

**Efecto de un biopreparado de cáscaras de
frutas en el crecimiento de *Lactobacillus casei*
y evaluación antagónica contra bacterias
patógenas**

Diana Melina Jované Garuz

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de un biopreparado de cáscaras de
frutas en el crecimiento de *Lactobacillus casei*
y evaluación antagónica contra bacterias
patógenas**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Diana Melina Jované Garuz

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Efecto de un biopreparado de cáscaras de frutas en el crecimiento de *Lactobacillus casei* y evaluación antagónica contra bacterias patógenas

Diana Melina Jované Garuz

Resumen. Las cáscaras de frutas son consideradas un desperdicio, sin notar que en ellas hay nutrientes que son considerados prebióticos. Por lo tanto, pueden ser un sustrato de crecimiento para bacterias. El objetivo de este trabajo evaluó la efectividad del uso de un biopreparado de cáscaras de papaya, banana y mango en el crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 431 y el efecto del mismo en la actividad antagónica del probiótico contra bacterias de interés alimentario. Primero se realizó el biopreparado y el recuento del crecimiento de *Lb. casei* a concentraciones de 30, 40, 50, 60, 70% de biopreparado y caldo MRS (control) con un pH del medio de 6.5 ± 0.2 ; se incubó a 41 °C por 48 h en anaerobiosis. Se realizó el ensayo de inhibición y la medición de los halos. Las bacterias patógenas de este estudio fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 235923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Se realizó la técnica “agar spot” y se incubó a 41 °C durante 24 h en aerobiosis. En la fase I, no hubo diferencias significativas en el crecimiento de *Lb. casei* a diferentes concentraciones de biopreparado y caldo MRS. Se obtuvieron rangos de zonas de inhibición de: 0.27 – 0.70, 0.30 – 0.97 y 0.33 – 1.13 cm para *E. coli*, *S. Typhimurium* y *S. aureus*, respectivamente. En ese sentido, es indiferente el uso del biopreparado o MRS para el crecimiento de *Lb. casei* y se demostró que el biopreparado no contraresta la actividad antagónica del probiótico frente a estas bacterias patógenas.

Palabras clave: Banana, biopreparado, mango, papaya, prebiótico, probiótico.

Abstract. Fruit peels are considered a waste, without realizing that there are nutrients in them that are considered prebiotics. Therefore, they can be a growth substrate for bacteria. That is why the objective of this work evaluated the effectiveness of the use of a bioprepared of papaya, banana and mango peels in the growth of *Lactobacillus casei* ATCC 431 and evaluated its effect on the antagonistic activity of the probiotic against bacteria of food interest. First the bioprepared and the growth count of *Lb. casei* at concentrations of 30, 40, 50, 60, 70% of bioprepared and MRS broth (control) with a pH of the medium of 6.5 ± 0.2 was incubated at 41 °C for 48 h in anaerobiosis. The inhibition test and the measurement of the halos were performed. The pathogenic bacteria of this study were: *Staphylococcus aureus* ATCC 235923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. The “agar spot” technique was performed and incubated at 41 °C for 24 h in aerobiosis. In phase I, there were no significant differences in the growth of *Lb. casei* at different concentrations of bioprepared and MRS broth. Ranges of inhibition zones of 0.27 - 0.70, 0.30 – 0.97 and 0.33 - 1.13 cm were obtained for *E. coli*, *S. Typhimurium* and *S. aureus*, respectively. In that sense, the use of bioprepared or MRS for the growth of *Lb. casei* and it was shown that the bioprepared does not counteract the antagonistic activity of the probiotic against these pathogenic bacteria.

Key words: Banana, bioprepared, mango, papaya, prebiotic, probiotic.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4. CONCLUSIONES	13
5. RECOMENDACIONES	14
6. LITERATURA CITADA	15
7. ANEXOS.....	19

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Recuento de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 431 en diferentes concentraciones del biopreparado, como tratamientos; y en caldo MRS, como control. Datos expresados en log UFC/ml.....	8
2. Zona inhibitoria (cm) correspondiente a <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 431 contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	10
3. Zona inhibitoria (cm) correspondiente a <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 431 contra <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028.....	11
4. Zona inhibitoria (cm) correspondiente a <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 431 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23593.....	11
Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la elaboración del biopreparado de frutas	3
2. Pasos para la activación de cepa probiótica, <i>Lb. casei</i> ATCC 431	4
3. Pasos para la activación de cepas patógenas, en este caso: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 235923, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 y <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	5
Anexos	Página
1. Fotografía de la siembra por estría de las tres bacterias patógenas, después de 24 horas de incubación a 37 °C	19
2. Fotografía de los tubos de ensayo con las diferentes concentraciones del biopreparado de frutas (caldo MRS, 30, 40, 50, 60 y 70%).....	19
3. Fotografía de la gota de 10 microlitros del biopreparado inoculado con <i>Lactobacillus casei</i> en los diferentes tratamientos	20
4. Fotografía de las placas para los ensayos de inhibición en la cámara de flujo laminar para su secado completo.....	20
5. Cuadro resumen de análisis de varianza para la fase I	20
6. Separación de medias para la fase II.....	21
7. Cuadro resumen de análisis de varianza para la fase II.....	21

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos que al ser ingeridos, tienen efecto de prevención para alguna patología o disminución de los daños causados por ciertas enfermedades. Los beneficios de las bacterias probióticas fueron descubiertos en el siglo pasado, alrededor del año 1907. En 1998, se incluyó el término que conocemos hoy en día como probióticos: “microorganismos vivos que, administrados a una dosis suficiente, confieren un efecto beneficioso a la salud general del individuo” (Hill *et al.* 2014).

Algunos de los beneficios en la salud del huésped son atribuidos a la ingesta de probióticos y pueden ser: prevención de dermatitis atópica (Rosenfeldt *et al.* 2003), tratamiento para diarrea aguda (Trallero *et al.* 2019), manejo de intolerancia a la lactosa (Vitellio *et al.* 2019), reducción de colesterol de baja densidad (Elaby *et al.* 2018), entre otros. Los probióticos, se aplican también en el ámbito de la zootecnia, principalmente, para aumentar rendimientos de producción (Martínez *et al.* 2007). La eficacia del uso de probióticos en los niveles de producción primaria ha sido demostrada para varios animales de granja, como lo son: cerdos (Duque *et al.* 2015), rumiantes y aves de corral. El mayor porcentaje de mortalidad en animales se debe a patógenos que causan enfermedades gastrointestinales; algunos de estos patógenos son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. De acuerdo con Akbar y Kumar (2011) la salmonelosis y las infecciones relacionadas con *E. coli*, son las enfermedades zoonóticas con mayor prevalencia en todo el mundo.

Estos beneficios nos indican que la importancia de los probióticos radica principalmente, en la reducción o inhibición de bacterias patógenas. Se han descrito tres mecanismos de antagonismo microbiano: Interferencia con la colonización: el establecimiento y proliferación de un microorganismo depende de su capacidad de adhesión y adaptación al medio (Suárez 2015). Mientras más bacterias de una especie, estén adaptadas a un medio, más difícil será para otras, colonizarlo. El segundo mecanismo es la producción de compuestos antimicrobianos: las bacterias al consumir ciertos nutrientes tienen la capacidad de producir una gran cantidad de compuestos o sustancias con capacidades antibióticas. Y, por último, la coagregación con patógenos: Algunos miembros se adhieren a organismos extraños/patógenos e impiden su establecimiento en los medios (Suárez 2015).

El efecto antagonico que presenta frente a otras bacterias ha conseguido despertar el interés de muchos científicos con el fin de reducir el uso de antibióticos sub-terapéuticos. Los antibióticos han sido uno de los descubrimientos más grandes en la historia de la medicina.

Sin embargo, el mismo factor alivante, en su momento, ha provocado una alerta debido al uso excesivo e indebido de una amplia variedad de antibióticos (Ventola 2015). El uso incorrecto de los antibióticos, sean estos terapéuticos o sub-terapéuticos, ha provocado la reducción de la eficiencia de estos y actualmente muchos antibióticos son productos

ineficientes. Estudios anteriores demuestran la aparición de cepas de patógenos con genes de resistencia frente a antibióticos a los que hace un tiempo eran susceptibles (Alós 2015).

La resistencia de patógenos ante antibióticos nos ha llevado a la búsqueda de alternativas al uso de estos, las cuales deben enfocarse en productos naturales con propiedades similares o iguales a la de los antibióticos. Algunas de las alternativas son el uso de probióticos junto con alimentos funcionales como prebióticos y para mejores resultados la creación de un ambiente simbiótico.

Según Olagnero *et al.* (2007), los prebióticos son ingredientes no digeribles de los alimentos que estimulan de forma selectiva el crecimiento y/o actividad metabólica de cepas de bacterias colónicas. Son compuestos grandes que no pueden ser digeridos por las digestivas y al momento de llegar al intestino grueso, son degradados por la microflora bacteriana.

Siempre ha sido prioridad la búsqueda de opciones económicas y con el mismo efecto que los menos accesibles ha sido probado, en diferentes ocasiones, que el uso de probióticos aislados de fermentos comerciales es menos eficiente que los obtenidos de sistemas gastrointestinales de animales, heces y demás (Cabezas 2009). Por consiguiente, se han encontrado métodos alternativos de propagación de probióticos y producción de subproductos con propiedades antimicrobianas a través de fermentación bacteriana, en medios con propiedades prebióticas. Estos nuevos métodos alternativos, pueden suponer el fin de los desperdicios o residuos de plantas agroindustriales como lo son la cáscara de piña que, en un estudio realizado por Cloutier (2010) fue demostrado que es una buena alternativa para el crecimiento de *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* y producción de ácido láctico por fermentación. Otro de los sustratos utilizados para la propagación de probióticos es la melaza de caña (Ossa *et al.* 2010).

Si bien es cierto las cáscaras de frutas contienen compuestos prebióticos como la fibra dietética que incluye a polisacáridos, inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y almidones resistentes. De los anteriormente mencionados, la inulina, los fructooligosacáridos y los galactooligosacáridos, son considerados prebióticos; los demás actúan como sustrato fermentable (Oliveira y González 2007).

Debido a la problemática anterior, se decidió utilizar las cáscaras de tres frutas maduras: papaya (*Carica papaya*), banana (*Musa paradisiaca*) y mango (*Mangifera indica* L.) para elaborar un subproducto llamado biopreparado para el cultivo de *Lactobacillus casei*. Los objetivos de este trabajo fueron:

- Evaluar la efectividad del uso de un biopreparado de cáscaras de frutas en el crecimiento de *Lactobacillus casei*.
- Evaluar el efecto del biopreparado de cáscara de frutas en la actividad antagónica de *Lactobacillus casei*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y detalles del estudio.

La realización del estudio se llevó a cabo en la Escuela Agrícola Panamericana. Las preparaciones de las muestras se realizaron en el Departamento de Agroindustria Alimentaria en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos.

Elaboración del biopreparado.

Fueron utilizadas las cáscaras de tres frutas: papaya, banano y mango. En el siguiente flujo de proceso (Figura 1), serán mostrados todos los pasos para la elaboración del biopreparado (BP), partiendo del residuo (cáscaras).

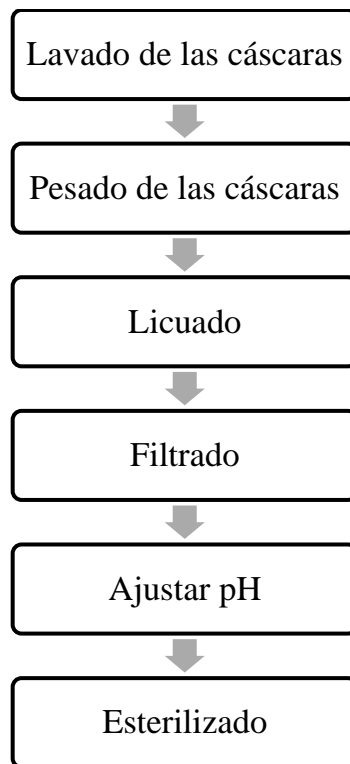


Figura 1. Flujo de proceso para la elaboración del biopreparado de frutas.

Lavado de las cáscaras. Las cáscaras fueron lavadas para evitar cualquier tipo de contaminación, sea ésta, restos de pulpa u otras partículas.

Pesado de cáscaras. Se pesaron 56 gramos de cáscara de cada fruta, para un total de 168 gramos de frutas, para una proporción 1:1:1.

Licuada/triturado. Las cáscaras fueron colocadas en una licuadora para poder obtener partículas más pequeñas y, a su vez, para facilitar la filtración del biopreparado. A los 168 gramos de sólidos se le adicionó, poco a poco, 336 mL de agua para tener una relación 1:2 (mezcla de cáscara de frutas:agua).

Filtrado. La filtración se realizó a través de cuatro filtros con mallas diferentes, cada vez de menor área. Los tamaños de las mallas fueron $42/\text{cm}^2$, $99/\text{cm}^2$, $132/\text{cm}^2$ y $2500/\text{cm}^2$.

Ajuste de pH. El pH del biopreparado se ajustó, tomando como referencia el del caldo MRS (6.5 ± 0.2).

Esterilizado. La esterilización se realizó en calor húmedo a $121\text{ }^\circ\text{C}$, durante 12 minutos.

Cultivos microbianos.

Cepa probiótica. Para la activación de la cepa probiótica, se colocó un gramo de las cápsulas de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 431 en un tubo con caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS, Acumedia), el mismo se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Se realizó la siembra por estría en agar MRS para el aislamiento de la bacteria, posteriormente, se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 horas. Pasado este tiempo, se tomó una colonia aislada con ayuda del asa de inoculación y se sacudió en caldo MRS. Se incubó a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durante un período de 24 horas. Esta etapa de activación, se realizó en condiciones de aerobiosis (Figura 2).

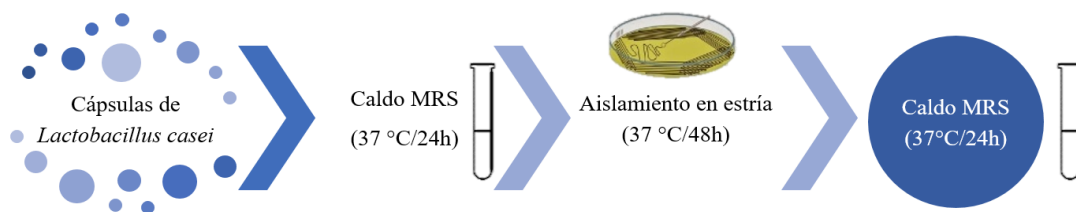


Figura 2. Pasos para la activación de cepa probiótica, *Lb. casei* ATCC 431.

Cepas patógenas. Se utilizaron tres bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus* ATCC 235923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Se activaron partiendo de cultivos de trabajo del cepario del Laboratorio de Microbiología de Zamorano. Con el asa de inoculación, se raspó levemente la superficie del agar de cada cepa y se sumergió en un tubo con Caldo Soya Tripticasa (CST). Se incubaron en condiciones aerobias durante 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Se realizó la siembra por estría en platos con Agar Cuenta Estándar (ACE), para el aislamiento y se incubaron en condiciones aerobias durante 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$. Se seleccionó la colonia más representativa, según su color, tamaño, y forma. Con el asa de inoculación se sacudió en CST e incubados en condiciones aerobias durante 24 horas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 3).

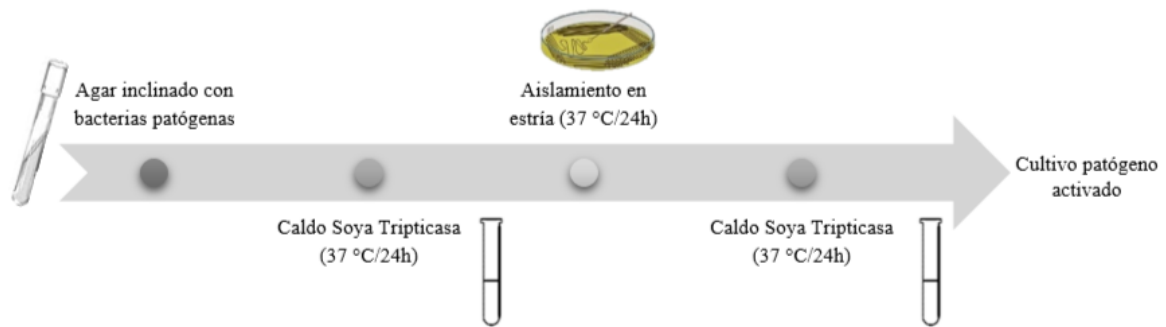


Figura 3. Pasos para la activación de cepas patógenas, en este caso: *Staphylococcus aureus* ATCC 235923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028.

Viabilidad de la cepa probiótica. Para ambas fases del estudio, fueron utilizados 10 μ l, por lo tanto, era necesario saber un aproximado de cuántas unidades formadoras de colonias estaban presentes en ese volumen. Se realizaron las respectivas diluciones decimales con buffer de fosfato estéril. Se realizó la técnica de siembra por superficie en platos Petri con agar MRS por triplicado. Las placas fueron colocadas en la incubadora a 37 °C por un tiempo de 24 - 48 h en condiciones aerobias. Los resultados se expresaron en log UFC/ml.

Fase I. Evaluación de la efectividad del uso del biopreparado a diferentes concentraciones para el crecimiento de *Lactobacillus casei*.

Crecimiento de *Lactobacillus casei* a diferentes concentraciones del biopreparado. El cultivo de *Lb. casei* activado se transfirió a seis tubos con diferentes concentraciones del biopreparado a evaluar. A cada tratamiento, se le adicionaron 10 μ l del probiótico, anteriormente activado. Los tratamientos fueron:

- 30% biopreparado + 70% buffer de fosfato.
- 40% biopreparado + 60% buffer de fosfato.
- 50% biopreparado + 50% buffer de fosfato.
- 60% biopreparado + 40% buffer de fosfato.
- 70% biopreparado + 30% buffer de fosfato.
- Caldo MRS (control)

Cada uno de los tratamientos se incubó a una temperatura de 37 °C durante 24 horas en condiciones anaerobias.

Conteo de *Lb. casei* a diferentes concentraciones del biopreparado. La cantidad de células viables en el medio, se determinó a través de diluciones decimales en buffer de fosfato estéril. Se realizó la técnica de siembra por superficie en platos de agar MRS por triplicado. Las placas fueron colocadas en la incubadora a 41 °C por un tiempo de 24 - 48 h en condiciones anaerobias.

Fase II. Evaluación del efecto antagónico contra bacterias patógenas.

Luego de la activación de *Lb. casei* y las bacterias patógenas, se procedió al desarrollo de los ensayos de inhibición. Se contaba con 18 platos con agar MRS, a los cuales se les colocó una gota de 10 μ L del cultivo probiótico que se desarrollaron en las diferentes concentraciones del biopreparado en el centro de la placa. Se dejó secar en una cámara de flujo laminar y fueron incubadas a 41 °C en condiciones anaeróbicas por 18 h. Pasado este tiempo, se le colocó una doble capa de AST. La doble capa estaba conformada por 9 ml de Agar Soya Trypticase y 1 ml del patógeno activado. Posteriormente, los 18 platos fueron colocados en la incubadora a 41 °C por 18 h, en condiciones aeróbicas.

La actividad antagónica para el crecimiento microbiano de los patógenos se verificó por la formación de zonas transparentes mayores de 0.1 cm alrededor de la gota que *contenía Lb. casei*. Los diámetros de los halos de inhibición en cada patógeno fueron medidos y expresados en centímetros.

Diseño experimental y análisis estadísticos.

Fase I. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). En el estudio se evaluaron cinco tratamientos que fueron las concentraciones diferentes del biopreparado de fruta (30, 40, 50, 60 y 70%) y caldo MRS (control). Se realizaron tres repeticiones para un total de 24 unidades experimentales. Los recuentos de *Lb. casei* (log UFC/ml) obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) con una separación de medias Duncan, usando el programa “Statistical Analysis Software” (SAS® versión 9.4) con un nivel de confianza del 95%.

Fase II. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial de 6 \times 3 (cinco diferentes concentraciones y un control, 30, 40, 50, 60 y 70% respectivamente del biopreparado de cáscaras de frutas y caldo MRS) y tres microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli*), obteniéndose un total de 18 tratamientos. Se establecieron tres repeticiones para un total de 54 unidades experimentales. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) para evaluar la significancia del modelo y una separación de medias a través del método de cuadrados mínimos (LSMeans) usando el programa “Statistical Analysis Software” (SAS® versión 9.4) con un nivel de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Evaluación de la efectividad del uso del biopreparado a diferentes concentraciones para el crecimiento de *Lactobacillus casei*.

Antes de la inoculación se realizó el recuento, el cual tenía una carga inicial de 4.99 ± 1.16 log UFC/ml, promedio de tres repeticiones. El pH inicial del biopreparado de cáscara de frutas era correspondía a 4.73 ± 0.29 , el cual se ajustó a 6.5 ± 0.2 . En el cuadro 1 se puede observar que no existen diferencias significativas entre la proliferación y crecimiento de *Lb. casei* dado en las diferentes concentraciones del biopreparado de cáscara de frutas y el caldo MRS, el cual es destinado para bacterias ácido-lácticas. El caldo MRS es un medio de enriquecimiento selectivo para lactobacilos (Man *et al.* 1960). La composición del caldo y el agar MRS permite el óptimo desarrollo de estas bacterias: la peptona y el extracto de carne son la fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales necesarios por la bacteria; el extracto de levadura es fuente de vitamina, específicamente, del complejo B y la glucosa, es la fuente fermentable.

Los resultados tabulados en el cuadro 1 indican que los recuentos finales de los tratamientos presentaron un incremento dos a tres unidades logarítmicas después de incubación a 41°C por un tiempo de 24 – 48 horas en condiciones anaeróbicas. Se logró incrementar el desarrollo microbiano de *Lb. casei*, a partir de medios no lácticos, al igual que en el caldo MRS.

Cuadro 1. Recuento de *Lactobacillus casei* ATCC 431 en diferentes concentraciones del biopreparado, como tratamientos; y en caldo MRS, como control. Datos expresados en log UFC/ml.

Concentración BP (%)	Log UFC/ml \pm DE (NS)
Caldo MRS	7.74 ± 1.25
50%: 5 ml BP + 5 ml BF	7.62 ± 0.73
60%: 6 ml BP + 4 ml BF	7.54 ± 0.63
70%: 7 ml BP + 3 ml BF	7.44 ± 0.75
40%: 4 ml BP + 6 ml BF	7.41 ± 0.75
30%: 3 ml BP + 7 ml BF	7.41 ± 0.53
Coefficiente de variación (%)	8.24

NS: No se presentan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).
BP: Biopreparado de cáscara de frutas; BF: Buffer de fosfato.

Se puede especular que el biopreparado de cáscara de fruta de papaya, banano y mango, puede llegar a ser un reemplazo para el caldo MRS, el cual supone ser una inversión mayor, tomando en cuenta que, según los resultados, el crecimiento de *Lb. casei* no es dependiente de la concentración de biopreparado utilizado y no tiene diferencias estadísticas con relación al caldo MRS.

De acuerdo a Wood y Holzapfel (1995) las bacterias del género *Lactobacilli* son estrictamente fermentativas y tienen requerimientos nutricionales complejos (aminoácidos, péptidos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas). Estos autores también indican que, con glucosa como fuente de carbono, pueden ser homofermentativas, con una producción de ácido láctico del 85% o heterofermentativas, produciendo ácido láctico, CO₂, etanol y/o ácido acético.

En un estudio más minucioso, Kulp y Lorenz (2003) mencionan que, de acuerdo a sus propiedades fermentativas, *Lactobacillus casei* es parte del grupo B. Este grupo es homofermentativo facultativo, fermentan hexosas hasta ácido láctico, vía Embden Meyerhof Parnas (EMP) y fermentan pentosas y gluconato hasta ácido láctico y acético, vía fosfogluconato.

En general, para su multiplicación, las bacterias ácido lácticas requieren azúcares como glucosa y lactosa, aminoácidos y vitaminas (Vásquez *et al.* 2009). Es importante destacar que las cáscaras fueron retiradas de frutos maduros y cada una de ellas tiene compuestos que son aprovechados por las bacterias.

Seguidamente, se destacan aspectos importantes de algunas de las cáscaras de los frutos utilizados. Según Ajila *et al.* (2007) la cáscara del mango constituye, aproximadamente, del 15 al 20% de la fruta, la cual contiene compuestos como polifenoles, carotenoides, enzimas y fibra dietaria. La fibra dietaria se encuentra en las paredes de las células vegetales y son considerados hidratos de carbono análogos, los cuales son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso (Institute of Medicine (US) Panel of Macronutrients y Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes 2001). La fibra incluye polisacáridos, oligosacáridos y ligninas; todas pueden ser fermentadas por bacterias a excepción de la lignina y, de manera general, las fibras solubles son mayormente fermentadas que las fibras insolubles (Trowell *et al.* 1976).

De acuerdo a Marques *et al.* (2010), la cáscara de mango es considerada una fuente importante de proteínas, carbohidratos y fibras, así como de elementos minerales. También nos menciona que, según la composición proximal de su estudio, la cáscara de mango contiene aproximadamente 1.24 g de proteína, 12.89 g de carbohidratos totales y 0.99 g de minerales; todo esto en base a 100 g de cáscara de mango.

En el estudio realizado por Rocha *et al.* (2001), el mayor contenido de almidón en un mango se registra en el estadio I con un 6.81% y, el menor contenido, equivalente a 3.04%, en el estadio V. Sañudo *et al.* (1997), indican que en los frutos el almidón acumulado se degrada y se convierte en azúcares solubles, disminuye la acidez y hay una degradación paulatina de las paredes celulares.

En cuanto a banana, Vu *et al.* (2017), indican que la cáscara de la misma es el principal subproducto del procesamiento de esta fruta y representa del 35 – 38% del peso total de la fruta entera. Según el análisis bromatológico de la cáscara de banano descrito por Pilco *et al.* (2018), se obtuvo un contenido de 8.30% de carbohidratos de, 0.87% de fibra y 1.55% de cenizas. Oblitas *et al.* (2018), midieron el contenido mineral el cual indicó que el principal mineral fue el potasio con 4207 mg/100g en base húmeda y el segundo mineral más abundante fue el calcio con 436.3 mg/g. Aquino *et al.* (2016), argumentan que el mayor porcentaje de azúcares solubles se encuentran en cáscaras maduras (glucosa y fructosa) y que el contenido de almidón se reduce drásticamente en esta etapa. Son ellos quienes también determinan que la cantidad de carotenoides, flavonoides, vitaminas C y minerales es mayor en cáscaras maduras. A su vez, indican que los compuestos fenólicos son 3.2 veces mayor en cáscaras maduras que en inmaduras.

Autores como Rinaldi *et al.* (2010), nos indican que la cáscara y la semilla de la papaya son los subproductos principales del procesamiento de esta fruta. Fueron ellos quienes realizaron un estudio en el cual describen, en porcentajes, la composición proximal de la cáscara de papaya. Se muestra que el contenido de proteína representaba el $4.0 \pm 0.1\%$, la fibra bruta el $1.7 \pm 0.2\%$, sólidos totales el $12.3 \pm 0.8\%$ y carbohidratos el $4.7 \pm 0.7\%$.

De las composiciones anteriormente mencionadas, las bacterias transformarán más rápido los azúcares simples que los demás componentes debido a que necesitan más tiempo en el cual usarán enzimas como aldosas y hexosa isomerasas para desdoblar componentes más complejos (Wood y Holzapfel 1995). Quintero *et al.* (2013) recalcan que, durante el período de maduración de las frutas, hay una reducción en la cantidad de ácidos orgánicos y de almidón; de manera simultánea, un aumento en la cantidad de sólidos solubles.

Como se mencionó anteriormente, en las cáscaras de frutas, hay compuestos considerados prebióticos, como lo son los FOS/inulina y GOS. Watson *et al.* (2013), quienes realizaron un estudio en el cual determinaron la utilización selectiva de los carbohidratos por *Lactobacilli*; en el cual demostraron que el crecimiento de *Lb casei* Shirota fue respaldado por todos los carbohidratos. También mencionan que *Lactobacillus paracasei* CRL-431 fue capaz de destacarse entre las 32 cepas ácido lácticas por crecer en presencia de FOS; también demostró ser capaz de crecer en presencia de GOS. Este estudio llevado a cabo por estos autores, permite especulaciones como que la bacteria utilizada en el presente estudio, no tiene dificultades para fermentar los componentes prebióticos presentes en las cáscaras de estas tres frutas maduras.

Fase II. Evaluación del efecto antagónico contra bacterias patógenas.

Según se muestra en el cuadro 2, la zona de inhibición expresada en centímetros de las placas correspondientes a *Lb. casei* contra *E. coli*, muestran que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos o concentraciones de biopreparado y caldo MRS. En otras palabras, es indiferente llevar a cabo el crecimiento de *Lb. casei* en caldo MRS o en las diferentes concentraciones de biopreparado para realizar este ensayo. Los datos de medición de las zonas de inhibición obtenidos en este estudio, difieren con los datos obtenidos por Musikasang *et al.* (2009), quienes obtuvieron rangos de zona de inhibición para *E. coli* de 0.8 a 2.5 cm. Al igual que en el estudio realizado por Ngoc *et al.* (2003), el efecto inhibitorio fue menos efectivo para *E. coli* en la técnica de inhibición

realizada (agar spot test). Sánchez *et al.* (2011) comprobaron que cepas de *Lactobacillus* sp, tienen propiedades antimicrobianas frente a *E. coli* ATCC 25922, al igual que en el presente estudio. Estos autores determinaron la producción de ácidos orgánicos que inhibieron el crecimiento de *E. coli*, por lo que podemos atribuir la actividad antimicrobiana a los mismos.

Cuadro 2. Zona inhibitoria (cm) correspondiente a *Lactobacillus casei* ATCC 431 contra *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tratamiento (%)	Halo de inhibición (cm) ± DE (NS)
Caldo MRS	0.70 ± 0.37
70%: 7 ml BP + 3 ml BF	0.53 ± 0.19
50%: 5 ml BP + 5 ml BF	0.47 ± 0.05
40%: 4 ml BP + 6 ml BF	0.43 ± 0.12
60%: 6 ml BP + 4 ml BF	0.40 ± 0.16
30%: 3 ml BP + 7 ml BF	0.27 ± 0.17
Coefficiente de variación (%)	46.15

NS: No se presentan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$).
BP: Biopreparado de cáscaras de frutas; BF: Buffer de fosfato.

De acuerdo con los datos de zona de inhibición (Cuadro 3) de las placas correspondientes a *Lb. casei* contra *Salmonella* Typhimurium, se indica que hubo diferencias significativas. De ambas bacterias Gram negativas, *Salmonella* spp., obtuvo una media mayor de halo de inhibición (0.65 cm), lo cual difiere con Velraeds *et al.* (1996), quienes registran poco potencial antimicrobiano en contra de bacterias Gram negativas. Makras y Vuyst (2006), indican que este antagonismo se le puede atribuir a la producción de ácidos orgánicos, particularmente, ácido láctico y ácido acético.

De acuerdo con los autores, estos ácidos orgánicos tienen una fuerte actividad antagónica contra bacterias Gram negativas. Amorcho (2011), argumenta que la actividad inhibitoria frente a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium puede deberse a componentes celulares, exclusión competitiva por nutrientes y presencia de ácido láctico, sumado al pH bajo.

Cuadro 3. Zona inhibitoria (cm) correspondiente a *Lactobacillus casei* ATCC 431 contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028.

Tratamiento (%)	Halo de inhibición (cm) \pm DE
Caldo MRS	0.97 \pm 0.19 ^a
70%: 7 ml BP + 3 ml BF	0.80 \pm 0.16 ^a
50%: 5 ml BP + 5 ml BF	0.63 \pm 0.33 ^{ab}
30%: 3 ml BP + 7 ml BF	0.60 \pm 0.24 ^{ab}
40%: 4 ml BP + 6 ml BF	0.57 \pm 0.26 ^{ab}
60%: 6 ml BP + 4 ml BF	0.30 \pm 0.16 ^b
Coefficiente de variación (%)	46.15

^{ab}: Letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre tratamientos (P < 0.05).

BP: Biopreparado de cáscaras de frutas; BF: Buffer de fosfato.

El cuadro 4 indica que hay diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos reflejados en el cuadro 4, coinciden con los datos obtenidos por Musikasang *et al.* (2009), quienes obtuvieron zonas de inhibición para *S. aureus* de 0.6 – 2.4 cm. Sánchez y Peña (2016) en un estudio similar, atribuyen la actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 235923 a la producción de compuestos como peróxido de hidrógeno. El H₂O₂ genera radicales que causan la peroxidación de los lípidos de la membrana, por ende, la susceptibilidad de bacterias patógenas.

Cuadro 4. Zona inhibitoria (cm) correspondiente a *Lactobacillus casei* ATCC 431 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 235923.

Tratamiento (%)	Halo de inhibición (cm) \pm DE
Caldo MRS	1.13 \pm 0.12 ^a
40%: 4 ml BP + 6 ml BF	0.80 \pm 0.51 ^{ab}
70%: 7 ml BP + 3 ml BF	0.77 \pm 0.24 ^{ab}
50%: 5 ml BP + 5 ml BF	0.73 \pm 0.47 ^{ab}
30%: 3 ml BP + 7 ml BF	0.70 \pm 0.36 ^{ab}
60%: 6 ml BP + 4 ml BF	0.33 \pm 0.17 ^b
Coefficiente de variación (%)	46.15

^{ab}: Letras diferentes presentan diferencias estadísticas entre tratamientos (P < 0.05).

BP: Biopreparado de cáscaras de frutas; BF: Buffer de fosfato.

De acuerdo a Sari *et al.* (2018), quienes se enfocaron en bacterias patógenas Gram positivas frente a *Lactobacillus casei*, obtuvo resultados que demostraron si se exhibió una actividad antagónica de parte de la bacteria ácido-láctica. La fermentación produce moléculas orgánicas de bajo peso molecular con actividad antagónica (Walter 2008). La acumulación de estas sustancias provoca un descenso en el pH del medio. La forma no disociada del ácido láctico penetra las paredes celulares donde se promueve la disociación, se liberan iones de hidrógeno y el anión correspondiente. Es debido a esto que hay interferencia en el metabolismo e inhibición de crecimiento celular.

La zona inhibitoria fue variable en cada una de las bacterias evaluadas. Este estudio no evaluó la naturaleza de las sustancias con propiedades antagónicas que son producidas como mecanismo de acción por *Lb. casei*. Según diferentes estudios escritos por varios autores, se recalca que pueden estar presentes ácidos orgánicos (ácido láctico), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído y sustancias de naturaleza proteica antimicrobiana, llamadas bacteriocinas, por lo que es necesario darle un seguimiento a este estudio (Lewus *et al.* 1991).

4. CONCLUSIONES

- Se demostró que el biopreparado de residuos agroindustriales como lo son las cáscaras de frutas (papaya, mango y banana), presenta propiedades prebióticas para *Lactobacillus casei*.
- Se concluyó que el biopreparado de cáscara de frutas no contraresta la actividad antagónica de *Lactobacillus casei* ATCC 431 contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 235923 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un análisis físico-químico del biopreparado para determinar los microcomponentes y macrocomponentes del mismo.
- Cuantificar la cantidad de ácidos orgánicos y bacteriocina producida por la bacteria para comprobar si la actividad antagónica es directamente causada por *Lb. casei* y sus subproductos o por los compuestos presentes en las cáscaras de frutas.
- Comprobar el efecto antagónico de *Lb. casei* inmersa en el biopreparado de cáscara de fruta mediante otros métodos de inhibición como: difusión en pozo y el método de Kirby-Bauer.
- Realizar un análisis de costos tanto para el biopreparado de cáscaras de frutas, como para el caldo MRS, con el fin de determinar si es posible la reducción de costos mediante la utilización de un biopreparado de cáscara de frutas.

6. LITERATURA CITADA

- Ajila CM, Bhat SG, Prasada Rao UJS. 2007. Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102, 1006–1011.
- Akbar A, Kumar A. 2011. Food Safety Concerns and Food-Borne Pathogens, *Salmonella*, *Escherichia coli* and *Campylobacter* [Tesis universitaria]. Tailandia: FUUAST, Federal Urdu University of Arts, Science and Technology, Asian Institute of Technology Klong Luang. 13 p.
- Alós JI. 2015. Resistencia bacteriana a los antibióticos: Una crisis global [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 33(10):692–699. spa. doi:10.1016/j.eimc.2014.10.004.
- Amorcho CM. 2011. Caracterización y potencial probiótico de bacterias lácticas aisladas de leche de oveja Guirra [Tesis doctoral]. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia. 267 p.
- Aquino C, Salomao L, Ribeiro S, Siqueira D, Cecon P. 2016. Carbohydrates, phenolic compounds and antioxidant activity in pulp and peel of 15 banana cultivars. *Rev. Bras. Frutic.* 38(4):1271. doi:10.1590/0100-29452016090.
- Cabezas MA. 2009. Evaluación de la capacidad de colonización intestinal de un *Lactobacillus* sp proveniente de un fermento comercial. Quito, Ecuador: Universidad San Francisco de Quito. 53 p; [consultado el 13 de sep. de 2019]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/929/1/95044.pdf>.
- Cloutier CA. 2010. Desarrollo de un proceso de fermentación para la producción de ácido láctico, utilizando un sustrato a base de un desecho de piña (*Ananas comosus*) y el microorganismo *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica. 117 p; [consultado el 13 de sep. de 2019]. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr/jspui/bitstream/123456789/2527/1/31473.pdf>.
- Duque J, Gutiérrez L, Bedoya O. 2015. Efecto del consumo de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus bulgaricus* en cerdas lactantes, sobre el desarrollo y crecimiento de los lechones. Caldas, Antioquía: Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias. 32 p; [consultado el 12 de sep. de 2019]. http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1497/1/Efecto_consumo_probioticos_cerdas_lactantes_desarrollo_lecho.pdf.
- Elaby SM, Salem AA, Ali JB, Abdel-Salam AF. 2018. Cholesterol-Lowering effects of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* probiotics *in vitro* and *in vivo*. *AJRB*. 1–12. doi:10.9734/ajrb/2018/v2i4540.

- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 11(8):506–514. eng. doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
- Institute of Medicine (US) Panel of Macronutrients, Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. 2001. *Dietary Reference Intakes Proposed Definition of Dietary Fiber*. Washington (DC): [sin editorial]. ISBN: 0309075645.
- Kulp K, Lorenz K. 2003. *Handbook of dough fermentations*. New York, Estados Unidos: CRC Press. ISBN: 978-0-8247-4264-5.
- Lewus C, Kaiser A, Montville T. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(6):1683–1688.
- Makras L, Vuyst L. 2006. The *in vitro* inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*. 16(9):1049–1057. doi:10.1016/j.idairyj.2005.09.006.
- Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Revista de Bacteriología Aplicada*. 23(1):130–135.
- Marques A, Chicaybam G, Araujo MT, Manhães LR, Sabaa-Srur A. 2010. Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Rev. Bras. Frutic*. 32(4):1206–1210. doi:10.1590/S0100-29452010005000117.
- Martínez M, Jiménez S, González S. 2007. Probióticos: Potencial para prevenir y curar. *RCCV, Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 1(2):573-583. spa.
- Musikasang H, Tani A, H-kittikun A, Maneerat S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J Microbiol Biotechnol*. 25(8):1337–1345. doi:10.1007/s11274-009-0020-8.
- Ngoc P, Le Binh T, Benno Y. 2003. Impact of two probiotic *Lactobacillus* strains feeding on fecal *lactobacilli* and weight gains in chicken. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 49(1):29–36. doi:10.2323/jgam.49.29.
- Oblitas K, Sancho A, Gozzi M. 2018. Caracterización físico-química de harina obtenida a partir de cáscaras de banana (*Musa paradisiaca*) y su aceptabilidad en budines sin gluten. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 28(2). es. <http://revcitecal.iiia.edu.cu/revista/index.php/RCTA/article/download/501/470>.
- Olagnero G, Abad A, Bendersky S, Genevois C, Granzella L, Montonati M. 2007. Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*; [consultado el 6 de oct. de 2019]. 25(121):20–33. <http://andeguat.org.gt/wp-content/uploads/2015/03/Alimentos-funcionales-fibra-prebi%C3%B3ticos-probi%C3%B3ticos-y-simbi%C3%B3ticos1.pdf>.

- Oliveira G, González I. 2007. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición hospitalaria*; [consultado el 29 de sep. de 2019]. 22(2):26–34. <http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v22s2/fisiologia4.pdf>.
- Ossa JA, Consuelo M, Badilla A. 2010. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*. 13(1):97–104.
- Pilco G, Borja D, Goetschel L, Andrade P, Irazabal J, Vargas-Jentzsch P, Guil-Guerrero J, Rueda-Ayala V, Ramos L. 2018. Caracterización bromatológica y evaluación de la actividad antimicrobiana en cáscara de banano Ecuatoriano (*Musa paradisiaca*). *Enfoque UTE*. 9(2):48–58. doi:10.29019/enfoqueute.v9n2.297.
- Quintero VC, Giraldo G, Lucas J, Vasco J. 2013. Caracterización fisicoquímica del mango común (*Mangifera indica* L.) durante su proceso de maduración. *Bioteología del Sector Agropecuario y Agroindustrial*; [consultado el 18 de sep. de 2019]. 11(1):10–18. <http://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/287/486>.
- Rinaldi M, Lima T., Ramírez D. 2010. Caracterização física de frutos de mamão e química de cascas e sementes.: *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*.
- Rocha RHC, Menezes JB, Morais EA, Silva GG, Ambrósio MMQ, Alves MZ. 2001. Uso do índice de degradação de amido na determinação da maturidade da manga 'Tommy Atkins'. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 23(2):302–305. doi:10.1590/S0100-29452001000200020.
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Michaelsen KF, Jeppesen D, Valerius N, Paerregaard A. 2003. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 111(2):389–395. eng. doi:10.1067/mai.2003.389.
- Sánchez L, Peña J. 2016. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* spp. contra patógenos causantes de mastitis bovina. *Revista de Salud Animal*. 38(2):85–92.
- Sánchez L, Vinchi J, Llanez M, Castro E, Soler D, Espinosa I, Kociubinski G, Ferreira C. 2011. Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidato a probióticos. *Revista de Salud Animal*; [consultado el 5 de oct. de 2019]. 33(3):154–160. <https://pdfs.semanticscholar.org/6f0b/102f0eb5c71c6742026d5abf82fcfb200940.pdf>.
- Sañudo R, Bustillos RJA, García LP, Molina EB, Nuño SO, Angel DN. 1997. Manejo postcosecha del mango. EMEX: A. C. 92 p
- Sari, Sari R, Untari EK. 2018. Antibacterial activity test of bacteriocin from *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* against Gram Positive pathogenic bacteria. *J.Trop.Biodiv.Biotech*. 3(3):85. doi:10.22146/jtbb.38138.
- Suárez JE. 2015. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos [Autochthonous microbiota, probiotics and prebiotics]. *Nutr Hosp*; [consultado el 23 de ago. de 2019]. 31(1):3–9. spa. <https://www.redalyc.org/pdf/3092/309238517001.pdf>. doi:10.3305/nh.2015.31.sup1.8701.

- Trallero O, Serrano L, Inglés M, Vallés D, Rodríguez A. 2019. Effect of the administration of a probiotic with a combination of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains on antibiotic-associated diarrhea. *Rev Esp Quimioter.* 32(3):268–272. eng.
- Trowell H, Southgate DAT, Wolever TMS, Leeds AR, Gassull MA, Jenkins DA. 1976. Dietary fibre redefined. *The Lancet.* 307(7966):967. doi:10.1016/S0140-6736(76)92750-1. REFERENCIAS.
- Vásquez S, Suárez H, Zapata S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición.* 36(1):1–8.
- Velraeds MM, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. 1996. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 62(6):1958–1963. eng.
- Ventola CL. 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy & Therapeutics.* 40(4):277–283. eng.
- Vitellio P, Celano G, Gobbetti M, Portincasa P, Angelis M. 2019. Effects of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus* on gut microbiota in patients with lactose intolerance and persisting functional gastrointestinal symptoms: A randomised, double-blind, cross-over study. *Nutrients.* 11(4). eng. doi:10.3390/nu11040886.
- Vu HT, Scarlett CJ, Vuong QV. 2017. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity from banana (*Musa cavendish*) peel. *Journal of Food Processing and Preservation.* 41(5):e13148. doi:10.1111/jfpp.13148.
- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology.* 74(16):4985–4996. eng. doi:10.1128/AEM.00753-08.
- Watson D, Motherway M, Schoterman MHC, van Neerven RJ, Nauta A, van Sinderen D. 2013. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology.* 114(4):1132–1146. en. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.12105>. doi:10.1111/jam.12105.
- Wood BBJ, Holzapfel WH. 1995. *The genera of lactic acid bacteria.* Boston, MA: Springer US. ISBN: 978-1-4613-7666-8.

7. ANEXOS

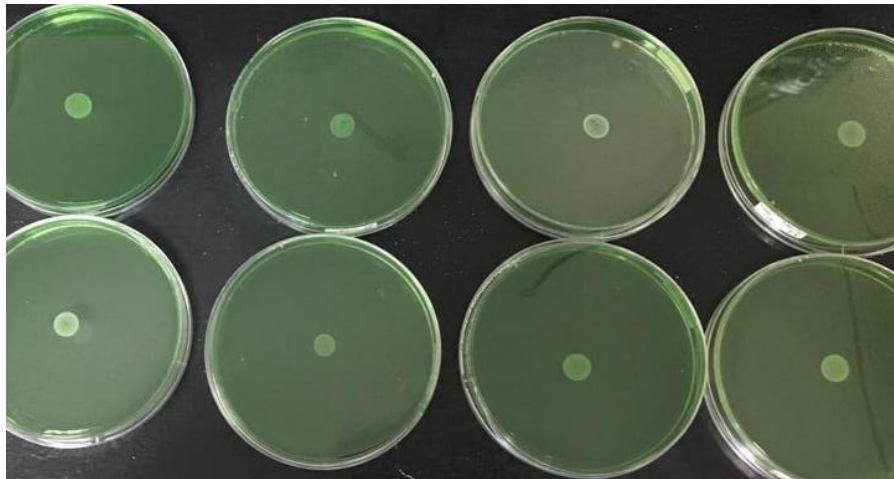
Anexo 1. Fotografía de la siembra por estría de las tres bacterias patógenas, después de 24 horas de incubación a 37 °C.



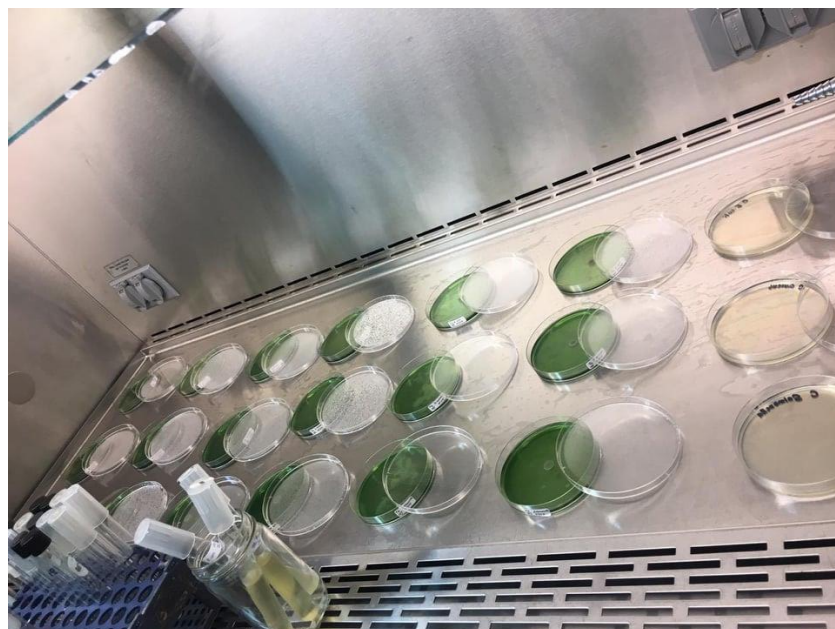
Anexo 2. Fotografía de los tubos de ensayo con las diferentes concentraciones del biopreparado de frutas (caldo MRS, 30, 40, 50, 60 y 70%).



Anexo 3. Fotografía de la gota de 10 microlitros del biopreparado inoculado con *Lactobacillus casei* en los diferentes tratamientos.



Anexo 4. Fotografía de las placas para los ensayos de inhibición en la cámara de flujo laminar para su secado completo.



Anexo 5. Cuadro resumen del análisis de varianza para la fase I.

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LOG Mean
0.64	8.24	0.62	7.53

Anexo 6. Separación de medias para la fase I del estudio con el programa SAS.

Duncan Grouping	Mean	N	TRT
A	7.7375	4	C
A	7.6200	4	50%
A	7.5375	4	60%
A	7.4375	4	70%
A	7.4125	4	30%
A	7.4125	4	40%

Anexo 7. Cuadro resumen del análisis de varianza de la fase II.

R-Square	Coeff Var	Root MSE	DH Mean
0.58	46.15	0.29	0.62