez-Osorio, A.S. Blackberry Juice Fermented with Two Consortia of Lactic Acid Bacteria and Isolated Whey: Physicochemical and Antioxidant Properties during Storage. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8882. <https://doi.org/10.3390/ijms25168882>

Academic Editors: Chia-Hung Kuo, Hui-Min David Wang and Shu-Ling Hsieh

Received: 29 May 2024

Revised: 1 August 2024

Accepted: 9 August 2024

Published: 15 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Fermenting fruit juices with lactic acid bacteria (LAB) is a sustainable method to enhance fruit harvests and extend shelf life. This study focused on blackberries, rich in antioxidants with proven health benefits. In this research, we examined the effects of fermentation (48 h at 37 °C) at 28 days on whey-supplemented (WH, 1:1) blackberry juice (BJ) inoculated with two LAB mixtures. Consortium 1 (BJWH/C1) included *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici*, while consortium 2 (BJWH/C2) comprised *Lactiacaseibacillus casei* and *Lactiacaseibacillus rhamnosus*. All of the strains were previously isolated from aguamiel, pulque, and fermented milk. Throughout fermentation and storage, several parameters were evaluated, including pH, lactic acid production, viscosity, stability, reducing sugars, color, total phenolic content, anthocyanins, and antioxidant capacity. Both consortia showed a significant increase in LAB count (29–38%) after 16 h. Sample BJWH/C2 demonstrated the best kinetic characteristics, with high regression coefficients ($R^2 = 0.97$), indicating a strong relationship between lactic acid, pH, and fermentation/storage time. Despite some fluctuations during storage, the minimum LAB count remained at 9.8 log CFU/mL, and lactic acid content increased by 95%, with good storage stability. Notably, sample BJWH/C2 increased the total phenolic content during storage. These findings suggest that adding whey enhances biomass and preserves physicochemical properties during storage.

Keywords: lactic acid bacteria; fermentation; blackberry juice; whey; antioxidants

1. Introduction

In recent decades, there has been a growing focus on researching and developing alternative foods and production processes that are viable for human consumption and beneficial to health [1,2]. Fermentation, an ancient process involving the biotransformation of fermentable substrates, such as carbohydrates primarily or proteins, through interactions with bacteria or fungi, has enhanced food's sensory, storage, and nutritional qualities in both industrial and home settings. Additionally, fermentation has proven highly effective

in developing functional foods that contain a wide range of metabolites, including organic acids, free amino acids, short-chain fatty acids, bioactive peptides [2,3], volatile compounds, and other substances, that can alter the intestinal microbiota [4]. As a result, many foods with probiotic, antimicrobial, and antioxidant properties have been developed [5,6].

In fruits, natural and spontaneous fermentation is driven by lactic acid bacteria (LAB), such as *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Weissella* spp., and other autochthonous strains, due to the presence of carbohydrates [7]. On an industrial scale, the use of LAB, like *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus acidophilus*, enhances the antioxidative and antibacterial properties of fermented products [8–12] and regulates the levels of secondary metabolites and final products. Functional foods, particularly red fruits, are also explored in fermentation due to their low sugar content and high polyphenolic compound concentration [13]. Fermentation with red fruits has shown significant growth of LAB, including *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, alongside lactic acid production. However, certain fruits, such as blackberry, possess notable antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and antidiabetic properties due to their organic acid content and low pH levels, which can inhibit LAB growth and lactic acid production [14].

On the other hand, whey, a byproduct of milk derivatives, is often considered an organic residue in the industry. However, it has been shown to enhance nutritional quality and promote sustainable food production [15]. This is primarily due to its high protein content, including α -lactalbumin, β -lactoglobulin, immunoglobulins, and lactoferrins [16]. Whey fermentation produces bioactive peptides, exopolysaccharides, organic acids, and antioxidants [17]. Furthermore, whey has been found to enhance antimicrobial activities when combined with certain fruits [18]. Research has also indicated that whey protein can improve glucose levels [19], which may be linked to the stability of phenols and anthocyanins through molecular interactions between antioxidants and whey proteins [20]. Consequently, incorporating whey protein into a matrix could influence LAB substrates and the stability of antioxidant and antibacterial properties during storage.

In fermented foods like yogurt, a decline in LAB concentration during storage at 4 °C for up to 28 days has been observed [21]. However, in fermented juices, such as blackberry juice fermented with *Lactobacillus*, the phenolic content and antioxidant properties have shown improvement under similar conditions [22]. Thus, this study aimed to assess the LAB growth, physicochemical characteristics, and antioxidant capacity of blackberry (*Rubus fruticosus*) juice fermented with whey isolated from milk and inoculated with two different LAB consortia.

2. Results

2.1. Fermentation for 24 and 48 Hours

The lactic acid fermentation experiment involved the controlled inoculation of five individual LAB strains, previously isolated from aguamiel (*L. plantarum* and *Pediococcus acidilactici*), pulque (*Levilactobacillus brevis*), and commercial fermented milk (*Lacticaseibacillus casei* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*). These strains have demonstrated inhibitory effects against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Helicobacter pylori* [23]. Each strain was inoculated at a concentration of 9 log CFU/mL into three different fermentation systems: milk whey (WH), blackberry juice (BJ), and a 1:1 mixture of WH and BJ over a 48-h period at 37 °C (Figure 1A–C).

The results showed that *L. brevis* exhibited the highest growth in the WH system, reaching 11.68 ± 0.15 Log₁₀ CFU/mL at 48 h, followed by *L. plantarum*, which reached 10.90 ± 0.09 Log₁₀ CFU/mL at 24 h (Figure 1A). In the BJ system, the strains maintained their initial LAB counts throughout the fermentation process (Figure 1B). However, all strains showed significantly increased growth in the mixture of BJ and WH (1:1), averaging 11.94 Log₁₀ CFU/mL at 24 h (Figure 1C).

Two fermentation systems were developed from the BJWH mixture to compare the effects of LAB strains isolated from pulque and aguamiel (*L. brevis*, *L. plantarum*, and *P. acidilactici*) with those isolated from commercial products (*L. rhamnosus* and *L. casei*). This led to the creation of two consortia: consortium 1 (C1) consisted of *L. brevis*, *L. plantarum*, and *P. acidilactici*, while consortium 2 (C2) included *L. casei* and *L. brevis* (C2). C1 and C2 were inoculated into the three fermentation systems (WH, BJ, and BJWH). The highest growth was observed in both consortia BJWH/C1 and BJWH/C2 at 24 h, with 12.54 ± 0.10 Log 10 CFU/mL and 12.94 ± 0.04 Log 10 CFU/mL, respectively, followed by the WH/C1 system (Figure 1D).

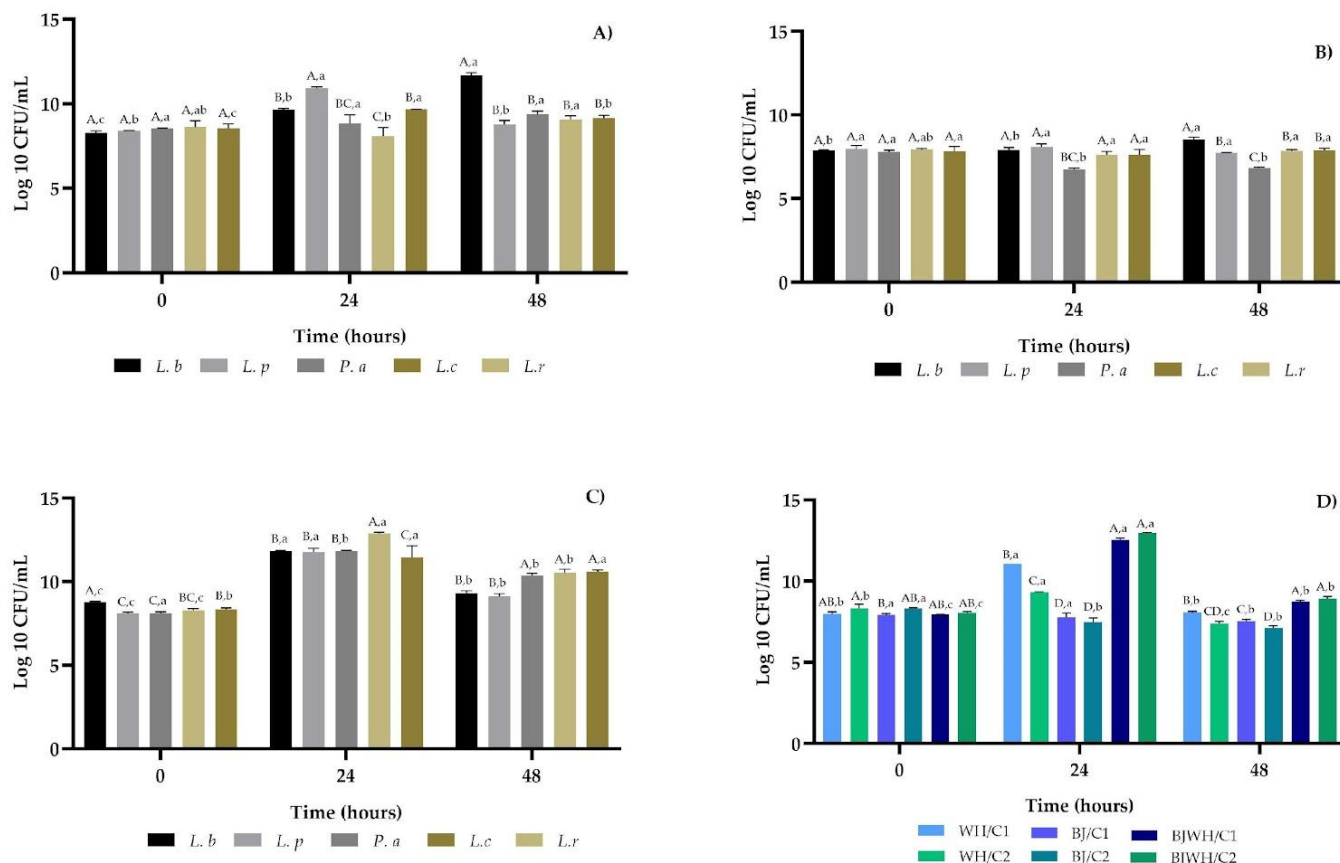


Figure 1. Growth of LAB during fermentation at 0, 24 and 48 h. Individual strains: *Levilactobacillus brevis* (L. b), *Lactiplantibacillus plantarum* (L. p), *Pediococcus acidilactici* (P. a), *Lactocaseibacillus rhamnosus* (L. r), and *Lactocaseibacillus casei* (L. c) were inoculated and fermented in WH (whey protein) (A), BJ (blackberry juice) (B), and BJWH (blackberry juice + whey protein) (C). WH/C1 (whey protein inoculated with consortium 1: L. b, L. p and P. a), WH/C2 (whey protein inoculated with consortium 2: L. r and L. c), BJ/C1 (blackberry juice with consortium 1), BJ/C2 (blackberry juice with consortium 2), BJWH/C1 and BJWH/C2 (blackberry juice + whey protein with consortium 1 and 2, respectively) (D). Values represent three experiments' mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Different capital letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between the different strains or consortium for each fermentation time. Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) of each strain or consortium between their different fermentation times.

2.2. Physicochemical Properties of Fermented Samples

After fermentation, pH, lactic acid content, total soluble solids ($^{\circ}$ Brix), and reducing sugars were measured to assess bacterial growth and the final products of LAB metabolism. The results of these physicochemical properties during the fermentation process (at 0, 24, and 48 h) are presented in Table 1.

Table 1. Physicochemical properties after fermentation in the two consortia of LAB were inoculated in the experimental samples (WH, BJ, and its combination).

Sample	pH			% Lactic Acid			Total Soluble Solids (°Brix)			Reducing Sugars (g/100 mL)		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
WH/ C1	5.7 ± 0.00 ^{D,a}	4.1 ± 0.00 ^{BC,b}	4.0 ± 0.01 ^{E,c}	0.02 ± 0.00 ^{Eb}	0.07 ± 0.01 ^{G,a}	0.07 ± 0.00 ^{FG,a}	0.9 ± 0.06 ^{D,a}	0.6 ± 0 ^{Eb}	0.4 ± 0.00 ^{G,c}	Nd	Nd	Nd
C2	5.9 ± 0.01 ^{BC,a}	3.8 ± 0.03 ^{C,b}	3.8 ± 0.04 ^{Eb}	0.02 ± 0.00 ^{Eb}	0.05 ± 0.00 ^{GH,a}	0.06 ± 0.00 ^{G,a}	0.8 ± 0.06 ^{D,a}	0.4 ± 0 ^{G,b}	0.0 ± 0.00 ^{H,c}	Nd	Nd	Nd
C-	5.7 ± 0.01 ^{D,a}	5.7 ± 0.00 ^{A,b}	5.7 ± 0.03 ^{B,b}	0.02 ± 0.00 ^{Eb}	0.03 ± 0.00 ^{H,a}	0.03 ± 0.00 ^{G,ab}	1.0 ± 0.00 ^D	1.0 ± 0.00 ^E	1.0 ± 0.00 ^F	Nd	Nd	Nd
BJ/ C1	5.9 ± 0.02 ^{C,a}	3.6 ± 0.20 ^{C,b}	3.6 ± 0.04 ^{H,b}	0.4 ± 0.00 ^{A,c}	1.5 ± 0.02 ^{A,a}	2.3 ± 0.02 ^{A,b}	10 ± 0.06 ^{A,a}	9.07 ± 0.1 ^{B,b}	8.9 ± 0.06 ^{C,b}	9.5 ± 0.00 ^{A,a}	7.9 ± 0.10 ^{B,c}	8.4 ± 0.08 ^{B,b}
C2	6.1 ± 0.04 ^{A,a}	4.7 ± 0.02 ^{B,b}	4.05 ± 0.00 ^{D,c}	0.3 ± 0.00 ^{B,c}	0.7 ± 0.01 ^{D,b}	1.4 ± 0.01 ^{B,a}	9.6 ± 0.30 ^{AB,a}	9.9 ± 0.1 ^{A,a}	9.5 ± 0.00 ^{B,a}	8.3 ± 0.08 ^{C,a}	6.1 ± 0.10 ^{C,c}	6.5 ± 0.03 ^{C,b}
C-	5.9 ± 0.01 ^{B,a}	5.8 ± 0.03 ^{A,b}	5.6 ± 0.00 ^{C,c}	0.3 ± 0.01 ^{B,b}	0.3 ± 0.00 ^{E,b}	0.4 ± 0.01 ^{E,a}	9.3 ± 0.20 ^{B,b}	10 ± 0.06 ^{A,a}	10 ± 0.00 ^{A,a}	8.9 ± 0.07 ^{B,a}	8.6 ± 0.10 ^{A,b}	9.03 ± 0.17 ^{A,a}
BJWH/ C1	5.4 ± 0.00 ^{E,a}	3.7 ± 0.01 ^{C,b}	3.5 ± 0.01 ^{I,c}	0.2 ± 0.00 ^{C,c}	0.9 ± 0.05 ^{B,b}	1.2 ± 0.01 ^{C,a}	6.0 ± 0.00 ^C	5.0 ± 0.00 ^D	5.0 ± 0.00 ^E	3.5 ± 0.01 ^{E,a}	2.6 ± 0.00 ^{D,b}	1.8 ± 0.00 ^{F,c}
C2	5.6 ± 0.01 ^{E,a}	3.8 ± 0.01 ^{C,b}	3.7 ± 0.00 ^{G,c}	0.2 ± 0.00 ^{D,c}	0.8 ± 0.01 ^{C,b}	0.9 ± 0.05 ^{D,a}	6.0 ± 0.00 ^C	5.0 ± 0.00 ^D	5.0 ± 0.00 ^E	3.5 ± 0.02 ^{E,a}	2.5 ± 0.03 ^{D,c}	2.7 ± 0.00 ^{E,b}
C-	5.6 ± 0.01 ^{E,a}	5.8 ± 0.60 ^{A,a}	5.8 ± 0.00 ^{A,a}	0.1 ± 0.00 ^{E,a}	0.1 ± 0.00 ^{F,a}	0.13 ± 0.01 ^{F,a}	6.0 ± 0.00 ^C	6.0 ± 0.00 ^C	6.0 ± 0.00 ^D	3.6 ± 0.03 ^{D,a}	2.6 ± 0.03 ^{D,c}	3.4 ± 0.04 ^{D,b}

BJ: blackberry juice; BJWH: blackberry juice + whey protein; WH: whey protein; C1: Consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici*, C2: Consortium 2 of *Lacticaseibacillus casei* and *Lacticaseibacillus rhamnosus*; C-: Consortium without LAB inoculum; Nd: not detectable. Values represent the mean ± standard deviation of three experiments (n = 3). Different capital letters indicate a significant difference (*p* < 0.05) between the different strains or consortium for each fermentation time. Different lowercase letters indicate a significant difference (*p* < 0.05) of each strain or consortium between their different fermentation times.

Initially, the BJWH system had the lowest pH values, ranging from 5.4 to 5.6. After 24 h, the WH/C2, BJ/C1, BJWH/C1, and BJWH/C2 systems exhibited significantly lower pH values. By 48 h, the pH values remained lower in the BJ/C1, BJWH/C1, and BJWH/C2 systems. The lactic acid percentage increased notably in the BJ/C1 system, followed by BJWH/C1 and BJWH/C2, while the WH/C1 and WH/C2 systems showed no significant changes at 24 and 48 h. This increase in lactic acid was associated with a decrease in total soluble solids by one unit at 24 and 48 h for the BJWH/C1 and BJWH/C2 systems. Additionally, reducing sugars were initially lower in the BJWH systems and decreased most significantly in the BJWH/C1 system by 48 h (Table 1).

2.3. Physicochemical Properties during Storage

The endpoint of fermentation was assessed by measuring CFU at intervals 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28, 32, and 48 h of incubation at 37 °C for BJWH/C1 and BJWH/C2. Figure 2A shows LAB growth, with BJWH/C1 exhibiting a notable increase from 16 h (13.34 ± 0.14 Log 10 CFU/mL) to 28 h (13.85 ± 0.21 Log 10 CFU/mL). However, a decrease in the LAB count was observed at 20 h for both BJWH/C1 and BJWH/C2, followed by variable behavior in subsequent hours, finally resulting in a lower average count (10.27 Log 10 CFU/mL) at 48 h. Consequently, storage analysis was initiated after 16 h of fermentation of the BJWH/C1 and BJWH/C2 samples.

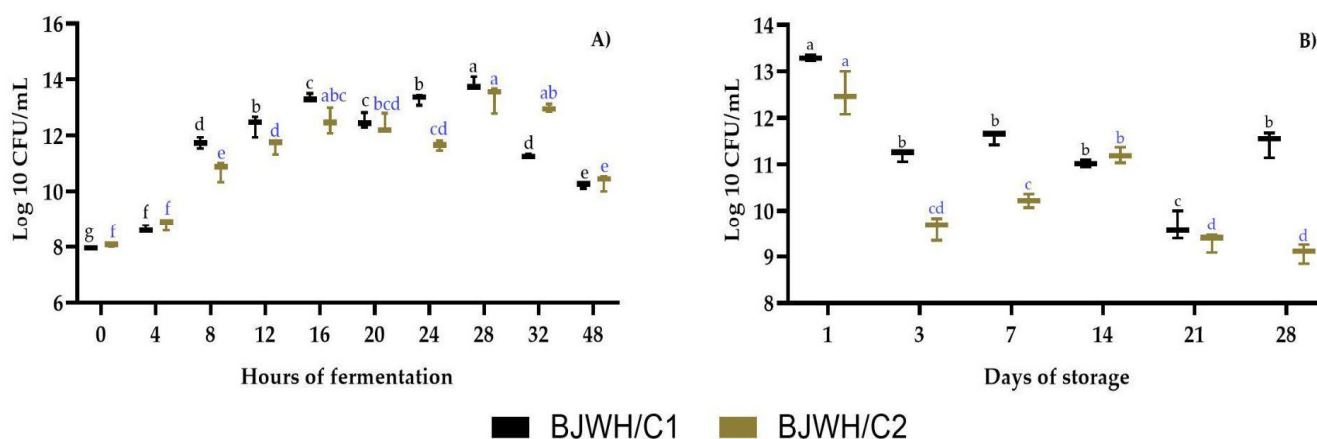


Figure 2. LAB growth during (A) fermentation of 48 h and (B) storage days after 16 h of fermentation of BJWH/C1 and BJWH/C2 (blackberry juice + whey protein with consortium 1 and 2, respectively). The sample contains C1: *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* and C2: *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus*. Values in each point represent three experiments' mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Different black (BJWH/C1) and blue (BJWH/C2) lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) in different fermentation and storage times.

Fermented samples were stored at 4 °C, and LAB counts were assessed on storage days 3, 7, 14, 21, and 28. While growth patterns varied among samples, BJWH/C1 consistently exhibited higher LAB counts, averaging 11.29 Log 10 CFU/mL on days 3, 7, 14, and 28. Notably, BJWH/C2 showed an increase in LAB count on day 14, followed by a significant decline by day 28 (see Figure 2B).

Kinetic parameters were calculated to determine significant differences between fermentations (see Table 2). BJWH/C2 exhibited more favorable parameters, including a longer generation time than BJWH/C1 (4.20 ± 0.60). However, the fermentation rate (μ) was faster in BJWH/C1, while BJWH/C2 demonstrated a better affinity, as indicated by its constant (k). These observations suggest a higher cellular density in BJWH/C2, particularly in systems containing *L. casei* and *L. rhamnosus*.

Table 2. Kinetic parameters at the time of fermentation (16 h) of blackberry juice supplemented with whey.

Fermentation System	Parameter Value			
	A (Log 10 CFU/mL)	μ (h ⁻¹)	g	k (g/h)
BJWH/C1	5.39 ± 0.13	0.33 ± 0.00	2.05 ± 0.05	0.48 ± 0.01
BJWH/C2	2.67 ± 0.36 *	0.16 ± 0.02 *	4.20 ± 0.60 *	0.24 ± 0.03 *

Blackberry juice + whey protein inoculated with consortium 1 (*Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici*, BJWH/C1), consortium 2 (*Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus*, BJWH/C2) and the negative control without LAB inoculum (BJWH/C-). A: increase in cell density; μ : Grow rate; g: Generation time; k: Growth rate constant. Values represent three experiments' mean ± standard deviation (n = 3). * Indicates significant differences between the samples.

The percentages of lactic acid and pH values were measured from the start of fermentation to the end of the storage (day 28, Figure 3). Lactic acid production rose after 4 h of fermentation for BJWH/C1 (0.12%) and BJWH/C2 (0.16%). The highest levels of lactic acid were observed in the BJWH/C2 group during the final 14 days of storage (Figure 3A). Additionally, while the initial pH averaged 5.6 throughout fermentation, it decreased significantly in the BJWH/C2 system during fermentation and storage. BJWH/C1 showed a substantial reduction in pH within the first eight hours of fermentation but remained relatively stable from 12 h onwards through the storage period (Figure 3B).

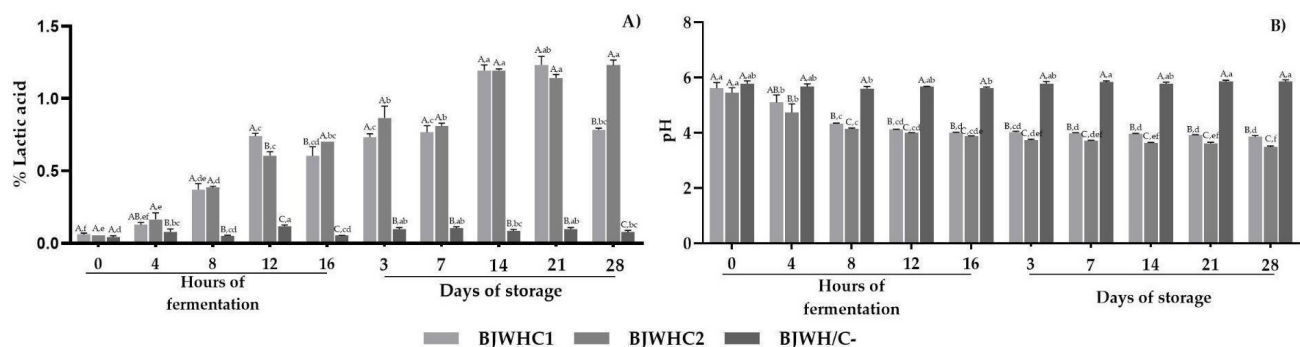


Figure 3. Lactic acid (A) and pH (B) values across the time of fermentation (16 h) and the time of storage (28 days) in Blackberry juice + whey protein inoculated with consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* (BJWH/C1), consortium 2 of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus* (BJWH/C2) and the negative control without LAB inoculum (BJWH/C-). Values represent three experiments, mean ± standard deviation (n = 3). Different capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the various strains or consortiums for each fermentation and storage time. Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) of each strain or consortium between their different fermentation and storage times.

Regression analysis was used to determine the correlation coefficients for lactic acid (Figure 4) and pH (Figure 5) with fermentation and storage time. Data for each factor were modeled with a third-degree polynomial curve. Lactic acid levels increased continuously up to 12 h of fermentation for BJWH/C1 (Figure 4A) and up to 16 h for BJWH/C2 (Figure 4C), with similar trends extending up to 21 days of storage for BJWH/C1 (Figure 4B). Most curves exhibited an R^2 value greater than 0.97, except for lactic acid production in BJWH/C2 during storage (Figure 4D), which had an R^2 of 0.80. pH levels decreased with extended fermentation or storage time, reflecting their relationship with lactic acid production (Figure 5). This analysis highlights a strong connection between lactic acid and pH, significantly influenced by time.

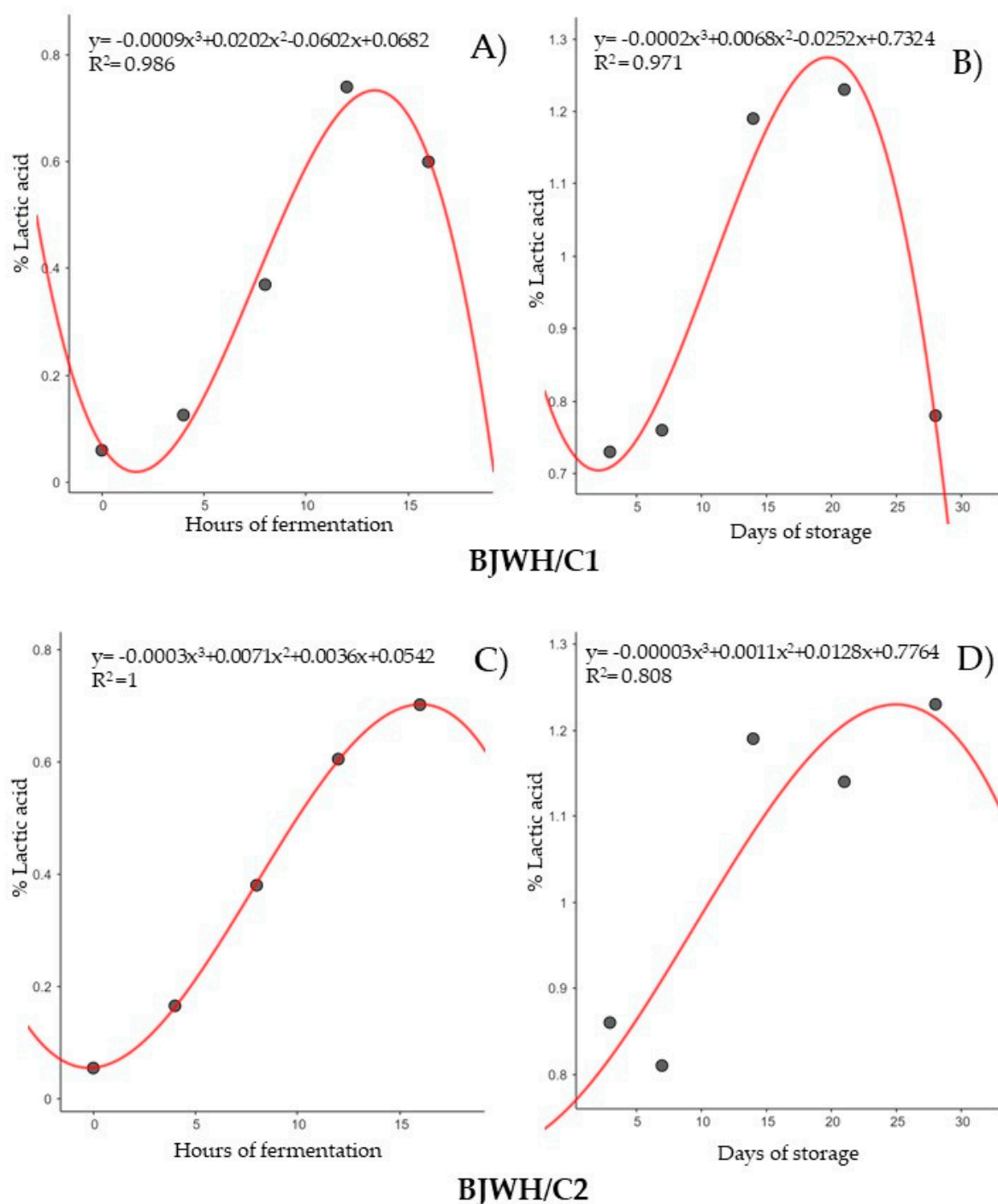


Figure 4. Non-linear regression analysis lactic acid values across the time of fermentation (16 h) and the time of storage (28 days) in blackberry juice + whey protein inoculated with consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* (BJWH/C1) (A,B), consortium 2 of *Lacticaseibacillus casei* and *Lactiacaseibacillus rhamnosus* (BJWH/C2) (C,D).

The total soluble solids were one °Brix lower in the LAB-inoculated systems (BJWH/C1 and BJWH/C2) than controls after the 8 h of fermentation and remained at 5 °Brix throughout storage. Reducing sugars decreased in BJWH/C1 and BJWH/C2 during fermentation and storage, with a more pronounced reduction in BJWH/C2. Overall, reducing sugars levels were significantly lower in BJWH/C1 and BJWH/C2 throughout fermentation and storage compared to the negative control, BJWH/C- (Table 3).

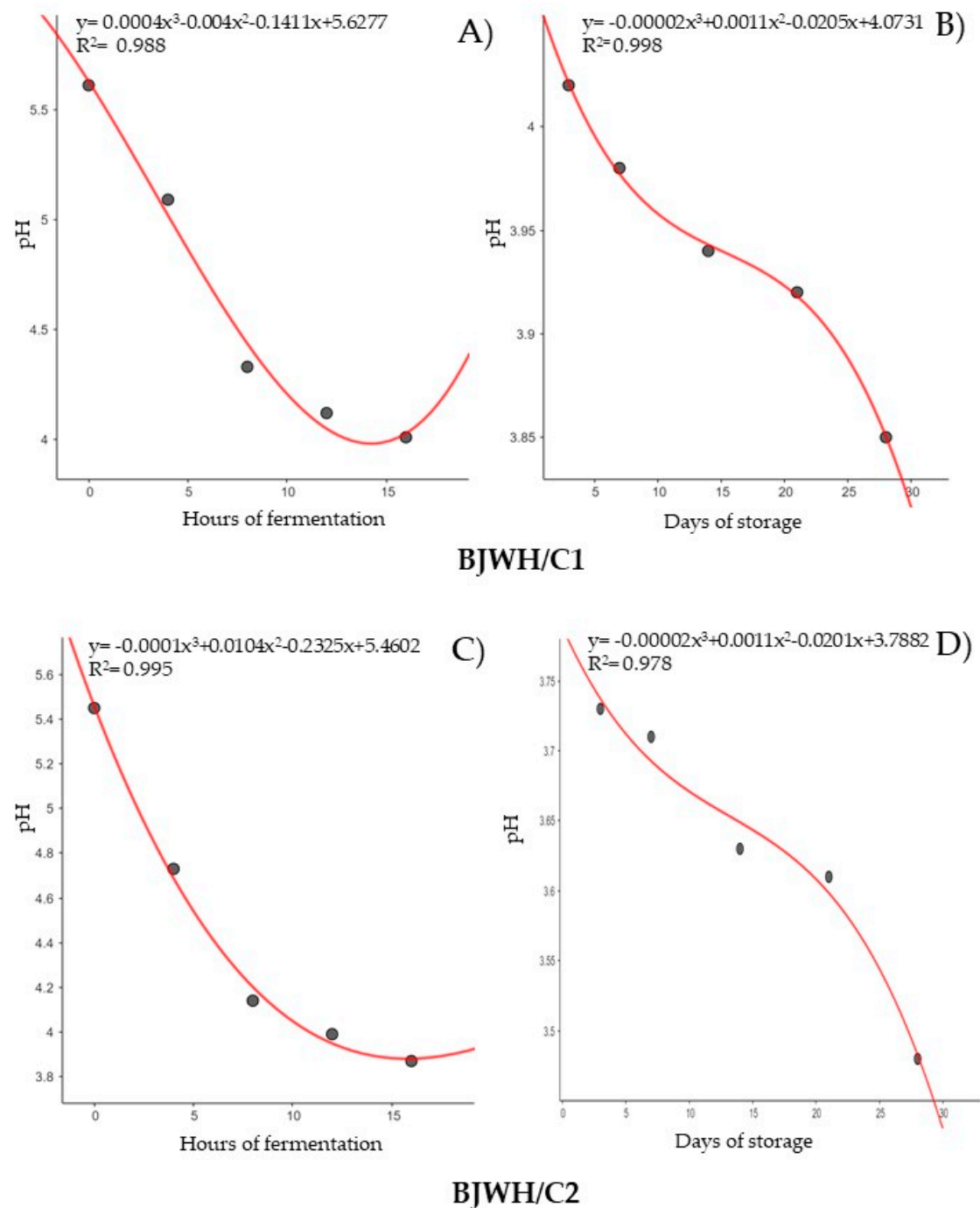


Figure 5. Non-linear regression analysis pH values across the time of fermentation (16 h) and the time of storage (28 days) in blackberry juice + whey protein inoculated with consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* (BJWH/C1) (A,B), consortium 2 of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus* (BJWH/C2) (C,D).

The acceptability of beverages is influenced by their physical stability, viscosity, and color. Table 4 shows the stability (nonprecipitated solids) and viscosity (centipoise) values at the start and end of fermentation (16 h) and during storage. At the end of fermentation and throughout, BJWH inoculated with LAB exhibited greater stability than the negative control, with a mean difference of 35% compared to BJWH/C-. The stability remained consistent for both LAB-inoculated consortia during storage. Regarding viscosity, LAB-inoculated systems (BJWH/C1 and BJWH/C2) significantly decreased in cP values after fermentation, maintaining lower viscosity levels than the negative control throughout

storage. There was no significant difference in viscosity between BJWH/C1 and BJWH/C2 (Table 4).

Table 3. Total soluble solids and reducing sugars at the time of fermentation (0–16 h) and storage (3–28 days) of blackberry juice supplemented with whey.

Time	Total Soluble Solids (°Brix) ¹			Reducing Sugars (g/100 mL)		
	BJWH/C1	BJWH/C2	BJWH/C-	BJWH/C1	BJWH/C2	BJWH/C-
0 h	6	6	6	3.4 ± 0.20 ^{AB,a}	2.9 ± 0.10 ^{B,a}	3.5 ± 0.20 ^{A,bcd}
4 h	6	6	6	2.1 ± 0.20 ^{B,d}	2.6 ± 0.10 ^{C,ab}	3.7 ± 0.40 ^{A,bcd}
8 h	5	5	6	2.6 ± 0.04 ^{B,b}	2.1 ± 0.30 ^{B,c}	3.3 ± 0.20 ^{A,cd}
12 h	5	5	6	2.2 ± 0.01 ^{B,cd}	2.2 ± 0.03 ^{B,c}	3.2 ± 0.02 ^{A,d}
16 h	5	5	6	2.1 ± 0.06 ^{B,d}	2.1 ± 0.08 ^{B,c}	3.4 ± 0.10 ^{A,bcd}
Day 3	5	5	6	2.5 ± 0.10 ^{B,bc}	2.0 ± 0.10 ^{C,c}	3.7 ± 0.07 ^{A,abd}
Day 7	5	5	6	2.2 ± 0.60 ^{B,bcd}	2.2 ± 0.04 ^{B,c}	3.4 ± 0.01 ^{A,bcd}
Day 14	5	5	6	2.1 ± 0.01 ^{C,d}	2.45 ± 0.06 ^{B,bc}	3.4 ± 0.06 ^{A,bcd}
Day 21	5	5	6	2.4 ± 0.08 ^{B,bcd}	2.1 ± 0.08 ^{C,c}	3.9 ± 0.05 ^{A,a}
Day 28	5	5	6	2.5 ± 0.10 ^{B,bc}	2.2 ± 0.03 ^{B,bc}	3.7 ± 0.10 ^{A,ab}

Blackberry juice + whey protein inoculated with consortium 1 (*Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici*, BJWH/C1), consortium 2 (*Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus*, BJWH/C2) and the negative control without LAB inoculum (BJWH/C-). Values represent three experiments' mean ± standard deviation (n = 3); ¹ In these experiments, the SD was zero. Different capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the various strains or consortium for each fermentation time (0–48 h and 3–28 days). Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) of each strain or consortium between their different fermentation and storage times.

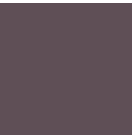
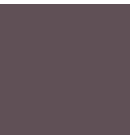
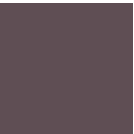
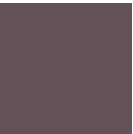
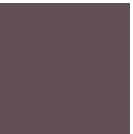
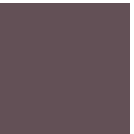
Table 4. Stability and viscosity at the time of fermentation (0–16 h) and storage (3–28 days) of blackberry juice with whey.

Time	Stability (%)			Viscosity (cP)		
	BJWH/C1	BJWH/C2	BJWH/C-	BJWH/C1	BJWH/C2	BJWH/C-
0 h	73.7 ± 0.6 ^{B,b}	76.3 ± 0.5 ^{A,c}	71.3 ± 0.5 ^{C,ab}	64 ± 0.8 ^{A,a}	51.2 ± 0.01 ^{B,a}	63.7 ± 0.9 ^{A,ab}
16 h	84.6 ± 0.5 ^{B,a}	87.7 ± 0.5 ^{A,a}	73 ± 1 ^{C,a}	27.5 ± 1.7 ^{B,b}	24.9 ± 0.4 ^{B,b}	50.4 ± 1.5 ^{A,c}
Day 3	85.3 ± 0.5 ^{A,a}	86.6 ± 0.5 ^{B,ab}	67.4 ± 0.5 ^{C,cd}	22.4 ± 2.2 ^{B,b}	23.7 ± 2.5 ^{B,b}	57.6 ± 1.9 ^{A,bc}
Day 7	85.6 ± 0.5 ^{A,a}	85 ± 1 ^{A,b}	69.6 ± 0.5 ^{B,bc}	26.6 ± 5.2 ^{B,b}	23.3 ± 3 ^{B,b}	59.6 ± 2.6 ^{A,ab}
Day 14	85 ± 0.1 ^{B,a}	87 ± 0.07 ^{A,ab}	67.3 ± 0.5 ^{C,d}	29.7 ± 0.8 ^{B,b}	24.1 ± 2.1 ^{B,b}	62.5 ± 2.9 ^{A,ab}
Day 21	84.7 ± 1.1 ^{A,a}	86.4 ± 0.5 ^{A,ab}	66.5 ± 1.3 ^{B,d}	28.2 ± 0.6 ^{B,b}	25.1 ± 2.4 ^{B,b}	67.5 ± 5.9 ^{A,ab}
Day 28	86.3 ± 0.5 ^{A,a}	86 ± 1.7 ^{A,ab}	69.7 ± 0.6 ^{B,b}	27.8 ± 1 ^{B,b}	25.9 ± 0.3 ^{B,b}	70.5 ± 0.7 ^{A,a}

Blackberry juice + whey protein inoculated with consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* (BJWH/C1), consortium 2 of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus* (BJWH/C2) and the negative control without LAB inoculum (BJWH/C-). Values represent three experiments with mean ± standard deviation (n = 3). Different capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the different strains or consortiums for each fermentation and storage time. Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) of each strain or consortium between their different fermentation and storage times.

Regarding the colorimetric characteristics, the L parameter (luminosity) varied among samples with the LAB inoculum but remained consistent after fermentation and throughout storage (Table 5). The predominant color was red, indicated by increasing a* values post-fermentation, with higher values observed in BJWH/C2 samples during storage. The b* parameter, initially negative in LAB-inoculated samples (BJWH/C1 and BJWH/C2), indicating a blue hue, shifted to positive values in BJWH/C- during storage, reflecting a change to more yellow tones.

Table 5. Colorimetric characteristics of blackberry juice supplemented with whey and two consortia at the time of fermentation (16 h) and time of storage (28 days).

Parameter	Sample	Fermentation		Day 3	Day 7	Storage Day 14	Day 21	Day 28
		0 h	16 h					
L	BJWH/C1	33.6 ± 0.50 ^{B,b}	35.3 ± 0.40 ^{A,a}	36.1 ± 0.40 ^{A,a}	35.6 ± 0.20 ^{A,a}	34.8 ± 1.20 ^{A,ab}	35.2 ± 0.30 ^{A,ab}	35.7 ± 0.20 ^{A,a}
	BJWH/C2	35.4 ± 0.40 ^{A,a}	34.9 ± 0.60 ^{A,a}	36.3 ± 0.60 ^{A,a}	36.0 ± 0.10 ^{A,a}	35.6 ± 0.50 ^{A,a}	36.0 ± 0.10 ^{A,a}	35.4 ± 0.80 ^{A,a}
	BJWH/C-	34.5 ± 0.40 ^{AB,a}	33.5 ± 0.08 ^{B,a}	34.6 ± 0.60 ^{B,a}	34.4 ± 0.50 ^{B,a}	34.3 ± 0.50 ^{A,a}	34.0 ± 0.50 ^{B,a}	34.6 ± 10 ^{A,a}
a*	BJWH/C1	1.3 ± 0.10 ^{B,b}	7.8 ± 0.10 ^{A,a}	8.3 ± 0.20 ^{B,a}	7.9 ± 0.30 ^{B,a}	8.4 ± 0.20 ^{B,a}	8.1 ± 0.40 ^{B,a}	8.2 ± 0.10 ^{B,a}
	BJWH/C2	2.5 ± 0.30 ^{A,d}	8.1 ± 0.60 ^{A,c}	9.5 ± 0.50 ^{A,abc}	9.1 ± 0.10 ^{A,bc}	10 ± 0.70 ^{A,ab}	10.5 ± 0.10 ^{A,a}	9.9 ± 0.03 ^{A,ab}
	BJWH/C-	1.5 ± 0.20 ^{B,a}	1.3 ± 0.30 ^{B,a}	1.7 ± 0.30 ^{C,a}	1.2 ± 0.03 ^{C,a}	1.4 ± 0.10 ^{C,a}	1.1 ± 0.02 ^{C,a}	1.2 ± 0.04 ^{C,a}
b*	BJWH/C1	−0.8 ± 0.06 ^{B,a}	−1.3 ± 0.10 ^{B,a}	−1.3 ± 0.10 ^{B,a}	−1.2 ± 0.10 ^{B,a}	−1.2 ± 0.20 ^{C,a}	−1.0 ± 0.07 ^{C,a}	−1.0 ± 0.06 ^{C,a}
	BJWH/C2	−1.4 ± 0.02 ^{C,c}	−0.8 ± 0.10 ^{B,bc}	−1.0 ± 0.10 ^{B,bc}	−0.7 ± 0.10 ^{AB,ab}	−0.5 ± 0.03 ^{B,ab}	−0.4 ± 0.10 ^{B,a}	−0.5 ± 0.07 ^{B,ab}
	BJWH/C-	−0.6 ± 0.06 ^{A,c}	−0.1 ± 0.01 ^{A,bc}	−0.1 ± 0.30 ^{A,abc}	−0.1 ± 0.01 ^{A,abc}	0.04 ± 0.20 ^{A,abc}	0.3 ± 0.06 ^{A,ab}	0.3 ± 0.06 ^{A,a}
Chroma	BJWH/C1	1.7 ± 0.20 ^{B,b}	7.9 ± 0.10 ^{B,a}	8.4 ± 0.30 ^{B,a}	7.9 ± 0.30 ^{B,a}	8.4 ± 0.1 ^{B,a}	8.2 ± 0.40 ^{B,a}	8.2 ± 0.10 ^{B,a}
	BJWH/C2	2.8 ± 0.20 ^{A,d}	8.2 ± 0.60 ^{A,c}	9.6 ± 0.50 ^{A,abc}	9.1 ± 0.10 ^{A,bc}	10 ± 0.7 ^{A,ab}	10.5 ± 0.10 ^{A,a}	10 ± 0.03 ^{A,abc}
	BJWH/C-	1.7 ± 0.10 ^{B,a}	1.4 ± 0.30 ^{B,a}	1.7 ± 0.30 ^{C,a}	1.2 ± 0.03 ^{C,a}	1.4 ± 0.1 ^{C,a}	1.1 ± 0.01 ^{C,a}	1.2 ± 0.05 ^{C,a}
Hue	BJWH/C1	−27.4 ± 2.20 ^{A,b}	−8.5 ± 0.70 ^{A,a}	−9.2 ± 0.70 ^{A,a}	−8.5 ± 0.40 ^{A,a}	−7.5 ± 1.40 ^{A,a}	−7.3 ± 0.10 ^{B,a}	−6.7 ± 0.30 ^{C,a}
	BJWH/C2	−26.3 ± 1.80 ^{A,b}	−6.1 ± 0.60 ^{A,a}	−5.7 ± 0.60 ^{A,a}	−4.7 ± 0.90 ^{A,a}	−2.7 ± 0.20 ^{A,a}	−2.2 ± 0.60 ^{B,a}	−3.2 ± 0.40 ^{B,a}
	BJWH/C-	−20.7 ± 0.30 ^{A,c}	−7.4 ± 1.80 ^{A,cd}	−3.2 ± 0.20 ^{A,abc}	−7.3 ± 0.90 ^{A,c}	1.9 ± 0.10 ^{A,abc}	15.3 ± 2.60 ^{A,ab}	17 ± 1.60 ^{A,a}
Sistema color	BJWH/C1							
	BJWH/C2							
	BJWH/C-							

L: luminosity. Blackberry juice + whey inoculated with consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* (BJWH/C1), consortium 2 of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus* (BJWH/C2), and the negative control without LAB inoculum (BJWH/C-). Values represent three experiments with mean ± standard deviation (n = 3). Different capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the different strains or consortia for each fermentation and storage time. Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between fermentation and storage time of each strain or consortium.

Chroma measures color saturation, with values ranging from 0 to 100, reflecting the intensity of the sample's color. The results show that BJWH/C2 and BJWH/C1 are brighter than BJWH/C-. Additionally, negative hue values in BJWH/C1 and BJWH/C2 indicate a pinkish tone. A more detailed graphical representation of these color results is provided in Table 5.

Finally, the levels of phenolic compounds, anthocyanins, and the scavenging activity of 2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were evaluated during fermentation and storage (Figure 6). The total phenolic content significantly decreased in all samples after 4 h of fermentation, averaging 30 mg GAE/100 mL ($p < 0.05$). This decline continued in BJWH/C1 through the end of storage, while BJWH/C2 showed a 19% increase after 3 days of storage, with higher levels observed in the control (BJWH/C-, Figure 6A). In contrast, the anthocyanin content was notably higher in BJWH/C1 after 4, 8, and 12 h of fermentation but showed an opposite trend at 16 h and 3 days. During storage, LAS-inoculated systems had a higher anthocyanin content compared to BJWH/C-, with BWH/C1 maintaining greater stability than BJWH/C2 by the end of storage (Figure 6B).

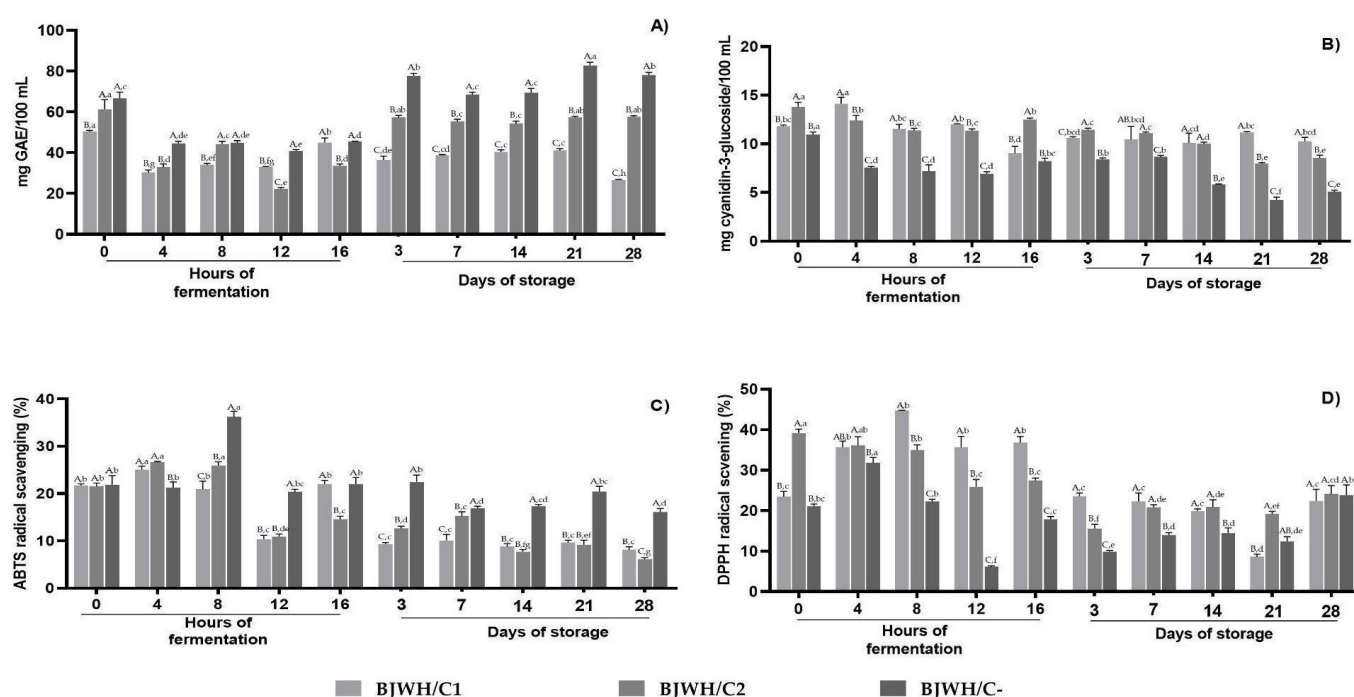


Figure 6. Content of total phenolic compounds (A), anthocyanins (B), ABTS scavenging (C), and DPPH scavenging (D). Values across the time of fermentation (16 h) and the time of storage (28 days) in Blackberry juice + whey inoculated with consortium 1 of *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus acidilactici* (BJWH/C1), consortium 2 of *Lactocaseibacillus casei* and *Lactocaseibacillus rhamnosus* (BJWH/C2) and the negative control without LAB inoculum (BJWH/C-). Values represent three experiments with mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Different capital letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the different strains or consortiums for each fermentation and storage time. Different lowercase letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) of each strain or consortium between their different fermentation and storage times.

For ABTS, which measures free radical scavenging activity, the BJWH/C1 fermentation system maintained its antioxidant activity at 0 h. However, during storage, the antioxidant capacity decreased by 57.7% in both consortia, with the non-inoculated sample exhibiting a significantly higher scavenging capacity ($p < 0.05$, Figure 6C). Despite this, DPPH scavenging activity was significantly higher at 8, 12, and 16 h of fermentation in BJWH/C1,

averaging 38% activity. After 3 days of storage, the scavenging activity decreased by 36% in BJWH/C1, 43% in BJWH/C2, and 44.6% in BJWH/C- (Figure 6D).

3. Discussion

This study explored the effects of adding isolated whey protein to blackberry juice, using two consortia to optimize biomass growth at 24 and 48 h of fermentation. Additionally, we aimed to maintain stable levels of phytochemicals and antioxidants throughout storage. The growth of strains like *L. brevis* and *L. plantarum* was significantly higher at 24 h in the whey protein system. However, the blackberry juice (BJ) system was less favorable for all LAB strains. This outcome is similar to findings from fermenting elderberry juice with *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, and *L. casei*. The authors noted that *L. casei* strains struggled to grow in the acidic environment, likely due to their origin in cheese, making them less adapted to acidic juices [24–26].

In the case of the limited growth observed in the BJ system, it could be attributed to the inherent chemical and physical properties of the fruit, such as its acidic environment, buffering capacity, high concentrations of indigestible nutrients (like fiber and fructooligosaccharides), and the presence of anti-nutritional compounds (such as phenols and tannins). Additionally, these factors may interact with the amino acids and proteins in whey [27].

Therefore, a protein source has been proposed to enhance biomass production and create a supportive environment for lactic acid bacteria (LAB). However, few studies have explored the impact of adding whey protein for fermentation systems to boost biomass in fruit beverages. Our research found that fermenting blackberry juice alone did not increase LAB counts. However, adding whey protein to blackberry juice significantly raised the LAB counts after 24 h (Figure 1C). Additionally, two different consortia were used, one consisting of *L. brevis*, *L. plantarum*, and *P. acidilactici* and the other of *L. casei* and *L. rhamnosus*, which proved to be more effective in promoting growth in the BJWH fermentation system, resulting in significantly higher LAB counts than other matrices (BJ and WH).

In addition, a similar pattern was observed in whey fermentation using *L. rhamnosus* and *S. thermophilus*, both in monoculture and co-culture. The authors found co-culturing these strains was more effective for biomass production [28]. The bacterial growth observed in BJWH/C1 and BJWH/C2 could be attributed to adding whey protein as a supplement, which enhances biomass production during fermentation and provides a valuable source for functional metabolites [3].

This study showed that combining blackberry juice with whey protein resulted in a more substantial increase in biomass than using the juice alone, where LAB counts decreased after 24 h. The synergy between these two food matrices (blackberries, which provide sucrose, glucose, and fructose as energy sources for LAB [29], and whey, which supplies proteins, lactose, fat, and mineral salts [30]) promotes enhanced biomass production. Phenolic compounds, especially ferulic and phenolic esters, play a crucial role in the growth and viability of probiotics in fruit-based food matrices [7]. Their presence has been shown to positively impact them, as they are susceptible to hydrolysis by *L. plantarum* esterases, including feruloyl esterase, tannase, and gallate decarboxylase [31]. Additionally, blackthorn extract (up to 0.62 mg) has been found to exhibit prebiotic properties that support the growth of LAB strains, such as *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, and *S. thermophilus* [32].

Conversely, synergism within bacterial consortia establishes the essential conditions for strain growth. Compared to individual samples, the notable bacterial growth in BJWH/C1 and BJWH/C2 can be attributed to the LAB protocoeoperation system. In these systems, microorganisms release and exchange metabolites, promoting optimal development and impacting the growth and acidification of fermentation systems [3]. For example, in a protocoeoperative relationship, *L. rhamnosus* expresses the extracellular proteinase PrtR [33], releasing and accumulating peptides in the medium [34] by other *Lactobacillus*

species. Furthermore, *L. plantarum* and *P. acidilactici* possess a biosynthetic pathway for lysine, which *L. brevis* lacks. Lysine is crucial as a cell wall constituent and an enzymatic substrate in metabolic pathways [35–37]. The combination of LAB in a fermentation medium could be pivotal for the development and viability of probiotics in producing symbiotic fermented foods.

During fermentation, LAB utilizes sugars (hexoses and pentoses) to produce lactic acid, decreasing pH [38–40]. Adjustments such as increasing pH are also necessary to enhance bacterial growth during fermentation [41]. Li et al. (2021) [42] previously reported a significant increase in LAB counts, exceeding 10 log CFU/mL, in blackberry juices using four *L. plantarum* strains and five *L. fermentum* strains, with a 35% increase in lactic acid production. In our study, a more significant reduction in pH was observed in the juice without whey and LAB consortium 1 (BJ/C1) at 24 and 48 h of fermentation, with an average reduction of up to 46%. This is associated with increased lactic acid at 24 h (75%) and 48 h (83%). However, the pH was lower in juice samples containing whey (BJWH) despite higher lactic acid production in BJWH/C1 and BJWH/C2 compared to the BJ and WH samples (Table 1). A similar relationship between pH changes and increased lactic acid production has been reported in whey fermentation with *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus* [30], wolfberry, and longan juice with *L. paracasei* and *L. lactis* subsp. *lactis* [42].

The BJWH/C1 and C2 samples showed a significant increase ($p < 0.05$) in bacterial count during fermentation, with exponential and continuous growth observed for up to 16 h (Figure 2A). This was accompanied by higher lactic acid production and a notable decrease in pH (Figure 3A). Similar results were reported for whey fermented with *L. casei* and *L. rhamnosus*, where exponential biomass growth occurred in the second fermentation stage, likely due to the consumption of lactose and galactose during the first 15 h of exponential growth [43]. Additionally, Wang et al. [44] noted that *L. acidophilus* JYLA-16 (La), *L. plantarum* JYLP-375 (Lp), and *L. rhamnosus* JYLR-005 (Lr) preferentially utilize glucose over fructose as a carbon source during fermentation. Therefore, adding milk whey protein to the fruit juice provides an additional substrate for fermentation, enhancing LAB growth. This effect was similarly observed in pomegranate juice supplemented with whey and fermented with *L. plantarum*, leading to increased LAB growth [45].

The superior performance of the BJWH/C2 system in kinetic parameters can be attributed to a combination of environmental factors and the complex interactions between microorganisms, particularly through proto-cooperation and synergism. Olvera-Rosales et al. (2023) [3] demonstrated that a co-culture system involving *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* in whey surpasses monocultures in both specific growth rate (μ) and generation time (g). This enhanced efficiency is reflected in higher lactic acid production and elevated levels of free amino groups [28]. Additionally, co-culture systems in milk fermentation are well documented to significantly enhance the production yields of lactic acid and secondary metabolites like peptides [34]. These findings highlight the crucial role of microbial interactions in optimizing fermentation processes and improving the overall yield of desired compounds.

During storage at 4 °C for 28 days, a significant decrease in LAB counts was observed during the first week, likely due to the adaptation of LAB in the BJWH/C1 and BJWH/C2. Notably, the LAB count remained above 9 Log CFU/mL by the end of the storage period, suggesting potential therapeutic benefits. Previous studies have shown that LAB mixtures in food matrices can exhibit heterogeneous growth behavior during storage at 4 °C [9,46]. However, by the end of 28 days, the strains survived at desirable and therapeutic levels (6–8 Log CFU/mL), depending on their specific adaptation conditions [46–48]. In consortia of LAB strains *L. acidophilus*, *L. casei*, and *L. plantarum*, added to ferment apple juice without additional nutrients, the maximum growth during fermentation reached 7.5 to 8.3 Log CFU/mL. However, during storage for 20 to 30 days, viable cell counts of *L. casei* rapidly decreased to 5.4 ± 0.04 Log CFU/mL, followed by *L. acidophilus* (5.6 ± 0.13 Log CFU/mL) and *L. plantarum* (5.7 ± 0.13 Log CFU/mL) [49].

During storage at 4 °C, lactic acid and physicochemical parameters (viscosity, color, soluble solids, reducing sugars) remained stable, with only slight variation observed in antioxidant capacity, total phenolic, and anthocyanin levels. The use of multiple LAB strains can enhance lactic acid production due to their homofermentative and heterofermentative characteristics, as well as the activation of various metabolic pathways (EMP, pentose phosphate, and phosphoketolase), depending on the strains used [50]. The increase in lactic acid production was particularly pronounced in BJWH/C1 and BJWH/C2.

Additionally, the total solids in a fermented product are influenced by differences in the activated enzyme systems and the microorganisms' ability to utilize matrix substrates [9]. As LAB consumes sugars, producing lactic acid and increased biomass can help maintain a balance in total solids [51]. Conversely, the reduction in soluble solids was more significant in the WH samples compared to BJ and BJWH at 24 and 48 h, as using protein substrates produces fewer soluble solids. The changes observed in BJ and BJWH are associated with a significant increase in lactic acid, over 45%, and a reduction of up to 48.6% in reducing sugars and bacterial growth.

During storage, the trends observed in lactic acid and pH remained consistent, while the content of reducing sugars decreased, and soluble solids stayed the same. This pattern mirrored the changes observed during fermentation. A similar decrease in pH during storage was reported for carrot juice supplemented with whey and fermented with kefir grains over 21 days [52]. In passion fruit juice fermented with *Lactobacillus plantarum*, the reduction in pH was attributed to the combined effects of the strains' post-acidification capacities and the buffering power of the substrate [53]. Additionally, LAB at low temperatures (4 °C) continue a slow fermentation process to meet their metabolic needs, resulting in ongoing production and consumption of metabolites during this period [54,55].

Lactic acid and pH levels correlated with fermentation or storage time, with correlation coefficients exceeding 0.97. This indicates a highly significant relationship between these parameters and time. The literature suggests that R^2 values close to 1 demonstrate a robust positive relationship between the variables, as seen in kimchi fermentation studies [56]. This strong correlation enables effective monitoring of the fermentation and storage process. Specifically, as the fermentation or storage time advances, lactic acid levels typically rise while pH decreases. These changes reflect the usual dynamics of fermentation, where increased lactic acid production lowers the medium's pH. This predictive relationship serves as a valuable tool for tracking process progress and can also be utilized to optimize and control the quality of the final product over time.

During fermentation, the physical stability of BJWH/C1 and BJWH/C2 improved, while viscosity decreased significantly by 57% for BJWH/C1 and 53% for BJWH/C2. Both properties remained stable throughout storage. The food matrix's structure influences the interplay between stability and viscosity. For instance, a thick and porous gel was observed in the fermentation of milk with strawberry juice using an initial kefir inoculum. However, a protein network with smaller pores enhanced stability and increased viscosity [57]. On the other hand, in a mixed juice (beet, carrot, apple, and strawberry) fermented with kefir grains, the viscosity initially increased within the first 12 h. Still, it later decreased due to the hydrolysis of exopolysaccharides by glycohydrolase [58]. This indicates that LAB-fermented products' physical stability and viscosity are largely determined by the strains' ability to integrate into the food matrix and their metabolic activities.

In the color analysis of BJWH/C1 and BJWH/C2 juices during fermentation, a shift from violet to red tones was observed at 16 h. During storage, the color parameters remained stable. This color change is linked to the stability of anthocyanins under varying pH levels, as anthocyanin cations remain stable in acidic conditions [20,53]. For BJWH/C2 samples, the color was red when the pH was below 7, violet between pH 7 and 8, and blue when the pH exceeded 11. Color variations in matrices containing antioxidants are also influenced by the concentration of glycosylated polyhydroxyl (violet) or polymethoxy (red) groups. Most anthocyanins have two, three, or more sugars attached as oligosaccharide side chains [53].

Lactic acid fermentation of antioxidant-rich foods affects these compounds, with changes dependent on the specific strain and the matrix (fiber, protein) in which they are present. During fermentation, a decrease in phenolic compounds was observed in all samples. This reduction can be attributed to thermal processing, which induces physical and chemical reactions, including the breakdown of bound phenolic compounds and their transformation into other forms [59]. LAB are known to metabolize phenolic compounds [60], possibly due to the biotransformation of these compounds through LAB reductases, decarboxylases, and glycosidases [49,61]. Additionally, LAB-produced hydrolases may hydrolyze phenolic complexes into simpler forms and disrupt cell walls, releasing antioxidant compounds, as seen in the co-fermentation of longan and goji juice [42]. In storage, however, sample BJWH/C2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*) showed an increased total phenolic content. Phenolic acid decarboxylases can catalyze the non-oxidative decarboxylation of phenolic acids to generate P-vinyl derivatives [62].

The fermentation of a drink made from blackberry juice and whey demonstrated that phenolic compounds and anthocyanins became more stable after fermentation with *L. plantarum* and *L. casei*. Binding anthocyanins or phenolic hydroxyl groups stabilized NH, CN, and C [20]. In apple juice fermented with *L. acidophilus*, *L. casei*, and *L. plantarum*, the total phenolic content decreased after 72 h of fermentation and during the first 10 days of storage [49], with stability observed thereafter until day 20. Similarly, Wang et al. [63] reported on the fermentation of mango juice with *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* 6063, and *L. plantarum*.

During fermentation, the anthocyanin content remained stable in the LAB-inoculated samples (BJWH/C1 and BJWH/C2). There was also a slight decrease in BJWH/C1 during storage and a more pronounced decrease in BJWH/C2 starting from day 21. In contrast, blackberry juice without an inoculum significantly reduced anthocyanins from day 14. In yogurt supplemented with 5% freeze-dried mulberry fruit juice (FDMJ), the anthocyanin content increased over 35 days (from 36.49 to 40.65 mg CGE cyanidin-3-glucoside/100 g) [64]. However, antioxidant activities decreased, likely due to the degradation of phenolic compounds or increased milk protein–polyphenol interactions [65]. LAB-produced-glycosidases contribute to reductions in anthocyanins during fermentation by breaking glycosidic bonds [27].

The radical scavenging capacity was measured using ABTS and DPPH assays to assess antioxidant activity. The BJWH/C1 and BJWH/C2 samples retained ABTS activity during the first eight hours of fermentation, followed by a decrease after 12 h. In contrast, DPPH assays showed increased antioxidant capacity during fermentation, especially in BJWH/C1, with activity maintained for the first 14 days of storage (Figure 6D). These antioxidant properties are attributed to proton donation and the samples' acidic and phenolic hydroxyl groups. Similar findings have been reported for fermented chokeberry [5] and mulberry pomace [66], which experienced a decrease in phenolic and anthocyanin contents during fermentation but showed increased ABTS and DPPH scavenging on the first day of fermentation.

One limitation of this study is the lack of analysis of the profiles of sugars and amino acids at the beginning and end of fermentation. Additionally, there is limited research on the effects of co-cultures or consortia, with most studies focusing on individual LAB and *Saccharomyces* strains. Future research should also explore how adding isolated whey to the medium might affect sensory preferences. Despite this, our study found that including whey enhances LAB growth conditions, resulting in good stability and antioxidant capacity during storage at low temperatures.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

The blackberries were sourced from Atotonilco, Hidalgo, Mexico, and the milk whey (100% isolated whey protein) was purchased from HolixLab, Hilmar ingredients® (Guadalajara, Jalisco, Mexico). The autochthonous strains used (*Lactiplantibacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* from aguamiel, *Levilactobacillus brevis* from pulque and *Lacticaseibacillus*

rhamnosus and *Lactocaseibacillus casei* from fermented milk [23]) were isolated and provided by the Academic Area of Nutrition of Autonomous University of Hidalgo State, México.

Rogosa and Sharpe (MRS) agar and broth from MERCK (Rahway, NJ, USA) and Difco (Sparks, MD, USA), respectively, were utilized for culturing. The reagents used for principal assays included sodium hydroxide (NaOH Labessa, Ciudad De León, Guanajuato, Mexico), Folin–Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), sodium carbonate (Meyer, Vallejo, CA, USA), gallic acid (Chem-Cruz, Dallas, TX, USA), potassium chloride (Meyer, Vallejo, CA, USA), sodium acetate (Meyer, Vallejo, CA, USA), hydrochloric acid (Meyer, Vallejo, CA, USA), ammonium 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS, Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), potassium persulfate (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), ascorbic acid (Meyer, Vallejo, CA, USA), 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA), absolute ethyl alcohol (Meyer, Vallejo, CA, USA), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA).

4.2. Blackberry Juice and Whey Preparation

Blackberry fruit (*Rubus fruticosus*) was sourced locally from Atotonilco El Grande, Hidalgo, Mexico. The method outlined by Cervantes-Elizarrarás [67] was followed to obtain clarified juice. The fruits were washed, disinfected, ground, and filtered with a conventional strainer. The juice was then clarified through centrifugation (10,000 rpm for 30 min at 4 °C) and treated with thermoultrasound under optimal conditions (50 ± 1 °C, 17 ± 1 min at 80% amplitude). After processing, the juice was frozen at -35 °C until needed. The whey was prepared by dissolving at 9.3 g/L of water and sterilized before use (121 °C for 15 min).

4.3. Juice Fermentation

Blackberry juice (BJ) and whey (WH) were mixed in a 1:1 ratio to produce BJWH solution, and the pH of all samples (BJ, WH, and BJWH) was adjusted to 6 using 1 M NaOH. The samples were inoculated with LAB strains previously activated on MRS agar (24 h at 37 °C) and growth in 5 mL of MRS broth under the same conditions. The biomass was collected by centrifugation (10,000 rpm for 15 min), resuspended in the fermentation matrices, and adjusted to an approximate initial count of 9 Log CFU/mL. Inoculation was performed with the following consortia: consortium 1 (C1) containing *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* and *Levilactobacillus brevis*; consortium 2 (C2) containing *Lactocaseibacillus rhamnosus* and *Lactocaseibacillus casei*; and negative control (C-) without LAB. The samples were incubated at 37 °C for 48 h, with 20 mL aliquots taken 0, 24, and 48 h during the initial phase. Testing continued for 32 h in the subsequent phase, with aliquots collected every 4 h. For storage analysis, the fermented samples were kept in the dark at 4 °C, with aliquots taken on days 3, 7, 14, 21, and 28. All aliquots were centrifuged (10,000 rpm for 15 min at 4 °C) and the supernatants were stored at -32 °C to analyze reducing sugars and antioxidant properties.

4.4. Microbiological Analysis of Fermented Juice

Microbiological analysis was conducted using the micro drop method described by Strahsburger, Retamales, Estrada, and Seeger [68]. The fermented juice samples' serial dilutions (1:10) were prepared in a peptone water solution for microbial counting. Aliquots were then inoculated onto MRS agar and incubated at 37 °C for 36 h. The results were logarithms of ten colony-forming units per milliliter (Log₁₀ CFU/mL).

4.5. Kinetic Parameters at the Time of Fermentation

The kinetic parameters were determined using Monod's mathematical model [69], which describes the growth of microorganisms during the exponential phase. The initial (N_0) and final (N_x) concentrations of growth were measured during the logarithmic phase, corresponding to the initial time (t_0) and final time (t_x). The increases in cell density (A),

growth rate (μ), generation time (g) and growth constant (k) were calculated using the following equations:

$$A = \text{Log}N_x - \text{Log}N_0$$

$$\mu = [\text{In}(N_x) - \text{In}(N_0)] / (t_x - t_0)$$

$$g = \text{In}(2) / \mu$$

$$k = 1/g$$

4.6. pH, Titratable Acidity and Soluble Solids of Fermented Juice

The pH was measured using a potentiometric method following standard procedures. Titratable acidity was determined by titrating a 1:10 dilution of the juice with deionized water using 0.01 N NaOH until a pH of 8.2 was reached. The titratable acidity was expressed as a percentage equivalent to lactic acid. Total soluble solids ($^{\circ}\text{Brix}$) were measured with a manual ATC refractometer by placing a drop of the juice on the prism, calibrating, and then taking the reading. Non-linear regression analysis was performed on the lactic acid and pH variables for fermentation (48 h) and storage (28 days), using GeoGebra Classic (version 6.0.851.0, <https://www.geogebra.org/classic?lang=es>, 12 July 2024) to model polynomial behavior.

4.7. Stability and Viscosity of Fermented Juice

The stability percentage was determined using the following procedure: 10 g of sample (sW) was weighed and centrifuged at 3500 rpm (Hamilton, model V65000, Montvale, NJ, USA) for 30 min. The precipitate (SW) was decanted and weighed. Stability was calculated using the equation below and expressed as a percentage.

$$\text{Stability (\%)} = 100 - [(SW/sW) \times 100]$$

Viscosity was measured using the method described by Díaz-Jiménez, Sosa-Morales, and Vélez-Ruiz [70] with a Brookfield DV3T viscometer (Manassas, VA, USA), employing needle LV-4 at 60 rpm. The readings were taken in centipoises (cP). A 30 mL aliquot was used, and measurements were started after 30 s, at which point the cP values stabilized.

4.8. Measure of the Color of Fermented Samples

Color measurements were taken using a colorimeter (Minolta CM-80, 500 SM-508D, Osaka, Japan Co., Ltd.) with a D65 illuminant and a 10° observation angle. Then, 5 mL of fermented juice was placed in a container for analysis. The color parameters were recorded using the CIE— $L^* a^* b^*$ values, where L^* indicates lightness ($L = 0$ for black and $L = 100$ for white), a^* measures the chromaticity from green (−) to red (+), and b^* measures the chromaticity from blue (−) to yellow (+). The colorimeter also provided the hue angle (h) and chroma (C) [71].

4.9. Antioxidant Properties

4.9.1. Total Phenolic Content

Total phenolic content (TPC) was measured following the method described by Stintzing et al. [72]. In brief, 100 μL of the sample was mixed with 500 μL of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. After adding 400 μL of 7.5% sodium carbonate, the mixture was incubated at room temperature for 30 min. The absorbance was then measured at 765 nm using a microplate lector (Power Wave XS UV-Biotek Gen 5 software (version 3.16.10), KC Junior, Winooski, VT, USA). Gallic acid served as the reference standard, and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 100 milliliters (mg GAE/100 mL).

4.9.2. Anthocyanins

The anthocyanin content was measured using the method outlined by Wallace and Giusti [73]. Two buffers were prepared: potassium chloride at 0.025 M and pH 1 (0.466 g in 250 mL of distilled water) and sodium acetate at 0.4 M and pH 4.5 (8.203 g in 250 mL of distilled water), with pH adjusted using 6 M HCl. A 4.5 mL aliquot of either buffer was mixed with 0.5 mL of the sample, and the mixture was allowed to stand for 15 min at room temperature and in complete darkness. Absorbance was then measured using a microplate lector (Power Wave XS UV-Biotek Gen 5 software (version 3.16.10) KC Junior, Winooski, VT, USA) at 510 and 700 nm wavelengths with the respective buffer. Results were expressed as milligrams of Cyanidin-3-glucoside per 100 milliliters of the sample (mg Cy-3-Gl/100 mL).

4.9.3. Antioxidant Activity by ABTS

Antiradical capacity was assessed following the method described by Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, and Fett [74]. An ABTS stock solution was prepared using 7 mmol/L ABTS and 2.45 mmol/L potassium persulfate and stored at a dark room temperature for 16 h. This stock solution was diluted with deionized water until an absorbance of 0.70 ± 0.10 at 754 nm was achieved. A 20 μ L aliquot of the sample was added to 980 μ L of the diluted ABTS solution, and absorbance readings were taken after 7 min incubation at room temperature. The absorbance was measured at 754 nm using a microplate reader (Power Wave XS UV-Biotek Gen 5 software (version 3.16.10), KC Junior, Winooski, VT, USA). Antioxidant capacity was expressed as milligrams of vitamin C equivalent antioxidant capacity per 100 milliliters (mg VCEAC/100 mL) of the fermented juice.

4.9.4. Antioxidant Activity by DPPH

Antiradical activity was assessed using DPPH radicals [75]. A stable DPPH radical solution was prepared in ethanol (7.4 mg/100 mL). In Eppendorf tubes, 100 μ L of the extract was mixed with 500 μ L of the DPPH solution and allowed to react for one hour at room temperature. Absorbance was then measured at 520 nm using a microplate reader (Power Wave XS UV-Biotek Gen 5 software (version 3.16.10), KC Junior, Winooski, VT, USA). The results are expressed as the fermented juice's micromoles of Trolox equivalents per 100 milliliters (μ mol TE/100 mL).

4.10. Statistical Analysis

All results are presented as the mean and standard deviation (mean $\pm$ SD) of three independent experiments ($n = 3$) with a significance level of $p < 0.05$. Comparisons were made for the same strain or consortium at different fermentation times (0, 24, and 48 h) and storage periods (3, 7, 14, 21, and 28 days). Additionally, analyses were conducted between different strains or consortia across fermentation and storage time. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), with two-way ANOVA applied for bacterial growth during fermentation (48 h) and storage (28 days). Kinetic parameters were compared using Student's *t*-test and post hoc Tukey test, with statistical analyses performed using SPSS v. 19 software.

5. Conclusions

This study underscores the significant advantages of incorporating whey protein into fruit-based beverages, particularly highlighting its impact on enhancing the antioxidant content and maintaining probiotic viability during refrigerated storage. This approach provides a sustainable alternative for using blackberries and showcases the synergistic effects between probiotics, whey-derived peptides, and phenolic compounds, which act as potential prebiotics.

Statistical analysis reveals that fermenting blackberry juice with added whey protein and two or three strains of lactic acid bacteria (LAB) results in continuous and linear growth patterns, surpassing the fermentation outcomes of blackberry juice or whey alone. The regression analysis further confirms a strong correlation between pH and lactic acid

production, dependent on the time, throughout fermentation and subsequent refrigerated storage. These findings indicate that the effectiveness of these fermentations depends on the specific proteolytic systems of the bacteria involved and their ability to adapt to the medium.

Moreover, the lactic acid fermentation process contributes to the stability of the beverage's physicochemical properties, notably enhancing its viscosity and color characteristics in both consortia (BJWH/C1 and BJWH/C2). Additionally, the fermentation of BJWH/C1 and BJWH/C2 during storage successfully preserves anthocyanins, ensuring sustained antioxidant potential over 28 days at low temperatures.

These advancements suggest that such formulations could improve consumer acceptability and offer potential health benefits. Future research is recommended to explore these potential benefits further and optimize the formulation for enhanced performance.

Author Contributions: L.L.-Z. investigation and methodology, L.L.-Z. and A.S.J.-O. conceptualization, formal analysis, writing—original draft and editing. L.D.-O., N.d.S.C.-C. and N.S.C.-J. investigation advisors and validation. L.L.-Z., A.S.J.-O. and L.D.-O. project administration. D.E.-L. manuscript review and edited. A.S.J.-O., N.d.S.C.-C. and L.D.-O. supervision and validation, L.G.G.-O. Data curation, formal analysis, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Fondos Estatales Genéricos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo”, Number 110201.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Rodzi, N.A.R.M.; Lee, L.K. Traditional Fermented Foods as Vehicle of Non-Dairy Probiotics: Perspectives in South East Asia Countries. *Food Res. Int.* **2021**, *150*, 110814. [\[CrossRef\]](#)
2. Rastogi, Y.R.; Thakur, R.; Thakur, P.; Mittal, A.; Chakrabarti, S.; Siwal, S.S.; Thakur, V.K.; Saini, R.V.; Saini, A.K. Food Fermentation—Significance to Public Health and Sustainability Challenges of Modern Diet and Food Systems. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *371*, 109666. [\[CrossRef\]](#)
3. Olvera-Rosales, L.B.; Pérez-Escalante, E.; Castañeda-Ovando, A.; Contreras-López, E.; Cruz-Guerrero, A.E.; Regal-López, P.; Cardelle-Cobas, A.; González-Olivares, L.G. ACE-Inhibitory Activity of Whey Proteins Fractions Derived of Fermentation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102. *Foods* **2023**, *12*, 2416. [\[CrossRef\]](#)
4. Duan, W.; Zhou, L.; Ren, Y.; Liu, F.; Xue, Y.; Wang, F.-Z.; Lu, R.; Zhang, X.-J.; Shi, J.-S.; Xu, Z.-H.; et al. Lactic Acid Fermentation of Goji Berries (*Lycium barbarum*) Prevents Acute Alcohol Liver Injury and Modulates Gut Microbiota and Metabolites in Mice. *Food Funct.* **2024**, *15*, 1612–1626. [\[CrossRef\]](#)
5. Wang, J.; Wei, B.; Xu, J.; Jiang, H.; Xu, Y.; Wang, C. Influence of Lactic Acid Fermentation on the Phenolic Profile, Antioxidant Activities, and Volatile Compounds of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) Juice. *J. Food Sci.* **2024**, *89*, 834–850. [\[CrossRef\]](#)
6. Li, Y.; Wang, W.; Deng, Y.; Gao, J.; Shi, J.; Cai, L. Antioxidant Properties and Changes in Vitro Digestion of the Fermented Kiwifruit Extract Prepared by Lactic Acid Bacteria and Yeasts. *Food Chem.* **2024**, *442*, 138416. [\[CrossRef\]](#)
7. Ruiz Rodríguez, L.G.; Zamora Gasga, V.M.; Pescuma, M.; Van Nieuwenhove, C.; Mozzi, F.; Sánchez Burgos, J.A. Fruits and Fruit By-Products as Sources of Bioactive Compounds. Benefits and Trends of Lactic Acid Fermentation in the Development of Novel Fruit-Based Functional Beverages. *Food Res. Int.* **2021**, *140*, 109854. [\[CrossRef\]](#)
8. Luo, Y.; Tang, R.; Qiu, H.; Song, A. Widely Targeted Metabolomics-Based Analysis of the Impact of *L. plantarum* and *L. paracasei* Fermentation on *rosa roxburghii* Tratt Juice. *Int. J. Food Microbiol.* **2024**, *417*, 110686. [\[CrossRef\]](#)
9. Yan, Y.; Zhang, F.; Chai, Z.; Liu, M.; Battino, M.; Meng, X. Mixed Fermentation of Blueberry Pomace with *L. rhamnosus* GG and *L. plantarum*-1: Enhance the Active Ingredient, Antioxidant Activity and Health-Promoting Benefits. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *131*, 110541. [\[CrossRef\]](#)
10. Mustafa, S.M.; Chua, L.S.; El-Enshasy, H.A.; Abd Majid, F.A.; Hanapi, S.Z.; Abdul Malik, R. Effect of Temperature and pH on the Probiotication of *Punica granatum* Juice Using *Lactobacillus* Species. *J. Food Biochem.* **2019**, *43*, e12805. [\[CrossRef\]](#)

11. Lima, W.D.L.; Monteiro, S.S.; Pasquali, M.A.d.B. Study of Fermentation Strategies by *Lactobacillus gasseri* for the Production of Probiotic Food Using Passion Fruit Juice Combined with Green Tea as Raw Material. *Foods* **2022**, *11*, 1471. [\[CrossRef\]](#)
12. Liu, M.; Zhang, L.; Li, J.; Xu, G.; Zong, W.; Wang, L. Effects of Lactic Acid Bacteria on Antioxidant Activity in Vitro and Aroma Component of *Eucommia ulmoides* Tea. *J. Food Sci. Technol.* **2024**, *61*, 169–177. [\[CrossRef\]](#)
13. Huynh, N.K.; Wilson, M.D.; Eyles, A.; Stanley, R.A. Recent Advances in Postharvest Technologies to Extend the Shelf Life of Blueberries (*Vaccinium* sp.), Raspberries (*Rubus idaeus* L.) and Blackberries (*Rubus* sp.). *J. Berry Res.* **2019**, *9*, 687–707. [\[CrossRef\]](#)
14. Aguilera, J.M. Berries as Foods: Processing, Products, and Health Implications. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2024**, *15*, 1–26. [\[CrossRef\]](#)
15. Khaire, R.A.; Gogate, P.R. Chapter 7—Whey Proteins. In *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications*; Galanakis, C.M., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 193–223. ISBN 978-0-12-816695-6.
16. Pillai, A.T.; Morya, S.; Kasankala, L.M. Emerging Trends in Bioavailability and Pharma-Nutraceutical Potential of Whey Bioactives. *J. Nutr. Metab.* **2024**, *2024*, 8455666. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Rosa, L.S.; Santos, M.L.; Abreu, J.P.; Rocha, R.S.; Esmerino, E.A.; Freitas, M.Q.; Mársico, E.T.; Campelo, P.H.; Pimentel, T.C.; Cristina Silva, M.; et al. Probiotic Fermented Whey-Milk Beverages: Effect of Different Probiotic Strains on the Physicochemical Characteristics, Biological Activity, and Bioactive Peptides. *Food Res. Int.* **2023**, *164*, 112396. [\[CrossRef\]](#)
18. Qian, Y.; Gui-Bing, L.; Wen-Qiong, W.; Cong-Cong, T.; Ruixia, G. The Mechanism of Whey Protein and Blueberry Juice Mixed System Fermented with *Lactobacillus* Inhibiting *Escherichia coli* during Storage. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 6614. [\[CrossRef\]](#)
19. Gordon, R.A.; Zumbro, E.L.; Castleberry, T.J.; Sokoloski, M.L.; Brisebois, M.F.; Irvine, C.J.; Duplanty, A.A.; Ben-Ezra, V. Whey Protein Improves Glycemia during an Oral Glucose Tolerance Test Compared to Vigorous-Intensity Aerobic Exercise in Young Adult Men. *BMC Sports Sci. Med. Rehabil.* **2022**, *14*, 147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Wen-Qiong, W.; Jie-Long, Z.; Qian, Y.; Ji-Yang, Z.; Mao-Lin, L.; Rui-Xia, G.; Yujun, H. Structural and Compositional Changes of Whey Protein and Blueberry Juice Fermented Using *Lactobacillus plantarum* or *Lactobacillus casei* during Fermentation. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 26291–26302. [\[CrossRef\]](#)
21. Cai, Z.; Guo, Y.; Zheng, Q.; Liu, Z.; Zhong, G.; Zeng, L.; Huang, M.; Pan, D.; Wu, Z. Screening of a Potential Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* NUC08 and Its Synergistic Effects with Yogurt Starter. *J. Dairy Sci.* **2024**, *107*, 2760–2773. [\[CrossRef\]](#)
22. Karimkhani, M.M.; Jamshidi, A.; Nasrollahzadeh, M.; Armin, M.; Jafari, S.M.; Zeinali, T. Fermentation of *Rubus dolichocarpus* juice using *Lactobacillus gasseri* and *Lactocaseibacillus casei* and protecting phenolic compounds by Stevia extract during cold storage. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 5711. [\[CrossRef\]](#)
23. Cervantes-Elizarrarás, A.; Cruz-Cansino, N.D.S.; Ramírez-Moreno, E.; Vega-Sánchez, V.; Velázquez-Guadarrama, N.; Zafra-Rojas, Q.Y.; Piloni-Martini, J. In vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from aguamiel and pulque and antibacterial activity against pathogens. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 601. [\[CrossRef\]](#)
24. Filannino, P.; Cardinali, G.; Rizzello, C.G.; Buchin, S.; De Angelis, M.; Gobbetti, M.; Di Cagno, R. Metabolic Responses of *Lactobacillus plantarum* Strains during Fermentation and Storage of Vegetable and Fruit Juices. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2206–2215. [\[CrossRef\]](#)
25. Ricci, A.; Cirlini, M.; Levante, A.; Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Lazzi, C. Volatile Profile of Elderberry Juice: Effect of Lactic Acid Fermentation Using *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. casei* strains. *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 412–422. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Ricci, A.; Cirlini, M.; Maoloni, A.; Del Rio, D.; Calani, L.; Bernini, V.; Galaverna, G.; Neviani, E.; Lazzi, C. Use of Dairy and Plant-Derived Lactobacilli as Starters for Cherry Juice Fermentation. *Nutrients* **2019**, *11*, 213. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Di Cagno, R.; Coda, R.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* **2013**, *33*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Olvera-Rosales, L.B.; Cruz-Guerrero, A.E.; Jaimez-Ordaz, J.; Pérez-Escalante, E.; Quintero-Lira, A.; Ramírez-Moreno, E.; Contreras-López, E.; González-Olivares, L.G. Differences in the Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria Affect the Release of DPP-IV Inhibitory Peptides from Whey Proteins. *Dairy* **2023**, *4*, 515–526. [\[CrossRef\]](#)
29. Fan-Chiang, H.-J.; Wrolstad, R.E. Sugar and Nonvolatile Acid Composition of Blackberries. *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 956–965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Pescuma, M.; Hébert, E.M.; Mozzi, F.; de Valdez, G.F. Functional Fermented Whey-Based Beverage Using Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *141*, 73–81. [\[CrossRef\]](#)
31. Surve, S.; Shinde, D.B.; Kulkarni, R. Isolation, characterization and comparative genomics of potentially probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains from Indian foods. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1940. [\[CrossRef\]](#)
32. Marčetić, M.; Samardžić, S.; Ilić, T.; Božić, D.D.; Vidović, B. Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Enzymatic, Antimicrobial and Prebiotic Properties of *Prunus spinosa* L. Fruits. *Foods* **2022**, *11*, 3289. [\[CrossRef\]](#)
33. Pastar, I.; Fira, D.; Strahinić, I.; Krstić, K.; Begović, J.; Topisirović, L.; Jovanović, G. Analysis of the presence of prtR proteinase gene in natural isolates of *Lactobacillus rhamnosus*. *Folia Microbiol.* **2006**, *51*, 535–540. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sebastián-Nicolas, J.L.; Contreras-López, E.; Ramírez-Godínez, J.; Cruz-Guerrero, A.E.; Rodríguez-Serrano, G.M.; Añorve-Morga, J.; González-Olivares, L.G. Milk fermentation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102: Proteolytic profile and ace-inhibitory activity. *Fermentation* **2021**, *7*, 215. [\[CrossRef\]](#)
35. Hao, P.; Zheng, H.; Yu, Y.; Ding, G.; Gu, W.; Chen, S.; Zhao, G. Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15964. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

36. Kobayashi, J. D-amino acids and lactic acid bacteria. *Microorganisms* **2019**, *7*, 690. [\[CrossRef\]](#)
37. Toe, C.J.; Foo, H.L.; Loh, T.C.; Mohamad, R.; Abdul Rahim, R.; Idrus, Z. Extracellular proteolytic activity and amino acid production by lactic acid bacteria isolated from Malaysian foods. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1777. [\[CrossRef\]](#)
38. Espirito-Santo, A.P.; Carlin, F.; Renard, C.M.G.C. Apple, Grape or Orange Juice: Which One Offers the Best Substrate for Lactobacilli Growth?—A Screening Study on Bacteria Viability, Superoxide Dismutase Activity, Folates Production and Hedonic Characteristics. *Food Res. Int.* **2015**, *78*, 352–360. [\[CrossRef\]](#)
39. Mukisa, I.M.; Byaruhanga, Y.B.; Muyanja, C.M.B.K.; Langsrud, T.; Narvhus, J.A. Production of Organic Flavor Compounds by Dominant Lactic Acid Bacteria and Yeasts from *Obushera*, a Traditional Sorghum Malt Fermented Beverage. *Food Sci. Nutr.* **2017**, *5*, 702–712. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. De Angelis, M.; Calasso, M.; Cavallo, N.; Di Cagno, R.; Gobbetti, M. Functional Proteomics within the Genus *Lactobacillus*. *Proteomics* **2016**, *16*, 946–962. [\[CrossRef\]](#)
41. Perjéssy, J.; Hegyi, F.; Nagy-Gasztonyi, M.; Zalán, Z. Effect of the Lactic Acid Fermentation by Probiotic Strains on the Sour Cherry Juice and Its Bioactive Compounds. *Food Sci. Technol. Int.* **2022**, *28*, 408–420. [\[CrossRef\]](#)
42. Li, S.; Tao, Y.; Li, D.; Wen, G.; Zhou, J.; Manickam, S.; Han, Y.; Chai, W.S. Fermentation of Blueberry Juices Using Autochthonous Lactic Acid Bacteria Isolated from Fruit Environment: Fermentation Characteristics and Evolution of Phenolic Profiles. *Chemosphere* **2021**, *276*, 130090. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Alvarez, M.M.; Aguirre-Ezkauriatza, E.J.; Ramírez-Medrano, A.; Rodríguez-Sánchez, A. Kinetic Analysis and Mathematical Modeling of Growth and Lactic Acid Production of *Lactobacillus casei* Var. *rhamnosus* in Milk Whey. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 5552–5560. [\[CrossRef\]](#)
44. Wang, J.; Wei, B.-C.; Zhai, Y.-R.; Li, K.-X.; Wang, C.-Y. Non-Volatile and Volatile Compound Changes in Blueberry Juice Inoculated with Different Lactic Acid Bacteria Strains. *J. Sci. Food Agric.* **2024**, *104*, 2587–2596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Pontonio, E.; Montemurro, M.; Pinto, D.; Marzani, B.; Trani, A.; Ferrara, G.; Mazzeo, A.; Gobbetti, M.; Rizzello, C.G. Lactic Acid Fermentation of Pomegranate Juice as a Tool to Improve Antioxidant Activity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Fonseca, H.C.; Melo, D.d.S.; Ramos, C.L.; Menezes, A.G.T.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Sensory and Flavor-Aroma Profiles of Passion Fruit Juice Fermented by Potentially Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0743 Strain. *Food Res. Int.* **2022**, *152*, 110710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Maisto, M.; Annunziata, G.; Schiano, E.; Piccolo, V.; Iannuzzo, F.; Santangelo, R.; Ciampaglia, R.; Tenore, G.C.; Novellino, E.; Grieco, P. Potential Functional Snacks: Date Fruit Bars Supplemented by Different Species of *Lactobacillus* spp. *Foods* **2021**, *10*, 1760. [\[CrossRef\]](#)
48. Neffe-Skocińska, K.; Okoń, A.; Kołożyn-Krajewska, D.; Dolatowski, Z. Amino Acid Profile and Sensory Characteristics of Dry Fermented Pork Loins Produced with a Mixture of Probiotic Starter Cultures. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2953–2960. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Yang, J.; Sun, Y.; Gao, T.; Wu, Y.; Sun, H.; Zhu, Q.; Liu, C.; Zhou, C.; Han, Y.; Tao, Y. Fermentation and Storage Characteristics of “Fuji” Apple Juice Using *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*: Microbial Growth, Metabolism of Bioactives and in Vitro Bioactivities. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 833906. [\[CrossRef\]](#)
50. Eiteman, M.A.; Ramalingam, S. Microbial Production of Lactic Acid. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37*, 955–972. [\[CrossRef\]](#)
51. Mojikon, F.D.; Kasimin, M.E.; Molujin, A.M.; Gansau, J.A.; Jawan, R. Probiotication of Nutritious Fruit and Vegetable Juices: An Alternative to Dairy-Based Probiotic Functional Products. *Nutrients* **2022**, *14*, 3457. [\[CrossRef\]](#)
52. Rejdlová, A.; Salek, R.N.; Mišková, Z.; Lorencová, E.; Kůrová, V.; Adámek, R.; Sumczynski, D. Physical Characterization of a Novel Carrot Juice Whey-Enriched Beverage Fermented with Milk or Water Kefir Starter Cultures. *Foods* **2023**, *12*, 3368. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Wang, W.; Wang, Y.; Liu, X.; Yu, Q. The Characteristics of Whey Protein and Blueberry Juice Mixed Fermentation Gels Formed by Lactic Acid Bacteria. *Gels* **2023**, *9*, 565. [\[CrossRef\]](#)
54. Bontsidis, C.; Mallouchos, A.; Terpou, A.; Nikolaou, A.; Batra, G.; Mantzourani, I.; Alexopoulos, A.; Plessas, S. Microbiological and Chemical Properties of Chokeberry Juice Fermented by Novel Lactic Acid Bacteria with Potential Probiotic Properties during Fermentation at 4 °C for 4 Weeks. *Foods* **2021**, *10*, 768. [\[CrossRef\]](#)
55. Isas, A.S.; Mariotti Celis, M.S.; Pérez Correa, J.R.; Fuentes, E.; Rodríguez, L.; Palomo, I.; Mozzi, F.; Van Nieuwenhove, C. Functional Fermented Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) Juice Using Autochthonous Lactic Acid Bacteria. *Food Res. Int.* **2020**, *138*, 109729. [\[CrossRef\]](#)
56. Kim, S.J.; Lee, J.Y.; Yoon, S.R.; Lee, H.W.; Ha, J.H. Regression analysis for predicting the fermentation state of packaged Kimchi using a colorimetric indicator. *J. Food Eng.* **2019**, *240*, 65–72. [\[CrossRef\]](#)
57. Wang, H.; Wang, C.N.; Guo, M.R. Effects of Addition of Strawberry Juice Pre- or Postfermentation on Physiochemical and Sensory Properties of Fermented Goat Milk. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 4978–4988. [\[CrossRef\]](#)
58. Paredes, J.L.; Escudero-Gilete, M.L.; Vicario, I.M. A New Functional Kefir Fermented Beverage Obtained from Fruit and Vegetable Juice: Development and Characterization. *LWT* **2022**, *154*, 112728. [\[CrossRef\]](#)
59. Chen, W.; Xie, C.; He, Q.; Sun, J.; Bai, W. Improvement in color expression and antioxidant activity of strawberry juice fermented with lactic acid bacteria: A phenolic-based research. *Food Chem.* **2023**, *17*, 100535. [\[CrossRef\]](#)

60. Piekarska-Radzik, L.; Klewicka, E. Mutual influence of polyphenols and *Lactobacillus* spp. bacteria in food: A review. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 9–24. [\[CrossRef\]](#)
61. Gaur, G.; Gänzle, M.G. Conversion of (Poly)Phenolic Compounds in Food Fermentations by Lactic Acid Bacteria: Novel Insights into Metabolic Pathways and Functional Metabolites. *Curr. Res. Food Sci.* **2023**, *6*, 100448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Rodríguez, H.; Curiel, J.A.; Landete, J.M.; de las Rivas, B.; López de Felipe, F.; Gómez-Cordovés, C.; Mancheño, J.M.; Muñoz, R. Food Phenolics and Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 79–90. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Wang, J.; Xie, B.; Sun, Z. Quality Parameters and Bioactive Compound Bioaccessibility Changes in Probiotics Fermented Mango Juice Using Ultraviolet-Assisted Ultrasonic Pre-Treatment during Cold Storage. *LWT* **2021**, *137*, 110438. [\[CrossRef\]](#)
64. Sung, J.M.; Kim, Y.B.; Kum, J.S.; Choi, Y.S.; Seo, D.H.; Choi, H.W.; Park, J.D. Effects of Freeze-dried Mulberry on Antioxidant Activities and Fermented Characteristics of Yogurt during Refrigerated Storage. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2015**, *35*, 807–814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Yuksel, Z.; Avci, E.; Erdem, Y.K. Characterization of Binding Interactions between Green Tea Flavanoids and Milk Proteins. *Food Chem.* **2010**, *121*, 450–456. [\[CrossRef\]](#)
66. Tang, S.; Cheng, Y.; Wu, T.; Hu, F.; Pan, S.; Xu, X. Effect of *Lactobacillus Plantarum*-Fermented Mulberry Pomace on Antioxidant Properties and Fecal Microbial Community. *LWT* **2021**, *147*, 111651. [\[CrossRef\]](#)
67. Cervantes-Elizarrarás, A.; Piloni-Martini, J.; Ramírez-Moreno, E.; Alanís-García, E.; Güemes-Vera, N.; Gómez-Aldapa, C.A.; Zafra-Rojas, Q.Y.; Cruz-Cansino, N.D. Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **2017**, *34*, 371–379. [\[CrossRef\]](#)
68. Strahsburger, E.; Retamales, P.; Estrada, J.; Seeger, M. Microdot method: Used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2016**, *44*, 742–749. [\[CrossRef\]](#)
69. Annual Review of Microbiology, Growth of Bacterial Cultures. In *The Physiological Significance of the Growth Constant*; Annual Review, Inc.: San Mateo, CA, USA, 1949; Volume 3, pp. 378–393. Available online: https://archive.org/details/sim_annual-review-of-microbiology_1949_3/page/392/mode/2up (accessed on 15 May 2024).
70. Díaz Jiménez, B.; Sosa Morales, M.E.; Vélez Ruiz, J.F. Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogurt. *Rev. Mex. Ing. Quím.* **2004**, *3*, 287–305.
71. Manzur-Valdespino, S.; Ramírez-Moreno, E.; Arias-Rico, J.; Jaramillo-Morales, O.A.; Calderón-Ramos, Z.G.; Delgado-Olivares, L.; Córdoba-Díaz, M.; Córdoba-Díaz, D.; Cruz-Cansino, N.D. *Opuntia ficus-indica* L. Mill Residues—Properties and Application Possibilities in Food Supplements. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 3260. [\[CrossRef\]](#)
72. Stintzing, F.C.; Herbach, K.M.; Mosshammer, M.R.; Carle, R.; Yi, W.; Sellappan, S.; Akoh, C.C.; Bunch, R.; Felker, P. Color, Betalain Pattern, and Antioxidant Properties of Cactus Pear (*Opuntia* spp.) Clones. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 442–451. [\[CrossRef\]](#)
73. Wallace, T.C.; Giusti, M.M. Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, C241–C248. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de Diversos Métodos Químicos Para Determinar Actividad Antioxidante En Pulpa de Frutos. *Food Sci. Technol.* **2005**, *25*, 726–732. [\[CrossRef\]](#)
75. Morales, F.J.; Jiménez-Pérez, S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* **2001**, *72*, 119–125. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO IV. Análisis del perfil proteolítico y de la actividad antioxidante del jugo de zarzamora fermentado con suero de leche y las BAL en consorcio.

4.1. Introducción

El uso de microorganismos con características probióticas para la fermentación de alimentos como las bebidas a base de frutas confiere propiedades nutricionales importantes, como la liberación y síntesis de metabolitos proteicos con efectos antihipertensivos, antibióticos o antimicrobianos, pero estos efectos dependen del sustrato, la viabilidad y la capacidad de producción de metabolitos secundarios por parte de las BAL durante la fermentación. En el entendido de que la actividad antimicrobiana depende de los metabolitos secundarios, de forma que es deseable obtener ácidos orgánicos, antioxidantes y péptidos bioactivos, en esta etapa se cuantificaron estos metabolitos, así como se determinó su actividad proteolítica y antioxidante.

A partir de este capítulo, se analizó el jugo fermentado con suero de leche (1:1) con dos consorcios: C1, fermentado con *L. brevis*, *L. plantarum* y *P. acidilactici*; C2: fermentado con *L. rhamnosus* y *L. casei*; C-, que se refiere al jugo con suero (1:1) fermentado sin inóculo adicional de BAL.

Para incrementar la capacidad de producir péptidos de interés antibacteriano, en este capítulo se destaca el potencial del uso de suero de leche en combinación con el jugo de zarzamora para incrementar su capacidad proteolítica y la identificación de péptidos de bajo peso molecular.

Además, se ha documentado que la liberación de compuestos fenólicos de las redes de fibra, la bioconversión de antocianinas en compuestos más bioactivos y el aumento de la actividad antioxidante suelen potenciar positivamente las características nutricionales del producto final después de la fermentación. Asimismo, las concentraciones de compuestos orgánicos en el producto final, pueden proveer características organolépticas deseables, así como ácidos orgánicos con capacidad antioxidante y antimicrobiana, deseables para promover su uso como una bebida funcional. Por tanto, se determinaron las concentraciones de ácidos orgánicos por medio de cromatografía de gases y las concentraciones de compuestos fenólicos por medio de HPLC. Posteriormente, se analizó su capacidad antioxidante, mediante ensayos de atrapamiento de radicales libres y la reducción férrica.

Al final de la experimentación, se identificó mayor actividad proteolítica y péptidos de bajo peso molecular en ambos consorcios, mientras que en el jugo sin inóculo fue significativamente menor. Como productos finales de la fermentación

encontramos ácido gálico y ácido hidroxibenzoico en ambos consorcios, mientras que C2 mostró mayor capacidad atrapadora y reductora, incrementando así su capacidad antioxidante *in vitro*. Los resultados de esta etapa se publicaron en la revista *Fermentation* (1).

4.2. Referencias

1. Lugo-Zarate L, Jiménez-Osorio AS, González-Olivares LG, Pérez-Escalante E, Castañeda-Ovando A, Pedraza-Chaverri J, et al. Potential of Whey Protein-Fortified Blackberry Juice in Transporting and Protecting Lactic Acid Bacteria: A Proteolytic Profile Analysis and Antioxidant Activity. *Fermentation*. 2025;11(5):252. doi:10.3390/fermentation11050252

Article

Potential of Whey Protein-Fortified Blackberry Juice in Transporting and Protecting Lactic Acid Bacteria: A Proteolytic Profile Analysis and Antioxidant Activity

Liliana Lugo-Zarate ^{1,2}, Angélica Sarai Jiménez-Osorio ^{1,*} , Luis Guillermo González-Olivares ^{3,*} , Emmanuel Pérez-Escalante ³ , Araceli Castañeda-Ovando ³ , José Pedraza-Chaverri ⁴ , Omar Noel Medina-Campos ⁴ , María Guadalupe Herrera-Hernández ⁵  and Luis Delgado-Olivares ² 

¹ Área Académica de Enfermería, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Actopan Tilcuaútl s/n. Ex Hacienda La Concepción, San Agustín Tlaxiaca 42160, Hidalgo, Mexico; lu279379@uaeh.edu.mx

² Área Académica de Nutrición, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Circuito Actopan Tilcuaútl s/n. Ex Hacienda La Concepción, San Agustín Tlaxiaca 42160, Hidalgo, Mexico; ldelgado@uaeh.edu.mx

³ Área Académica de Química, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma 42184, Hidalgo, Mexico; emmanuel_perez@uaeh.edu.mx (E.P.-E.); ovandoa@uaeh.edu.mx (A.C.-O.)

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Ciudad de Mexico, Mexico; pedraza@unam.mx (J.P.-C.); omarnoelmedina@gmail.com (O.N.M.-C.)

⁵ Laboratorio de Alimentos Funcionales, Campo Experimental Bajío, INIFAP, Celaya 38110, Guanajuato, Mexico; herrera.guadalupe@inifap.gob.mx

* Correspondence: angelica_jimenez@uaeh.edu.mx (A.S.J.-O.); lgonzales@uaeh.edu.mx (L.G.G.-O.); Tel.: +52-7717172000 (ext. 4323 or 40113) (A.S.J.-O. & L.G.G.-O.)



Academic Editors: Renpeng Du and Dan Zhao

Received: 25 March 2025

Revised: 23 April 2025

Accepted: 29 April 2025

Published: 2 May 2025

Citation: Lugo-Zarate, L.; Jiménez-Osorio, A.S.; González-Olivares, L.G.; Pérez-Escalante, E.; Castañeda-Ovando, A.; Pedraza-Chaverri, J.; Medina-Campos, O.N.; Herrera-Hernández, M.G.; Delgado-Olivares, L. Potential of Whey Protein-Fortified Blackberry Juice in Transporting and Protecting Lactic Acid Bacteria: A Proteolytic Profile Analysis and Antioxidant Activity. *Fermentation* **2025**, *11*, 252. <https://doi.org/10.3390/fermentation11050252>

Copyright: © 2025 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study investigates the potential of blackberry juice fortified with whey as a carrier for transporting and protecting lactic acid bacteria (LAB). The interactions between whey proteins and the juice were examined to assess their impact on probiotic stability and protection during storage and passage through the gastrointestinal tract. Additionally, the study explored how this combination influences the antioxidant properties of the product. The results indicated that the blackberry juice and whey protein mixture provided moderate protection to *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG compared to the positive control (inulin), suggesting that whey proteins may enhance probiotic viability. Proteolytic analysis revealed progressive protein hydrolysis during fermentation, leading to the release of bioactive peptides, indicating the formation of compounds with potential functional benefits. Moreover, samples inoculated with LAB exhibited higher antioxidant activity than those without inoculum. This research demonstrates the promise of fermented blackberry juice fortified with whey proteins as an effective probiotic delivery system. It opens new possibilities for developing functional foods to promote intestinal health and overall well-being.

Keywords: blackberry juice; whey proteins; lactic acid bacteria; probiotic delivery; antioxidant properties

1. Introduction

In recent years, probiotics have garnered considerable attention for their potential health benefits, especially in relation to gut microbiota [1]. One of the most widely studied

and utilized probiotics is *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG, known for its positive effects on digestion, immune system regulation, and protection against gastrointestinal infections [2,3]. However, maintaining probiotic viability during storage and ensuring survival through the gastrointestinal tract poses a significant challenge due to factors like acidic pH and bile salts [4,5]. Various strategies have been explored to address this challenge and enhance probiotic stability [4,6].

One promising approach involves developing vehicles that serve as protective matrices, facilitating the controlled release of microorganisms at the optimal location, such as the small intestine [7]. Natural matrices like fruit juices have become an attractive option [8–10]. Specifically, blackberry juice, rich in bioactive compounds, including antioxidants, flavonoids, and dietary fiber, is an excellent candidate for formulating functional products [11,12]. This juice may also support probiotics' survival and biological activity [13].

On the other hand, whey proteins, which are byproducts of the cheesemaking process, are known for their functional properties, including their ability to interact with microorganisms [14,15]. These proteins have shown potential in enhancing probiotic stability, acting as protective agents against harsh gastrointestinal conditions and, in some instances, assisting in the adhesion of probiotics to intestinal cells [16,17]. For instance, whey proteins fermented by *Pediococcus acidilactici* produce low-molecular-weight peptides (<7 kDa) with inhibitory activity against angiotensin 1-converting enzyme (ACE) [18]. Additionally, fermenting yellow whey with *Lactcaseibacillus casei* YQ336 for 48 h increased organic acids production and antioxidant activity [19]. *L. casei* has also shown potential antidiabetic activities measured by the inhibition of α -glucosidase and α -amylase in vitro [20]. Fortifying fruit juices with whey proteins might provide an effective delivery system for *Lactcaseibacillus rhamnosus* GG, boosting probiotic viability and efficacy [21].

Studies have reported the use of cheese whey in *L. plantarum* 67- and *L. paracasei* grx 701-fermented blueberry juice. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy analysis revealed that anthocyanins interact with whey protein through electrostatic interactions, hydrogen bonding, and hydrophobic interactions, resulting in protein fluorescence quenching and structural changes. Adding whey protein to blueberry juice increased the survival rate compared to whey protein alone [22]. In addition, interactions between whey proteins and apple polyphenols enhanced polyphenol bioaccessibility and bioavailability in simulated gastrointestinal digestion and human Caco-2 cells [23].

Previously, we reported that using lactic acid bacteria (LAB) consortia to enhance biomass during fermentation in fruit juices can be beneficial, resulting in a 3-logarithmic increase in growth with whey addition. The increased survival was related to lactic acid production and antioxidant changes during fermentation and 28-day storage at 4 °C [24].

Therefore, the potential of whey protein-fortified blackberry juice as a carrier for transporting and protecting LAB was analyzed through the proteolytic profile of LAB consortia. We aim to understand how whey proteins interact with blackberry juice and how this combination affects the probiotic's protection and stability during storage and transit through the gastrointestinal tract. Additionally, we will explore how the composition of this matrix impacts the final content of phenolic acids, flavonoids, and organic acid, bacteriocins production, and antioxidant properties, providing an added benefit to fortifying blackberry juice with bioactive compounds.

This study evaluates the effectiveness of this system as a probiotic delivery tool, presenting new opportunities for developing functional products promoting intestinal health and overall well-being.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The raw materials used to produce the beverages include blackberries (*Rubus fruticosus*) from Atotonilco el Grande, Hidalgo, Mexico. Whey protein (100% isolated) was purchased from HolixLab (Hilmar ingredients, Guadalajara, Jalisco, Mexico).

Bacterial cultures of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactocaseibacillus rhamnosus*, and *Lactocaseibacillus casei* were provided from the strain collection of the Nutrition Department from the Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. The probiotic strain *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG was sourced from the strain collection of the Food Biotechnology Department at the Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa Campus, México.

(+)-Catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin gallate, 2,2′-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH), 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), 4-hydroxybenzoic acid, acetic acid, benzoic acid, ellagic acid, butyric acid, caffeic acid, gallic acid, HPLC grade formic acid, iron trichloride (FeCl₃), isovaleric acid, myricetin, p-coumaric acid, propionic acid, radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·), rutin, sodium fluorescein, trans-ferulic acid, Trolox, and vanillic acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). HPLC grade methanol was obtained from JT Baker (Wayne, PA, USA).

2.2. Obtaining Thermoultrasonic Blackberry Juice

Blackberry juice (BJ) was extracted under aseptic conditions using colloidal silver (Microdyn[®], Ciudad de Mexico, CDMX, Mexico) as a disinfectant. Subsequently, the fruit was crushed, and seeds were separated. The juice was clarified by centrifugation (10,000 rpm for 30 min, 4 °C) followed by thermo-ultrasound treatment (80% amplitude for 17 min), according to the optimization conditions reported by Cervantes-Elizarrarás et al. [25].

2.3. Fermentation

A mixture of BJ and whey (WH) was prepared in equal concentrations (1:1), and the pH was adjusted to 6 with 1 M NaOH. The beverage was subdivided into 3 parts for inoculation (9 Log CFU/10 mL): consortium 1 (C1) was inoculated with *L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*; consortium 2 (C2) was inoculated with *L. rhamnosus* and *L. casei*; and a sample without inoculum (C–). Fermentation was carried out for 16 h at 37 °C, with samples taken at 0, 8, and 16 h.

2.4. Determination of Prebiotic Activity

The method described by Jaime-Ordaz et al. [26] was applied with modifications to determine the prebiotic activity through in vitro digestion study simulating the small intestine. This method included MRS medium carbon-free, and the BJ and BJ + WH juices were used as the carbon source. Inulin (1 g/L solution) was used as the positive control of the prebiotic activity. All samples were inoculated with 1×10^7 CFU/mL of *L. rhamnosus* GG. The flasks were kept at 37 °C for 48 h on an orbital shaker (at 150 rpm). The viable probiotic count was determined by seeding on MRS agar (Hilmar) and incubating at 37 °C under anaerobic conditions for 72 h. Carbon source consumption was determined by measuring the total carbohydrates using the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method.

2.5. Proteolytic Profile Assessment

2.5.1. Determination of Free Amino Groups by the TNBS Technique

Free amino groups during fermentation were measured using the method described by Sebastian-Nicolás et al. [27]. In glass tubes shielded from light, 2 mL of a phosphate buffer (0.21 M, pH 8.2), 0.250 mL of the samples, and 2 mL of 0.10% TNBS were combined, stirred, and incubated for 60 min at 50 °C. The reaction was halted with 4 mL of 0.1 N HCl, and the absorbance was assessed in a spectrophotometer at 340 nm against a control of deionized water. A glycine calibration curve (0 to 0.25 mg/mL) was used.

2.5.2. Low-Molecular-Weight Peptides Separation by Tris–Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tris–Tricine SDS-PAGE)

The method suggested by Sebastián-Nicolás et al. [27] was applied with modifications. The protein concentration of the samples was determined using the nanodroplet. A total of 40 µL of lyophilized sample (20-fold concentrated) was mixed with 20 µL of running buffer (0.1 M Tris base–Tricine) and 3 µL of mercaptoethanol and incubated at 40 °C for 30 min. After incubation, 15 µL of the sample (C1, C2, and C–) was loaded. The polyacrylamide gel (15% T) was starting from a 30% T solution (acrylamide:bisacrylamide ratio 19:1 and 0.1 M Tris–Tricine). Electrophoresis was carried out at 30 V for 1 h, followed by 95 V for approximately seven hours. Image Lab™ software from Gel-Doc™ EZ system 1708270 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to analyze the bands after the gels were stained with silver (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

2.6. Organic Acids Quantification

For the quantification of organic acids, a Gases Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID) method was used [28]. The calibration curve was constructed with the following commercial compound standards: acetic acid, propionic acid, butyric acid, and isovaleric acid at concentrations of 0.05 to 0.13%.

One microliter of sample was injected into a PerkinElmer AutoSystem XL gas chromatograph (PerkinElmer, Springfield, IL, USA) equipped with a DB-FFAP capillary column (15 m × 0.53 mm × 0.50 µm; Agilent, Santa Clara, CA, USA), a flame ionization detector at 250 °C, and a split/splitless injector (split ratio 30:1). Hydrogen was used as a carrier gas of 45 mL/min.

The oven temperature ramp for the analysis was as follows: the oven temperature was raised to 60 °C for 1 min; then, the temperature was increased to 165 °C at 20 °C/min and held for 1.25 min; finally, the temperature was increased to 200 °C at 10 °C/min and held for 4 min. The compounds were identified by comparing their retention time and absorption spectra with the following commercial standards: gallic acid, (+)-catechin, 4-hydroxybenzoic acid, (–)-epigallocatechin gallate, vanillic, (–)-epicatechin, caffeic acid, p-coumaric acid, trans-ferulic acid, benzoic acid, ellagic acid, rutin, and myricetin. Their quantification was carried out using calibration curves.

2.7. Quantification of Phenolic Compounds

Phenolic compounds were analyzed by HPLC using the methodology developed by García-Falcón et al. [29], with some modifications. A Zorbax Eclipse XDB-C18 column (5 µm particle size, 15 cm × 4.6 mm i.d.; Agilent, Santa Clara, CA, USA), was used. The mobile phase was set to 1.5 mL/min and comprised 1% formic acid in methanol (Phase A) and 1% formic acid in water (Phase B). During the analysis, the solvent gradient was programmed to increase from 10% to 100% B in A over 30 min. A sample volume of 20 µL was injected into the column. A diode array detector was utilized, programmed for four different wavelengths: 260, 280, 320, and 360 nm. The compounds were identified by

comparing their retention times and absorption spectra with the following commercial standards: gallic acid, (+)-catechin, 4-hydroxybenzoic acid, (–)-epigallocatechin gallate, vanillic, (–)-epicatechin, caffeic acid, p-coumaric acid, trans-ferulic acid, benzoic acid, ellagic acid, rutin, and myricetin. Their quantification was carried out using calibration curves.

2.8. Antioxidant Capacity Assays

2.8.1. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Test

The ORAC test was determined according to the method described by Fernandez-Rojas et al. [30]. The AAPH compound was used as a peroxy radical generator, and Trolox (0.5 to 10 μ M) served as a standard. Briefly, 25 μ L of diluted samples were mixed with 25 μ L of 153 mM AAPH and 150 μ L of 0.05 μ M fluorescein in 96-well black microplates (Costar®, Corning, NY, USA). Fluorescence was measured every minute for 90 min at 37 °C in a Synergy HT multimode microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) using fluorescence filters with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. Data were expressed as μ M of Trolox equivalents.

2.8.2. Ferric Ion-Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

This parameter was determined using the methodology described by Ramírez-Rodríguez et al. [31]. Briefly, 30 μ L of the diluted samples and 300 μ L of the FRAP solution (1.66 mM FeCl₃ and 0.83 mM TPTZ in 300 mM acetate buffer, pH 3.6) were mixed in a 96-well microplate. After 15 min of incubation at room temperature, the absorbance at 593 nm was measured. Data were expressed as mM of Trolox equivalents.

2.8.3. Antioxidant Activity Assay Against 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical (DPPH•)

This assay was created according to Koren et al. [25]. Briefly, 27 μ L of the sample and 20 μ L of 2 mM DPPH• methanolic solution were added directly to the 96-well microplate and allowed to stand for 2 min. Subsequently, 285 μ L of methanol were added, followed by another 2 min standing period, and the optical density at 517 nm was read. The results were expressed as the percentage of DPPH removed.

2.9. Extraction of Low-Molecular-Weight Peptides

The peptide extract was prepared following the method described by Gaspar et al. [32] with modifications. The pH of 50 mL of samples (C1 and C2) was adjusted to 6.5 using 1 M NaOH and stirred for 30 min at room temperature. Subsequently, the samples were heated in a water bath at 70 °C for 30 min. The cells were collected by centrifugation at 4500 rpm for 15 min at 4 °C and washed twice with a sodium phosphate buffer (5 mM at pH 6.5). The cells were collected again by centrifugation under the same conditions. The recovered cells were resuspended in 30 mL of NaCl solution (100 mM at pH 2, adjusted with phosphoric acid) and stirred for 1 h at 4 °C using a magnetic stirrer. The suspension was centrifuged at 4500 rpm for 15 min at 4 °C, and the supernatant was collected and adjusted to pH 6.5 with 1 M NaOH. The recovered supernatant was filtered through a cellulose acetate filter with a pore size of 0.22 μ m, and finally, the extract was lyophilized for analysis. Each sample was analyzed by gel electrophoresis using the same technique described in Section 2.5.2.

2.10. Statistical Analysis

The results were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) test and a post hoc Tukey's test at a significance level of $p < 0.05$. Data are presented as the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. Comparisons were made between each consortium at different fermentation times (0, 8, and 16 h) and differences

between consortia at the same fermentation time. All analyses were carried out using the SPSS V.19 statistical package.

3. Results

3.1. Prebiotic Activity

The effect of treatments on prebiotic activity was assessed in terms of the survival of *L. rhamnosus* GG (Figure 1A) and the concentration of reducing sugars (Figure 1B) in BJ and its mixture with whey (BJ + WH). In Figure 1A, inulin, used as a positive control, significantly enhanced the survival of *L. rhamnosus* GG compared to BJ and BJ + WH ($p < 0.05$). The samples showed intermediate survival, indicating that whey components may offer some protective effects.

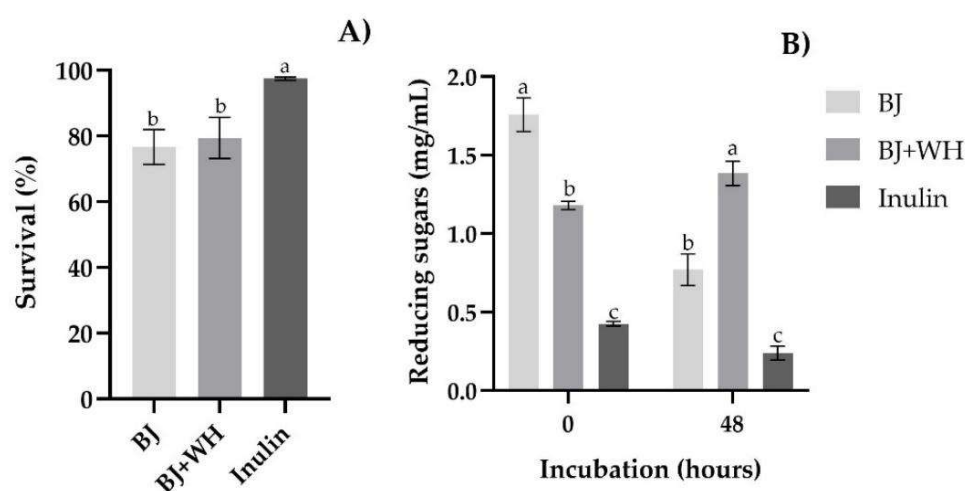


Figure 1. Prebiotic activity on the survival of *L. rhamnosus* GG (A) and reducing sugars (B) in blackberry juice (BJ) and its mixture with whey (BJ + WH). Values represent the mean of three experiments $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between samples.

In panel B, the initial concentration of reducing sugars was higher in BJ than in BJ + WH and the inulin control. After 48 h of incubation at 37 °C, the concentration of reducing sugars decreased in BJ and the control inulin, reflecting their consumption by the microorganisms and suggesting a more efficient metabolism by *L. rhamnosus* GG, supporting its prebiotic effect.

3.2. Proteolytic Profile

The proteolytic profile of BJ mixed with whey (1:1) was evaluated for three samples of C1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*); C2 (*L. casei* and *L. rhamnosus*); and C– (BJ + WH without inoculum). The protein hydrolysis was determined by measuring free amino groups and analyzing the molecular weights using SDS-PAGE electrophoresis, as shown in Figure 2.

The evolution of free amino groups during fermentation reflects the dynamics of protein hydrolysis and the subsequent release of peptides and amino acids [33]. The initial free amino group concentration was 1676.6 mg/L on average. During the first 8 h of fermentation, samples C1 and C2 showed significant decreases to 983.8 mg/L and 1140.3 mg/L, respectively, likely due to rapid assimilation by LAB for biomass synthesis and energy metabolism. At 16 h, free amino group concentrations were maintained in C1 (860.6 mg/L) and C2 (1128.7 mg/L) compared to C– (1296.8 mg/L). The action of proteases

and peptidases can degrade proteins into lower molecular weight peptides and free amino acids [34].

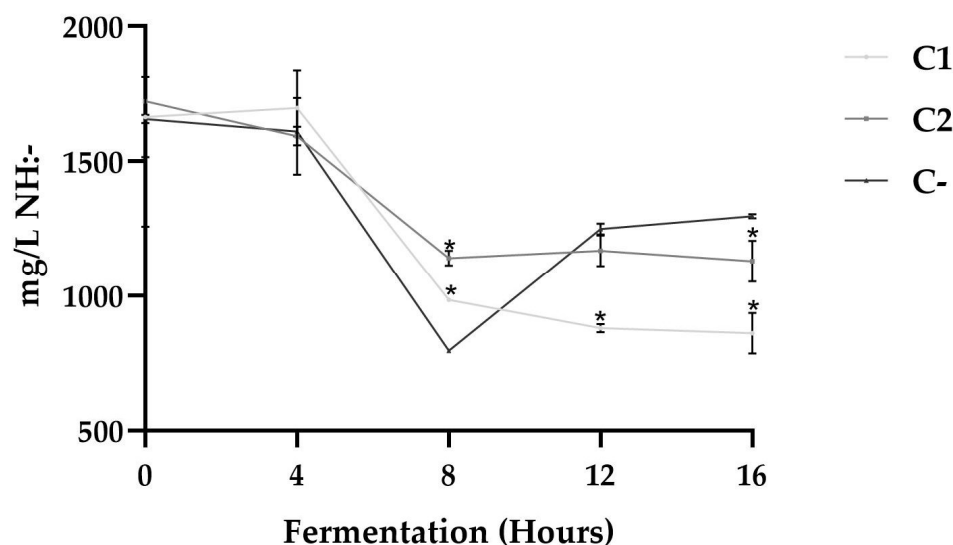


Figure 2. Free amino groups determined by the TNBS technique for blackberry beverages containing whey during fermentation. C1: Consortium 1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*); C2 (*L. casei* and *L. rhamnosus*); and C- (without inoculum). * $p < 0.05$ vs. C-. Values represent the mean $\pm$ standard deviation of three experiments ($n = 3$).

Differences between C1 and C2 suggest moderated variability in proteolytic activity, with C1 showing greater accumulation of free amino groups, indicating more efficient protein degradation by the generation of low-molecular-weight peptides. The increased concentration of free amino groups during the final hours of fermentation indicates the possible presence of bioactive peptides in the fermented matrix.

The variation in free amino groups throughout the fermentation process demonstrates the differing proteolytic activity of the evaluated bacterial consortia [28]. The greater production of these compounds in C1 suggests their potential to generate peptides with bioactive activity, creating opportunities for developing fermented beverages with improved functional properties [35].

SDS-PAGE analysis revealed the gradual degradation of proteins during fermentation, illustrating the generation of lower molecular weight peptides over time (see Figure 3). Initially (time 0), high-molecular-weight bands diminished in intensity as the fermentation progressed, indicating the activity of bacterial proteases on the proteins in whey and blackberry juice.

After 8 h, partial fragmentation was observed, with lower molecular weight bands emerging, indicating ongoing hydrolysis. By 16 h, a significant accumulation of low-molecular-weight peptides and disappearance of larger protein bands were evident, reflecting the proteolytic activity of LAB, such as *L. plantarum* and *P. acidilactici*, which are known to produce enzymes that release bioactive peptides during fermentation. Notably, C1 showed increased smaller peptides (5 and 2 kDa) at 16 h. This is likely associated with the formation of compounds with bioactive potential, including those exhibiting antioxidant, antihypertensive, or immunomodulatory properties, highlighting the importance of this process in the development of functional foods [34].

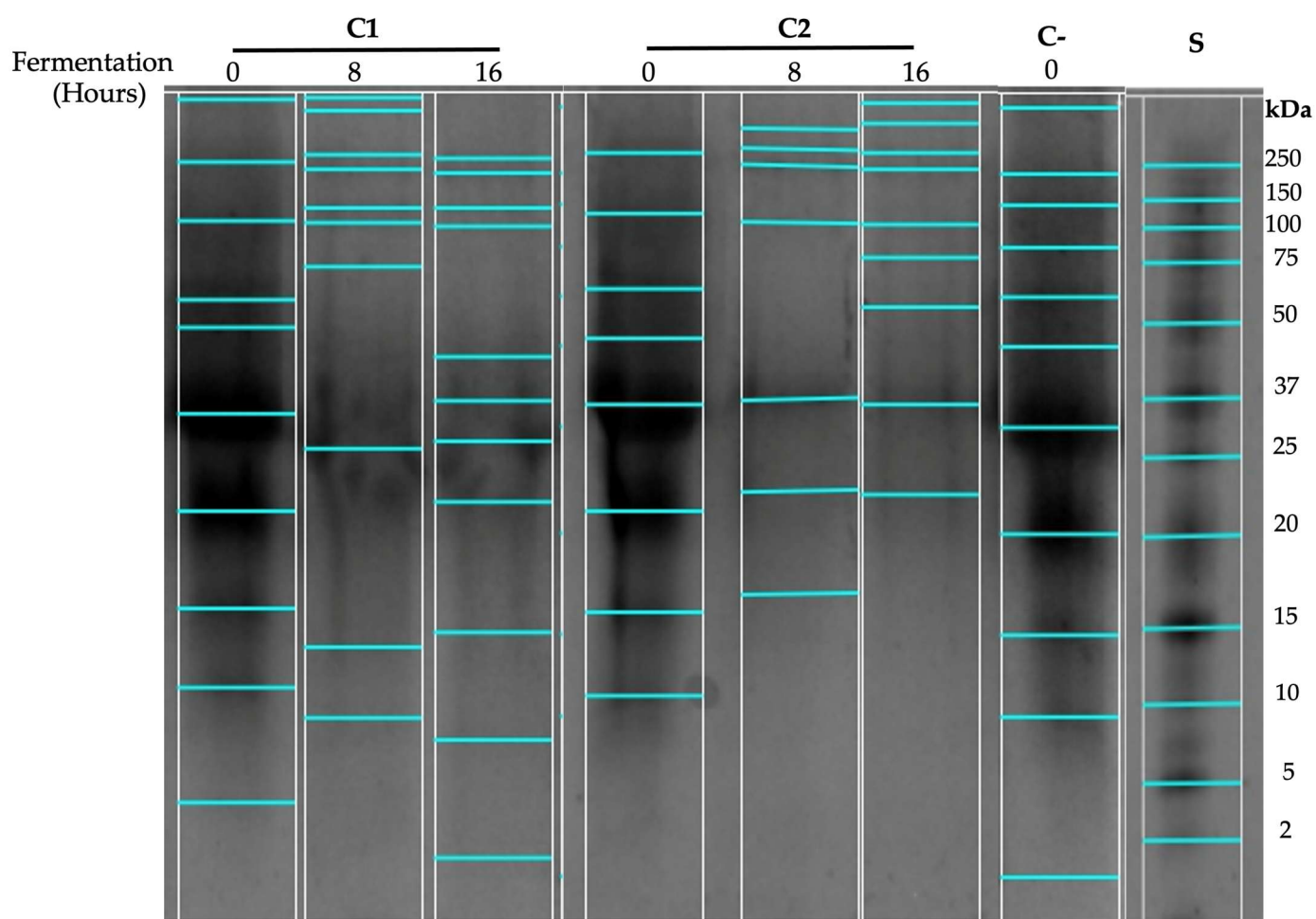


Figure 3. SDS-PAGE gel used to evaluate low-molecular-weight peptides of blackberry beverages with and without whey during fermentation. C1 (consortium 1: *L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*); C2 (consortium 2: *L. rhamnosus* and *L. casei*); and C– (sample without inoculum). S: molecular weight standard.

3.3. Quantification of Organic and Phenolic Compounds During Fermentation

Table 1 displays the changes in phenolic acids, flavonoids, and organic acids in C1, C2, and C– samples at 0, 8, and 16 h of fermentation. A noteworthy decrease in certain phenolic acids, such as gallic acid and hydroxybenzoic acid, was observed in the inoculated samples (C1 and C2) and benzoic acid in C2, suggesting their potential metabolism by LAB. In contrast, the levels of these compounds remain stable in the non-inoculated sample (C–), indicating that microbial fermentation influences their transformation. Furthermore, catechin and epicatechin show fluctuating concentrations, likely due to flavonoid conversion or their interaction with proteins and peptides released during fermentation.

EGCG (epigallocatechin gallate), which was not detected in the three samples at 0 h, appears in C2 at 8 and 16 h after fermentation, potentially due to the conversion of other flavonoids. Benzoic acid, a microbial metabolite produced from phenolic acid degradation, showed varying concentrations, with higher levels observed in the control sample (C–), suggesting LAB fermentation may influence its production.

Table 1. Quantification of phenolic acids, flavonoids, and organic acids in fermented beverages (C1, C2, and C–) during fermentation (0, 8, and 16 h).

Fermentation Sample	C1	0 h C2	C–	C1	8 h C2	C–	C1	16 h C2	C–
<i>Phenolic acids</i>									
Gallic acid	0.356 ± 0.007 ^{A,a}	0.394 ± 0.014 ^{A,a}	0.353 ± 0.031 ^{A,a}	0.144 ± 0.060 ^{B,a}	0.171 ± 0.017 ^{B,a}	0.349 ± 0.021 ^{A,b}	0.147 ± 0.004 ^{B,a}	0.163 ± 0.001 ^{B,a}	0.347 ± 0.016 ^{A,b}
Hydroxybenzoic	0.031 ± 0.001 ^{A,a}	0.029 ± 0.002 ^{A,a}	0.030 ± 0.001 ^{A,a}	0.017 ± 0.002 ^{B,a}	0.017 ± 0.004 ^{B,a}	0.028 ± 0.002 ^{AB,b}	0.013 ± 0.001 ^{C,a}	0.018 ± 0.001 ^{B,b}	0.026 ± 0.001 ^{B,c}
Vanillic acid	0.072 ± 0.004 ^{A,a}	0.046 ± 0.023 ^{A,a}	0.063 ± 0.010 ^{A,a}	0.042 ± 0.022 ^{AB,ab}	0.027 ± 0.013 ^{A,a}	0.078 ± 0.002 ^{A,b}	0.020 ± 0.014 ^{B,a}	0.015 ± 0.004 ^{A,a}	0.073 ± 0.005 ^{A,c}
Caffeic acid	0.069 ± 0.001 ^{A,b}	0.060 ± 0.004 ^{A,a}	0.064 ± 0.002 ^{A,ab}	0.062 ± 0.016 ^{A,a}	0.040 ± 0.009 ^{B,a}	0.038 ± 0.004 ^{B,a}	0.031 ± 0.006 ^{B,a}	0.024 ± 0.002 ^{C,a}	0.031 ± 0.012 ^{B,a}
Coumaric acid	0.157 ± 0.001 ^{A,a}	0.126 ± 0.015 ^{A,a}	0.157 ± 0.022 ^{A,a}	0.138 ± 0.028 ^{A,a}	0.023 ± 0.005 ^{B,b}	0.111 ± 0.001 ^{B,b}	0.046 ± 0.002 ^{B,c}	0.026 ± 0.001 ^{B,a}	0.037 ± 0.001 ^{C,b}
Ferulic acid	0.075 ± 0.005 ^{A,b}	0.023 ± 0.006 ^{B,a}	0.092 ± 0.004 ^{A,c}	0.030 ± 0.003 ^{C,a}	0.051 ± 0.008 ^{A,b}	0.086 ± 0.008 ^{A,c}	0.051 ± 0.002 ^{B,a}	0.056 ± 0.004 ^{A,a}	0.087 ± 0.004 ^{A,b}
Benzoic acid	1.064 ± 0.057 ^{A,a}	1.588 ± 0.174 ^{A,b}	1.742 ± 0.142 ^{A,b}	1.084 ± 0.268 ^{A,a}	1.252 ± 0.206 ^{AB,a}	1.407 ± 0.113 ^{B,a}	1.324 ± 0.032 ^{A,a}	1.126 ± 0.127 ^{B,a}	1.211 ± 0.074 ^{B,a}
Ellagic acid	0.063 ± 0.002 ^{A,a}	0.063 ± 0.005 ^{A,a}	0.056 ± 0.001 ^{A,a}	0.047 ± 0.010 ^{AB,b}	0.024 ± 0.002 ^{B,a}	0.062 ± 0.004 ^{A,b}	0.028 ± 0.008 ^{B,a}	0.033 ± 0.006 ^{B,ab}	0.059 ± 0.019 ^{A,b}
<i>Flavonoids</i>									
Rutin	0.683 ± 0.029 ^{A,a}	1.172 ± 0.143 ^{A,b}	0.526 ± 0.031 ^{B,a}	0.686 ± 0.081 ^{A,b}	0.467 ± 0.052 ^{B,a}	0.852 ± 0.021 ^{A,c}	0.494 ± 0.019 ^{B,a}	0.511 ± 0.067 ^{B,a}	0.910 ± 0.079 ^{A,b}
Myricetin	0.062 ± 0.016 ^{A,a}	0.053 ± 0.004 ^{A,a}	0.070 ± 0.005 ^{A,a}	0.067 ± 0.005 ^{A,b}	0.031 ± 0.002 ^{B,a}	0.055 ± 0.016 ^{A,b}	0.021 ± 0.002 ^{B,b}	0.007 ± 0.001 ^{C,a}	0.053 ± 0.009 ^{A,c}
Epicatechin	0.407 ± 0.042 ^{A,b}	0.166 ± 0.009 ^{B,a}	0.333 ± 0.029 ^{B,b}	0.404 ± 0.027 ^{A,b}	0.343 ± 0.015 ^{A,a}	0.441 ± 0.021 ^{A,b}	0.364 ± 0.008 ^{A,a}	0.369 ± 0.018 ^{A,a}	0.474 ± 0.007 ^{A,b}
EGCG	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.132 ± 0.005 ^{B,a}	<LOD	0.0134 ± 0.005 ^b	0.142 ± 0.005 ^{A,a}	0.215 ± 0.008 ^A
Catechin	3.307 ± 0.271 ^{AB,a}	2.249 ± 0.911 ^{A,a}	2.882 ± 0.296 ^{B,b}	3.554 ± 0.220 ^{A,b}	2.882 ± 0.119 ^{A,a}	3.454 ± 0.052 ^{A,b}	2.848 ± 0.085 ^{B,a}	3.067 ± 0.063 ^{A,b}	3.418 ± 0.104 ^{A,c}
<i>Organic acids</i>									
Acetic acid	52.4 ± 4.26 ^{C,b}	49.22 ± 4.77 ^{B,b}	64.71 ± 3.81 ^{A,a}	77.34 ± 7.65 ^{B,a}	64.75 ± 4.78 ^{AB,ab}	58.32 ± 6.15 ^{A,b}	93.91 ± 3.38 ^{A,a}	65.94 ± 6.00 ^{A,b}	53.00 ± 2.50 ^{B,c}

Note. Data are presented in mg/100 mL. C1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*); C2 (*L. casei* and *L. rhamnosus*); and C– (without inoculum); EGCG: epigallocatechin gallate; LOD: Limit of Detection. Values represent the mean ± standard deviation of three experiments ($n = 3$). Different capital letters in subscript indicate significant differences between different hours for each sample. Different lowercase letters indicate significant differences between samples for each hour of fermentation.

The rutin and myricetin levels decreased in inoculated samples (C1 and C2) during fermentation, suggesting degradation or conversion into other bioactive compounds. Myricetin showed the most significant reduction in C2, potentially due to higher enzymatic activity. Additionally, acetic acid, a marker of fermentation activity, increased over time in C1 and C2, confirming the metabolic activity of LAB in converting sugars and other precursors into organic acids. In contrast, acetic acid levels remained stable in the control sample (C−), highlighting the role of bacteria fermentation.

3.4. Antioxidant Capacity

Table 2 presents the antioxidant properties of fermented blackberry juice, evaluated through the ORAC, FRAP, and DPPH assays at 0, 8, and 16 h of fermentation, by evaluating three samples: C1, C2, and C−.

Table 2. Antioxidant properties of fermented beverages during fermentation.

Samples	Fermentation (Hours)	ORAC *	FRAP *	DPPH (% of Elimination)
C1	0	2447.8 ± 48.5 ^{A,b}	2.7 ± 0.09 ^{A,a}	51.71 ± 5.79 ^{A,a}
	8	2106.5 ± 274.6 ^{A,b}	2.4 ± 0.28 ^{AB,a}	51.27 ± 1.04 ^{A,a}
	16	2061.5 ± 203.1 ^{A,a}	2.04 ± 0.10 ^{B,a}	43.36 ± 1.82 ^{A,a}
C2	0	2919.8 ± 290.7 ^{A,a}	2.75 ± 0.27 ^{A,a}	45.31 ± 2.83 ^{A,a}
	8	2291.7 ± 148.5 ^{B,a}	2.38 ± 0.17 ^{AB,a}	45.27 ± 2.32 ^{A,b}
	16	2982.6 ± 30.17 ^{A,a}	1.99 ± 0.11 ^{B,a}	46.27 ± 1.95 ^{A,a}
C−	0	2589.5 ± 90.3 ^{A,ab}	2.51 ± 0.22 ^{A,a}	44.39 ± 1.42 ^{A,a}
	8	2652.6 ± 92.9 ^{A,a}	2.61 ± 0.45 ^{A,a}	39.7 ± 2.51 ^{A,c}
	16	2164.1 ± 165.2 ^{B,a}	2.19 ± 0.2 ^{A,a}	44.78 ± 2.04 ^{A,a}

* Results of the ORAC and FRAP assays are presented as μM and mM Trolox equivalents, respectively. C1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*); C2 (*L. casei* and *L. rhamnosus*); and C− (without inoculum). Values represent the mean $\pm$ standard deviation of three experiments ($n = 3$). Capital letters in superscripts indicate significant differences between different hours for each sample. Different lowercase letters indicate significant differences between samples for each hour of fermentation.

The overall antioxidant capacity, evaluated by ORAC, varied throughout fermentation, with C2 exhibiting a higher value at 16 h (2982.6 μM Trolox equivalents) after a temporary decrease at 8 h. In contrast, the antioxidant capacity of C1 and C− declined over the 16 h of fermentation. Sample C1 showed the lowest antioxidant capacity at 16 h (2061.5 μM Trolox equivalents), indicating that the presence of LAB influences this property [36].

The FRAP assay displays the reducing power of ferric ions by the antioxidants present in the samples. The results showed a decrease in ferric reduction ability through fermentation time. C1 and C2 showed a significant decrease from the initial values of 2.7 mM Trolox equivalents.

The DPPH assay showed a decreasing trend throughout fermentation, with C1's scavenging capacity diminishing from 51.71% to 43.36% at 16 h. In contrast, C2 and C− maintained their DPPH scavenging ability.

In summary, the antioxidant properties of fermented blackberry juice are influenced by the presence of LAB, with C2 exhibiting more favorable behavior. The results suggest that the fermentation process gradually reduces antioxidant activity, as measured by the ORAC, FRAP, and DPPH assays, with variations between samples reflecting the specific interactions between LAB and the antioxidant compounds in blackberry juice [37].

3.5. Separation of Bacteriocins

Figure 4 shows electropherograms of the SDS-PAGE separation of bacteriocins in whey-fortified blackberry beverages throughout fermentation at 0, 8, and 16 h. Panels A, B, and C present the results obtained at 0, 8, and 16 h of fermentation.

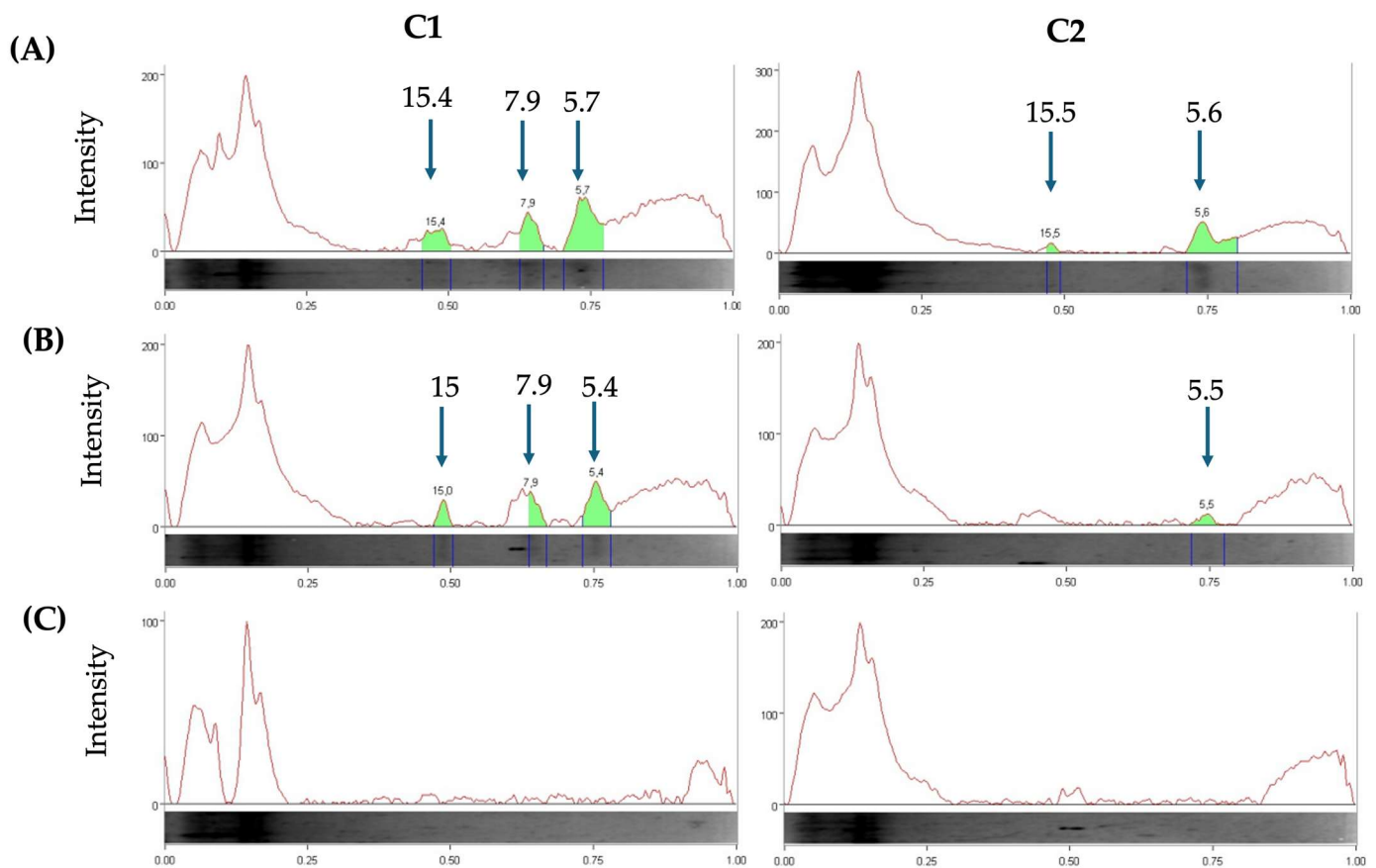


Figure 4. SDS-PAGE separation of peptides from the extract of C1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*) and C2 (*L. casei* and *L. rhamnosus*) during fermentation at time 0 (A), 8 h (B), and 16 h (C) of fermentation.

In Figure 4A (0 h), several bands corresponding to the molecular weights of the bacteriocins in the initial samples are visible. In C1, the approximate molecular weights are 15.4 kDa, 7.9 kDa, and 5.7 kDa, while, in C2, two bands with molecular weights of 15.5 kDa and 5.6 kDa were detected. These bands indicate the presence of bacteriocins with varying molecular sizes at the beginning of fermentation. In Figure 4B (8 h), all three bacteriocins are still present in C1, suggesting that, although some degradation or modification has occurred, the bacteriocins remain intact. In contrast, C2 retains only the 5.5 kDa bacteriocin, implying that the higher molecular weight bacteriocins have been broken down or altered by the activity of LAB during fermentation.

Finally, in Figure 4C (16 h), all bacteriocins in both samples nearly disappear, indicating that, after 16 h of fermentation, the bacteria in the beverage have fully degraded or converted them into smaller or bioactive compounds. This pattern highlights the metabolic activity of LAB facilitating probiotic's stabilization and viability through fermentation, which can break down bacteriocins and change the antimicrobial properties of the final product [38].

4. Discussion

This research demonstrated the effect of the addition of whey to a complex matrix (blackberry juice) on probiotic viability. This can be attributed to its protein and carbohydrates, which promote probiotic growth [15]. It has been reported that β -lactoglobulin and α -lactalbumin can interact with the cell membrane of *L. rhamnosus* GG [39], enhancing its stability under harsh conditions such as gastric acidity and bile salts [40]. This indicates that whey supplies essential nutrients and may act as a structural protector, supporting probiotic viability in fermented systems.

Our study shows an 80% survival rate of *L. rhamnosus* GG in BJ and BJ + WH, suggesting these matrices support probiotic viability and potentially serve as effective delivery systems. The decrease in reducing the sugar content in BJ after 48 h suggests active carbohydrate consumption by microorganisms, whereas BJ + WH showed no significant decrease, potentially due to *L. rhamnosus* proteolytic activity targeting whey proteins, as previously reported the liberation of free amino groups in whey after fermentation [41]. Without the addition of whey, *L. rhamnosus* and *L. plantarum* effectively metabolize simple and complex carbohydrates to produce organic acids and bioactive metabolites [42]. The significant decrease in reducing sugar in the inulin control confirms its high fermentability.

Protein hydrolysis during fermentation confirms the formation of low-molecular-weight peptides, aligning with previous studies on the proteolytic activity of LAB in dairy and plant matrices [35,43,44]. The greater protein reduction in C1 suggests increased enzymatic activity from *L. plantarum*, *P. acidilactici*, and *L. brevis*, promoting the release of peptides with functional properties [20].

Protein hydrolysis increased the free amino groups, indicating the formation of peptides with specific bioactive sequences. SDS-PAGE gel electrophoresis revealed a progressive breakdown of proteins during fermentation in C1 and C2, which suggests the formation of low-molecular-weight peptides with potential bioactive properties.

Several studies have demonstrated that peptides generated by LAB can exhibit antihypertensive, antioxidant, and antimicrobial effects, depending on their amino acid composition and structure [38]. The peptide profile observed in this study aligns with previous research identifying bioactive sequences from casein and β -lactoglobulin that exhibit angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities [44,45]. Specifically, the peptides found in sample C2 may contain sequences with strong antioxidant activity, suggesting their potential to influence metal binding activity in biological models.

The proteolytic activity during fermentation releases low-molecular-weight peptides with enhanced antioxidant potential due to the increased accessibility of specific amino acid residues like tyrosine, tryptophan, and histidine [41]. Rather than losing bioactivity, peptide degradation can result in the formation of new, functionally active sequences that contribute to the overall antioxidant capacity of the fermented matrix.

The fermentation of beverages C1 and C2 significantly increased the total acidity and acetic acid concentration while reducing the pH. These changes are associated with LAB metabolism, which generates organic acids and facilitates the enzymatic hydrolysis of serum proteins, releasing bioactive peptides [46]. Previous studies showed that fermentation-derived compounds, like phenolic metabolites and organic acids, can synergize with bioactive peptides, enhancing antimicrobial and antioxidant activities through mechanisms such as membrane destabilization and redox modulation [47–49]. This synergism is reflected in the fermented beverage's functional properties, with indicators like the total acidity and acetic acid levels, serving as reliable markers of bioactivity [50]. Monitoring these parameters provides insights into fermentation's contribution to the functional potential of the final product.

The protective effect of LAB is associated with the degradation of protein–peptide compounds, like bacteriocins, which produce peptides with biological and antioxidant properties through hydrolysis. Whey proteins provide a nitrogen source, supporting metabolism during fermentation without affecting bacteriocin stability. Probiotic microorganisms trigger various reactions, generating not only organic acids but also metabolites with biological activities. The whey protein-enriched matrix provides a favorable environment for maintaining probiotic activity [51–53].

The organic acid profile shows increased acetic acid production in C1 and C2, indicating active fermentation by LAB [54]. This finding aligns with previous studies emphasizing the ability of heterofermentative LAB, such as *L. plantarum* and *L. brevis*, to convert carbohydrates into organic acids like acetic and lactic acid [55]. These acids help modulate the medium's acidity, enhancing the product's microbiological and sensory stability [56]. The production of organic acids is closely tied to substrate availability and LAB enzymatic activity. The BJ + WH combination provided an environment rich in fermentable sugars and proteins, influencing bacterial metabolism. Recent research has shown that organic acids and bioactive peptides can work synergistically, enhancing stability and bioavailability in the gastrointestinal tract [57].

Regarding the conversion of phenolic compounds, a significant reduction in the concentration of phenolic acids, such as gallic acid and ferulic acid, was noted after fermentation, indicating their potential metabolism by lactic microbiota. Certain LABs are known to produce phenolases and esterases that can alter the chemical structure of phenols, leading to metabolites with improved biological activity [58,59]. Specifically, transforming ferulic acid into smaller phenolic compounds could enhance their solubility and antioxidant capacity, thus facilitating absorption in the small intestine [60,61].

The increase in EGCG content in all the samples (C1, C2, and C–) may be related to protein–phenol interactions and the specific LAB metabolism, although the evidence is limited. Similarly, fermented yogurt with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* showed reduced protein–phenol affinity, facilitating the EGCG release [62].

The higher retention of phenolic compounds in consortium C1 compared to C2 and the control (C–) suggests variations in enzymatic activity among the tested microorganisms. This may indicate that certain strains have more effective mechanisms for bioconverting polyphenols into bioactive forms with improved antioxidant effects [60]. Previous studies have demonstrated that the biotransformation of phenolic compounds by LAB can enhance their antioxidant and anti-inflammatory properties, implying that the resulting fermented product could mitigate oxidative stress at the cellular level [61].

Lactobacillaceae microorganisms, including *L. plantarum* and *L. brevis*, are known for converting polyphenolic compounds. Esterases, reductases, and decarboxylases mediate the conversion of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids [63]. This biotransformation is strain-specific, as reported by Montijo-Prieto et al., where *L. plantarum* 748T consumed p-coumaric acid through cinnamoyl esterase and decarboxylase activity, resulting in increased antioxidant activity [64].

Phenolic compounds are sensitive to pH and temperature changes during fermentation. Previous research showed that BJ + WH samples exhibit high variability in the total phenolic content at pH 6, whereas C1 and C2 were more stable at pH 3.5 [24]. Phenolic compounds have also been reported to be more stable during vegetable fermentation [65]. Additionally, they can remain stable during fermentation at 37 °C and storage at 4 °C [24,66,67].

Antioxidant activity, measured by ORAC, FRAP and DPPH, showed a slight decrease in some samples after 16 h of fermentation, but consortium C2 maintained its antioxidant capacity. This activity may be attributed to the production of antioxidant metabolites

during fermentation, including transformed organic acids, phenolic compounds, and bioactive peptides released through whey protein hydrolysis [44,68]. Additionally, previous studies have indicated that peptides derived from dairy protein fermentation may exhibit antioxidant activity, primarily due to amino acid residues that effectively neutralize reactive oxygen species [43]. Specifically, residues such as tyrosine, histidine, and tryptophan have been associated with the antioxidant capacity of low-molecular-weight peptides [44].

In this context, the peptides released in sample C2 may contribute to the observed antioxidant activity, as their generation was more pronounced compared to the other samples. Several studies have shown that peptides with a high content of hydrophobic groups can interact with free radicals and help stabilize cell membranes, thereby preventing oxidative damage in biological systems [20,44].

Furthermore, the interaction between bioactive peptides and phenolic compounds in fermented systems has been recognized as enhancing antioxidant activity [69]. Some studies suggest that certain peptides can form insoluble complexes with polyphenols, shielding them from degradation and boosting their bioactivity in the gastrointestinal tract [70]. This synergy between peptides and phenolic compounds may account for the stable antioxidant activity observed in consortium C2, where a lesser decrease in antioxidant capacity was noted following fermentation.

As the antioxidant activity of peptides depends on their specific structure and amino acid sequence [34], future studies may concentrate on characterizing these peptides using mass spectrometry and evaluating their capacity to modulate antioxidant pathways in cellular and animal models. This strategy would allow for a more precise assessment of their potential in preventing diseases related to oxidative stress, including cardiovascular and neurodegenerative disorders.

The findings of bacteriocin degradation by LAB during fermentation are consistent with previous reports. Perez et al. [71] noted that LAB can release antimicrobial peptides during dairy products fermentation, indicating a similar mechanism for bacteriocins in the whey blackberry beverage [72]. This degradation process affects the stability of bacteriocins and improves the final product's functional properties. The transformation of bacteriocins into smaller peptides that enhance bioavailability and absorption, as observed in this study, aligns with findings from other researchers, such as Abbasiliasi et al. [38], who discussed the fragmentation of high-molecular-weight proteins during fermentation, which facilitates the absorption of bioactive compounds in the intestinal tract, resulting in a product with greater therapeutic potential.

Finally, concerning the enhancement of organoleptic properties in the final product, the results of this study correspond with observations from other research, which indicates that fermentation not only enhances the functional properties of foods but also has a positive impact on their sensory characteristics [73]. In this context, Hu et al. [74] highlighted that the enzymatic activity of LAB during fermentation helps develop appealing flavors and textures, making the product more enticing to consumers. These findings strengthen the idea that manipulating bacteriocins during fermentation can positively influence both the health benefits and sensory quality of the final product.

5. Conclusions

The findings of this study highlight the potential of fermenting blackberry juice with whey as a strategy to improve probiotic viability and encourage the release of bioactive peptides. The use of specific LAB consortia promotes the generation of peptides, but the specific interactions between LAB could impact the results of the antioxidant activity. In this context, the use of C2 (*L. casei* and *L. rhamnosus*) consortia showed maintained antioxidant

activity, suggesting that such products could play a valuable role in developing functional foods.

Future research should aim to identify and characterize the peptides produced during fermentation, particularly through mass spectrometry, and conduct in vivo studies to evaluate their bioavailability and biological activity. Furthermore, optimizing the LAB consortia and fermentation conditions could improve the functionality of the final product, paving the way for the development of fermented beverages with therapeutic potential and enhanced health benefits.

Author Contributions: L.L.-Z. and A.S.J.-O. investigation, methodology, formal analysis, writing—origin draft, and data curation. L.G.G.-O. conceptualization, writing—original draft, project administration, and formal analysis. E.P.-E. writing—original draft and methodology. A.C.-O. methodology and validation. J.P.-C. methodology and supervision. O.N.M.-C. methodology. M.G.H.-H. methodology and investigation. L.D.-O. validation, conceptualization, and manuscript review. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Fondos Estatales Genéricos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo”, Number 110201, to A.S.J.-O. and by “Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)”, Grant Number IN202725, to J.P.-C.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in this study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Das, T.K.; Pradhan, S.; Chakrabarti, S.; Mondal, K.C.; Ghosh, K. Current Status of Probiotic and Related Health Benefits. *Appl. Food Res.* **2022**, *2*, 100185. [\[CrossRef\]](#)
2. Liu, Y.; Chen, Y.; Liao, H.; Sun, S.; Zhang, X.; Xie, L.; Liu, H. Research Progress on the Application of *Lactacaseibacillus rhamnosus* GG in Pediatric Respiratory Diseases. *Front. Nutr.* **2025**, *12*, 1553674. [\[CrossRef\]](#)
3. Leser, T.; Baker, A. Molecular Mechanisms of *Lactacaseibacillus rhamnosus*, LGG® Probiotic Function. *Microorganisms* **2024**, *12*, 794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Terpou, A.; Papadaki, A.; Lappa, I.K.; Kachrimanidou, V.; Bosnea, L.A.; Kopsahelis, N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients* **2019**, *11*, 1591. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Bustos, A.Y.; Taranto, M.P.; Gerez, C.L.; Agriopoulou, S.; Smaoui, S.; Varzakas, T.; Enshasy, H.A.E. Recent Advances in the Understanding of Stress Resistance Mechanisms in Probiotics: Relevance for the Design of Functional Food Systems. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2025**, *17*, 138–158. [\[CrossRef\]](#)
6. Gurram, S.; Jha, D.K.; Shah, D.S.; Kshirsagar, M.M.; Amin, P.D. Insights on the Critical Parameters Affecting the Probiotic Viability During Stabilization Process and Formulation Development. *AAPS PharmSciTech* **2021**, *22*, 156. [\[CrossRef\]](#)
7. Enck, K.; Banks, S.; Yadav, H.; Welker, M.E.; Emmanuel, C. Opara Development of a Novel Oral Delivery Vehicle for Probiotics. *Curr. Pharm. Des.* **2020**, *26*, 3134–3140. [\[CrossRef\]](#)
8. de Oliveira, P.M.; Leite Júnior, B.R.d.C.; Martins, E.M.F.; Martins, M.L.; Vieira, É.N.R.; de Barros, F.A.R.; Cristianini, M.; de Almeida Costa, N.; Ramos, A.M. Mango and Carrot Mixed Juice: A New Matrix for the Vehicle of Probiotic Lactobacilli. *J. Food Sci. Technol.* **2021**, *58*, 98–109. [\[CrossRef\]](#)
9. Plessas, S. Editorial: Innovations in Functional Food Production: Application of Fruit and Vegetable Juices as Vehicles for Probiotic Delivery. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 854705. [\[CrossRef\]](#)
10. Horackova, S.; Rokytova, K.; Bialasova, K.; Kloidova, I.; Slukova, M. Fruit Juices with Probiotics—New Type of Functional Foods. *Czech J. Food Sci.* **2018**, *36*, 284–288. [\[CrossRef\]](#)
11. Buljeta, I.; Nosić, M.; Pichler, A.; Ivić, I.; Šimunović, J.; Kopjar, M. Apple Fibers as Carriers of Blackberry Juice Polyphenols: Development of Natural Functional Food Additives. *Molecules* **2022**, *27*, 3029. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Barkaoui, S.; Madureira, J.; Boudhrioua, N.; Cabo Verde, S. Berries: Effects on Health, Preservation Methods, and Uses in Functional Foods: A Review. *Eur. Food Res. Technol.* **2023**, *249*, 1689–1715. [\[CrossRef\]](#)

13. Wu, Y.; Li, S.; Tao, Y.; Li, D.; Han, Y.; Show, P.L.; Wen, G.; Zhou, J. Fermentation of Blueberry and Blackberry Juices Using *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium bifidum*: Growth of Probiotics, Metabolism of Phenolics, Antioxidant Capacity In Vitro and Sensory Evaluation. *Food Chem.* **2021**, *348*, 129083. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Ha, E.; Zemel, M.B. Functional Properties of Whey, Whey Components, and Essential Amino Acids: Mechanisms Underlying Health Benefits for Active People (Review). *J. Nutr. Biochem.* **2003**, *14*, 251–258. [\[CrossRef\]](#)
15. Kareb, O.; Aider, M. Whey and Its Derivatives for Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Functional Foods: A Critical Review. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11*, 348–369. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Arbizu, S.; Chew, B.; Mertens-Talcott, S.U.; Noratto, G. Commercial Whey Products Promote Intestinal Barrier Function with Glycomacropeptide Enhanced Activity in Downregulating Bacterial Endotoxin Lipopolysaccharides (LPS)-Induced Inflammation in Vitro. *Food Funct.* **2020**, *11*, 5842–5852. [\[CrossRef\]](#)
17. Wang, C.; Killpatrick, A.; Humphrey, A.; Guo, M. Whey Protein Functional Properties and Applications in Food Formulation. In *Whey Protein Production, Chemistry, Functionality, and Applications*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 157–204. ISBN 978-1-119-25605-2.
18. Daliri, E.B.-M.; Lee, B.H.; Park, B.-J.; Kim, S.-H.; Oh, D.-H. Antihypertensive Peptides from Whey Proteins Fermented by Lactic Acid Bacteria. *Food Sci. Biotechnol.* **2018**, *27*, 1781–1789. [\[CrossRef\]](#)
19. Qian, Z.; Li, Y.; Hao, Z.; Zheng, Z.; Yang, H.; Li, S.; Xu, S.; Xu, Y.; Zhang, L. Enhancement of the Organic Acid Content and Antioxidant Capacity of Yellow Whey through Fermentation with *Lactocaseibacillus casei* YQ336. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2023**, *40*, 53. [\[CrossRef\]](#)
20. Rosa, L.S.; Santos, M.L.; Abreu, J.P.; Rocha, R.S.; Esmerino, E.A.; Freitas, M.Q.; Mársico, E.T.; Campelo, P.H.; Pimentel, T.C.; Cristina Silva, M.; et al. Probiotic Fermented Whey-Milk Beverages: Effect of Different Probiotic Strains on the Physicochemical Characteristics, Biological Activity, and Bioactive Peptides. *Food Res. Int. Ott. Ont* **2023**, *164*, 112396. [\[CrossRef\]](#)
21. Ying, D.; Schwander, S.; Weerakkody, R.; Sanguansri, L.; Gantenbein-Demarchi, C.; Augustin, M.A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in Whey Protein and Resistant Starch Matrices: Probiotic Survival in Fruit Juice. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 98–105. [\[CrossRef\]](#)
22. Wang, Y.; Liu, X.; Shao, Y.; Guo, Y.; Gu, R.; Wang, W. Cheese Whey Protein and Blueberry Juice Mixed Fermentation Enhance the Freeze-Resistance of Lactic Acid Bacteria in the Freeze-Drying Process. *Foods* **2024**, *13*, 2260. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Li, D.; Yang, Y.; Yang, X.; Wang, Z.; Yao, X.; Guo, Y. Enhanced Bioavailability and Anti-Hyperglycemic Activity of Young Apple Polyphenols by Complexation with Whey Protein Isolates. *J. Food Sci.* **2022**, *87*, 1257–1267. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Lugo-Zarate, L.; Delgado-Olivares, L.; Cruz-Cansino, N.D.; González-Olivares, L.G.; Castrejón-Jiménez, N.S.; Estrada-Luna, D.; Jiménez-Orsorio, A.S. Blackberry Juice Fermented with Two Consortia of Lactic Acid Bacteria and Isolated Whey: Physicochemical and Antioxidant Properties during Storage. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 8882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Koren, E.; Kohen, R.; Ginsburg, I. Polyphenols enhance total oxidant-scavenging capacities of human blood by binding to red blood cells. *Exp. Biol. Med* **2010**, *235*, 689–699. [\[CrossRef\]](#)
26. Jaimez-Ordaz, J.; Contreras-López, E.; Ramírez-Godínez, J.; Castañeda-Ovando, A.; González-Olivares, L.G. Prebiotic Potential of Macerates Derived from Solid-State Fermentation of Barley Straw by *Rhizopus Oryzae* JCP024: Preliminary Evaluation. *Biomass Convers. Biorefinery* **2023**, *13*, 4797–4802. [\[CrossRef\]](#)
27. Sebastián-Nicolas, J.L.; Contreras-López, E.; Ramírez-Godínez, J.; Cruz-Guerrero, A.E.; Rodríguez-Serrano, G.M.; Añorve-Morga, J.; Jaimez-Ordaz, J.; Castañeda-Ovando, A.; Pérez-Escalante, E.; Ayala-Niño, A.; et al. Milk Fermentation by *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102: Proteolytic Profile and ACE-Inhibitory Activity. *Fermentation* **2021**, *7*, 215. [\[CrossRef\]](#)
28. Zafra-Rojas, Q.; Cruz-Cansino, N.; Delgadillo-Ramírez, A.; Alanís-García, E.; Añorve-Morga, J.; Quintero-Lira, A.; Castañeda-Ovando, A.; Ramírez-Moreno, E. Organic Acids, Antioxidants, and Dietary Fiber of Mexican Blackberry (*Rubus fruticosus*) Residues Cv. Tupy. *J. Food Qual.* **2018**, *2018*, 5950761. [\[CrossRef\]](#)
29. García-Falcón, M.S.; Pérez-Lamela, C.; Martínez-Carballo, E.; Simal-Gándara, J. Determination of Phenolic Compounds in Wines: Influence of Bottle Storage of Young Red Wines on Their Evolution. *Food Chem.* **2007**, *105*, 248–259. [\[CrossRef\]](#)
30. Fernández-Rojas, B.; Gómez-Sierra, T.; Medina-Campos, O.N.; Hernández-Juárez, J.; Hernández-Cruz, P.A.; Gallegos-Velasco, I.B.; Pérez-Cervera, Y.; Pedraza-Chaverri, J. Antioxidant Activity of Glucosamine and Its Effects on ROS Production, Nrf2, and O-GlcNAc Expression in HMEC-1 Cells. *Curr. Res. Toxicol.* **2023**, *5*, 100128. [\[CrossRef\]](#)
31. Ramírez-Rodríguez, Y.; Ramírez, V.; Robledo-Márquez, K.; García-Rojas, N.; Rojas-Morales, P.; Arango, N.; Pedraza-Chaverri, J.; Medina-Campos, O.N.; Pérez-Rojas, J.M.; Flores-Ramírez, R.; et al. Stenocereus Huastecorum-Fruit Juice Concentrate Protects against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Nitric Oxide Pathway Activity and Antioxidant and Antiapoptotic Effects. *Food Res. Int.* **2022**, *160*, 111337. [\[CrossRef\]](#)
32. Gaspar, C.; Donders, G.G.; Palmeira-de-Oliveira, R.; Queiroz, J.A.; Tomaz, C.; Martinez-de-Oliveira, J.; Palmeira-de-Oliveira, A. Bacteriocin Production of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Express* **2018**, *8*, 153. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

33. Duong, T.H.; Grolle, K.; Nga, T.T.V.; Zeeman, G.; Temmink, H.; van Eekert, M. Protein Hydrolysis and Fermentation under Methanogenic and Acidifying Conditions. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 254. [\[CrossRef\]](#)
34. Olvera-Rosales, L.B.; Cruz-Guerrero, A.E.; Jaimez-Ordaz, J.; Pérez-Escalante, E.; Quintero-Lira, A.; Ramírez-Moreno, E.; Contreras-López, E.; González-Olivares, L.G. Differences in the Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria Affect the Release of DPP-IV Inhibitory Peptides from Whey Proteins. *Dairy* **2023**, *4*, 515–526. [\[CrossRef\]](#)
35. Saubenova, M.; Oleinikova, Y.; Rapoport, A.; Maksimovich, S.; Yermekbay, Z.; Khamedova, E. Bioactive Peptides Derived from Whey Proteins for Health and Functional Beverages. *Fermentation* **2024**, *10*, 359. [\[CrossRef\]](#)
36. Kwaw, E.; Ma, Y.; Tchabo, W.; Apaliya, M.T.; Wu, M.; Sackey, A.S.; Xiao, L.; Tahir, H.E. Effect of *Lactobacillus* Strains on Phenolic Profile, Color Attributes and Antioxidant Activities of Lactic-Acid-Fermented Mulberry Juice. *Food Chem.* **2018**, *250*, 148–154. [\[CrossRef\]](#)
37. Feng, T.; Wang, J. Oxidative Stress Tolerance and Antioxidant Capacity of Lactic Acid Bacteria as Probiotic: A Systematic Review. *Gut Microbes* **2020**, *12*, 1801944. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Abbasiliasi, S.; Tan, J.S.; Tengku Ibrahim, T.A.; Bashokouh, F.; Ramakrishnan, N.R.; Mustafa, S.; Ariff, A.B. Fermentation Factors Influencing the Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria: A Review. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 29395–29420. [\[CrossRef\]](#)
39. Guerin, J.; Bacharouche, J.; Burgain, J.; Lebeer, S.; Francius, G.; Borges, F.; Scher, J.; Gaiani, C. Pili of *Lactobacillus rhamnosus* GG Mediate Interaction with β -Lactoglobulin. *Food Hydrocoll.* **2016**, *58*, 35–41. [\[CrossRef\]](#)
40. Lu, W.; Fu, N.; Woo, M.W.; Chen, X.D. Exploring the Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and Whey Protein Isolate for Preservation of the Viability of Bacteria through Spray Drying. *Food Funct.* **2021**, *12*, 2995–3008. [\[CrossRef\]](#)
41. Olvera-Rosales, L.B.; Pérez-Escalante, E.; Castañeda-Ovando, A.; Contreras-López, E.; Cruz-Guerrero, A.E.; Regal-López, P.; Cardelle-Cobas, A.; González-Olivares, L.G. ACE-Inhibitory Activity of Whey Proteins Fractions Derived of Fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Streptococcus thermophilus* SY-102. *Foods* **2023**, *12*, 2416. [\[CrossRef\]](#)
42. Luca, L.; Oroian, M. Influence of Different Prebiotics on Viability of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* Encapsulated in Alginate Microcapsules. *Foods* **2021**, *10*, 710. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Santa, D.; Sribinowska, S. Whey: Source of Bioactive Peptides, Probiotics, Organic Acids, Aromatic Compounds and Enzymes. In *Whey Valorization: Innovations, Technological Advancements and Sustainable Exploitation*; Poonia, A., Trajkovska Petkoska, A., Eds.; Springer Nature: Singapore, 2023; pp. 239–258. ISBN 978-981-9954-59-9.
44. Olvera-Rosales, L.B.; Cruz-Guerrero, A.E.; García-Garibay, J.M.; Gómez-Ruiz, L.C.; Contreras-López, E.; Guzmán-Rodríguez, F.; González-Olivares, L.G. Bioactive Peptides of Whey: Obtaining, Activity, Mechanism of Action, and Further Applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 10351–10381. [\[CrossRef\]](#)
45. Martín-del-Campo, S.T.; Martínez-Basilio, P.C.; Sepúlveda-Álvarez, J.C.; Gutiérrez-Melchor, S.E.; Galindo-Peña, K.D.; Lara-Domínguez, A.K.; Cardador-Martínez, A. Production of Antioxidant and ACEI Peptides from Cheese Whey Discarded from Mexican White Cheese Production. *Antioxidants* **2019**, *8*, 158. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Chourasia, R.; Chiring Phukon, L.; Abedin, M.M.; Padhi, S.; Singh, S.P.; Rai, A.K. Bioactive Peptides in Fermented Foods and Their Application: A Critical Review. *Syst. Microbiol. Biomanufacturing* **2023**, *3*, 88–109. [\[CrossRef\]](#)
47. Hernández-Jabalera, A.; Cortés-Giraldo, I.; Dávila-Ortiz, G.; Vioque, J.; Alaiz, M.; Girón-Calle, J.; Megías, C.; Jiménez-Martínez, C. Influence of Peptides-Phenolics Interaction on the Antioxidant Profile of Protein Hydrolysates from Brassica Napus. *Food Chem.* **2015**, *178*, 346–357. [\[CrossRef\]](#)
48. Hu, Y.; Ling, Y.; Qin, Z.; Huang, J.; Jian, L.; Ren, D.F. Isolation, Identification, and Synergistic Mechanism of a Novel Antimicrobial Peptide and Phenolic Compound from Fermented Walnut Meal and Their Application in Rosa Roxburghii Tratt Spoilage Fungus. *Food Chem.* **2024**, *433*, 137333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Ji, Q.-Y.; Wang, W.; Yan, H.; Qu, H.; Liu, Y.; Qian, Y.; Gu, R. The Effect of Different Organic Acids and Their Combination on the Cell Barrier and Biofilm of *Escherichia coli*. *Foods* **2023**, *12*, 3011. [\[CrossRef\]](#)
50. Li, K.J.; Brouwer-Brolsma, E.M.; Burton-Pimentel, K.J.; Vergères, G.; Feskens, E.J.M. A Systematic Review to Identify Biomarkers of Intake for Fermented Food Products. *Genes Nutr.* **2021**, *16*, 5. [\[CrossRef\]](#)
51. Wang, H.; Huang, T.; Liu, K.; Yu, J.; Yao, G.; Zhang, W.; Zhang, H.; Sun, T. Protective Effects of Whey Protein Hydrolysate on *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Probio-M8 during Freeze-Drying and Storage. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 7308–7321. [\[CrossRef\]](#)
52. Yuan, Y.; Jiang, X.; Li, W.; Chang, C.; Wu, J. A Protectant for *Lactobacillus rhamnosus* Based on Whey Protein Isolate and Isomalt: Stress Resistance and Underlying Mechanisms. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *280*, 135712. [\[CrossRef\]](#)
53. Prosekov, A.; Lyubov, D.; Milentyeva, I.; Sykhikh, S.A.; Babich, O.; Ivanova, S.; Pavsky, V.; Shishin, M.V.; Matskova, L.V. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Bacteriocin-Producing Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Human Gastrointestinal Tract. *Prog. Nutr.* **2017**, *19*, 67–80. [\[CrossRef\]](#)
54. Nuryana, I.; Andriani, A.; Lisdiyanti, P.; Yopi. Analysis of Organic Acids Produced by Lactic Acid Bacteria. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2019**, *251*, 012054. [\[CrossRef\]](#)
55. Ricci, A.; Cirlini, M.; Levante, A.; Dall'Asta, C.; Galaverna, G.; Lazzi, C. Volatile Profile of Elderberry Juice: Effect of Lactic Acid Fermentation Using *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. casei* Strains. *Food Res. Int. Ott. Ont* **2018**, *105*, 412–422. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

56. Zalán, Z.; Hudáček, J.; Štětina, J.; Chumchalová, J.; Halász, A. Production of Organic Acids by *Lactobacillus* Strains in Three Different Media. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *230*, 395–404. [\[CrossRef\]](#)
57. Tagliazucchi, D.; Martini, S.; Solieri, L. Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation* **2019**, *5*, 96. [\[CrossRef\]](#)
58. Fenwick, M.L. The Production of an Esterase Inhibitor from Schradan in the Fat Body of the Desert Locust. *Biochem. J.* **1958**, *70*, 373–381. [\[CrossRef\]](#)
59. Fritsch, C.; Heinrich, V.; Vogel, R.F.; Toelstede, S. Phenolic Acid Degradation Potential and Growth Behavior of Lactic Acid Bacteria in Sunflower Substrates. *Food Microbiol.* **2016**, *57*, 178–186. [\[CrossRef\]](#)
60. Rodríguez, H.; Curiel, J.A.; Landete, J.M.; de las Rivas, B.; López de Felipe, F.; Gómez-Cordovés, C.; Mancheño, J.M.; Muñoz, R. Food Phenolics and Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 79–90. [\[CrossRef\]](#)
61. Li, T.; Jiang, T.; Liu, N.; Wu, C.; Xu, H.; Lei, H. Biotransformation of Phenolic Profiles and Improvement of Antioxidant Capacities in Jujube Juice by Select Lactic Acid Bacteria. *Food Chem.* **2021**, *339*, 127859. [\[CrossRef\]](#)
62. Chen, X.; Zhao, Z.; Zhang, C.; Shang, C.; Gao, L.; Li, C.; Zhang, G.; Liu, L. Effect of Epigallocatechin Gallate on the Fermentative and Physicochemical Properties of Fermented Milk. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 7322–7333. [\[CrossRef\]](#)
63. Gaur, G.; Gänzle, M.G. Conversion of (Poly)Phenolic Compounds in Food Fermentations by Lactic Acid Bacteria: Novel Insights into Metabolic Pathways and Functional Metabolites. *Curr. Res. Food Sci.* **2023**, *6*, 100448. [\[CrossRef\]](#)
64. De Montijo-Prieto, S.; Razola-Díaz, M.D.; Barbieri, F.; Tabanelli, G.; Gardini, F.; Jiménez-Valera, M.; Ruiz-Bravo, A.; Verardo, V.; Gómez-Caravaca, A.M. Impact of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Avocado Leaf Extracts. *Antioxidants* **2023**, *12*, 298. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Hur, S.J.; Lee, S.Y.; Kim, Y.-C.; Choi, I.; Kim, G.-B. Effect of Fermentation on the Antioxidant Activity in Plant-Based Foods. *Food Chem.* **2014**, *160*, 346–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Escobar-Ortiz, A.; Castaño-Tostado, E.; Rocha-Guzmán, N.E.; Gallegos-Infante, J.A.; Reynoso-Camacho, R. Anthocyanins Extraction from *Hibiscus sabdariffa* and Identification of Phenolic Compounds Associated with Their Stability. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 110–119. [\[CrossRef\]](#)
67. Rizzi, F.; Juan, B.; Espadaler-Mazo, J.; Capellas, M.; Huedo, P. *Lactiplantibacillus plantarum* KABP051: Stability in Fruit Juices and Production of Bioactive Compounds During Their Fermentation. *Foods* **2024**, *13*, 3851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Abdi, A.; Gatri, E.; Filannino, P.; M'Hir, S.; Ayed, L. Formulation Design and Functional Characterization of a Novel Fermented Beverage with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antibacterial Properties. *Beverages* **2025**, *11*, 27. [\[CrossRef\]](#)
69. Rezvankhah, A.; Yarmand, M.S.; Ghanbarzadeh, B.; Mirzaee, H. Generation of Bioactive Peptides from Lentil Protein: Degree of Hydrolysis, Antioxidant Activity, Phenol Content, ACE-Inhibitory Activity, Molecular Weight, Sensory, and Functional Properties. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 5021–5035. [\[CrossRef\]](#)
70. Pérez-Gregorio, R.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Bioactive Peptides and Dietary Polyphenols: Two Sides of the Same Coin. *Molecules* **2020**, *25*, 3443. [\[CrossRef\]](#)
71. Perez, R.H.; Zendo, T.; Sonomoto, K. Multiple Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **2022**, *134*, 277–287. [\[CrossRef\]](#)
72. Kowalski, R.; Gustafson, E.; Carroll, M.; Gonzalez de Mejia, E. Enhancement of Biological Properties of Blackcurrants by Lactic Acid Fermentation and Incorporation into Yogurt: A Review. *Antioxidants* **2020**, *9*, 1194. [\[CrossRef\]](#)
73. Pinto, T.; Vilela, A.; Cosme, F. Chemical and Sensory Characteristics of Fruit Juice and Fruit Fermented Beverages and Their Consumer Acceptance. *Beverages* **2022**, *8*, 33. [\[CrossRef\]](#)
74. Hu, Y.; Li, Y.; Li, X.; Zhang, H.; Chen, Q.; Kong, B. Application of Lactic Acid Bacteria for Improving the Quality of Reduced-Salt Dry Fermented Sausage: Texture, Color, and Flavor Profiles. *LWT* **2022**, *154*, 112723. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CAPÍTULO V. Propiedades probióticas de las BAL y su actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*.

5.1. Introducción

La demanda sobre el consumo de probióticos ha ganado interés entre la población, relacionado con el impacto positivo que tiene sobre el cuerpo humano. Sus principales acciones se encaminan a la inhibición de patógenos y síntesis de posbióticos como ácidos orgánicos, péptidos, exopolisacáridos, que tienen un efecto en funciones endocrinas, señalización neurológica, maduración del sistema inmune, metabolismo de sales biliares, entre otras (1).

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico, es necesario demostrar su funcionalidad y se debe mantener su viabilidad en cantidades suficientes para el hospedero. Se ha sugerido que la cantidad mínima terapéutica de 10^6 UFC/gr con la necesidad de que las cepas permanezcan intactas a través del tracto intestinal para garantizar efectos promotores de la salud al entrar en su sitio de acción (2,3). Con esta concentración, se puede asegurar su supervivencia tras el paso por el tracto gastrointestinal, obteniendo concentraciones suficientes que permitan la colonización en el colon (4–6), seguido de la adherencia al epitelio intestinal, la cual es una propiedad relacionada con su potencial antimicrobiano (7,8). Otro punto importante a considerar en el contexto de enfermedad, es su sensibilidad a los antibióticos para disminuir el riesgo de resistencia a los fármacos (9). Estas pruebas permiten que los microorganismos con propiedades probióticas puedan ser administrados de forma segura y con un impacto positivo en la salud.

Aunque ya son conocidas las propiedades probióticas de diferentes cepas ácido-lácticas en monocultivo, aún no se conoce completamente si estas propiedades pueden verse modificadas en combinaciones/co-cultivo que impacten directamente en la salud del huésped (1). Dado que se trabajó con un jugo fermentado con dos consorcios de BAL, resulta fundamental analizar las propiedades probióticas de cada consorcio sin el jugo, así como la actividad antimicrobiana de los consorcios en el jugo. Por lo cual, el objetivo del presente trabajo fue determinar las propiedades probióticas en cepas de bacterias ácido-lácticas en monocultivo y co-cultivo, que permitan identificar si las propiedades evaluadas se modifican cuando las cepas están en co-cultivo.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

El caldo y agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) son de HIMEDIA, caldo Muller-Hinton (Merk) y los principales reactivos son PBS (fosfato de sodio monobásico y fosfato de potasio dibásico, 900 y 400 µg en 100 mL, respectivamente, pH 7.5), pepsina, pancreatina, sales biliares, ácido tricloroacético, dextrano y los antibióticos ampicilina, penicilina, meropenem, linezolid, vancomicina, eritromicina y clindamicina son Sigma-Aldrich.

5.2.2. Preparación de cultivos bacterianos

Se usaron cultivos frescos para las pruebas de autoagregación, hidrofobicidad, resistencia al paso por condiciones del tracto gastrointestinal, antibiograma y actividad antimicrobiana (Capítulo 1).

5.2.3. Ensayo de autoagregación

La capacidad de autoagregación de cepas se evaluó mediante el método descrito por Hyrslova, et al. (10) con ligeras modificaciones. Esta metodología se basa en la agregación y precipitación de cultivos bacterianos, reflejándose en la pérdida de la turbidez. Se recolectó la biomasa de los cultivos frescos (ver sección 6.2.2) por centrifugación (Centrífuga Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA) a 8,000 rpm, durante 7 minutos y se resuspendieron en PBS (NaCl 0.137 M, KCl 0.0027 M, Na₂HPO₄ 0.01 M, KH₂PO₄ 0.0018 M, pH 7.4) a una densidad óptica de 0.50-0.60 a 600 nm (A_0). Los cultivos se incubaron (Felisa FE-133D, Feligneo, México) a 37 °C por 7 horas sin agitación (y se midió la densidad óptica a las 2, 4 y 7 horas (A_h) a 600 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Gen 5 Software versión 3.16.10, KC Junior, Winooski, VT, USA). El porcentaje de autoagregación se determinó con la siguiente fórmula:

$$1. \text{ Autoagregación (\%)} = (1 - (A_h/A_0)) \times 100$$

5.2.4. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad se realizó de acuerdo con el método establecido por Hyrslova, et al. (10), esta metodología permite determinar la afinidad de los microorganismos al disolvente apolar, simulando la adherencia de las bacterias a superficies hidrofóbicas. Los cultivos frescos (ver sección 6.2.2), fueron centrifugados (Centrífuga Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA) por 5000 xg, durante 5 minutos, a

temperatura ambiente. La biomasa bacteriana se lavó dos veces con 5 mL de tampón de solución salina de fosfato (5 mM a pH 7.0) y se resuspendió a una densidad óptica de 0.50-0.60 a 620 nm (H_0).

Después, se tomaron 5 mL de suspensión bacteriana y se agregaron 150 μ L de hexano; se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se dejó en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. La densidad óptica de la fase acuosa se midió a 620 nm (H_t) en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Gen 5 Software versión 3.16.10, KC Junior, Winooski, VT, USA). El porcentaje de hidrofobicidad se calculó con la siguiente fórmula:

$$2. \text{ Hidrofobicidad (\%)} = ((H_0 - H_t) / H_0) \times 100$$

5.2.5. Sobrevivencia al paso por condiciones del tracto gastrointestinal

La sobrevivencia de las cepas al paso por el tracto gastrointestinal se realizó por simulación *in vitro* (11). Esta técnica permite determinar la capacidad de resistencia a condiciones adversas del tracto gastrointestinal superior como el pH ácido (2 a 3), actividad enzimática (pepsina) y sales biliares, con el objetivo de que el mayor número de BAL lleguen viables al intestino grueso (12).

Como primer paso, 1 mL del cultivo en fresco (ver sección 6.2.2), se recolectó y centrifugó (Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA) durante 7 minutos a 5500 xg a temperatura ambiente (y se lavó dos veces en PBS (pH 7). La biomasa fue resuspendida en 10 mL de jugo gástrico simulado compuesto de pepsina a 3 g/L a pH 2 (ajustado con HCl 1 N), diluido en solución salina al 0.5 %. La solución se incubó por 2 horas a 37 °C sin agitación, se tomó una alícuota de 2 mL y se determinó la cuenta viable en placa con MRS con la técnica de microgota, las placas fueron incubadas (marca, modelo, país) a 37 °C por 36 horas. Como segundo paso, se recolectó por centrifugación, en las mismas condiciones, la biomasa del jugo gástrico simulado y se resuspendió en 10 mL de jugo intestinal simulado (1 g/L de pancreatina más 2 g/L de sales biliares a pH 8 ajustado con NaOH 1 N, en dilución con solución salina al 0.5 %), se realizó la cuenta viable en agar MRS. Posteriormente, las placas se incubaron en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad celular.

5.2.6. Antibiograma

La resistencia a los antibióticos de las BAL se evaluó con la concentración mínima inhibitoria (CMI) de acuerdo con el método de susceptibilidad establecido por

el Clinical and Laboratory Standards Institute (13). Los antibióticos probados fueron ampicilina, penicilina, meropenem, linezolid, vancomicina, eritromicina y clindamicina, relacionados con la solicitud de la norma ISO 10932 (14). Las cepas fueron cultivadas a 37 °C por 24 h en caldo MRS; posteriormente, se inoculó cada cepa partiendo de una suspensión al 0.5 del nefelómetro de McFarland en caldo Muller-Hinton suplementado con sangre de caballo (1 %). Se incubaron a 35 °C con 5% de CO₂ por 24 h. La CMI se determinó por observación de hemólisis celular (degradación de eritrocitos) para cada una de las cepas probadas, la ausencia de hemólisis indica seguridad (sensibilidad al antibiótico).

5.2.7. Producción de exopolisacáridos

Para determinar la producción de exopolisacáridos de las BAL, las cepas en monocultivo (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* y *L. casei*) y co-cultivo (C1: *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *L. brevis*; y C2: *L. rhamnosus* y *L. casei*) se cultivaron en caldo MRS en incubación (Felisa FE-133D, Feligneo, México) a 37 °C por 72 horas. Durante la fermentación se tomaron alícuotas de 5 mL a las 0, 24, 48 y 72 horas. Se agregaron 2 mL de ácido tricloroacético (80% en agua desionizada) al cultivo bacteriano, se agitó vigorosamente por 30 seg y se dejó reposar 20 min a 4 °C.

Posteriormente, se centrifugó (Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA) 30 minutos a 7000 xg a 4 °C a temperatura ambiente. Se tomaron 2 mL del sobrenadante y se agregaron 2 mL de etanol absoluto y se mezcló vigorosamente por 30 segundos. Se dejó reposar 20 min a 4°C y se midió la absorbancia de (200 µL) a 720 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, Gen 5 Software versión 3.16.10, KC Junior, Winooski, VT, USA). Como estándar de referencia se utilizó dextrano y se realizó una curva estándar de 5 puntos (0, 0.2, 0.4, 0.6 y 1 mg/mL). Los resultados se expresaron en mg/mL.

5.2.8. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de microdilución en caldo (15) que se fundamenta en determinar la cinética de muerte de un microorganismo de referencia (patógeno) al contacto con el microorganismo probiótico a través del tiempo. Se probó la actividad bactericida de los cultivos frescos fermentados en caldo MRS, en monocultivo (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* y *L. casei*) y cocultivo (C1: *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *L. brevis*; y C2: *L. rhamnosus* y *L. casei*). Los cocultivos inoculados y fermentados en jugo de zarzamora con suero de leche el BJWH/C1 (*L. plantarum*, *P. acidilactici* y *L. brevis*) y BJWH/C2 (*L. rhamnosus* y *L.*

casei) y controles negativos se utilizó el caldo MRS y jugo BJWH/C-, muestras sin inóculo.

En cuanto a las cepas patógenas de referencia, se activaron en agar soya tripticaseína para *S. aureus* y agar bilis rojo violeta (VRBG) para *Escherichia coli* y se sincronizaron en 5 mL de caldo nutritivo, en ambos procesos se incubaron (Felisa FE-133D, Feligneo, México) a 37 °C por 24 h, cada paso. Del cultivo fresco sincronizado se recuperó la biomasa por centrifugación (Allegra 25R, Beckman Coulter, EUA) durante 15 min a 7000 xg a temperatura ambiente y se hizo un lavado con 2mL de PBS. Se preparó una concentración al 2 del nefelómetro de McFarland de las cepas patógenas *E. coli* y *S. aureus*.

La preparación de los tubos se realizó de la siguiente manera: 0.5 mL del patógeno a 2 McFarland, 2 mL de caldo nutritivo y 2.5 mL de las muestras a probar. Posteriormente, se llevaron a incubación (Felisa FE-133D, Feligneo, México) a 37 °C y se tomaron alícuotas de 200 µL a las 0, 2, 4, 6 y 24 horas. Se realizaron diluciones seriadas y se utilizó la técnica de microgota (16) para determinar la cuenta viable de *E. coli* en medio VRBG y de *S. aureus* en medio soya tripticaseína, las placas se llevaron a incubación a 37 °C por 24 h.

5.2.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados como la media y desviación estándar (media $\pm$ DE) de tres experimentos independientes (n= 3), a un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con post hoc Tukey. Adicionalmente, se hizo un test-T para comparar los cambios en la resistencia a la digestión entre cada cepa (estómago con intestino). Todos los análisis se realizaron en el software SPSS v. 27.

5.3. Resultados

El análisis probiótico de las BAL aisladas de aguamiel (*L. plantarum* y *P. acidilactici*), pulque (*L. brevis*) y leches fermentadas (*L. rhamnosus* y *L. casei*), en monocultivo y cocultivo (Consortio 1 conformado por *L. plantarum*, *L. brevis* y *P. acidilactici*; y Consortio 2 conformado por *L. rhamnosus* y *L. casei*).

5.3.1. Capacidad de autoagregación e hidrofobicidad

Las propiedades de autoagregación aumentaron con respecto al tiempo de incubación (Figura 5.1) en todas las cepas y en cocultivo. Sin embargo, *P. acidilactici*

resultó con mayor porcentaje de autoagregación desde las 2 horas (28.76%) y hasta las 7 horas (45.65%), lo cual fue significativo. Esto se relaciona con el hecho de que en las muestras en cocultivo, el C1 obtuvo el porcentaje de autoagregación (24.83 %, en promedio) más alto, ya que contiene *L. brevis*, *L. plantarum* y *P. acidilactici*. Mientras que las muestras de C2, que contienen *L. rhamnosus* y *L. brevis*, tuvieron el menor porcentaje de autoagregación, incluso que las cepas individuales.

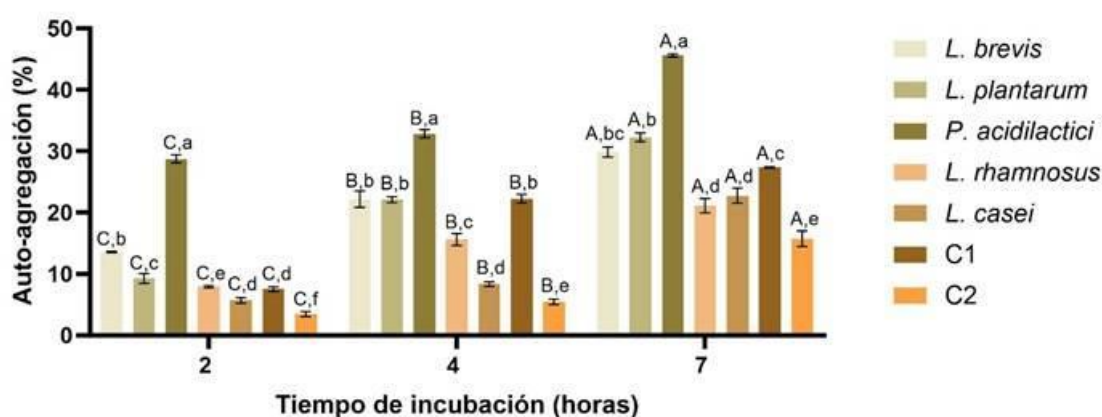


Figura 5.1. Autoagregación de bacterias ácido lácticas en monocultivo y cocultivo. Consorcio 1 (C1), Consorcio 2 (C2). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=3$). ^{a-f} Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre las diferentes muestras en monocultivo y cocultivo por tiempo de incubación. ^{A-C} Diferentes letras mayúsculas indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre cada muestra en los diferentes tiempos de incubación.

En cuanto a la capacidad de hidrofobicidad en los monocultivos, *L. rhamnosus* obtuvo el valor más alto, con un valor promedio de 64.71 ± 0.33 %. Por consiguiente, se observó que el cocultivo C2 tuvo el mayor porcentaje de hidrofobicidad ($47.38 \pm 2.67\%$, Figura 2), mientras que no fue detectable en las muestras de C1.

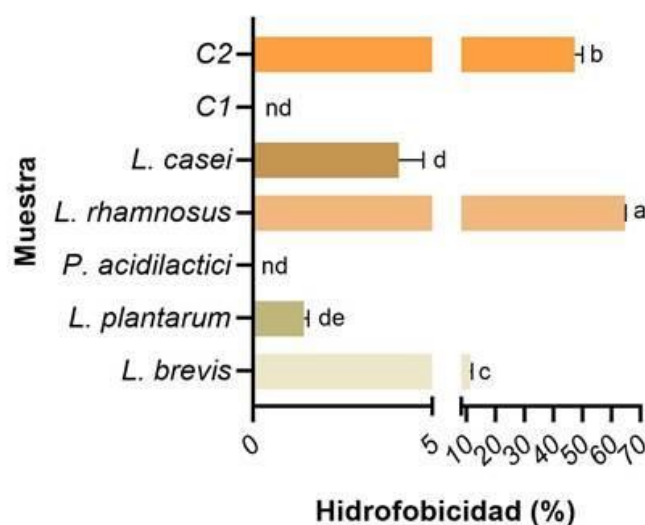


Figura 5.2. Hidrofobicidad de bacterias ácido lácticas en monocultivo y cocultivo. Consorcio 1 (C1), Consorcio 2 (C2). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (n=3). ^{a-e} Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes muestras en monocultivo y co-cultivo.

5.3.2. Sobrevivencia al paso por condiciones del tracto gastrointestinal

En la Tabla 5.1 se observa la viabilidad de las BAL en las pruebas de resistencia a condiciones del proceso digestivo. En relación al 100% de bacterias iniciales en el ensayo, hubo una disminución de sobrevivencia del 5.61% al 26.68% en las condiciones gástricas (pH de 2), mientras que los consorcios C1 y C2 no presentaron diferencias significativas entre ellos. En cuanto a la sobrevivencia en condiciones simuladas al intestino delgado, la cepa que tuvo menor viabilidad fue *P. acidilactici*, en comparación con las demás cepas de BAL, su viabilidad fue 13.76% menos que la el co-cultivo C1 quién fue el que mayor viabilidad mantuvo en el proceso. La diferencia de sobrevivencia en condiciones gástricas vs condiciones intestinales tuvo una disminución del 4.77% en *L. brevis*, de 10.75% en *P. acidilactici*, de 12.44% en C1 y de 13.97% en *L. casei*.

5.3.3. Resistencia a antibióticos

La prueba del antibiograma en las cepas de BAL en monocultivo (*L. brevis*, *L. plantarum*, *P. acidilactici*, *L. rhamnosus* y *L. casei*) resultó en sensibilidad a 7 antibióticos probados, mientras que se observó resistencia a la vancomicina en concentraciones mayores a 16 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 5.1)

Tabla 5.1. Propiedades probióticas de BAL en monocultivo y cocultivo.

Muestra	Resistencia a la digestión (%)		Antibiograma (µg/mL)						
	Estómago	Intestino	Amp	Pen	Mer	Lin	Van	Eri	Cil
Monocultivo									
<i>L. brevis</i>	80.03±1.79 ^{bc}	75.26±1.50 ^{ab*}	1 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	4 (S)	>16 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)
<i>L. plantarum</i>	77.43±6.17 ^{bc}	72.77±4.53 ^{ab}	1 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	4 (S)	>16 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)
<i>P. acidilactici</i>	73.32±4.07 ^c	62.57±3.43 ^{b*}	1 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	4 (S)	>16 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)
<i>L. rhamnosus</i>	94.39±6.03 ^a	69.84±7.02 ^{ab}	1 (S)	1 (S)	0.5 (S)	4 (S)	>16 (R)	05 (S)	05 (S)
<i>L. casei</i>	80.94±5.07 ^{bc}	66.97±7.83 ^{ab*}	1 (S)	0.5 (S)	0.5 (S)	4 (S)	>16 (R)	0.5 (S)	0.5 (S)
Co-cultivo									
C1	88.80±1.28 ^{ab}	76.36±0.35 ^{a*}							
C2	78.86±3.17 ^{bc}	74.46±1.20 ^{ab}							

Consorcio 1 (C1), Consorcio 2 (C2). Amp: ampicilina; Pen: penicilina; Mer: meropenem; Lin: Linezolid; Van: vancomicina; Eri: eritromicina; Cil: clindamicina; S: sensible; R: resistente. Los valores representan la media±desviación estándar (n=3).

^{a-c} Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) entre las diferentes muestras en monocultivo y cocultivo.

5.3.4. Producción de exopolisacáridos

La síntesis de exopolisacáridos por las cepas de BAL evaluadas se determinó durante 72 horas de incubación (Figura 5.3). La cepa *L. plantarum* mostró un aumento con respecto al tiempo, presentó las mayores concentraciones a las 72 h con 55 $\mu\text{g/mL}$. *P. acidilactici* mostró un comportamiento contrario, disminuyendo la cantidad de exopolisacárido hasta valores nulos a las 72 horas. La mayor producción fue a diferentes tiempos en las cepas *L. casei* y C1 a las 24 h (58 y 11.3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), en *L. rhamnosus* a las 48 horas (26.3 $\mu\text{g/mL}$), y en C2 a las 72 horas (22 $\mu\text{g/mL}$).

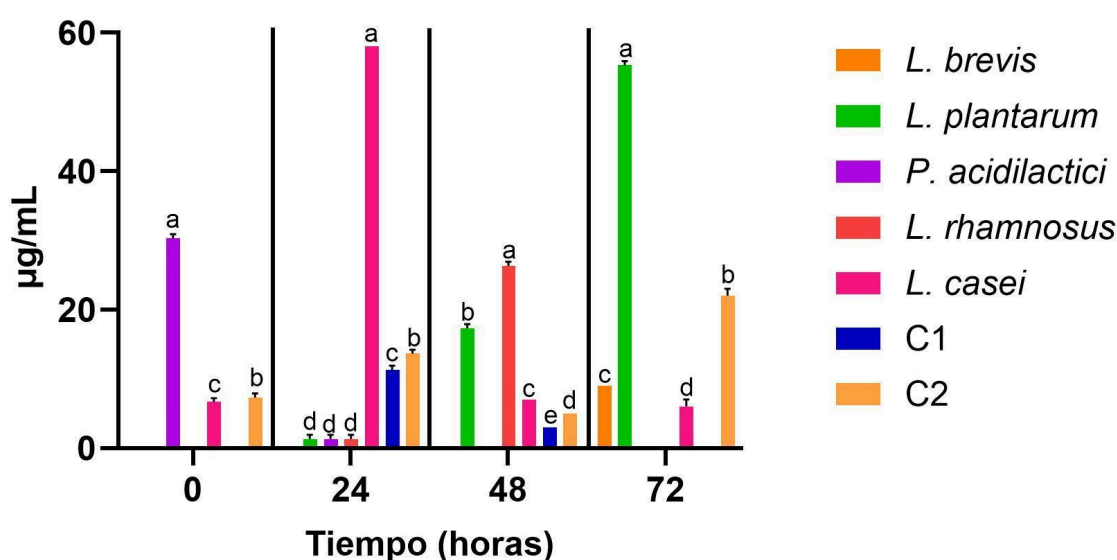


Figura 5.3 Producción de exopolisacáridos por bacterias ácido-lácticas en monocultivo y cocultivo. Consorcio 1 (C1), Consorcio 2 (C2). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar ($n=3$). ^{a-e} Diferentes letras minúsculas indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre las diferentes muestras en monocultivo y cocultivo por tiempo de incubación.

5.3.5. Propiedades antimicrobianas

Se realizaron pruebas antimicrobianas por el método de microdilución en caldo, determinando el tiempo de muerte del microorganismo patógeno evaluado durante diferentes tiempos de incubación hasta por 24 h. En el crecimiento en medio MRS, las muestras sin inóculo, que corresponden a C-, mostraron un aumento significativo en la viabilidad de *E. coli* (Fig 5.4 A) y *S. aureus* (Fig 5.4 B) durante el tiempo de incubación. La cuenta viable de *E. coli* disminuyó significativamente ($p< 0.05$) a las 2 horas de

incubación, en donde no se detectó recuento de la BAL, a excepción de *L. brevis* en la que hasta las 24 h los conteos de *E. coli* fueron de 0 UFC/mL (Figura 5.4 A). Mientras que las propiedades antimicrobianas contra *S. aureus* se vieron reducidas con el tiempo, mostrando valores nulos del patógeno a las 4 horas de incubación en las muestras de los consorcios C1 y C2 cuando se fermentó en medio MRS (Figura 5.4 B).

Por otro lado, al determinar las propiedades antimicrobianas del jugo de zarzamora en mezcla con suero de leche inoculado con los consorcios C1 y C2, se observó el mismo comportamiento del C- en MRS en la muestra BJWH/C- (5.4 C y D). Y en las muestras fermentadas a las 4 horas no se reportó el crecimiento de *E. coli* (5.4 C) y sobre el conteo de *S. aureus* no se apreció crecimiento a las 4 y 6 horas para las muestras BJWH/C2 y BJWH/C1, respectivamente (Fig 5.4 D).

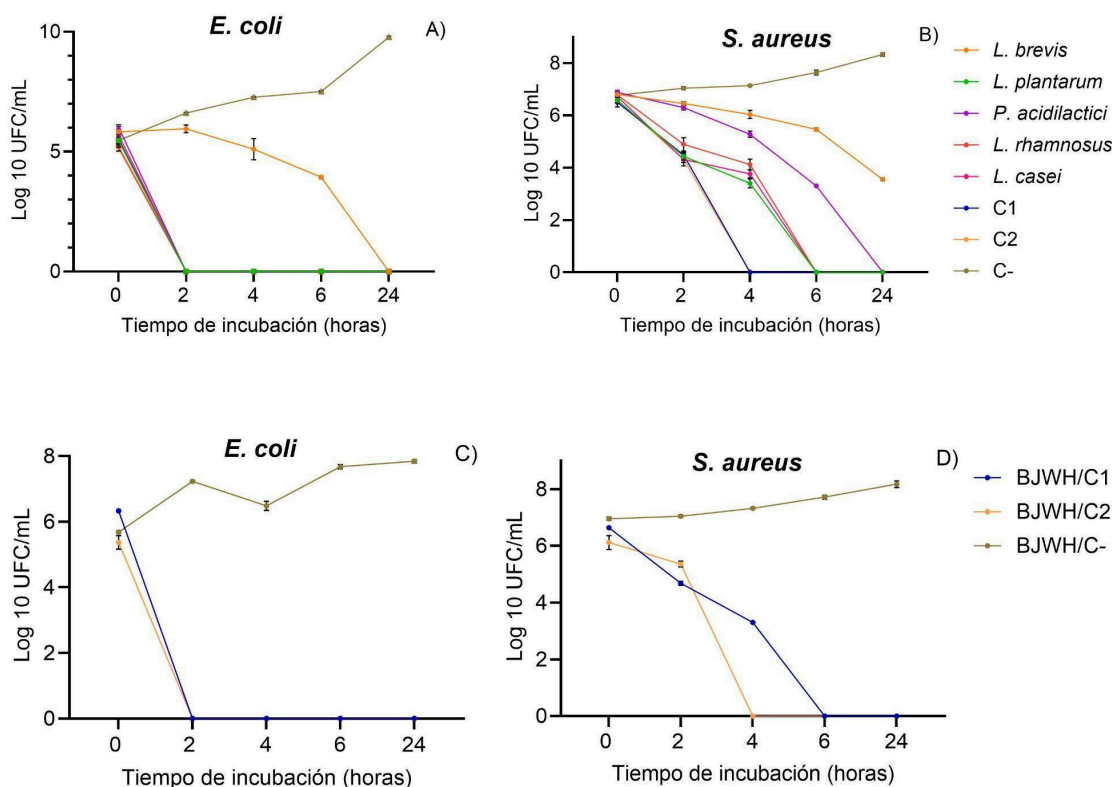


Figura 5.4. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido-lácticas en medio MRS con *E. coli* (A) y *S. aureus* (B), y del jugo de zarzamora con suero de leche fermentado con *E. coli* (C) y *S. aureus* (D). Los valores representan la media $\pm$ desviación estándar (n=3). C1: consorcio 1; C2: consorcio 2; C-: control negativo; BJWH: jugo de zarzamora + suero de leche.

5. 4. Discusión

En este capítulo se evaluaron las propiedades probióticas de cepas de BAL en monocultivo y cocultivo, mediante los análisis indirectos de hidrofobicidad, autoagregación, sobrevivencia al paso por el tracto gastrointestinal, la producción de exopolisacáridos y las propiedades antimicrobianas. Se observó que las BAL tienen potencial para considerarse microorganismos probióticos, gracias a su supervivencia y propiedades bactericidas contra *E. coli* y *S. aureus*.

5.4.1. Auto-agregación e hidrofobicidad

Las capacidades de auto-agregación e hidrofobicidad, están relacionadas con las propiedades de adhesión a la superficie celular del tejido epitelial intestinal (17,18) y a la capacidad de formar una barrera que excluya a microorganismos patógenos, limitando su adhesión (7). La auto-agregación es la interacción física entre las mismas células bacterianas, permitiendo que el microorganismo probiótico persista en el epitelio intestinal mediante la formación de una biomasa, creando una barrera que previene la posible colonización de microorganismos patógenos (19,20). Mientras que hidrofobicidad hace referencia a la capacidad de las BAL a adherirse a la mucosa celular (21), la cual es una propiedad que permite el primer contacto entre las bacterias y las células del epitelio gastrointestinal (22). En general, a mayor porcentaje de hidrofobicidad, mayor posibilidad de adhesión al estar en contacto con las células del epitelio intestinal.

Las cepas analizadas en el presente capítulo en monocultivo y co-cultivo en MRS tuvieron un comportamiento heterogéneo, demostrando que estas propiedades son independientes entre cepa, con diferencias entre la misma especie. Los valores de auto-agregación en todas las muestras en las primeras 2 horas fueron de 3-28%, que corresponde a baja capacidad de agregación. Zawistowska et al. (8) reportaron en cepas aisladas productos probióticos, que al mismo tiempo de incubación (2 horas), los valores de agregación fueron de 8.4% para cepas de *L. plantarum* y de 13.1% en *L. rhamnosus* GG. Aumentando con respecto al tiempo de incubación en las horas 4 y 7. Los autores reportaron que estos valores proveen una capacidad de adhesión al epitelio para combatir los microorganismos patógenos *E. faecalis* y *S. typhimurium*, con 8.85% de capacidad de auto-agregación.

En cuanto a la hidrofobicidad, según la clasificación propuesta por Colloca et al. (23), la hidrofobicidad bacteriana puede considerarse baja (0 a 35%), moderada (36 a 70%) o alta (71 a 100%). De acuerdo con la clasificación anterior, en este estudio los

resultados de las cepas estudiadas sobre las propiedades de hidrofobicidad se consideran en capacidad baja, a excepción de *L. rhamnosus* y el C2, los cuales tuvieron capacidad moderada.

Los resultados sobre capacidades de hidrofobicidad y agregación realizados en las cepas del presente capítulo, se podrían sugerir como posible medición indirecta de las propiedades de adhesión al epitelio gástrico o intestinal. En este sentido, dos cepas de *L. plantarum* IF3083 y IF5014, aisladas de heces infantiles, mostraron porcentajes de hidrofobicidad de 55 y 60%, respectivamente y 79 y 82% de auto-agregación, respectivamente. A estas mismas cepas se les determinó la capacidad de adhesión a células de adenocarcinoma gástrico (AGS) y colorrectal (HT-29), con buena adhesión, ya que en promedio se reportaron índices de adhesión de 19.64 UFC/célula para las células HT-29 y de 37.5 UFC/célula para las células AGS (24). En lo que respecta a cepas aisladas de zarzamora, higos y tunas, su capacidad de hidrofobicidad fue de 20.04 a 34.57 en *L. plantarum* y en *L. paracasei* fue de 63.8, sugiriendo mayor afinidad. Estos resultados fueron comparables con las propiedades de adhesión a células adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2), con índices de adhesión de 1.22 y 4.57 % (25). Lo anterior sugiere, que los valores encontrados de auto-agregación e hidrofobicidad en esta investigación podrían ser suficientes para establecer adhesión al epitelio, lo cual deberá comprobarse mediante estudios celulares e *in vivo*.

5.4.2. Digestión *in vitro*

La supervivencia de los probióticos a través del paso por el tracto gastrointestinal permite que un mayor número de BAL colonicen el intestino (26). En las cepas en monocultivo y co-cultivo se encontró una supervivencia en un rango de 73-94% en condiciones al jugo gástrico y de 62.5-76.0 % en jugo intestinal. En otro estudio se determinó la supervivencia al paso por condiciones del tracto gastrointestinal de cinco cepas aisladas de heces y posteriormente crecidas en medio MRS, observando valores similares a los del presente trabajo, a diferencia de que los autores aislaron la cepa *Lactobacillus salivarius* (80.1%) a las 3 horas de incubación en jugo gástrico (pH 3) y a las 4 horas la tasa de supervivencia en la misma cepa fue de 79.2% en jugo intestinal (27).

Debido a que en este estudio se observó buena supervivencia ante la acidez del jugo gástrico, se considera que este efecto se debe a su capacidad de sobrevivir en condiciones estresantes, como a un pH bajo de 2. Lo anterior se basa en que las

BAL tienen un mecanismo de defensa, que mantiene la homeostasis del medio intracelular con respecto al extracelular, mediante la liberación de protones acumulados (H^+) por la ATPasa manteniendo el pH intracelular a 6 (28,29).

En lo que respecta a la sobrevivencia en las sales biliares de las cepas analizadas en este capítulo, se observó que las cepas en monocultivo *L. brevis* y *L. plantarum* y los co-cultivos C1 y C2 tuvieron mayor supervivencia (74.6%). Se ha documentado que algunas BAL como *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. casei* aisladas de suplementos y bebidas lácteas, tienen la capacidad de producir hidrolasas de sales biliares, desconjugando el ácido biliar primario a uno secundario menos tóxico e incrementando su potencial de sobrevivencia (30). Por tanto, resulta necesario evaluar la producción de dichos metabolitos para conocer si los mecanismos de supervivencia dependen de esta vía.

Algunas estrategias para aumentar la supervivencia de los microorganismos probióticos a las condiciones estresantes (como el pH) del tracto digestivo, se basan en diseñar un vehículo de las BAL resistente al pH y sales biliares. Por ejemplo, se elaboraron encapsulados complejos a partir de un auto-agregado de proteína de nuez, polifenoles de té y *L. rhamnosus*, recubiertos con alginato de sodio, incrementando un 60% la supervivencia de las BAL, en comparación con las cepas libres en el fluido gástrico simulado (31). Lo anterior hace evidente la necesidad de evaluar si los polifenoles presentes en el jugo de zarzamora contribuyen a la supervivencia de las BAL.

5.4.3. Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos forma parte de las investigaciones para determinar la seguridad sobre el consumo de BAL con características probióticas. Las cepas en monocultivo presentaron resistencia a la vancomicina en concentraciones $>16 \mu\text{g/mL}$. Este comportamiento es similar al de un estudio sobre el aislado de 54 cepas de BAL de alimentos lácteos, que demostraron tener alta resistencia a la vancomicina del 93 al 100% en concentraciones de $0.25\text{--}32.0 \mu\text{g/mL}$ en los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (32). Mientras que *L. plantarum* aislada de leche fermentada mostró una fuerte resistencia en concentraciones $>128 \mu\text{g/mL}$ (33).

A nivel molecular, este tipo de BAL como *L. plantarum* (34), se caracterizan por tener una resistencia intrínseca a la vancomicina no relacionada con su expresión de genes resistentes, como los relacionados con el reemplazo de D-Alanil-D-Alanina por D-Alanil-D-lactato (tipos VanA, VanB, VanD, VanF y VanM) como aminoácidos

terminales en el lípido II, resultando en la disminución de 1000 veces la constante de unión entre vancomicina y el peptidoglicano debido a la pérdida de un enlace hidrógeno (35), en consecuencia, la síntesis de peptidoglicano es normal. La resistencia a la vancomicina de las BAL deriva de mutaciones en la misma vía (D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-lac), ejemplo de este efecto es *L. rhamnosus* fermentado en un medio MRS no presentó genes *van* relacionados con la resistencia a la vancomicina (36).

Por lo anterior, se sugiere un mayor análisis para evaluar la resistencia a antibióticos, debe ser un criterio de seguridad para proceder a estudios más complejos relacionados con sus efectos benéficos (37). Como el análisis genotípico para la identificación de genes de resistencia, en los genes puede determinarse si están flanqueados por elementos móviles que podrían transferirse o están codificados por plásmidos conjugativos, transposones y elementos de profagos. De ser así la cepa no debe comercializarse, pero esta prohibición puede depender del antimicrobiano en cuestión, su utilidad en la clínica actual y un análisis de riesgo/beneficio para la cepa (38).

5.4.4. Exopolisacáridos

Se detectó la producción de exopolisacáridos de las cepas de *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum* y el cocultivo C2 (*L. rhamnosus* y *L. casei*) en MRS (9 a 55.3 µg/mL a las 72 horas de incubación). Zeidan, et al (39) indican que en promedio se sintetizan de 20 a 600 µg/mL de exopolisacáridos dependientes de la vía Wzy, la cual es una de las vías más usadas en las BAL para la síntesis de estos polímeros.

Además, la síntesis de exopolisacáridos está sujeta a la capacidad de la cepa para producirlos y a las condiciones de crecimiento como el tiempo, temperatura, pH y sustrato (40). En un estudio sobre la optimización en medio líquido de MRS, sobre la producción de exopolisacáridos de *L. plantarum* aislado de leche de yak fermentada. Se determinó la producción de 345.81 mg/L de exopolisacáridos, bajo las siguientes condiciones: 4 % de inóculo inicial, incubación de 30 horas a 34 °C y pH inicial de 6.4. Además, la actividad enzimática se vio disminuida a mayor temperatura y a un pH ácido (41).

Las enzimas encargadas de la síntesis de exopolisacáridos están mediadas por glicosil transferasas extracelulares y fructosil transferasas en el proceso de polimerización. La entrada de sustrato al citoplasma es dependiente del tipo de carbohidrato, como la sacarosa o la glucosa, ocurriendo por el transporte pasivo o del

sistema fosfoenol piruvato-fosfotransferasa (42). En relación con ello la zarzamora podría promover la mayor síntesis de exopolisacáridos por su contenido en glucosa que oscila entre los 3-4 g/100g y de fructosa con 1-2 g/100 g, sin embargo, su contenido en sacarosa es bajo <1 g/100 g (43).

El enriquecimiento del sustrato con carbohidratos para optimizar la síntesis de exopolisacáridos por las BAL, es utilizado como una estrategia en el diseño de productos fermentados. En una bebida fermentada a base de arroz hidrolizado con sacarosa y agua, e inoculado con *Ln. citreum* DSM 5577 perteneciente a un cepario, se incrementó la síntesis de dextrano, alcanzando un nivel de 9.25 mg/100 mg a una concentración de sacarosa del 20% (44).

La síntesis de exopolisacáridos en alimentos fermentados incrementa su potencial antimicrobiano. Se ha reportado que el heteropolisacárido de *L. paracasei* es activo contra *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Bacillus cereus* (45).

5.4.5. Propiedades antimicrobianas

Las propiedades antimicrobianas de las cepas después de una incubación de 24 horas se realizaron con dos cepas de referencia, *E. coli* se obtuvo de la Colección de Cultivos del Laboratorio de Nutrigenómica (Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México) y *S. aureus* ATCC 29746, mostrando efectos bactericidas a las 2 horas para *E. coli* en todas las muestras, excepto el C-, y a las 4, 6 y 24 horas para *S. aureus*.

En los análisis previos (capítulo 4) sobre la fermentación de los cocultivos en el jugo de zarzamora con suero de leche, se observó la síntesis de ácido láctico (1.2% en BJWH/C1 y 0.9% en BJWH/C2) (46), ácido acético (93.91 mg/100 mL en BJWH/C1 y 65.94 mg/100 mL en BJWH/C2) y de péptidos de bajo peso molecular (44). Estos metabolitos podrían estar relacionados con los efectos antimicrobianos contra *E. coli* y *S. aureus*. Se ha reportado que en matrices similares como el jugo de arándano fermentado con un cultivo comercial (*L. plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidipiscis*, and *Saccharomyces cerevisiae*), mostró halos de inhibición de 21 mm contra *E. coli* y de 25 mm contra *S. aureus* y este efecto podría deberse a la síntesis de ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético y cítrico) y disminución de pH (47). Mientras que *L. lactis* aislada de muestras fecales, fue capaz de sintetizar ácidos orgánicos, mientras que *L. salivarius* y *L. paracasei* sintetizaron ácidos orgánicos y bacteriocinas. Estos metabolitos mostraron alta actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922 (25).

5.5. Conclusiones

En este estudio se analizaron las propiedades probióticas de bacterias ácido lácticas en monocultivo y en cocultivo. Se observó un incremento de la autoagregación a través del tiempo de incubación, siendo *P. acidilactici*, *L. brevis* y *L. plantarum* las cepas con los mayores porcentajes. Mientras que las cepas *L. rhamnosus* y el cocultivo C2 tuvieron mayor porcentaje de hidrofobicidad.

La supervivencia de las cepas al paso por el tracto gastrointestinal *in vitro* fue mayor al 62 %, lo cual podría sugerir una alta posibilidad de permanencia en el colon del huésped. Sin embargo, la producción de exopolisacáridos no se benefició por el método utilizado sobre la fermentación en un medio MRS. Además, un buen potencial bactericida contra *E. coli* y *S. aureus* se determinó en todas las muestras, tanto en monocultivo como en cocultivo.

Estos resultados proporcionan recursos como posible potencial de aplicación para el análisis más detallado y específico de las características probióticas de las BAL para su posterior aplicación en el desarrollo de nuevos productos con propiedades benéficas para la salud.

5.6. Referencias

1. Gómez A. Microbioma, salud y enfermedad: probióticos, prebióticos y simbióticos. *Biomedica*. 2019;39(4):617-21.
2. Neffe-Skocińska K, Rzepkowska A, Szydłowska A, Kołożyn-Krajewska D. Chapter 3 - Trends and possibilities of the use of probiotics in food production. En: Holban AM, Grumezescu AM, editores. *Alternative and Replacement Foods*. Academic Press; 2018. p. 65-94. (Handbook of Food Bioengineering). doi:10.1016/B978-0-12-811446-9.00003-4
3. Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients*. 2019;11(7):1591. doi:10.3390/nu11071591
4. Ljungh A, Wadström T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2006;7(2):73-89.
5. Bengoa AA, Zavala L, Carasi P, Trejo SA, Bronsoms S, Serradell M de LÁ, et al. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Res Int*. 2018;103:462-7. doi:10.1016/j.foodres.2017.09.093
6. Oliveira G, González-Molero I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*. 2016;63(9):482-94. doi:10.1016/j.endonu.2016.07.006
7. Klopper KB, Deane SM, Dicks LMT. Aciduric Strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus*, Isolated from Human Feces, Have Strong Adhesion and Aggregation Properties. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018;10(1):89-97. doi:10.1007/s12602-017-9307-5

8. Zawistowska-Rojek A, Kośmider A, Stępień K, Tyski S. Adhesion and aggregation properties of Lactobacillaceae strains as protection ways against enteropathogenic bacteria. Arch Microbiol. 2022;204(5):285. doi:10.1007/s00203-022-02889-8
9. Zavišić G, Popović M, Stojkov S, Medić D, Gusman V, Jovanović Lješćković N, et al. Antibiotic Resistance and Probiotics: Knowledge Gaps, Market Overview and Preliminary Screening. Antibiotics (Basel). 2023;12(8):1281. doi:10.3390/antibiotics12081281
10. Hyrslova I, Drab V, Cihlar J, Krausova G, Mrvikova I, Kana A, et al. Functional and Probiotic Characterization of Newly Isolated Strains from Infant Feces and Breast Milk. Fermentation. 2023;9(11):960. doi:10.3390/fermentation9110960
11. Kostelac D, Gerić M, Gajski G, Markov K, Domijan AM, Čanak I, et al. Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. Int Dairy J. 2021;112:104828. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104828
12. Naissinger da Silva M, Tagliapietra BL, Flores VDA, Pereira Dos Santos Richards NS. *In vitro* test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. Curr Res Food Sci. 2021; 12;4:320-325. doi: 10.1016/j.crf.2021.04.006.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2024) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34th Edition, CLSI. - References - Scientific Research Publishing [Internet]. [citado 15 de marzo de 2026]. Disponible en: <https://www.scrip.org/reference/referencespapers?referenceid=4019104>
14. ISO [Internet]. [citado 15 de marzo de 2026]. ISO 10932:2010. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/46434.html>
15. Biadała A, Szablewski T, Cegielska-Radziejewska R, Lasik-Kurdyś M, Adzahan NM. The Evaluation of Activity of Selected Lactic Acid Bacteria for Bioconversion of Milk and Whey from Goat Milk to Release Biomolecules with Antibacterial Activity. Molecules. 2023;28(9):3696. doi:10.3390/molecules28093696
16. Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., Muñoz-Rojas, J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de" Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo. Rev colomb de biotecnol. 2012; 14(2), 147-156.
17. de Souza BMS, Borgonovi TF, Casarotti SN, Todorov SD, Penna ALB. Lactobacillus casei and Lactobacillus fermentum Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. Probiotics Antimicrob Proteins. 2019;11(2):382-96. doi:10.1007/s12602-018-9406-y
18. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur Food Res Technol. 2008;226(5):1065-73. doi:10.1007/s00217-007-0632-x
19. Sorroche FG, Spesia MB, Zorreguieta A, Giordano W. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native Sinorhizobium meliloti isolates from Argentina. Appl Environ Microbiol. 2012;78(12):4092-101. doi:10.1128/AEM.07826-11
20. Krausova G, Hyrslova I, Hynstova I. In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. Fermentation. 2019;5(4):100. doi:10.3390/fermentation5040100

21. Sánchez L, Tromps J. Caracterización in vitro de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico. *Rev Salud Anim.* 2014;36(2):124-9.
22. Falah F, Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S, Mortazavi SA, et al. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. *Microb Pathog.* 2019;131:246-53. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.006
23. Colloca ME, Ahumada MC, López ME, Nader-Macías ME. Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. *Oral Dis.* 2000;6(4):227-33. doi:10.1111/j.1601-0825.2000.tb00118.x
24. Gao F, Sui L, Mu G, Qian F, Zhu X. Detección de posibles probióticos con actividad anti- *Helicobacter pylori* en heces infantiles mediante análisis de componentes principales. *Food Biosci.* 2021;42:101045. doi:10.1016/j.fbio.2021.101045
25. Barache N, Ladjouzi R, Belguesmia Y, Bendali F, Drider D. Abundance of *Lactobacillus plantarum* strains with beneficial attributes in blackberries (*Rubus* sp.), fresh figs (*Ficus carica*), and prickly pears (*Opuntia ficus-indica*) grown and harvested in Algeria. *Probiotics & Antimicro Prot.* 2020;12(4):1514-23. doi:10.1007/s12602-020-09632-z
26. Mendonça AA, Pinto-Neto W de P, da Paixão GA, Santos D da S, De Moraes MA, De Souza RB. Journey of the probiotic bacteria: survival of the fittest. *Microorganisms.* 2022;11(1):95. doi:10.3390/microorganisms11010095
27. Liu Z, Xu C, Tian R, Wang W, Ma J, Gu L, et al. Screening beneficial bacteriostatic lactic acid bacteria in the intestine and studies of bacteriostatic substances. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2021;22(7):533-47. doi:10.1631/jzus.B2000602
28. De Angelis M, Gobbetti M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics.* 2004;4(1):106-22. doi:10.1002/pmic.200300497
29. Guan N, Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(1):51-65. doi:10.1007/s00253-019-10226-1.
30. Hernández-Gómez JG, López-Bonilla A, Trejo-Tapia G, Ávila-Reyes SV, Jiménez-Aparicio AR, Hernández-Sánchez H. In vitro bile salt hydrolase (BSH) activity screening of different probiotic microorganisms. *Foods.* 2021;10(3):674. doi:10.3390/foods10030674
31. Li Y, Liu G, Liao N, Xu F, Wang J, Shao D, et al. Construction of walnut protein/tea polyphenol/alginate complex for enhancing heat and gastrointestinal tolerance of lactic acid bacteria. *Food Hydrocoll.* 2024;149:109523. doi:10.1016/j.foodhyd.2023.109523
32. Floris I, Battistini R, Tramuta C, Garcia-Vozmediano A, Musolino N, Scardino G, et al. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria from dairy products in northern Italy. *Antibiotics (Basel).* 2025;14(4):375. doi:10.3390/antibiotics14040375
33. Rodríguez J, Vázquez L, Flórez AB, Mayo B. Phenotype testing, genome analysis, and metabolic interactions of three lactic acid bacteria strains existing as a consortium in a naturally fermented milk. *Front Microbiol.* 2022;13:1000683. doi:10.3389/fmicb.2022.1000683
34. Song X, Li F, Zhang M, Xia Y, Ai L, Wang G. Effect of D-Ala-Ended peptidoglycan precursors on the immune regulation of *Lactobacillus plantarum* strains. *Front Immunol.* 2021;12:825825. doi:10.3389/fimmu.2021.825825
35. Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Sci.* 2020;29(3):654-69. doi:10.1002/pro.3819

36. Tynkkynen S, Singh KV, Varmanen P. Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (van) genes. *Int J Food Microbiol.* 1998;41(3):195-204. doi:10.1016/s0168-1605(98)00051-8
37. Stefańska I, Kwiecień E, Jóźwiak-Piasecka K, Garbowska M, Binek M, Rzewuska M. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria strains of potential use as feed additives - The basic safety and usefulness criterion. *Front Vet Sci.* 2021;8:687071. doi:10.3389/fvets.2021.687071
38. Merenstein D, Pot B, Leyer G, Ouwehand AC, Preidis GA, Elkins CA, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut Microbes.* 15(1):2185034. doi:10.1080/19490976.2023.2185034
39. Zeidan AA, Poulsen VK, Janzen T, Buldo P, Derkx PMF, Øregaard G, et al. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(Supp_1):S168-200. doi:10.1093/femsre/fux017
40. Zhao X, Tang F, Cai W, Peng B, Zhang P, Shan C. Effect of fermentation by lactic acid bacteria on the phenolic composition, antioxidant activity, and flavor substances of jujube–wolfberry composite juice. *LWT.* 2023;184:114884. doi:10.1016/j.lwt.2023.114884
41. Angelin J, Kavitha M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *Int J Biol Macromol.* 2020;162:853-65. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190
42. Blackberries. En: *Nutritional composition and antioxidant properties of fruits and vegetables* [Internet]. Academic Press; 2020 [citado 15 de marzo de 2026]. p. 407-22. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/chapter/edited-volume/pii/B9780128127803000258> doi:10.1016/B978-0-12-812780-3.00025-8
43. Lu Y, Jia C, Niu M, Xu Y, Zhao S. The *in-situ* dextran produced in rice protein yogurt: Effect on viscosity and structural characteristics. *Carbohydrate Polymers.* 2023;311:120767. doi:10.1016/j.carbpol.2023.120767
44. Amini E, Salimi F, Imanparast S, Mansour FN. Isolation and characterization of exopolysaccharide derived from *Lacticaseibacillus paracasei* AS20(1) with probiotic potential and evaluation of its antibacterial activity. *Lett Appl Microbiol.* 2022;75(4):967-81. doi:10.1111/lam.13771
45. Lugo-Zarate L, Delgado-Olivares L, Cruz-Cansino N del S, González-Olivares LG, Castrejón-Jiménez NS, Estrada-Luna D, et al. Blackberry juice fermented with two consortia of lactic acid bacteria and isolated whey: physicochemical and antioxidant properties during storage. *Int J Mol Sci.* 2024;25(16):8882. doi:10.3390/ijms25168882
46. Lugo-Zarate L, Jiménez-Osorio AS, González-Olivares LG, Pérez-Escalante E, Castañeda-Ovando A, Pedraza-Chaverri J, et al. Potential of whey protein-fortified blackberry juice in transporting and protecting lactic acid bacteria: A proteolytic profile analysis and antioxidant activity. *Fermentation.* 2025;11(5):252. doi:10.3390/fermentation11050252
47. Zhong H, Abdullah, Zhao M, Tang J, Deng L, Feng F. Probiotics-fermented blueberry juices as potential antidiabetic product: antioxidant, antimicrobial and antidiabetic potentials. *J Sci Food Agric.* 2021;101(10):4420-4427. doi:10.1002/jsfa.11083.

CAPÍTULO VI. Evaluar la capacidad antimicrobiana de la bebida fermentada sobre *H. pylori*, mediante pruebas de letalidad en medios líquidos y sólidos.

6.1. Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria patógena considerada un carcinogénico de tipo 1 por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La infección desencadena una inflamación gástrica crónica, que puede conducir al desarrollo de úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociada a la mucosa gástrica (1). Se estima que 8 de cada 10 pacientes que acuden al servicio de Gastroenterología del Hospital Juárez de México con gastritis son causados por *H. pylori* (2). Las primeras medidas para su control o erradicación son terapias combinadas de antibióticos como amoxicilina, metronidazol, claritromicina y levofloxacino. Sin embargo, su control se ha visto comprometido por la multirresistencia a la terapia farmacológica (3,4). Y un proceso de reinfección pone en riesgo a la erradicación.

Por ello, se han propuesto diferentes alternativas que permitan erradicar *H. pylori*. Como la adopción de tratamientos cuádruples sin bismuto, duales concomitantes y basados en levofloxacino (5), o la implementación de un tratamiento terapéutico basado en métodos moleculares de resistencia del microorganismo patógeno (6). Además, se sugiere el uso complementario con microorganismos con características probióticas (7).

En lo que respecta a la terapia con probióticos, el avance y la búsqueda de tratamientos alternativos ha permitido el análisis de diversas cepas de BAL con características bactericidas en esta infección. Se han reportado efectos positivos sobre la erradicación de *H. pylori* y en la modulación de la disbiosis causada por la infección (8,9). Sus efectos bactericidas están dados por la producción de metabolitos antimicrobianos, como el ácido láctico, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno.

Sin embargo, el uso de probióticos en la infección por *H. pylori* no está totalmente regulado. Se requieren mayores análisis y bases científicas que permitan comprender estos efectos bactericidas contra *H. pylori*. Permitiendo que este tipo de productos puedan ser utilizados como coadyuvantes en el tratamiento, con el objetivo de disminuir los efectos adversos de la terapia farmacológica.

Por lo anterior, en este capítulo se analizaron las propiedades bactericidas de la bebida de zarzamora fermentada con suero de leche y BAL, en modelos *in vitro* contra *H. pylori*. Cabe destacar que, para estos análisis, la muestra seleccionada por sus propiedades probióticas y bactericidas contra *E. coli* y *S. aureus*, fue el jugo C2 inoculado con las cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus*.

6.2. Metodología

6.2.1. Cultivos microbiológicos

Las cepas *L. rhamnosus* y *L. casei* fueron activadas a partir de una asada de cepa en criovial y se sembró mediante estriado en agar MRS incubado (Felisa FE-133D, Feligneo, México) a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se tomó una asada de las cepas activadas y se sembró en caldo MRS, incubando a 37 °C por 24 h. Estos cultivos frescos fueron usados para la inoculación en el jugo de zarzamora, en combinación con el suero de leche.

6.2.2. Obtención del jugo fermentado

El jugo fermentado con el consorcio C2 (*L. rhamnosus* y *L. casei*) se elaboró según la metodología descrita por Lugo-Zarate et al., 2024. Se utilizó un sustrato de jugo de zarzamora clarificado y termosonicado (17 minutos a 80% de amplitud) con suero de leche, para su posterior inoculación con 9 UFC/10 mL de las cepas de BAL y fermentado por 16 h a 37 °C. Además, se realizaron fermentaciones en monocultivo a partir de jugo de zarzamora con suero de leche (9 UFC/10 mL), inoculado con *L. casei* o *L. rhamnosus*, con un tiempo de fermentación de 16 h a 37° C.

6.2.3. Crecimiento y mantenimiento de *H. pylori*

Esta fase experimental se desarrolló en el laboratorio de investigación en microbiología y resistencia antimicrobiana del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Cabe destacar que los resultados derivaron en la formación de un recurso humano de grado licenciatura en colaboración y asesoría de la Dra. Norma Velázquez Guadarrama, quien cuenta con cepas ATCC y clínicas identificadas. Se usaron dos cepas de *H. pylori*: ATCC (43504 y 26695) y 4 cepas de aislamientos clínicos (F366F, 20A4, 124C y A360).

Se utilizó medio Casman enriquecido con 10% de sangre de carnero desfibrinada y envejecida (con un máximo de 5 meses después de su fecha de caducidad), suplementado con una mezcla de Skirrow (vancomicina 3 mg/mL, trimetoprim 5 mg/mL, anfotericina B 2 mg/mL y ácido nalidíxico 10 mg/mL). Para obtener el cultivo fresco, las cepas fueron activadas y sincronizadas en medio Casman e incubadas a 37 °C en condiciones de microaerofilia (atmósfera de CO₂ al 10% y 95% de humedad relativa) por 48 h en cada paso. Para identificar las cepas, se realizaron tinción de Gram, pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa, para verificar su pureza.

6.2.4. Pruebas de identificación para *H. pylori*

La identificación rápida de una cepa aislada de *H. pylori* se basa en sus características metabólicas y físicas, principalmente en la producción de enzimas como la catalasa, la oxidasa y la ureasa.

6.2.4.1. Tinción de Gram

Se utilizó la técnica establecida por la ficha técnica del kit de tinción Gram (Hycel), que consistió en la fijación con calor del inóculo o colonia en un portaobjetos y una primera tinción con violeta genciana dejando reposar por 1 min, posteriormente se cubrió con yodo por 1 min y se enjuagó con alcohol-acetona. Después, se realizó una segunda tinción con safranina, se dejó reposar por 1 min, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar al aire para posteriormente observar en un microscopio óptico (LOMO, BMH4-BF, Rusia) a 100X. Se reportó la presencia y pureza del cultivo de *H. pylori* a la tinción Gram negativa (color rojo) y de forma de bastoncillo.

6.2.4.2. Prueba de oxidasa

Esta prueba permite identificar *H. pylori* mediante la actividad de oxidasa, que muestra un cambio de color a azul oscuro en contacto con el reactivo. Para esta prueba se tomó del cultivo celular activo una asada y se colocó en un papel filtro estéril, posteriormente se colocó una gota del reactivo *N,N,N',N'*-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) (Becton Dickinson).

6.2.4.3. Prueba de catalasa

La enzima catalasa está presente en *H. pylori*, esta enzima hidroliza el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, liberando burbujas. La metodología consistió en tomar una colonia de la bacteria y colocarla en un portaobjetos. Posteriormente, se agregó una gota de H₂O₂ al 3% y se observó la formación o ausencia de burbujas. Se reportó como un resultado positivo la formación de burbujas (+) y como negativo la ausencia de ellas (-).

6.2.4.4. Prueba de ureasa

Esta prueba permite la detección de la enzima ureasa producida por *H. pylori* que descompone la urea en amoníaco y dióxido de carbono, aumentando el pH y cambiando de color del reactivo a rosado-rojo. Se preparó el agar urea de Christensen y se distribuyó en microtubos de 1 mL. Del cultivo celular activo se tomó una asada y por punción se introdujo en el agar, seguido de su incubación a 37 °C por 10 min. Se distinguió por cambio de color como ureasa positiva.

6.2.5. Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de dilución en agar (CLSI 2024). Se utilizó metronidazol como estándar de referencia a diferentes diluciones: 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16 y 8 µg/mL. Se prepararon 6 mL de medio Casman a una concentración de 2X para obtener la consistencia adecuada de agar sólido cuando se agregan 6 mL de las diluciones del jugo fermentado C2 (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:100 y 1:1000).

Posteriormente, del crecimiento fresco de *H. pylori* se obtuvo la biomasa con asa bacteriológica y se resuspendió en 5 mL agua estéril para obtener una concentración 2 del nefelómetro McFarland. De esta solución se tomaron 10 µL para inocular en cada placa con la mezcla de Skirrow y con las muestras fermentadas en placa con las diluciones seriadas. Las placas se incubaron a 37 °C en microaerofilia por 48 horas.

La CMI se definió como la menor concentración del compuesto donde no se observó crecimiento visible de *H. pylori*.

6.2.6. Cinética de muerte de *H. pylori* en medio líquido

La cinética de muerte se realizó por la metodología de microdilución en caldo, con ligeras modificaciones (10). Se determinó la actividad bactericida de *H. pylori* en presencia de las muestras fermentadas en monocultivo a diferentes diluciones, relacionados con la CMI: *L. rhamnosus* en dilución 1:4 y *L. casei* en dilución 1:16 y el consorcio C2 (*L. rhamnosus* y *L. casei*) en diluciones 1:100 y 1:1000. Se utilizaron dos controles negativos: muestras de jugo fermentado sin inóculo de BAL (C-) y caldo brucella suplementado (1% de β-ciclodextrina y 10% de suero fetal bovino). Como control positivo, se usó metronidazol a la CMI obtenida anteriormente (128 µg/mL).

Para este ensayo, se utilizó el cultivo fresco de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*, a una concentración 2 del nefelómetro de McFarland disuelta en caldo Brucella suplementado, permitiendo un ambiente más enriquecido y adecuado para *H. pylori*.

Los tubos se prepararon como se describe a continuación: 200 µL de la concentración 2 de McFarland de *H. pylori* y 1800 µL de la dilución de las muestras probadas. Los tubos se incubaron (SANYO, MCO-19AIC, Japón) en agitación a 80 rpm a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Se tomó un tubo diferente por cada hora de la cinética (0, 1, 2, 6, 24 y 48 h) y se midió la absorbancia a 600 nm (Epoch® Biotek, Santa Clara, CA, USA) de 100 µL suspensión.

Posteriormente, se sembró directamente en placa 100 µL en agar Casman y se determinó la cuenta viable por la metodología de microgota en placa (11). Para ello se fijaron 10 µL en un portaobjetos para realizar tinción de Gram y se conservaron 150 µL

de la preparación del tubo en 500 µL de TRIZOL® almacenados a -20°C para su posterior extracción de RNA.

6.2.7. Cuantificación relativa de cDNA de *H. pylori*

Para la extracción de RNA se siguió la metodología de Invitrogen para RNA. El RNA se cuantificó y se realizó un tratamiento con DNAsa, con la metodología descrita por el kit distribuido por ThermoCientific (kit EN0525) cuantificando nuevamente el RNA.

Posteriormente, se sintetizó cDNA a partir del RNA tratado con DNAsa del kit Jena Bioscience (PCR-511S) para la cuantificación de cDNA obtenido. Se prepararon diluciones del cDNA para obtener una concentración de 100 ng/µL y se realizó la RT-qPCR para amplificar el gen 16S de *H. pylori*. Se agregaron 7.5 µL de Master Mix de Jena Bioscience, 4 pmol del iniciador Forward (TCG GAA TCA CTG GGC GTA A), 4 pmol de iniciador Reverse (TTC TAT GGT TAA GCC ATA GGA TTT CAC), 300 ng de cDNA y H₂O–DEPC (pirocarbonato de dietilo), para completar un volumen de 15 µL.

Se realizaron 30 ciclos en el termociclador (ARIA MX) con tiempos de 15 segundos a 95 °C, 20 segundos a 60 °C y 10 segundos a 72 °C. Una curva patrón se realizó la cuantificación absoluta de acuerdo con la metodología descrita por Gomez-Ramirez et al., 2023 (12).

6.2.8. Cinética de muerte de *H. pylori* en simulación gástrica *in vitro*

Se determinó la actividad bactericida de *H. pylori* en simulación de condiciones gástricas con las siguientes muestras: monocultivo *L. rhamnosus* o *L. casei* y el consorcio C2 (*L. rhamnosus* + *L. casei*). Como controles negativos se usaron las muestras de jugo no fermentado (C-) y de jugo gástrico (solución salina estéril al 5%, pH 2 y 3 g/L de pepsina). Como controles positivos, se utilizaron metronidazol (128 µg/mL), amoxicilina (0.015 µg/mL) y su combinación: metronidazol/amoxicilina (128/0.015 µg/mL). Cabe destacar que para este ensayo se agregó la amoxicilina con el objetivo de tener una terapia farmacológica más cercana a las utilizadas para el tratamiento de la infección.

En lo que respecta a la cepa de *H. pylori*, para este ensayo se usó el cultivo fresco de la cepa ATCC 43504 a una concentración de 2 del nefelómetro de McFarland, disuelto en caldo Brucella suplementado con 1% de β-ciclodextrina y 10% de suero fetal bovino.

Los tubos se prepararon como se describe a continuación: 200 µL de la concentración 2 del nefelómetro McFarland de *H. pylori*, adicionando 1.6 mL de la solución de jugo gástrico y 200 µL de la muestra a probar.

Se prepararon tubos independientes para cada tiempo de análisis, los cuales fueron incubados en agitación a 80 rpm a 37 °C en condiciones de microaerofilia (atmósfera de CO₂ al 10% y humedad). Se tomó un tubo diferente por cada hora de la cinética (0, 2, 3 y 6 h); se midió la absorbancia de 100 µL de suspensión a 600 nm en un lector de microplacas (Epoch® Biotek, Santa Clara, CA, USA). Se realizó la siembra directa en placa de 100 µL en agar Casman, además de la determinación de la cuenta viable por la metodología de microgota en placa de agar Casman, y se fijaron 10 µL en un portaobjetos para realizar tinción de Gram.

6.2.9. Cinética de muerte de *H. pylori* en simulación gástrica *in vitro* en combinación con antibióticos

Se siguió el mismo diseño experimental de la cinética de muerte en simulación gástrica *in vitro*, pero las muestras a comparar se mezclaron con los antibióticos de referencia como a continuación se especifica:

- a. *L. casei*, o *L. rhamnosus*, o C2 con metronidazol (128 µg/mL)
- b. *L. casei*, o *L. rhamnosus*, o C2 con amoxicilina (0.015 µg/mL)
- c. *L. casei*, o *L. rhamnosus*, o C2 con metronidazol/amoxicilina (128/0.015 µg/mL)
- d. Controles: metronidazol (128 µg/mL), amoxicilina (0.015 µg/mL) y metronidazol/amoxicilina (128/0.015 µg/mL).
- e. Control de crecimiento: *H. pylori*

6.2.10. Actividad bactericida en medio sólido

La actividad en medio sólido se determinó mediante la siembra del cultivo de *H. pylori* en placa, simulando la adhesión a la superficie y posterior contacto con la muestra digerida a probar. Las muestras a probar fueron las fermentaciones en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) y en consorcio C2 (*L. casei* y *L. rhamnosus*). Como controles negativos, se usaron el jugo C- (sin inóculo) y el jugo gástrico sin muestra; como controles positivos, se usaron los antibióticos metronidazol (128 µg/mL) y amoxicilina (0.15 µg/mL).

Como primer paso, se tomó el cultivo fresco de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* y se realizó una suspensión al 0.5 del nefelómetro de McFarland en agua estéril, se inocularon 250 µL de la suspensión en placas de agar Casman y se dejaron incubar por 48 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia (atmósfera de CO₂ al 10% y humedad).

Por otro lado, se prepararon las muestras fermentadas y antibióticos con la solución de jugo gástrico colocando 5.4 mL del jugo gástrico y 0.6 mL de la muestra a probar. Se prepararon tubos independientes por cada hora (0, 2 y 4 horas) y se

llevaron a incubación a 37 °C en agitación de 80 rpm, en condiciones de microaerofilia (atmósfera de CO₂ al 10% y humedad).

Después de cada tiempo de incubación se tomó un tubo, y una alícuota de 10 µL se colocó en la placa con el crecimiento de 48 horas de *H. pylori*. Esas placas fueron incubadas en las mismas condiciones por 24 y 48 h.

6.3. Resultados

6.3.1. Concentración mínima inhibitoria

Se determinó la CMI de las bebidas fermentadas en monocultivo y cocultivo mediante diluciones seriadas (1:4 a 1:1000) para inhibir el crecimiento de diferentes cepas de *H. pylori* (Tabla 6.1). En lo que respecta a las muestras fermentadas en monocultivo, la dilución 1:16 de *L. rhamnosus* y *L. casei* inhibieron la mayoría de las cepas a excepción de la ATCC 43504 para *L. rhamnosus*. En el jugo fermentado con el consorcio C2, no se observó la presencia de colonias de *H. pylori* en ninguna de las diluciones probadas, por lo que se probó a una dilución 1:1000, observándose crecimiento. Mientras que en el control C- (jugo sin inóculo de BAL), la muestra sin diluir solo fue eficaz contra 4 cepas clínicas (20A5, 26695, 124C y A360). En el control de metronidazol se observó ausencia de colonias de la cepa ATCC y de la 20A5 a la concentración de 128 µg/mL, y en las cepas clínicas F366, 26695 y 124C la CMI fue de 8 µg/mL.

Tabla 6.1 Concentración mínima inhibitoria del jugo de zarzamora fermentada contra *H. pylori* en monocultivo y cocultivo.

Muestra	ATCC 43504	F366	20A5	26695	124C	A360
<i>L. rhamnosus</i>	1:4	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
<i>L. casei</i>	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
C2	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500	1:500
C-	SI	SI	D	D	D	D
Metronidazol µg/mL	128	8	128	8	8	<1

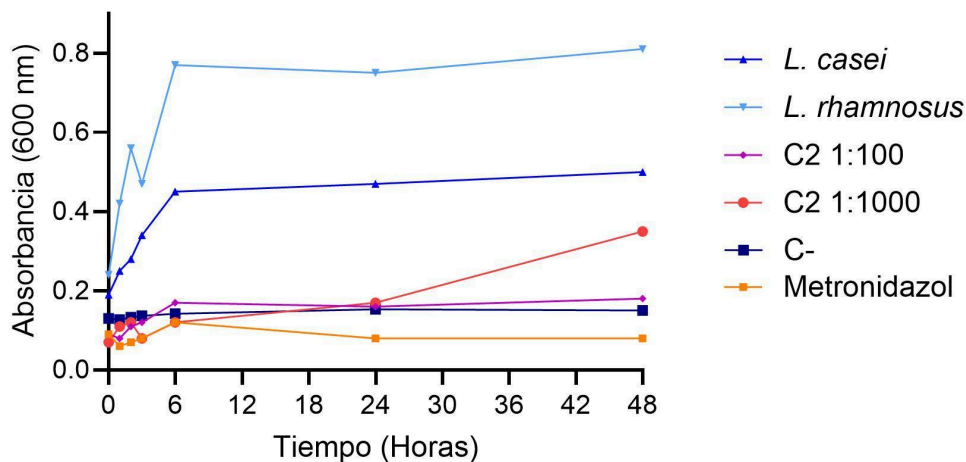
C2: Consorcio 2 (*L. rhamnosus* y *L. casei*); SI: Sin Inhibición; D: directo.

A partir de estos resultados, los siguientes experimentos se realizaron con la cepa ATCC, la cual mostró ser resistente al metronidazol, y las CMI de las muestras en

monocultivo y cocultivo fueron iguales a los valores de la CMI para cepas clínicas de *H. pylori*.

6.3.2. Cinética de muerte en medio líquido

Se realizó una cinética de muerte por 48 h, midiendo la densidad óptica (OD), cuenta viable en placa de *H. pylori* y tinción de Gram para verificar su presencia o ausencia, así como su morfología. En lo que respecta a la OD, la turbidez aumentó significativamente ($p < 0.05$) en todas las muestras fermentadas y C- a las 48 horas con respecto a la hora 0, con valores de 0.15 a 0.81 de absorbancia (abs). Las muestras fermentadas con los monocultivos tuvieron comportamientos similares (Figura 7.1). *L. rhamnosus* mostró un aumento significativo a las 2 y 6 horas con abs de 0.42 y 0.77, respectivamente, mientras que *L. casei* a las 6 horas registró un valor de absorbancia de 0.45 durante el ensayo. La absorbancia del cocultivo C2 aumentó significativamente a las 48 horas (0.35) en la dilución 1:1000. En cambio, el metronidazol no mostró cambios significativos en las diferentes horas de incubación (0.6 a 0.8 abs).



Muestra	0 h	1 h	2 h	3 h	6 h	24 h	48 h
<i>L. casei</i>	A, d	C, cd	C, ab	B, b	B, a	B, a	B, a
<i>L. rhamnosus</i>	A, d	A, cd	A, bc	A, cd	A, ab	A, ab	A, a
C2 1:100	B, b	DE, b	DE, b	C, b	C, a	C, a	CD, a
C2 1:1000	B, d	D, c	D, c	C, d	D, c	C, b	BC, a
C-	A, e	B, de	B, cd	B, cd	B, c	A, b	A, a
Metronidazol	B, ab	E, b	F, b	C, ab	D, a	C, ab	D, a

Figura 6.1 Densidad óptica del jugo de zarzamora fermentado en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) y en cocultivo (C2: *L. casei* + *L. rhamnosus*) contra *H. pylori*. ^{a-e} Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes horas por muestra, ^{A-F} letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las muestras por cada hora de análisis.

En cuanto a la cuenta viable de *H. pylori* (Tabla 6.1) todas las muestras tuvieron una cuenta inicial de 8.05 UFC/mL. A partir de la hora 2 de incubación, se observó un incremento ligero significativo en el control del crecimiento (CC) y una disminución (de 8.6 ± 0.05 en la hora 3 hasta 7.7 ± 0.1), mientras que en las muestras C2 1:1000 el aumento fue a partir de la primera hora (9.4 ± 0.2 Log UFC/mL), con un descenso significativo en la segunda hora (8.7 ± 0.2).

Al comparar los cambios en cada muestra durante el tiempo del experimento, en las muestras C2 1:100 y C2 1:1000 no se identificaron colonias de *H. pylori* a partir de la hora 3, debido al crecimiento de las BAL. Este mismo efecto se presentó en los fermentados en monocultivo (*L. casei* y *L. rhamnosus*) desde la hora 0, imposibilitando su conteo por el enmascaramiento de las colonias de *H. pylori*.

El jugo sin inóculo C- no mostró cambios significativos, mientras que el metronidazol a la hora 3 reportó su mayor recuento de *H. pylori* (8.2 UFC/mL) y en las horas subsiguientes (6, 24 y 48 h) no se detectaron colonias del microorganismo (Tabla 6.2).

Tabla 6.2 Cuenta viable de *H. pylori* (Log UFC/mL) en presencia de jugo fermentado con BAL.

Muestra	Incubación (horas)						
	0	1	2	3	6	24	48
CC	$8.09 \pm 0.1^{A,b}$	$8.05 \pm 0.2^{B,b}$	$8.1 \pm 0.1^{AB,ab}$	$8.6 \pm 0.1^{A,a}$	$8.1 \pm 0.1^{A,ab}$	7.7 ± 0.1^b	8.2 ± 0.3^{ab}
C2 1:100	$8.1 \pm 0.3^{A,a}$	$8.3 \pm 0.3^{B,a}$	$7.7 \pm 0.2^{B,a}$	NI	NI	NI	NI
C2 1:1000	$8.1 \pm 0.3^{A,c}$	$9.4 \pm 0.2^{A,a}$	$8.7 \pm 0.2^{A,b}$	NI	NI	NI	NI
C-	$8.1 \pm 0.4^{A,a}$	$7.9 \pm 0.1^{B,a}$	$7.4 \pm 0.5^{B,a}$	$7.6 \pm 0.1^{C,a}$	$7.7 \pm 0.02^{B,a}$	NI	NI
MTZ	$7.9 \pm 0.3^{A,b}$	$7.9 \pm 0.1^{B,b}$	$7.9 \pm 0.1^{B,ab}$	$8.2 \pm 0.1^{B,a}$	ND	ND	ND

C2: Consorcio 2 (*L. casei* y *L. rhamnosus*). **CC:** Control de crecimiento. **ND:** no detectado. **NI:** No identificado por crecimiento de BAL. **MTZ:** Metronidazol. ^{A-C} Letras mayúsculas diferentes muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes muestras en la misma hora. ^{a-c} Letras minúsculas diferentes muestran diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes horas por cada muestra.

En relación con los resultados antes expuestos, en la figura 6.2 se observan las imágenes de las tinciones en el microscopio, así como la evaluación semi cuantitativa del número de células de *H. pylori* detectadas visualmente en los campos de observación al 100X.

Al inicio del análisis se observaron en todas las muestras >10 células/campo (+++), a excepción de la muestra con metronidazol, las cuales fueron incontables hasta la primera hora. Posteriormente, en la tercera hora de incubación, la muestra en

co-cultivo C2 1:100 y las fermentaciones en monocultivo (*L. casei* y *L. rhamnosus*), disminuyó el número de células (5-8 células/campo) observado.

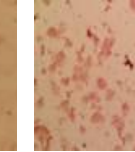
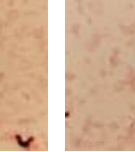
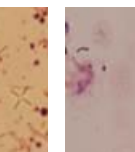
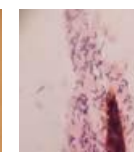
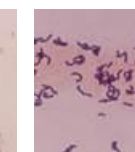
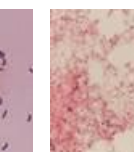
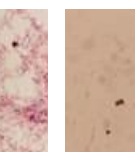
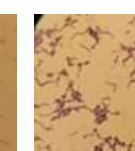
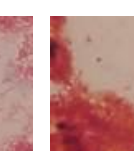
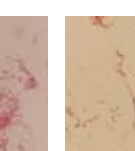
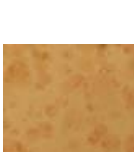
Muestra	Incubación (horas)					
	0	1	3	6	24	48
CC						
	+++	+++	+++	+++	++++	++++
C2 1:100						
	+++	+++	++	++	-	-
C2 1:1000						
	+++	+++	+++	+++	-	-
<i>L. casei</i>						
	+++	+++	++	+/-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>						
	+++	+++	++	++	-	-
C- Jugo						
	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Metronidazol						
	++++	++++	+++	+	-	-

Figura 6.2 Micrografías y análisis semicuantitativo de la actividad antimicrobiana contra *H. pylori* en un medio líquido. CC: control de crecimiento. C2: jugo de zarzamora fermentado con el consorcio 2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*). C-: jugo de zarzamora fermentado sin inóculo. Número de células de *H. pylori* observados por campo +: 1-4/campo, ++: 5-8/campo, +++: >10/campo, ++++: incontables/campo, +/-: se observó a *H. pylori* en una sola repetición.

En la hora 6 en la muestra de metronidazol aún se apreció la presencia de *H. pylori* aunque en el ensayo anterior no se apreció su crecimiento por colonias en placa, estas células tenían una forma pleomórfica (alas de gaviota) característica del patógeno.

En las horas 24 y 48 ya no se visualizaron células de *H. pylori* en las muestras de metronidazol, C2 1:100, *L. casei* y *L. rhamnosus*, mientras que en C2 1:1000, el C- y el CC se identificaron y contabilizaron células (>10 células/campo).

En lo que respecta a la presencia de los bacilos Gram positivos, correspondientes a las BAL, en las muestras fermentadas C2 1:100, *L. casei* y *L. rhamnosus* se observó un aumento sobre la densidad de bacilos en el campo de observación después de las 6 horas del ensayo.

6.3.3. Cuantificación de cDNA de *H. pylori* mediante RT-qPCR.

Para comprobar los efectos bactericidas de *H. pylori* en los ensayos metodológicos anteriores se realizó la cuantificación del cDNA correspondiente a *H. pylori*, en las muestras analizadas de la cinética de muerte en medio líquido en las horas 0, 4 y 6.

Al comparar el tiempo 0 con las 6 horas de las muestras C2 y C2 1:100 se apreció un aumento en el ciclo de cuantificación, con valores de 19.54 a 27.58 y de 14.1 a 22.03, respectivamente. Lo que indica menor concentración del material genético de *H. pylori*. En las muestras C2 1:1000 y C-, no se observaron diferencias en los tres tiempos, mientras que en el tratamiento con metronidazol a las 4 horas se vio disminuida la carga de *H. pylori*, pero a la hora 6 aumentó significativamente.

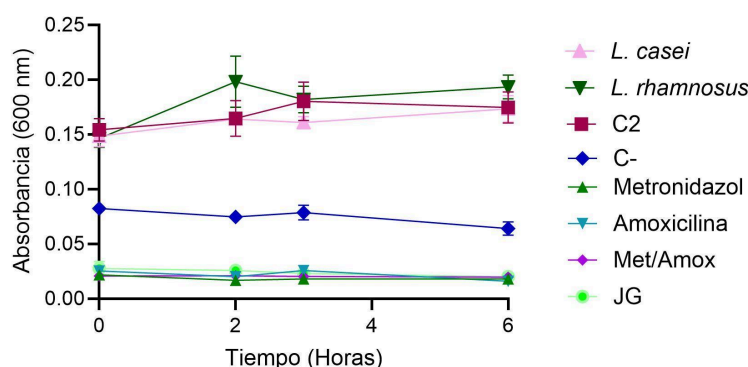
Tabla 6.3 Viabilidad de *H. pylori* en un ensayo de cinética de muerte en contacto con jugo fermentado con BAL.

Muestra	Tiempo de fermentación (horas)								
	0			6			24		
	Cq	Ng cDNA	N° Mol	Cq	Ng cDNA	N° Mol	Cq	Ng cDNA	N° Mol
C2	16.2±0.6 ^{BC,c}	0.14	1.73x10 ⁹	24.1±1.2 ^{AB,b}	0.006	7.3x10 ⁸	27.58±2.7 ^{A,a}	0.0005	5.9x10 ⁶
C2 1:100	14.1±0.3 ^{BC,b}	6.66	7.9x10 ¹¹	19.29±5 ^{B,ab}	0.17	20.7x10 ⁹	22.03±1.5 ^{B,a}	0.024	2.99x10 ⁸
C2 1:1000	12.9±1.8 ^{C,c}	1.35	1.6x10 ¹¹	18.79±0.1 ^{B,a}	0.24	2.9x10 ⁹	16.92±1.5 ^{C,b}	0.91	1.71x10 ¹¹
C-	28.05±1.1 ^{A,a}	0.0003	4.3x10 ⁶	28.4±1.1 ^{A,a}	0.0009	3.2x10 ⁶	26.8±2.2 ^{A,a}	0.002	9.9x10 ⁶
MTZ	17.07±2.8 ^{B,a}	0.08	9.8x10 ⁹	20.26±2.6 ^{B,a}	0.08	1.04x10 ¹⁰	16.21±0.3 ^{C,a}	1.50	1.8x10 ¹⁰
CC	28.41±1.3 ^{A,a}	0.0002	3.3x10 ⁶	22±1.5 ^{B,b}	0.02	3.05x10 ⁹	12.44±1.7 ^{C,c}	21.51	2x10 ¹¹

C2: consorcio 2 inoculado con *L. casei* y *L. plantarum*; **C-:** jugo sin inóculo; **CC:** control de crecimiento de *H. pylori*; **cDNA:** ADN complementario; **Cq:** umbral de cuantificación (número de ciclo en el que hay detección); **MTZ:** metronidazol. ^{A-C} Letras mayúsculas superíndices diferentes muestran diferencia significativa (p<0.05) entre las diferentes muestras en la misma hora. ^{a-c} Letras minúsculas superíndices diferentes muestran diferencia significativa (p<0.05) entre las diferentes horas por cada muestra.

6.3.4. Cinética de muerte en simulación gástrica

Para probar la actividad antimicrobiana de las bebidas fermentadas con BAL en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*), co-cultivo (*L. casei* + *L. rhamnosus*) y antibióticos (metronidazol o amoxicilina y su mezcla), se realizó una cinética de muerte en un medio de simulación en jugo gástrico. La densidad óptica de las muestras fermentadas con los monocultivos tuvo un aumento significativo, con valores iniciales de 0.14 a 0.18 de abs a las 6 h, en promedio (Figura 6.3). Las muestras C2, metronidazol, MTZ/AMX y JG, su abs no se vio modificada en los diferentes tiempos de incubación.



Muestra	0 h	2 h	3 h	6 h
<i>L. casei</i>	A, b	B, ab	A, ab	A, a
<i>L. rhamnosus</i>	A, b	A, a	A, ab	A, a
C2	A, a	B, a	A, a	A, a
C-	B, a	C, ab	B, a	B, b
Metronidazol	C, a	D, b	C, ab	C, ab
Amoxicilina	C, a	D, b	C, a	C, b
Metr/Amox	C, a	D, a	C, a	C, a
JG	C, a	D, a	C, a	C, a

Figura 6.3 Densidad óptica del jugo de zarzamora fermentado en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) y en cocultivo (C2: *L. casei* + *L. rhamnosus*) contra *H. pylori* en una simulación de digestión gástrica. ^{a-b} Letras minúsculas indican diferencia significativa entre las diferentes horas por muestra, ^{A-D} letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre las muestras por cada hora de análisis.

En la cuenta viable de *H. pylori*, se observó mayor crecimiento de las BAL en el medio, aun cuando este estaba preparado con antibióticos (vancomicina), debido a que en el capítulo V se reportó la resistencia a la vancomicina por las BAL utilizadas. Por ello, se realizaron tinciones de Gram, analizadas mediante una escala semicuantitativa del número de bacterias de *H. pylori* por campo de visión a 100X.

En la hora 0 (Figura 6.4), se detectó la misma densidad de Gram negativos (>10 células/campo) en todas las muestras, a excepción del JG + *H. pylori* (5-8/campo). En las siguientes horas la cantidad de *H. pylori* disminuyó gradualmente la presencia de bacilos curvos hasta la hora 6, en donde las muestras fermentadas con *L. casei*, *L. rhamnosus*,

AMX y en el control con JG se observaron de 1-4 células/campo. La presencia de *H. pylori* no fue clara entre las repeticiones en C2 y MTZ (una de las repeticiones se observó la presencia de una célula del patógeno). Finalmente, en la mezcla de antibióticos (MTZ/AMX) a las 6 h se apreció la eliminación total de *H. pylori*.

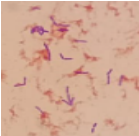
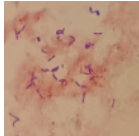
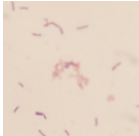
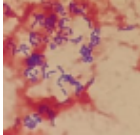
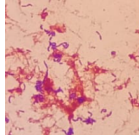
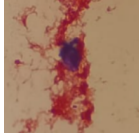
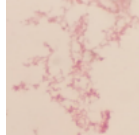
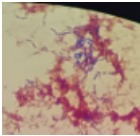
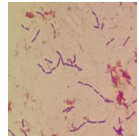
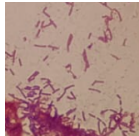
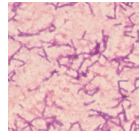
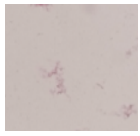
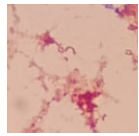
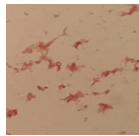
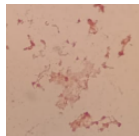
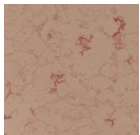
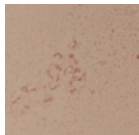
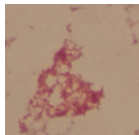
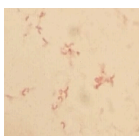
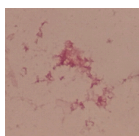
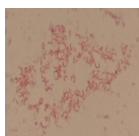
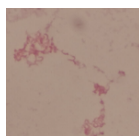
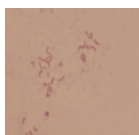
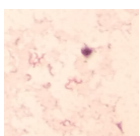
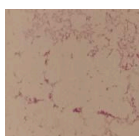
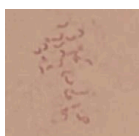
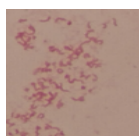
Muestra	Incubación (horas)			
	0	2	3	6
C2	 +++	 ++	 +	 +/-
<i>L. casei</i>	 +++	 ++	 ++	 +
<i>L. rhamnosus</i>	 +++	 ++	 ++	 +
C-	 +++	 +++	 +++	 ++
Jugo gástrico	 ++	 ++	 +	 +
Amoxicilina	 +++	 ++	 +	 +
Metronidazol	 +++	 ++	 +	 +/-
Metro/Amox	 +++	 ++	 +	 +

Figura 6.4. Micrografías y análisis semicuantitativo de la actividad antimicrobiana contra *H. pylori* en la simulación de digestión *in vitro*. CC: control de crecimiento. C2: jugo de zarzamora fermentado con el consorcio 2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*). C-: jugo de zarzamora fermentado sin inóculo. Número de células de *H. pylori* por campo +: 1-4/campo, ++: 5-8/campo, +++: >10/campo, ++++: incontables/campo, +/-: se observó a *H. pylori* en una sola repetición.

6.3.5. Cinética de muerte en simulación gástrica en mezcla con antibióticos

Se determinaron las propiedades bactericidas de las bebidas fermentadas en combinación con cada uno de los antibióticos (MTZ o AMX) o con ambos (MTZ/AMX) (Tabla 6.4). Se observó una disminución rápida de la presencia de bacilos Gram negativos (1-4 células/campo), correspondientes a la morfología de *H. pylori* después de las 2 horas de incubación en todas las muestras fermentadas con BAL en monocultivo o cocultivo, a excepción del jugo con *L. rhamnosus* + AMX (5-8 células/campo). A las 4 horas de incubación, en la muestra C2 en combinación con MTZ, no se detectó *H. pylori* en los frotis teñidos. Sin embargo, al combinar el C2 con AMX o con la combinación de antibióticos, se indujeron formas cocoides del microorganismo. Este mismo comportamiento se identificó en las demás muestras fermentadas a excepción de *L. rhamnosus* + MTZ. Finalmente, en el jugo de zarzamora sin inóculo (C-), en combinación con los diferentes antibióticos, se mostró una disminución progresiva de *H. pylori*.

Tabla 6.4. Análisis semicuantitativo de la inhibición de *H. pylori* por la actividad de las bebidas fermentadas en combinación con antibióticos.

Muestra	Incubación (horas)		
	0	2	4
C2 + AMX	+++	++	Fc
C2+MTZ	+++	+	-
C2+AMX/MTZ	+++	+	Fc
<i>L. casei</i> +AMX	+++	+	Fc
<i>L. casei</i> +MTZ	+++	+	Fc
<i>L. casei</i> +AMX/MTZ	+++	+	Fc
<i>L. rhamnosus</i> +AMX	+++	++	+
<i>L. rhamnosus</i> +MTZ	+++	+	Fc
<i>L. rhamnosus</i> +AMX/MTZ	+++	+	Fc
C-+AMX	+++	++	+
C-+MTZ	+++	++	+
C-+AMX/MTZ	+++	++	+
CC	+++	+++	+++

C2: jugo de zarzamora fermentado con el consorcio 2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*). **C-:** jugo de zarzamora fermentado sin inóculo. **CC:** control de crecimiento. **AMX:** Amoxicilina. **MTZ:** Metronidazol. **Fc:** Forma cocoide. Número de células de *H. pylori* observados por campo +: 1-4/campo, ++: 5-8/campo, +++: >10/campo.

6.3.6. Actividad bactericida en medio sólido

Se realizó un ensayo con *H. pylori* adherido a una superficie en medio Cassman sólido, posterior a su crecimiento por 48 horas, agregando la muestra a probar posterior al proceso de digestión gástrica a las 0, 2 y 4 horas (Figura 6.5). Las muestras que se analizaron fueron los digeridos gástricos del jugo fermentado con el cocultivo C2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*), el jugo sin inóculo (C-), los antibióticos MTZ y AMX, así como su combinación (MTZ + AMX) y el control del jugo gástrico sin inóculo.

A las 0 horas se observó una mayor lisis de *H. pylori* en todas las muestras. Adicionalmente, en el jugo C2 se apreció el crecimiento de colonias bacterianas correspondientes a BAL. Este efecto bactericida permaneció ligeramente hasta la hora 2 para todas las muestras y en la hora 4 la actividad bactericida se perdió en todas las muestras a excepción del co-cultivo C2, observando mayor densidad de un crecimiento de BAL.

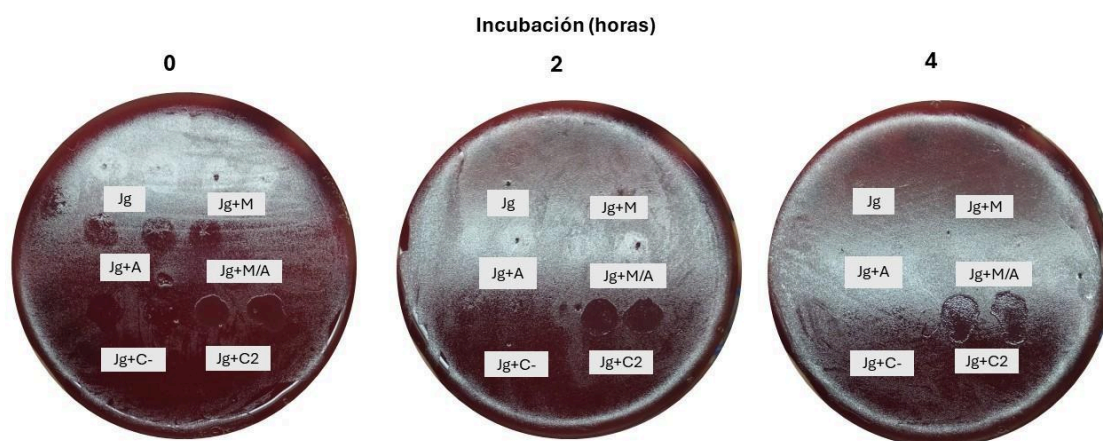


Figura 6.5 Actividad antimicrobiana del jugo fermentado digerido a diferentes tiempos contra *H. pylori*. Jg: Jugo gástrico. Jg+M: Jugo gástrico+metronidazol. Jg+A: Jugo gástrico+amoxicilina. Jg+M/A: Jugo gástrico+metronidazol/amoxicilina. Jg+C-: Jugo gástrico + jugo sin inóculo. Jg+C2: Jugo gástrico + jugo inoculado con *L. casei* y *L. rhamnosus*.

6.4. Discusión

En este capítulo se determinaron las propiedades antimicrobianas/bactericidas *in vitro* contra *H. pylori* de los jugos de zarzamora, fermentados con las BAL en monocultivo y cocultivo C2, en comparación con jugo sin inóculo bacteriano (C-) y los tratamientos con los antibióticos MTZ y AMX. Se observó la capacidad bactericida de las muestras fermentadas durante 0 a 48 h. A partir de la hora cero en los diferentes ensayos, permitiendo demostrar sus propiedades probióticas anteriormente analizadas (Ver capítulo V).

La CMI para las cepas ATCC (43504) y clínicas (F366, 20A5, 26695, 124C y A360) de las bebidas fermentadas fue en las diluciones 1:4 y 1:16. En el monocultivo *L. rhamnosus*, de 1:16 para *L. casei*, y de 1:500 para el consorcio C2, mostrando mayor efectividad bactericida del C2 a menor concentración. El inóculo directo sin dilución en el C- inhibió algunas cepas clínicas (20A5, 26695, 124C y A360), lo cual indica menor capacidad para inhibir *H. pylori*. El MTZ inhibió en concentraciones de 128 µg/mL para la cepa ATCC y 20A5. Las propiedades antimicrobianas de las muestras fermentadas se evaluaron mediante una cinética de muerte para *H. pylori*, lo cual se relacionó con la disminución del número de colonias, presencia de células en los frotis y menor concentración de cDNA. Esto se observó en los tratamientos con las muestras fermentadas en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) y en el consorcio C2 1:100 (*L. casei* + *L. rhamnosus*).

Las propiedades antibacterianas de las muestras fermentadas pueden deberse a la producción de diferentes metabolitos sintetizados por las BAL. Uno de ellos es el ácido láctico, que puede inhibir la actividad de la ureasa (13). Al respecto, Huang et al., (2021) reportaron que cuando *H. pylori* fue incubado con el sobrenadante libre de células y las BAL viables de *Lactobacillus* aislados de diferentes fuentes de alimentos, disminuyó la actividad de la ureasa en un 78 y 64.4 % (14). Mientras que en dos cepas de *L. plantarum* aisladas de heces, a las 4 horas de incubación inhibió en un 55.9 % a 55.33 % la actividad de la ureasa, y se identificaron sustancias con potencial antibacteriano como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno y proteínas. Por medio de las micrografías se determinó que el posible mecanismo de acción es por la destrucción de la pared celular (15). En cambio, en el aislado de la cepa *L. pentosus* LPS16 de bambú y posteriormente fermentado por 24 horas en caldo MRS, mostró actividad bactericida relacionada con el contenido de ácido láctico (0.06 g/100 g) en las cepas ATCC 43504 y J99 de *H. pylori* (16).

Los mecanismos de acción de los metabolitos antes mencionados contra *H. pylori* aún no son claros, pero se sabe que el ácido láctico y los ácidos grasos de cadena corta actúan como transportadores de protones, reducen el pH del citoplasma y comienzan a acumular aniones tóxicos que previenen la colonización (17). Mientras que el peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que daña las proteínas, los lípidos y el ADN de *H. pylori* (18).

El análisis realizado anteriormente en las cinéticas de muerte, sobre la disminución de la viabilidad de *H. pylori* se pudo corroborar con la identificación y cuantificación del cDNA de *H. pylori*, observando la misma tendencia a la disminución de la presencia del patógeno con respecto al tiempo, principalmente en las muestras del C2 (sin dilución) y C2 1:100, mientras que en la muestra C2 1:1000 en la hora 24 hubo un

aumento de 0.67 ng cDNA, en comparación con la hora 6. Y sobre el tratamiento con metronidazol presentó valores de 4.36 ng de cDNA a la hora 0 h, disminuyendo a 1.29 ng cDNA a 24 h. Este tipo de análisis de bebidas fermentadas es escaso y se ha observado un mayor número de análisis sobre la caracterización total de la microbiota en pacientes con diferentes tratamientos. Por ejemplo, en pacientes diagnosticados con *H. pylori*, tratados con terapia cuádruple (tetraciclina, amoxicilina, citrato de bismuto y potasio, y lansoprazol), se analizaron muestras fecales antes del tratamiento y seis semanas después, donde no se detectó ningún género ni especie de *H. pylori*, observando una mayor relación de Bacteroidetes/Firmicutes por posibles alteraciones metabólicas del patógeno y una disminución de *Faecalibacterium prausnitzii*. Esta última, es una bacteria productora de butirato lo cual podría indicar un entorno colónico comprometido con posible deterioro de la barrera intestinal (19). Un comportamiento similar fue reportado en un análisis de la microbiota por 16S rRNA de heces fecales después de un tratamiento farmacológico con la terapia cuádruple, observándose una abundancia de Bacteroidetes (43.59%) y Proteobacteria (8.36 %) e infiriéndose mayor señalización de la vía de transducción de MAPK relacionada con procesos inflamatorios y mayor metabolismo de arginina y prolina implicado en el desarrollo de cáncer (19).

Los estudios anteriormente descritos dan un panorama de los efectos negativos que implica la infección de *H. pylori* sobre la microbiota, promoviendo disbiosis y sensibilidad a padecer otras enfermedades. Por el contrario, en un estudio en pacientes positivos a *H. pylori* se sometieron a un tratamiento de *L. rhamnosus* en combinación con una terapia cuádruple (rabeprazol, levofloxacino, metronidazol y pectina de bismuto) durante dos semanas, al finalizar se observó una reducción significativa en marcadores de la inflamación (neutrófilos, alanina, pepsinógeno, e IL-6 y TNF- α) en comparación con el grupo sin suplementación de probióticos (20).

El uso de probióticos en conjunto con el tratamiento farmacológico contra *H. pylori* aún requiere análisis adicionales para determinar dosis, tipos de fármacos usados y mecanismos de acción (21). Una revisión reciente detalla la eficacia de los probióticos contra la infección y la reducción de los efectos secundarios, pero aún falta comprender su efecto específico en cada cepa de probióticos (22). Por lo anterior, se determinó la actividad bactericida de la bebida C2 en combinación con los antibióticos y si esta podía verse afectada o podría tener un efecto sinérgico. La combinación de las muestras fermentadas con los antibióticos, se observó mayor eficacia de eliminación de *H. pylori* ya que a las 2 horas la mayoría de las muestras solo tenían de 1-4 células/campo, a excepción del fermentado C2 y *L. rhamnosus* con AMX. Así como, la muestra C- en mezcla con todos los antibióticos.

La sensibilidad de las BAL a la AMX puede afectar su eficiencia antimicrobiana. Previos estudios han reportado que utilizando nanopartículas de *L. casei* con quitosano y cargadas con AMX (CMI50 48.82 ng/mL), se veía comprometida su supervivencia, induciendo disrupción de la pared celular, lo cual se mejoró en un 95.7% con la suplementación de inulina (500 ug/mL). Mientras que los efectos bactericidas del mismo tratamiento (nanopartículas de quitosano con AMX + inulina) sobre *H. pylori* se conservaron, lo cual se relacionó con la capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular de la bacteria (23). Estos resultados podrían compararse con los del presente trabajo, pues el uso de un jugo con suero de leche y posterior fermentación se puede sugerir cómo un compuesto protector de las BAL permitiendo su función bactericida.

Cabe destacar que la combinación de C2 (AMX y MTZ) en *L. casei* y en el fermentado con *L. rhamnosus* (MTZ y su mezcla con AMX) indujo formas cocoides de *H. pylori* a las 4 h del ensayo. Estas formas están relacionadas con la capacidad de sobrevivencia de *H. pylori* ante condiciones estresantes como un pH bajo o la presencia de antibióticos. Es un estado donde disminuye su metabolismo, pero mantienen la virulencia y se asocian con recaídas de infecciones en pacientes (24). En un tratamiento de inducción de formas cocoides con AMX (0.03125 µg/mL), se observó el cambio de la morfología a las 6 h de tratamiento y se mantuvieron viables, pero no cultivables hasta 14 días (25). Este efecto puede resultar en un fracaso en la terapia de erradicación, por lo que es importante realizar mayores análisis, en los tratamientos de jugo fermentado C2 en combinación con los antibióticos pues estos indujeron formas cocoides. Efecto relacionado con una reinfección.

La actividad antibacteriana de los productos de la digestión *in vitro* del jugo fermentado con el cocultivo (C2) y de los antibióticos (MTZ, AMX y su combinación) se determinó sobre la simulación de la adherencia de *H. pylori* a una superficie (placa de agar casman). En la hora cero la zona de lisis fue visible para todas las muestras y en el jugo C2 se observó un crecimiento que correspondió a las BAL. En un ensayo similar, se inoculó la cepa *L. acidophilus* aislada de un producto comercial en diferentes concentraciones (MacFarland 1, 2, 3 y 4) en una placa con *H. pylori*, a una densidad 3 del nefelómetro McFarland. Las cepas patógenas correspondieron a aislados clínicos de úlcera péptica. Se observó mayor efecto inhibitor a mayor densidad celular de *L. acidophilus* del 60% en el 3 del nefelómetro de McFarland en contraste con 20% de las demás soluciones (26). Este efecto se podría comparar con los resultados en este ensayo, pues a mayor tiempo de digestión gástrica, la viabilidad de las BAL se vio disminuida, como resultó en el capítulo anterior.

La actividad de lisis sobre *H. pylori* disminuyó en todas las muestras con mayor tiempo de digestión, pero se conservó en el C2. Este comportamiento podría estar

relacionado al efecto de adherencia y coagregación de las BAL. Al respecto, en el ensayo realizado por Juntatachot, et al., (27) analizaron las cepas probióticas *L. rhamnosus* SD4, SD11 y GG, aisladas de productos comerciales contra las nueve cepas de *H. pylori* (ATCC 43504 y ocho clínicas de aislados orales). Se observó mayor adherencia en células de adenocarcinoma colorrectal humano (Caco-2) y en la línea celular epitelial intestinal normal humana 6 (células HIEC-6), con valores de 80.25 y 68.76% respectivamente, en comparación con las cepas patógenas (69.15 % en Caco-2 y 60% en HIEC-6). Estas características son una ventaja sobre la capacidad de inhibir la colonización de *H. pylori* en las mucosas del huésped y se relacionan con las propiedades de hidrofobicidad (capítulo 6) donde *L. rhamnosus* presentó 64.7 % y el co-cultivo de *L. casei* con *L.rhamnosus* C2 47.3%.

El uso de este tipo de productos ha demostrado tener efectos benéficos sobre la erradicación de *H. pylori* y la disminución de efectos adversos. La suplementación por 28 días de una leche fermentada con cepas *Lactocaseibacillus* (dos cepas *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y cuatro cepas de yogurt), en pacientes después de la terapia de antibióticos de 14 días, mostró una recuperación significativamente más rápida de la composición de la microbiota intestinal. Se detectaron mayores concentraciones de ácidos grasos de cadena corta, y cepas viables de *Lactocaseibacillus* en las heces después del tratamiento (28).

6.5. Conclusiones

En el presente capítulo se determinó la actividad antibacteriana de los jugos fermentados en monocultivo con *L. casei* o *L. rhamnosus*, el fermentado con el consorcio C2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*), en comparación con antibióticos usados para tratar esta infección (metronidazol y amoxicilina). Se observó una respuesta favorable en cuanto a la eliminación de *H. pylori* en todos los tratamientos, siendo más eficaz el jugo C2 y en mezcla con antibióticos, lo que sugiere mejorar la terapia farmacológica de erradicación. Sin embargo, es necesario realizar mayores estudios sobre la inducción de formas cocoides.

La bebida fermentada con la mezcla de los probióticos *L. casei* + *L. rhamnosus* (C2) puede sugerirse como un alimento de ensayo sobre un modelo de infección con *H.pylori* por sus efectos antimicrobianos observados en el presente capítulo.

6.6. Referencias

1. Figura N, Marano L, Moretti E, Ponzetto A. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma: Not all the strains and patients are alike. *World J Gastrointest Oncol*. 2016;8(1):40-54. doi:10.4251/wjgo.v8.i1.40
2. Salud S de. gob.mx [Internet]. [citado 16 de marzo de 2026]. 204. La mayoría de casos de gastritis es consecuencia de infección por la bacteria *Helicobacter pylori*. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/prensa/204-la-mayoria-de-casos-de-gastritis-es-consecuencia-de-infeccion-por-la-bacteria-helicobacter-pylori>
3. Ho JJC, Navarro M, Sawyer K, Elfanagely Y, Moss SF. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in the United States between 2011 and 2021: A systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2022;117(8):1221-30. doi:10.14309/ajg.0000000000001828
4. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: A systematic review and meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*. 2018;155(5):1372-1382.e17. doi:10.1053/j.gastro.2018.07.007
5. Gisbert JP, Alcedo J, Amador J, Bujanda L, Calvet X, Castro-Fernández M, et al. V Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Hepatol*. 2022;45(5):392-417. doi:10.1016/j.gastrohep.2021.07.011
6. Fernandez-Caso B, Miqueleiz A, Valdez VB, Alarcón T. Are molecular methods helpful for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and for the prediction of its antimicrobial resistance? *Front Microbiol*. 2022;13:962063. doi:10.3389/fmicb.2022.962063
7. Yang Z, Zhou Y, Han Z, He K, Zhang Y, Wu D, et al. The effects of probiotics supplementation on *Helicobacter pylori* standard treatment: an umbrella review of systematic reviews with meta-analyses. *Sci Rep*. 2 de mayo de 2024;14(1):10069. doi:10.1038/s41598-024-59399-4
8. Keikha M, Karbalaei M. Probiotics as the live microscopic fighters against *Helicobacter pylori* gastric infections. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):388. doi:10.1186/s12876-021-01977-1
9. Oh B, Kim BS, Kim JW, Kim JS, Koh SJ, Kim BG, et al. The effect of probiotics on gut microbiota during the *Helicobacter pylori* eradication: Randomized controlled trial. *Helicobacter*. 2016;21(3):165-74. doi:10.1111/hel.12270
10. Gao F, Sui L, Mu G, Qian F, Zhu X. Detección de posibles probióticos con actividad anti- *Helicobacter pylori* en heces infantiles mediante análisis de componentes principales. *Food Biosci*. 2021;42:101045. doi:10.1016/j.fbio.2021.101045
11. Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., Muñoz-Rojas, J. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Rev colomb de biotecnol*. 2012;14(2), 147-156.
12. Gomez-Ramirez U, Nolasco-Romero CG, Contreras-Rodríguez A, Zuñiga G, Mendoza-Elizalde S, Prado-Galbarro FJ, et al. Dysbiosis by eradication of *Helicobacter pylori* infection associated with follicular gastropathy and pangastropathy. *Microorganisms*. 2023;11(11):2748. doi:10.3390/microorganisms11112748

13. Rezaee P, Kermanshahi RK, Falsafi T. Antibacterial activity of lactobacilli probiotics on clinical strains of *Helicobacter pylori*. Iran J Basic Med Sci. 2019;22(10):1118-1124. doi:10.22038/ijbms.2019.33321.7953.
14. Huang H, Peng F, Li J, Liu Z, Xie M, Xiong T. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria with antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. Food Bioscience. 1 de diciembre de 2021;44:101446. doi:10.1016/j.fbio.2021.101446
15. Wei Z, Peng Z, Li J, Tang H, Qiao B, Madjirebaye P, et al. Screening, characterization, and mode of action of three lactic acid bacteria against *Helicobacter pylori*. Probiotics Antimicrob Proteins. 2025. doi:10.1007/s12602-025-10620-4
16. Zheng PX, Fang HY, Yang HB, Tien NY, Wang MC, Wu JJ. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2016;49(2):168-74. doi:10.1016/j.jmii.2014.04.014
17. Wang C, Chang T, Yang H, Cui M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 2015;47:231-6. doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.034
18. Di J, Zhang J, Cao L, Huang T ting, Zhang J xia, Mi Y ni, et al. Hydrogen peroxide-mediated oxygen enrichment eradicates *Helicobacter pylori* in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64(5):e02192-19. doi:10.1128/AAC.02192-19
19. Chen XJ, Hu MY, Zheng ED, Pan JY. Alterations in the gut microbiota of Chinese patients following *Helicobacter pylori* eradication with bismuth-based quadruple therapy. Front Microbiol. 2025;16:1713477. doi:10.3389/fmicb.2025.1713477
20. Niu Y, Li J, Qian H, Liang C, Shi X, Bu S. Evaluation of efficacy and safety of *Lactobacillus rhamnosus* LRA05 in the eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Front Immunol. 2024;15:1450414. doi:10.3389/fimmu.2024.1450414
21. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical guideline: treatment of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol. 2017;112(2):212-39. doi:10.1038/ajg.2016.563
22. Dash D, Mishra V, Panda MK, Pathak SK. Effects of *Lactobacillus* spp. on *Helicobacter pylori*: A promising frontier in the era of antibiotic resistance. Probiotics Antimicrob Proteins. 2025;17(5):2653-72. doi:10.1007/s12602-024-10396-z
23. Fayed B, Jagal J, Cagliani R, Kedia RA, Elsherbeny A, Bayraktutan H, et al. Co-administration of amoxicillin-loaded chitosan nanoparticles and inulin: A novel strategy for mitigating antibiotic resistance and preserving microbiota balance in *Helicobacter pylori* treatment. Int J Biol Macromol. 2023;253(Pt 2):126706. doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.126706
24. Krzyżek P, Grande R. Transformation of *Helicobacter pylori* into coccoid forms as a challenge for research determining activity of antimicrobial substances. Pathogens. 2020;9(3):184. doi:10.3390/pathogens9030184
25. Jung K, Bae H, Kim JK, Jeong B, Park MI, Lee JY. Comparison of three methods for generating the coccoid form of *Helicobacter pylori* and proteomic analysis. BMC Microbiol. 2024;24(1):448. doi:10.1186/s12866-024-03599-5
26. Vilaichone RK, Mahachai V, Tumwasorn S, Nunthapisud P, Kullavanijaya P. Inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Helicobacter pylori* in peptic ulcer patients: in vitro study. J Med Assoc Thai. 2002;85 Suppl 1:S79-84.

27. Juntarachot N, Sunpaweravong S, Kaewdech A, Wongsuwanlert M, Ruangsri P, Pahumunto N, et al. Characterization of adhesion, anti-adhesion, co-aggregation, and hydrophobicity of *Helicobacter pylori* and probiotic strains. *J Taibah Univ Med Sci*. 2023;18(5):1048-54. doi:10.1016/j.jtumed.2023.02.017.
28. Guillemard E, Poirel M, Schäfer F, Quinquis L, Rossoni C, Keicher C, et al. A Randomised, controlled trial: effect of a multi-strain fermented milk on the gut microbiota recovery after *Helicobacter pylori* therapy. *Nutrients*. 2021;13(9):3171. doi:10.3390/nu13093171

Capítulo VII. Efecto del jugo de zarzamora fermentado con BAL en un modelo in vivo utilizando el nematodo *Caenorhabditis elegans* infectado con *S. aureus* y *H. pylori*.

7.1. Introducción

El estudio del efecto de los alimentos en la salud comprende varias etapas, desde estudios *in vitro* para investigar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas y nutrimentales para conocer los compuestos funcionales que podrían tener el efecto deseado en la salud humana. Posteriormente, en estudios *in vivo* se pueden analizar sus propiedades y su toxicidad/letalidad, para trasladar el conocimiento a los estudios preclínicos, utilizando modelos animales que mimetizan contextos específicos del proceso de salud-enfermedad, hasta estudios clínicos en sus diversas etapas. Los estudios preclínicos y clínicos pueden ser muy costosos y poco informativos si se desconocen los efectos biológicos y los blancos moleculares relacionados con el contexto de salud que se requiere investigar (1).

Un modelo ampliamente utilizado es el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual se ha convertido en un organismo importante como primera plataforma para estudiar vías de señalización alteradas en enfermedades humanas (1-3). Sus ventajas de estudio en los procesos de salud-enfermedad en humanos incluye su pequeño tamaño (1 mm en la etapa adulta), su gran tamaño de camada (de 300 a 500 animales por adulto), la facilidad de cultivo, el bajo coste de mantenimiento, la criopreservación a largo plazo, el rápido tiempo de generación, la transparencia, la invariabilidad en el número y desarrollo celular, y la capacidad de reducir la actividad génica mediante ARN de interferencia (ARNi) administrado por alimentación y la capacidad de introducir secuencias de genes de humano, así como su expresión (4).

Una de las principales ventajas del uso de este nematodo como modelo de enfermedades humanas es que al menos el 38 % de los genes codificadores de proteínas de *C. elegans* tienen ortólogos predichos en el genoma humano (5), entre el 60% y el 80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* (6), y el 40 % de los genes asociados a enfermedades humanas tienen ortólogos claros en el genoma de *C. elegans* (7).

Los estudios en el nematodo se basan en el análisis de la esperanza de vida (lifespan) a las temperaturas de 16, 20 y 25 °C, en condiciones de CO₂ y O₂ ambientales (8). Mediante los análisis de supervivencia, es posible determinar si un compuesto puede incrementar su vida media por vía oral. Se han identificado vías celulares que pueden incrementar esta esperanza de vida y que desempeñan funciones evolutivamente

conservadas entre las especies. Una de ellas es la vía de insulina/IGF1-1 (IIS), que controla el envejecimiento en *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* y mamíferos (9); la vía de DAF-16/Forkhead box (FOXO) y SKN-1/Factor Nuclear eritroide relacionado al factor 2 (NRF2), que participan en la transcripción de genes de respuesta a diferentes estreses, incluido el estrés oxidativo cuando los animales son sometidos a condiciones oxidantes como ambientes de peróxido de hidrógeno (10). Adicionalmente, en condiciones de alta temperatura (35 a 37 °C), pueden activar el factor de transcripción de choque térmico HSF-1, promoviendo la expresión de genes chaperonas y respondiendo al estrés térmico (11).

Por otro lado, es importante mencionar que los nematodos carecen de células inmunitarias de respuesta adaptativa; sin embargo, han desarrollado mecanismos altamente eficientes, como su sistema inmune innato, aprendizaje y memoria para reconocer y eliminar patógenos. En su sistema de defensa pueden combatir infecciones intestinales, en la hipodermis y en el sistema nervioso mediante la activación de las vías de señalización p38, MAPK, TGFβ, la regulación de la expresión génica y receptores hormonales nucleares (12-15).

Lo anterior permite establecer un modelo *in vivo* útil para el estudio de probióticos. Diferentes investigaciones sustentan la viabilidad de este modelo para evaluar las interacciones con probióticos (3, 16, 17). De esta manera, Sugawara et al., (2019), reportaron incremento de la vida media del nemátodo alimentado con el Kéfir de arroz, actuando vía Daf16/FOXO (18). Posteriormente, Zhao et al., (2020), indicaron que los extractos de cebada fermentada disminuyen la acumulación de grasa en *C. elegans* vía daf-2 regulando la Beta oxidación de los ácidos grasos y la síntesis de ácidos grasos insaturados (19). También se han estudiado las propiedades antioxidantes de BAL aisladas de leche de yak fermentada, otorgando resistencia al estrés térmico y oxidativo con peróxido de hidrógeno (20). Además, se ha utilizado como modelo para estudiar la infección y la respuesta a la infección por diversos patógenos bacterianos, microsporidios y virus que colonizan el sistema digestivo (21). En este sentido, se ha estudiado el efecto de las BAL ante infecciones por patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis* (22).

Por lo anterior, para evidenciar el potencial del jugo de zarzamora fermentado con BAL y suero de leche como producto con actividad antibacteriana, se realizaron experimentos de supervivencia del nematodo con las BAL ante estresores como el estrés oxidativo y la infección por *S. aureus* y *H. pylori*. En esta etapa únicamente se trabajó con las cepas del consorcio 2 (*L. rhamnosus* y *L. casei*).

7.2. Estrategia metodológica

7.2.1. Cepas y preparación del jugo

Las cepas de BAL utilizadas fueron *L. plantarum* y *P. acidilactici* a partir de savia de agave. *L. brevis*, *L. rhamnosus* y *L. casei*, de pulque. Las cepas mencionadas anteriormente fueron aisladas previamente (23). Para activar las BAL, se inocularon 100 μ L de cepas congeladas a -80 °C en 5 mL de caldo MRS estéril y se incubaron (Felisa FE-133D, Feligneo, México) a 37 °C durante 24 h, repitiendo el proceso para completar dos ciclos. Posteriormente, se procedió a concentrar el cultivo 1:10 mediante centrifugación (Eppendorf, 22-62-010-0, Hamburgo Alemania) a 8000 $\times$ g durante 15 minutos. Después de este proceso, se evaluaron las unidades formadoras de colonias para cada cepa de BAL, obteniendo un promedio de 9.44 UFC/mL.

7.2.2. Adquisición y mantenimiento de *C. elegans*

La cepa N2 Bristol de *C. elegans* y su fuente de alimento no patógena, *E. coli* OP50, fueron obtenidas del Caenorhabditis Genetics Center (CGC, Minneapolis, MN, EE. UU.) mediante colaboración con el Dr. José Pedraza Chaverri de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y donadas a la Dra. Angélica Saraí Jiménez Osorio. Las cepas se mantuvieron a 20 °C en el Bioterio, una vez que el proyecto fue registrado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Número de registro: CICUAL-V-I/06/2024).

El mantenimiento del nematodo se llevó a cabo utilizando placas Petri de 60 mm de diámetro, estériles, que contenían 10 mL de Medio de Crecimiento para Nematodos (NGM) siguiendo procedimientos estándar (24) y se mantuvieron a 20 °C (a excepción de los ensayos de exposición a patógenos, las cuales son libres de peptona). Los cultivos de OP50 se obtuvieron mediante crecimiento durante 24 horas a 37 °C en medio Caldo Luria, los cuáles se concentraron 1:10 por centrifugación (Eppendorf, 22-62-010-0, Hamburgo Alemania) (8000 $\times$ g, 15 min) y se añadieron 200 μ L a las placas de 60 mm y 100 μ L a las placas de 35 mm con NGM. La bacteria se inactivó mediante la exposición a la luz ultravioleta durante 15 minutos.

7.2.3. Sincronización de la etapa larvaria

Para llevar a cabo los experimentos, los animales se requirieron en una etapa larvaria L4. Se sincronizaron mediante tiempo de oviposición y utilizando una mezcla de blanqueo con 1:0.5 de hipoclorito y NaOH 5 N, utilizando el método de Wilkinson et al., (2012) (25) con algunas modificaciones. Los nematodos se reprodujeron hasta tener mayor población de adultos grávidos en una caja petri de 65 mm, la cual se lavó con 2 mL de tampón M9 (3g de KH_2PO_4 , 6g de Na_2HPO_4 , 5g de NaCl, 1 mL de MgSO_4 1M, aforando a 1 L con H_2O destilada), recolectando los animales con la punta de la pipeta y

colocándolos en un tubo cónico de 2 ml y se centrifugó en microcentrífuga (Eppendorf, 22-62-010-0, Hamburgo Alemania) durante 45 segundos a 8000 g . Posteriormente, se decantó el sobrenadante hasta obtener 500 μ L y se añadieron 300 μ L de la mezcla de blanqueo, agitando por no más de 2 minutos, posterior a este lavado. Se centrifugó nuevamente durante 45 seg a 8000 g y se eliminó el sobrenadante, repitiendo este proceso de enjuague con tampón M9 seis veces. Posteriormente, con una micropipeta se retiraron los huevos y se colocaron en una caja nueva con *E. coli* OP50, y se dejó la caja a 20 °C hasta que llegasen a la etapa L4 (48 h), lo que permitió obtener una población de individuos sincronizados.

7.2.4. Ensayo de toxicidad aguda

Se prepararon las cajas de 35 mm, con 3 mL de medio NGM estéril, sin alimento. Se adicionaron 150 μ L de cada compuesto, según se describe a continuación.

- a. Grupo control: agua destilada
- b. Jugo de zarzamora
- c. Suero de leche (9.3 g/L)
- d. Jugo de zarzamora + suero de leche (1:1)

Posteriormente, se trabajó con el jugo de zarzamora + suero de leche (1:1) fermentado durante 16 horas con cada una de las siguientes cepas:

- a. Grupo control: agua destilada
- b. *L. casei* al 100 %, 75 %, 50 % y 25 %.
- c. *L. brevis* al 100 %, 75 %, 50 % y 25 %.
- d. C2 (*L. casei* + *L. brevis*) al 100 %, 75 %, 50 % y 25 %.
- e. C- (Jugo de zarzamora + suero de leche sin inóculo) al 100 %, 75 %, 50 % y 25 %.

Se colocaron 25 nematodos en cada una de las cajas experimentales (2 por experimento, 3 experimentos independientes). El número de animales supervivientes en cada placa se determinó 24 horas después de la exposición en comparación con el grupo control (agua destilada).

7.2.5. Ensayo de vida útil (lifespan)

Los ensayos de vida útil (*lifespan*) y los de parámetros de bienestar (*healthspan*) del nematodo se realizaron de acuerdo con lo descrito por Yu et al., (2024) (26). Una vez sincronizados los nematodos, se colocaron 30 animales en etapa larvaria L4 (2 cajas por condición) con sus respectivas cepas bacterianas y 20 a 50 μ M de 5,2-fluorodesoxiuridina (FuDR), para controlar el crecimiento de la progenie.

Los grupos de experimentación fueron los siguientes:

- a. Lifespan de los nematodos alimentados con cada una de las cepas analizadas. Se colocaron 100 μ L de cepas de LAB centrifugadas (9.44 UFC/mL) en placas de Petri de 35 mm que contenían 3 mL de medio NGM.
- b. Lifespan del nematodo expuesto a 100 μ L de la bacteria OP50 (control), tratamientos utilizando 150 μ L de jugo fermentado (jugo de zarzamora + suero de leche):
 - C2 (*L. casei* + *L. brevis*) al 75 % y 50 %.
 - C- (Jugo de zarzamora + suero de leche sin inóculo) al 75 % y 50 %.

Los animales se mantuvieron a 20 °C y se realizaron cambios de caja cada tercer día. Se registraron las muertes diarias de los nematodos, considerando como muertos a aquellos que no respondieron al estímulo mecánico con el asa de platino y perdidos a aquellos que migraron a la pared de la placa Petri o con la vulva expuesta.

7.2.6. Ensayo de producción de progenie

Se seleccionaron 10 nematodos sincronizados en estado larvario L4 por condición experimental y se colocaron en placas con los siguientes tratamientos bacterianos (150 μ L de agua o jugo fermentado):

- Control: OP50 + agua destilada
- OP50 + C2 (*L. casei* + *L. brevis*) al 75 % y 50 %.
- OP50 + C- (Jugo de zarzamora + suero de leche sin inóculo) al 75 % y 50 %.

Los animales se mantuvieron a 20 °C, sin uso de FuDR, y diariamente se transfirieron a placas nuevas para contabilizar el número de progenie por cada 10 animales en placa, hasta que dejaron de poner huevos.

7.2.7. Ensayo de bombeo faríngeo

En el estadio L4, 10 nematodos fueron colocados en placas con sus tratamientos (como se indica en la sección 8.2.5) y, cada tercer día, se observaron y se contabilizaron las contracciones faríngeas durante 30 segundos. Este ensayo se realizó hasta que todos los nematodos murieron. Los resultados se reportaron como el promedio del número de contracciones faríngeas por minuto.

7.2.8. Ensayo de locomoción

Para la evaluación de la motilidad de los nematodos, 10 animales de cada grupo (como se indica en la sección 8.2.5) fueron transferidos a una placa nueva con NGM.

Después de que los nematodos alcanzaron la edad adulta (día 2 de exposición), cada 48 horas se observó y registró el número de curvas sinusoidales que formaron los nematodos durante 1 min. Se registraron y analizaron al estandarizar contra el control con *E. coli* OP50.

7.2.9. Ensayo de estrés oxidativo inducido por H₂O₂

El ensayo de estrés oxidativo se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Yu et al., (2024) (27). Una vez sincronizados, se eligieron 40 nematodos por tratamiento (al igual que sección 8.2.5) en etapa larvaria L4, los cuales fueron alimentados durante 4 días con *E. coli* OP50 (grupo control del experimento) o sus tratamientos correspondientes. Posterior al pretratamiento, los gusanos se expusieron a peróxido de hidrógeno a una concentración final en la placa de 8 mM, sin alimento. Se contabilizó la supervivencia hasta que no respondieron al estímulo mecánico con el asa de platino y se contaron como muertos.

7.2.10. Ensayos de exposición a *S. aureus*

El primer ensayo que se ejecutó para analizar la respuesta de *C. elegans* frente a los diferentes patógenos fue mediante el análisis de supervivencia cuando: se exponen previamente al jugo y posteriormente se infectan los animales con el patógeno (tratamiento pre-infección); se exponen primeramente al patógeno y posteriormente se tratan con el jugo (tratamiento post-infección) y se co-exponen tanto al patógeno, como al tratamiento con el jugo (co-exposición al patógeno) como a continuación se especifica.

Compuestos. Para estos experimentos, se prepararon cajas de petri de 35 mL con 3 mL de agar NGM, libres de peptona. Se utilizaron 10 cajas por cada experimento y dependiendo de cada tratamiento, fue el número de cajas con compuesto. Para los controles se agregaron 150 µL de agua destilada estéril, mientras que para las cajas con jugo se les agregaron 150 µL de jugo en cocultivo C2 al 75 %, o bien 150 µL de jugo sin inóculo (C- al 75%).

Crecimiento de nematodos. Después de la sincronización y obtener los huevos suficientes para el experimento (n>400 huevos), estos fueron alimentados con OP50 a temperatura de desarrollo de 25 °C. Se seleccionaron los animales en la etapa L4 definida (vulva en forma de media luna), la cual corresponde a un día previo al inicio de la fertilización.

A) Tratamiento pre-infección

Tratamiento. Se colocaron 40 animales L4 por caja petri de 3 mL (2 por condición experimental, n= 80 animales) en un total de 10 cajas por experimento (6 con agua, 2 con C2 y 2 con C-), todos alimentados por 5 días con la bacteria OP50 (Figura 7.1).

Infección. A partir del día 6, posterior al inicio del tratamiento, se utilizaron cajas con los compuestos de acuerdo a su condición experimental y se les cambió el alimento por *S. aureus* (a excepción del control del experimento con OP50). De esta manera, de las 10 cajas, 2 se les agregó agua + OP50 (control del experimento a lo largo del tiempo), 2 con agua destilada + *S. aureus* (control positivo del patógeno), 2 con vancomicina 83 µg/mL + *S. aureus* (control de patógeno con antibiótico), 2 con jugo C2 + *S. aureus*, y 2 de C- + *S. aureus*.

Durante todo el tiempo de experimentación, se expusieron a 25° C y se transfirieron a cajas nuevas cada tercer día. Se contabilizó el número de animales vivos, transferidos, perdidos y muertos por día, y se realizaron los gráficos de supervivencia.

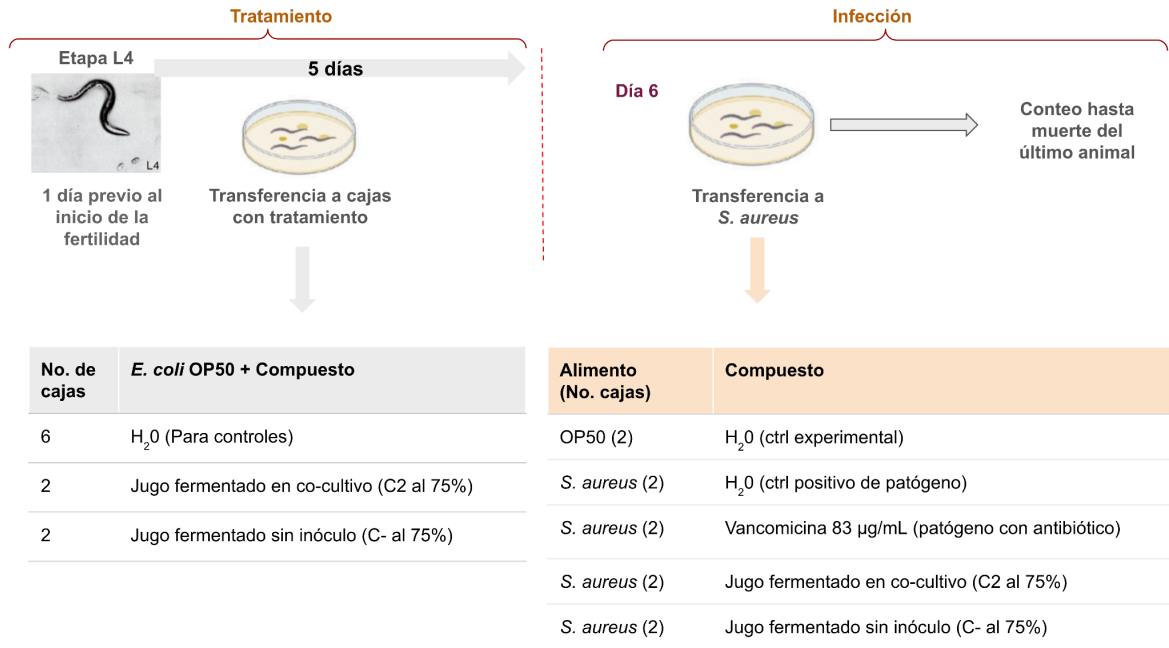


Figura 7.1. Estrategia experimental usando como modelo *Caenorhabditis elegans* tratado con jugo fermentado y pre-infectado con *S. aureus*.

B) Tratamiento post-infección.

Infección. Cuando los animales alcanzaron la etapa L4, se transfirieron a 10 cajas con agua destilada, de las cuales 2 tuvieron como alimento a la bacteria OP50 y 8 tuvieron como alimento a *S. aureus*. Los animales se contabilizaron diariamente en los primeros 5 días (Figura 7.2).

Tratamiento. Al sexto día, posterior al inicio del experimento, los animales se transfirieron a las cajas experimentales con los compuestos y fueron alimentados hasta el final del experimento con *S. aureus*.

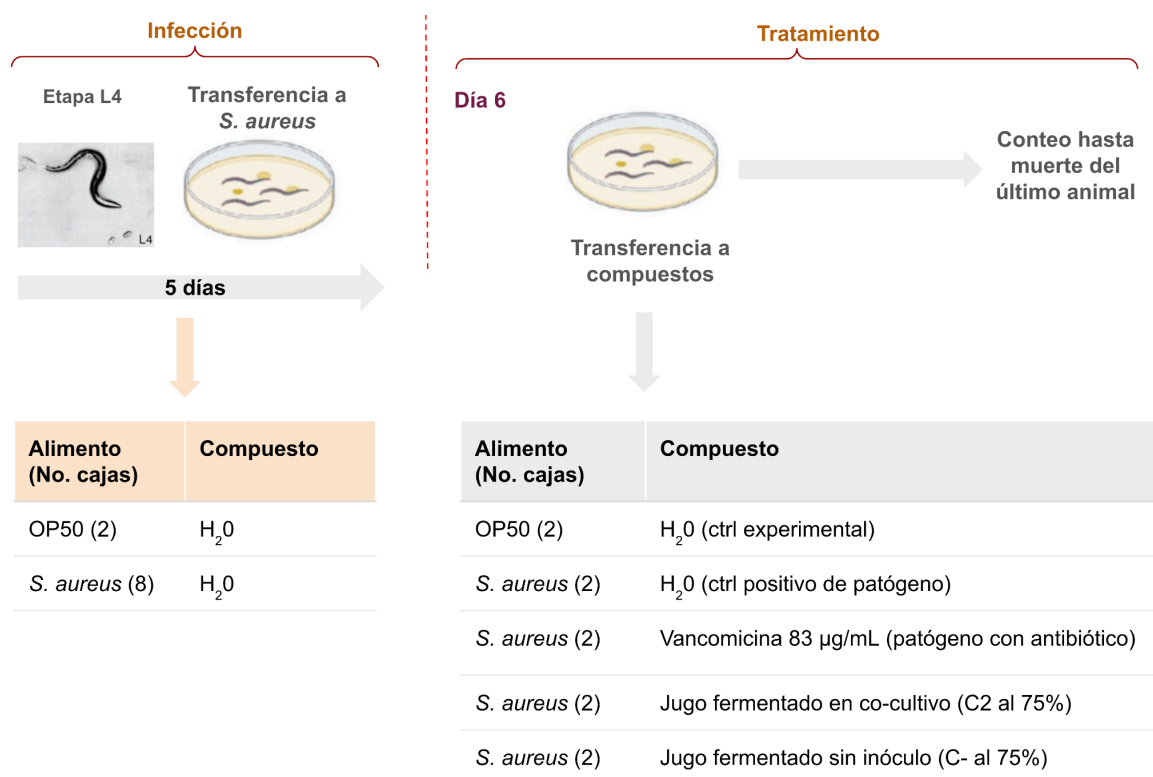


Figura 7.2. Estrategia experimental utilizando *Caenorhabditis elegans* bajo un tratamiento post-infección por *S. aureus*.

C) Tratamiento en coexposición.

En la tercera estrategia, los animales se seleccionaron desde la etapa L4 bajo las siguientes condiciones:

- Control del experimento: 2 cajas de 40 nemátodos cada una, con agua como control experimental y alimentados con OP50.
- Control de patógeno: 2 cajas de 40 nemátodos cada una, con agua como control experimental y alimentados con *S. aureus*.
- Control de antibióticos: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con Vancomicina (83 µg/mL) y alimentados con *S. aureus*.
- C2: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo fermentado en cocultivo (C2) al 75% y alimentados con *S. aureus*.
- C-: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo fermentado sin inóculo, al 75% y alimentados con *S. aureus*.

Todo el tiempo de supervivencia a 25 °C de los nematodos se siguió bajo estas condiciones, con transferencia a cajas frescas cada tercer día.

D) Número de bacterias de *S. aureus* en los nematodos

La cuenta viable de *S. aureus* en los nematodos se determinó bajo la metodología descrita por Komura et al., (2022) (27) con ligeras modificaciones. Se colocaron 10

animales en un microtubo con 500 µL de gentamicina (1mg/mL) por 30 min. Se eliminó el exceso de antibiótico por centrifugación (Eppendorf, 22-62-010-0, Hamburgo Alemania) (7200 xg, 45 segundos a T° ambiente) y se hicieron 5 lavados con tampón M9. Posteriormente, los nematodos se trituraron mecánicamente, el volumen se ajustó a 1 mL con tampón M9. Se realizaron diluciones seriadas y por la técnica de microgota se sembró en agar soya tripticaseína. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

7.2.11. Ensayos de exposición a *Helicobacter pylori*

A) Exposición a antibióticos

Esta estrategia se empleó con la finalidad de comprobar si la bebida fermentada podría ser utilizada junto con los antibióticos más comunes, utilizados para tratar la infección de *H. pylori*. En este ensayo, no se expusieron a la bacteria, únicamente a los antibióticos.

Compuestos. Se elaboraron 14 cajas experimentales de 35 mm y se agregaron a cada una 100 µL de la bacteria OP50. Cuando los animales se expusieron al grupo de control experimental, se agregaron 150 µL de agua destilada. A las cajas con compuesto, se les agregaron 150 µL de cada uno de los siguientes compuestos:

- a) MTZ 128 µg/mL en agua destilada
- b) AMX 15 ng/mL en agua destilada
- c) C- al 75% + Metronidazol 128 µg/mL
- d) C- al 75% + Amoxicilina 15 ng/mL
- e) C2 al 75% + Metronidazol 128 µg/mL
- f) C2 al 75% + Amoxicilina 15 ng/mL

Todos los animales iniciaron el experimento en etapa L4 y se evaluó su supervivencia a 25 °C en cada una de las condiciones, contando diariamente los animales hasta la muerte del último animal. Los animales se transfirieron cada tercer día a cajas frescas de acuerdo a su condición experimental.

B) Tratamiento con jugo previo a la infección por *Helicobacter pylori*.

Tratamiento. Se colocaron 40 animales L4 por caja Petri de 3 mL (2 por condición experimental, n = 80 animales) en un total de 14 cajas por experimento (6 con agua, 4 con C2 y 4 con C-), todos alimentados por 5 días con la bacteria OP50.

Infección. A partir del día 6, posterior al inicio del tratamiento, se utilizaron cajas con los compuestos de acuerdo con su condición experimental y se les cambió el alimento por *H. pylori* (a excepción de 2 cajas del control del experimento con OP50). Las cajas restantes que iniciaron con agua destilada se destinaron para el control de antibióticos (2 para metronidazol 128 µg/mL y 2 para amoxicilina 15 ng/mL) con *H. pylori*.

Las cajas que iniciaron con el jugo fermentado (4 cajas de cada jugo), se destinaron 2 a combinación con metronidazol o con amoxicilina.

Durante el tiempo de experimentación, se expusieron a 25° C y se transfirieron a cajas nuevas cada quinto día. Se contabilizó el número de animales vivos, transferidos, perdidos y muertos por día, y se realizaron los gráficos de supervivencia. De las cajas experimentales, 2 se destinaron a tratamiento con metronidazol y 2 con amoxicilina como se indica en la Figura 7.3.

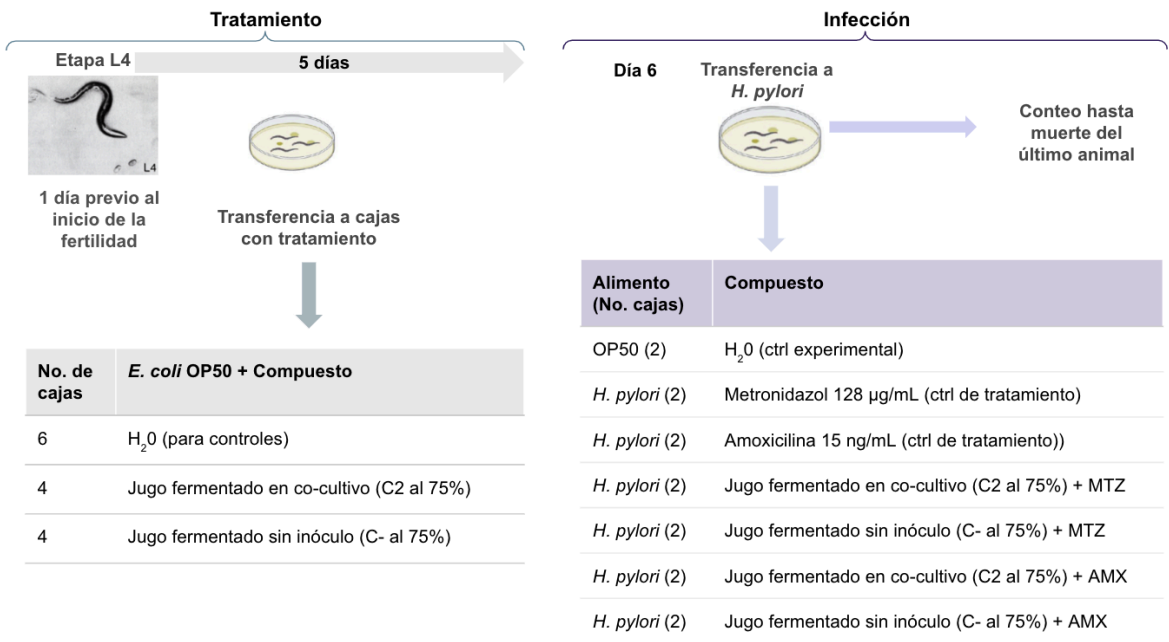


Figura 7.3. Estrategia experimental utilizando como modelo *Caenorhabditis elegans*, bajo un esquema de tratamiento previo a la infección por *Helicobacter pylori*.

C) Coexposición con *Helicobacter pylori*.

En la tercera estrategia, los animales se seleccionaron desde la etapa L4 bajo las siguientes condiciones:

- f) Control del experimento: 2 cajas de 40 nemátodos cada una, con agua como control experimental y alimentados con OP50.
- g) Control de antibióticos: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con metronidazol (128 µg/mL) y alimentados con *H. pylori*; 2 cajas de 40 nematodos cada una, con amoxicilina (15 ng/mL) y alimentados con *H. pylori*.
- h) Jugo C2 con antibióticos: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo C2 + Metronidazol (128 µg/mL) y alimentados con *H. pylori*; 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo C2 + amoxicilina (15 ng/mL) y alimentados con *H. pylori*.

- i) Jugo C- con antibióticos: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo C- + metronidazol (128 µg/mL) y alimentados con *H. pylori*; 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo C- + amoxicilina (15 ng/mL) y alimentados con *H. pylori*.
- j) Jugos con patógeno: 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo C2 y alimentados con *H. pylori*; 2 cajas de 40 nematodos cada una, con jugo C- y alimentados con *H. pylori*.

Todo el tiempo de supervivencia a 25 °C de los nematodos se siguió bajo estas condiciones, con transferencia a cajas frescas cada cinco días.

7.2.12. Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 8.0.1 para el análisis estadístico de los resultados y los gráficos. Para el análisis de toxicidad aguda, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias con la prueba de Tukey.

En los estudios de lifespan, los animales se contabilizaron como muertos si no respondieron al estímulo con el asa de platino, los cuales se codificaron con 1. Sin embargo, cuando no respondieron al estímulo y se observó implosión de la vulva con crecimiento interno de nematodos, o rotura del animal, o huida a las paredes de las cajas, los animales se censuraron y se contaron como perdidos, codificando con 0. El análisis de supervivencia se realizó mediante el estimador de Kaplan-Meier, el cual es un método no paramétrico que muestra las probabilidades de supervivencia acumuladas a lo largo del tiempo y compara las distribuciones de supervivencia en diferentes grupos. Además, se ejecutaron las pruebas de rango logarítmico, también conocidas como prueba log-rank, donde se determinó si hay diferencias significativas en las curvas de supervivencia entre diferentes grupos para comparar la vida media de cada condición experimental versus el control (OP50) o los controles positivos (patógenos o antibióticos)

Los análisis de progenie, bombeo faríngeo y locomoción, se analizaron mediante un ANOVA de un factor (únicamente el tratamiento), con una prueba post-hoc de Dunnett comparando versus el grupo control de cada experimento. Aunque en estos análisis se muestran los resultados a través del tiempo, ya se ha documentado que estos parámetros disminuyen significativamente conforme avanzan los días. Por lo anterior, el factor tiempo se desestimó en este análisis.

7.3. Resultados

7.3.1. Toxicidad aguda del jugo fermentado

Los experimentos de toxicidad aguda mostraron que tanto los animales alimentados con la cepa control (*E. coli* OP50), como el jugo de zarzamora, o el suero el jugo con suero, no producen toxicidad en 24 horas (Figura 7.4 A). Sin embargo, cuando

los animales se alimentaron únicamente con el jugo fermentado con C2 sin diluir, la supervivencia disminuyó en un 9 % en 24 horas (Figura 7.4 B). Dado que en estas muestras concentradas se observó la toxicidad máxima, se descartó el uso del jugo fermentado al 100 % en los experimentos de lifespan y healthspan.

Las muestras de jugo fermentado diluidas con *L. casei* y *L. rhamnosus* al 50 % mostraron una disminución de 3 y 6 puntos porcentuales, respectivamente, en supervivencia a las 24 horas (Figura 7.4 B). Cuando los animales se alimentaron con las muestras de C2 al 75 %, la supervivencia disminuyó significativamente en un 7 % en 24 horas. A partir de estos experimentos, dado que el grupo experimental de interés es el C2, se trabajó con las concentraciones de 75, 50 y 25 %.

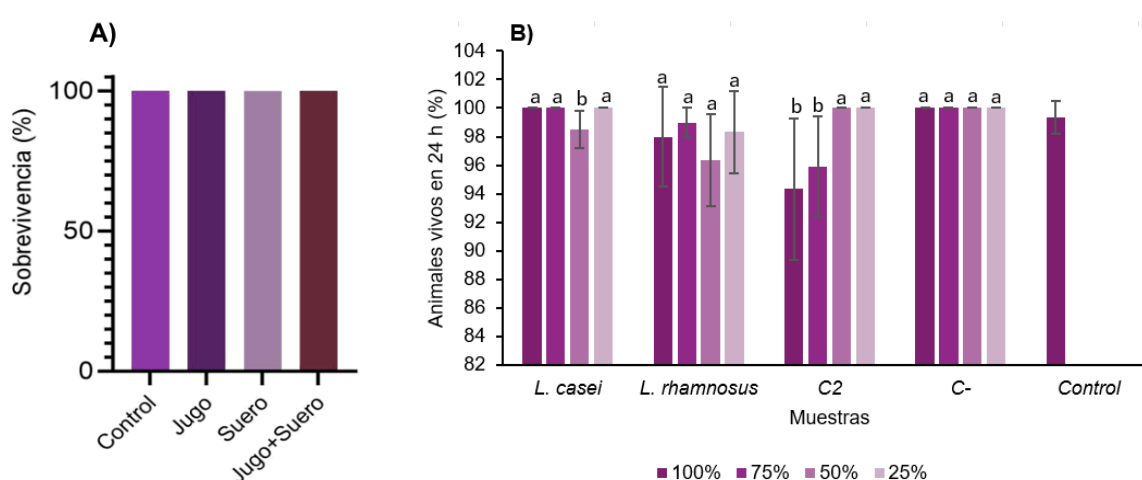


Figura 7.4. Toxicidad aguda de 24 h en *C. elegans*. Las larvas fueron alimentadas con A) jugo, suero y su combinación; B) jugo fermentado con suero y *L. casei* o *L. rhamnosus*, o C2 (jugo + suero + *L. casei* + *L. rhamnosus*), o C- (jugo + suero) y el control alimentado con OP50 sin jugo. Cada barra representa la media con su desviación estándar de 2 experimentos. ^{a-c} Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las distintas concentraciones por cada muestra.

7.3.2. Lifespan de las cepas individuales y en el jugo fermentado

En este experimento, primero se analizó individualmente la supervivencia del nematodo cuando se alimentó con cada una de las cepas de BAL, sin jugo. Estos experimentos se realizaron junto con la alumna Vania Lizett Hernández Lucas, a quien se asesoró con fines de titulación (manuscrito publicado) (28).

Los nematodos alimentados con *L. rhamnosus* mostraron un incremento de la vida media de 33.3 % y alcanzaron una vida máxima de 25 días, en comparación con el control OP50 (vida media de 10 días, con vida máxima de 15 días), lo cual fue significativo. Adicionalmente, los nematodos que fueron alimentados con *L. casei*

incrementaron en un 16.6 % su vida media, y en los alimentados con *L. plantarum* se observó un incremento del 9% en su vida media y un máximo de 20 días (Figura 7.5).

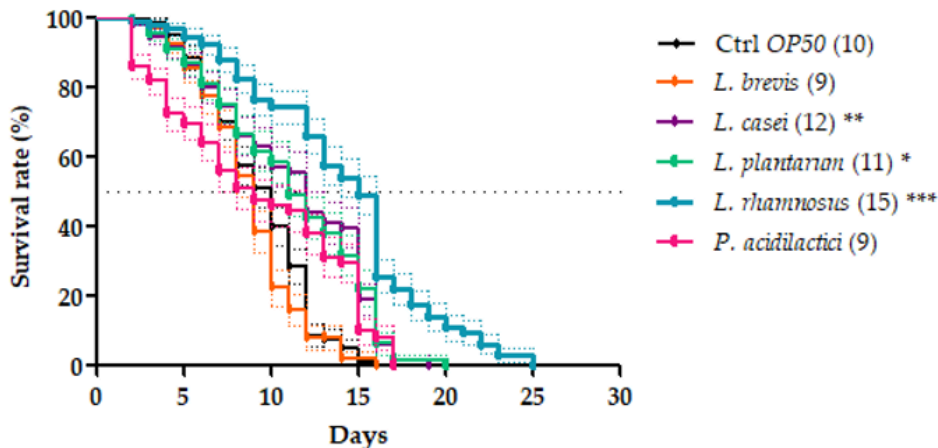


Figura 7.5. Lifespan de *C. elegans* alimentadas con cada una de las cepas de BAL utilizadas en esta investigación. Entre paréntesis se muestra la vida media. Significancia: * p < 0.001, ** p< 0.01, and * p< 0.05 (28).**

En los experimentos con el jugo se determinó la vida media de C2 y su control C– (jugo fermentado sin BAL), al 50 % y al 75 % (Tabla 7.1 y Figura 7.6). Se observó que el jugo sin BAL (C–) al 50 % y al 75% reduce la vida media del nematodo (p<0.0001), mientras que C2 al 75 % y al 50 %, no resultó letal, aunque no incrementó por sí solos la esperanza de vida del nematodo (Figura 7.5).

Tabla 7.1. Parámetros de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentados con OP50 (control) y con los jugos en cocultivo C2 y C- al 50 % y 75%.

Tratamiento	Vida media días	Vida máxima días	P vs OP50
OP50	14	20	— — —
C2 50%	14	19	<0.0001
C2 75%	14	22	0.0735
C- 50%	11	19	<0.0001
C- 75%	12	15	0.5944

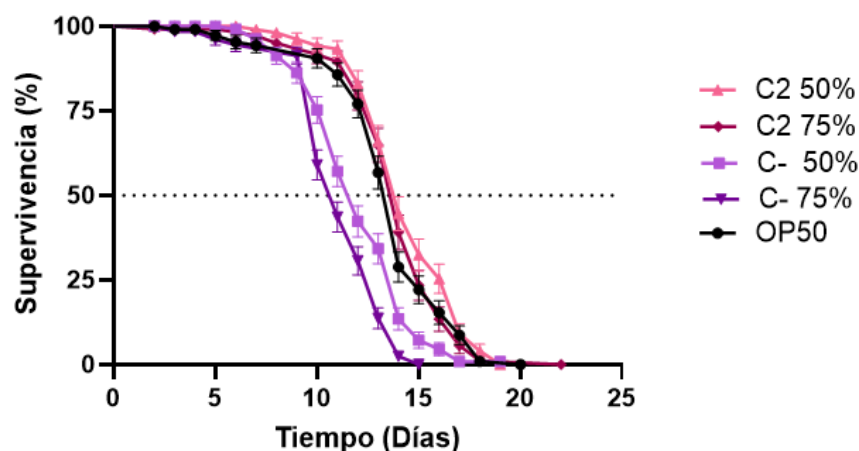


Figura 7.6. Supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentado con OP50 (control) y los jugos en cocultivo C2 (jugo fermentado con suero y *L. casei* + *L. rhamnosus*) y C- (jugo con suero sin inóculo) a 20 °C.

7.3.3. Parámetros de bienestar por el consumo de jugo fermentado

En la Figura 7.6 se aprecian los resultados de la movilidad, fertilidad y bombeo faríngeo. La movilidad es un indicador del bienestar neuromuscular, ya que el nematodo puede desplazarse en busca de alimento mediante un recorrido de forma sinusoidal. Cuando estos animales envejecen o por un proceso patológico o de intoxicación, su movilidad disminuye considerablemente a través del tiempo.

A partir del día 4 de la adultez, la movilidad de los animales en cualquiera de los tratamientos con jugo fue superior al control experimental (OP50). Al día 8 posterior al inicio del tratamiento, los animales con jugo C2 al 75% y C-, aunque disminuyó casi un 50 % su movimiento en comparación con el inicio, mantuvieron la motilidad superior al control. Al día 12, en todos los tratamientos (excepto C2 al 75%) se apreció disminución significativa de la movilidad, en comparación con el control (Figura 7.6 A).

La fertilidad es un parámetro importante que se evalúa para conocer las posibles vías de extensión de la vida útil, aunque no está directamente relacionado con la toxicidad. Los animales mantienen la fertilidad activa entre 16 y 24 h aproximadamente después de pasar a la etapa L4, por lo que el conteo se inició el día 1. Se observó que en el control experimental el número total de progenie fue cercano a 200 huevos por animal. En cambio, los animales tratados con jugos iniciaron con una fertilidad menor que la del control experimental (OP50). Al día siguiente, únicamente el grupo del jugo C- al 75% mostró mayor fertilidad, y al cuarto día la fertilidad de los grupos C2 y C- al 75% fue mayor que la del control.

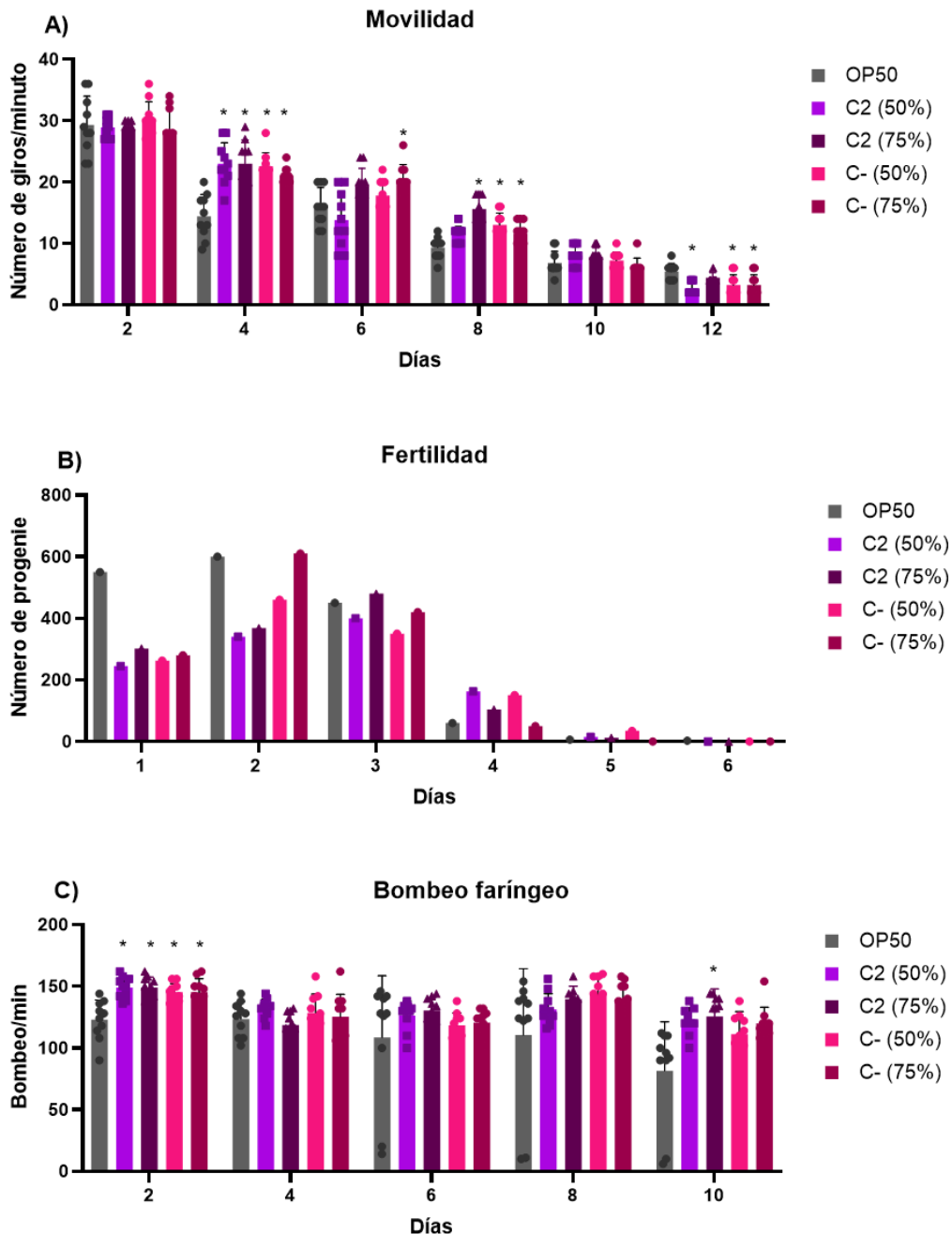


Figura 7.7. Parámetros de bienestar de *Caenorhabditis elegans* alimentado con el jugo + suero en co-cultivo C2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*) o sin inóculo de BAL (C-) a 50 y 75%. B) Movilidad determinada como el número de giros por animal en un minuto; B) progenie por cada 10 animales por día; C) bombeo de la faringe por minuto por 10 animales por experimento. Las barras representan la media con su desviación estándar. Significancia * $p < 0.05$, mediante una prueba de Dunnett versus OP50.

El bombeo faríngeo es un indicativo indirecto de que los animales están consumiendo el alimento. Si los animales evitan el alimento, activarán mecanismos de restricción calórica y aumentará su tiempo de vida gracias a estos mecanismos. En la evaluación de este parámetro, se observó que desde el primer día de exposición el bombeo faríngeo fue significativamente mayor en los grupos experimentales. Al transcurso de los días se mantuvo el bombeo faríngeo semejante al grupo control y al final de la observación (día 10), el bombeo faríngeo fue únicamente superior en el grupo C2 al 75% (Figura 7.6 C).

7.3.3. Estrés oxidativo

Debido a que a lo largo de esta investigación se ha analizado la composición del jugo y la producción de analitos que incrementen su capacidad antioxidante, en este experimento se expusieron a peróxido de hidrógeno 8 mM sin alimento, para evaluar su supervivencia. Se observó que los animales previamente alimentados con *L. rhamnosus* incrementaron su vida máxima, que fue de 3 horas más que el control ($p < 0.001$). En cambio, en los animales pre alimentados con *L. brevis* y *P. acidilactici*, disminuyó significativamente su vida media y vida máxima (Figura 8.4).

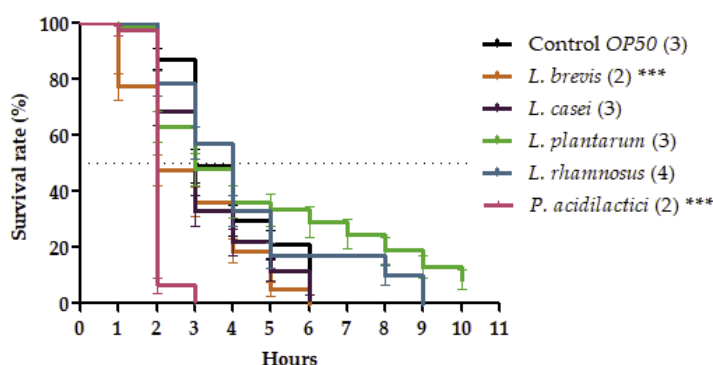


Figura 7.8. Supervivencia de *Caenorhabditis elegans* al estrés oxidativo (H_2O_2 8 mM), posterior a 4 días de alimentación con las cepas de bacterias ácido lácticas o con el alimento (OP50). Los números dentro de los paréntesis indican la vida media versus el control OP50: *** $p < 0.001$.

Posteriormente, se evaluó la supervivencia de los animales cuando fueron pre alimentados durante 5 días con su alimento estándar (*E. coli* OP50) y cada uno de los jugos en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*), en co-cultivo (C2) y sin inóculo (C-), a 3 diferentes diluciones (25, 50 y 75%) y posteriormente se expusieron a estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno 8 mM sin alimento).

En el grupo control se observó una disminución súbita de la supervivencia en las primeras cuatro horas. Se puede identificar que a las 4 horas, los jugos con inóculo

tuvieron mayor resistencia que el grupo control y el jugo sin inóculo C- (Figura 7.8). En los jugos sin inóculo C-, la dilución a 25% permitió incrementar significativamente la vida máxima y se apreció una diferencia en el área bajo la curva del jugo C- al 50% en comparación con el grupo control. Las 3 diluciones del jugo en monocultivo y en co-cultivo C2 permitieron resistencia a las condiciones estresantes por el incremento de su vida máxima. Sin embargo, únicamente el tratamiento previo con C2 al 75% permitió el incremento de la vida media respecto al control (Tabla 7.2).

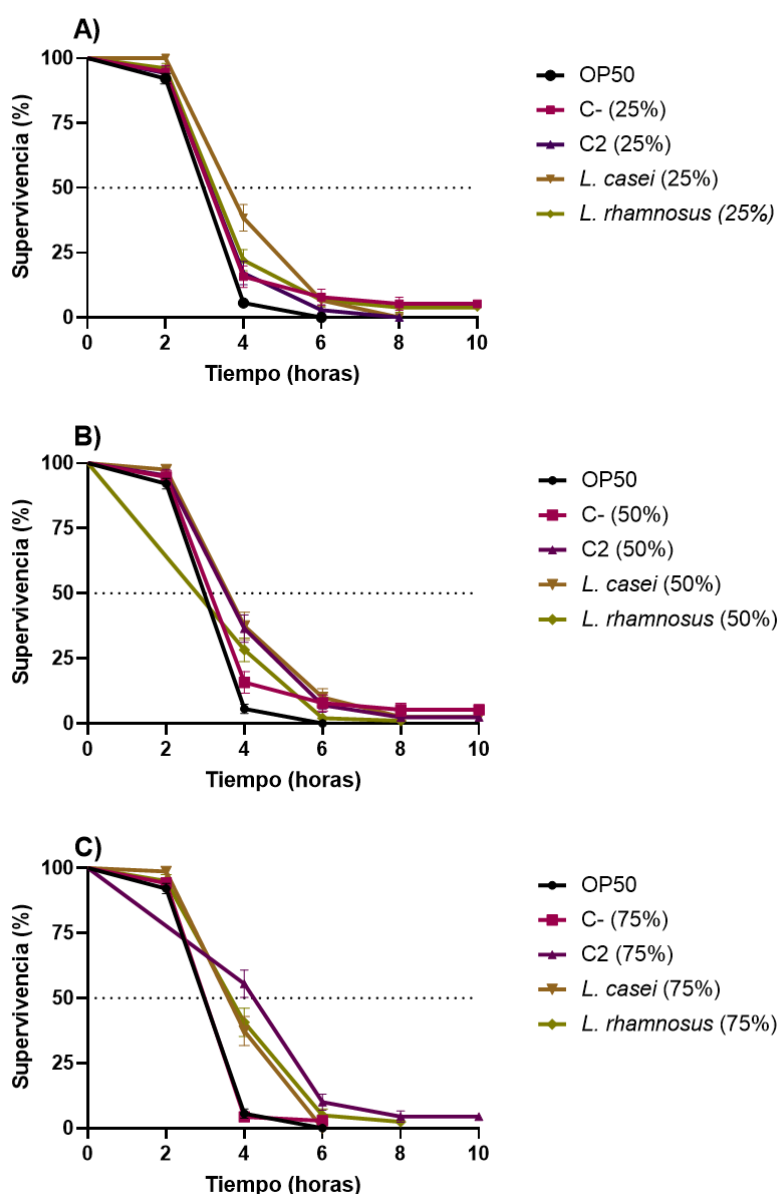


Figura 7.9. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* al estrés oxidativo (H_2O_2 8 mM), posterior a 4 días de alimentación con el control (OP50), jugo fermentado sin inóculo (C-), jugo fermentado con el co-cultivo (*L. casei* + *L. rhamnosus*) o en monocultivo (*L. casei* o *L. rhamnosus*) a 3 diluciones: A) 25%, B) 50% y C) 75%.

Tabla 7.2. Parámetros de supervivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentados con OP50 (control) y con los jugos en co-cultivo C2 y C- al 25, 50 y 75%.

Tratamiento	Horas de vida media	Horas de vida máxima	P vs OP50
OP50	4	6	– – –
C- 25%	4	10	0.0017
C- 50%	4	6	0.0150
C- 75%	4	6	0.7965
C2 25%	4	8	0.0066
C2 50%	4	10	<0.0001
C2 75%	6	10	<0.0001
<i>L. casei</i> 25%	4	8	<0.0001
<i>L. casei</i> 50%	4	10	<0.0001
<i>L. casei</i> 75%	4	6	<0.0001
<i>L. rhamnosus</i> 25%	4	10	<0.0001
<i>L. rhamnosus</i> 50%	4	8	<0.0001
<i>L. rhamnosus</i> 75%	4	8	<0.0001

7.3.4. Exposición de *Caenorhabditis elegans* a *Staphylococcus aureus*

En el esquema de tratamiento por 5 días previo a la infección, se observó una disminución de la supervivencia en todos los grupos, a excepción del jugo en co-cultivo C2 al 75% (Figura 7.9). Una vez expuestos los animales a *S. aureus* a los 6 días observamos una disminución súbita en los controles (OP50, *S. aureus* y vancomicina). Al término del experimento, el área bajo la curva del jugo con C2 tuvo una vida media y máxima mayor al del control OP50, *S. aureus* y vancomicina (Tabla 7.3).

En comparación al tratamiento posterior a la infección, el control positivo de patógeno (*S. aureus*) y del antibiótico (vancomicina) tuvieron mayor supervivencia que el control experimental (OP50). Al final del experimento, el tratamiento con vancomicina incrementó significativamente la vida media y máxima en comparación con *S. aureus*. El tratamiento con el jugo C2 permitió un incremento de la vida máxima en comparación con *S. aureus* y no se determinaron diferencias significativas al comparar con la supervivencia de vancomicina. El grupo C- no tuvo una diferencia significativa en el

incremento de la vida media o máxima contra el control experimental y su supervivencia fue estadísticamente inferior a la de *S. aureus* y vancomicina (Figura 7.9 y Tabla 7.3).

En el experimento de co-exposición, cuando los animales se expusieron desde la etapa L4 a los compuestos experimentales (C2 y C-) y al patógeno, se observó una caída de la supervivencia de los animales alimentados con jugo C-, incluso menor que el control del experimento (OP50). Curiosamente, en este ensayo, el grupo con *S. aureus* tuvo mayor supervivencia que el control, el antibiótico y el jugo con C2, lo cual fue estadísticamente significativo. En cambio, el co-tratamiento con C2 no fue suficiente para incrementar la supervivencia.

Tabla 7.3. Parámetros de supervivencia a 25 °C de *Caenorhabditis elegans* alimentado con OP50 (control) y jugo fermentado en cocultivo (C2) y sin inóculo (C-) frente a la infección con *Staphylococcus aureus*.

Tratamiento	Días de vida media	Días de vida máxima	P vs <i>S. aureus</i>	P vs Vancomicina
Tratamiento previo a la infección con <i>S. aureus</i>				
OP50	6	8	0.5153	0.6670
<i>S. aureus</i>	6	10	NA	0.9975
Vancomicina	5	9	0.9975	NA
C- 75%	6	11	0.0583	0.1536
C2 75%	7	19	<0.0001	<0.0001
Tratamiento posterior a la infección con <i>S. aureus</i>				
OP50	11	16	<0.0001	<0.0001
<i>S. aureus</i>	14	19	NA	<0.0001
Vancomicina	16	21	<0.0001	NA
C- 75%	12	20	0.5372	<0.0001
C2 75%	14	23	0.0079	0.6734
Co-exposición de los jugos con <i>S. aureus</i>				
OP50	11	16	<0.0001	<0.0001
<i>S. aureus</i>	16	20	NA	0.3136
Vancomicina	14	22	0.3136	NA
C- 75%	9	10	<0.0001	<0.0001
C2 75%	11	16	0.0031	0.2264

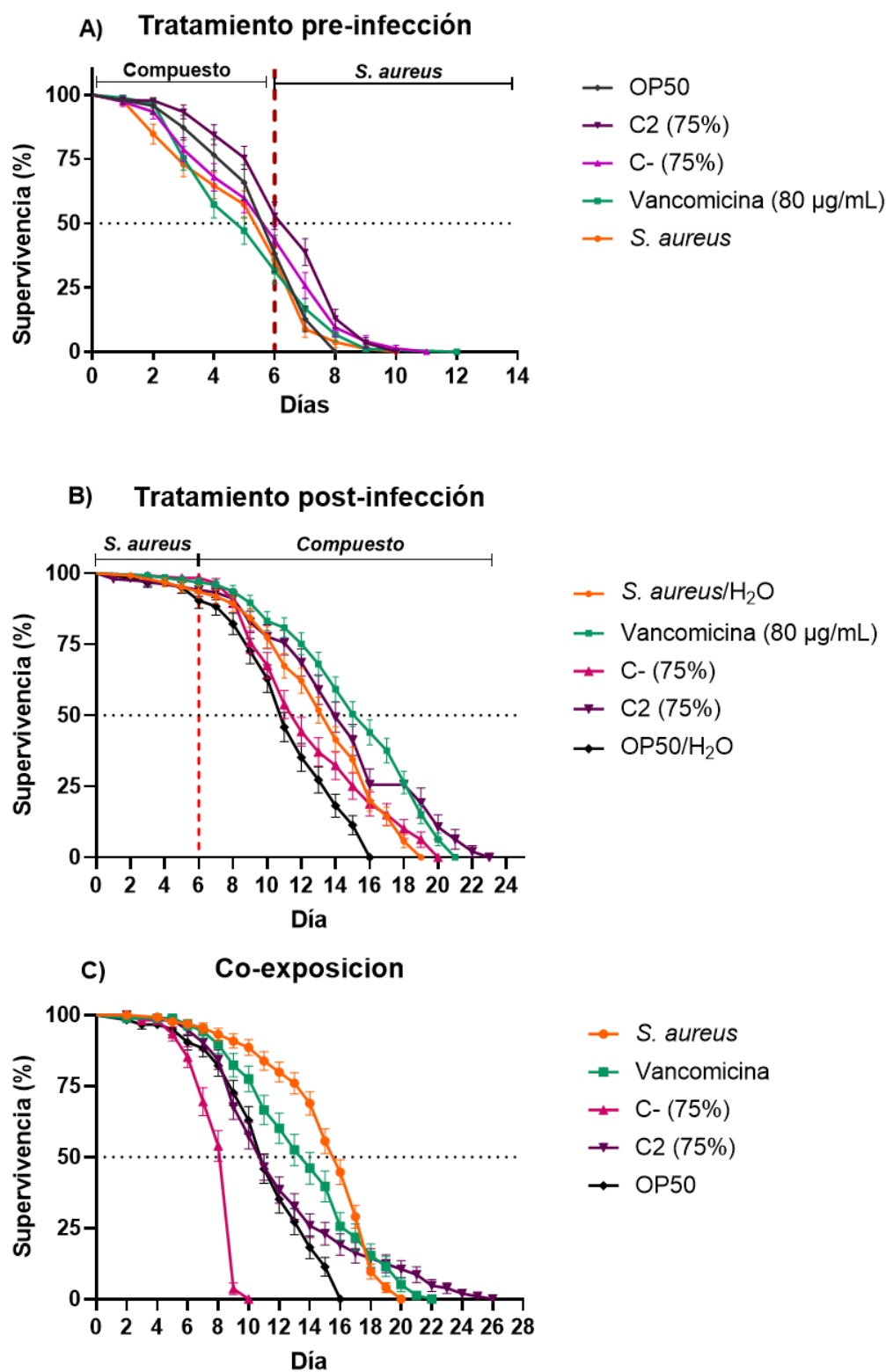


Figura 7.10. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* en las tres estrategias de infección por *S. aureus*. A) tratamiento con compuesto previo a la infección; B) Tratamiento posterior a 5 días de infección con *S. aureus*; C) co-exposición de *S. aureus* con el compuesto.

En los análisis de cuenta viable en los nematodos, no hubo diferencias significativas en los tratamientos a los diferentes días. Únicamente al día 7 el C- fue estadísticamente menor que *S. aureus* (7 vs 7.5 log UFC/mL, respectivamente). En la coexposición, C2 al día 3 tuvo menor cuenta viable que *S. aureus* (Tabla 7.4).

Tabla 7.4. Cuenta viable de *S. aureus* en diferentes tratamientos con jugo fermentado

Días	1	3	5	7	9
Tratamiento pre-infección					
Muestra	Pre-infección			Tratamiento	
C2 75%	7.6±0.20 ^{A,a}	5.6±0.15 ^{Ab}	7.6±0.05 ^{A,a}	7.7±0.25 ^{A,a}	7.6±0.30 ^{A,a}
C- 75%	7.3±0.35 ^{A,a}	5.6±0.00 ^{A,b}	7.5±0.17 ^{A,a}	7.0±0.32 ^{B,a}	7.3±0.05 ^{A,a}
Vancomicina	6.9±0.45 ^{A,a}	5.2±0.15 ^{B,b}	7.3±0.05 ^{A,a}	7.4±0.05 ^{AB,a}	7.3±0.00 ^{A,a}
<i>S. aureus</i>	7.8±0.47 ^{A,a}	5.0±0.05 ^{B,b}	7.3±0.35 ^{A,a}	7.5±0.15 ^{AB,a}	7.7±0.20 ^{A,a}
Tratamiento post-infección					
Muestra	Tratamiento			Post-infección	
C2 75%	-	-	-	7.3±0.05	7.5±0.11
C- 75%	-	-	-	7.4±0.17	7.5±0.15
Vancomicina	-	-	-	7.6±0.05	6.6±0.10*
<i>S. aureus</i>	-	-	-	7.5±0.17	7.6±0.05
Tratamiento en co-exposición					
Muestra	Tratamiento + infección				
C2 75%	7.2±0.17 ^{A,a}	4.2±0.11 ^{B,b}	7.3±0.05 ^{A,a}	-	-
C- 75%	7.2±0.10 ^{A,a}	5.3±0.30 ^{A,b}	7.6±0.15 ^{A,a}	-	-
Vancomicina	7.4±0.41 ^{A,a}	5.4±0.65 ^{A,b}	7.3±0.15 ^{A,a}	-	-
<i>S. aureus</i>	7.9±0.49 ^{A,a}	5.0±0.05 ^{AB,b}	7.2±0.37 ^{A,a}	-	-

C2: consorcio 2 (*L. casei*+*L. rhamnosus*), C-: Jugo sin inóculo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa entre las diferentes muestras por día. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre los diferentes días por cada muestra. *Indica diferencia significativa.

7.3.5. Exposición a *Helicobacter pylori*

Se obtuvo que tanto los antibióticos, como la mezcla de los jugos con los antibióticos, incrementaron la vida media y máxima respecto al control del experimento, observando mayor incremento de la vida media en C2 en comparación con el jugo (Figura 7.10 y Tabla 7.5) y en general el tratamiento con metronidazol incrementó significativamente la supervivencia en comparación a todas las muestras.

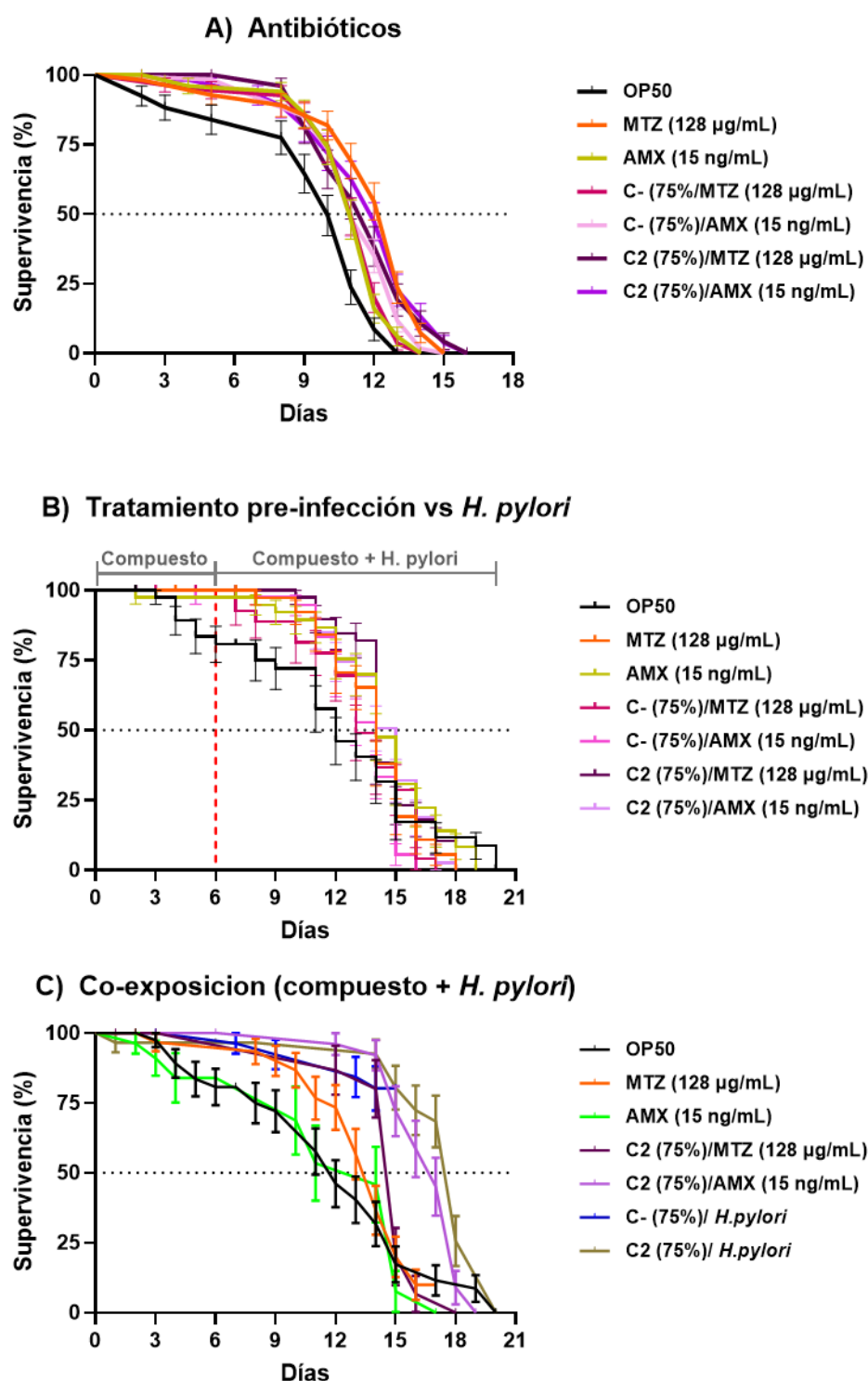


Figura 7.11. Sobrevida de *Caenorhabditis elegans* frente a *Helicobacter pylori*. A) Efecto de los antibióticos utilizados para controlar la infección de *H. pylori*; B) tratamiento con compuestos previo a la infección; C) co-exposición de *H. pylori* con el compuesto.

En el ensayo de tratamiento con los jugos previo a la infección con *H. pylori*, no se observó un efecto significativo en la supervivencia de los animales con C2. Sin

embargo, la combinación de C- con amoxicilina resultó estadísticamente menor en la vida máxima en comparación con el control de antibiótico con amoxicilina (Tabla 7.5).

Tabla 7.5. Parámetros de sobrevivencia de *Caenorhabditis elegans* alimentado con OP50 (control), con jugo fermentado en co-cultivo (C2) y sin inóculo (C-) frente a la infección por *Helicobacter pylori*.

Tratamiento	Días de vida media	Días de vida máxima	P vs OP50	P vs MTZ	P vs AMX
Antibióticos					
OP50	10	13	— — —		
MTZ (128 µg/mL)	13	15	<0.0001		
AMX (15 ng/mL)	11	14	0.0034		
C- MTZ	11	14	0.0022		
C- AMX	11	15	<0.0001		
C2 MTZ	12	16	<0.0001		
C2 AMX	12	16	<0.0001		
Tratamiento previo a la infección con <i>H. pylori</i> y antibióticos					
OP50	12	20	— — —	0.0486	0.3049
MTZ	14	18	0.0486	— — —	0.1541
AMX	14	19	0.3049	0.1541	— — —
C- MTZ	13	17	0.7098	0.5410	0.0992
C- AMX	14	16	0.9739	0.1520	0.0126
C2 MTZ	14	18	0.0791	0.1451	0.9571
C2 AMX	15	18	0.3067	0.3955	0.4616
Co-infección con <i>H. pylori</i>					
OP50	12	20	— — —	0.4374	0.4690
MTZ	14	17	0.4374	— — —	0.4036
AMX	14	17	0.4690	0.4036	— — —
C2 MTZ	15	18	0.1516	0.1553	0.0367
C2 AMX	17	19	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C- <i>H. pylori</i>	17	14	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C2 <i>H. pylori</i>	18	19	<0.0001	<0.0001	<0.0001

AMX, amoxicilina 15 ng/mL; MTZ, metronidazol 128 µg/mL

Interesantemente, en el ensayo de co-exposición de los nematodos a *H.pylori* y su respectivo tratamiento con y sin antibiótico, se identificó que el tratamiento con C2 + metronidazol incrementó significativamente la supervivencia más que el control de metronidazol ($p=0.0367$). Cuando se mezcló el jugo C2 con amoxicilina (15 ng/mL), este tratamiento incrementó significativamente la supervivencia en comparación con el control OP50, metronidazol y amoxicilina ($p<0.0001$). Finalmente, la coexposición de *H. pylori* y el jugo C2 tuvo mayor supervivencia, evaluada por un incremento significativo de la vida media y la vida máxima respecto a los controles (Figura 7.10 y Tabla 7.5).

7.4. Discusión

En esta última etapa, se analizó el efecto de la ingesta del jugo en co-cultivo con *L. casei* + *L. rhamnosus*, sin inóculo (C-) y en monocultivo en *C. elegans*, con la finalidad de determinar su efecto en el tratamiento preventivo, durante la infección y posterior a la infección con *S. aureus* y *H. pylori*. A través de los experimentos se demostró que las cepas de *L. rhamnosus* y *L. casei* proveen incremento de la vida media en el nematodo. Cuando se alimentan los nematodos con el jugo C2, aunque por sí solos no incrementan la vida media en las diluciones al 75 y 50%, se observó mayor resistencia al estrés oxidativo. En los esquemas de pre y post infección con *S. aureus*, C2 mostró un efecto protector al aumentar la vida máxima del nematodo, aunque en la cuenta viable no se observaron diferencias significativas. Finalmente, en la co-infección con *H. pylori*, el aumento de la supervivencia de los nematodos tratados con C2 fue superior al tratamiento con antibióticos.

7.4.1. Toxicidad del jugo en *C. elegans*

Los experimentos de toxicidad aguda son útiles para definir las concentraciones seguras de trabajo en la exposición con *C. elegans*. El consumo del jugo de zarzamora con y sin suero de leche y fermentados por 16 h a 37° C, no mostraron toxicidad en el nematodo. Son pocos los estudios que evalúan los efectos del consumo de extractos de zarzamora en el nematodo y no se ha documentado efecto letal a las 24 horas en *C. elegans* (29-30).

Cuando los animales se expusieron sin alimento bacteriano a los jugos en monocultivo fermentados con *L. casei* o *L. rhamnosus*, o en co-cultivo a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%), los jugos concentrados mostraron disminución de la supervivencia en no más de 10 puntos porcentuales. Si bien, no se ha documentado previamente toxicidad por jugo de zarzamora fermentado en *C. elegans*,

se ha reportado en otros jugos de frutas una disminución de la supervivencia comparable.

En un jugo de kiwi y pitahaya fermentado por 15 días con *Saccharomyces cerevisiae* al 12% y posteriormente una segunda fermentación con 6% de *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus thermophilus* durante 9 días, observaron una tasa de supervivencia del 94% cuando se alimentó a *C. elegans* con el jugo fermentado a 50%. Cuando se alimentaron con el jugo concentrado, la tasa de supervivencia se redujo a 43.95% (31). Otro estudio, en donde se formuló una bebida de leche de mijo perla inoculada con *L. plantarum* DHCU 70 y *L. plantarum* MCC 5231 al 10% y adicionada con polvo endulzado al 5%, reportaron que en las concentraciones de 100 a 200 µg/mL, mantienen una tasa de supervivencia del 97 al 95%. A concentraciones de 250 µg/mL la supervivencia disminuyó al 85–87%, a concentraciones de 300 µg/mL la supervivencia cayó a un rango de 37–40% (32), por lo que los investigadores realizaron los siguientes experimentos en las concentraciones menores a 200 µg/mL. Por lo anterior, se consideró trabajar con las concentraciones de 50 y 75% en los experimentos crónicos de supervivencia, ya que no se observó disminución de la misma en más del 90%.

7.4.2. Efecto del consumo del jugo fermentado en la sobrevida de *C. elegans*

En los ensayos de lifespan se demostró que cuando los nematodos se alimentaron desde la etapa L4 con *L. rhamnosus* o con *L. casei*, su vida media y vida máxima incrementan en comparación con los nematodos alimentados con la bacteria *E. coli* OP50. Este incremento está acorde por lo reportado previamente con diferentes cepas de *L. rhamnosus*, con un incremento de la vida media desde 9.6 hasta 42,9%. Este incremento más alto se observó con la cepa Lcr35, aislada del intestino de un infante adulto (33). En cepas aisladas de quesos fermentados, *L. rhamnosus* R4 incrementó la vida media en *C. elegans* hasta un 36% (34), mientras que *L. rhamnosus* KF7 aislada de kefir, únicamente disminuyó un 0.6% la vida media del nematodo (35). Estos datos podrían sugerir que la fuente de las cepas podría contribuir al efecto en el nematodo.

Cuando los nematodos se alimentaron con *L. casei* únicamente, se observó un incremento del 16.6% en la vida media en comparación con el grupo control (OP50). Informes anteriores mostraron diferentes efectos en cuanto a la extensión de la vida útil, desde un incremento en la vida media del 0,23% hasta un 42%. Cuando los nematodos se alimentan con *L. casei* 63 (aislada de un paciente con síndrome de intestino corto), se observó un incremento de la vida media de 38,5% más que OP50 (36). Sin embargo, *L. casei* LBC80R aislado de muestras fecales solo mostró un

aumento de la vida útil del 0,23% (37). *L. casei* HY2782 aislada de yogurt fermentado, extendió la vida útil en un 25% en animales pretratados con *P. aeruginosa* (38-39). Por tanto, podría sugerirse que la fuente de bacterias ácido lácticas y el pretratamiento con patógenos podrían ser factores importantes para inducir una respuesta molecular que incremente la supervivencia.

Interesantemente cuando los nematodos se alimentan a partir de la etapa L4 con el jugo fermentado en co-cultivo C2 al 50 y 75% no hay un incremento de la vida media y máxima. En cambio, el jugo fermentado sin inóculo al 50 y 75% disminuyeron su vida media y máxima respecto al control OP50. No se ha reportado previamente que extractos de zarzamora o de frutos rojos puedan tener este efecto “tóxico”, por lo que resulta difícil la explicación. Sin embargo, se puede considerar que el jugo sin inóculo (C-) tiene mayor contenido de azúcares reductores a las 16 h de fermentación (capítulo III) y mayor contenido de compuestos fenólicos (capítulo IV), lo que podría interferir a nivel mecanístico en el aumento de la esperanza de vida. Por ejemplo, en un estudio previo se analizó la toxicidad causada por la glucosa (10 mM) en el nematodo frente a diferentes plantas con alto contenido de compuestos fenólicos, incluyendo hojas de zarzamora y bayas de saúco. Los investigadores demostraron que no necesariamente un alto contenido de polifenoles corresponde a un incremento en la vida media del nematodo y el efecto de los polifenoles contra la toxicidad por glucosa puede ser restaurador, pero nunca incrementan la vida media del nematodo (28). Por tanto, resulta interesante investigar si la esperanza de vida del nematodo depende de las concentraciones de glucosa en el jugo.

7.4.3. Efecto del consumo del jugo en los parámetros de bienestar en *C. elegans*

Los parámetros de movilidad, fertilidad y bombeo faríngeo apoyan a determinar si el alimento les produce cambios en el comportamiento (4). En cuanto a la movilidad se observó en los primeros 4 días que todos los animales alimentados con jugo fermentado C2 y sin inóculo (C-) al 50 y 75% mantuvieron el patrón de movimiento. Al día 12, únicamente C2 al 75% mantuvo el patrón de movimiento semejante al control, mientras que se observó menor movilidad en los tratamientos restantes.

En cuanto a la movilidad, se puede identificar un papel importante de las BAL en la conservación de la actividad neuromuscular. Liao et al. (2025) (1), reportaron que las cepas comerciales *L. plantarum* TWK10 y *L. rhamnosus* GG aumentaron la velocidad de movimiento, así como la flexión corporal en el día 1 y 5 de la edad adulta, significativamente mayor que el control (OP50). También analizaron el efecto del consumo de *L. plantarum* TWK10 en ratones y en un ensayo clínico. La administración

oral de *L. plantarum* TWK10 1×10^{10} UFC/día durante dos semanas redujo los niveles de lactato sérico y mejoró el rendimiento físico y el almacenamiento de glucógeno. Lo anterior sugiere que el ácido láctico puede tener un papel importante en este parámetro, dado que en el capítulo III se demostró que el jugo de zarzamora fermentado con C2 (*L. casei* + *L. rhamnosus*), tiene mayor contenido de ácido láctico al final de la fermentación de 16 horas.

En cuanto al bombeo faríngeo, se observó que el tratamiento con jugo C2 al 75% preserva activamente las contracciones musculares, parámetros del mantenimiento del bienestar del animal. En este sentido, Cheng et al, ha informado de un aumento en la flexión corporal y el bombeo faríngeo con *L. rhamnosus* GG y *L. rhamnosus* KF7 (40). La capacidad de *L. rhamnosus* para mantener la locomoción y la actividad faríngea durante períodos más prolongados indica que la suplementación con probióticos puede ayudar a preservar las funciones neuromusculares y de alimentación, que son marcadores críticos de la longevidad saludable.

En cuanto a la fertilidad, observamos que en los primeros dos días, los animales con jugo C2 y C- disminuyen su capacidad reproductora. El impacto de las BAL en la fertilidad resalta la complejidad de las interacciones entre los probióticos y los huéspedes. Chelliah et al., (2018) (41) reportaron que los gusanos alimentados con 35 cepas de BAL mostraron menor fertilidad que aquellos alimentados con OP50. Yu et al. (2024) (42) también indicaron que las BAL activas utilizan recursos y energía en el intestino de los nematodos para mantener la supervivencia y la reproducción. Para dilucidar estas disparidades, es imperativo especificar cómo cada cepa emplea nutrientes e influye en el gasto energético para mantener la fertilidad del huésped. Esta variabilidad sugiere que las diferencias en la reproducción pueden estar vinculadas a cómo cada cepa ajusta sus procesos reguladores.

7.4.4. Efecto del consumo del jugo fermentado en la resistencia de *C. elegans* al estrés oxidativo

De manera similar, los experimentos de estrés oxidativo demostraron que las BAL podrían inducir sistemas antioxidantes, lo que les permite neutralizar especies reactivas de oxígeno, quelar iones metálicos prooxidantes y regular genes de respuesta al estrés del huésped. Estas propiedades pueden explicar su capacidad para conferir protección contra el daño oxidativo y promover el equilibrio redox (43). En esta investigación, la resistencia al estrés oxidativo no fue significativa para *L. rhamnosus* y perjudicial para *L. brevis* y *P. acidilactici*, por lo que el experimento apoyó la decisión de seleccionar el co-cultivo C2 y no el C1, que en los capítulos primeros se formuló para evaluar sus propiedades y su efecto antibacteriano.

En estudios sobre estrés oxidativo en animales expuestos a bebidas fermentadas, se observó que únicamente C2 al 75% proporciona mayor resistencia al nematodo ante concentraciones altas de peróxido de hidrógeno. En estudios previos se reportó que los nematodos alimentados con *L. rhamnosus* Lcr35, no soportaron la exposición a peróxido de hidrógeno 3 mM. Los investigadores creen que este desequilibrio se debe a la sobreproducción de la enzima superóxido dismutasa-3 (*sod-3*) y la falta de catalasa o de peroxidasas para descomponer eficazmente el peróxido de hidrógeno (33). Thiruppathi et al. (2024) demostraron que *L. brevis* aumentó su supervivencia en un 45% bajo estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno a 10 mM, posterior a 2 h de exposición. La reducción de ROS intracelulares y el aumento de la expresión de *sod-3* y *gst-4* podrían explicar las dianas moleculares (44). Además, Kumar et al. (2022) (45) observaron que *L. brevis* MTCC 1759 aumenta la expresión de *sod-3*. La activación de esta enzima ocurre de manera dependiente de *daf-16* (FOXO), una vía utilizada por el animal para la supervivencia, relacionada con la vía de la insulina en mamíferos. Por tanto, las diferencias observadas entre cepas sugieren la participación de distintos mecanismos moleculares que requieren investigación, incluyendo la activación de factores de transcripción como *daf-16* y *skn-1/nrf2*, y la regulación de genes diana como *sod-3* y *gst-4*, observadas en *L. brevis* y *L. casei* (38-45).

7.4.5. Efecto del consumo del jugo en *C. elegans* frente *S. aureus*

Desde la década de los 90s, se ha utilizado *C. elegans* como modelo de infección por patógenos. Aun cuando el animal se alimenta de bacterias como *E. coli*, cuando se expone a *P. aeruginosa* disminuye significativamente su esperanza de vida. Otros patógenos que se han empleado como modelo de infección incluyen *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* sp., *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* y *S. aureus* (21). Este último patógeno puede acumularse significativamente en el intestino de *C. elegans* a partir de las 4 h de su exposición y, posterior a este tiempo, puede acumularse en los extremos anterior y posterior del intestino. Los signos físicos de la infección son movimientos disminuidos, más pequeños y disminuye su fertilidad (46).

En este estudio, se observaron diferentes respuestas del nematodo ante la infección por *S. aureus*. En todos los esquemas de infección, los animales iniciaron desde la etapa L4 y cuando se expusieron los animales al día 6 de adultez, la supervivencia descendió drásticamente (Figura 7.9 A). Sin embargo, cuando se exponen al patógeno desde la etapa L4, la supervivencia de *C. elegans* con el patógeno es superior, incluso a la del control OP50 (Figura 7.9 B y C). Respecto a este

incremento de la esperanza de vida, se ha reportado que en la infección por *S. aureus*, la inhibición de la lipasa Y51H4A.5 puede provocar resistencia a la muerte. Asimismo, el nematodo, como respuesta, puede inducir la expresión de genes de defensa que activan lisozimas que degradan la peptidoglicana y estas enzimas se pueden encontrar en células humanas (46). Por lo anterior, quedan por analizar diferentes cepas de *S. aureus* con patogenicidad diversa.

En cuanto al efecto del jugo en cada uno de los esquemas, se puede resaltar que no se observó efecto en el tratamiento C- previo a la infección por *S. aureus*, mientras que se observó un ligero incremento significativo en la esperanza de vida del nematodo alimentado con C2, por lo que se sugiere que el efecto no se debe únicamente a la composición del jugo. Este efecto se perdió cuando se infectaron los animales desde la etapa L4. Al respecto, previamente se reportó que la administración de la cepa de *Lactiplantibacillus brownii* MH-1 aislada de chucrut provoca un incremento de la supervivencia en *C. elegans* infectados con *S. aureus* únicamente cuando se exponen en la etapa larvaria (L1 a L4) y no en la adulta, lo cual se debe a la activación de *daf-16/FOXO* y *pmk-1/p38* (47). Sin embargo, se requiere mayor evidencia para sostener que el efecto de resistencia depende de la etapa en que fueron infectados.

En los análisis de cuenta viable, se identificó una disminución de *S. aureus* únicamente a los tres días de exposición en el grupo C2 al 75% en el esquema de coexposición. Este efecto no se observó en los días subsecuentes. Para discutir este punto, es importante resaltar que en ninguno de los esquemas de tratamiento C2 mostró ser tóxico, lo cual sí ocurrió con C- en el esquema de coexposición (Figura 7.9 B y C). Lo anterior evidencia que las BAL tienen un papel determinante en el tratamiento de patógenos intestinales. Los mecanismos moleculares de la infección por *S. aureus* no se encuentran del todo dilucidados, pero la investigación de Irazoqui et al, (2010) reveló consideraciones importantes. Primeramente, a las 8 h de infección, se activa una respuesta de detoxificación de xenobióticos. A las 36 h, *S. aureus* puede destruir totalmente las microvellosidades del intestino, posiblemente debido a sus toxinas bacterianas. Sin embargo, a las 72 horas, se identificaron más de 46 genes reguladores de defensa protectora de *S. aureus* en *C. elegans* e incluyen *tag-38* (glutamato descarboxilasa/esfingosina fosfato liasa), *sodh-1* (sorbitol deshidrogenasa), *cyp-37B1* (citocromo P450), F43C11.7 (proteína que contiene F-box), *math-38* (proteína de señalización que contiene el dominio MATH) y *clec-70* (CTL secretado) (46). Por lo anterior, las investigaciones futuras se dirigen a evaluar la expresión de genes que podrían interferir con la patogenicidad de *S. aureus* y la respuesta de *C. elegans* a través del tiempo.

Debido a que los resultados de esta etapa se han realizado conociendo las propias limitaciones del uso del nematodo, las ventajas evidentes son que el jugo C2 no presenta toxicidad en este organismo y que podría tener efectos en las primeras horas de tratamiento. Se sugiere que la estrategia para continuar estos estudios en mamíferos sea un esquema preventivo más que un esquema correctivo.

7.4.6. Efecto del consumo del jugo en *C. elegans* frente *H. pylori*

La infección de *C. elegans* por *H. pylori* ha sido abordada de una forma muy limitada en la bibliografía. Al discutir los esquemas de exposición en seminarios, el personal clínico sugirió analizar el esquema en combinación con los antibióticos, dado que existe el interés de que el jugo pueda proporcionarse durante la infección y el tratamiento con los antibióticos.

En este estudio, primero analizamos el efecto de la combinación de los jugos con los antibióticos para evaluar la toxicidad,, y se encontró que ninguno de los jugos en combinación con los antibióticos presentó una vida media menor que la del grupo control (OP50), y el mayor incremento del lifespan fue observado en los animales tratados con metronidazol, seguido de los tratamientos con C2. No existen estudios previos sobre el efecto de metronidazol y amoxicilina en el incremento de la esperanza de vida en *C. elegans*. Bonuccelli et al, (2023), demostraron que el antibiótico doxiciclina y azitromicina, que actúan como inhibidores de ribosomas mitocondriales, aumentan la esperanza de vida en el nematodo a través de la disminución del consumo de energía (48). Resulta importante evaluar si el mecanismo de acción de los antibióticos está relacionado con la actividad mitocondrial.

En cuanto a la exposición con *H. pylori*, no observamos un incremento significativo en la esperanza de vida de los grupos tratados con C2 previo a la infección, aunque sí fue mayor para el grupo de C- con amoxicilina versus solo el antibiótico. En la coinfección con *H. pylori* se observó aumento significativo de la vida media en los grupos tratados con C2 al 75% combinados con amoxicilina, así como C- y C2 al 75% sin antibiótico, lo cual resultó favorable para definir el posible tratamiento en mamíferos. Incluso, la vida media máxima en este tratamiento se debió al consumo de C2 sin antibiótico.

Previamente, Palacios-Gorba et al, (2020) realizaron una infección del nematodo con *H. pylori* disminuye la fertilidad y la vida media en los primeros 6 días, lo cual fue revertido por diferentes especies de algas *Phaeophyceae* (*Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida*, *Macrocystis pyrifera*) (49). Los mecanismos moleculares de esta protección no fueron investigados, pero se observó un dato importante, un efecto sinérgico con los antibióticos. En esta investigación observamos un mayor efecto del

jugo C2 que el de los propios antibióticos en la coexposición, lo que revela que el mecanismo de acción va más allá de los propios mecanismos de acción de la amoxicilina y metronidazol.

En esta etapa no fue posible determinar la cuenta viable de *H. pylori* debido a la limitada cantidad de cepa que obtuvimos durante la experimentación en las condiciones del laboratorio 1 del Bioterio. Por lo anterior, la interpretación de los resultados de esta etapa debe ser cautelosa.

7.5. Conclusión

Los análisis *in vivo*, utilizando como modelo a *C. elegans* infectado por *S. aureus* y *H. pylori* revelaron que el consumo oral de C2 es útil para el abordaje de las infecciones, más que el jugo sin inóculo (C-), por lo que las BAL juegan un papel determinante en la infección. Si bien aún no se identificaron los blancos moleculares, la protección de las cepas ante condiciones altamente estresantes por peróxido de hidrógeno puede revelar un mecanismo de protección vía estrés oxidativo. Asimismo, la coexposición de C2 con *H. pylori* produjo un incremento significativo en la vida útil del nematodo, aún superior que de los antibióticos o su combinación con el jugo.

Dado que el modelo de *C. elegans* se considera una plataforma para reducir costos de experimentación, los resultados de esta etapa revelan la necesidad de trasladar los conocimientos a modelos animales, sometiendo los análisis bajo un esquema preventivo en *S. aureus* y en un modelo de tratamiento para *H. pylori*.

7.6. Referencias

1. Liao J-F, Lee C-C, Lee M-C, et al. A comprehensive approach, based on the use of *Caenorhabditis elegans*, mouse, and human models, elucidates the impact of *Lactiplantibacillus plantarum* TWK10 on exercise performance and longevity. *Curr Res Food Sci* 2025; 10: 101015.
2. Zanni E, Schifano E, Motta S, et al. Combination of Metabolomic and Proteomic Analysis Revealed Different Features among *Lactobacillus delbrueckii* Subspecies *bulgaricus* and *lactis* Strains While *In Vivo* Testing in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* Highlighted Probiotic Properties. *Front Microbiol* 2017; 8: 1206.
3. Poupet C, Chassard C, Nivoliez A, et al. *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. *Front Nutr* 2020; 7: 135.
4. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook Online Rev C Elegans Biol* 2015; 1–31.
5. Shaye DD, Greenwald I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PloS One* 2011; 6: e20085.
6. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 387–398.

7. Culetto E, Sattelle DB. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 869–877.
8. Zhang B, Xiao R, Ronan EA, He Y, Hsu AL, Liu J, Xu XZ. Environmental Temperature Differentially Modulates *C. elegans* Longevity through a Thermosensitive TRP Channel. *Cell Rep.* 2015;11(9):1414–24. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.066.
9. Anisimov VN, Bartke A. The key role of growth hormone-insulin-IGF-1 signaling in aging and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 87: 201–223.
10. Tullet JMA, Hertweck M, An JH, et al. Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 2008; 132: 1025–1038.
11. Hsu A-L, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 2003; 300: 1142–1145.
12. Millet ACM, Ewbank JJ. Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 4–9.
13. Cohen LB, Troemel ER. Microbial pathogenesis and host defense in the nematode *C. elegans*. *Curr Opin Microbiol* 2015; 23: 94–101.
14. Lei M, Tan Y, Tu H, et al. Neuronal basis and diverse mechanisms of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Front Immunol* 2024; 15: 1353747.
15. Hajdú G, Szathmári C, Sőti C. Modeling Host-Pathogen Interactions in *C. elegans*: Lessons Learned from *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Int J Mol Sci*; 25. Epub ahead of print 27 June 2024. DOI: 10.3390/ijms25137034.
16. Roselli M, Schifano E, Guantario B, et al. *Caenorhabditis Elegans* and Probiotics Interactions from a Prolongevity Perspective. *Int J Mol Sci*; 20. Epub ahead of print 10 October 2019. DOI: 10.3390/ijms20205020.
17. Mahesh R, Ilangoan P, Nongbri D, et al. Probiotics Interactions and the Modulation of Major Signalling Pathways in Host Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Indian J Microbiol* 2021; 61: 404–416.
18. Sugawara T, Furuhashi T, Shibata K, et al. Fermented product of rice with *Lactobacillus kefirianofaciens* induces anti-aging effects and heat stress tolerance in nematodes via DAF-16. *Biosci Biotechnol Biochem* 2019; 83: 1484–1489.
19. Zhao Y, Wu C, Bai J, et al. Fermented barley extracts with *Lactobacillus plantarum* dy-1 decreased fat accumulation of *Caenorhabditis elegans* in a daf-2-dependent mechanism. *J Food Biochem* 2020; 44: e13459.
20. Li W, Gao L, Huang W, et al. Antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented yak milk and their probiotic effects on the oxidative senescence of *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct* 2022; 13: 3690–3703.
21. Kaito C, Murakami K, Imai L, et al. Animal infection models using non-mammals. *Microbiol Immunol* 2020; 64: 585–592.
22. Yun B, Ryu S, Kang M, et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG Increased Longevity and Resistance Against Foodborne Pathogens in *Caenorhabditis elegans* by Regulating MicroRNA miR-34. *Front Cell Infect Microbiol*; Volume 11-2021, <https://www.frontiersin.org/journals/cellular-and-infection-microbiology/articles/10.3389/fcimb.2021.819328> (2022).
23. Cervantes-Elizarrarás A, Cruz-Cansino ND, Ramírez-Moreno E, et al. In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. *Appl Sci*; 9. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/app9030601.

24. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook Online Rev C Elegans Biol* 2006; 1–11.
25. Wilkinson DS, Taylor RC, Dillin A. Analysis of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol* 2012; 107: 353–381.
26. Yu J, Gao X, Zhang L, et al. Magnolol extends lifespan and improves age-related neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* via increase of stress resistance. *Sci Rep* 2024; 14: 3158.
27. Komura T, Takemoto A, Kosaka H, et al. Prolonged Lifespan, Improved Perception, and Enhanced Host Defense of *Caenorhabditis elegans* by *Lactococcus cremoris* subsp. *cremoris*. *Microbiol Spectr* 2022; 10: e0045421.
28. Lucas-Hernández, V.L.; Lugo-Zarate, L.; Olivo-Ramírez, D.P.; Hernández-Cruz, E.Y.; Pedraza-Chaverri, J.; Jiménez-Osorio, A.S. Effect of Feeding Lactic Acid Bacteria from Agave in *Caenorhabditis elegans* Lifespan, Heat Shock and Acute Oxidative Stress. *Appl. Biosci.* **2026**, 5, 27. <https://doi.org/10.3390/applbiosci5020027>
29. Fitzenberger E, Deusing DJ, Wittkop A, et al. Effects of plant extracts on the reversal of glucose-induced impairment of stress-resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Plant Foods Hum Nutr Dordr Neth* 2014; 69: 78–84.
30. Song B, Zheng B, Li T, et al. Raspberry extract promoted longevity and stress tolerance via the insulin/IGF signaling pathway and DAF-16 in *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct* 2020; 11: 3598–3609.
31. Su Y, Hu J, Lai T, et al. Functional Evaluation of Fermented Pomegranate Juice in Vitro and in Vivo and Its Impact on the Gut Microbiota. *J Food Sci* 2026; 91: e70846.
32. Kaila NHJ, Halami PM, Ramakrishna C, et al. Physicochemical and Functional Characterization of Pearl Millet-Based Probiotic Beverage for Antiaging Potential in *Caenorhabditis elegans*. *Foods Basel Switz*; 14. Epub ahead of print 10 October 2025. DOI: 10.3390/foods14203460.
33. Poupet C, Veisseire P, Bonnet M, et al. Curative Treatment of Candidiasis by the Live Biotherapeutic Microorganism *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® in the Invertebrate Model *Caenorhabditis elegans*: First Mechanistic Insights. *Microorganisms*; 8. Epub ahead of print 23 December 2019. DOI: 10.3390/microorganisms8010034.
34. Azat R, Liu Y, Li W, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17: 597–609.
35. Cheng Y, Zhang Y, Pang X, et al. Safety evaluation of *Lactocaseibacillus rhamnosus* KF7 based on complete genome, phenotypic assays and alternative models: *Caenorhabditis elegans*. *Curr Res Food Sci* 2025; 11: 101227.
36. Giron M, Thomas M, Jarzaguet M, et al. *Lactocaseibacillus casei* CNCM I-5663 supplementation maintained muscle mass in a model of frail rodents. *Front Nutr* 2022; 9: 928798.
37. Bouasker S, Nodland S, Millette M. The Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* CL1285 Reduces Fat Deposition and Oxidative Stress and Increases Lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Microorganisms*; 12. Epub ahead of print 21 May 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12061036.
38. Bae W-Y, Nguyen UTT, Le TAN, et al. *Lactocaseibacillus casei* HY2782 improves the intestinal barrier and tract environment and ultimately prolongs the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct* 2025; 16: 5871–5884.
39. D'Antoni CL, Pourtalebi Jahromi L, Sana L, et al. Membrane Vesicles from *Lactocaseibacillus Casei* BL23 Exhibit Antimicrobial Activity Against *Escherichia coli*

- and Immunostimulatory Effects on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Adv Healthc Mater* 2025; e00548.
40. Cheng Y, Zhang Y, Pang X, You C. Safety evaluation of *Lactocaseibacillus rhamnosus* KF7 based on complete genome, phenotypic assays and alternative models: *Caenorhabditis elegans*. *Curr Res Food Sci.* 2025;11:101227. doi: 10.1016/j.crfs.2025.101227.
 41. Chelliah, R., Choi, J. G., Hwang, S. bin, Park, B. J., Daliri, E. B. M., Kim, S. H., Oh, D. H. In vitro and in vivo defensive effect of probiotic LAB against *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans* model. *Virulence.* 2018; 9(1), 1489–1507. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1518088>
 42. Yu J, Gao X, Zhang L, Shi H, Yan Y, Han Y, Wu C, Liu Y, Fang M, Huang C, Fan S. Magnolol extends lifespan and improves age-related neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* via increase of stress resistance. *Sci Rep.* 2024;14(1):3158. doi: 10.1038/s41598-024-53374-9.
 43. Ayuda-Durán B, Sánchez-Hernández E, González-Manzano S, et al. The effects of polyphenols against oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* are determined by coexisting bacteria. *Front Nutr* 2022; 9: 989427.
 44. Thiruppathi G, Mohankumar A, Kalaiselvi D, et al. Geroprotective Effect of *Levilactobacillus brevis* and *Weizmannia coagulans* in *Caenorhabditis elegans*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2024; 16: 589–605.
 45. Kumar S, Praneet NS, Suchiang K. *Lactobacillus brevis* MTCC 1750 enhances oxidative stress resistance and lifespan extension with improved physiological and functional capacity in *Caenorhabditis elegans* via the DAF-16 pathway. *Free Radic Res* 2022; 56: 555–571.
 46. Irazoqui JE, Troemel ER, Feinbaum RL, et al. Distinct pathogenesis and host responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000982.
 47. Hashimoto M, Tanimoto Y, Kage-Nakadai E. Administration of *Lactiplantibacillus brownii* Strain MH-1 During the Larval Stage Increases the Resistance Against *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* in *Caenorhabditis elegans*. *Microbiol Immunol* 2026; 70: 1–8.
 48. Bonuccelli G, Brooks DR, Shepherd S, et al. Antibiotics that target mitochondria extend lifespan in *C. elegans*. *Aging* 2023; 15: 11764–11781.
 49. Palacios-Gorba C, Pina R, Tortajada-Girbés M, et al. *Caenorhabditis elegans* as an in vivo model to assess fucoidan bioactivity preventing *Helicobacter pylori* infection. *Food Funct* 2020; 11: 4525–4534.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente proyecto sientan las bases para desarrollar un coadyuvante en el tratamiento de la infección contra *H. pylori*. Para incrementar la evidencia, se requiere abordar experimentos que permitan comprender los mecanismos de acción por los cuales la bebida de zarzamora fermentada con *L. casei* y *L. rhamnosus* presenta actividad bactericida.

Específicamente, es importante identificar los metabolitos sintetizados durante la fermentación, más allá de los compuestos fenólicos y orgánicos (como el ácido láctico y el ácido acético). Por lo que se sugiere, además, la identificación de la secuencia de los péptidos de bajo peso molecular y la determinación de su actividad antimicrobiana.

En lo que respecta al modelo *in vivo* con *C. elegans* es importante determinar la patogénesis de *H. pylori*, mediante la colonización intestinal por técnicas fluorescentes y de microscopía, además de determinar las vías de señalización que permiten mayor supervivencia ante el patógeno.

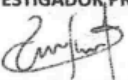
Finalmente, se sugiere trasladar el conocimiento a ensayos *in vivo* en un modelo superior de infección por *H. pylori*, como el jerbo de Mongolia, para validar la eficacia de los efectos observados en los ensayos *in vitro* e *in vivo* con *C. elegans*, que permitan evaluar la respuesta fisiológica de un modelo más complejo.

Con la evidencia actual se puede iniciar su registro ante la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, de forma que se evalúe su seguridad a nivel clínico en sujetos sanos, así como la aceptabilidad y los posibles beneficios anteriormente documentados sobre el consumo de esta bebida, de acuerdo a las etapas de evidencia clínica.

ANEXOS

COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO DICTÁMEN DE EVALUACIÓN

INSTITUTO: Instituto de Ciencias de la Salud, Área Académica de Nutrición, Área Académica de Enfermería	FOLIO: CICUAL-V-I/06/2024 FECHA DE SOLICITUD: 13/02/24		
PROYECTO: Efectos de compuestos bioactivos caracterizados en el Estado de Hidalgo y sus interacciones con fármacos a partir del análisis en <i>Caenorhabditis elegans</i> , como modelo complementario.	RESPONSABLE DEL PROYECTO: Dra. Angélica Saraí Jiménez Osorio E mail: angelica_jimenez@uaeh.edu.mx Teléfono: 5545316411		
INVESTIGADORES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO:			
ALUMNOS O PASANTES QUE PARTICIPAN EN EL PROYECTO: Liliana Lugo Zárate.			
ASPECTOS A EVALUAR	ACEPTABLE	NO ACEPTABLE	SUGERENCIAS
JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES DE LABORATORIO	X		
BIENESTAR Y ESTRÉS ANIMAL	X		
PROCEDIMIENTOS Y CUIDADOS APLICADOS EN EL ANIMAL	X		
ASPECTOS ÉTICOS DEL PROTOCOLO	X		
PUNTO FINAL Y EUTANASIA	X		
OBSERVACIONES GENERALES			
FECHA DE REVISIÓN	NEGADO		FECHA DE APROBACIÓN
13/02/24	APROBADO	x	11/03/24
Fecha de inicio: 03/04/24 Fecha de término: 09/04/25			
CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES QUE SE PROPORCIONARÁN: 5 viales con 500 y/o larvas huevos en etapa dauer/ <i>Caenorhabditis elegans</i> / Cepa silvestre Bristol N2 / Hermafrodita/macho / Estado larvario dauer. / 8 – 12 semanas / 25-30 gr			

INVESTIGADOR PRINCIPAL  Angélica Saraí Jiménez Osorio	PRESIDENTE CICUAL  Carlos Alberto Gómez Aldapa	DIRECTOR BIOTERIO  Héctor Hernández Domínguez
---	--	---



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

División de Investigación, Desarrollo e Innovación

Division of Research, Development and Innovation

Dirección de Investigación

Department of Research

FOLIO: DIDI/DI/1913-2025

JIMÉNEZ OSORIO ANGELICA SARAÍ
PROFESOR(A) INVESTIGADOR(A) DEL(LA)
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Sirve este medio para hacer de su conocimiento que la **Dirección de Investigación** emite la siguiente constancia para el proyecto con número **DI-1114-2025** titulado "**Impacto de un jugo de zarzamora fermentado con bacterias ácido-lácticas sobre Helicobacter pylori**" registrado mediante la **plataforma SISOF** y con una vigencia durante el periodo comprendido del **06/01/2025** al **12/12/2025**, registro que servirá para su desarrollo y cumplimiento de los productos comprometidos.

Así mismo, queda registrada la participación de **Norma Guadarrama Velázquez** como integrante(s) y participante(s) del grupo de trabajo que colaboran en el desarrollo del proyecto.

Por último, entre los compromisos del investigador se encuentra la formación del(los) estudiante(s) **Liliana Lugo Zárate** a través de actividades desarrolladas en el proyecto antes mencionado.

Para los fines y usos administrativos que al interesado convenga, se extiende la presente a los ocho días del mes de diciembre del dos mil veinticinco, en Pachuca de Soto, Hidalgo.

Atentamente

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete
Director



Torres de Rectoría, 4to piso, Carretera Pachuca -
Actopan Km. 4.5, Colonia Campo de Tiro, Pachuca de
Soto, Hidalgo, México C.P. 42039
Teléfono: 7717172000 Ext. 10411 y 10410
investigacion@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



Efecto del metronidazol en combinación con una bebida de zarzamora fermentada
con probióticos contra *Helicobacter pylori* resistente en condiciones gástricas
simuladas.

TESIS

Como requisito para obtener el título de
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

PRESENTA

García Galindo Iván

ASESORES

Asesora: Dra. CQB Norma Velázquez Guadarrama
Coasesor: M en CBS. Liliana Lugo Zarate

Ciudad de México, febrero 2026



Communication

Effect of Feeding Lactic Acid Bacteria from Agave in *Caenorhabditis elegans* Lifespan, Heat Shock and Acute Oxidative Stress

Vania Lizett Lucas-Hernández ¹, Liliana Lugo-Zarate ^{2,3}, Diana Patricia Olivo-Ramírez ³,
Estefani Yaquelin Hernández-Cruz ⁴, José Pedraza-Chaverri ⁴ and Angélica Saraf Jiménez-Osorio ^{2,*}

¹ Área Académica de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca 42184, Mexico; lu402975@uaeh.edu.mx

² Área Académica de Enfermería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca 42160, Mexico; lu279379@uaeh.edu.mx

³ Área Académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca 42160, Mexico; diana_olivo@uaeh.edu.mx

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico; estefani.hernandez@quimica.unam.mx (E.Y.H.-C.); pedraza@unam.mx (J.P.-C.)

* Correspondence: angelica_jimenez@uaeh.edu.mx; Tel.: +52-7717172000 (ext. 41526)

Abstract

The food industry has a strong interest in lactic acid bacteria (LAB) because of their probiotic potential and health advantages. LAB have been previously isolated from pulque and agave sap, showing antibacterial action. However, their reaction to stress can limit their survivability, and their biological activities are strain-specific. To ascertain the impact of LAB isolated from pulque and agave sap on lifespan, thermal and oxidative stress, and health span parameters, we fed the nematode *Caenorhabditis elegans* these bacteria. The nematodes fed the *Escherichia coli* OP50 strain were utilized as a control for each experiment. Animals were fed each strain for four days starting from L4 and either (day 5) exposed to oxidative stress caused by high hydrogen peroxide concentrations (8 mM) or acute heat stress (35 °C) for four hours. The strains *Lactocaseibacillus rhamnosus* and *Lactiplantibacillus plantarum* significantly improved lifespan, fertility, movement, and heat shock resistance. *Lactocaseibacillus casei* enhanced the *C. elegans* lifespan, and *Levilactobacillus brevis* only increased its survivability in the heat shock studies. Interestingly, we discovered a harmful impact on animals fed *Pediococcus acidilactici*. This study highlights that, even when strains come from the same plant source, their biological activity might differ significantly.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*; lactic acid bacteria; oxidative stress; thermal stress



Academic Editors: Adriana Basile,
Viviana Maresca and Alessia
Postiglione

Received: 31 December 2025

Revised: 21 February 2026

Accepted: 20 March 2026

Published: 2 April 2026

Copyright: © 2026 by the authors.
Licensee MDPI, Basel, Switzerland.
This article is an open access article
distributed under the terms and
conditions of the [Creative Commons
Attribution \(CC BY\)](#) license.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are known for their role in food fermentation due to their excellent probiotic properties [1–3], which contribute to intestinal health by supporting homeostasis and protection against pathogens [4,5]. They have also been reported to exhibit antimicrobial [6–8] and antioxidant activities, enabled by their metabolism and the production of organic acids, bacteriocins, exopolysaccharides, and antioxidants that could control systemic homeostasis through probiotic actions [9–11].

LAB have developed various ways to respond to environmental challenges to survive, including changing their metabolism, producing special molecules, and using complex repair and control systems. It has been recognized that LAB possesses a stress-inducible