

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

INGENIERIA BIOQUÍMICA

REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL

NOMBRE DEL PROYECTO

**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DEL COCULTIVO DE
L. plantarum BAL 03-ITTG/*L. fermentum* BAL 21-ITTG.**

PRESENTA

DANIEL ALBERTO VELÁZQUEZ VILLARREAL

ASESORA

M.C. LUCIA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

Agradecimientos

A la maestra Cristina Ventura Canseco por llevar la dirección de este proyecto, por su atención, revisiones, consejos y apoyo incondicional en el trabajo.

A la maestra Laura Porras y al maestro Jorge Gómez, por su apoyo constante y confianza.

A mis amigos Kathya, Fernando, Freddy Oswaldo, Dalina, Ricardo y Karina, en especial a mi mejor amiga y compañera, Merari, por su apoyo en todo momento, por las risas y los momentos de los que aprendimos juntos.

A mi familia, mi fortaleza e inspiración, papá y mamá (Fernando y Aida), hermanos (Luis, Claudia, Lorena y Liliana).

Resumen

Los probióticos se definen como microorganismos vivos, principalmente bacterias, no patógenas, utilizados en forma de suplemento alimenticio, que, tras ser ingeridos en cantidades suficientes, mejoran el equilibrio microbiano intestinal y provocan efectos benéficos sobre la salud de quienes los ingieren (Marquina & Santos, 2001). Las Bacterias ácido lácticas son consideradas como probióticos, su característica común es la capacidad de producir ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos. (Parada *et al.*, 2007), además de presentar otras características como actividad antimicrobiana mediante la producción de sustancias inhibidoras, la producción de exopolisacaridos y beneficios para la salud y bienestar humano y animal. Se estudiaron las cepas *L. plantarum* (BAL 03-TTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG) con el objetivo de evaluar la capacidad probiótica de estas cepas en monocultivo y cocultivo, Las cinéticas de cada tratamiento fueron evaluadas durante 24 horas, monitoreando el crecimiento celular empleando cuenta en placa en agar MRS y agar MRS BPB(Lee & Lee, 2008), el consumo de glucosa se cuantificó utilizando la metodología descrita por Miller (1959) y la producción de ácido láctico empleando titulación alcalimétrica, descrita en la norma mexicana NMX-F-420-S-1982, tomando lecturas cada 4 horas. Para evaluar la capacidad de producción de EPS en los monocultivos y cocultivos, se empleó la metodología reportada por van Geel-Schuteen *et al.*, (1998). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de difusión en agar, utilizando pozos (Audisio *et al.*, 2011; Churata *et al.*, 2016). Los tratamientos en cocultivo 5:5, 6:4, 7:3 y *L. plantarum* BAL 03-ITTG mostraron concentraciones celulares mayor o igual a 8×10^9 UFC/mL, dichas concentraciones se encuentran dentro de la población mínima que los microorganismos deben alcanzar para ser empleados como probióticos (10^9 UFC/mL) (Ouwehand *et al.*, 2002). La proporción 7:3 evidencio la mayor producción de ácido láctico con una concentración de 26.91 ± 0.509 g/L y una conversión de sustrato de 91.51%, este mismo cocultivo presentó la mayor actividad antimicrobiana contra los tres patógenos evaluados, además se evidencio que *L. plantarum* (BAL 03-TTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG) no producen bacteriocinas. Todos los tratamientos produjeron más de 40 g/L de EPS, niveles que son de 10 a 100 veces más altos que los reportados previamente para los *Lactobacillus* (van den Berg *et al.*, 1995; van Geel-

Schutten *et al*, 1998). La diferencia de producción de EPS entre cocultivos y monocultivos no es significativa, por lo cual ningún tratamiento es mejor que otro para producir EPS. El medio de cultivo con concentración alta de azúcar favorece la producción de EPS.

El cocultivo 7:3 (BAL 03: BAL 21) fue la mejor proporción con mejores atributos probióticos, generando biomasa superior a 8×10^9 UFC/mL, mayor producción de ácido láctico (26.91 g/L) y una mayor actividad antimicrobiana.

Índice general

Capítulo	Página
Agradecimientos	II
Resumen.....	III
Índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	IX
1. Introducción	1
2. Descripción de la empresa u organización y del puesto o área del trabajo el estudiante.	3
3. Problemas a resolver.	4
4. Objetivos	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos específicos.....	5
5. Justificación.....	6
6. Fundamento teórico.....	7
6.1 Probióticos.....	7
6.1.1 Características de los Probióticos.....	7
6.1.1.1 Actividad antimicrobiana contra patógenos	8
6.1.1.2 Adherencia al epitelio intestinal	10
6.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	10
6.2.1 Características morfológicas macroscópicas	11
6.2.2 Características morfológicas microscópicas	12
6.2.3 Características bioquímicas	12
6.2.4 Condiciones óptimas de crecimiento.....	13
6.2.5 Metabolismo.....	15
6.2.6 Metabolitos producidos por BAL.....	18
6.2.6.1 Ácidos orgánicos	19
6.2.6.2 Exopolisacáridos (EPS).....	20
6.2.6.3 Bacteriocinas	21
6.3 Métodos de cultivo de las BAL.....	23
6.3.1 Cocultivo	23

7.	Metodología	25
7.1	Reactivación de cepas probióticas.....	25
7.2	Cinética de crecimiento de los cultivos.....	25
7.3	Producción de EPS de los cocultivos	26
7.3.1	Condiciones de cultivo	26
7.3.2	Contenido de azúcares en los EPS	27
7.3.2.1	Determinación de carbohidratos totales en los EPS	27
7.4	Producción de ácido láctico y actividad antimicrobiana de los cocultivos	28
7.4.1	Condiciones de cultivo	28
7.4.2	Preparación de los sobrenadantes libres de células (SLC)	28
7.4.3	Cuantificación de ácido láctico por acidez titulable.....	28
7.4.4	Consumo de glucosa.....	29
7.4.5	Actividad antimicrobiana contra patógenos	30
7.4.5.1	Reactivación de cepas patógenas	30
7.4.5.2	Actividad antimicrobiana en placa	30
7.4.5.3	Identificación de Bacteriocinas en <i>Lactobacillus plantarum</i> (BAL -03 ITTG) y <i>Lactobacillus fermentum</i> (BAL – 21 ITTG)	31
8.	Resultados y discusiones.....	32
8.1	Evaluación del crecimiento celular en monocultivo y cocultivo.....	32
8.2	Producción de ácido láctico y actividad antimicrobiana	41
8.3	Producción de Exopolisacaridos (EPS).....	46
9.	Conclusiones	53
10.	Competencias desarrolladas y/o aplicadas	54
11.	Fuentes Consultadas.....	55
12.	Anexos.....	62

Índice de figuras

Figura 6.1 Colonias de BAL	11
Figura 6.2 Forma y disposición de las células en tres géneros de BAL	12
Figura 6.3 Fermentación Homoláctica	16
Figura 6.4 Fermentación Heteroláctica	17
Figura 8.1 Perfil de crecimiento de <i>L. plantarum</i> (BAL 03-ITTG) y <i>L. fermentum</i> (BAL 21-ITTG)	32
Figura 8.2 Perfiles de crecimiento en monocultivo y cocultivo	34
Figura 8.3 Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 3:7	35
Figura 8.4 Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 4:6	36
Figura 8.5 Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 5:5	36
Figura 8.6 Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 6:4	37
Figura 8.7 Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 7:3	37
Figura 8.8 Perfil de crecimiento total, por cepa, consumo de sustrato y producción de ácido láctico en la proporción 3:7	43
Figura 8.9 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por BAL 03	48
Figura 8.10 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por BAL 21	49
Figura 8.11 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 3:7	49

Figura 8.12 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 4:6	50
Figura 8.13 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 5:5	50
Figura 8.14 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 6:4	51
Figura 8.15 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 7:3	51
Figura 12.1. Curva patrón de azúcares reductores	63
Figura 12.2. Curva patrón de azúcares totales	64

Índice de tablas

Tabla 6.1. Principales características de las cepas probióticas	8
Tabla 6.2. Composición del medio MRS	14
Tabla 6.3. Bacteriocinas producidas por BAL	22
Tabla 7.1. Proporciones de inóculo para los estudios en cocultivo	25
Tabla 7.2 Preparación de la curva patrón de carbohidratos totales	27
Tabla 7.3. Preparación de la curva patrón para azúcares reductores	30
Tabla 8.1. Parámetros cinéticos de los monocultivos y cocultivos	40
Tabla 8.2. Producción de ácido láctico en monocultivo y cocultivo	42
Tabla 8.3. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes ácidos de los monocultivos y cocultivos estudiados contra bacterias patógenas	45
Tabla 8.4. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes ácidos de los monocultivos, contratamiento enzimático, estudiados contra bacterias patógenas	47
Tabla 8.5 Producción de EPS en monocultivo y cocultivo	47
Tabla 8.6. Parámetros cinéticos de monocultivo y cocultivo productores de EPS	53
Tabla 12.1. Lecturas de absorbancia para curva patrón de azúcares reductores	63
Tabla 12.2. Lecturas de absorbancia para curva patrón de azúcares totales	64

1. Introducción

La presente investigación se refiere al estudio de la producción de probióticos mediante el cocultivo de *Lactobacillus plantarum* BAL-03 y *Lactobacillus fermentum* BAL-21 aislados a partir de la taberna (bebida obtenida de la savia fermentada de la palma *Acrocomia aculeata*, producida en el Sureste de México). Los probióticos son microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias ácido láctico (BAL), predominando los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las BAL se clasifican con base en sus propiedades morfológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad de fermentación de carbohidratos y la configuración de ácido láctico producido, estos son microorganismos en forma de bacilos o cocabacilos Gram positivos, no esporulados que tienen la propiedad de fermentar carbohidratos para producir compuestos de menor peso molecular como ácido láctico, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido acético, CO₂, diacetilo, H₂O, bacteriocinas, entre otros metabolitos (Bergey, 1992). Estos compuestos antimicrobianos producidos por las BAL, inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas contribuyendo a mejorar los procesos digestivos.

Los probióticos, al ser administrados en cantidades suficientes, pueden beneficiar la salud del huésped (FAO/OMS, 2002); dentro de los efectos saludables destacan la contribución nutricional, atenuación de la intolerancia a la lactosa, mejora de la digestibilidad normal, prevención de cáncer, reducción de infecciones respiratorias, reducción de colesterol sérico, mejora de la salud gástrica y coadyuvante en tratamientos con antibióticos (Ouweland *et al.*, 2002; Rowland *et al.*, 2010).

Lactobacillus plantarum BAL-03 ITTG y *Lactobacillus fermentum* BAL-21 ITTG, fueron evaluadas por González (2013) quien reportó un crecimiento celular de ambas cepas en el orden de 10⁹ UFC/mL. Además, es importante mencionar que ambas cepas presentaron una producción de ácido láctico alrededor de 22 g/L y actividad positiva antimicrobiana contra algunos patógenos (*E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*).

En base a esto, se ha demostrado la capacidad de *Lactobacillus plantarum* (BAL 03-ITTG) y *Lactobacillus fermentum* (BAL 21-ITTG) como posibles bacterias probióticas en cocultivo, ya que es posible que las características probióticas individuales se complementen y actúen de forma sinérgica mediante cocultivo y potencializar así los beneficios probióticos (Chapman *et al.*, 2011). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar las características probióticas del cocultivo de *L. plantarum* (BAL 03-ITTG)/*L. fermentum* (BAL21-ITTG).

2. Descripción de la empresa u organización y del puesto o área del trabajo el estudiante.

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Microbiología No. 3 ubicado en el edificio que ocupa el Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles, también se ocupó el Laboratorio de Investigación ubicado en el edificio D y el Laboratorio de Microbiología ubicado en el edificio L, estas instalaciones se encuentran en el Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ubicado en Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Misión

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

Visión

Ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

3. Problemas a resolver

Lactobacillus plantarum (BAL 03-ITTG) y *Lactobacillus fermentum* (BAL 21-ITTG) son bacterias ácido lácticas que pertenecen al mismo género y tienen características similares y son consideradas como probióticas, por lo que cultivarlas en cocultivo tiene como objetivo encontrar la proporción adecuada que potencialice las características probióticas de las cepas por si solas.

Potencializar la producción de EPS probando a *Lactobacillus plantarum* (BAL 03-ITTG) y *Lactobacillus fermentum* (BAL 21-ITTG) en monocultivo y cocultivo en un medio suplementado con azúcar, para obtener una producción mayor a la ya reportada y darles un valor agregado a las cepas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar las características probióticas del cocultivo de *L. plantarum* BAL-03-ITTG/*L. fermentum* BAL-21-ITTG.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar la cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de ácido láctico del cocultivo de *L. plantarum* BAL-03-ITTG/*L. fermentum* BAL-21-ITTG.

Evaluar la actividad antimicrobiana del cocultivo de *L. plantarum* BAL-03-ITTG/*L. fermentum* BAL-03-ITTG

Evaluar la producción de exopolisacáridos del cocultivo de *L. plantarum* BAL-03-ITTG/*L. fermentum* BAL-21-ITTG.

5. Justificación

Durante décadas la investigación científica y tecnológica de los microorganismos probióticos ha ido en aumento debido a los beneficios que se presentan en el huésped, el consumo de productos que contienen bacterias probióticas benefician la salud debido a que incluyen una mejora de la microbiota humana, como el control y disminución de infecciones gastrointestinales, control de infecciones en el tracto urogenital, reducción a la intolerancia a la lactosa, reducción del riesgo de cáncer de colon (y otros órganos), disminución de colesterol sérico, enfermedades cardiacas, entre otros. Esto avala la necesidad de desarrollar un gran interés por la producción y comercialización de probióticos como parte de los alimentos funcionales, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas.

Los probióticos constituidos por una sola cepa (monocultivo) no presentan la suficiente capacidad en cuanto a la viabilidad y composición una vez que se adhieren en el intestino grueso del huésped (Fasoli *et al.*, 2003; Temmerman *et al.*, 2003), además las cepas que logran adherirse al sistema intestinal no tienen el potencial suficiente para cumplir la demanda de múltiples dolencias en el huésped, puesto que cada cepa en específico tiene propiedades probióticas intrínsecas (Sanders & Huis in 't Veld, 1999).

Un cultivo constituido por dos o más diferentes cepas probióticas (cocultivo), podría tener un efecto benéfico hacia el huésped, por lo que el hoy en día la biotecnología se enfoca en el estudio de los efectos sinérgicos que dos o más microorganismos puedan presentar al cultivarse paralelamente, debido a las interacciones microbianas como el comensalismo, amensalismo, mutualismo, protocoperación, neutralismo, parasitismo, depredación y competencia (Sanders, 1993).

6. Fundamento teórico

6.1 Probióticos

La etimología de la palabra probiótico nos lleva a su raíz griega: "pro" y "bios". Significa "a favor de la vida". Hacia 1970 un microorganismo probiótico se definía como un microorganismo que se utiliza como suplemento en la alimentación animal, para aumentar el crecimiento y reducir el estrés. Desde entonces, esta definición ha evolucionado notablemente, de forma que hoy se define probiótico como microorganismos vivos, principalmente bacterias, no patógenas, utilizados en forma de suplemento alimenticio, que, tras ser ingeridos en cantidades suficientes, mejoran el equilibrio microbiano intestinal y provocan efectos benéficos sobre la salud de quienes los ingieren (Marquina & Santos, 2001).

6.1.1 Características de los Probióticos

Los microorganismos deben cumplir con ciertos requisitos para poder ser considerados probióticos (Tabla 6.1), por ejemplo, deben resistir la acidez del estómago y las sales biliares, fijarse en el epitelio intestinal y colonizar el intestino mediante la producción de exopolisacáridos. Además, deben ser capaces de competir con otras bacterias o sus productos tóxicos y aniquilarlos mediante cambios de pH intestinal o por la producción de proteínas antibacterianas llamadas bacteriocinas (Barboza *et al*, 2004).

Tabla 6.1. Principales características de las cepas probióticas (FAO/OMS, 2002)

- Resistencia a la acidez gástrica
- Resistencia a los ácidos biliares
- Adherencia al moco y/o células epiteliales humanas y líneas celulares
- Actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas
- Capacidad para reducir la adhesión de patógenos a las superficies
- Actividad hidrolasa de sal biliar
- Resistencia a los espermicidas (aplicable a los probióticos para uso vaginal)

Las bacterias probióticas generalmente son adicionadas en alimentos y estas comienzan su viaje hacia el tracto intestinal inferior a través de la boca (Gibson *et al*, 2000). Algunos experimentos *in vitro* han utilizado el jugo gástrico humano de sujetos sanos ajustándolo a un pH tan bajo de 1.5, como el de individuos en ayuno. Los resultados detallaron que la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* mostraron tolerancia a las condiciones del estómago humano y llegaron eficazmente al intestino. Sin embargo, *Bifidobacterium* demostró ser más sensible a las condiciones ácidas y al jugo gástrico humano que las cepas de *Lactobacillus* (Drasar *et al*, 1969). En cuanto a los ácidos biliares segregados en su forma conjugada se ha demostrado que la sensibilidad a estos depende de los orígenes de las sales biliares, se ha encontrado que la bilis porcina tiene más efectos de inhibición sobre cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que la bilis bovina. Sin embargo, se ha encontrado que la mayoría de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aislados en humanos tenían la capacidad de tolerar las concentraciones fisiológicas de bilis humana (Dunne *et al*, 2001).

6.1.1.1 Actividad antimicrobiana contra patógenos

Las actividades antimicrobianas de los probióticos recaen tanto en las células y en los metabolitos producidos por estos. Los metabolitos producidos por los probióticos han demostrado tener un amplio espectro de inhibición contra bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas. Tomando en cuenta que existe una diversidad de compuestos químicos, lo más probable es que su actividad antimicrobiana no es atribuible a un mecanismo específico,

es decir podría haber efectos sinérgicos de distintos componentes de la célula. Algunos metabolitos como el lactato y el acetato, disminuye el pH. Sin embargo, el efecto general de los probióticos es debido a la producción de ácido, que reduce el pH en el intestino y sintetizar bacteriocinas extracelulares que a su vez limita el crecimiento de patógenos (Bian, 2008).

Las bacteriocinas son otro metabolito, producido por algunos probióticos, que contribuyen a la eficacia global de la inhibición de los patógenos. El modo de acción, el espectro de inhibición, peso molecular, el origen genético y propiedades bioquímicas de estos metabolitos varía en cuanto su clasificación (Beristáin *et al*, 2012) pero una hipótesis ampliamente aceptada para la actividad de las bacteriocinas es que en primer lugar se adsorben a receptores específicos o no específicos sobre la superficie de la célula, y entonces altera la permeabilidad de la membrana (Nissen-Meyer *et al.*, 1992).

Se han reportado otros tipos de metabolitos producidos por BAL pero en menor concentración a los mencionados anteriormente pero que también se asocian con la actividad antimicrobiana de los probióticos al tener características como la estabilidad a pH altos y termoestabilidad. Agentes oxidantes fuertes como el peróxido de hidrógeno generado a través de la NADH oxidasa y la superóxido dismutasa (Batdorj *et al*, 2007.), el dióxido de carbono y el diacetilo son algunos de estos metabolitos (Audisio *et al.*, 2011). Por lo tanto, la actividad antimicrobiana de los probióticos depende de múltiples factores, los cuales pueden trabajar de forma sinérgica para contribuir a la eficacia general.

6.1.1.2 Adherencia al epitelio intestinal

La capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino es un importante criterio para los probióticos ya que sólo las cepas que se puedan adherir podrán llevar a cabo una colonización efectiva y ejercer los efectos beneficiosos que proveen los probióticos en su interacción con el huésped, además, se sabe desde hace tiempo que muchos patógenos no pueden ejercer su efecto dañino en el intestino hasta que no se han adherido, por lo que el hecho de tener una colonización protectora del intestino va a prevenir la adhesión de posteriores patógenos (Rivas & Martínez, 2006).

6.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las Bacterias ácido lácticas agrupan a diversos microorganismos cuya característica común es la capacidad de producir ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos. (Parada *et al.*, 2007), además de presentar otras características como actividad antimicrobiana mediante la producción de sustancias inhibidoras, la producción de exopolisacáridos y beneficios para la salud y bienestar humano y animal.

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes clasificado en cuatro familias y siete géneros i) familia *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus* y *Pediococcus*), ii) familia *Leuconostocaceae* (género *Oenococcus* y *Leuconostoc*), iii) familia *Enterococcaceae* (género *Enterococcus*) y iv) familia *Streptococcaceae* (género *Lactococcus* y *Streptococcus*). El género de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más importantes y frecuentemente se usan como cultivos probióticos. Debido a que las BAL prevalecen en los alimentos fermentados, a su bajo nivel de infección y que son parte de la microbiota normal de las mucosas, se les atribuye su bajo potencial patogénico, por lo que se consideran como organismos GRAS (*General Regarded As Safe*) (Zhang *et al.*, 2011).

6.2.1 Características morfológicas macroscópicas

En medios sólidos las colonias de las BAL (Figura 6.1) son relativamente pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, algunas especies forman colonias rugosas, opacas y sin pigmentos debido a la ausencia de citocromos, dándole un aspecto blanco muy característico. El pequeño tamaño de estos es atribuible a su bajo rendimiento de crecimiento, debido a su metabolismo exclusivamente fermentativo. Algunas especies pueden producir colonias grandes cuando crecen en medios de cultivo que contienen alta concentración de sacarosa como resultado de la producción de exopolisacáridos como levano y dextrano a expensas de este disacárido (Stanier, 1996). Las BAL en medio líquido, sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Bergey, 1992).

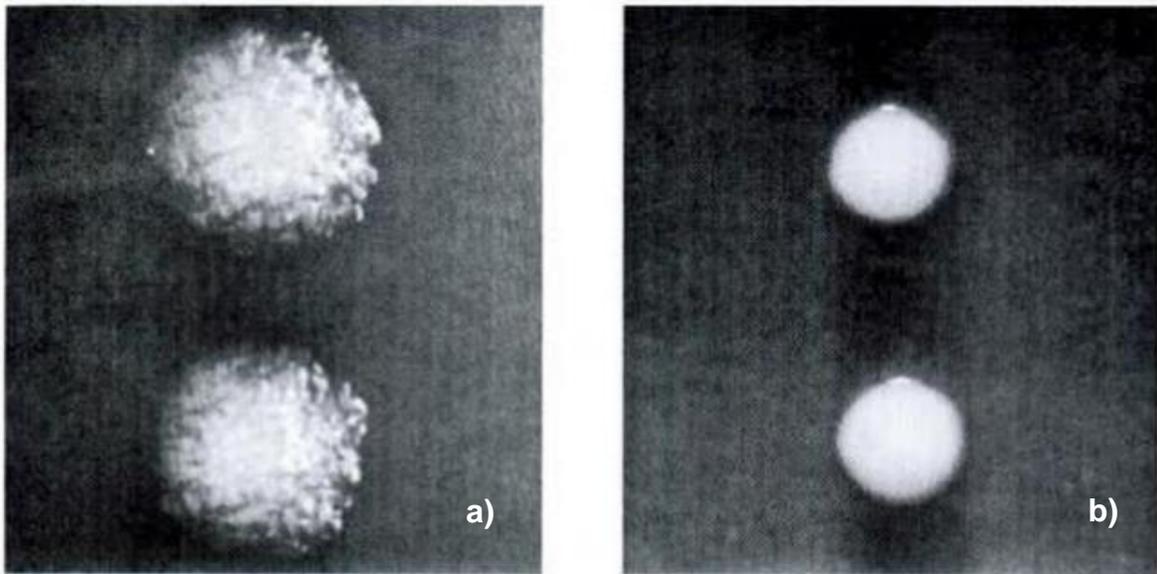


Figura 6.1. Colonias de BAL: a) *Lactobacillus plantarum*; b) *Streptococcus lactis* (Stanier, 1996).

6.2.2 Características morfológicas microscópicas

Son microorganismo Gram positivos con forma de cocos o bacilos con un tamaño de 0.5-1.2 x 1.0-10.0 μm y frecuente forman cadenas cortas (Figura 6.2).

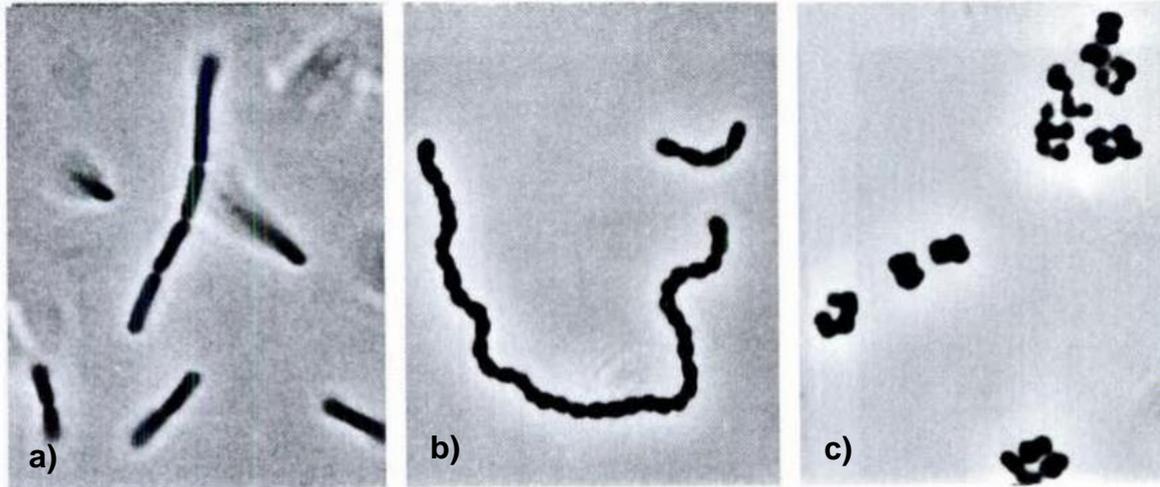


Figura 6.2. Forma y disposición de las células en tres géneros de BAL: a) *Lactobacillus*; b) *Streptococcus*; c) *Pediococcus*. (Contraste de fases, X 2180). (Stanier, 1996).

6.2.3 Características bioquímicas

En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivas, con rara producción de pigmentos, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, no digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble, no producen indol ni ácido sulfhídrico (H_2S), son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno, carecen de citocromos por la ausencia de porfirinas para ejecutar la fosforilación oxidativa, son benzidina negativa, no reducen el nitrato a nitrito, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0 y producen ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), como el único o

principal producto de la fermentación de carbohidratos, alcohol y dióxido de carbono(CO₂) como subproductos. (Carr *et al*, 2002; Vázquez *et al*, 2009).

6.2.4 Condiciones óptimas de crecimiento

Específicamente los *Lactobacilos* presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos, para su multiplicación requieren no sólo carbohidratos fermentables (glucosa y lactosa), como fuentes de carbono y energía, sino también: péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies, estos requerimientos de nutrientes se encuentran en el medio de cultivo MRS (Tabla 6.2) (Bergey, 1992; De Man *et al*, 1960).

Las BAL crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial en un rango de 6.4-4.5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5.5 y 6.2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3.6 en dependencia de especies y cepas, disminuyendo notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del medio donde se encuentran por debajo del valor 4.0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores (Bergey, 1992).

Tabla 6.2. Composición del medio MRS (De Man *et al*, 1960;Difco)

Fórmula por 1 L	
Proteasa peptona No.3	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	20 g
Tween 80	1 g
Citrato de amonio*	2 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio*	0.1 g
Sulfato de manganeso*	0.05 g
Fosfato dipotásico *	2 g
pH 6.5 ± 0.2	
* Componentes que forman parte de las sales (micronutrientes) del medio de cultivo MRS	

La relación de las BAL con el oxígeno es compleja, por su incapacidad de sintetizar porfirinas hémicas, son consideradas como anaerobias. Sin embargo, su sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable según las cepas, desde anaerobia estricta, aerotolerante e insensible. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes ya que su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey, 1992).

La mayor parte de los Lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). Los llamados lactobacilos termófilos pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C (Bergey, 1992; Parra, 2010).

6.2.5 Metabolismo

Las BAL pueden ser homofermentativas o heterofermentativas, dependiendo de la fermentación de azúcares (hexosas y pentosas) en condiciones de crecimiento no limitadas.

El grupo homofermentativo compuesto de *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En contraste, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, y así solamente generan la mitad de la energía del grupo homofermentativo. En la Figura 3 se observa que el ácido láctico es el principal producto de esta fermentación. Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfocetolasa (Hernández *et al*, 2007; Parra, 2010).

El grupo heterofermentativo produce solamente 50% de ácido láctico. Estas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. 1 mol de ATP es generada por mol de glucosa (Prescott *et al*, 2004). Este grupo está compuesto de un número de géneros incluyendo: *Lactococcus*, *Lactobacillos*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfocetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa, así que, en lugar de seguir la vía EMP, utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Parra, 2010). En base a estas dos vías de

fermentación, las BAL han sido divididas en tres categorías metabólicas: homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas y heterofermentativas facultativas.

Las especies heterofermentativas estrictas utilizan solamente la ruta dependiente fosfoacetolasa para metabolizar azúcares, y además de ácido láctico, ellas producen cantidades significantes de ácido acético y/o etanol con la generación de CO_2 y las heterofermentativas facultativas (Figura 6.4) tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo principal; si se modifican algunas condiciones de cultivo, como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce la vía fosfoacetolasa causando la fermentación heterofermentativa (Parra, 2010).

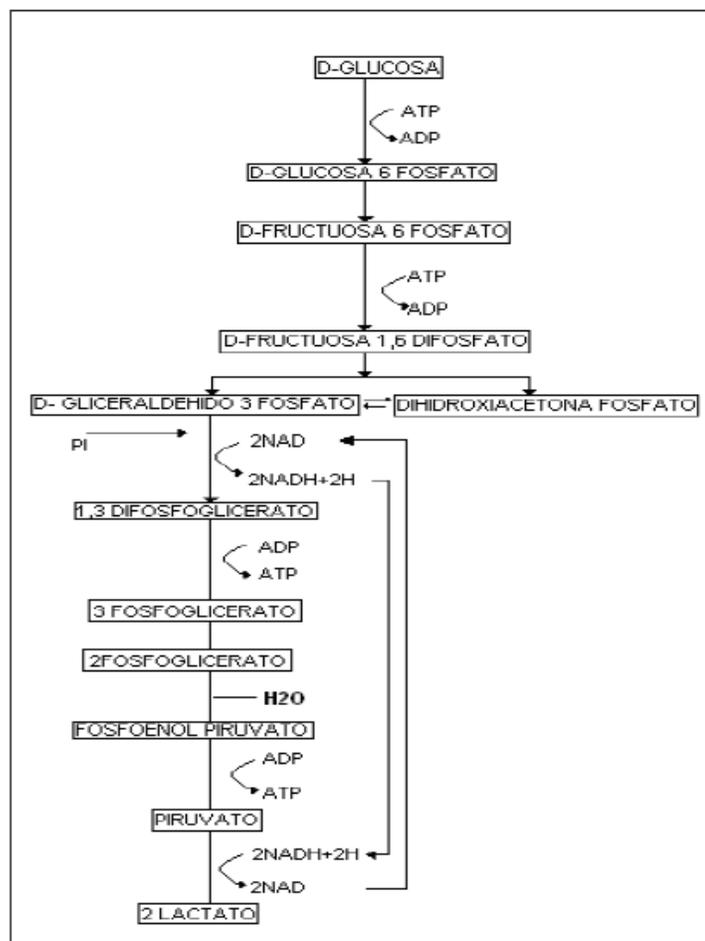


Figura 6.3. Fermentación Homoláctica (Parra, 2010; Axelsson,1993).

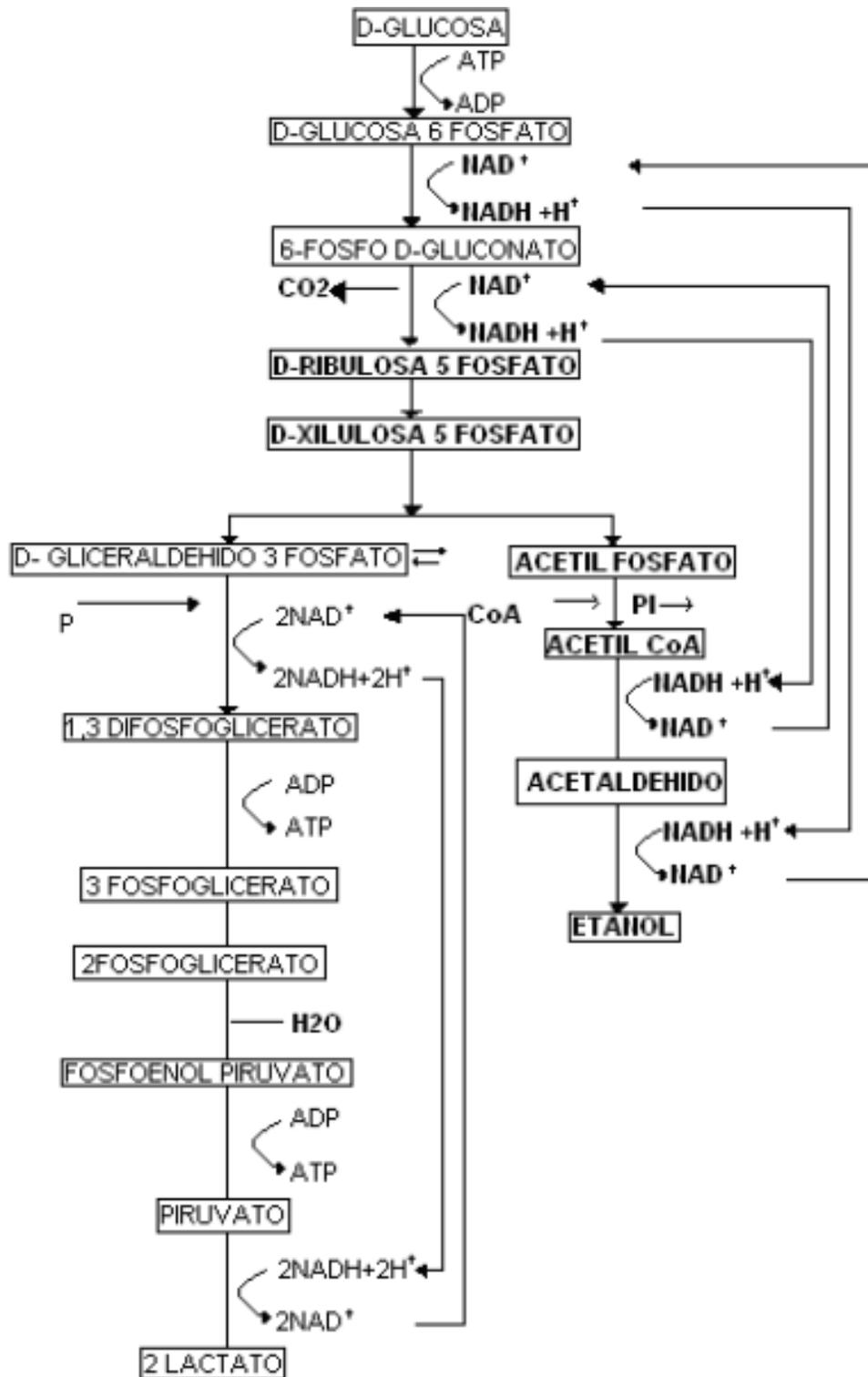


Figura 6.4. Fermentación Heteroláctica Facultativa (Parra, 2010; Axelsson, 1993)

En la fermentación heteroláctica los *Lactobacillus* están formados por: *plantarum*, *ramnosus*, *coryneformis*, *curvatus*, *casei*, *paracasei*, *brevis*, *buchneri*, *fermentun*, *kéfir*, *reuteri*, *leuconostc*. En la fermentación Homoláctica se encuentran los *Lactobacillus acidophilus*, *helveticus*, *delbrueckii subsp delbrueckii*, *delbrueckii subsp lactis*, *delbrueckii subsp bulgaricus*, *lactis*, *thermophilus* (Blanco *et al*, 2006).

6.2.6 Metabolitos producidos por BAL

Las BAL producen una serie de sustancias llamadas metabolitos, estos pueden cumplir diferentes funciones tales como, efecto antimicrobiano y empleo en los alimentos. Los metabolitos antimicrobianos producidos por BAL inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes. Se ha demostrado que la adición de levaduras fermentadas por *Lactobacillus plantarum*, inhibe el crecimiento de *Fusarium* (Vázquez & Murado, 2008).

Los metabolitos producidos por los probióticos han demostrado tener un amplio espectro de inhibición contra bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas. Tomando en cuenta que existe una diversidad de compuestos químicos, lo más probable es que su actividad antimicrobiana no es atribuible a un mecanismo específico, es decir podría haber efectos sinérgicos de distintos componentes de la célula. El efecto general de los probióticos es debido a la producción de ácido, que reduce el pH en el intestino, y a su vez limita el crecimiento de patógenos.

6.2.6.1 Ácidos orgánicos

Algunas BAL producen ácido propiónico, esta fermentación la efectúan bacterias heterofermentativas utilizadas en quesería, donde el ácido láctico es transformado en ácido propiónico y acético con desprendimiento de CO₂ el cual forma los ojos en los quesos (Parra, 2010).

Algunas BAL fermentan ácido cítrico, esta fermentación la efectúan las bacterias heterofermentativas, utilizadas en mantequillas y quesos, ya que transforman el ácido cítrico en productos aromatizantes como la acetoina y el diacetilo (*Leuconostoc citrovorum*, *Streptococcus diacetylactis*). Estos compuestos, así como imparten aroma y sabor a los productos lácteos también tienen un efecto antimicrobiano. El acetaldehído puede inhibir la división celular en *Escherichia coli*, y el diacetilo inhibe levaduras, bacterias Gram negativas y Gram positivas (Hernández, 2007).

El ácido orgánico más importante y producido por las BAL es el ácido láctico. Este ácido ha tenido a lo largo de la historia utilidades para fermentación y preservación de comestibles. Fue primero descubierto en leche cortada por Scheele en 1780, quien inicialmente lo consideró como un componente de la leche. En 1789, Lavoisier llamó a este componente de la leche “ácido láctico”. En 1857, Pasteur descubrió que no era un componente de la leche, pero sí un metabolito de la fermentación generado por ciertos microorganismos. Es clasificado como GRAS para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Ghasemi, 2009). Este ácido es uno de los más importantes producidos por las BAL, dentro de los microorganismos productores pueden citarse *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Bifidobacterium*, siendo *Lactobacillus delbrueckii* el microorganismo más utilizado (Moreira *et al*, 2000). Este es un producto de procesos de fermentación natural que ocurre en la mantequilla, queso, cerveza, leches cortadas y algunos otros alimentos fermentados. Este es utilizado como acidulante/agente buffer de pH o inhibidor de esporas de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados (Devlieghere *et al*, 2004).

Así mismo, se ha reportado que los ácidos orgánicos pueden funcionar en combinación para lograr una actividad inhibidora fuerte contra muchos patógenos transmitidos por alimentos, tales como *Salmonella Typhimurium*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Wong & Chen, 1988; Kao & Frazier, 1996; Alakomi *et al*, 2000).

6.2.6.2 Exopolisacáridos (EPS)

Los exopolisacáridos (EPS) son polisacáridos de cadena larga consistentes de ramificaciones de unidades repetidas de azúcares. Estas unidades de azúcar son principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones. Como las BAL son GRAS, son óptimas para la producción de EPS funcionales. Las BAL son caracterizadas por su conversión de una gran proporción de su fuente de carbono, azúcares fermentables, a ácido láctico; las BAL son capaces de desviar una pequeña proporción de azúcares fermentables hacia la biosíntesis de EPS, dependiendo de las condiciones de cultivo y composición del medio Laws & Marshall, 2001).

Los EPS pueden ser divididos en dos grupos: homopolisacáridos compuestos por monosacáridos como el dextrano y heteropolisacáridos compuestos de diferentes azúcares como glucosa, galactosa, ramnosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido glucónico. Algunos cultivos de *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* son capaces de producir EPS de alto peso molecular con diferentes estructuras (van Geel-Schutten *et al*, 1998).

El rol fisiológico que los exopolisacáridos juegan en los probióticos se relaciona con la adaptación y reconocimiento de factores ambientales. Estos constituyen una barrera hidrofílica que puede proteger a la bacteria y estar implicada en la adhesión a superficies (Ruas-Madiedo *et al.*, 2008). Dada la estructura química y el tipo de uniones que presentan estos EPS, no pueden ser hidrolizados por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal, por lo tanto, pueden llegar al intestino delgado donde podrían ejercer un efecto biológico a través de diversos mecanismos (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). A pesar de los bajos niveles de producción comparados con otros microorganismos, las BAL representan una fuente de EPS natural que se puede utilizar en diversos procesos de fermentación o ser utilizados como aditivos alimentarios (agentes espesantes, emulsificantes y estabilizantes) (Jolly *et al.*, 2002; Ruas-Madiedo *et al.*, 2006).

Algunos EPS producidos por BAL son capaces de contrarrestar el efecto de ciertos enteropatógenos, ya sea por su capacidad de interactuar con las células del epitelio intestinal o por secuestro de toxinas u otros metabolitos nocivos. Los EPS producido por *L. rhamnosus* ATCC9595 demostró capacidad de secuestrar toxina colérica. Estudios han demostrado que algunos EPS producidos por BAL son capaces de actuar como inmunomoduladores (Kim *et al.*, 2006). Las propiedades inmunomoduladoras que poseen algunos exopolisacáridos se han vinculado con la actividad antitumoral, como en los estudios realizados con la administración intraperitoneal de cultivos de *L. lactis subsp. cremoris* KVS20 productores de EPS, estos fueron capaces de inhibir *in vivo* el crecimiento de tumores inducidos en ratones (Kitazawa *et al.*, 1991).

6.2.6.3 Bacteriocinas

Un factor importante que contribuye a la eficacia global de la inhibición de los patógenos son las bacteriocinas, las cuales son moléculas catiónicas de bajo peso molecular, que son liberadas extracelularmente (Riley & Wertz, 2002; Ouwehand & Vesterlund, 2004). Las bacteriocinas son componentes proteínicos antibacterianos que son producidos por BAL

comúnmente presentes en alimentos, son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático. Algunas bacteriocinas de BAL pueden inhibir el crecimiento de Gram-positivas patogénicas y bacterias dañinas como también levaduras y especies Gram-negativas (Parra, 2010).

Las producciones de bacteriocinas son muy exigentes debido a la necesidad para enriquecer el medio de crecimiento conteniendo nutrientes como carbohidratos, ácidos nucleicos, minerales y principalmente aminoácidos, proteínas o hidrolizados de proteínas. Por ejemplo, los medios de laboratorio estándar (MRS, TGE, APT) resuelven el problema de fuentes de proteína, incorporando productos como bactopectona, triptona, extracto de carne o extracto de levadura en las formulaciones. Entre las bacteriocinas producidas por BAL y extraídas de estas se observan en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Bacteriocinas producidas por BAL (Hill *et al*, 2002)

BACTERIOCINAS	BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA
Lactococcina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactacina	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Mesenterocina	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Curvaticina	<i>Lactobacillus curvatus</i>
Sakacina	<i>Lactobacillus sake</i>
Pediocina	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Piscicolina	<i>Carnobacterium piscícola</i>
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lacticina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactocina	<i>Lactobacillus sake</i>
Carnocina	<i>Carnobacterium piscícola</i>
Variacina	<i>Micrococcus varians</i>
Leucocina	<i>Leuconostoc gelidum</i>

Las bacteriocinas son diferentes de los antibióticos debido a que son péptidos ribosomalmente sintetizados, su modo de acción es principalmente en la membrana y tienen un espectro estrecho para matar sólo especies estrechamente relacionadas (Abee *et al*, 1995). Hoy en día, muchas bacteriocinas se han descubierto y varían en espectro de inhibición, modo de acción, peso molecular, el origen genético y propiedades bioquímicas. La nisina es la bacteriocina más conocida producida por *Lactobacillus lactis*, y se ha aprobado para su uso en diversas industrias por todo el mundo (Hurst, 1981). Otras bacteriocinas producidas por las BAL incluyen lactacin de *L. acidophilus*, pediocina de *Pediococcus acidilactici*, enterocina de *Enterococcus faecium* y bacteriocina ST8SH producida por *Lactobacillus plantarum* ST8SH (Todorov *et al*, 2015).

A pesar de que las bacteriocinas han sido ampliamente utilizados en la conservación de alimentos y aplicaciones médicas, todavía están limitados por su estrecho espectro de inhibición, y los parámetros extrínsecos tales como tolerancia al pH y la termoestabilidad.

6.3 Métodos de cultivo de las BAL

6.3.1 Cocultivo

Un cocultivo contiene más de una cepa de la misma especie o especies estrechamente relacionadas, por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. Los probióticos de múltiples especies se definen como cepas que contienen diferentes especies probióticas que pertenecen a uno o preferentemente a más géneros, por ejemplo, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis*.

La producción de probióticos multicepa consiste en el cultivo y el secado de cultivos puros por separado, y luego mezclarlos para conseguir una formulación deseada. El desarrollo de una fermentación en cocultivo para producir tales productos en una correcta proporción de microorganismos viables, puede reducir las operaciones múltiples, y podría ser rentable. Varios intentos se han hecho en el pasado para desarrollar bioprocesos-cultivo mixto, la funcionalidad de un probiótico en cocultivo podría ser más eficaz y más consistente que el de un probiótico en monocultivo, debido a que las preparaciones probióticas que contienen bacterias de sólo una cepa tienen pocas posibilidades de colonizar con éxito el tracto gastrointestinal. (Sanders & Huis in't Veld, 1999). Por lo tanto, Dunne *et al.* (1999) ha sugerido que los probióticos deberían consistir en una combinación de cepas, debido a que los cultivos mixtos pueden contener bacterias que complementan el efecto de salud del otro y, por lo tanto, tienen propiedades probióticas sinérgicas.

7. Metodología

7.1 Reactivación de cepas probióticas

Las cepas *Lactobacillus plantarum* (BAL 03-ITTG) y *Lactobacillus fermentum* (BAL 21-ITTG) se resembraron quincenalmente en caldo MRS, agitándose a 80 rpm y 35°C por 8 h, para su posterior refrigeración a 4°C hasta la siguiente resiembra.

7.2 Cinética de crecimiento de los cultivos

Los tratamientos de cocultivos se muestran en la tabla 7.1, cada tratamiento fue realizado por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo MRS (Difco). El inóculo de cada tratamiento fue obtenido de matraces con *L. plantarum* y *L. fermentum* cultivados en caldo MRS por 8 horas a 80 rpm. El volumen de inóculo usado fue de 10% (v/v). Los tratamientos 1-5 son los cocultivos, los tratamientos 6 y 7 son los monocultivos de *L. plantarum* y *L. fermentum*, respectivamente.

Tabla 7.1. Proporciones de inóculo para los estudios en cocultivo.

Tratamiento	% BAL-03	% BAL-21
1	3	7
2	4	6
3	5	5
4	6	4
5	7	3
6	10	0
7	0	10

Las cinéticas de cada tratamiento fueron evaluadas durante 24 horas, monitoreando el crecimiento celular empleando cuenta en placa en agar MRS y agar MRS BPB, descrito por Lee & Lee (2008), el consumo de glucosa se cuantificó utilizando la metodología descrita por Miller (1959) y la producción de ácido láctico empleando titulación alcalimétrica, descrita en la norma mexicana NMX-F-420-S-1982, tomando lecturas cada 4 horas.

7.3 Producción de EPS de los cocultivos

7.3.1 Condiciones de cultivo

Para evaluar la capacidad de producción de los monocultivos y cocultivos, se empleó la metodología reportada por van Geel-Schuteen *et al*, (1998).

Se emplearon tubos de ensayo de 13 x100 mm con 10 mL de caldo MRS modificado (100 g/L de glucosa), cada tratamiento fue inoculado con 10% de inóculo de acuerdo con la tabla 7.1. Los tubos fueron incubados a 35°C a 80 rpm durante 72 h. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C para separar las células del caldo de cultivo. Dos volúmenes de etanol frío, se agregaron al sobrenadante y se dejaron reposar toda la noche a 4°C para la precipitación de los EPS producidos.

La mezcla se centrifugó a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C, los EPS se secaron a temperatura ambiente por 12 horas. El contenido de EPS se determinó mediante cuantificación de azúcares totales.

7.3.2 Contenido de azúcares en los EPS

7.3.2.1 Determinación de carbohidratos totales en los EPS

El método de fenol-sulfúrico se basa en la presencia de ésteres metílicos en los mono, oligo y polisacáridos así como en sus derivados, los cuales son grupos potencialmente reductores que dan una coloración amarillo – anaranjada estable cuando se tratan con fenol y ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico provoca la hidrólisis del polisacárido, de modo que al quedar los monómeros libres reaccionan con el fenol y se obtiene la coloración que servirá para la cuantificación de los carbohidratos presentes en la muestra. Este método es sensible en un rango de 20 a 100 ppm de polisacárido (Mata, 2006).

A partir de las soluciones de EPS se realizaron diluciones $\frac{1}{100}$, de esta solución diluida se tomaron 400 μL , se le añadieron 400 μL de fenol al 5% (v/v); se agitó en vortex por 10 s y se añadió bruscamente 2 mL de H_2SO_4 , con el objetivo de que la reacción exotérmica se desarrollara. Se dejó reposar durante 10 minutos, se volvió agitar en vortex por 30 segundos para la posterior incubación a 25 – 30 °C por 15 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se leyó la absorbancia a $\lambda=490$ nm en un espectrofotómetro (VELAB VE-5600UV) (Dubois *et al.*, 1956). Previamente se construyó la curva patrón empleando glucosa a diferentes concentraciones como se indica en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Preparación de la curva patrón de carbohidratos totales

	Blanco	20 ppm	40 ppm	60 ppm	80 ppm	100 ppm
Glucosa 100 ppm	0	80 μL	160 μL	240 μL	320 μL	400 μL
H_2O	400 μL	320 μL	240 μL	160 μL	80 μL	0
Fenol 5%	400 μL					
H_2SO_4	2 mL					

7.4 Producción de ácido láctico y actividad antimicrobiana de los cocultivos

7.4.1 Condiciones de cultivo

Los tratamientos se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 60 mL de caldo MRS (Difco), para los cuales el volumen de inóculo empleado fue 10% (v/v) de cultivo fresco de acuerdo a la tabla 7.1. Los matraces fueron agitados a 80 rpm, a 35°C por 24 horas. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

7.4.2 Preparación de los sobrenadantes libres de células (SLC)

Al finalizar las 24 h de cultivo, los respectivos cultivos fueron centrifugados a 4500 rpm a 4°C por 15 minutos para separar las células. El sobrenadante se separó en 3 partes, una para la cuantificación del ácido láctico producido, otra para cuantificar el consumo de glucosa y la tercera parte para evaluar la actividad antimicrobiana.

7.4.3 Cuantificación de ácido láctico por acidez titulable

Este método se basa en la titulación alcalimétrica con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, utilizando solución de fenolftaleína al 1% como indicador.

Se tomaron 10 mL del sobrenadante del apartado 8.4.2 y se añadieron 500 µL de fenolftaleína 1%. Se tituló con NaOH 0.1 N hasta la aparición de un color rosado persistente dentro de 15 – 30 s (NMX-F-420-S-1982).

La acidez en la muestra expresada como ácido láctico se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez g/L (ácido láctico)} = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

En donde:

V = Volumen de solución de NaOH gastado en la titulación de la muestra, en mL.

N = Normalidad de la solución de NaOH.

M = Volumen de la muestra, en mL

90 = Equivalente del ácido láctico.

NOTA: 1 mL de NaOH 0.1 N es igual a 0.0090 g de ácido láctico.

7.4.4 Consumo de glucosa

Para evaluar el consumo de glucosa de los cocultivos y monocultivos se empleó la metodología reportada por Miller (1959).

Un mililitro de sobrenadante libre de células se diluyó a un volumen final de 10 mL (Dilución $\frac{1}{10}$), de esta, se tomó 1 mL añadiéndole 2 mL de reactivo DNS. Se sometió a baño maría por 5 minutos para el desarrollo de color, se detuvo la reacción añadiendo 5 mL de agua destilada y enfriando en un baño de agua con hielo. Se leyó la absorbancia a $\lambda=550$ nm en un espectrofotómetro (UNICO UV-2100).

Previamente se construyó la curva patrón empleando glucosa a diferentes concentraciones como se indica en la Tabla 7.3.

Tabla 7.3. Preparación de la curva patrón para azúcares reductores

	Blanco	0.2 mg/mL	0.4 mg/mL	0.6 mg/mL	0.8 mg/mL	1 mg/mL
Glucosa 1 mg/mL	0	200 µL	400 µL	600 µL	800 µL	1000 µL
H ₂ O	1000 µL	800 µL	600 µL	400 µL	600 µL	0
DNS	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
5 minutos baño maría						
H ₂ O	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL

7.4.5 Actividad antimicrobiana contra patógenos

7.4.5.1 Reactivación de cepas patógenas

Las cepas patógenas *Escherichia coli* (ITTG 1879), *Staphylococcus aureus* (ENCB-16883) y *Proteus mirabilis* (ITTG 4860) fueron proporcionadas por el Cepario del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Los cultivos se mantuvieron frescos sembrando semanalmente en agar BHI (BDBioxon), incubándolos a 35°C por 24 h para posterior refrigeración a 4°C hasta la siguiente reactivación.

7.4.5.2 Actividad antimicrobiana en placa

El sobrenadante destinado para evaluar la actividad antimicrobiana se dividió en dos partes, una de las mitades se ajustó a pH 6.5 con NaOH (1 N) para excluir los efectos de los ácidos orgánicos y verificar la presencia o ausencia de bacteriocinas producidas por las BAL, a este sobrenadante se le nombró MRS_N y el sobrenadante ácido restante, sin ajustar el pH, se

nombró MRS_A. Los cultivos de patógenos en placa se realizaron con 20 mL de agar BHI (BDBioxon), inoculando el patógeno por técnica masiva con hisopo estéril (Pimental *et al*, 2015). Una vez inoculado, se realizaron pozos de 5 mm de diámetro con un sacabocados y se llenaron con 100 µL de sobrenadante MRS_N y MRS_A respectivamente. Las placas se incubaron durante 3 h a 4°C para difundir el sobrenadante en el agar y se adicionó nuevamente 100 µL de sobrenadante MRS_N y MRS_A respectivamente, posteriormente se incubaron a 35°C por 48 h (Audisio *et al*, 2011; Churata *et al*, 2016). Después del periodo de incubación, se midieron las zonas de inhibición, incluyendo el diámetro de los pozos (Bauer *et al*, 1966; Rojas *et al*, 2005; Jurado *et al*, 2015). Cada ensayo se realizó por duplicado.

7.4.5.3 Identificación de Bacteriocinas en *Lactobacillus plantarum* (BAL -03 ITTG) y *Lactobacillus fermentum* (BAL – 21 ITTG)

Para confirmar la naturaleza proteica del componente activo o la presencia de una bacteriocina producida por BAL-03 o BAL-21 se realizó un tratamiento enzimático al sobrenadante libre de células únicamente para los monocultivos. Los SLC se trataron con pepsina y proteasa a una concentración final de 1 mg/mL, incubadas a 37°C por 2 h. Después del tratamiento enzimático las enzimas se inactivaron mediante tratamiento térmico, 98 ° C durante 3 min (Todorov *et al*, 2015). Se realizó el mismo procedimiento para actividad antimicrobiana descrito en 7.4.5.2, a excepción del cambio de pH.

8. Resultados y discusiones

8.1 Evaluación del crecimiento celular en monocultivo y cocultivo

Durante la evaluación del crecimiento celular de los monocultivos y cocultivos durante 24 horas de incubación en caldo MRS, se observó que los cultivos de *L. plantarum* (BAL 03-ITTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG) alcanzaron una densidad máxima poblacional de 8.85×10^9 UFC/mL y 5.78×10^9 UFC/mL, respectivamente, a las 12 horas de cultivo. La fase estacionaria del crecimiento para BAL 03 comienza a las 8 horas de cultivo, mientras que BAL 21 lo hace a las 12 horas, como se observa en la Figura 8.1.

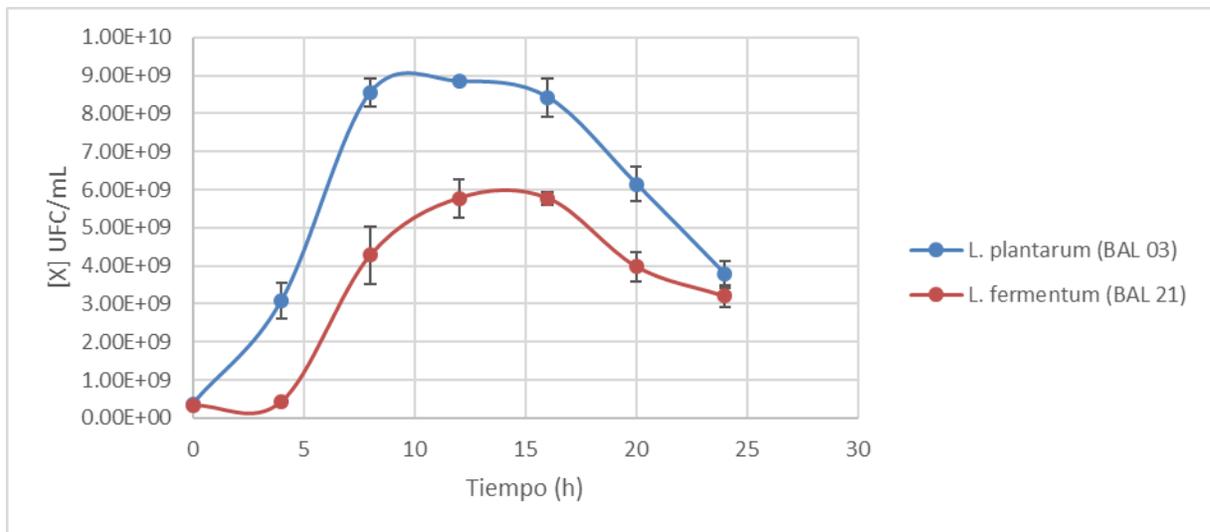


Figura 8.1. Perfil de crecimiento de *L. plantarum* (BAL 03-ITTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG).

En la figura 8.1 se observa que *L. fermentum* presenta una fase de adaptación durante las primeras 4 horas de cultivo en donde las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas necesarias para la replicación de su material genético (Christophe, 2011), posteriormente después de la hora 4 se observa que

inicia la fase exponencial en el crecimiento de *L. fermentum*. Por su parte, la cinética de crecimiento de *L. plantarum* no presentó fase de adaptación.

Se han reportado comportamientos similares en cuanto al perfil de crecimiento de la cepa *L. plantarum* WCFS1, algunos autores mencionan que ese fenómeno se debe a un grupo de genes con una función en común denominado casete génico, cuya finalidad es codificar una gran variedad de proteínas involucrados en la absorción y utilización de azúcares y proteínas (Kleerebezem *et al.*, 1995). Esta característica permite que *Lactobacillus plantarum* pueda crecer en numerosas fuentes de carbono ya que en sus cromosomas se incluyen 25 complejos enzimáticos de PTS II (Sistema de fosfotransferasa) y 30 sistemas de transporte involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Siezen & van Hylckama Vlieg, 2011). Lo anterior ayuda a explicar el hecho de que *L. plantarum* inicia fase log a partir de que es inoculada en el caldo MRS, a diferencia de *L. fermentum*.

Ambas cepas evidenciaron la capacidad de crecer hasta alcanzar concentraciones alrededor de 8.85×10^9 UFC/mL y 5.78×10^9 UFC/mL de *L. plantarum* BAL 03-ITTG y *L. fermentum* BAL 21-ITTG respectivamente. La mayor concentración celular en *L. plantarum* es debida a la versatilidad metabólica asociada al crecimiento de la cepa. El crecimiento celular cuantificado en esta investigación es similar a lo reportado por otros autores. Gámez *et al.*, (2013), quienes obtuvieron la mayor concentración celular de *Lactobacillus plantarum* 1H1 y *Lactobacillus plantarum* 1H2 con un valor de 6×10^9 UFC/mL y 4×10^9 UFC/mL a las 12 horas de cultivo, empleando como medio de cultivo caldo MRS.

Del mismo modo se realizaron las cinéticas de crecimiento de los diferentes tratamientos del cocultivo *L. plantarum* BAL 03-ITTG/*L. fermentum* BAL 21-ITTG en caldo MRS a 36 °C, graficando los perfiles de crecimiento de cada cocultivo con la finalidad de comparar el patrón de crecimiento con los monocultivos.

La figura 8.2 muestra que ninguno de los tratamientos en cocultivo presentaron fase de adaptación, este efecto puede ser debido a la capacidad de *L. plantarum* de establecerse y coadyuvar al crecimiento rápido del cocultivo sin importar la proporción en la que se encuentre esta cepa dentro del inóculo. Los perfiles de crecimiento de los cocultivos son similares al perfil del monocultivo de BAL 03, es evidente el significativo efecto benéfico de *L. plantarum* en los tratamientos 7:3, 6:4 y 5:5.

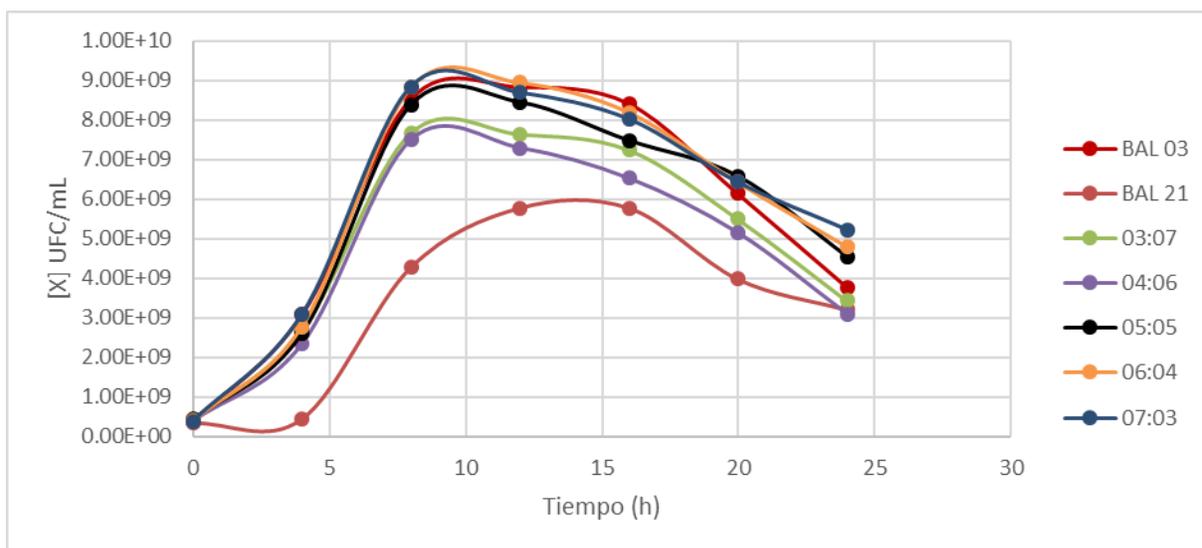


Figura 8.2 Perfiles de crecimiento en monocultivos y cocultivos.

El perfil de crecimiento de cada cepa en cocultivo se muestra de la siguiente manera: la figura 8.3 para el tratamiento 3:7, la figura 8.4 corresponde al tratamiento 4:6, la figura 8.5 corresponde al tratamiento 5:5, la figura 8.6 corresponde al tratamiento 6:4 y la figura 8.7 corresponde al tratamiento 7:3. En todos los gráficos se compara con el crecimiento en monocultivo.

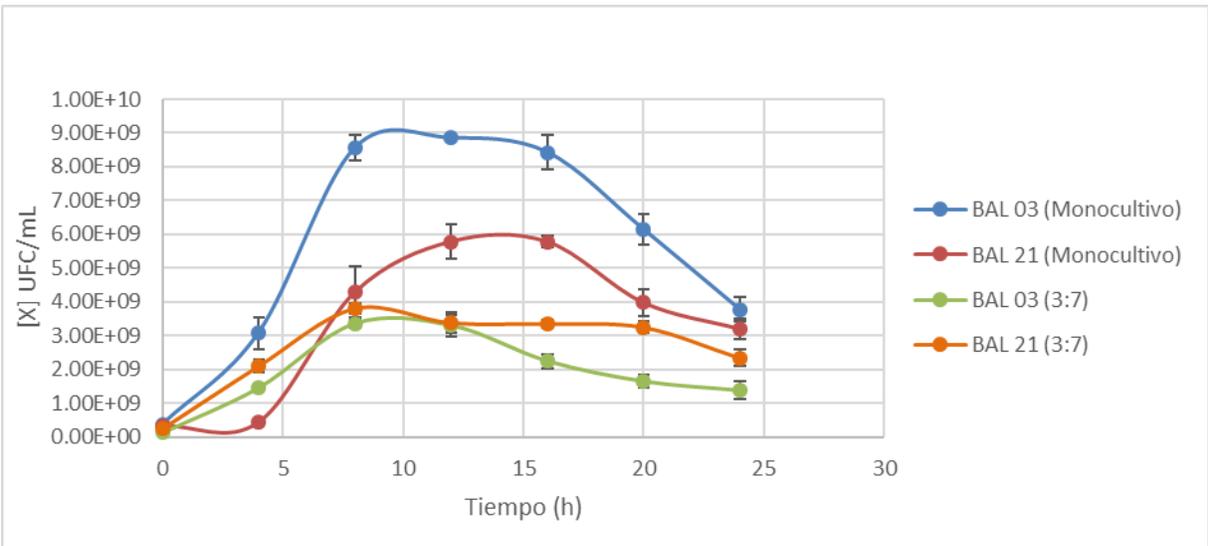


Figura 8.3. Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 3:7.

La figura 8.3 muestra que en el cocultivo el crecimiento de BAL-21 no presenta fase lag, inicia fase log desde que es inoculada y entra a fase estacionaria a las 7 horas de fermentación, prolongándose ésta fase durante 8 horas, tiempo mayor en comparación con el monocultivo de BAL-21. Por su parte BAL-03 no presentó cambios significativos en cuanto a su perfil de crecimiento.

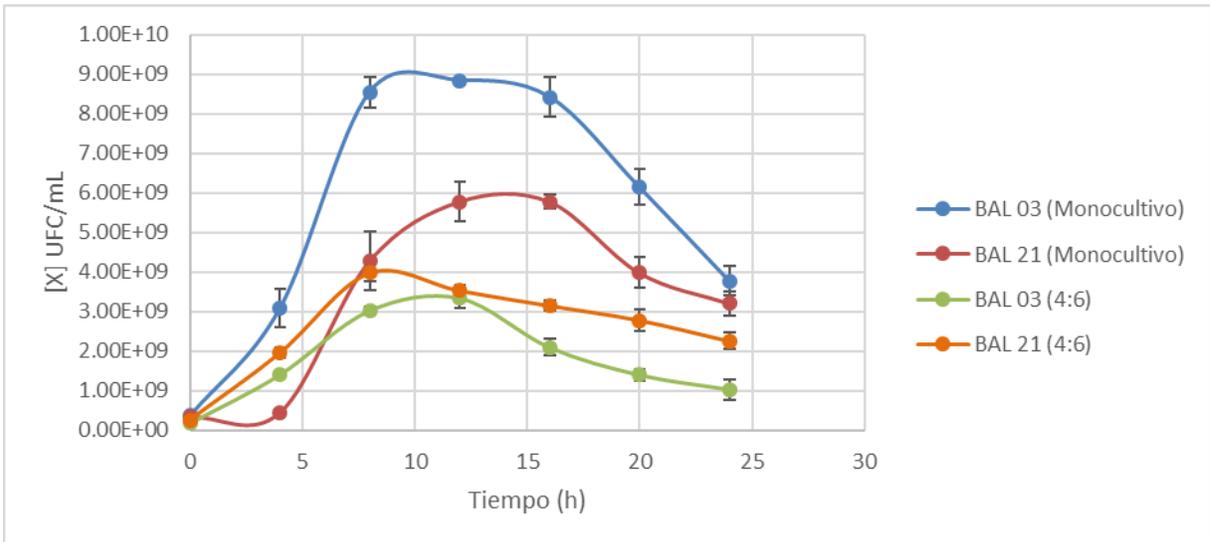


Figura 8.4. Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 4:6.

En la figura 8.4 se observa que en el cocultivo BAL-21 mantuvo semejante duración de la fase log que su monocultivo, pero no presentó fase estacionaria o bien, la fase estacionaria tiene una duración menor a 4 horas. Cabe destacar que ambas cepas entran a la fase estacionaria horas antes al compararlas con su respectivo monocultivo, BAL-03 mostró un inicio de fase de muerte 4 horas antes mientras que BAL-21 lo hace a las 8 horas de fermentación.

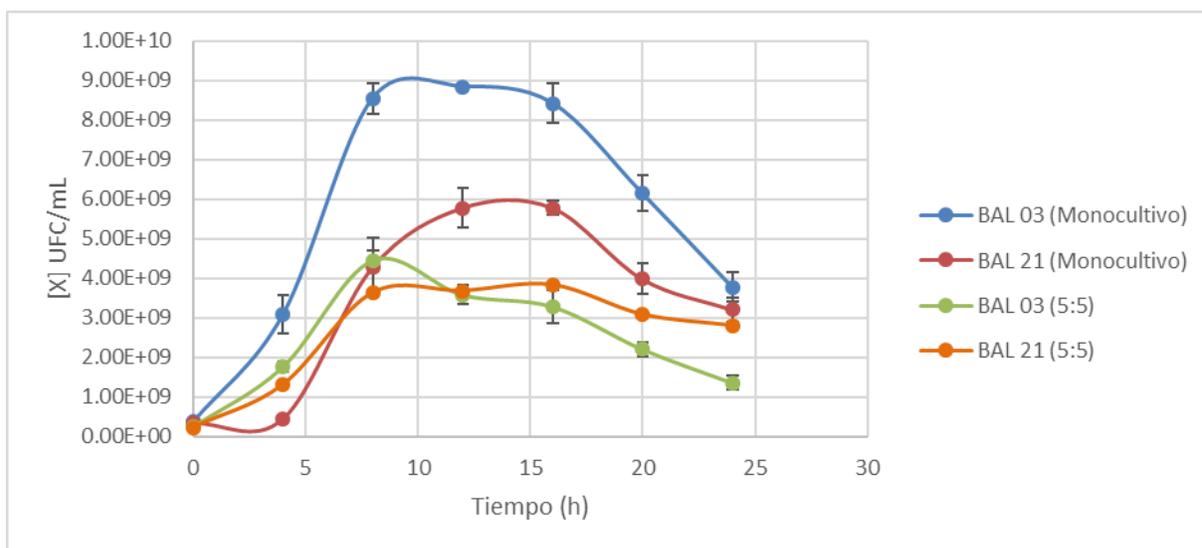


Figura 8.5. Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 5:5.

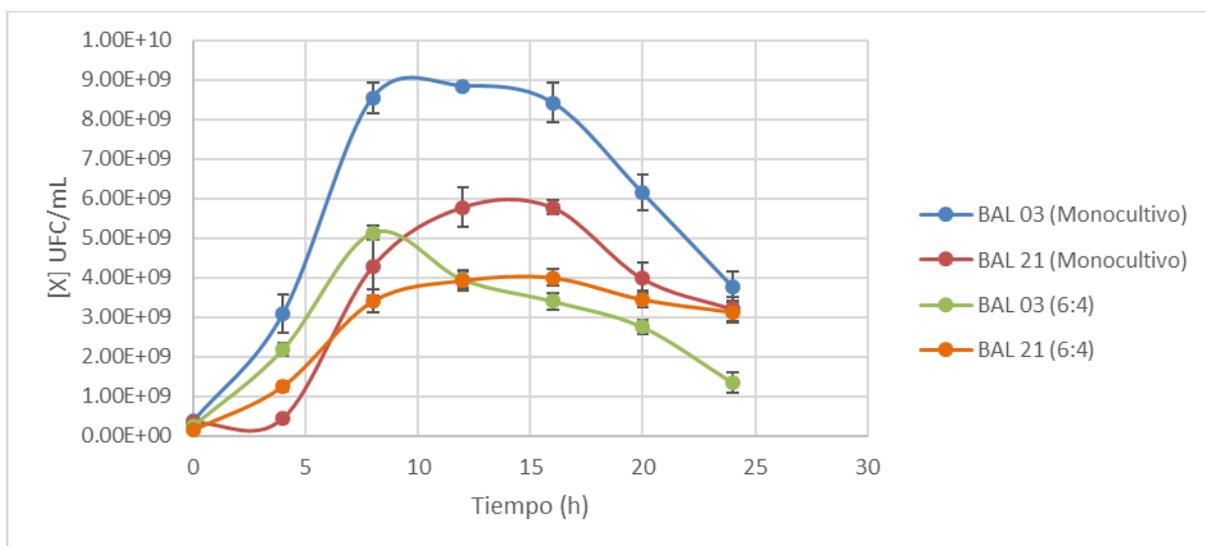


Figura 8.6. Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 6:4

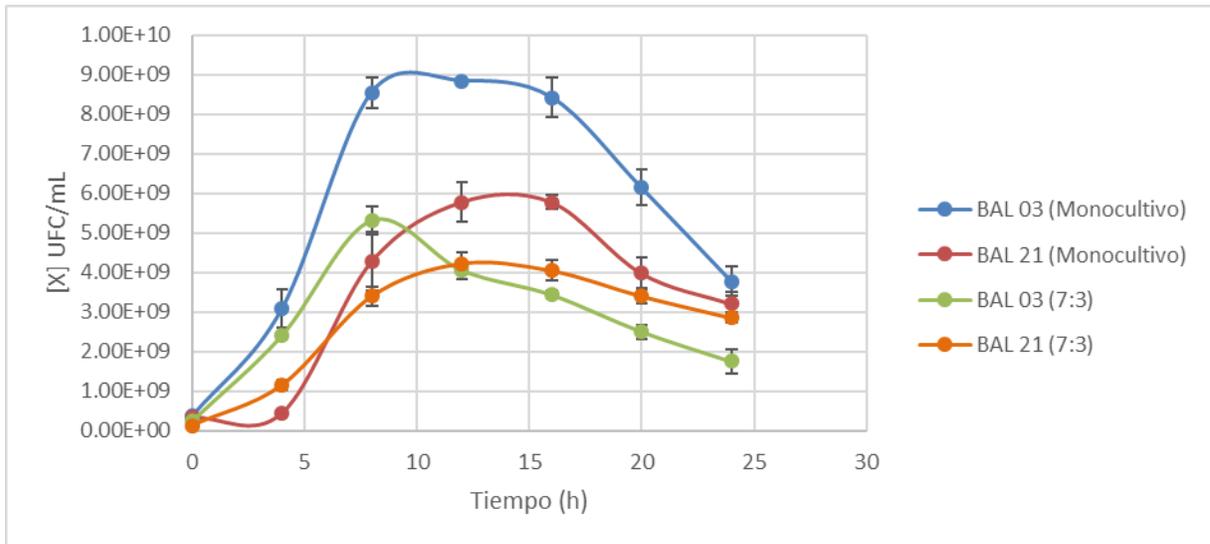


Figura 8.7. Perfil de crecimiento de BAL 03/BAL 21 en cocultivo 7:3

En las proporciones 5:5, 6:4 y 7:3 el crecimiento de BAL-03 presentó un decaimiento a las 8 horas de fermentación, no presentó fase estacionaria y la fase de muerte inició a las 8 horas del cultivo. Por su parte BAL-21 aumenta 4 horas su fase log y disminuye la fase estacionaria. Es destacable que en todos los cocultivos y su monocultivo, BAL-21 entró en fase de muerte a las 16 horas, siendo la única fase en mantener su hora de inicio constante con respecto a los tratamientos.

La producción del metabolito principal (ácido láctico) fue aumentando conforme a las proporciones, (esto se discute a fondo más adelante), es decir, aumentó la producción conforme la proporción de BAL-03 aumentaba o bien conforme la proporción de BAL-21 disminuía. Un aumento en la producción de ácido láctico conlleva a una mayor acidez en el medio, por lo que se evidencia que la cepa *L. plantarum* presenta menor tolerancia ácida en los diferentes tratamientos en cocultivo.

Algunos autores argumentan que la biomasa máxima obtenida (2.06 g/L) en el cocultivo de *L. delbrueckii* ssp/*L. plantarum* se debe principalmente a *L. delbrueckii* debido a que la producción concomitante de ácido láctico afectó el crecimiento de *L. plantarum*. En condiciones de estrés ácida los *Lactobacillus*, en general, son capaces de regular la

homeostasis del pH intracelular mediante la eliminación activa de protones de la célula mediante la enzima ATPasa la cual se encarga de traslocar protones hacia fuera de la célula con la finalidad de mantener el pH interno, sin embargo, la actividad ATPasa tiene una actividad optima a valores de pH (5.0-5.5) en cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* (Jangra *et al.*, 2015).

Esto fundamenta la razón de la tolerancia a la acidez de *L. plantarum* BAL-03 ITTG lo cual se relaciona con la restricción de su crecimiento en el cocultivo y su perfil de crecimiento en los cocultivos, puesto que los valores de pH en cocultivo se encontraron en un rango de 3.6-3.4, valores fuera de la actividad optima del mecanismo de regulación de pH en cepas de *Lactobacillus plantarum*.

En todos los perfiles de crecimiento se observa que la fase de adaptación de BAL-21 no se comporta de igual manera que en su respectivo monocultivo, además la fase estacionaria de BAL-03 disminuye, entrando en fase de muerte antes que en su monocultivo. En la tabla 8.1 se muestran los parámetros cinéticos de los monocultivos y cocultivos.

El crecimiento máximo de la población total de microorganismos en los diferentes tratamientos en cocultivo se evidenció a la hora 12, se observa que el comportamiento del crecimiento celular de los diferentes cocultivos fue diferente al del monocultivo de *Lactobacillus fermentum*, obteniendo mayor concentración celular en los diferentes tratamientos en cocultivos, comparado a lo cuantificado en el monocultivo de *L. fermentum* ($5.43 \times 10^9 \pm 2.12 \times 10^8$ UFC/mL). Es importante señalar que los tratamientos en cocultivo alcanzaron una concentración celular máxima parecida al del monocultivo de *L. plantarum*, siendo el tratamiento 6:4 el que obtuvo la mayor concentración celular (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Parámetros cinéticos de los monocultivos y cocultivos.

Tratamiento	μ (h ⁻¹)	$Y \frac{X}{S}$ (UFC/g)	% ρ	$[X]_{\text{máx}}$ (UFC/mL)	$Q_x \left(\frac{\text{UFC}}{\text{mL} \cdot \text{h}} \right)$
BAL 03	0.393 ± 0.014	5.25x10 ⁵ ± 1.21x10 ⁴	92.26 ± 0.421	8.48x10 ⁹ ± 5.03x10 ⁷	1X10 ⁹
BAL 21	0.323 ± 0.027	3.87x10 ⁵ ± 5.24x10 ⁴	87.77 ± 0.522	5.43x10 ⁹ ± 2.12x10 ⁸	6.50X10 ⁸ ± 5.77X10 ⁷
3:7	0.370 ± 0.015	6.71x10 ⁵ ± 1039	89.31 ± 0.691	7.28x10 ⁹ ± 3.71x10 ⁸	9x10 ⁸ ± 8.16x10 ⁷
4:6	0.371 ± 0.014	6.12x10 ⁵ ± 3.96x10 ⁴	90.10 ± 0.123	7.12x10 ⁹ ± 3.90x10 ⁸	8.75X10 ⁸ ± 5X10 ⁷
5:5	0.373 ± 0.017	4.86x10 ⁵ ± 6.87x10 ⁴	91 ± 0.149	8.03x10 ⁹ ± 8.22x10 ⁸	9.75x10 ⁸ ± 5x10 ⁷
6:4	0.388 ± 0.005	6.22x10 ⁵ ± 1731	91.66 ± 0.428	8.56x10 ⁹ ± 1.24X10 ⁸	1x10 ⁹
7:3	0.393 ± 0.005	7.91x10 ⁵ ± 8229	91.51 ± 0.274	8.47x10 ⁹ ± 1.62x10 ⁸	1X10 ⁹

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias

Los resultados concuerdan con lo reportado por Yilmaz & Gömen (2017), quienes al evaluar el crecimiento de un cocultivo de *Streptococcus thermophilus* RSKK 04082/*Lactobacillus bulgaricus* DSM 20081/*Lactobacillus plantarum* RSKK 02030 en yogurt, encontraron que no existía diferencia en cuanto a la concentración final celular obtenida en el cocultivo (SBP) de 8.2 log UFC/mL respecto a la concentración final de los cultivos puros de *S. thermophilus* (8.1 log UFC/mL) y *L. plantarum* (8.2 log UFC/mL), sin embargo, la concentración de *Lactobacillus bulgaricus* al final de la fermentación alcanzó una concentración de 6.7 log UFC/mL , dicha concentración fue menor a lo encontrado en el cocultivo SBP.

El hecho de cultivar dos o más microorganismos en un mismo sistema no siempre significa obtener un mayor crecimiento total de los microorganismos con respecto a los monocultivos, puesto que el crecimiento de un microorganismo como cultivo puro puede ser sustancialmente diferente de su crecimiento en cocultivo, debido a las interacciones microbianas que se presenten (Pin & Baranyi, 1998). Tales interacciones pueden ser de naturaleza sinérgica o antagonica, dando como resultado una proliferación potenciada o inhibida con respecto al crecimiento de los microorganismos o la producción de metabolitos o enzimas.

Los resultados muestran que el empleo de proporciones de inóculo menores a 5:5 % (v/v) de *L. plantarum* BAL-03 ITTG genera menores concentraciones celulares totales en el cocultivo, mientras que al emplear inóculos mayores o igual al 5:5 % (v/v) de *L. plantarum* BAL-03 ITTG genera la mayor concentración celular en los cocultivos. Se han publicado investigaciones en donde se demuestra que una cantidad apropiada de *L. plantarum* tiene un efecto positivo en la biomasa total de cocultivo, y esta cantidad va a depender de los microorganismos constituyentes del cocultivo a causa de la dinámica poblacional de los microorganismos involucrados en el cocultivo (Tang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017). Por último, es importante mencionar que los tratamientos en cocultivo 5:5, 6:4, 7:3 y *L. plantarum* BAL 03-ITTG mostraron concentraciones celulares mayor o igual a 8×10^9 UFC/mL, dichas concentraciones se encuentran por arriba de la población mínima que los microorganismos deben alcanzar para ser empleados como probióticos (10^9 UFC/mL) (Ouweland *et al.*, 2002).

8.2 Producción de ácido láctico y actividad antimicrobiana

La producción de ácido láctico generados por BAL 03, BAL 21 y cada cocultivo en caldo MRS se muestra en la Tabla 8.2; en ella se observa que todos los cocultivos son mayores productores de ácido láctico al compararlos con las cepas en monocultivo, la mayor concentración de ácido láctico (26.91 g/L) fue producido por la proporción 7:3.

Tabla 8.2. Producción de ácido láctico en monocultivos y cocultivos

Tratamiento	Ác. Láctico (g/L)	% ρ	$Y \frac{P}{S}$ (g/g)	$Q_P \left(\frac{g}{L \cdot h} \right)$
BAL 03	21.60 ± 0.254	92.26 ± 0.421	0.839 ± 0.010	0.6787 ± 0.038
BAL 21	22.18 ± 0.823	87.77 ± 0.522	0.943 ± 0.021	0.7012 ± 0.037
3:7	23.62 ± 0.318	89.31 ± 0.691	1.030 ± 0.024	0.7687 ± 0.005
4:6	23.58 ± 0.381	90.10 ± 0.123	1.027 ± 0.009	0.7781 ± 0.007
5:5	24.88 ± 0.445	91.00 ± 0.149	1.070 ± 0.027	0.8418 ± 0.018
6:4	25.06 ± 0.063	91.66 ± 0.428	1.181 ± 0.011	0.8638 ± 0.0002
7:3	26.91 ± 0.509	91.51 ± 0.274	1.244 ± 0.030	0.9150 ± 0.021

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias

La cepa BAL 03 presentó el mayor porcentaje de conversión de sustrato y la menor producción de ácido láctico. Comparando la tabla 8.2 con la tabla 8.1 se observa que BAL 03 tiene mayor crecimiento celular, pero su Q_P es menor a Q_P de BAL 21. Por su parte BAL 21 produce mayor ácido láctico pero menor biomasa. Cabe destacar que entre mayor fue la proporción de BAL 03 empleada en el cocultivo fue mayor la producción de ácido láctico, por lo tanto, Q_P y $Y \frac{P}{S}$ son mayores en la proporción 7:3 en comparación a el resto de proporciones, superando notoriamente a ambos monocultivos, lo cual demuestra que la proporción 7:3 es la

mejor productora de ácido láctico como metabolito de interés. Además los valores de $Y_{\frac{P}{S}}$ tanto en monocultivo como cocultivo demuestran que BAL 03 y BAL 21 son homofermentativas. Es importante mencionar la probabilidad de una sinergia entre ambas cepas ya que BAL 21 produjo en mayor porcentaje el ácido láctico mientras BAL 03 aportó la mayor cantidad de biomasa total del cultivo como se muestra en la figura 8.8.

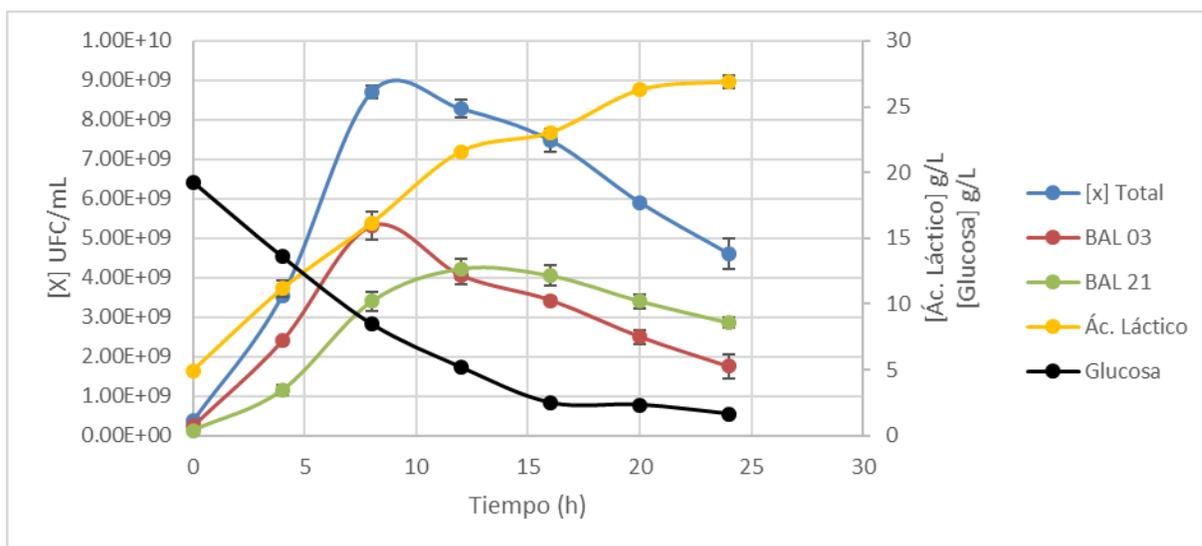


Figura 8.8. Perfil de crecimiento total, por cepa, consumo de sustrato y producción de ácido láctico en la proporción 7:3

En la industria de los alimentos es deseable que las BAL produzcan ácido láctico en elevadas concentraciones, ya que es uno de los ingredientes más versátiles aplicados en alimentos y en la preservación de productos (Vickroy, 1985). Las bacterias homofermentativas son capaces de convertir la glucosa a ácido láctico con un rendimiento por arriba del 85%. Además, estas bacterias son las más utilizadas en las fermentaciones ya que producen mayores cantidades de ácido láctico como producto principal de la fermentación, produciendo 2 moles de ácido láctico a partir de 1 mol de glucosa por la vía EMP (König & Fröhlichet, 2009).

Gonzales (2013) reportó rendimientos mayores al 80% de conversión de sustrato para la producción de ácido láctico para BAL 03 y BAL 21 concordando con los resultados de esta investigación.

En cuanto a los rendimientos de la producción de ácido láctico con respecto al consumo de glucosa, los monocultivos y cocultivos presentaron valores de 0.83 a 1.24. Lo cual indica que la mayor parte de la glucosa se está convirtiendo en ácido láctico. Por lo tanto, la enzima con mayor actividad es la aldolasa, la cual cataboliza a la glucosa a través de la vía EMP, y la enzima con menor actividad es la fosofocelotasa, la cual cataliza la producción del ácido acético en bajas concentraciones por la ruta de las pentosas fosfato (Axelsson,1993). En nuestros resultados el mayor rendimiento ($Y_{\frac{P}{S}}$) fue de 1.24 por la proporción 7:3, por lo que es posible considerar que hay otros sustratos que participan en el suministro de esqueletos carbonados. Tal como citrato, que es un componente del caldo MRS posible de ser metabolizado por algunas bacterias ácido lácticas (Sánchez, 2005).

Por otra parte, el efecto de la actividad antimicrobiana se reportó por la medición de las zonas de inhibición del crecimiento de los patógenos sobre la superficie del agar. De acuerdo a los resultados obtenidos se encontró que todos los MRS_N no tuvieron un efecto inhibitorio contra el crecimiento de los patógenos, mientras que los MRS_A presentaron efectos inhibitorios contra los tres patógenos de prueba (Tabla 8.3).

Todas los MRS_A de las BAL tuvieron un efecto inhibitorio con las tres cepas estudiadas. Siendo el cocultivo 7:3 quien presentó mayor actividad inhibitoria, superando a los cocultivos restantes y a los monocultivos. *S. aureus* y *E. coli* fueron las cepas más sensibles en la evaluación. Esto concuerda con el hecho de que la proporción 7:3 fue la mayor productora de ácido láctico con una concentración final de 26.91 ± 0.509 g/L, un rendimiento del producto con respecto al sustrato de 1.244 ± 0.030 y una Q_P de 0.9150 ± 0.021 superando en estos parámetros cinéticos a todos los cocultivos y monocultivos.

En los MRS_A el principal responsable de la actividad antimicrobiana fue el ácido láctico producido por los monocultivos y cocultivos y que en muchas investigaciones han reportado ser los responsables de la actividad antimicrobiana contra varios patógenos (Jin *et al.*, 1996; Lehto & Salminen, 1997; De Keersmacker *et al.*, 2006; Hutt *et al.*, 2006; Millette *et al.*, 2007).

Tabla 8.3. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes ácidos de los monocultivos y cocultivos estudiados con bacterias patógenas.

Tratamiento	Ác. Láctico (g/L)	Halo de inhibición (mm)		
		<i>S. aureus</i> ENCB-16883	<i>E. coli</i> ITTG 1879	<i>P. mirabilis</i> ITTG 4860
BAL 03	21.60 ± 0.254	10.81 ± 0.335	7.81 ± 0.390	6.39 ± 0.101
BAL 21	22.18 ± 0.823	11.02 ± 0.163	6.94 ± 0.187	6.24 ± 0.3449
3:7	23.62 ± 0.318	12.68 ± 0.638	11.61 ± 0.536	8.23 ± 0.929
4:6	23.58 ± 0.381	11.91 ± 0.520	9.83 ± 0.520	6.91 ± 0.144
5:5	24.88 ± 0.445	12.08 ± 0.763	10.65 ± 0.108	7.35 ± 0.180
6:4	25.06 ± 0.063	11.45 ± 0.740	9.52 ± 0.719	7.05 ± 0.236
7:3	26.91 ± 0.509	14.00 ± 0.376	11.12 ± 0.745	8.01 ± 0.619

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias

El mecanismo de acción se ha asociado con la disociación de la molécula de ácido láctico. En el caso del lactato la constante de disociación (pK) es de 3.86 y para el acetato es de 4.75, por lo que estas sustancias están parcialmente en su forma no disociada a valores de pH más bajos. Por lo tanto, estos ácidos orgánicos no disociados son lipofílicos y son capaces de penetrar la membrana de la célula bacteriana, y a mayores valores de pH intracelulares se disocian para producir iones de hidrógeno generando un gradiente de protones dentro de la célula que interfieren con las funciones esenciales bacterianas (Booth, 1985; Bian, 2008).

Cordoba *et al.*, (2003), reportaron que a concentraciones de 17 y 25 g/L de ácido láctico producido por cepas de *Lactobacillus plantarum* presentaron efectos inhibitorios contra *E.coli*, *Staphy. aureus* y *Salmonella thiphyrium*. Audisio *et al.*, (2011), evidenciaron que los sobrenadantes de cepas de *Lactobacillus jonhsonni* presentaban efectos inhibitorios con *E.coli*, *Staphy. aureus* y *Listeria monocitogenes*.

Con esta prueba se buscó conocer los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana, neutralizando los MRS_N se eliminó la actividad de los ácidos orgánicos producidos por las BAL y se buscó la interacción de otros metabolitos como las bacteriocinas, sin embargo, la mayoría de los compuestos inhibitorios son inestables por encima de pH neutro (Belgacem *et al.*, 2012). Se recurrió entonces a otra técnica para evidenciar la presencia de bacteriocinas mediante un tratamiento enzimático con proteasas, los resultados evidenciaron que BAL-03 y BAL 21 no producen bacteriocinas ya que los halos de inhibición no fueron significativamente diferentes (Tabla 8.4) al compararlos con la tabla 8.3. El tratamiento enzimático solo se realizó a los sobrenadantes libre de células de los monocultivos.

Tabla 8.4. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes ácidos de los monocultivos, con tratamiento enzimático, estudiados con bacterias patógenas.

Tratamiento	Ác. Láctico (g/L)	Halo de inhibición (mm)		
		<i>S. aureus</i> ENCB-16883	<i>E. coli</i> ITTG 1879	<i>P. mirabilis</i> ITTG 4860
BAL 03	21.45	10.6	7.7	6
BAL 21	22.21	11	7	5.8

8.3 Producción de Exopolisacaridos (EPS)

La producción de EPS por los cocultivos empleando caldo MRS modificado (100g/L) se muestra en la Tabla 8.4. La mayor producción de EPS la presentó la proporción 4:6 con una producción de 60513.27 ± 500.60 mg/L. Cabe destacar que la variación entre los EPS producidos por los cocultivos y monocultivos no varía notoriamente, a pesar de que las proporciones 5:5, 6:4 y 7:3 no superaron la producción de EPS en comparación a los monocultivos.

Tabla 8.5. Producción de EPS en BAL 03, BAL 21 y sus cocultivos.

Tratamiento	EPS (mg/L)
<i>L. plantarum</i> (BAL 03-ITTG)	53920.35 ± 688.33
<i>L. fermentum</i> (BAL 21-ITTG)	51221.23 ± 1376.66
3:7	57371.68 ± 438.03
4:6	60513.27 ± 500.60
5:5	48079.64 ± 563.18
6:4	43035.39 ± 813.48
7:3	42460.17 ± 125.15

Los resultados se expresan como medias, \pm es el error estándar de las medias

Algunos reportes indican que el extracto de carne, el extracto de levadura y la peptona contenidas en el caldo MRS, interfieren en un 94% en la cuantificación de los EPS (Stacy & Robert, 1998) aunque Younis et al., (2010), demostraron que el extracto de carne y extracto de levadura influyen drásticamente en el crecimiento de BAL, por lo cual, es lógico pensar que estos componentes del medio no permanecen constantes durante el crecimiento de BAL, tanto en monocultivo como en cocultivo. El perfil de crecimiento de los monocultivos y cocultivos en el medio MRS modificado (100 g/L Glucosa) se observan las siguientes figuras; en la figura 8.9 se observa la cinética de crecimiento de BAL 03, la figura 8.10 corresponde a BAL 21, la proporción 3:7 se observa en la figura 8.11, correspondiente a la proporción 4:6 es la figura 8.12, la figura 8.13 muestra la cinética correspondiente a la proporción 5:5, la figura 8.14 muestra a la proporción 6:4 y la figura 8.15 el perfil de la proporción 7:3.

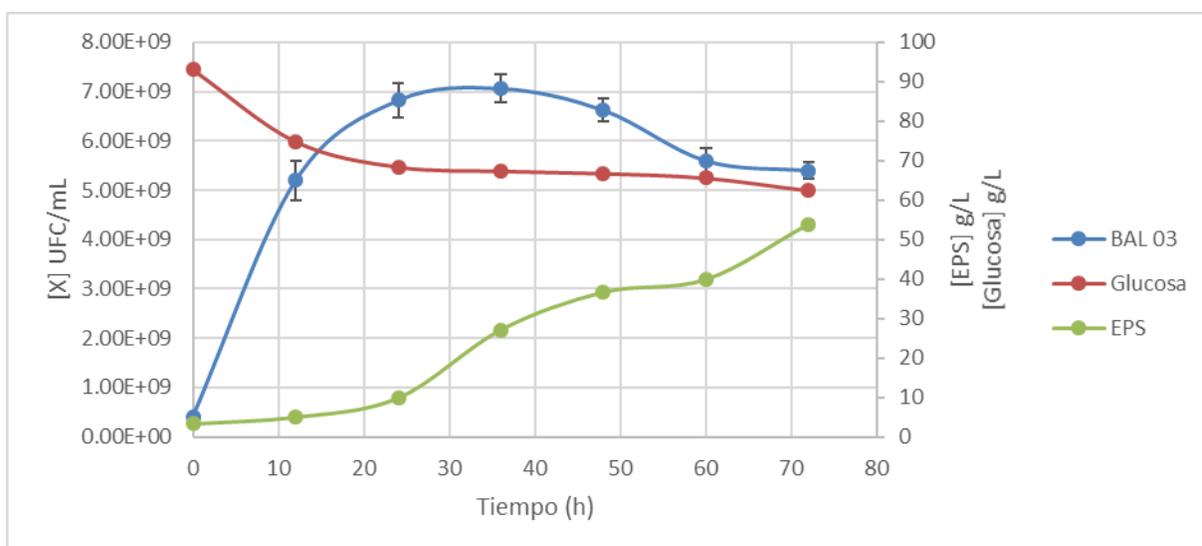


Figura 8.9 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por BAL 03

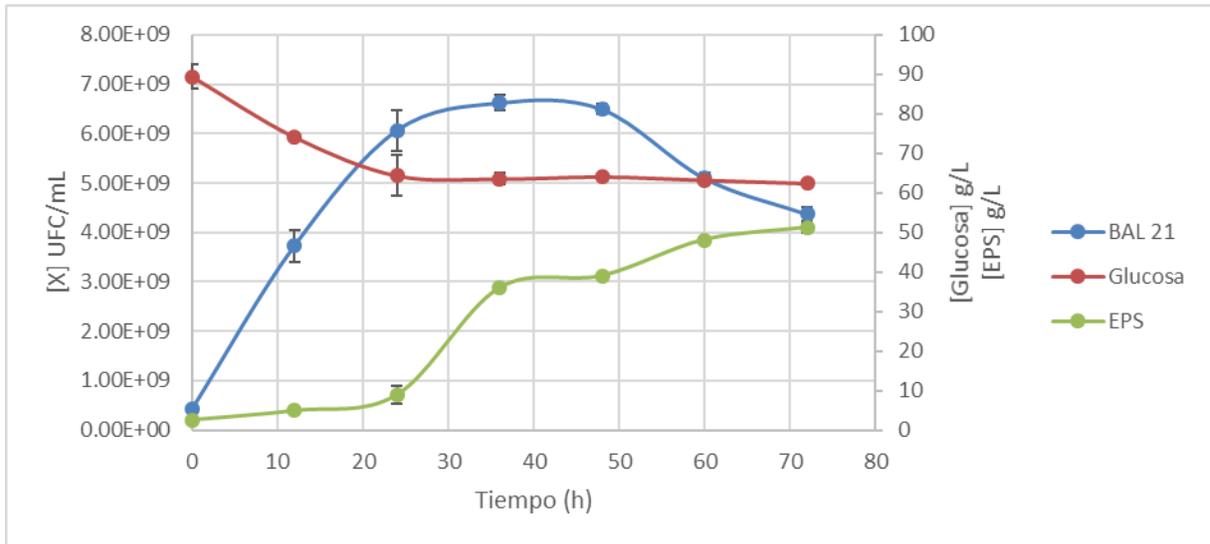


Figura 8.10 Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por BAL 21

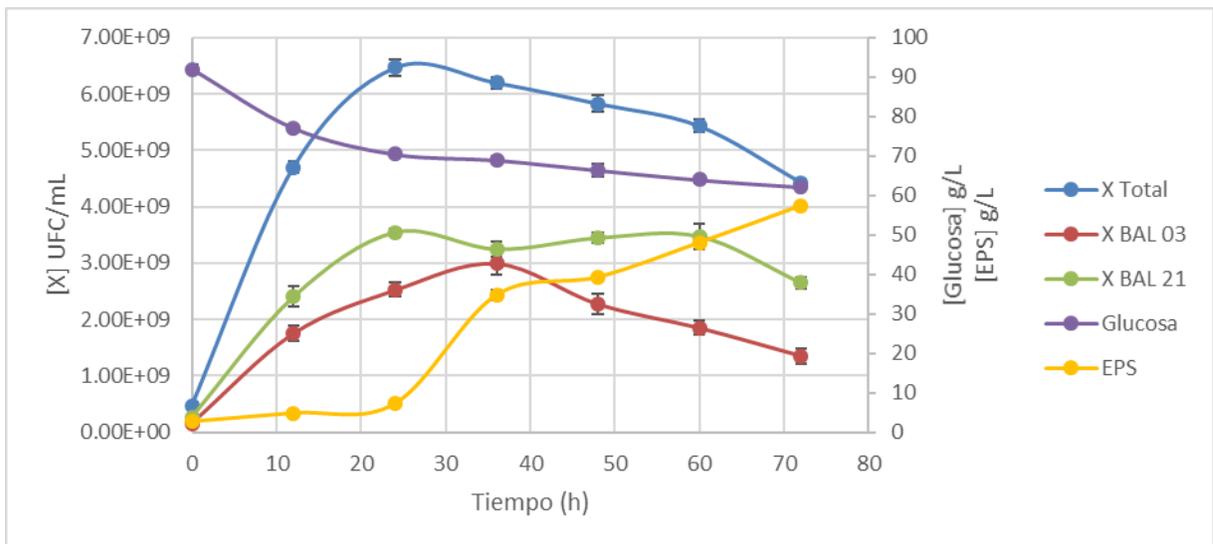


Figura 8.11. Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 3:7

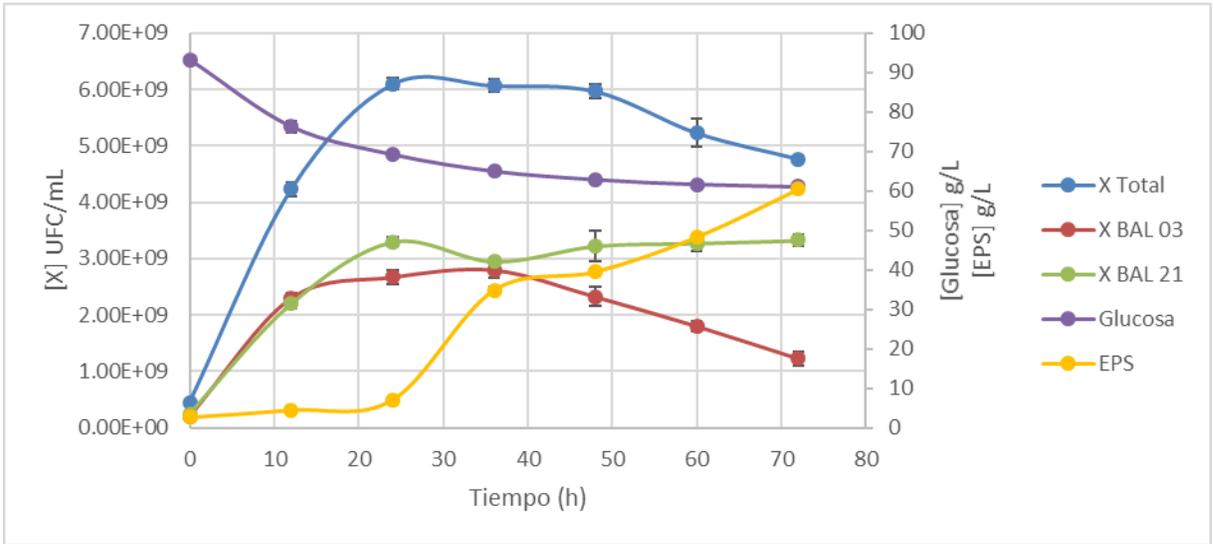


Figura 8.12. Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 4:6

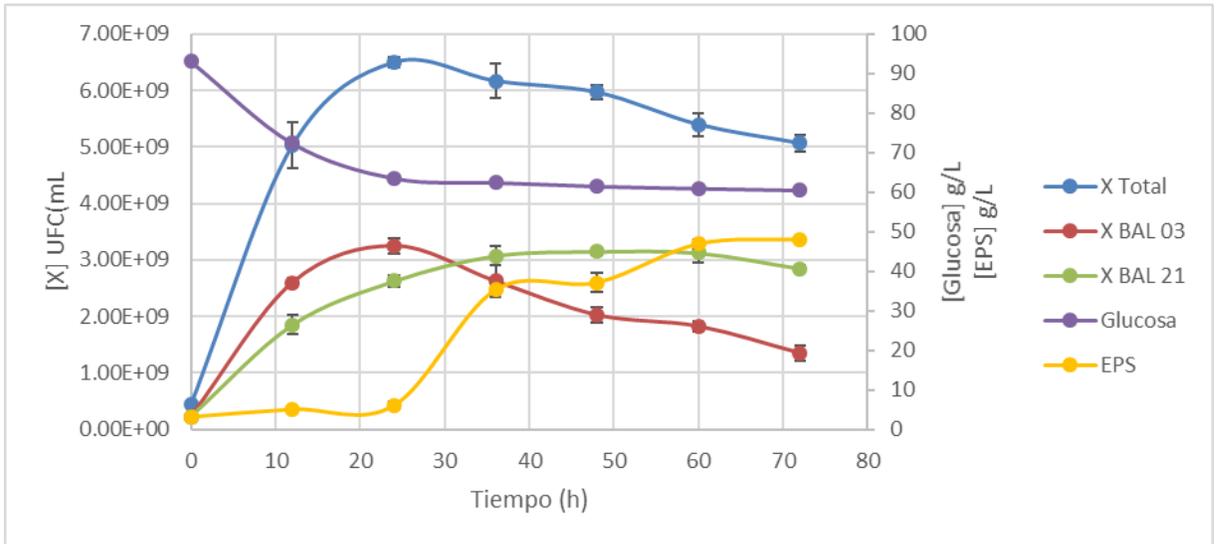


Figura 8.13. Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 5:5

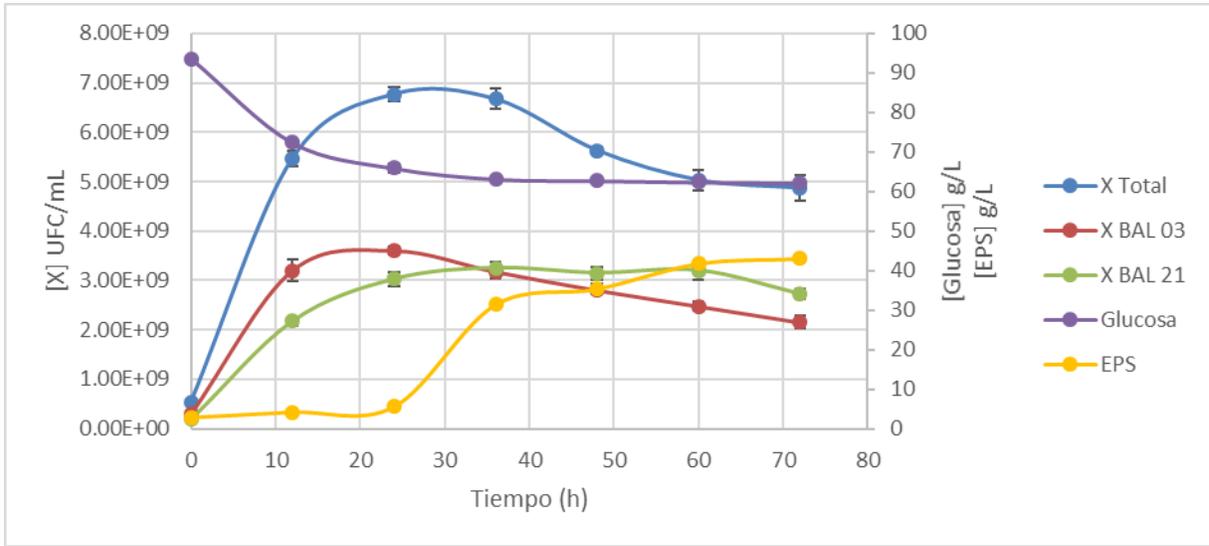


Figura 8.14. Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 6:4

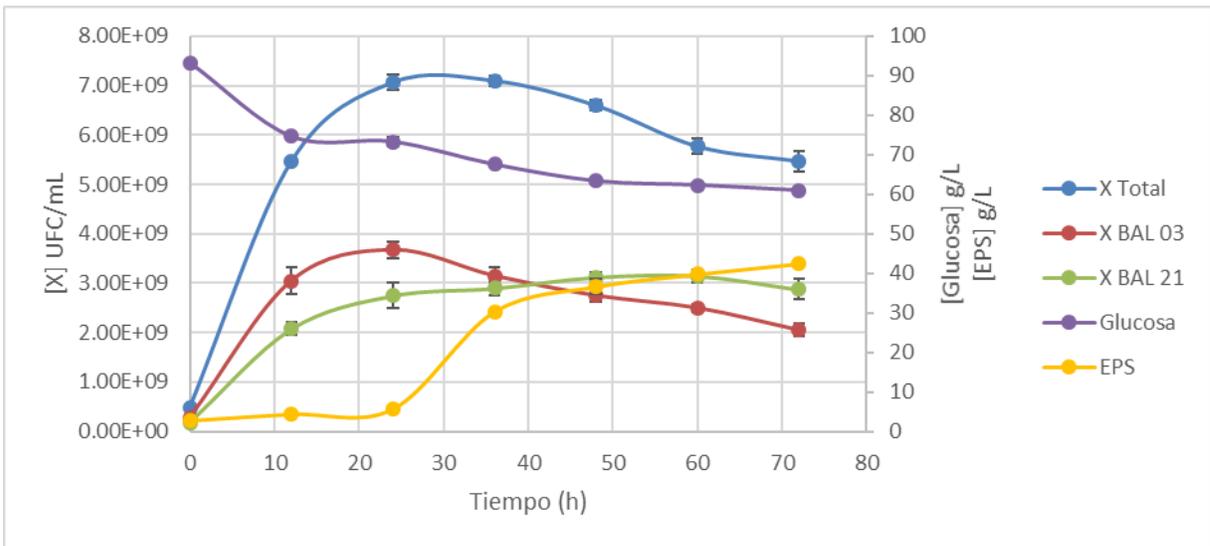


Figura 8.15. Perfil de crecimiento, consumo de sustrato y producción de EPS por la proporción 7:3.

En todos los gráficos anteriores se observa que los EPS no son metabolitos relacionados con el crecimiento celular, ya que, cuando los monocultivos y cocultivos se encuentran en su fase exponencial los EPS se producen en cantidad pequeñas, cuando los cultivos entran a la fase estacionaria de su crecimiento es en donde se potencializa la producción de EPS. Del mismo modo, en todos los tratamientos, el consumo de glucosa comienza a detenerse a las 48 horas de cultivo, con una concentración de glucosa residual de aproximadamente 60%. Los parámetros cinéticos de los cultivos se presentan en la tabla 8.5.

Los rendimientos del producto con respecto al sustrato demuestran que BAL 03 y BAL 21, solas o en cocultivo, son buenas productoras de EPS al presentar rendimientos mayores a 1. Sin embargo, la diferencia de producción entre cocultivos y monocultivos no es amplia, por lo cual ningún tratamiento es mejor que otro para producir EPS, junto a eso se observa un porcentaje de conversión de sustrato muy bajo, menos del 50% del sustrato inicial es consumido por las cepas, esto indica que hay una pérdida considerable de sustrato.

Tabla 8.6. Parámetros cinéticos de monocultivos y cocultivos productores de EPS.

Tratamiento	$[X]_{MÁX}$ (UFC/mL)	$[P]_{MÁX}$ (mg/L)	$Y_{\frac{P}{S}}$ (g/g)	% ρ
BAL 03	$6.66 \times 10^9 \pm$ 2.36×10^8	$53920.35 \pm$ 688.33	1.64	32.95
BAL 21	$6.21 \times 10^9 \pm$ 7.79×10^7	$51221.23 \pm$ 1376.66	1.80	30.11
3:7	$6 \times 10^9 \pm$ 1.04×10^8	$57371.68 \pm$ 438.03	1.83	32.43
4:6	$5.65 \times 10^9 \pm$ 9×10^7	$60513.27 \pm$ 500.60	1.80	34.45
5:5	$6.06 \times 10^9 \pm$ 8.47×10^7	$48079.64 \pm$ 563.18	1.38	34.97
6:4	$6.23 \times 10^9 \pm$ 1.13×10^8	$43035.39 \pm$ 813.48	1.27	33.60
7:3	$6.61 \times 10^9 \pm$ 9×10^7	$42460.17 \pm$ 125.15	1.23	34.66

Los resultados se expresan como medias, \pm es el error estándar de las medias

Aunque los perfiles de crecimiento celular de todos los tratamientos mostraron una adaptación rápida de las cepas en el medio de cultivo, tanto en monocultivo como en cocultivo, no se obtuvieron densidades elevadas de biomasa en comparación con lo obtenido en el cultivo en caldo MRS normal, esto sustenta por qué el porcentaje de conversión de sustrato es mínimo, lo que indica que la mayoría de ese sustrato consumido se dirige hacia la producción de EPS. Todos los tratamientos produjeron más de 40 g/L de EPS, niveles que son de 10 a 100 veces más altos que los reportados previamente para los *Lactobacillus* (van Geel-Schutten et al, 1998).

9. Conclusiones

Los monocultivos y sus correspondientes cocultivos fueron capaces de crecer en un orden de 10^9 UFC/mL, siendo *L. plantarum* y los cocultivos 5:5, 6:4 y 7:3 quienes se encuentran dentro de la población mínima para ser considerados probióticos.

Los monocultivos y cocultivos de *L. plantarum* (BAL 03-ITTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG) son homofermentativos, por lo que producen altas cantidades de ácido láctico lo cual hace viable a estas cepas y sus cocultivos para su aplicación en la industria alimentaria.

Se comprobó que *L. plantarum* (BAL 03-ITTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG) tienen actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (ITTG 1879), *Staphylococcus aureus* (ENCB-16883) y *Proteus mirabilis* (ITTG 4860), debido a su alta producción de ácido láctico. Los cocultivos son capaces de producir mayor cantidad de ácido láctico al compararlos con los monocultivos, siendo el cocultivo 7:3 quien presentó mayor producción de ácido láctico y, por ende, mayor actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos. Se demostró que estas BAL no producen bacteriocinas, dejando toda la actividad antimicrobiana al ácido láctico.

La producción de EPS reveló que, tanto en monocultivo como en cocultivo, la cantidad producida no varía de manera relevante, lo cual indica que monocultivo y cocultivo son viables para la producción de EPS. Se destaca que el medio de cultivo con concentración alta de azúcar favorece la producción de EPS, siendo *L. plantarum* (BAL 03-ITTG) y *L. fermentum* (BAL 21-ITTG), y sus cocultivos, cepas productoras de EPS en cantidades superiores a 40 g/L.

El cocultivo 7:3 (BAL 03: BAL 21) fue la mejor proporción con mejores atributos probióticos, generando biomasa superior a 8×10^9 UFC/mL, mayor producción de ácido láctico (26.91 g/L) y una mayor actividad antimicrobiana.

10. Competencias desarrolladas y/o aplicadas

A continuación, se muestran las competencias desarrolladas y/o aplicadas durante la Residencia Profesional:

Personales:

- Compromiso.
- Decisión.
- Automotivación.
- Adaptabilidad.
- Trabajo individual
- Pensamiento analítico.
- Análisis de problemas.
- Redacción.
- Manejo de estrés.

Académicas:

- Trabajo en equipo
- Aplicación de conocimientos en Microbiología.
- Aplicación de conocimientos en cinética microbiana.
- Aplicación de conocimientos matemáticos básicos.
- Aplicación de conocimientos en Bioquímica básica.
- Búsqueda de información.
- Análisis cinéticos y bioquímicos.

11. Fuentes Consultadas

1. Abee, T., Krockel, L y Hill, C, (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 28, 169-185.
2. Alakomi, HL., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. y Helander, IM, (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (5), 2001-2005.
3. Audisio, MC., Torres, MJ., Sabate, DC., Ibarguren, C y Apella, MC, (2011). Propierties of diferents lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiology Research* 166, 1-13.
4. Axelsson, L. (1993). Lactic acid bacteria classification and physiology. Ed Nueva York: Marcel Dekker.
5. Barboza, J.E., Vázquez, H., Salcedo, R y Bautista, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*. 14(3):32-38.
6. Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgarrondo, M., Prévost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertlé, T Y Chobert, JM, (2007). Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 103 (3), 584-593.
7. Bauer, AW., Kirby, WM., Sherris, JC y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal Of Clinical Pathology*. 45(4). 493-496.
8. Belgacem, Z., Rehaiem, A., Bernárdez, P., Manai, M y Pastrana, L. (2012). Interactive effects of pH and temperature on the bacteriocin stability by response surface analysis. *Microbiology*, 81(2), 195–200.
9. Bergey, M. (1992). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Tenth Edition. The Williams & Wilkings Co. Baltimore, U.S.A.

10. Beristain, SC., Palou, E y López, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6 (2012). 64-78.
11. Bian, L., (2008). An *in vitro* antimicrobial and safety study of *Lactobacillus reuteri* DPC16 for validation of probiotic concept. Tesis de maestría de la universidad Massey, Auckland Nueva Zelandia.
12. Blanco, S., Delahaye, P y Fragenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Revista Facultad de Agronomía (Maracay) Venezuela*. (32). 131-144.
13. Booth, IR. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 49 (4), 359-378.
14. Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28 (4):281-370.
15. Chapman, CMC y Gibson, GR. (2011). Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *European Journal of Nutrition*. 1-17.
16. Chen, Y., Huang, Y., Bai, Y., Fu, C., Zhou, M., Gao, B., Wang, C., Li, D., Hu, Y y Xu, N. (2017). Effects of mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in alcoholic fermentation on the physicochemical and sensory properties of citrus vinegar. *Food Science and Technology*. 84. 753-763.
17. Churata, D., Ramos, D., Moromi, H., Martínez, E., Castro, A y García, R. (2016). Efecto antifúngico de *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Revista Estomatol Herediana*. 26(2). 78-84.
18. De Man, JC., Rogosa, M. and Sharpe, ME. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23 (1), 130.
19. Devlieghere, F., Vermeiren, L y Debevere, J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Review International Dairy Journal*. (14). 273-285.
20. Drasar, BS., Shiner, M y McLeod GM. (1969). Studies on the intestinal flora. I. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterol* 56, 71-9.

21. Dubois, M., Gilles, KA., Hamilton, JK., Rebers, PA y Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3). 350-356.
22. Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 279– 292
23. Dunne, C., Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., Halloran, S y Feeney, M. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The american Journal of Clinical Nutrition* 73, 386– 392.
24. FAO/OMS, (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London ON, Canada.
25. Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzoti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 59–70.
26. Gámez, H., Ramírez, C., Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos, Grupo de Investigación en Ingeniería de los Procesos Agroalimentarios y Biotecnológicos GIPAB. Cali, Colombia.
27. Ghasemi, M. (2009) Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African Journal of Biotechnology*. (8). 81-84.
28. Gibson, GR., Otaway, PB y Robert, AR. (2000). Prebiotics: New developments in functional foods. London: Chandos Publishing (Oxford) Limited.
29. González, J. (2013). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas. Tesis de Maestría del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

30. Hernández, V. (2007). Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Journal Food Technology Biotechnological*. (45). 27-31.
31. Hill, C., Okeeffe, T y Ross, P. (2002). Antimicrobial factors produced by lactic acid bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and nutrition*. (14). 273-285.
32. Hurst, A. (1981). Nisin. *Advances in Applied Microbiology* 27, 85-123.
33. Jolly, L., Vincent, SJF., Duboc, P y Neeser, JR. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 367-374.
34. Jurado, H., Jarrín, V y Parreño, J. (2015). Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens* y *S. aureus*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 13(2). 57-66.
35. Kao, CT y Frazier, WC. (1996). Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 14, 251-255.
36. Kim, SY., Yasuki, O., Hiromi, N y Yoshikazu, A. (2006). Heat resistance, acid and bile tolerance of canine intestinal lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*. *Japanese Journal of Animal Hygiene* 32 (1), 5-11.
37. Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S y Yamaguchi, T. (1991). Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis subsp. cremoris* isolated from Scandinavian røp sour milk “villi”, *Animal Science and Technological* 62, 277-283.
38. Laws, Y y Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterization, and desing of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*. (19). 597-625.
39. Lee, HM y Lee, Y. (2008). A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. *Applied Microbiology*. 676-681.
40. Marquina, D y Santos, A. (2001). Probióticos, prebióticos y salud. Universidad Complutense.
41. Mata, J. (2006). Caracterización de los exopolisacaridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Halomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis doctoral de la Universidad de Granada.

42. Miller, G., (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428
43. Moreira, M., Abraham, A y Antoni, G. (2000). Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at sub-optimal temperatura. *Journal Dairy Science.* (83). 395-400.
44. Nissen-Meyer, J., Holo, H., Håvarstein, LS., Sletten, K y Nes, IF. (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *Journal of Bacteriology* 174 (17), 5686-5692.
45. NMX-F-420-1982. Productos alimenticios para uso humano. Determinación en acidez en leche fluida. Diario Oficial de la Federación. 02 de abril de 1982.
46. Ouwehand, AC y Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In S. Salminen, von Wright, A., Ouwehand, A. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc.
47. Parada, JL., Caron, CR., Medeiros, AB y Soccol, CR. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50 (3), 521-542.
48. Parra, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia*.
49. Pimentel, E., Castillo, D., Quintana, M., Murtua, D., Villegas, L y Díaz, C. (2015). Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatol Herediana.* 25(3). 268-277.
50. Prescott, LM., Harley, JP y Klein, DA. (2004). *Microbiología*. España: McGraw-Hill Interamericana.
51. Riley, MA y Wertz, JE. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews Microbiology* 56, 117–137
52. Rivas, F y Martinez, B. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición.* 7(1).

53. Rojas, JJ., García, AM y López, AJ. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 4(2). 28-32.
54. Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Fernández-García, M., De Los Reyes-Gavilán, CG., Margolles, A., (2008). Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (6), 1936-1940.
55. Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., De los Reyes-Gavilán, CG y Salminen, S. (2006). Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *Journal of Food Protection* 69 (8), 2011–2015.
56. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J y Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 12, 163-171.
57. Sanders, ME., Huis in't Veld, JHJ. (1999). Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 293– 315
58. Siezen, RL y Van Hylckama Vlieg, JET. (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories*. 1-13.
59. Stacy, A y Roberts, F. (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology* 40, 87–92.
60. Stanier, R. (1996). Microbiología. España: Editorial Reverté.
61. Timmerman, HM., Koning, CJM., Mulder, L., Rombouts, FM y Beynen, AC. (2003). Monostrain, multistain and multispecies probiotics: a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*. 96(2004). 219-233.
62. Todorov, S., Holzapfel, W y Nero, L. (2015). Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and some aspects of its mode of action. *Annals of Microbiology*.

63. Van Geel-Schuteen, GH., Flesch, F., Brink, B., Smith, MR y Dijkhuijen, L. (1998). Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 697-703.
64. Vázquez, SM., Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición.* 36(1):64-71.
65. Vázquez, J y Murado, M. (2008). Enzymatic hydrolysates from food wastewaters as a source of peptones for lactic productions. *Enzyme and Microbial Technology.* (43). 66-72.
66. Wong, HC y Chen, YL. (1988). Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2179-2184.
67. Yilmaz, C y Gokmen, V. (2017). Formation of tyramine in yoghurt during fermentation – Interaction between yoghurt starter bacteria and *Lactobacillus plantarum*. *Food Research International.* 288-295.
68. Zhang, ZG., Ye ZQ., Yu, L y Shi, P. (2011). Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evolucionary Biology* 11 (1), 1-12.

12.Anexos

Tabla 12.1. Lecturas de absorbancia para curva patrón de azúcares reductores

Glucosa (mg/mL)	ABS
0	0
0.2	0.222 ± 0.022
0.4	0.519 ± 0.005
0.6	0.793 ± 0.034
0.8	1.103 ± 0.071
1	1.398 ± 0.037

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias

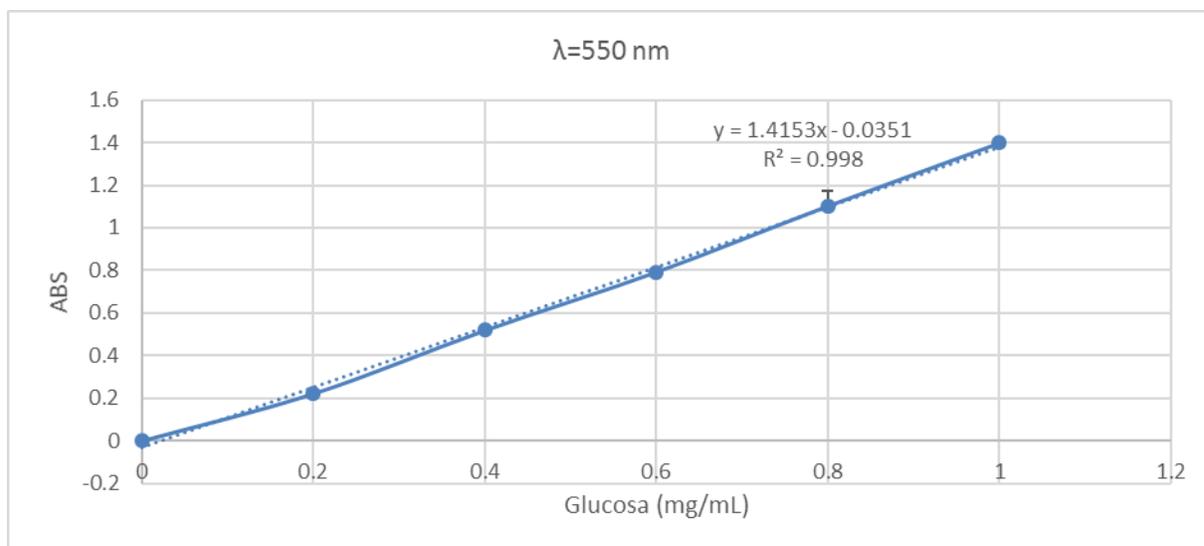


Figura 12.1. Curva patrón de azúcares reductores

Tabla 12.2. Lecturas de absorbancia para curva patrón de azúcares totales

Glucosa (ppm)	ABS
0	0
20	0.300 ± 0.008
40	0.435 ± 0.003
60	0.631 ± 0.026
80	0.898 ± 0.021
100	1.182 ± 0.117

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias

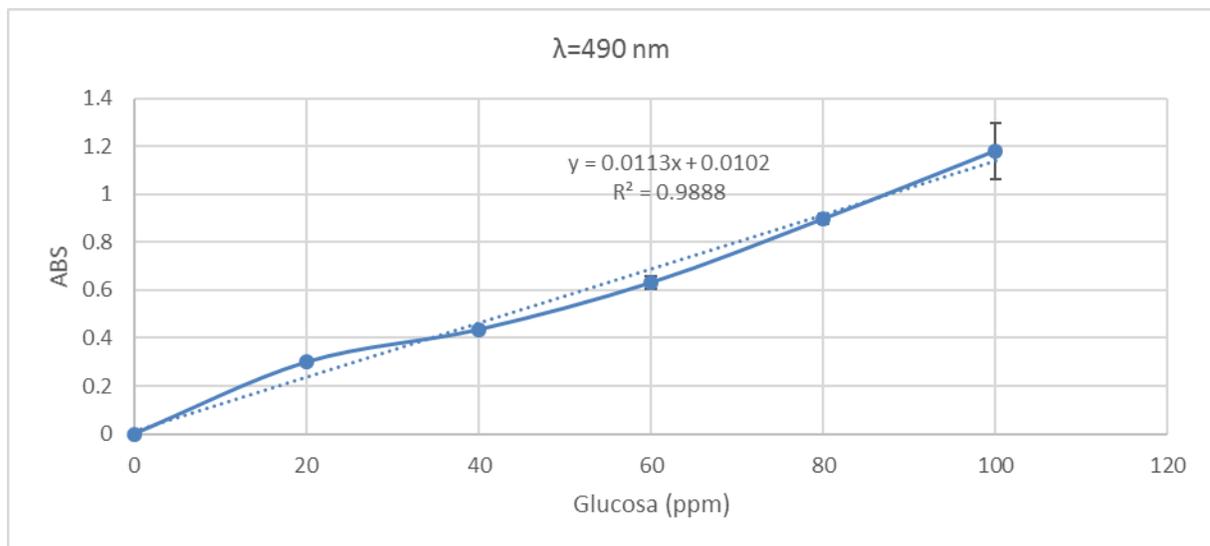


Figura 12.2. Curva patrón de azúcares totales