



# Optimización del proceso de liofilización de cultivos microbianos para su aplicación en laboratorios de control de calidad en alimentos

Optimization of the freeze-drying process of microbial cultures for application in food quality control laboratories

MYLADY A. BASTIDAS DALLA TORRE<sup>1\*</sup>, LAURA DE OLIVEIRA<sup>2\*\*\*</sup>, ARCIDES PERDOMO<sup>3\*\*</sup>, LIZET BOU RACHED<sup>4\*\*\*</sup>, MARÍA ISABEL CALDERÓN<sup>5\*\*\*</sup>, ALICIA MARIELA RINCÓN<sup>6\*\*\*</sup>, ANA MARÍA REYES<sup>7\*\*\*</sup>

## Resumen

**Introducción:** Uno de los pilares de la calidad en la industria alimentaria es la inocuidad. Los ensayos interlaboratorios constituyen una herramienta para evaluar el desempeño de los analistas y la veracidad de los resultados. La obtención de un material de referencia, homogéneo y estable, resulta un desafío en microbiología. La liofilización es una solución prometedora para este problema. **Objetivo:** Optimizar el proceso de liofilización de cultivos microbianos para su aplicación en laboratorios de control de calidad de alimentos. **Materiales y métodos:** El microorganismo seleccionado fue *Lactobacillus* por su papel en el deterioro alimentario. Las cepas utilizadas fueron *L. brevis*, *L. fructivorans*, *L. paracasei* y *L. plantarum*. Se utilizó un liofilizador Labconco 4,5 L. El protocolo de liofilización se estableció según el Capítulo 6 del Boletín Nº 428 del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y la ISO 13528:2015. **Resultados:** Se obtuvo un inóculo estable de *Lactobacillus*, aplicable a la investigación. Se evaluó el efecto de los lioprotectores sobre la viabilidad celular, y se encontró que la leche descremada al 10% fue la más eficaz. Se determinó la concentración microbiana más estable del inóculo, resultando ser  $10^5$  UFC/mL. El lote del inóculo liofilizado cumplió con el criterio de homogeneidad según la ISO 13528:2015. La estabilidad se mantuvo a 5 °C y a -12 °C por 48 horas, pero se vio comprometida a 28 °C y 37 °C por 7 días. El inóculo se aplicó con éxito en un interlaboratorio piloto. **Conclusiones:** Se demostró que el proceso optimizado permite obtener inóculos liofilizados homogéneos y estables aplicables a interlaboratorios microbiológicos.

**Palabras clave:** Liofilización, inóculos, inóculos liofilizados, *Lactobacillus*, interlaboratorio microbiológico, material de referencia

## Abstract

**Introduction:** Food safety is a cornerstone of quality in the food industry. Therefore, interlaboratory tests are a crucial tool for evaluating analyst performance and the veracity of results. However, obtaining homogeneous and stable reference material remains a challenge in microbiology. Lyophilization offers a promising solution to this problem. **Objective:** To optimize the lyophilization process for microbial cultures for their application in food quality control laboratories. **Materials and Methods:** The selected microorganism was *Lactobacillus* due to its role in food spoilage. The specific strains used were *L. brevis*, *L. fructivorans*, *L. paracasei*, and *L. plantarum*. A Labconco 4.5 L lyophilizer was utilized. The lyophilization protocol was established in accordance with Chapter 6 of Bulletin No. 428 from the Institute of Agricultural Research and ISO 13528:2015. **Results:** A stable *Lactobacillus* inoculum suitable for research was successfully obtained. The effect of various lyoprotectants on cell viability was evaluated, with 10% skim milk proving to be the most effective. The most stable microbial concentration for the inoculum was found to be  $10^5$  CFU/mL. The batch of lyophilized inoculum met the homogeneity criterion as specified in ISO 13528:2015. Stability was maintained at 5°C and -12°C for 48 hours, but it was compromised at 28°C and 37°C after 7 days. The inoculum was successfully applied in a pilot interlaboratory study. **Conclusions:** The optimized process was demonstrated to enable the production of homogeneous and stable lyophilized inocula suitable for microbiological interlaboratory testing.

**Keywords:** Liofilización, inóculos, inóculos liofilizados, *Lactobacillus*, interlaboratorio microbiológico, material de referencia

\*Mención Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. \*\*Empresas Polar.

\*\*\*Unidad de Investigación Análisis de Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela.

Correspondencia: lizethbourachedr@gmail.com

Orcid: <sup>1</sup>[0009-0004-0554-0839](https://orcid.org/0009-0004-0554-0839)

<sup>2</sup>[0009-0003-7516-8449](https://orcid.org/0009-0003-7516-8449)

<sup>3</sup>[0009-0008-8406-973X](https://orcid.org/0009-0008-8406-973X)

<sup>4</sup>[0009-0005-8951-0377](https://orcid.org/0009-0005-8951-0377)

<sup>5</sup>[0000-0002-2094-8638](https://orcid.org/0000-0002-2094-8638)

<sup>6</sup>[0009-0003-7187-6966](https://orcid.org/0009-0003-7187-6966)

<sup>7</sup>[0009-0008-9378-5498](https://orcid.org/0009-0008-9378-5498)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.88.2.7](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.2.7)

Disponible: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ff](http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff)

Recepción: 06/10/2025

Aprobación: 20/10/2025

Rev. Fac. Farmacia 88(2): 217-233. 2025

## Introducción

Garantizar la seguridad y la calidad es una prioridad para la industria alimentaria, y el control microbiológico es una herramienta clave para evaluar cada lote antes de su comercialización. Los microorganismos presentes en los alimentos pueden ser deteriorativos, afectando propiedades sensoriales y fisicoquímicas, o patógenos, representando un riesgo directo para la salud pública al causar enfermedades (Jay y col., 2005; Sperber y Doyle, 2009; Organización Panamericana de la Salud, 2023; Organización Mundial de la Salud, 2024).

Entre los microorganismos deteriorativos, destacan las bacterias ácido-lácticas (BAL), como las del género *Lactobacillus*, gracias a su capacidad para causar el deterioro en alimentos, particularmente matrices de composición ácida ( $\text{pH} < 4$ ), un pH inferior al óptimo para el crecimiento de la mayoría de las bacterias (Jay y col., 2005; Abiola y col., 2022).

Este grado de contaminación microbiana debe ser meticulosamente controlado por las empresas a través de sus laboratorios de microbiología, tomando como base para su funcionamiento las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) descritas en la norma ISO 17025:2005. Este documento establece que los fabricantes precisan evaluar continuamente el desempeño de sus analistas y la veracidad de sus resultados, para lo que se emplea la comparación interlaboratorio. Un ensayo interlaboratorio se define como un proceso estandarizado donde múltiples laboratorios analizan la misma muestra para comparar sus resultados y evaluar su desempeño (Norma ISO 17025:2005; Del Pilar, 2024).

De acuerdo con la Norma ISO 17043:2011, para la ejecución de ensayos interlaboratorios se debe usar un material de referencia, definido como un material suficientemente homogéneo y estable respecto a una o más de sus propiedades específicas, que ha sido comprobado como apto para su utilización en procesos de medición (Norma ISO 35:2006). Esto representa un desafío persistente en los interlaboratorios de microbiología, ya que la preparación de un material de referencia homogéneo y estable en el tiempo resulta muy compleja, pues la concentración microbiana de un cultivo puede variar significativamente a lo largo de su vida útil (Centro Nacional del Medio Ambiente, 2006). Tradicionalmente, se usan inóculos en forma de suspensiones microbianas de concentración conocida para contaminar intencionalmente las muestras a analizar. Sin embargo, su concentración puede variar drásticamente debido a la susceptibilidad de los microorganismos a las condiciones ambientales. Este método convencional presenta desventajas significativas, como la necesidad de realizar pruebas extensas sobre el efecto de la matriz alimentaria y la complejidad de preparar grandes cantidades de material de referencia, que no son estables en el tiempo, lo que implica una inversión de recursos en gran medida (Wehrmann, 2005).

Para superar estos inconvenientes, la liofilización emerge como una alternativa prometedora para la conservación de inóculos microbianos. Este proceso elimina el agua por sublimación bajo vacío, transformando el cultivo en un polvo que preserva la integridad celular y prolonga la vida útil de los microorganismos por diez años o más (García y Uruburu, 2000;

Martínez y col., 2018). La liofilización minimiza el riesgo de cambios genéticos y facilita enormemente el almacenamiento y transporte, incluso a temperatura ambiente por períodos cortos, lo que la convierte en una herramienta de gran potencial para optimizar el diseño y la ejecución de interlaboratorios en la industria alimentaria (García y Uruburu, 2000; Martínez y col., 2018; Quintero y col., 2023).

A pesar de sus ventajas, el proceso de liofilización puede resultar perjudicial para las células microbianas debido a la formación de cristales de hielo y a la alta presión osmótica generada durante el proceso. La susceptibilidad varía según el microorganismo, lo que destaca la necesidad de incorporar agentes lioprotectores. Estas sustancias protegen la integridad celular, evitan la formación de cristales de hielo y son esenciales para asegurar la viabilidad y funcionalidad de los microorganismos liofilizados (Barragán y Lesmes, 2009; Santelices y Castro, 2020).

Para la liofilización de *Lactobacillus*, se han empleado distintos agentes lioprotectores que han resultado eficaces para preservar la viabilidad y estabilidad de las células microbianas (Tabla I).

El presente trabajo propone optimizar el proceso de liofilización de cultivos microbianos, con especial énfasis en su aplicación en laboratorios de control de calidad de alimentos y en programas interlaboratorios. Mediante un diseño experimental sistemático, se busca evaluar parámetros clave, como la selección de agentes lioprotectores, la homogeneidad de los inóculos liofilizados y su estabilidad a lo largo del tiempo y bajo distintas condiciones de almacenamiento. La implementación exitosa de esta optimización permitirá a la industria alimentaria diseñar y ejecutar interlaboratorios de manera más eficiente, fortaleciendo la inocuidad alimentaria y la competencia técnica de los laboratorios de control de calidad microbiológica, consolidando a la empresa como un referente en calidad e innovación.

## Materiales y Métodos

### Materiales

Las cepas utilizadas (*L. brevis*, *L. fructivorans*, *L. paracasei* y *L. Plantarum*) fueron proporcionadas por la empresa donde se realizó la investigación. Se empleó

**Tabla I.**  
Lioprotectores específicos para liofilizados de *Lactobacillus*

Lioprotector	Concentración de uso	Mecanismo	Referencia
Leche descremada	Del 10 al 20%	Posee macromoléculas, como la lactosa (disacárido), que disminuyen los efectos deletéreos en la membrana y previenen la desnaturización de proteínas, y aminoácidos, que ayudan en la reparación de células dañadas y aportan energía en la regeneración del microorganismo.	Guerra y Castro (2020)
Sacarosa al 8% en caldo MRS	Del 2 al 15%	Disacáridos como la sacarosa disminuyen los efectos deletéreos sobre la membrana y previenen la desnaturización de las proteínas.	Chen y col. (2017) Li y col. (2010)
Lactosa al 15% en agua estéril	15%		Li y col. (2010) Guerra y Castro (2020)

Caldo MRS: Man, Rogosa y Sharpe

el liofilizador Labconco FreeZone de 4,5 L. Se usaron reactivos de grado analítico, tales como leche descremada (Oxoid), agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Oxoid), lactosa (Merck), caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Merck), agar Rogosa (Merck).

## Metodología

El procedimiento para la optimización de la liofilización de microorganismos se basó en el Capítulo 6 del Boletín Nº 428 del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Santelices y Castro, 2020) y en procedimientos internos de la empresa, adaptados a las necesidades y a la disponibilidad de equipos, reactivos y cepas del laboratorio. Se siguieron los lineamientos expuestos en la Norma ISO 17043:2011 (Evaluación de la conformidad: Requisitos generales para los ensayos de aptitud), ISO 13528:2015 (Métodos estadísticos para uso en ensayos de aptitud interlaboratorio) y la ISO 35:2006 (Materiales de Referencia - Guía para la caracterización y evaluación de la homogeneidad y la estabilidad), en donde se detallan aspectos a evaluar para la conformidad de un material de referencia (MR) a ser aplicado en ensayos de interlaboratorio, en donde se exponen las siguientes premisas:

**Debe ser homogéneo:** Se refiere a la uniformidad de la propiedad a medir (en este caso, la concentración microbiana) entre las distintas unidades de un mismo lote de material de referencia. Es decir, que cada laboratorio participante reciba una muestra con una concentración idéntica o muy similar.

**Debe ser estable:** Se refiere a la capacidad de mantener sus propiedades (concentración microbiana) inalteradas a lo largo del tiempo

y bajo las condiciones de almacenamiento y transporte correspondientes. Esto incluye tanto la estabilidad a largo plazo (vida útil) como la estabilidad a corto plazo (durante el transporte y la manipulación previa al ensayo).

## Obtención de un inóculo estable de las cepas de *Lactobacillus* de interés

La actividad metabólica de *Lactobacillus* spp. genera compuestos como el ácido láctico, etanol y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que afectan las propiedades sensoriales de los alimentos cuando su crecimiento se ve favorecido. Alteraciones como sabor amargo, olores extraños y turbidez o viscosidad excesivas son indicadores de deterioro, lo que compromete la calidad y el valor comercial del producto (Sperber y Doyle, 2009).

Aunque el pH bajo y el ácido acético inhiben la mayoría de las bacterias, ciertas especies de *Lactobacillus* (*L. fructivorans*, *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. paracasei*) resisten estas condiciones, lo que causa el 25% de las alteraciones en productos con pH inferior a 4-5 (Sperber y Doyle, 2009). Estas cepas fueron seleccionadas por su impacto documentado en la industria alimentaria, donde prometen la calidad de derivados lácteos, salsas y bebidas fermentadas (Bjorkroth y Korkeala, 1997).

Para la obtención del inóculo de cepas de *Lactobacillus*, se siguieron los protocolos internos de la empresa. La metodología consistió inicialmente en recuperar las cepas (provenientes del cepario o aisladas de procesos) por la técnica de repique en placa por duplicado en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y se incubaron a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 horas, en anaerobiosis usando sobres y jarras marca Anaerocult®.

Seguidamente, se inundó cada placa con 7 mL de agua destilada estéril y por el método de raspado de colonias se trasvasó el contenido a un tubo Falcon con ayuda de una micropipeta, obteniéndose un volumen de 14 mL de suspensión microbiana de cada cepa. A continuación, se determinó la concentración por el método de recuento en placa empleando como diluyente agua peptonada al 0,1% y agares selectivos para *Lactobacillus*: Agar Suero Naranja (ASN) en condición de aerobiosis y Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) en anaerobiosis (Figura 1).

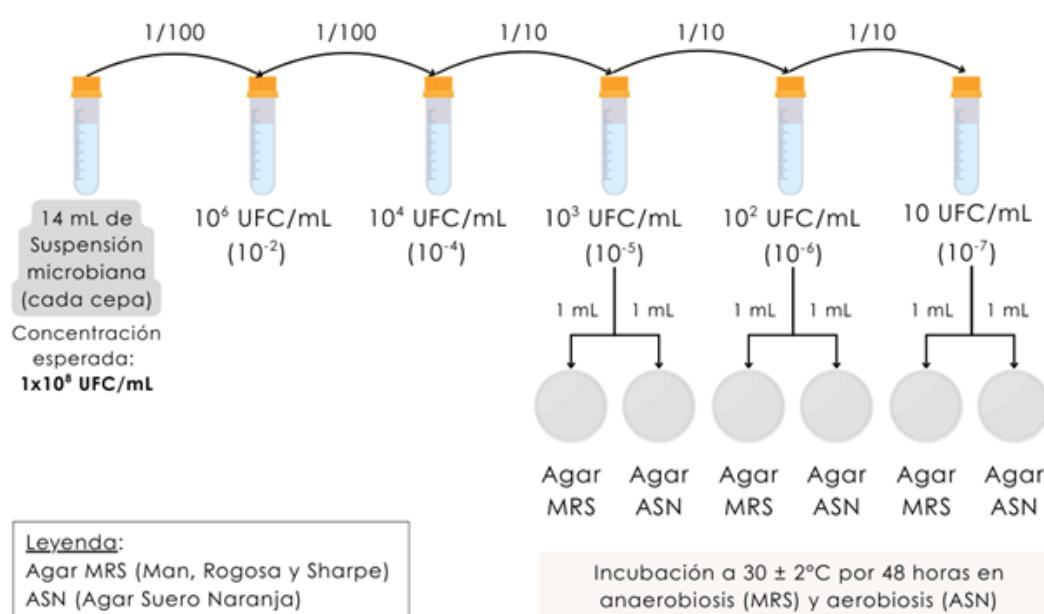
Después de determinar la concentración de cada suspensión, se realizaron los cálculos para determinar las alícuotas a tomar de cada cepa para lograr un cóctel de inóculo de *Lactobacillus* con la concentración deseada de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, en el que el aporte de cada cepa fuera equitativo. Una vez mezclados los volúmenes, se determinó la concentración final del inóculo y se evaluó su estabilidad durante dos meses en refrigeración ( $5^\circ\text{C}$ ). Para ello, se empleó el método de recuento

en placa, sembrando los tres niveles de dilución para obtener un recuento dentro del rango contable (Figura 2).

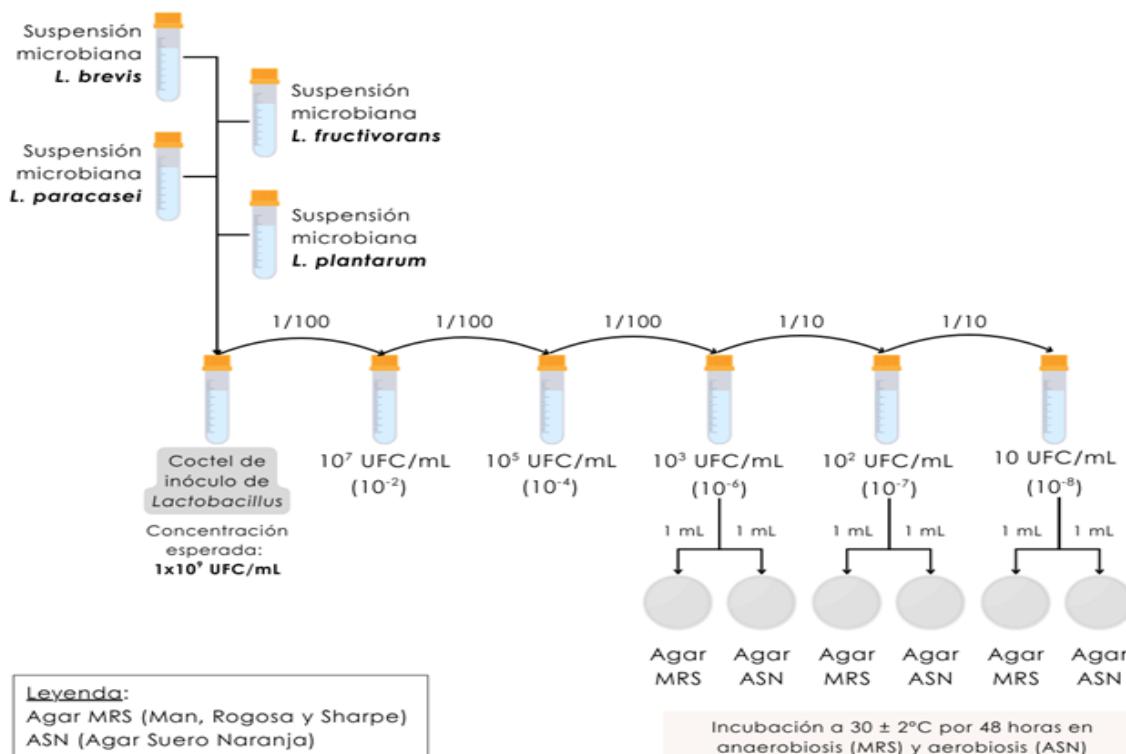
### Evaluación de la estabilidad del inóculo en diferentes lioprotectores antes y después del proceso de liofilización

Inicialmente, se realizó una prueba preliminar con el fin de estudiar cómo se comportan los agentes lioprotectores por sí solos durante la liofilización. Un factor importante a considerar fue el volumen de líquido a liofiltrar, para lo cual se probó centrifugando y retirando el sobrenadante previo a la liofilización, de modo que se liofilizaron 1 mL y 0,15 mL de cada lioprotector.

Tomando como referencia lo establecido en el capítulo 6 del Boletín Nº 428 del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (Santelices y Castro, 2020), se diseñó un protocolo para obtener el inóculo liofilizado empleando como diluyente cada uno de los



**Figura 1.** Determinación de la concentración de las suspensiones microbianas de cada cepa de *Lactobacillus*. Fuente: Elaboración propia



**Figura 2.** Determinación de la concentración del cóctel de inóculo de *Lactobacillus*. Fuente: Elaboración propia

lioprotectores evaluados: Lactosa al 15% en agua destilada estéril, Lactosa al 15% en caldo MRS, Leche descremada al 10% y Sacarosa al 8% en caldo MRS (Figura 3).

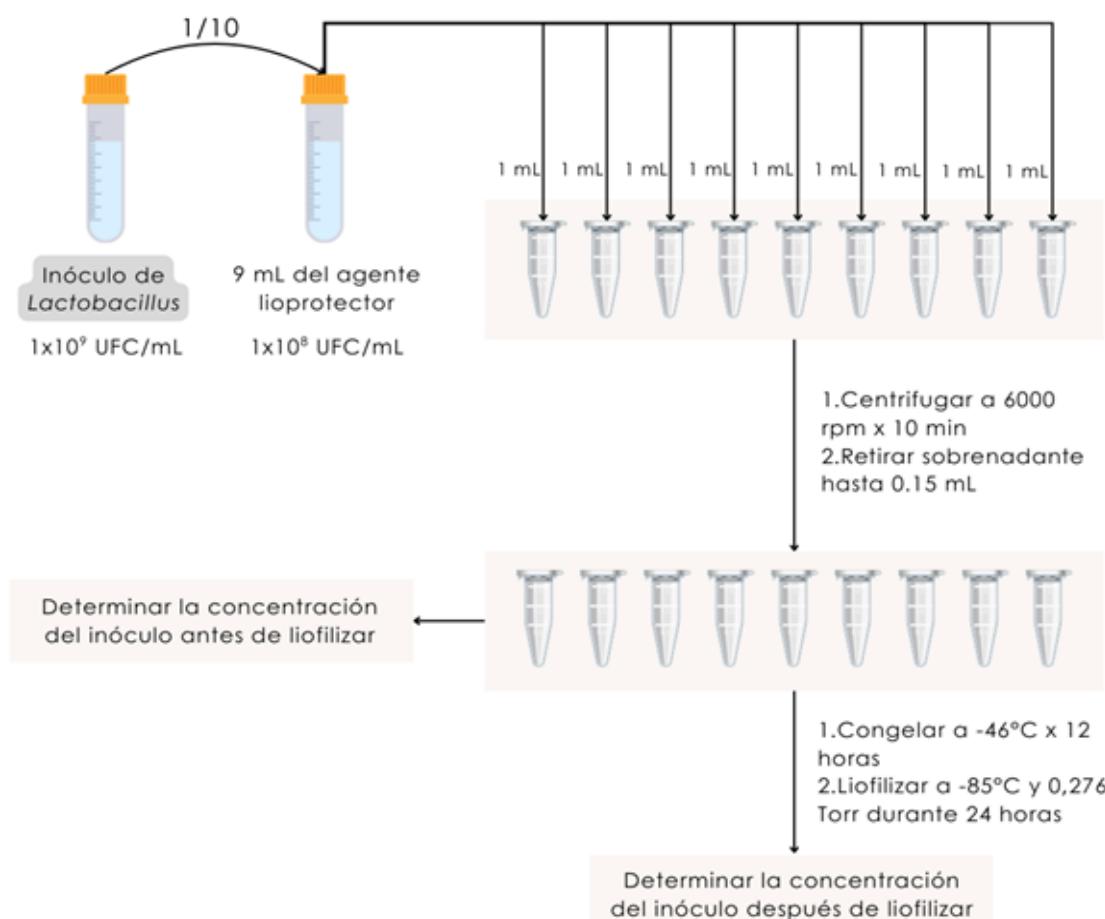
Para evaluar la eficacia de cada lioprotector, se determinó la concentración del inóculo antes y después del proceso de liofilización mediante el método de recuento en placa (Figura 4). Este procedimiento se realizó por triplicado para cada lioprotector, con el objetivo de comparar su efecto sobre la viabilidad celular. La selección del mejor lioprotector se basó en calcular la diferencia absoluta entre las concentraciones del inóculo antes y después de la liofilización, considerando como criterio que dicha diferencia fuera menor a 0,5 (USP, 2018). Además, se tomaron en cuenta otras propiedades, como la facilidad de preparación del lioprotector y el aspecto final del producto liofilizado.

### Fórmula para el cálculo de viabilidad celular

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Concentración celular después de liofilizar (UFC/mL)}}{\text{Concentración celular antes de liofilizar (UFC/mL)}} \times 100$$

### Determinación de la concentración microbiana ideal del inóculo liofilizado para su aplicación en laboratorios de control de calidad de alimentos

Para obtener la concentración microbiana ideal del inóculo, se utilizó el lioprotector más eficaz obtenido en la fase anterior. Se elaboraron inóculos liofilizados de *Lactobacillus* a partir del cóctel inicial con una concentración de  $10^9 \text{ UFC/mL}$ , ajustándose para obtener concentraciones finales de  $10^5$ ,  $10^4$  y  $10^3 \text{ UFC/mL}$  (Figura 5). Al igual que en la etapa previa, la concentración del inóculo se determinó antes y después de la liofilización por el método de recuento en placa, realizando



**Figura 3.** Protocolo para la obtención de inóculos liofilizados en cada agente lioprotector evaluado.

Fuente: Elaboración propia

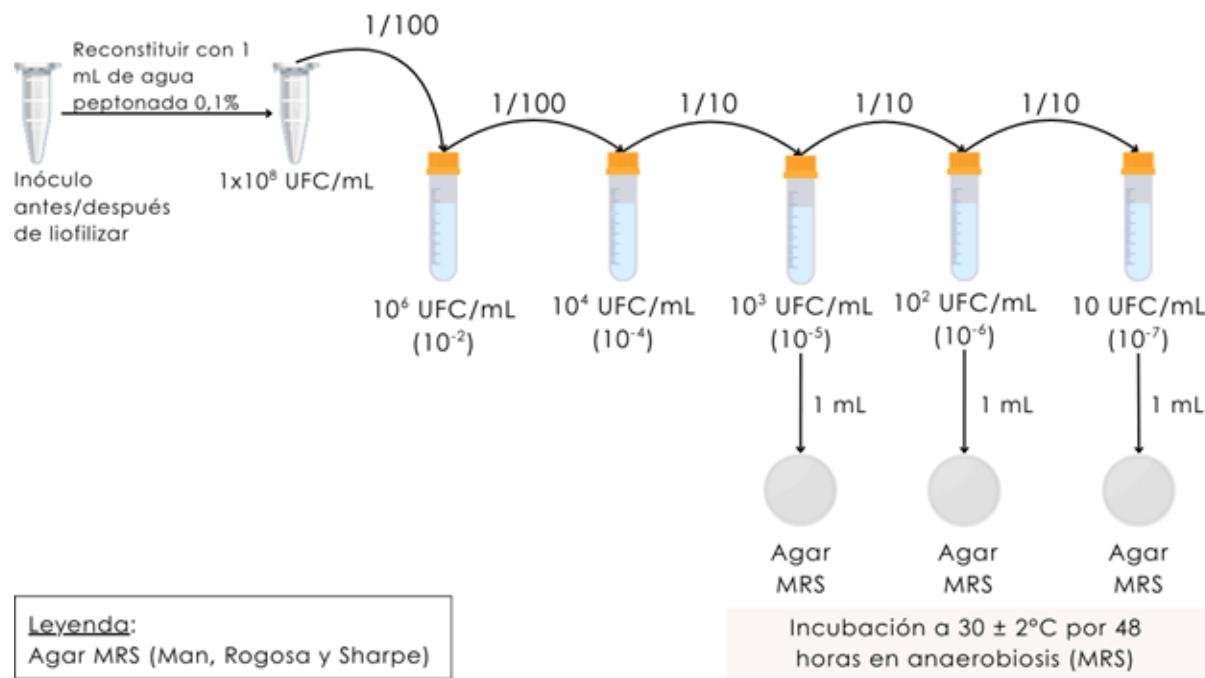
el procedimiento por triplicado. Esto permitió analizar el comportamiento de cada nivel de inóculo y definir con precisión la concentración óptima del proceso. El criterio de aceptación, igual que en la etapa anterior, consistió en calcular la diferencia absoluta entre las concentraciones antes y después de la liofilización. Sin embargo, en este caso, la concentración ideal es aquella que arroje la menor diferencia (USP, 2018).

#### **Determinación de la homogeneidad del lote de inóculos como material de referencia de acuerdo con la ISO 13528:2015**

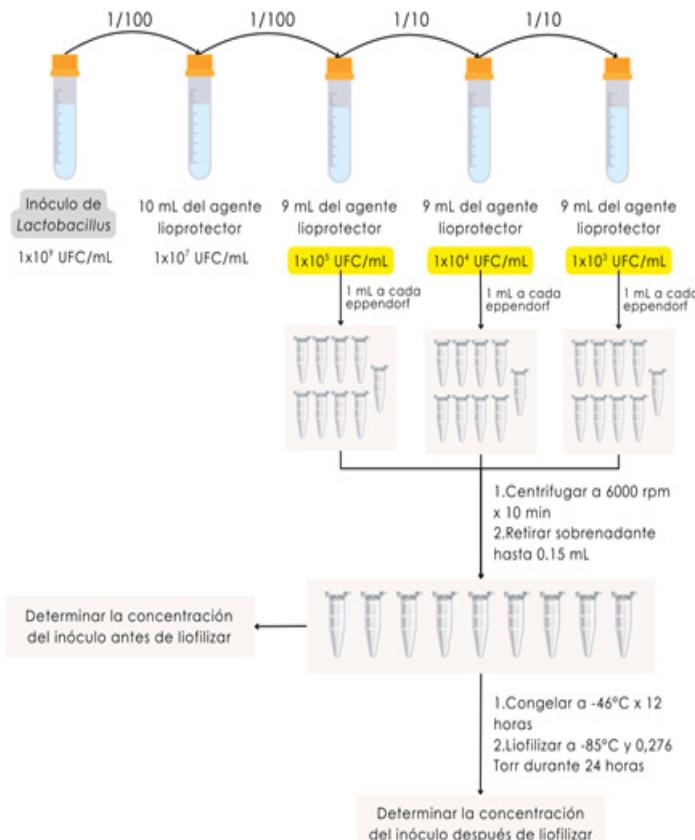
Tras seleccionar el lioprotector más eficaz y determinar la concentración

óptima del inóculo, se procedió a evaluar la homogeneidad del lote de MR, con el objetivo de verificar su cumplimiento de los requisitos establecidos en la norma ISO 13528:2015. Para esta prueba, se elaboró un lote de 90 inóculos liofilizados y se seleccionaron aleatoriamente 20 muestras para su análisis. Cada muestra fue procesada según el protocolo previamente descrito y su concentración se determinó mediante recuento en placa.

El criterio de aceptación para este parámetro consistió en que la desviación estándar entre las muestras debía ser menor que el valor de comprobación calculado. A modo complementario, se determinó la dispersión de los datos, identificando



**Figura 4.** Determinación de la concentración del inóculo antes y después de liofilizar por el método de recuento en placa. Fuente: Elaboración propia



**Figura 5.** Protocolo para la obtención de inóculos de *Lactobacillus* liofilizados para evaluar la concentración ideal.  
Fuente: Elaboración propia

cuántos valores se encontraron fuera de especificación mediante un gráfico de control, cuyos límites se establecieron en 2 veces la desviación estándar obtenida. El criterio para esta prueba consistió en que no más de 2 valores salieran de especificación (Norma ISO 13528:2015; Mitra, 2014).

#### Fórmula para calcular el valor de comprobación

$$\text{Valor de comprobación} = 0,3\sigma_{\text{pt}}$$

Donde:  $\sigma_{\text{pt}} = \text{Desviación estándar para la evaluación de la aptitud}$

$\sigma_{\text{pt}} = \text{Propósito de aptitud} \times \text{Promedio de las muestras}$

Donde: El propósito de la aptitud se refiere al error admisible según la naturaleza del ensayo, lo que permite que la  $\sigma_{\text{pt}}$  sea adecuada para la evaluación realista del desempeño. Para efectos de esta investigación, se tomó el valor del 15% referido en la ISO 13528:2015.

## Evaluación de la estabilidad del inóculo liofilizado en el tiempo, bajo las posibles condiciones de almacenamiento

Para estudiar la estabilidad del inóculo liofilizado, se utilizó el lote previamente preparado. Se evaluó la variación en la concentración del inóculo utilizando el lioprotector más eficaz y la concentración óptima determinada en las fases anteriores, a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de almacenamiento (Tabla II). El método empleado fue el recuento en placa y el análisis se realizó por triplicado.

El criterio de aceptación para la estabilidad del inóculo en refrigeración ( $5^{\circ}\text{C}$ ) consistió en que la diferencia absoluta del promedio de las concentraciones obtenidas en cada tiempo y el valor de referencia (promedio resultante de la prueba de homogeneidad) fueran menores a 0,5. A modo complementario, se elaboró un gráfico de concentración vs. tiempo que permitió visualizar las variaciones en la concentración del inóculo liofilizado.

Respecto a la estabilidad del inóculo en diferentes condiciones de almacenamiento, además de aplicar el criterio de la diferencia absoluta  $<0,5$ , se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) paramétrico o no paramétrico, dependiendo de si los datos obtenidos cumplían con una distribución normal (Tabla III), lo que permitió determinar diferencias significativas entre las condiciones evaluadas (ISO 13528:2015).

## Aplicación de los inóculos obtenidos en un ensayo piloto interlaboratorio

Siguiendo las directrices de la Norma ISO 17043:2011, se diseñó y ejecutó un interlaboratorio piloto para validar el uso del inóculo liofilizado de *Lactobacillus* como material de referencia. Se preparó un lote de 60 ejemplares, de los cuales se seleccionaron aleatoriamente 5 para realizar una prueba preliminar de homogeneidad.

El diseño del interlaboratorio incluyó detalles específicos, como las instrucciones para la adecuada reconstitución del

**Tabla II.**  
Condiciones para evaluar la estabilidad del inóculo liofilizado de *Lactobacillus*

Estabilidad	Condiciones	Finalidad
A largo plazo	Estabilidad en refrigeración: Se monitoreó la concentración del inóculo a los días 1, 9, 14, 28 y 35 a una temperatura de refrigeración ( $-5^{\circ}\text{C}$ ).	Evaluar la estabilidad en condiciones óptimas de almacenamiento prolongado. Este ensayo permitió identificar posibles variaciones en condiciones controladas.
A corto plazo	Estabilidad a $28^{\circ}\text{C}$ por 7 días: Se midió la concentración al inicio y al final de un período de 7 días a esta temperatura.	Simular las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente cálida y su impacto sobre el inóculo.
	Estabilidad a $37^{\circ}\text{C}$ por 7 días: Se evaluó la concentración al principio y al finalizar 7 días a $37^{\circ}\text{C}$ .	Analizar la resiliencia del inóculo frente a temperaturas elevadas, como las que podrían presentarse durante el transporte o en almacenes no climatizados.
	Estabilidad tras congelación ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) por 48 horas y descongelación: Se analizó la concentración antes de un período de congelación de 48 horas y nuevamente después de descongelar.	Determinar el impacto de una congelación accidental en la integridad del material.

**Tabla III.**  
Criterios para el análisis de varianza de los datos

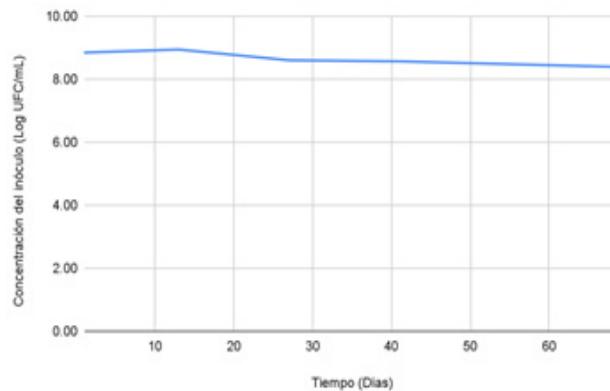
Prueba estadística	Objetivo	Criterio	Referencias bibliográficas
Prueba de Shapiro-Wilk	Determinar si los datos siguen una Distribución normal	$p > 0,05$ : No se rechaza la normalidad $p \leq 0,05$ : Se rechaza la normalidad, los datos no son normales	Sánchez y col., 2024 Roco y col., 2024
ANOVA paramétrico (Distribución normal)	Comparar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de tres o más grupos independientes.	$p > 0,05$ : No hay diferencias estadísticas entre las medias de los grupos. $p \leq 0,05$ : Al menos un grupo es diferente; se rechaza la hipótesis nula.	Molina, 2017
ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) (No tienen una Distribución normal)			

liofilizado, la inoculación de la matriz seleccionada y las diluciones necesarias para evaluar la recuperación de la carga microbiana inoculada. En este caso, se utilizó el queso fundido como matriz de interés, considerando su relevancia en la industria alimentaria y con el objetivo de analizar cómo las condiciones adversas del alimento afectan la viabilidad del inóculo de *Lactobacillus*. Como criterio de aceptación, a los resultados del interlaboratorio se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) paramétrico o no paramétrico, de acuerdo a si los datos obtenidos tienen una distribución normal o no (Tabla III).

## Resultados y Discusión

El cóctel del inóculo de *Lactobacillus* obtenido demostró ser altamente estable a lo largo del tiempo, lo que permitió su uso consistente durante toda la investigación (Figura 6).

Al evaluar la estabilidad del inóculo en diferentes lioprotectores, en la prueba



**Figura 6.** Curso temporal de la concentración del cóctel de inóculo de *Lactobacillus*

preliminar se determinó que un volumen de 0,15 mL era el más adecuado para el proceso de liofilización en comparación con 1 mL. Esto se debe a que, al centrifugar y retirar el sobrenadante, se logra recuperar el nivel de inóculo esperado utilizando un menor volumen de líquido, lo que favorece una liofilización más rápida y mejora la apariencia final del producto liofilizado. Durante la evaluación de la estabilidad del cultivo en diferentes lioprotectores, se determinó la concentración del inóculo antes y posterior a la liofilización (Tabla IV).

**Tabla IV.**  
Evaluación de lioprotectores en inóculos liofilizados de *Lactobacillus*

Lioprotectores	Inóculo antes de liofilizar (Log UFC/mL)	Inóculo después de liofilizar (Log UFC/mL)	Diferencia absoluta	% viabilidad	DE
Sacarosa al 8% en MRS	7,96	7,46	0,50	93,73	0,05
<b>Leche descremada al 10%</b>	7,72	7,24	<b>0,48</b>	<b>93,80</b>	0,04
<b>Lactosa al 15% en MRS</b>	7,92	7,51	<b>0,41</b>	<b>94,88</b>	0,03
Lactosa al 15% en agua destilada	7,98	7,27	0,72	91,04	0,16

DE = desviación estándar. MRS= Man, Rogosa y Sharpe. n=3

Los lioprotectores que arrojaron menor variación entre la concentración antes y después de la liofilización, con un mayor porcentaje de viabilidad, fueron lactosa al 15% en caldo MRS, con una diferencia absoluta de 0,41, y leche descremada al 10%, con 0,48. Por otro lado, el resto de los lioprotectores arrojaron diferencias mayores a 0,50, excediendo el criterio establecido.

Para la selección del mejor lioprotector, además de escoger aquel que permitió una mayor viabilidad post-liofilización, también se consideraron otros aspectos, como la apariencia del liofilizado, la formación de un sólido uniforme y la facilidad para su preparación. Se decidió escoger la leche descremada al 10%, ya que la apariencia del liofilizado era más uniforme en comparación con la lactosa al 15% en caldo MRS. Adicionalmente, la preparación de la leche descremada al 10% resulta más fácil que la lactosa al 15% en caldo MRS, ya que esta última no se puede esterilizar por autoclave, sino por filtración, lo que a gran volumen de lioprotector resulta más complicado.

El comportamiento del inóculo de *Lactobacillus* en leche descremada al 10%

se evaluó a distintas concentraciones. Como se observa en la Tabla V, la concentración del inóculo más estable tras la liofilización fue de  $10^5$  UFC/mL, ya que presentó una mayor viabilidad (73,43%) en comparación con las concentraciones de  $10^3$  y  $10^4$  UFC/mL. Además, mostró una menor diferencia absoluta entre las concentraciones antes y después de la liofilización, con un valor de 1,59. Estos resultados sugieren que una mayor concentración inicial del inóculo podría estar relacionada con una mayor estabilidad post-liofilización.

Después de analizar los 20 inóculos seleccionados aleatoriamente, se calculó el promedio entre las muestras procesadas, para lo que se decidieron excluir 4 datos que resultaron valores atípicos (con un exceso de más de 3 veces la desviación estándar), esto con el fin de obtener un análisis estadístico más cercano a la realidad. Se calculó el promedio con los 16 datos y su desviación estándar (DE), la cual resultó menor que el valor de comprobación, cumpliendo con el requisito establecido (Norma ISO 13528:2015) (Tabla VI).

A modo complementario, los datos se analizaron mediante un gráfico de control, empleando como criterios de aceptación

**Tabla V.**  
Concentración ideal para los inóculos liofilizados de *Lactobacillus*

Nivel objetivo (UFC/mL)	Inóculo antes de liofilizar (Log UFC/mL)	Inóculo después de liofilizar (Log UFC/mL)	Diferencia absoluta	% Viabilidad	DE
$10^5$ UFC/ mL	5,97	4,39	1,59	73,43	0,43
$10^4$ UFC/ mL	4,97	3,10	1,87	62,40	0,17
$10^3$ UFC/ mL	3,94	2,30	1,64	58,34	0,00

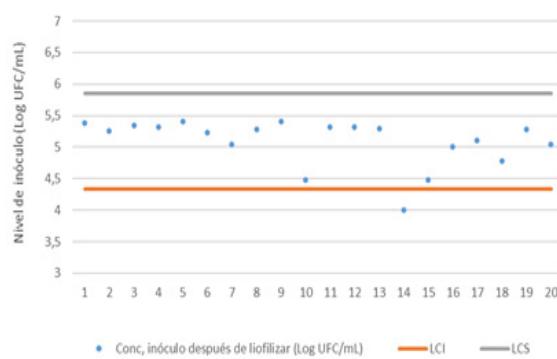
DE: desviación estándar. n=3

**Tabla VI.**  
Homogeneidad del lote de inóculos liofilizados de *Lactobacillus*

Promedio	Desviación Estándar (DE)	Propósito de aptitud	Desviación del ensayo de aptitud	Valor de comprobación	Criterio de aceptación	Resultado
5,25	0,13	0,15	0,79	0,24	DE < Valor de comprobación	Conforme

n=16

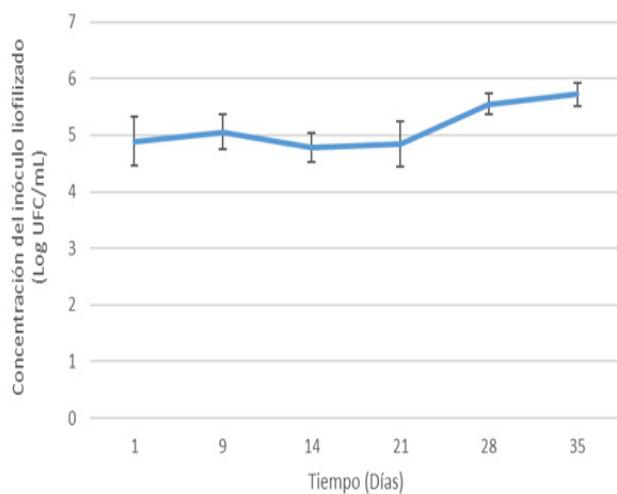
el doble de la desviación estándar como límite superior e inferior (Figura 7). El gráfico permitió estudiar la dispersión de los datos, arrojando un único valor como fuera de especificación, mientras que los otros 19 valores se encuentran dentro de los límites permitidos. Por lo tanto, el lote cumple con ambos criterios de aceptación.



**Figura 7.** Evaluación de la homogeneidad de los inóculos liofilizados a través de un gráfico de control

Se estudió la estabilidad del inóculo en leche descremada al 10% y a una concentración de  $10^5$  UFC/mL en el tiempo,

bajo condiciones de refrigeración ( $5^\circ\text{C}$ ) en donde se evidenció que el inóculo se mantuvo alrededor de 5 UFC/mL, expresado en logaritmo (Figura 8).



**Figura 8.** Curso temporal de la estabilidad del inóculo liofilizado a temperatura de refrigeración ( $5^\circ\text{C}$ )

La concentración inicial del inóculo liofilizado se ubicó en 4,39 UFC/mL y se observaron fluctuaciones en la concentración, con un valor máximo de 5,72 UFC/mL y un mínimo de 4,78 UFC/mL

(Figura 8). Dichas variaciones pueden estar relacionadas con el nivel de homogeneidad y con técnicas no adecuadas para la reconstitución del liofilizado, lo cual se corrigió posteriormente en la investigación.

El promedio de las concentraciones obtenidas en cada tiempo se comparó con el promedio de la prueba de homogeneidad (referencia), cuyos valores de diferencia absoluta fueron inferiores a 0,5 en todos los casos, lo que se consideró un resultado conforme (Tabla VII).

Posteriormente, se evaluó la estabilidad del inóculo de *Lactobacillus* bajo potenciales condiciones de almacenamiento a lo largo de su uso en interlaboratorios: 7 días a 28 °C, a 37 °C y congelación por 48 horas. Se obtuvo como resultado que únicamente la condición de congelación (-12 °C) durante 48 horas cumplió con la especificación, mientras que a 28 °C y 37 °C el inóculo no se mantuvo lo suficientemente estable (Tabla VIII).

A modo complementario, se estudió la distribución de los datos obtenidos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, en la que se determinó un valor  $p < 0,001$ ,

lo que no indica una distribución normal. Por lo que se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis en donde se compararon las 3 condiciones planteadas con un grupo de referencia (inóculo liofilizado conservado a 5 °C). La prueba de Kruskal-Wallis arrojó un valor  $p$  de 0,004 (inferior a 0,05), lo que confirma una diferencia significativa entre los grupos de datos. Para identificar con mayor precisión entre cuáles de ellos existía esa diferencia, se realizó una comparación *post hoc* mediante la prueba de DWass-Steel-Critchlow-Fligner (Tabla IX).

Los resultados de la comparación mostraron que la concentración del inóculo liofilizado de referencia (almacenado a 5 °C) difería significativamente de los inóculos expuestos a 28 °C y 37 °C ( $p < 0,05$  en ambos casos). En contraste, al comparar el control con el inóculo congelado y luego descongelado, el valor  $p$  fue superior a 0,05, lo que indica que no hubo diferencia significativa entre sus concentraciones.

En resumen, estos hallazgos demuestran que el inóculo no mantiene su estabilidad a 28 °C y 37 °C después de 7 días, mientras que su concentración sí se mantiene constante tras 48 horas de congelación.

**Tabla VII.**  
Estabilidad del lote de inóculos liofilizados de *Lactobacillus*

Tiempo (día)	Promedio (Log UFC/mL)	Desviación Estándar (DE)	Diferencia absoluta	Resultado
1	4,89	0,43	0,37	Conforme
9	5,06	0,31	0,20	Conforme
14	4,78	0,25	0,48	Conforme
21	4,84	0,40	0,41	Conforme
28	5,55	0,19	0,29	Conforme
35	5,72	0,20	0,46	Conforme
<b>Referencia (Homogeneidad)</b>	5,25			
<b>Criterio de aceptación</b>	Diferencia < 0,5			

n=3

**Tabla VIII.**  
Estabilidad del inóculo liofilizado de *Lactobacillus*  
en distintas condiciones de almacenamiento

Condiciones de almacenamiento	Promedio (Log UFC/mL)	Desviación estándar (DE)	Diferencia absoluta	Resultado
A 28°C por 7 días	4,50	0,348	0,75	No conforme
A 37°C por 7 días	4,10	0,174	1,15	No conforme
Congelado por 48 horas	5,11	0,294	0,14	Conforme
<b>Referencia (Homogeneidad)</b>	<b>5,25</b>			
<b>Criterio de aceptación</b>	Diferencia < 0,5			

n=3

**Tabla IX.**  
Comparaciones dos a dos Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

	Almacenamiento a 28°C por 7 días	Almacenamiento a 37°C por 7 días	Almacenamiento a -12°C por 48 horas
Valor <i>p</i> respecto al control (Kruskal-Wallis)	0,036	0,036	0,835

### Interlaboratorio Piloto

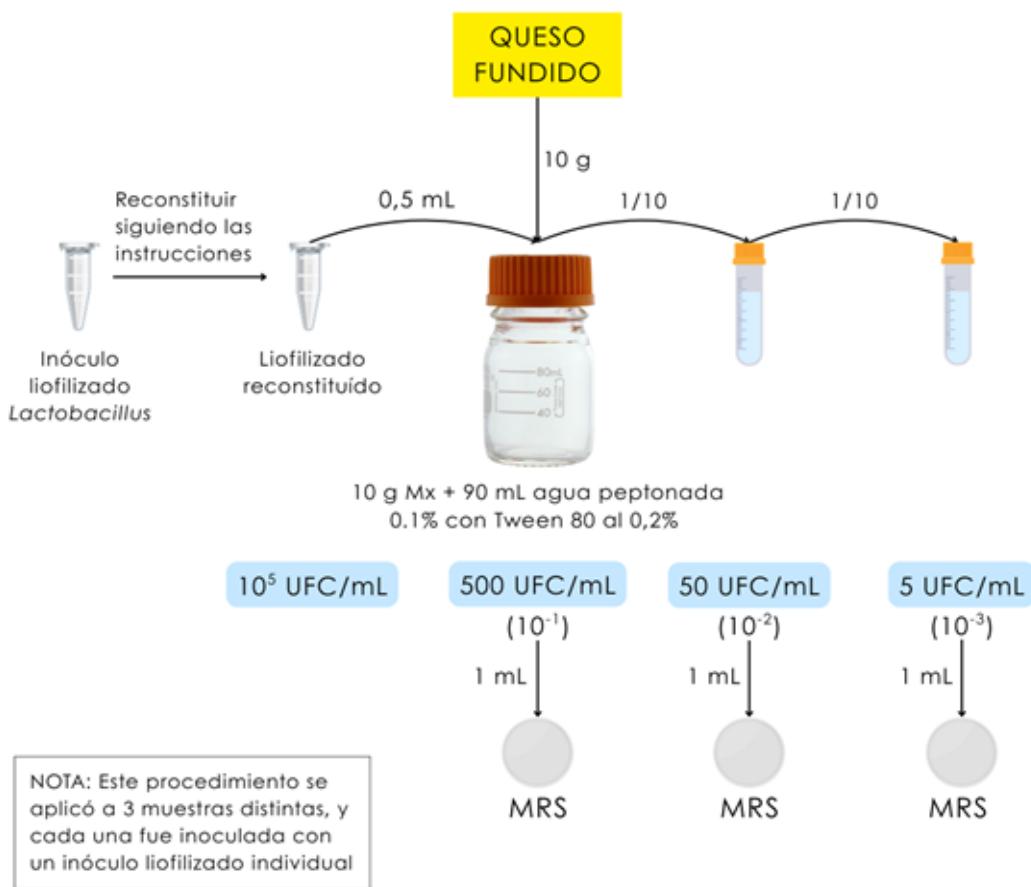
Se planteó un interlaboratorio piloto entre 5 analistas, con la finalidad de evaluar el comportamiento del inóculo liofilizado de *Lactobacillus*. Se diseñó un protocolo con instrucciones detalladas para el manejo adecuado del liofilizado, en el que la etapa de reconstitución del inóculo resultó crucial. El diluyente usado se seleccionó en función de la matriz, la cual en este caso presentó 20% de grasa, por lo que se usó como diluyente agua peptonada al 0,1 % adicionada de Tween al 0,2 % (Norma COVENIN 1126:2022).

Dada la naturaleza de la leche descremada en polvo, se realizaron numerosas pruebas hasta establecer un protocolo adecuado para la reconstitución del liofilizado. Este protocolo consistió en calentar agua peptonada al 0,1% a 35 °C, añadir 1 mL al tubo Eppendorf y, posteriormente,

mezclar con vórtex y homogeneizar con una micropipeta hasta completa disolución del liofilizado.

El esquema para el interlaboratorio consistió en la inoculación de la matriz seguida de una serie de diluciones, en la que la concentración de la matriz fue determinada por el método de recuento en placa. El procedimiento se realizó por triplicado, en donde se emplearon 3 muestras inoculadas con un liofilizado para cada una (Figura 9).

Los datos obtenidos fueron comparados contra el analista de referencia para determinar la variabilidad en el procesamiento de la muestra (Tabla X). Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, con un valor *p* de 0,203, lo que indica que los datos cumplían con una distribución normal. Posteriormente, se realizó un ANOVA de un factor, obteniéndose un valor *p* de 0,310,

**Figura 9.** Esquema del interlaboratorio piloto

**Tabla X.**  
Interlaboratorio piloto empleando el inóculo liofilizado de *Lactobacillus*

	Referencia	Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 4
Log UFC/g	3,43	3,45	3,63	3,35	3,52
Desv. estándar	0,128	0,180	0,197	0,175	0,075

lo que indica que la diferencia entre los analistas no es significativa, por lo que el inóculo liofilizado podría emplearse en interlaboratorios.

## Conclusiones

Se demostró que la metodología aplicada para la obtención del cóctel de inóculo de *Lactobacillus* permite mantenerlo estable durante el tiempo evaluado (2 meses).

Se evidenció el efecto beneficioso de la lactosa al 15% en caldo MRS y de la leche descremada al 10% como lioprotectores en inóculos liofilizados de *Lactobacillus*, obteniéndose niveles altos de viabilidad celular post-liofilización de 94,88% y 93,80%, respectivamente, superiores a los de los demás lioprotectores evaluados. Sin embargo, se escogió la leche descremada al 10% por ofrecerle una mejor apariencia al liofilizado (sólido uniforme) y por su fácil preparación.

Se observó una relación proporcional entre la concentración inicial y la estabilidad del inóculo post-liofilización. Específicamente, la concentración de  $10^5$  UFC/mL mostró una estabilidad superior en comparación con  $10^4$  y  $10^3$  UFC/mL.

Se determinó que el lote de inóculos liofilizados elaborado cumplió con el criterio de homogeneidad establecido por la ISO 13528:2015. Esta propiedad representa un factor crítico en la repetibilidad de los resultados del ensayo, lo que resulta importante para determinar la idoneidad de un material de referencia en la evaluación del desempeño de un analista. Además, la técnica de preparación de los inóculos, previa a la liofilización, es clave para lograr un nivel óptimo de homogeneidad.

Se demostró que la estabilidad del inóculo liofilizado de *Lactobacillus* en leche descremada al 10% y a una concentración de  $10^5$  UFC/mL, se ve comprometida por la temperatura de almacenamiento. Por lo tanto, es esencial almacenarlo a  $5^\circ\text{C}$  para garantizar su estabilidad. Las temperaturas de  $28^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$  durante siete días afectan negativamente la concentración del inóculo. La congelación a  $-12^\circ\text{C}$  por 48 horas no compromete su estabilidad.

Se realizó un interlaboratorio piloto de acuerdo con lo establecido en la ISO 17043:2011 para la aplicación del inóculo liofilizado de *Lactobacillus* como material de referencia, obteniéndose resultados sin diferencias significativas entre los analistas (ANOVA,  $p > 0,05$ ), lo que indica que el inóculo puede aplicarse a interlaboratorios de mayor escala.

## Recomendaciones

Complementar el estudio de estabilidad a  $28^\circ\text{C}$  (aproximadamente a temperatura ambiente) durante 4 días, con la finalidad de evaluar la factibilidad del transporte a temperatura ambiente de los inóculos liofilizados. Esta información resulta clave para facilitar la logística de envío de una planta a otra.

Realizar un interlaboratorio entre analistas expertos para determinar el valor asignado a la concentración del inóculo liofilizado y su incertidumbre, conforme a la Norma ISO 13528:2015.

Aplicar el protocolo establecido a otros microorganismos, como mohos y levaduras, para la obtención de inóculos liofilizados mediante lioprotectores específicos.

## Referencias Bibliográficas

- Abiola R, Okoro K, Sokunbi O. 2022. Lactic Acid Bacteria and the Food Industry—A Comprehensive Review. International Journal of Health Sciences and Research 12(5):128-142.
- Barragán D, Lesmes A. 2009. Comparación de dos métodos de conservación, liofilización y microsecado sobre tres especies bacterianas: Elección del mejor método. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia, Disponible: <https://apidspace.javeriana.edu.co/server/api/core/bitstreams/75b15220-2f72-4bfcc-b846-44f390b56b67/content>
- Bjorkroth KJ, Korkeala HJ. 1997. *Lactobacillus fructivorans* Spoilage of Tomato Ketchup. J Food Prot 60(5):505-509.
- Centro Nacional del Medio Ambiente. 2006. Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorios. Disponible: <https://repositorio>.

- [uchile.cl/bitstream/handle/2250/119930/CENMA\\_Libro.pdf?sequence=1](http://uchile.cl/bitstream/handle/2250/119930/CENMA_Libro.pdf?sequence=1)
- Chen H, Huang J, Shi X, Li Y, Liu Y. 2017. Effects of six substances on the growth and freeze-drying of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulganicus*. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria* 16(4):403-412.
- Del Pilar R. 2024. Maximizando la Competencia a través de los Ensayos de Aptitud: Una Perspectiva desde la Norma ISO 17043:2023. – Experts Group SAS. <https://expertsgroup.com.co/blog/maximizando-la-competencia-a-traves-de-los-ensayos-de-aptitud-una-perspectiva-desde-la-norma-iso-iec-170432023/>
- García M, Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad SEM* 30:12-16.
- Guerra M, Castro J. 2020. Evaluación de viabilidad de microorganismos. En Boletín No 428—Instituto de Investigaciones Agropecuarias (pp. 139-153). <https://biblioteca.inia.cl/server/api/core/bitstreams/be8267be-452d-47da-be01-dd86aca6fea9/content>
- ISO 13528:2015. Norma internacional ISO 13528. 2015. Métodos estadísticos para su uso en pruebas de competencia mediante comparación interlaboratorio, Suiza.
- ISO 17025:2005. Norma internacional ISO 17025. 2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, Suiza.
- ISO 17043:2011. Norma internacional ISO 17043. 2011. Evaluación de la conformidad: requisitos generales para los ensayos de competencia, Suiza.
- ISO 35:2006. Norma internacional ISO 35. 2006. Materiales de Referencia - Guía para la caracterización y evaluación de la homogeneidad y la estabilidad, Suiza.
- Jay J, Loessner M, Golden D. 2005. *Modern Food Microbiology* (7ma ed.).
- Li H, Lu M, Guo H, Li W, Zhang H. 2010. Protective Effect of Sucrose on the Membrane Properties of *Lactobacillus casei* Zhang Subjected to Freeze-Drying. *Journal of Food Protection* 73(4):715-719.
- Martínez A, Fernández M, González G, Armas G. 2018. Liofilización de bacterias y levaduras de interés industrial. *ICIDCA* 52(2):33-35.
- Mitra A. 2014. Control Charts for Standard Deviation. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat04044>
- Molina M. 2017. ¿Qué significa realmente el valor de  $p$ ? *Pediatria Atención Primaria* 19(76):377-381.
- Norma Venezolana COVENIN 1126:2022. Toma, identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico (2da. revisión).
- Organización Mundial de la Salud. 2024. Inocuidad de los alimentos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- Organización Panamericana de la Salud. 2023. Manual de inspección de alimentos basado en riesgos. Establecimientos productores de alimentos. PAHO. <https://doi.org/10.37774/9789275326886>
- Quintero M, Montoya D, Restrepo D, González D. 2023. Conservación de bacterias por liofilización en la Colección de Microorganismos CM-EM-UDEA, Medellín, Colombia. *Biota Colombiana* 24(2). <https://doi.org/10.21068/2539200x.1127>
- Roco A, Vladimir S, Olguín M, Aguilera Raúl. 2024. Consideraciones ante el uso de la prueba de Shapiro-Wilk cuando se trabaja con muestras pequeñas. *Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular* 76: 1-63.
- Sánchez Y, Raqui C, Huaroc E, Nilton M. 2024. Importancia de conocer la normalidad de los datos utilizados en los trabajos de investigación por testistas: Supuestos de normalidad. *Resiliencia Paradigmática* 17: 404-413.
- Santelices C, Castro J. 2020. Preservación de microorganismos por liofilización. En Boletín No. 428—Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Pp. 96-115.
- Sperber W, Doyle M. 2009. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages.
- USP. 2018. <1223> Validación de métodos microbiológicos alternativos. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. [https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp\\_pdf/ES/gc-1223-esp.pdf](https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/ES/gc-1223-esp.pdf)
- Wehrmann C. 2005. Estudios interlaboratorios en microbiología: Evaluación del desempeño de los laboratorios de microbiología en una industria de alimentos venezolana realizando el método de análisis de agua. Tesis de postgrado. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, Caracas, Venezuela.