



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

---

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE  
BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS (BAL), AISLADAS DE  
UNA BEBIDA FERMENTADA TRADICIONAL DE  
CHIAPAS (*TABERNA*)**

## **T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**LICENCIATURA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**QUE PRESENTA**

**BERTHA PATRICIA BUENO LÓPEZ**

**ASESOR DEL PROYECTO**

**M.C. LUCÍA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO**

**REVISORES DEL PROYECTO**

**DRA. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE  
DR. MIGUEL ABUD ARCHILA**



**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, SEPTIEMBRE DE 2013.**

# DEDICATORIA

---

Dedico este trabajo a Dios por haberme permitido vivir hasta este día, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi mami Minerva por ser el pilar más importante, quien más que una buena madre ha sido mi mejor amiga, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional a lo largo de estos años de vida, por los valores que me ha inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida; sobre todo por ser un excelente ejemplo a seguir, ya que siempre promovió el desarrollo y la unión en nuestra familia, por haber creído en mi hasta el último momento.

A mis hermanos José Luis y Moisés, que siempre han estado junto a mí, por apoyarme en aquellos momentos de necesidad y me motivaron para no renunciar, por ser parte importante de mi vida, por llenar mi vida de alegría y amor cuando más lo he necesitado.

A mi amor Arturo, por haberme apoyado en las buenas y en las malas en el transcurso de mi carrera, por haber tenido la paciencia necesaria y por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación. Gracias por su amor incondicional, por la hermosa creación que vamos a tener, por ser un excelente amigo.

A mi abuelita Ruth y tía Yadira, porque me han brindado su apoyo y por compartir buenos y malos momentos.

Para ellos, muchas gracias y que dios los bendiga.

# AGRADECIMIENTO

---

El presente trabajo de tesis, le agradezco primeramente al Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por darme la oportunidad de estudiar y ser una profesional.

A mi amiga Elvia por el apoyo recibido para la realización de esta tesis desde el día que la conocí, por ser más que una amiga; por todos los consejos. A mi amiga Areli, por compartir buenos y malos momentos en el trascurso de la carrera. A Jorge, porque sin el equipo que formamos no habiéramos logrado esta meta.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis profesores: Mtra. Lucia María Cristina Ventura Canseco, Dr. Miguel Abud Archila y Dra. Patricia Sánchez Iturbe, por haber compartido sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional a las que me encantaría agradecerles su amistad. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén, quiero darles las gracias por formar parte de mí.

# ÍNDICE

---

	Pág.
RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. OBJETIVO.....	13
2.1 Objetivo General.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	15
3.1 Alimentos fermentados como fuente de bacterias ácido lácticas.....	16
3.2 Probióticos.....	18
3.2.1 Criterios de selección para cepas probióticas.....	19
3.2.2 Pruebas in vitro para evaluación del potencial probiótico de cepa.....	19
3.2.3 Pruebas in vivo para evaluación del potencial probiótico de cepas.....	20
3.3 Bacterias ácido lácticas.....	20
3.3.1 Descripción microbiológica.....	20
3.3.2 Clasificación de las BAL de acuerdo al metabolismo de los carbohidratos.....	21
3.3.3 Capacidad antimicrobiana de las BAL.....	25
3.3.3.1 Ácido láctico.....	26
3.3.3.2 Bacteriocinas.....	27
3.3.4 Resistencias al tránsito gastrointestinal.....	31
3.3.5 Disminución del colesterol.....	32
3.3.6 Producción de exopolisacáridos (EPS's).....	34
3.3.7 Capacidad de degradación de azúcares.....	36
4. METODOLOGÍA.....	39
4.1 Cinéticas de crecimiento.....	40

4.2 Supervivencia de las BAL bajo condiciones gastrointestinales simuladas.....	40
4.3. Cuantificación de ácido láctico, ácido acético y glucosa residual.....	42
4.4 Determinación de exopolisacáridos.....	42
4.4.1 Tratamiento químico para superficies celulares.....	42
4.4.2 Extracción y purificación de EPS`s.....	43
4.4.3 Cuantificación de EPS`s.....	43
4.5 Disociación del taurocolato de sodio (sal biliar).....	44
4.6 Degradación de azúcares.....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1 Cinética de crecimiento.....	47
5.2 Cuantificación de la supervivencia de las BAL bajo condiciones gastrointestinales simuladas.....	51
5.3 Cuantificación de ácido láctico, ácido acético y glucosa residual.	55
5.4 Cuantificación de exopolisacáridos.....	57
5.5 Disociación de taurocolato de sodio.....	59
5.6 Degradación de azúcares.....	61
6. CONCLUSIONES.....	65
7. RECOMENDACIONES.....	67
8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	69
9. ANEXOS.....	85

# ÍNDICE DE CUADROS

---

	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Microorganismos aislados de alimentos tradicionales.....	17
Cuadro 2. Bacterias ácido lácticas homofermentativas y heterofermentativas.....	23
Cuadro 3. Substratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH.....	37
Cuadro 4 Parámetros cinéticos de crecimiento de BAL.....	49
Cuadro 5. Supervivencia de BAL después de la simulación gástrica.....	52
Cuadro 6. Cuantificación de ácido láctico y ácido acético.....	56
Cuadro 7. Cuantificación de Exopolisacáridos.....	57
Cuadro 8. Desconjugación de taurocolato de sodio.....	59
Cuadro 9. Degradación de azúcares.....	62
Cuadro 10. Bacterias identificadas por el kit API 50 CH.....	63

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Proceso de selección y evaluación de microorganismos probióticos.....	19
Figura 2. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	22
Figura 3. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.....	24
Figura 4. Producción de bacteriocinas.....	30
Figura 5. Producción de ácido láctico y EPS.....	35
Figura 6. Pruebas de interpretación para el kit API 50 CH.....	38
Figura 7. Cinéticas de crecimiento. (a) crecimiento rápido, (b) crecimiento moderado y (c) crecimiento lento.....	47



# RESUMEN



Los probióticos son microorganismos vivos que, constituyen una interesante alternativa en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades, razón por la cual hay un interés creciente por caracterizar microorganismos para uso probiótico. Con el objetivo de caracterizar 24 cepas de *Lactobacillus* aisladas de una bebida artesanal de Chiapas (taberna), mediante estudios *in vitro*, se evaluaron los parámetros cinéticos de cada cepa. En la selección de aquellas resistentes a las principales barreras naturales del tránsito gastrointestinal, se evaluó la resistencia a pH ácido 1.9 y a 0.3 % de sales biliares en caldo MRS. La producción de ácido láctico se evaluó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para cuantificar los exopolisacáridos por el método de Dubois, previamente se confirmó su naturaleza polisacáridica, las pruebas siguientes fueron disociación de taurocolato de sodio y degradación de azúcares utilizando el kit API 50 CH.

Los resultados de las cinéticas de crecimiento, permitió la selección de 18 cepas de crecimiento rápido ( $T_d=1.16$  h) y crecimiento moderado ( $T_d=1.49$  h), las cuales alcanzaron una concentración celular superior a  $10^9$  UFC/mL. En la prueba bajo condiciones gastrointestinales simuladas (pH 1.9 y 0.3 % sales biliares), se obtuvo que 11 (61.11 %) de las 18 BAL evaluadas, fueron capaces de sobrevivir, observando que la BAL-22 presentó una sobrevivencia del 89.71% demostrando la mejor tolerancia. La producción de ácido láctico presentó un rango entre  $19.009 \pm 0.68$  y  $22.955 \pm 1.60$  g/L, siendo consideradas como homofermentativas, la BAL-21 es la mayor productora de ácido láctico de  $22.955 \pm 1.60$  g/L. La cuantificación de exopolisacáridos fue entre  $34.997 \pm 8.749$  y  $233.986 \pm 17.841$  g/L, siendo la BAL 10 la mayor productora con 233.986 g/L. La disociación de taurocolato de sodio varió desde  $0.53 \pm 0.23$  hasta  $1.79 \pm 0.13$  mM, siendo la BAL 28 quien presentó mayor disociación. La prueba API 50 CHL de acuerdo a la habilidad para fermentar diferentes azúcares, identificó como *Lactobacillus plantarum* 1 y *Lactobacillus fermentum*.

**Palabras claves:** Ácido láctico, resistencia a pH, sales biliares, exopolisacáridos.



1

# INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un alto potencial biotecnológico, dada su presencia en diversos procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano y animal. Estas bacterias no solo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas de los alimentos, sino que generan ambientes pocos favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos, debido a su marcada capacidad antagonista. Además de este importante papel en procesos de bioconservación, se ha comprobado que algunas cepas de bacterias lácticas, entre ellas las del género *Lactobacillus*, son benéficas para la salud tanto humana como animal.

Los probióticos son microorganismos vivos adicionados a un alimento que ejercen un efecto benéfico sobre la salud humana. Los efectos más destacables se pueden resumir en: mejora de la respuesta inmunitaria, el mantenimiento de la microbiota del colon, reduciendo la cantidad de diversas enzimas procarcinógenas en las heces, el tratamiento de la diarrea del viajero y la secundaria a la terapia antibiótica, el control de los rotavirus y de la colitis inducida por *Clostridium difficile*, y la prevención de las úlceras relacionadas con *Helicobacter pylori*. Otros aspectos más controvertidos incluyen la reducción de la absorción del colesterol, la prevención de las caries, y la prevención y el tratamiento de las infecciones del tracto urinario (Álvarez y col., 2001).

Estas se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza y también en nuestro sistema digestivo. Aunque se les conoce sobre todo por sus aplicaciones en la industria láctea, también se utilizan para conservar pescado, carne y embutidos.

Las fuentes naturales donde se han obtenido microorganismos probióticos es en la leche cruda, queso, nata, mantequilla y leche fermentada en Egipto (El soda y col., 2003); granos húmedos de destilado de trigo (Pederson y col., 2004); pulque, tepache y solución madre del vinagre en México (Alvarado y col., 2006); nomo, fura y ogi en Nigeria (Adebayo y col., 2008).

Para considerar a las bacterias ácido lácticas como probióticos deben poseer una serie de características: no ser patógeno ni tóxico, debe ejercer efectos benéficos sobre la salud de quien lo ingiere, ser tecnológicamente utilizable, presentar un elevado porcentaje de células viables, debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones estresantes del estómago y tener capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa del intestino, buena producción de ácido láctico, degradación de colesterol y poseer actividad antimicrobiana (Collado Amores, 2004).

Debido al auge del consumo de alimentos probióticos, la FAO en conjunto con la OMS, publicaron en mayo de 2002 una guía para la evaluación sistemática de probióticos en alimentos (Sanz y col., 2003); dicha guía incluye identificación del género, especie y cepa probiótica, pruebas *in vitro* para la selección de probióticos de uso humano, donde se incluyen ensayos de resistencia a acidez gástrica y sales biliares, adherencia a la mucosa intestinal y actividad antagónica contra patógenos; seguridad de los probióticos, donde se incluye evaluación de resistencia a antimicrobianos, estudios *in vivo* utilizando animales y humanos; y características del etiquetado.

Considerando que en el proceso de selección de cepas de interés probiótico, es fundamental comprobarla capacidad de tolerancia a las condiciones adversas a su paso por el tracto gastrointestinal, en esta investigación, se realizó un estudio *in vitro* a cepas bacterianas, aisladas de la taberna con propiedades probióticas con posibilidad de usarse en humanos o animales.



2

# OBJETIVO

## **2.1 General:**

Evaluar las características cinéticas y metabólicas de las bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de la taberna y determinar su potencial probiótico.

## **2.2 Específico:**

1. Determinar la cinética de crecimiento de cada una de las 24 BAL aisladas de la taberna que, por su velocidad de crecimiento, serán consideradas de crecimiento rápido, moderado y lento.
2. Evaluar la resistencia a pH ácido y sales biliares de las BAL que presenten crecimiento rápido ó moderado, mediante una simulación gastrointestinal "*in vitro*".
3. Cuantificar la producción de ácido láctico de cada una de las BAL que presenten sobrevivencia mayor al 60% en la simulación gastrointestinal.
4. Cuantificar la producción de exopolisacáridos (EPS's) de cada una de las BAL seleccionadas.
5. Evaluar la capacidad de disociación de taurocolato de sodio para cada una de las BAL seleccionadas.
6. Evaluar la capacidad de degradación de azúcares de las BAL seleccionadas.



3

# FUNDAMENTO TEÓRICO

### **3.1 Alimentos fermentados como fuente de bacterias ácido lácticas**

La comida tradicional fermentada es el producto de un proceso biotecnológico; es producida por el aprovechamiento de la flora natural asociada con sustratos presentes en los alimentos, es una técnica usada para conservar y mejorar la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos en fresco. Los alimentos tradicionales fermentados son una abundante fuente de microorganismos, presentando algunas características probióticas debido a su resistencia a las condiciones gastrointestinales, adhesión al tejido intestinal y la exclusión que ejercen sobre bacterias patógenas, adhesión al epitelio intestinal de acogida y la prevención del crecimiento o la invasión de bacterias patógenas en el intestino de los animales (Chiu y col., 2007). En algunos casos estos microorganismos presentes en alimentos presentan condiciones de resistencia y adaptabilidad superior a los microorganismos comerciales (Liu y col., 2011); Klayraung y col 2010). En el cuadro 1 se presentan algunos de los microorganismos aislados de alimentos tradicionales a los que se les han realizado pruebas para evaluar su potencial probiótico.



**Cuadro 1.** Microorganismos aislados de alimentos tradicionales (Rivera y col., 2010)

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>SUSTRATO</b>	<b>REFERENCIA</b>
<i>L. plantarum</i>	Kung-som	Hwanhlem y col., (2009)
<i>L. fermentum</i>	Preparados lácteos tradicionales del Tibet, Mongolia, "Yun Nan"	Yan y col., (2010)
<i>P. acidilactici, E. faecium</i>	Salchichas fermentadas	Ruiz y col., (2008)
<i>L. acidophilus, L. paracasei, L. fermentum, L. rhamnosus, L. casei shirota</i>	"Kule naoto"	Mathara y col., (2008)
<i>L. acidophilus, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus, Lactobacillus Sp.</i>	Quesos	Maragkoudakis y col., (2006)
<i>L. plantarum, L. brevis, L. curvatus, P. petosaceus, P. acidilactici, Leuconostos spp., E. durans</i>	Vegetales fermentados	Tamang y col (2009)
<i>L. fermentum</i>	"Nham" y "Miang": carne de cerdo fermentada, pescado fermentado, escabeche de ajo, hojas de té fermentadas.	Klayraung y col., (2010)
<i>L. helveticus, L. paracasei</i>	Yogurt y "kimchi"	Song y col (2010)
<i>L. casei Zhang</i>	"Koumiss"	Guo y col., (2009)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Melaza de caña	Ortiz y col., (2008)
BAL	"Adai" cereales y leguminosas	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. platarum, L. brevis, L. fermentum, Leuc mesenteroides</i>	"Agbelina" mandioca	Rivera y Gallardo, (2010)
BAL	"Atole" maíz	Rivera y Gallardo, (2010)
BAL	"Been-saalga" granos de bjara	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. plantarum, L. brevis, L. rhamnosus, L. fermentum, Leuc. mesenteroides</i>	"Boza" cereales	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>Leuc. Mesenteroides, L. fermentum, Sacch, cerevisiae</i>	"Dosa" arroz y garbanzo	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>Leuc. Mesenteroides. BAL y levaduras</i>	"Idli" cereales y leguminosas	Rivera y Gallardo, (2010)
BAL	"Ilambazi lokubilisa" maíz	Rivera y Gallardo, (2010)
BAL	"Kecap" trigo y frijol	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. casei, L. lactis, L. plantarum, L. brevis, N. acidophilus, L. fermentum, L. casei, levaduras</i>	"Kenkey" maíz	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. plantarum, L. curvatus, L. brevis, L. sake, Leuc mesenteroides</i>	"Kimchi" vegetales	Rivera y Gallardo, (2010)
BAL	"Kishk" cereal y leche	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>Lactobacillus sp., L. brevis</i>	"Kisra" sorgo	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. fermentum, L. salivarius</i>	"Koko" bjara	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. bulgaricus, L. brevis</i>	"Mahewu" maíz	Rivera y Gallardo, (2010)
<i>L. fermentum, L. brevis, L. salivarius, Sacch, cerevisiae</i>	"Mawe" maíz	Rivera y Gallardo, (2010)

### 3.2 Probióticos

Las BAL fueron referidas como probióticos en la década de los 60, sin embargo en la década de los 70 la palabra probiótico tomó una terminología diferente al describir extractos de tejidos que estimulaban crecimiento microbiano. A los finales de los 70 se redefinió como organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal (Savadogo y col., 2006).

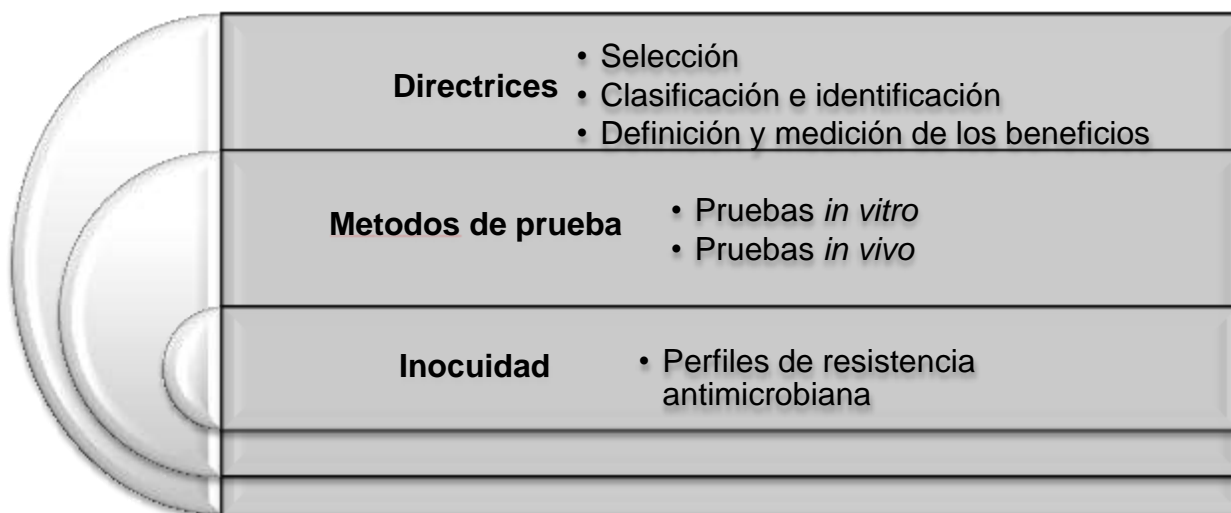
Cada vez es mayor el interés por las BAL y su uso como probióticos; la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) los han definido como “organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped” (Castro y col., 2006).

Las BAL son utilizadas en alimentos para proporcionar una amplia variedad de beneficios saludables. Los efectos fisiológicos relacionados con bacterias probióticas incluye reducción de pH en el intestino, producción de algunas enzimas digestivas y vitaminas, producción de sustancias antibacteriales como por ejemplo ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, sistema lactoperoxidasa, lactonas y otras sustancias sin definir, reconstrucción y construcción de microflora intestinal normal después de desórdenes causados por diarrea, terapia de antibióticos y radioterapia, reducción de colesterol en la sangre, supresión de infecciones bacteriales, eliminación de carcinogénesis, mejoramiento de la absorción de calcio (Grajek y col., 2005).

Además del efecto benéfico en la salud del huésped, un cultivo debe ser ingerido en cantidades suficientes. La concentración sugerida de BAL está en el rango  $10^6$ - $10^7$  UFC/g de producto (Hummel y col., 2007; Ruiz y col., 2008).

### 3.2.1 Criterios de selección para cepas probióticas

La FAO y OMS, incluyen dentro de sus publicaciones, la metodología y los parámetros que se deben de tener en cuenta para el desarrollo de probióticos, así como la identificación, evaluación de seguridad y caracterización funcional de las cepas probióticas (Figura 1).



**Figura 1.** Proceso de selección y evaluación de microorganismos probióticos

### 3.2.2. Pruebas *in vitro* para evaluación del potencial probiótico de cepas

Los métodos *in vitro* son aptos para la evaluación de los criterios antes mencionados. Sin embargo, es importante señalar que los resultados de tales estudios no pueden ser predictivos de la situación *in vivo*. Por ejemplo, la supervivencia de los microorganismos a pH bajo o en presencia de bilis en tubos de ensayo no es un reflejo de las interacciones en el estómago y el intestino, donde existen condiciones fisiológicas complejas (Holzapfel y col., 1998). Las metodologías de los ensayos deben someter a los microorganismos a las condiciones menos favorables del tracto gastrointestinal; por ejemplo, en el estómago el pH es la peor condición y en el duodeno son las sales biliares. Por esta razón es necesario evaluar la tasa de supervivencia de las bacterias presentes en estas condiciones durante un tiempo determinado, simulando las condiciones *in vivo*.

### **3.2.3. Pruebas *in vivo* para evaluación del potencial probiótico de cepas**

Según la FAO-OMS (2002), este tipo de estudios están destinados a demostrar la eficacia de los probióticos en animales y mostrar el efecto que tienen al mejorar significativa, estadística y biológicamente la condición, los síntomas, el bienestar o la calidad de vida, la reducción del riesgo de enfermedad o el aumento del tiempo de recurrencia. En pocas palabras, cada beneficio debería de tener probada correlación con el probiótico de interés.

Esta es de las fases más importantes en el desarrollo de probióticos, ya que, permite evidenciar los resultados que se obtienen *in vitro*, demostrando los efectos que se le puedan adjudicar a un microorganismo.

### **3.3. Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros, con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común.

Las BAL están distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, de la tierra, de las plantas verdes, así como también del tracto digestivo y la vagina de mamíferos, entre otras fuentes (Torres y col., 2002).

Para su multiplicación requieren de azúcares como la glucosa y la lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento (Ramírez y col., 2011).

#### **3.3.1 Descripción microbiológica**

En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, tienen un tamaño de 0.5-1.2 x 1.0-10.0  $\mu\text{m}$ , son no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativa, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos.

Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH bajos y otras a valores tan altos como 9.6 y la mayoría crece a un pH de 4 a 4.5, permitiéndoles sobrevivir en medios donde otras bacterias no tolerarían la actividad producida por los ácidos orgánicos.

El intervalo de temperatura de crecimiento se sitúa entre 35-38°C (Carr y col., 2002; Vázquez y col., 2009).

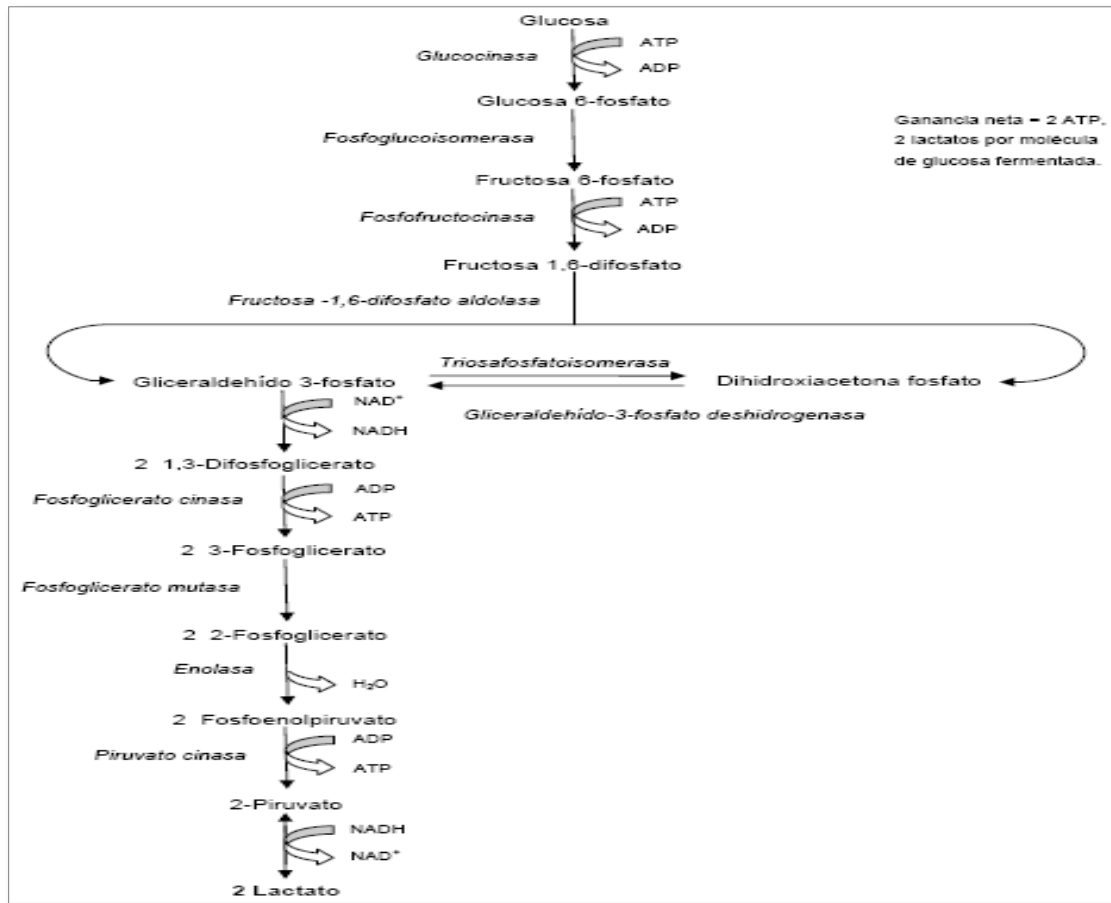
### **3.3.2 Clasificación de las BAL de acuerdo al metabolismo de los carbohidratos**

La clasificación de las BAL en géneros diferentes está basada en principio en la morfología, el modo de fermentación (homofermentativas y heterofermentativas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración (L ó D) del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a alta concentración de sal y la tolerancia ácida y alcalina.

- **Homofermentativas:**

Poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de fosfoacetolasa. Se caracterizan por la capacidad de transformar la glucosa por la vía EMP (Embden-Meyerhof-Parnas), para producir dos moléculas de lactato por una molécula de glucosa. En algunos casos se transforma la fructosa para obtener ácido láctico, con producción nula o mínima de otros productos secundarios (Figura 2).

Las bacterias homolácticas son capaces de extraer de una determinada cantidad de glucosa aproximadamente el doble de energía con respecto a las bacterias heterolácticas. Dentro de esta clasificación (Cuadro 2) se encuentran los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* (Casp y col., 1999; Jay y col., 1992).



**Figura 2.** Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Axelsson y col., 2004).

- **Heterofermentativas**

No tienen la enzima fructosa-difosfato-aldolasa, enzima clave en la glucólisis, pero tienen la enzima fosfoacetolasa y por lo tanto oxidan la glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato que se escinde hasta gliceraldehído 3-fosfato y acetil-fosfato por medio de la fosfoacetolasa, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (Adenosina trifosfato), mientras que el acetil-fosfato acepta electrones del NADH (Nicotinamida adenina dinucleotido, forma reducida) que se ha generado durante la formación de xilulosa 5-fosfato, dando lugar directamente a etanol sin producir ATP “Vía de pentosas fosfatos o de las hexosas fosfatos” (Prescott y col., 1999).

A partir de las hexosas, las BAL heterofermentativas producen cantidades equimolares de ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ), ácido acético ( $C_2H_4O_2$ ), etanol ( $C_2H_6O$ ), y dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (Figura 3). Dentro de este grupo se clasifican todas las especies de *Leuconostoc*, *Weissella* y *Carnobacterium* así como algunos del género *Lactobacillus*. Las bacterias heterolácticas son más importantes que las homolácticas desde el punto de vista de la producción de los componentes de aroma y sabor, tales como el acetaldehído y el diacetilo (Casp y col., 1999; Lyhs y col., 2002).

**Cuadro 2.** Bacterias Ácido Lácticas Homofermentativas y Heterofermentativas  
(Jay y col., 2000)

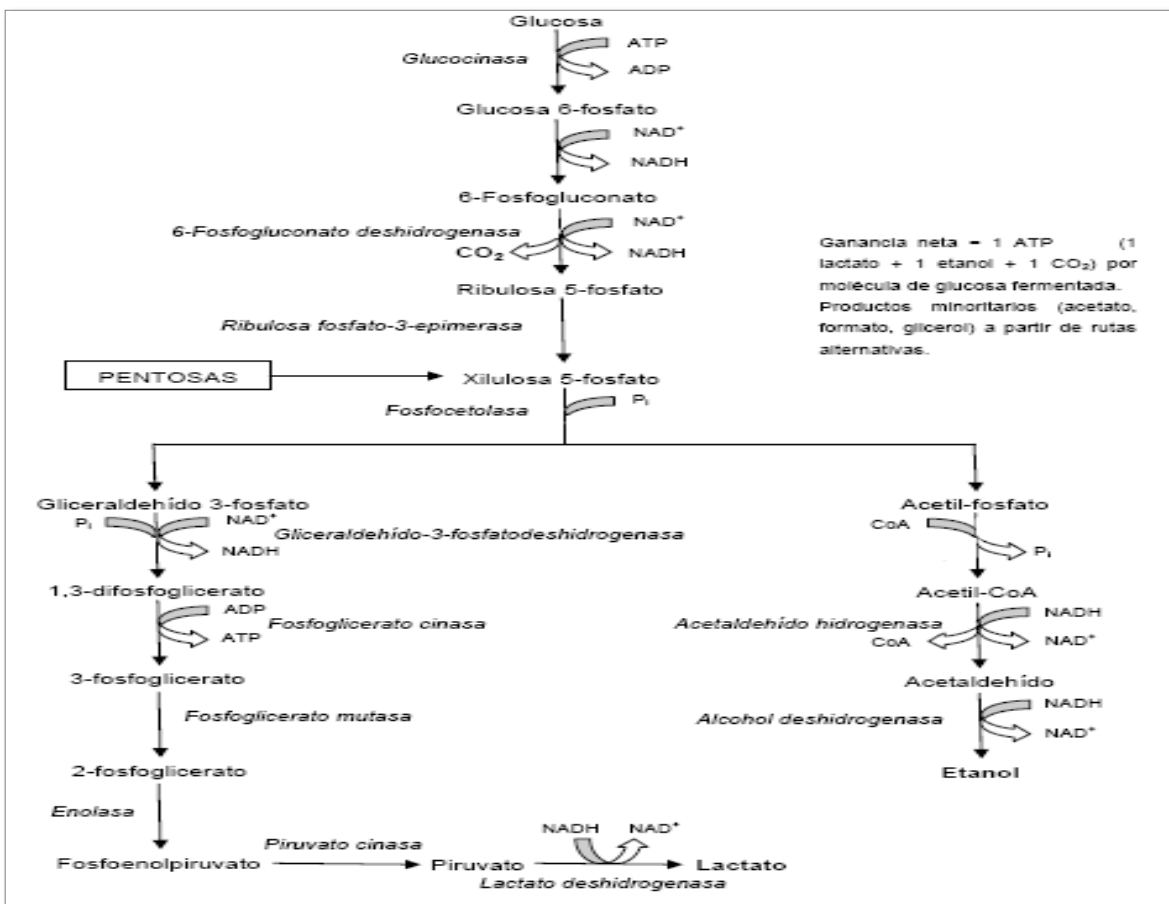
Homofermentativas		Heterofermentativas	
Organismos	Configuración lactato	Organismos	Configuración lactato
<i>Lb. acidophilus</i>	DL	<i>Lb. Brevis</i>	DL
<i>Lb. alimentarius</i>	L(D)	<i>Lb. Bucheneri</i>	DL
<i>Lb. bulgaricus</i>	D (-)	<i>Lb. Cellobiosus</i>	DL
<i>Lb. casei</i>	L(+)	<i>Lb. Coprophilus</i>	DL
<i>Lb. corynformis</i>	DL	<i>Lb. Fermentum</i>	DL
<i>Lb. curvatus</i>	DL	<i>Lb. Fructivorans</i>	DL
<i>Lb. delbrueckii</i>	D(-)	<i>Lb. Hilgardii</i>	DL
<i>Lb. helveticus</i>	DL	<i>Lb. Pontis</i>	DL
<i>Lb. jugurti</i>	DL	<i>Lb. Sanfrancisco</i>	DL
<i>Lb. jensenii</i>	D(-)	<i>Lb. Trichoides</i>	DL
<i>Lb. lactis</i>	D(-)	<i>Leuc. Cremoris</i>	D(-)
<i>Lb. leichmanii</i>	D(-)	<i>Leuc. Dextranicum</i>	D(-)
<i>Lb. plantarum</i>	DL	<i>Leuc. Lactis</i>	D(-)
<i>Lb. salivarius</i>	L(+)	<i>Leuc. mesenteroides</i>	D(-)
<i>P. acidilactici</i>	DL	<i>Leuc. Gelidum</i>	D(-)
<i>P. cerevisiae</i>	DL	<i>Leuc. Carnosum</i>	D(-)
<i>P. pentosaceus</i>	DL	<i>Leuc. mesenteroides</i> subesp. <i>Mesentorosis</i>	
<i>P. damnosus</i>		<i>Leuc, mesenteroides</i> subesp. <i>Cremoris</i>	

Nota: DL= 25 al 75% del ácido láctico es de la configuración L; D o L = el isómero registrado constituye hasta el 90% o más del ácido láctico; D(L); L(D) = el isómero entre paréntesis representada hasta el 15 – 20% del ácido láctico total.

En la naturaleza existen muchos géneros, pero los más representativos son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Prescott y col., 2000).

- **Heterofermentativas facultativas**

Utilizan la vía EMP o la vía de las pentosas fosfatos para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, ácido fórmico y etanol. Las bacterias heterofermentativas fermentan hexosas para producir ácido láctico por la vía de EMP o para etanol, ácido acético y ácido fórmico. Las pentosas son fermentadas para producir ácido láctico y ácido acético a partir de la vía del 6P-gluconato (Lyhs, 2002; Vandamme y col., 1996).



**Figura 3.** Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Axelsson y col., 2004)



### 3.3.3. Capacidad antimicrobiana de las BAL

Debido a que estas bacterias ejercen múltiples efectos benéficos en el organismo, es fácil comprender que su mecanismo de acción se establezca por vías muy distintas y a veces poco conocidas (Fuller y col., 1989). Dichos efectos pueden ser debidos a una acción antagónica frente a grupos de microorganismos específicos, a un efecto sobre su metabolismo o a un estímulo de la inmunidad.

Vázquez y col. (2008) demostraron que al realizar una fermentación con *Lactobacillus plantarum*, esta inhibe el crecimiento de hongos como *Fusarium*, debido a que dichas bacterias producen varios componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos patógenos.

Las BAL pueden producir sustancias que neutralicen los efectos adversos de un microorganismo al modificar su metabolismo, sin necesidad de destruirlo, pero sí disminuyendo su población, produciendo para ello metabolitos tales como: ácido láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, reutenina y sustancias tipo bacteriocina (Yingy col., 2007).

El efecto antimicrobiano de las BAL contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años. Metchnikof (1908) señaló que una flora nativa intestinal estable regula la toxemia crónica natural que tiene un papel primordial en el envejecimiento y muerte. Además de la competencia por sustratos, los sitios de colonización y los productos de la fermentación, resultan inhibitorios para muchos patógenos (Fernández y col., 2000). Esta característica se utiliza para la destrucción de bacterias indeseables o patógenas en la fabricación de los alimentos.

En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS (Generalmente reconocido como seguro), por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservadores están recibiendo una gran atención (Gould y col., 1996; Stiles y col., 1996).

Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las BAL son la competencia por nutrientes y la formación de ácidos láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH (Kandler y col., 1983; Daeschel y col., 1989; Lindgren y col., 1990).

### **3.3.3.1. Ácido láctico**

Este ácido ha tenido a lo largo de la historia utilidad 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 (Huertas y col., 2010).

Dentro de los microorganismos productores pueden citarse *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Bifidobacterium*, siendo el *Lactobacillus delbrueckii* el microorganismo más utilizado (Moreira y col., 2000).

Una importante función de las BAL es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico a una velocidad conveniente para asegurar una fermentación consistente y exitosa. El ácido láctico puede ser obtenido a través de la fermentación de la lactosa, lo cual genera un sabor ácido fresco en leches fermentadas, mejora el cuerpo y textura en los quesos e inhibe, en parte, el desarrollo de flora contaminante y patógena. Es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Ghasemim y col., 2009).

El ácido láctico es producido por la vía homofermentativa de las BAL como el principal metabolito a través de la vía EMP, puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Sin embargo, por la vía heterofermentativa se produce en pequeñas cantidades junto con el ácido acético, etanol y dióxido de carbono.

El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias. En la actividad antimicrobiana, los esteroisómeros del ácido láctico difieren, de forma que el ácido L-láctico es más inhibitorio que el isómero D-láctico (Ouwehand, 1993; Yang, 2000).

### **3.3.3.2 Bacteriocinas**

Las bacteriocinas se pueden definir como péptidos antimicrobianos, de síntesis ribosomal, producidos por bacterias Gram positivas o negativas, además de ser producidas por bacterias pueden ser generadas por plantas, animales u hongos. Algunas cualidades que presentan en común son: su pequeño peso molecular, su naturaleza anfipática o, en algunos casos hidrofóbica y su capacidad para interactuar con la membrana plasmática de las células sensibles (Criadoy col., 2006).

Las bacteriocinas son péptidos, estables al calentamiento y, con características antimicrobianas específicas. En general, las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas, tales como las BAL se diferencian de aquellas STB (sustancia tipo bacteriocina) producidas por las Gram negativas presentando un amplio espectro antimicrobiano que afecta incluso a géneros taxonómicos no relacionados (Taggy col., 1976; Jack y col., 1995; Nesy col., 2007). El extenso conocimiento sobre muchas de las bacteriocinas provenientes de las BAL, junto con el estatus de GRAS (Generalmente reconocido como seguro), del cual gozan las bacterias productoras, son cualidades a favor, para su empleo como conservadores biológicos para proteger los alimentos procesados (Muñoz, 2006).

Por otra parte, las bacteriocinas son consideradas como biopreservantes y son degradadas en el tracto gastrointestinal (Yingy col., 2007). Según lo señalado por Borquez (2000) exhiben una acción bactericida o bacteriostática contra algunas especies bacterianas. A continuación se mencionan algunas de las características de las bacteriocinas:

- Son producidas por bacterias clasificadas como GRAS (Generalmente reconocido como seguro), como las del género *Carnobacterium*, *Lactobacillus* entre otras.
- Son degradadas por enzimas proteolíticas a nivel del tracto gastrointestinal
- No son activas biológicamente frente a células eucarióticas.
- Presentan un amplio espectro y elevada actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos, además de actuar de forma sinérgica con otros sistemas de conservación.
- La mayoría de estas resisten tratamientos de conservación como: la pasteurización, la liofilización y la acidificación (Ying y col., 2007).

A pesar de la heterogeneidad de su tamaño molecular, las bacteriocinas producidas por las bacterias Gram positivas, presentan un peso molecular, que en algunos casos es menor a los 6 kDa, y varían en su espectro de acción antimicrobiana, propiedades bioquímicas, espectro de acción y organización genética. Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes que permiten agruparlas en tres clases principales (Zendoy col., 2005):

Clase I (antibióticos): Engloba bacteriocinas de pequeño peso molecular (menor a 5 kDa), son termoestables y contienen aminoácidos inusuales y modificados, como la deshidroalanina, la lantoina y la  $\beta$ -metil-lantionina. Según su estructura esta clase se divide en dos tipos:

- Tipo A: Péptidos formadores de poros y catiónicos cuyo prototipo es la nisina.
- Tipo B: Péptidos globulares inmunológicamente activos que actúa como inhibidores de enzimas.

Clase II: Comprende bacteriocinas de peso molecular menor de 10 kDa, termoestables, no presentan aminoácidos modificados y actúan a nivel de membrana citoplasmática. Esta clase se subdivide a su vez en cuatro subclases:

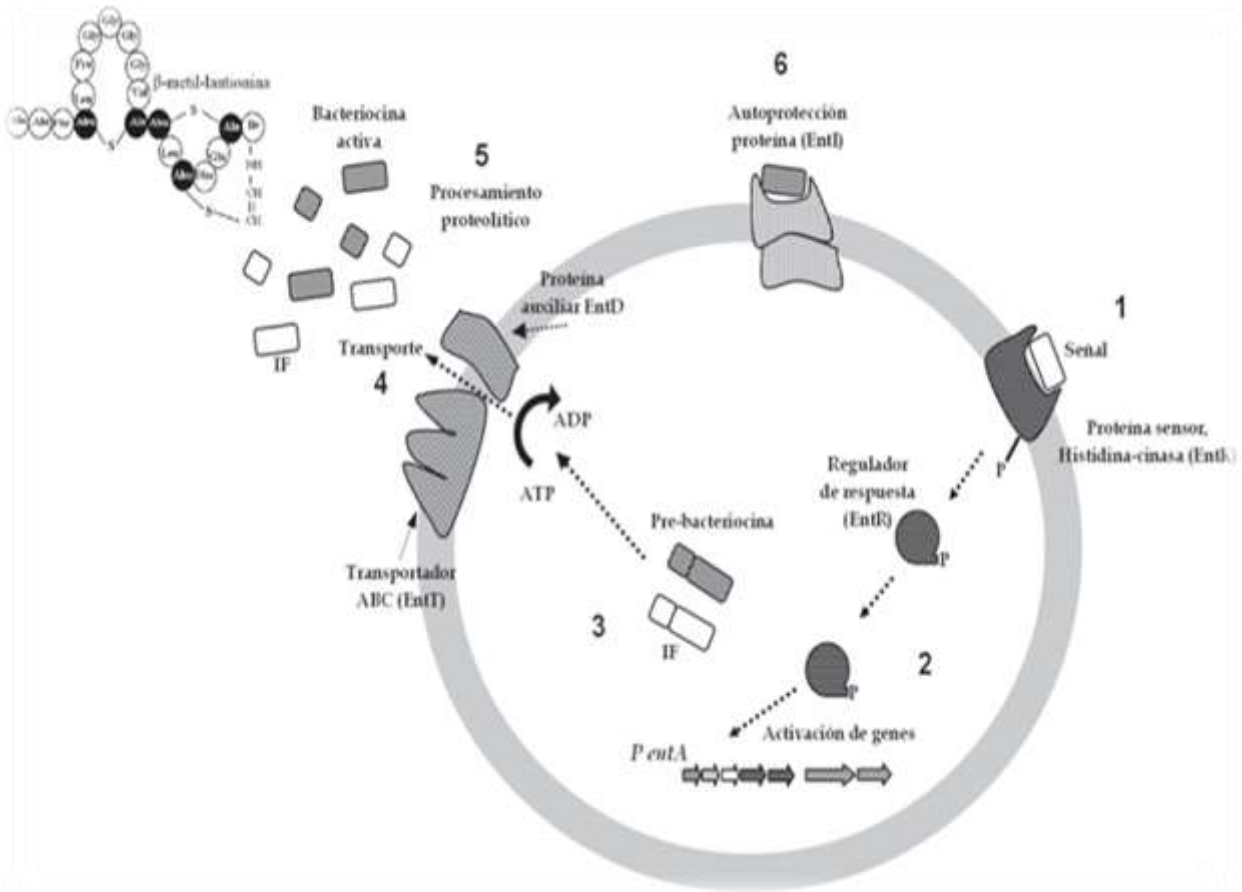
- Subclase IIa: Denominada como familia de la pediocina, comprende bacteriocinas con una fuerte acción antilisterial se encuentra constituida por varios géneros pertenecientes a las bacterias lácticas, como: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y también incluye al género *Enterococcus* (Ennahary col., 2000; Zendoy col., 2005; Cintasy col., 2001; Graveseny col., 2002).
- Subclase IIb: Comprende a aquellas bacteriocinas que requieren la combinación de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana en forma total y efectiva (Cintasy col., 2001).
- Subclase IIc: Compuesta por bacteriocinas secretadas mediante la Ruta General de Secreción (GSP-General Secretary Pathway) (Cintasy col., 2001).
- Subclase II d: Agrupa a aquellos péptidos de la clase II, que no se encuentran incluidos en ninguno de los grupos anteriores (Cintas y col., 2001).

Clase III: Constituida por bacteriocinas de alto peso molecular (mayor a 30kDa), también son termolábiles, pero se inactivan con tratamientos térmicos a temperaturas entre 60°C y 100°C durante un periodo de tiempo de 10 a 15 min. La mayoría de estas sustancias son producidas por especies del género *Lactobacillus* (Zendoy col., 2005).

Se ha estudiado la interacción de las bacteriocinas provenientes de las BAL con la membrana citoplasmática de la célula sensible mediante uniones electroestáticas entre el extremo C-Terminal de las bacteriocinas que poseen carga positiva, y los lípidos de la membrana que se encuentran cargados negativamente, observándose que la nisina, por ejemplo, requiere de un mínimo potencial de

membrana para poder insertarse en la membrana y así ejercer su acción. Por otra parte, existen otras bacteriocinas, que no requieren de un determinado nivel energético para su inserción en la membrana y posteriormente poder formar poros. En el caso de las enterocinas, éstas ejercen su función inhibitoria formando poros que permiten la permeabilidad de la membrana y favorecen la salida de  $K^+$ ,  $Na^+$  y otros compuestos de bajo peso molecular, disipando con esto su potencial de membrana y haciendo así a la célula inviable (Criado y col., 2006). Las bacterias productoras de bacteriocinas poseen proteínas que las protegen de la acción de sus propios péptidos (Figura. 4)

La protección puede ser proporcionada por una proteína específica que secuestra e inactiva a la bacteriocina, o bien se une al receptor de la bacteriocina cambiando su estructura conformacional (López y col., 2008).



**Figura 4.** Producción de bacteriocinas (López y col., 2008)

### 3.3.4. Resistencia al tránsito gastrointestinal

El tracto gastrointestinal es un importante órgano para la defensa del hospedador frente a microorganismos potencialmente patógenos. Después de la ingestión, los probióticos producen beneficios terapéuticos al colonizar el intestino en las cantidades suficientes y necesarias para conferir dichos beneficios. Sin embargo, para que se lleve a cabo ese proceso, los microorganismos deben tolerar dos barreras biológicas importantes: la acidez del estómago y los jugos biliares secretados en el duodeno.

Los microorganismos probióticos a su paso a través del tránsito gastrointestinal deben de resistir la acidez estomacal y la presencia de enzimas gástricas y pancreáticas, así como las sales biliares intestinales que presentan una importante actividad antibacteriana. Estas cualidades pueden evaluarse mediante sencillos ensayos *in vitro* o mediante modelos más complejos en los que se simule el proceso dinámico de la digestión (Marteau y col., 1997).

Para ser caracterizados como probióticos los microorganismos deben ser sometidos a pruebas de resistencia frente a ácidos. Estas pruebas son imprescindibles ya que las respuestas varían de una especie a otra. El pH del estómago es de 1.5 y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estómago es de 90 minutos.

Por lo que, según Chou y Weimer, en su trabajo publicado en 1999, las pruebas de resistencia *in vitro* deben verificar que las BAL son capaces de resistir ese tiempo y pH sin perder viabilidad. Varios estudios han demostrado que la matriz de alimentos consumidos juntamente con los probióticos puede tener un efecto protector frente a los ácidos del estómago (González Rivas y col., 2006).

La supervivencia y persistencia de los probióticos en el intestino depende en gran medida de los mecanismos de exclusión competitiva que posean las cepas y que incluyen entre otros la capacidad de adhesión al epitelio intestinal y la actividad antimicrobiana.

Una vez que el microorganismo ha llegado a su destino tiene que ser capaz de adherirse a las células de la mucosa intestinal y evitar ser eliminado por las secreciones y los movimientos peristálticos. Los mecanismos que intervienen en los procesos de adherencia no están del todo clarificados y parecen ser diversos. Exopolisacáridos, proteínas y ácidos lipoteicoicos de la superficie celular son algunos de los factores que podrían participar en la adhesión (Granato y col., 1999; Roos y col., 2002; Pridmore y col., 2004).

### **3.3.5. Disminución del colesterol**

El consumo diario de alimentos probióticos reduce los niveles de colesterol sérico hasta en un 3%, valor significativo para la prevención de la hipercolesterolemia, factor de riesgo de enfermedad cardiovascular y causal de mortalidad. Algunas especies del género *Lactobacillus*, utilizadas en la industria alimentaria como probiótico, reducen el colesterol sérico por dos mecanismos, la adsorción de colesterol y producción de la enzima hidrolasa de sales biliares. La sobrevivencia de las BAL cuando pasan por el tracto gastrointestinal es una característica imprescindible (Cueto y col., 2012).

Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de moléculas de colesterol y secretados como sus conjugados con glicina o taurina en el intestino delgado, en donde emulsionan grasas y vitaminas liposolubles facilitando su absorción. En humanos hay dos sales biliares principales, el ácido cólico (CA) y el ácido quenodeoxicólico (CDCA) y tres secundarias, ácido deoxicólico (DCA), ácido litocólico (LCA) y ácido deursodeoxicólico (UDCA), con sus respectivas glicinas y taurinas conjugadas, estas quince sales biliares están también presentes en las ratas (Ando y col., 2006).

Una vez que cumplen su función digestiva, aproximadamente el 95% de las sales biliares regresan al hígado para su reutilización varias veces al día cumpliendo un ciclo enterohepático, el 5% restante son eliminados por acción de los microorganismos de la microbiota intestinal al sufrir deshidroxilación a ácidos



biliares secundarios ó desconjugación de la glicina o de la taurina, perdiendo su acción emulsificante de las grasas, precipitando y siendo eliminadas por las heces. El hígado responde a esa pérdida de sales biliares con un aumento de la síntesis a partir de colesterol endógeno, favoreciendo la disminución de los niveles de colesterol en el organismo.

La desconjugación de las sales biliares es catalizada por las enzimas hidrolasas de sales biliares (HSB), las cuales han sido detectadas en bacterias intestinales como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Enterococcus* (Begley y col., 2006).

La función de las hidrolasas de sales biliares en las bacterias intestinales no es aún bien conocida, pero se cree que al desconjugar las sales biliares, las bacterias pueden aprovechar los aminoácidos liberados como fuente de carbono, nitrógeno y energía.

Otras funciones adscritas a las HSB (hidrolasas de sales biliares) están relacionadas con la modificación de la superficie celular bacteriana, al facilitar por ejemplo, la incorporación del colesterol en la membrana, lo cual potencialmente podría aumentar la resistencia a la lisis bacteriana y favorecer su persistencia en el intestino (Dambekodi y col., 1998). Sin embargo, el mecanismo exacto por el que las HSB juegan un papel en la tolerancia a la bilis, no está todavía esclarecido y otros factores podrían intervenir.

Se han realizado algunos estudios de cepas bacterianas con potencial reductor de colesterol y se han conocido algunos mecanismos que logran esta reducción como son la desconjugación de las sales biliares por acción de la enzima hidrolasa (BSH) (E.C. 3.5.1.24) activa en muchas especies de BAL (Lye y col., 2010) y la absorción del colesterol en el lumen intestinal. La adsorción de colesterol incrementa su demanda para la síntesis de nuevos ácidos biliares o por reducción de la solubilidad del colesterol. Algunos autores han reportado la capacidad de las

bacterias de incorporar a la membrana o adherir colesterol a la superficie, reduciendo la disponibilidad para su absorción intestinal y posterior pase a la sangre (Belviso y col., 2009).

Para que los microorganismos probióticos tengan efecto sobre la salud del hospedador deben de ser capaces de alcanzar, sobrevivir e implantarse o mantenerse viables durante un cierto tiempo en el intestino. Los criterios funcionales hacen referencia a las propiedades biológicas y a las características de probiósis de las cepas e incluyen aspectos de resistencia al tránsito gastrointestinal y supervivencia en el lugar de acción.

### **3.3.6. Producción de exopolisacáridos (EPS's)**

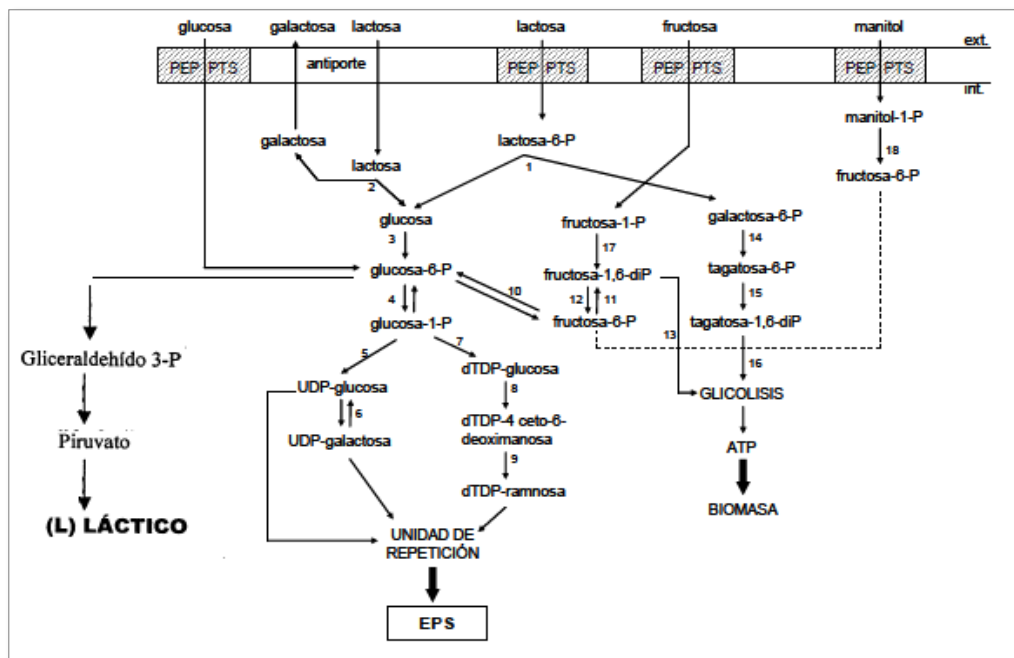
Algunas bacterias lácticas tienen la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares (EPSs). Polisacáridos de cadena larga consistentes de ramificaciones de unidades repetidas de azúcares. Estas unidades de azúcar son principalmente, glucosa, galactosa y ramnosa en diferentes proporciones.

Como las BAL son GRAS (generalmente reconocido como seguro), son candidatas para la producción segura 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 (Figura. 5), dependiendo también de las condiciones de cultivo y composición del medio.

Los polisacáridos 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 glucónilico (Huertas y col., 2010)

Los exopolisacáridos (EPS) desempeñan un papel industrial en la producción de derivados lácteos fermentados, además, los EPS han sido utilizados ampliamente como geles, emulsificantes y suspensiones de estabilizantes; otro beneficio fisiológico incluye la colonización gastrointestinal de bacterias probióticas incrementando la residencia de los EPS en el tracto gastrointestinal.

Los EPS producidos por BAL han sido estudiados al tener efectos anti-tumor, anti-úlceras, efectos inmuno-estimulatorios, disminución de niveles de colesterol en la sangre (Tavaria, 2002; Vuyst, 2003).



**Figura 5.** Producción de ácido láctico y EPS (Reddy y col., 2008, Zourari y col., 1991)

### 3.3.7. Capacidad de degradación de azúcares

El método más rápido que permite la identificación de *Lactobacillus* a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas, es el Kit API 50 CH Y API WEB; que consiste en un dispositivo con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados de acuerdo a la prueba de fermentación de carbohidratos.

Cada test API 50 CH consta de cincuenta recipientes que contienen una zona anaerobia (la porción en forma de tubo) para el estudio de fermentación, y una zona aerobia (la porción en forma de cúpula) para el estudio de oxidación o asimilación.

El primer recipiente no contiene ningún sustrato y se usa como control negativo. El resto de recipientes contienen una cantidad determinada de sustrato deshidratado, pertenecientes a la familia de hidratos de carbono y sus derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). Cuadro 3.

Estos sustratos pueden ser metabolizados mediante diferentes rutas bioquímicas:

- Asimilación: se indica por el crecimiento del microorganismo en la cúpula cuando el sustrato es la única fuente de carbono presente.
- Oxidación: se muestra por un cambio de color en la cúpula, y es debido a la producción aerobia de ácido detectado por el indicador de pH incluido en el medio elegido.
- Fermentación: se muestra por un cambio de color en el tubo, y es debido a la producción anaerobia de ácido detectado por el indicador de pH incluido en el medio elegido.

**Cuadro 3.-** Substratos incluidos en cada uno de los 50 recipientes de la galería enzimática para bacterias ácido-lácticas API 50 CH. (Ruiz, 2012)

Tira 0-9	Tira 10-19	Tira 20-29	Tira 30-39	Tira 40-49
<b>Pocillo/substrato</b>	<b>Pocillo/substrato</b>	<b>Pocillo/substrato</b>	<b>Pocillo/substrato</b>	<b>Pocillo/substrato</b>
0. CONTROL*	10. <b>GALactosa</b>	20. 1- <b>Metil-D-Manopiranosida</b>	30. <b>MELibiosa</b>	40. <b>D-TURanosa</b>
1. <b>GLYcerol</b>	11. <b>GLUcosa</b>	21. 1- <b>Methyl-D-Glucopiranosida</b>	31. <b>SACarosa</b>	41. <b>D-LYXosa</b>
2. <b>ERYtritol</b>	12. <b>FRUctosa</b>	22. <b>N-Acetil-Glucosamina</b>	32. <b>TREhalosa</b>	42. <b>D-TAGatosa</b>
3. <b>D-ARAbinosa</b>	13. <b>MamNosE</b>	23. <b>AMYgdalina</b>	33. <b>INUlina</b>	43. <b>D-FUCosa</b>
4. <b>L-ARAbinosa</b>	14. <b>SorBosE</b>	24. <b>ARButina</b>	34. <b>MeLeZitosa</b>	44. <b>L-FUCosa</b>
5. <b>RIBosa</b>	15. <b>RHAMnosa</b>	25. <b>ESCuлина citrato férrico</b>	35. <b>RAFfinosa</b>	45. <b>D-ARabitol</b>
6. <b>D-XYLosa</b>	16. <b>DULcitol</b>	26. <b>SALicina</b>	36. <b>AIMiDón</b>	46. <b>L-ARabitol</b>
7. <b>L-XYLosa</b>	17. <b>INOsitol</b>	27. <b>CELIobiosa</b>	37. <b>GLYcóGeno</b>	47. <b>GlucONaTo potásico</b>
8. <b>ADOnitol</b>	18. <b>MANitol</b>	28. <b>MALtosa</b>	38. <b>XiLiTol</b>	48. <b>2-Keto-Gluconato potásico</b>
9. <b>Metil-βD-Xylopiranosida</b>	19. <b>SORbitol</b>	29. <b>LACtosa</b>	39. <b>GENtiobiosa</b>	49. <b>5-Keto-Gluconato potásico</b>

Nota: En la práctica, sólo se usan las abreviaturas en mayúsculas de los respectivos carbohidratos.

Para la interpretación de los resultados, los recipientes que aparecen sin cambio de color (púrpura) se consideran como “negativos” y aquellos dónde se detecte un cambio de color (amarillo, ó negro en el recipiente nº 25) (de acuerdo con el color del control) se considera “positivo” (Figura 6).



**Figura 6.-**Pruebas de interpretación para el kit API 50 CH (APIWEB, 2010)



4

# METODOLOGÍA

#### **4.1. Cinéticas de crecimiento**

Cada una de las 24 cepas de BAL fue cultivada a 37°C y 80 rpm en caldo MRS durante 33 horas. La evaluación del crecimiento microbiano se realizó mediante la densidad óptica a una longitud de 620 nm y cuenta viable por vaciado en placa empleando agar MRS, ambas evaluaciones se realizaron por triplicado cada 3 horas. La información generada fue empleada para identificar las fases de crecimiento, evaluar la velocidad de crecimiento específico ( $\mu_{\max}$ ), tiempos de duplicación ( $T_d$ ) y biomasa máxima ( $X_{\max}$ ), alcanzada por cada cepa.

#### **4.2. Supervivencia de las BAL bajo condiciones gastrointestinales simuladas**

Las BAL que son capaces de crecer a concentraciones de  $10^9$  UFC/mL y con tiempos de duplicaciones cortos (1.2-1.8 h) en caldo MRS, fueron sometidas a la simulación gastrointestinal. La tolerancia de las BAL a las condiciones ácidas del estómago se determinó mediante la exposición sucesiva de cada uno de los microorganismos a un pH de 1.9 durante una hora y la simulación en el intestino delgado se realizó a un pH de 7.5 durante seis horas. Los jugos gástricos se prepararon disolviendo 0.26 g/L de pepsina (Matheson Coleman y Bell Manufacturing Chemists, USA) en agua destilada estéril ajustado el pH a 1.9. Los jugos intestinales consistieron en una solución de pancreatina y una solución de sales biliares. La solución de pancreatina se preparó disolviendo pancreatina 4X (Páncreas porcina, P-1500, SIGMA-ALDRICH) en buffer de fosfato de sodio estéril (0.02 M, pH 7.5) para lograr una concentración final de 1.95 g/L.

La solución de sales biliares (3 g/L) fue preparada disolviendo polvo de extracto de sales biliares (Bilis bovina, B3883, SIGMA-ALDRICH) en agua destilada.

La suspensión resultante se esterilizó por filtración a través de una membrana (0.45  $\mu\text{m}$ , Millipore). Todas las soluciones fueron preparadas al momento de realizar la simulación.



Para la simulación se empleó aproximadamente 1 g de células de cada una de las BAL obtenidas a partir de 150 mL de cultivo fresco en caldo MRS (DIBICO). Los cultivos fueron centrifugados en tubos falcón a 3510 rpm por 15 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 2 mL de solución salina al 0.9% (p/v) utilizando las mismas condiciones de centrifugación y se suspendieron en una probeta con 9 mL de jugos gástricos que contenía una solución de pepsina (0.318 g/L, pH 1.9), y se determinó el número de células viables por mL al inicio de la prueba. La suspensión de células se mantuvo a 37°C en baño maría y en agitación. Después de un periodo de incubación de 1 h, el pH se incrementó a 7.5 con una solución de NaOH (1 N) y se retiró una muestra de 1 mL para determinar el número de células viables. Posteriormente se adicionaron 1.2 mL de solución de buffer de fosfato de sodio (0.25 M, pH 7.5) y 2 mL de solución de sales biliares. Se ajustó el pH a 7.5 y el volumen a 14 mL con agua destilada estéril.

Finalmente se adicionó 1 mL de solución de pancreatina, obteniendo un volumen final de 15 mL. Después de un periodo de incubación de 6 h, se retiró una muestra de 1 mL para determinar el número de células viables. La viabilidad de las células se determinó mediante la siembra en superficie de agar MRS (DIBICO), (Picot y col., 2004).

El porcentaje de supervivencia fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$(\%) = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \times 100$$

Donde  $N_1$  representa el total de células viables después de los tratamientos y  $N_0$  representa el número inicial de BAL inoculadas.

### **4.3. Cuantificación de ácido láctico, ácido acético y glucosa residual**

Los productos de la fermentación (ácido láctico y ácido acético) y la glucosa residual se determinaron usando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Perkin Elmer, series 200) conectado a un detector de IR (PerkinElmer, series 200a). Se utilizaron los caldos obtenidos al final del periodo de incubación descrito en la sección 4.1.

Las muestras se centrifugaron (Centrifuga eppendorf, 5810 R) a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se diluyó cinco veces y se filtró a través de una membrana (0.22 µm, Millipore). Para la cuantificación se utilizó una columna Hi-Plex Ca (300 x 7.7 mm) (Agilent Technologies, Alemania) mantenida a 85°C. Se trabajó en condiciones isocráticas a un flujo de 0.3mL/min, utilizando como fase móvil agua tridestilada y con un volumen de inyección de 10 µL. Las soluciones estándar de los productos de fermentación fueron preparados en agua tridestilada para conocer los tiempos de elusión y las curvas de calibración. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado (Stephenie y col., 2007).

### **4.4. Determinación de exopolisacáridos**

#### **4.4.1 Tratamiento químico para superficies celulares**

Para confirmar la naturaleza polisacárida del polímero se realizó un tratamiento químico previo. Se utilizaron muestras de 10 mL de cultivo (obtenido como se describe en el apartado 4.1), se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, el sedimento obtenido se lavó con solución Ringer ¼ (cloruro de sodio 0.85%; cloruro de potasio 0.04%; cloruro de calcio dihidrato 0.034%), se retiró el sobrenadante y se re-suspendió en 5 mL de NaOH (0.05 M) a 20 °C y se incubó durante 30 minutos. Por último, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min para observar la pérdida o no de la mucosidad del precipitado celular (Forde y col., 1999).

#### **4.4.2 Extracción y purificación de EPS's**

Para liberar el EPS unido a la pared celular, se emplearon muestras de 10 mL de cultivo (obtenido como se describe en el apartado 4.1.), se sometieron a sonicación a 30 W durante 5 minutos con pulsos de 1 segundo a 10°C. Posteriormente, los cultivos se trataron con 3 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 70% durante 30 min en agitación; se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, y se decantó (eliminación de proteínas y células). El EPS del sobrenadante se precipitó mediante la adición de 20 mL de etanol, seguida de incubación a 4°C durante una noche. Después se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min, se retiró el sobrenadante y al pellet conteniendo el EPS se re-suspendió en 1 mL de agua destilada y se dializó utilizando membranas de diálisis con un tamaño de poro de 12000 Da (Sigma) frente a 5 L de agua destilada a 4°C durante 48 h, con cuatro cambios de agua. Las muestras con el EPS purificado se congelaron a -20°C hasta su cuantificación (Tallon y col., 2003).

#### **4.4.3 Cuantificación de EPS's**

Para la cuantificación de EPS se empleó la técnica colorimétrica de fenol-sulfúrico. Para ello, se empleó 1 mL de solución de EPS, 0.5 mL de fenol y 2.5 mL de ácido sulfúrico, se agitó en vórtex durante 5 s, se dejó reposar durante 10 minutos y posteriormente se incubó durante 15 min a 30°C. Para calcular la concentración de EPS se midió la absorbancia a 490 nm frente a una curva de calibrado con glucosa, restando la absorbancia originada por el medio de cultivo sin inocular purificado del mismo modo que los cultivos (Dubois y col., 1956).

#### **4.5. Disociación del taurocolato de sodio (sal biliar)**

Se utilizó 8 mL de caldo MRS suplementado con 2 mL de taurocolato de sodio (30 mM) disuelto en agua, obteniendo una concentración de 6 mM. La concentración de sal biliar utilizada se asemeja a las concentraciones existentes en el intestino delgado humano (Brashears y col., 1998). El método es una adaptación del descrito por Liong y Shah, (2005). Se basa en medir la cantidad de ácido cólico liberado por cada BAL a partir de la desconjugación del taurocolato de sodio.

Las BAL estresadas en la simulación gastrointestinal (como se describe en el apartado 4.2.), se recuperaron mediante centrifugación de 10 mL de la suspensión celular en tubos falcón a 3950 rpm por 15 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 2 mL de solución salina al 0.9% (p/v) y se inocularon en 10 mL de caldo MRS suplementado con 6 mM de taurocolato de sodio, se incubaron a 35°C por 20 h. Después del período de incubación el cultivo se ajustó a pH 7.0 con NaOH (1 N). Las células se centrifugaron a 10000 rpm (Centrifuga eppendorf, 5810 R) a 4 ° C durante 10 min. El sobrenadante obtenido se ajustó a pH 1.0 con HCl (10 N). Un mililitro del sobrenadante se adicionó con 2 mL de acetato de etilo en un tubo limpio y se mezclaron con un vortex durante 1 min. Los 2 mL de la capa de acetato de etilo se transfirieron a un tubo de vidrio y se evaporó a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en 1 mL de NaOH (0.01 N) con la ayuda de un vortex durante 1 min. Después se adicionó 1 mL de furfuraldehído (1%) y 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (16 N), la mezcla se agitó con un vórtex durante 1 min antes de calentar a 65 ° C en un baño de agua durante 10 min. Después de enfriar en un baño de hielo durante 1 min, se adicionaron 2 mL de ácido acético glacial y la mezcla se agitó en un vórtex durante 1 min. Finalmente se leyó la absorbancia a 660 nm (DO<sub>660</sub>) (Beckman coulter, DU 73). La cantidad de ácido cólico liberado se determinó usando una curva estándar de ácido cólico. Todos los experimentos se repitieron tres veces.

#### **4.6. Degradación de azúcares**

Para conocer la habilidad de las BAL para fermentar diferentes carbohidratos se utilizó un sistema API 50 (bioMérieux) que contiene 49 carbohidratos diferentes, la prueba se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Nigatu (2000). Se empleó 10 mL de cultivo de un periodo de incubación de 20 h. Los cultivos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos, se lavaron dos veces con una solución de NaCl al 0.9% (p/v) y las células obtenidas se suspendieron en el medio API CHL (bioMérieux), el cual se depositó en los microtubos de API 50 CH (bioMérieux). La superficie de los microtubos se cubrió con aceite parafina estéril (Merck) para crear las condiciones de anaerobiosis. El API 50 CH se mantuvo dentro de una cámara humedad y se incubó a 30 °C como lo recomienda el fabricante. Se realizaron dos lecturas de los cambios de color de violeta a amarillo a las 24 y 48 h, respectivamente.



5

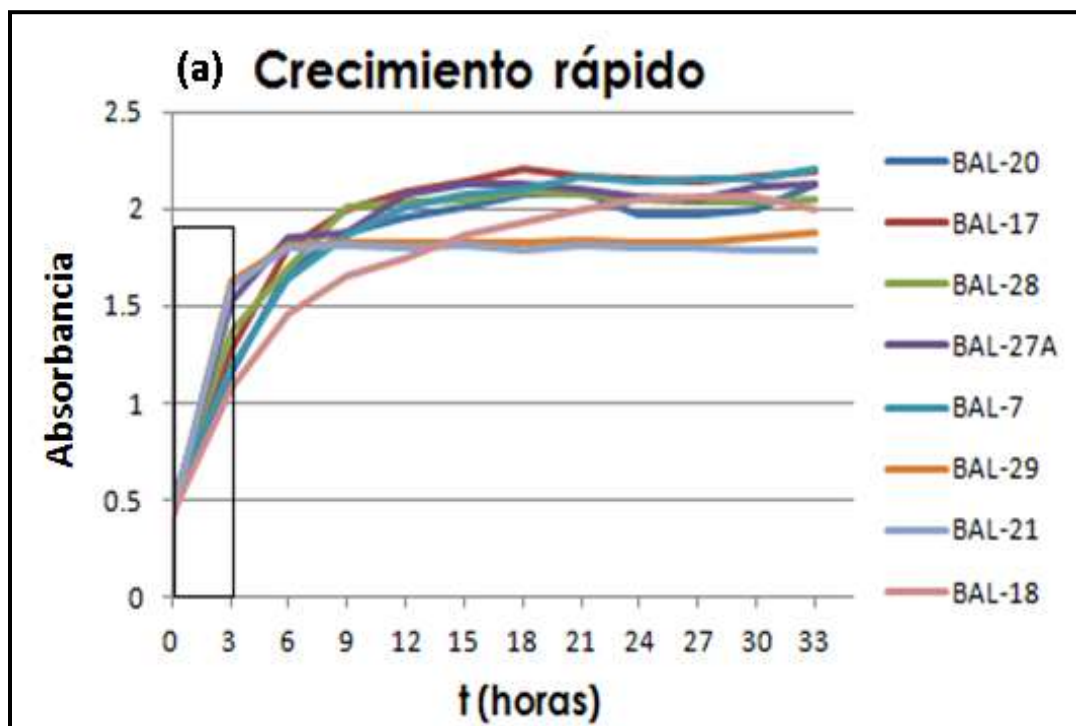
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

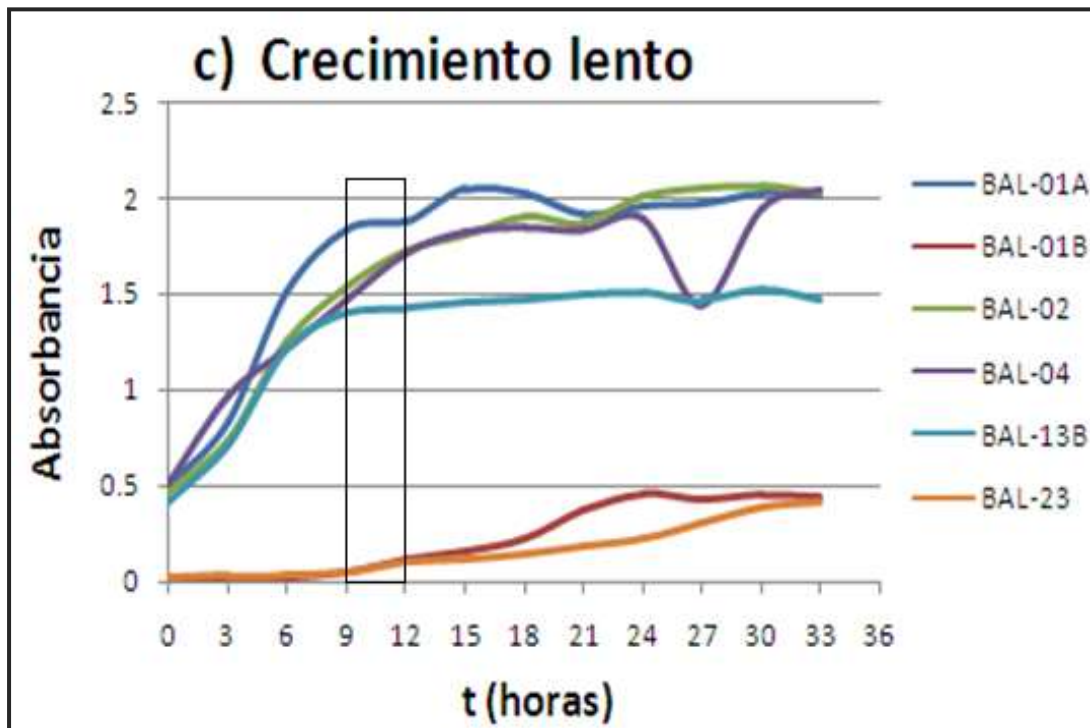
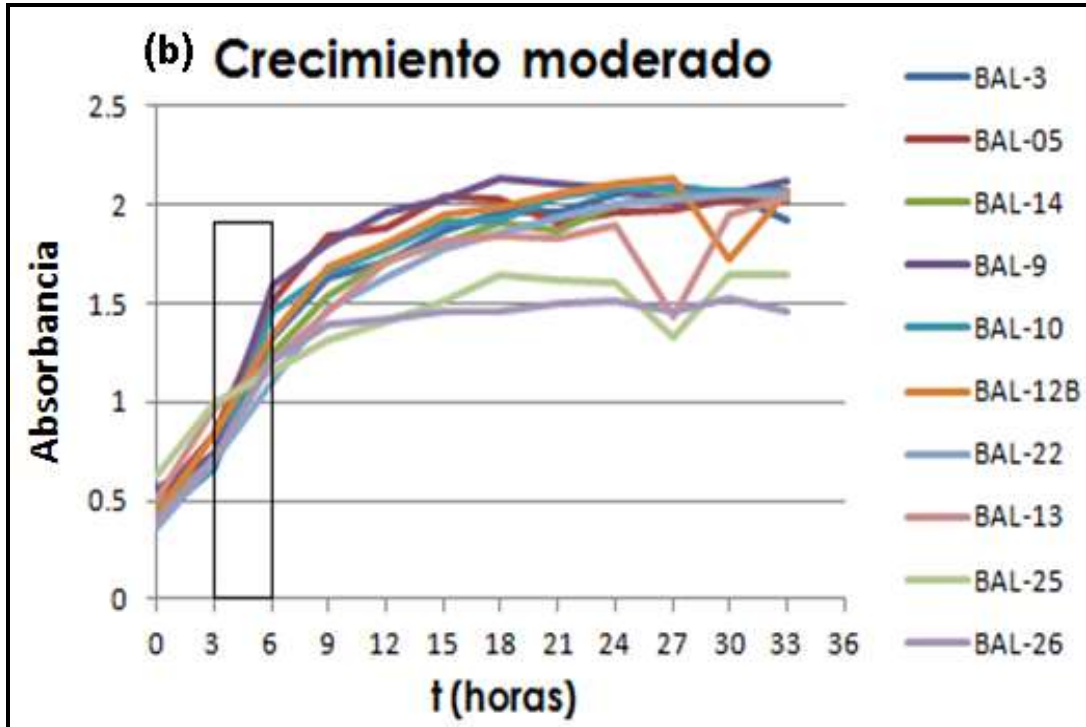
## 5.1. Cinética de crecimiento

De acuerdo a los resultados obtenidos de las 24 cinéticas de crecimientos de las BAL, se seleccionaron 18 BAL que presentaron un rápido ó moderado crecimiento. Como puede observarse en la figura 7, 8 bacterias ácido lácticas mostraron crecimiento rápido, 10 mostraron crecimiento moderado y 6 mostraron crecimiento lento. La mayoría de las BAL presentaron una fase exponencial que duró entre 3 y 6 horas.

Las 18 cepas seleccionadas fueron aquellas que mostraron máxima producción de biomasa a las 18 horas alcanzando una población superior a  $10^9$  UFC/mL, como se observa en el cuadro 4.

La FAO/OMS en el 2002, recomienda que los probióticos deben tener una concentración mínima de  $10^6$  UFC/mL (Lin y col., 2006), después de haber pasado por el tránsito gastrointestinal, por lo que para asegurar esa concentración es recomendable disponer de cultivos celulares con concentraciones superiores.





**Figura 7.** Cinéticas de crecimiento. (a) crecimiento rápido, (b) crecimiento moderado y (c) crecimiento lento



**Cuadro 4.** Parámetros cinéticos de crecimiento de BAL

N.C.	CEPA	X <sub>max</sub> (ufc/mL)	Td (h <sup>-1</sup> )
1	BAL- 03	1.9x10 <sup>9</sup> ± 0.03	1.49 ± 0.10
2	BAL -05	1.72x10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
3	BAL-07	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
4	BAL-09	1.83x10 <sup>9</sup> ± 0.03	1.49 ± 0.10
5	BAL-10	2.46x10 <sup>9</sup> ± 0.03	1.49 ± 0.10
6	BAL-12B	3.12x10 <sup>9</sup> ± 0.03	1.49 ± 0.10
7	BAL-13A	2.62X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
8	BAL-14	1.75X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
9	BAL-17	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
10	BAL-18	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
11	BAL-20	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
12	BAL-21	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
13	BAL-22	1.9X10 <sup>9</sup> ± 0.03	1.49 ± 0.10
14	BAL-25	1.78x10 <sup>9</sup> ± 0.03	1.49 ± 0.10
15	BAL-26	2.13X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
16	BAL-27A	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
17	BAL-28	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
18	BAL-29	2.28X10 <sup>9</sup> ± 0.01	1.16 ± 0.04
19	BAL- 01A	1.31x10 <sup>5</sup> ± 0.02	8.25± 1.53
20	BAL- 01B	1.31x10 <sup>5</sup> ± 0.02	8.25 ± 1.53
21	BAL- 02	1.31x10 <sup>5</sup> ± 0.02	8.25 ± 1.53
22	BAL- 04	1.31x10 <sup>5</sup> ± 0.02	8.25 ± 1.53
23	BAL- 13B	1.31X10 <sup>5</sup> ± 0.02	8.25 ± 1.53
24	BAL- 23	1.31X10 <sup>5</sup> ± 0.02	8.25 ± 1.53

Otra de las cualidades importantes son los resultados de tiempo de duplicación que, son los periodos que requiere una célula para duplicar su número. En nuestro caso, los tiempos obtenidos fueron de 1.16 a 1.49 h, tiempo adecuado, comparándolo con los resultados reportados por Agudelo y col. (2010) quienes obtuvieron 1.28 h de tiempo de duplicación para *L. plantarum* A6.

Giraud y col. en 1994 reportaron que la bacteria *L. plantarum* A6 obtuvo un tiempo de duplicación de 1.1 h en un medio de almidón, mientras que otros autores como Rao en el 2004 han obtenido un tiempo de duplicación de 1.98h.

Los tiempos cortos de replicación obtenidos, demuestran que estas BAL podrán ser capaces de colonizar el intestino de manera rápida, siendo esta una aptitud probiótico importante para un estudio in vivo posterior.

En cuanto a las concentraciones de  $X_{max}$  se observa que siete cepas tiene una cantidad mayor de  $1.9 \times 10^9$  UFC/mL, y se asemejan a los reportados por Martínez y col. (2009) quienes obtuvieron una concentración de  $1.01 \times 10^9$  UFC/mL durante el crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. lactis* 166cVCOR. Así mismo, nuestros resultados son elevados al compararlos con los reportados por Alvarado y col. (2009) quienes consideraron una biomasa entre  $1.0 \times 10^7$  y  $1.0 \times 10^8$  UFC/mL adecuado, para realizar la evaluación de potencial probiótico *in vitro*, por ser la cantidad promedio de bacterias probióticas recomendable que deben consumirse para lograr los efectos benéficos. Marteau y col. (2003) confirman que la concentración de probióticos viables que se considera que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es  $\geq 10^6$  UFC/mL en el intestino delgado y  $\geq 10^8$  UFC/g en el colon siendo esta cantidad recomendable.

## 5.2. Cuantificación de la supervivencia de las BAL bajo condiciones gastrointestinales simuladas

Se evaluaron 18 cepas, 16 sobrevivieron a las exposiciones propuestas. A pH 1.9 hubo una disminución en promedio de 3.6 ciclos logarítmicos y en medio adicionado con 0.3% de sales biliares, de 4.2 ciclos logarítmicos, partiendo de un recuento inicial de 10.0 log UFC/mL.

Del análisis de resistencia a pH 1.9 y tolerancia a sales biliares (0.3%), condiciones que afectan la supervivencia bacteriana durante su paso a través de un modelo *in vitro* del tracto gastrointestinal durante una hora aproximadamente, tiempo que tarda la comida en atravesar el sistema (Urbanska y col., 2007), se observó que el 61.11% de las cepas estudiadas fueron capaces de sobrevivir a las condiciones propuestas en el estudio (Cuadro 5). Cueto y col., (2012) reportaron en su estudio que el 48.6% de cepas de *Lactobacillus* estudiadas fueron capaces de sobrevivir a las mismas condiciones propuestas en este estudio.

Se indica al respecto que las diferencias en la tolerancia al tránsito gastrointestinal pueden deberse a las diferencias existentes en la estructura de la pared celular de las distintas especies y géneros bacterianos (Prasad y col., 1998).

**Cuadro 5.** Supervivencia de BAL después de la simulación gástrica.

CEPA	Ciclos log a 0 h (Control)	Ciclos log a 1 h (pH 1.9)	Ciclos log a 6 h (pH 7.5)	%Supervivencia
BAL 03	10.26 ± 0.08 <sup>ab</sup>	8.46 ± 0.13 <sup>de</sup>	8.37 ± 0.02 <sup>c</sup>	81.59
BAL 05	10.21 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>n</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>k</sup>	0.00
BAL 07	10.22 ± 0.04 <sup>ab</sup>	7.47 ± 0.03 <sup>g</sup>	6.54 ± 0.04 <sup>g</sup>	64.00
BAL 09	10.30 ± 0.11 <sup>ab</sup>	6.95 ± 0.06 <sup>i</sup>	7.04 ± 0.12 <sup>e</sup>	68.36
BAL 10	10.22 ± 0.06 <sup>ab</sup>	7.71 ± 0.04 <sup>f</sup>	6.48 ± 0.04 <sup>g</sup>	63.45
BAL 12B	10.30 ± 0.12 <sup>ab</sup>	8.52 ± 0.03 <sup>d</sup>	6.78 ± 0.04 <sup>f</sup>	65.81
BAL 13A	10.29 ± 0.11 <sup>ab</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>n</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>k</sup>	0.00
BAL 14	10.35 ± 0.13 <sup>ab</sup>	6.71 ± 0.04 <sup>j</sup>	6.09 ± 0.04 <sup>hi</sup>	58.83
BAL 17	10.22 ± 0.04 <sup>ab</sup>	5.77 ± 0.13 <sup>i</sup>	5.24 ± 0.19 <sup>i</sup>	51.28
BAL 18	10.27 ± 0.07 <sup>ab</sup>	5.32 ± 0.17 <sup>m</sup>	4.89 ± 0.28 <sup>j</sup>	47.59
BAL 20	10.31 ± 0.10 <sup>ab</sup>	6.10 ± 0.09 <sup>k</sup>	6.12 ± 0.08 <sup>h</sup>	59.36
BAL 21	10.37 ± 0.14 <sup>a</sup>	6.76 ± 0.10 <sup>j</sup>	6.42 ± 0.03 <sup>g</sup>	61.94
BAL 22	10.20 ± 0.08 <sup>b</sup>	10.15 ± 0.05 <sup>a</sup>	9.15 ± 0.09 <sup>a</sup>	89.71
BAL 25	10.31 ± 0.10 <sup>ab</sup>	9.59 ± 0.03 <sup>b</sup>	8.78 ± 0.02 <sup>b</sup>	85.16
BAL 26	10.33 ± 0.22 <sup>ab</sup>	8.38 ± 0.03 <sup>e</sup>	7.01 ± 0.10 <sup>e</sup>	67.91
BAL 27A	10.34 ± 0.12 <sup>ab</sup>	9.37 ± 0.15 <sup>c</sup>	8.82 ± 0.01 <sup>b</sup>	85.26
BAL 28	10.28 ± 0.04 <sup>ab</sup>	7.28 ± 0.05 <sup>h</sup>	7.35 ± 0.01 <sup>d</sup>	71.51
BAL 29	10.21 ± 0.02 <sup>ab</sup>	6.74 ± 0.06 <sup>j</sup>	5.99 ± 0.01 <sup>h</sup>	58.64

De las cepas seleccionadas como microorganismos con potencial probiótico, la BAL 22 fue la que presentó mayor tolerancia a las condiciones de pH 1.9 y sales biliares (0.3%), disminuyendo en promedio 1 ciclo logarítmico. Bao y col. (2010) reportaron 11 cepas de *L. fermentum* con alta tolerancia a la acidez gástrica con porcentaje de supervivencia del 80% luego de 3 h de incubación a pH 2.5. Así mismo citan los resultados reportados por Conway y col. (1987) donde *L. acidophilus* NCFM disminuyó cuatro ciclos logarítmicos al ser inoculado en *buffer* fosfato por 3 h a pH 3,0. Cueto y col. (2012) reportaron que la cepa K72 disminuyó en promedio 2.1 unidades logarítmicas en las condiciones de pH 2.0 y sales biliares 0.3% y fue seleccionada como una cepa con potencial probiótico. Teniendo en cuenta esto, la BAL 22 presenta un resultado alto a la tolerancia de acidez. Cabe hacer mención que Vallejo y col. (2008) reportaron que cepas

evaluadas mantuvieron sobrevivencia a pH 2, y demostraron que las cepas autóctonas tienen mayor capacidad para tolerar valores bajos de pH que las cepas comerciales; este mismo procedimiento se podría realizar en este trabajo, para ver si se obtienen resultados positivos y dar un aporte más significativo.

La cepa que presentó menor resistencia fue la BAL 18, disminuyendo en promedio 5 ciclos logarítmicos, mientras que las cepas que no soportaron dicha simulación fueron la BAL 05 y BAL 13A teniendo nulo porcentaje de supervivencia.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecieron en el 2002 criterios de selección de microorganismos probióticos en el “Informe del grupo de trabajo sobre la redacción de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos” (Who y col., 2002). Uno de los criterios de selección *in vitro* es la resistencia a la acidez estomacal y a las sales biliares de intestino delgado (Park y col., 2006).

En condiciones normales el tiempo de tránsito gastrointestinal comprende de 2 a 4 h y varía según el individuo (Macfarlane y col., 2007). El estrés celular inicia en el estómago a pH de 1,5 previo a la ingestión de alimentos; las bacterias pasan a través del estómago, entran al tracto intestinal donde son secretadas las sales biliares (Cebeci y col., 2003; Chou y col., 1999). Gilliland y col. (1984) consideraron que la concentración crítica para determinar la resistencia de cepas era de 0,3% de sales biliares (Erkkilä y col., 2000).

Es de gran importancia entender el comportamiento de las sales biliares, que es un factor que afecta en gran parte a la viabilidad de las células. Para poder cumplir con las especificaciones de un probiótico, las BAL deben de sobrevivir arriba de un 80% en las condiciones adecuadas para que esta sea capaz de colonizar en el intestino y desarrollar efectos benéficos a la salud debido a sus actividades metabólicas. La bilis actúa sobre la membrana plasmática alterando su permeabilidad y provocando, en el caso de cepas sensibles la lisis celular, sin

embargo en el caso de estas cepas que fueron resistentes, puede facilitar el transporte de sustratos y favorecer el ingreso de nutrientes. Los efectos de la bilis y el pH ácido han sido investigados por diferentes autores (Floch y col., 1972; Tannock y col., 1989; Dunne, 2001; Tsai y col., 2005), como evaluaciones obligadas para la selección de cepas.

La mayoría de las cepas evaluadas fueron capaces de resistir y crecer en presencia de las sales biliares, con estos resultados se demuestra que las cepas de *Lactobacillus* en estudio pudieran también ser capaces de desconjugar las sales biliares. En estudios anteriores (Tanaka y col., 1999; Ahn y col., 2003; Liong y Shah, 2005) se ha comprobado que las bacterias ácido lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* son capaces de producir la enzima conocida como sal biliar hidrolasa (SBH), que cataliza la hidrólisis de las sales biliares conjugadas con glicina y taurina. Esta desconjugación pudiera ocurrir en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, ya que la actividad de la SBH se incrementa al disminuir el pH por producción de gran cantidad de ácidos orgánicos (Corzo y col., 1999).

Para proseguir con las pruebas posteriores, se seleccionaron las cepas que tuvieron un porcentaje de supervivencia arriba del 60%, siendo un total de 11 cepas (cuadro 5).

### 5.3. Cuantificación de ácido láctico, acético y glucosa residual

Para evaluar la capacidad de producción de ácido láctico se seleccionaron 11 cepas, las cuales presentaron una supervivencia de entre 61.04% y 89.71% después de la simulación gastrointestinal.

Para la producción de ácido láctico se requiere la fermentación de carbohidratos como son la glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento.

El medio que se utilizó, contenía 20 g de glucosa por cada litro, siendo esta la principal fuente de energía. Por lo que estas BAL metabolizaron la glucosa a piruvato por la ruta glucolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas, obteniéndose ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación. La producción de este ácido como único producto metabólico tiene lugar solamente en condiciones de exceso de fuente de carbono (glucosa o lactosa).

La cepa que presentó mayor producción de ácido láctico es la BAL 21 con un valor de 22.955 g/L (Cuadro 6), Jurado y col., (2009) reportaron una concentración de ácido láctico de 25.39 g/L con *Lactobacillus plantarum* 1, aislada del intestino grueso de cerdos. Serna y col., (2005) reportaron que obtuvieron una concentración de ácido láctico de 13.7 g/L sin control de pH y sin agitación; Rondon A. y col., (2008) reportaron que obtuvieron una concentración de ácido láctico de 14.83 g/L a 16.747 g/L de *Lactobacillus salivarius* aisladas del TGI de pollos. Cueto y col., (2010) obtuvieron un rango de 0.018 a 1.008 g/L de ácido láctico de BAL aisladas de suero costeño. Lo reportado nos da pauta para afirmar que las 11 cepas estudiadas son buenas productoras de ácido láctico comparado con dichos autores. La producción de ácidos orgánicos por determinados grupos de bacterias beneficiosas de la microbiota autóctona favorecen la reducción del pH intestinal. Los valores bajos de pH son considerados como el principal factor en la inhibición del desarrollo de enteropatógenos como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Campylobacter sp.* (Jin y col., 2001; Garlich, 1999; Arias, 2000; Adams, 2000; Chaveerach y col., 2002). Además, la acidificación del lumen intestinal

acelera las reacciones bioquímicas de la digestión (Pascual y col., 1996; Pérez y col., 2002).

El grupo homofermentativo compuesto utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir una 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, bióxido de carbono y etanol a partir de glucosa usando hexosa monofosfato o la vía de la pentosas, y así solamente generan la mitad de la energía del grupo homofermentativa (Almanza y col., 1991).

En función a la producción de ácido láctico como producto final y de muy poco ácido acético, las 11 BAL son consideradas homofermentativas (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Cuantificación de ácido láctico y ácido acético.

CEPA	Glucosa residual g/L	Ácido láctico g/L	Ácido acético g/L	Tipo de Metabolismo
BAL-03	1.2	21.961 ± 1.38 <sup>ab</sup>	1.715 ± 0.70 <sup>bc</sup>	Homofermentativo
BAL-07	1.556	21.919 ± 0.57 <sup>ab</sup>	1.554 ± 0.50 <sup>bc</sup>	Homofermentativo
BAL-09	2.042	21.246 ± 1.12 <sup>bc</sup>	1.792 ± 0.28 <sup>bc</sup>	Homofermentativo
BAL-10	1.132	21.256 ± 0.48 <sup>bc</sup>	1.996 ± 0.11 <sup>c</sup>	Homofermentativo
BAL-12B	2.069	21.303 ± 1.58 <sup>ab</sup>	1.693 ± 0.94 <sup>bc</sup>	Homofermentativo
BAL-21	0.924	22.955 ± 1.60 <sup>a</sup>	1.169 ± 0.94 <sup>abc</sup>	Homofermentativo
BAL-22	2.7	19.009 ± 0.68 <sup>d</sup>	1.44 ± 1.13 <sup>bc</sup>	Homofermentativo
BAL-25	0.84	22.695 ± 0.32 <sup>ab</sup>	0.193 ± 0.03 <sup>a</sup>	Homofermentativo
BAL-26	0.76	22.071 ± 0.46 <sup>ab</sup>	1.603 ± 0.50 <sup>bc</sup>	Homofermentativo
BAL-27 <sup>a</sup>	1.322	19.627 ± 0.85 <sup>cd</sup>	0.975 ± 0.30 <sup>abc</sup>	Homofermentativo
BAL-28	0.641	21.847 ± 0.51 <sup>ab</sup>	0.63 ± 0.20 <sup>ab</sup>	Homofermentativo

La razón de porque es importante cuantificar la producción de ácido láctico, es debido a su importancia en la contribución al desarrollo del sabor, aroma y textura de los productos fermentados. El ácido acético tiene capacidad antimicrobiana como el láctico, debido al descenso de pH, pudiendo inhibir levaduras, mohos y



bacterias (Blom y col., 1991), asegurando la calidad y uniformidad de algún producto a desarrollar. Es por ello, que ambos ácidos orgánicos son producidos biotecnológicamente, teniendo un amplio rango de aplicaciones.

#### 5.4. Cuantificación de Exopolisacaridos

La producción de EPS's, demostró variaciones en los resultados, como se observa en el cuadro 7. Los resultados muestran que, la cepa BAL 10 resultó la mejor productora de EPS's con 233.986 mg/L, siendo una cantidad muy por arriba de las que reportó Garai, (2010) en donde los rendimientos de 32 cepas de BAL procedentes de sidras ahiladas como no ahiladas fue entre 18 y 243 mg/L. Por otra parte la BAL-25 cuantificó la menor cantidad (23.422 mg/mL) de EPS's, sin embargo esa concentración se encuentra dentro de lo reportado por ese mismo autor. Estos datos dan pauta a analizar lo que menciona Malpartida y col., (2005) que los EPS de lactobacilos son productos microbianos de gran interés biotecnológico en las industrias alimentaria, farmacéutica, médica, etc. actuando como viscosantes, emulsificantes, gelificantes y estabilizantes.

**Cuadro 7.** Cuantificación de Exopolisacáridos

<b>CEPA</b>	<b>EPS's (mg/mL)</b>
<b>BAL-03</b>	135.30± 32.49 <sup>c</sup>
<b>BAL-07</b>	34.997 ± 10.72 <sup>e</sup>
<b>BAL-09</b>	119.427 ± 72.31 <sup>cd</sup>
<b>BAL-10</b>	233.986 ± 21.846 <sup>a</sup>
<b>BAL-12B</b>	119.257 ± 57.939 <sup>cd</sup>
<b>BAL-21</b>	215.432 ± 22.904 <sup>ab</sup>
<b>BAL-22</b>	69.212 ± 12.479 <sup>de</sup>
<b>BAL-25</b>	23.422 ± 8.650 <sup>e</sup>
<b>BAL-26</b>	148.365 ± 7.163 <sup>c</sup>
<b>BAL-27A</b>	163.176± 51.616 <sup>bc</sup>
<b>BAL-28</b>	118.746 ± 12.980 <sup>cd</sup>

En el proceso de la evaluación de BAL con potencial probiótico, la producción de EPS's es gran interés, ya que este metabolito tiene efectos benéficos a la salud tales como favorecer la colonización del tracto gastrointestinal, efectos anti-tumor, anti- úlcera, efectos estimulador, y disminución de colesterol en la sangre (Tavaria y col., 2002). Así como en la mejora de la reología, textura y sensación bucal o "mouthfeel" de productos lácteos fermentados como el yogur, leches fermentadas o queso.

Aunque los EPS's carecen de sabor por sí mismos, aumentan el tiempo que el producto permanece en la boca, incrementando la sensación de gusto (Duboc y col., 2001), lo cual es especialmente interesante en productos desnatados con el fin de simular la textura y sabor originales. Los niveles de producción de heteropolisacáridos oscilan generalmente entre 0.025 y 0.600 g/L dependiendo de la cepa (Ruas-Madiedo, 2002), y para la producción de homopolisacáridos como los glucanos (9.8 g/L) o fructanos (7.3 g/L) (Van Geel-Schutteny col., 1999).

## 5.5. Disociación de taurocolato de sodio

La prueba de disociación de taurocolato de sodio, muestra una relación de las células iniciales y ácido cólico liberado por cada una de las 11 cepas estudiadas, (cuadro 8).

**Cuadro 8.** Desconjugación de taurocolato de sodio

Bacteria	Células iniciales (log UFC/mL)	Ácido cólico liberado (mM) Taurocolato de sodio
BAL-03	7.31 ± 0.01	1.35 ± 0.43 <sup>bc</sup>
BAL-07	5.06 ± 0.08	0.53 ± 0.23 <sup>f</sup>
BAL-09	6.12 ± 0.09	0.91 ± 0.16 <sup>def</sup>
BAL-10	5.45 ± 0.02	0.92 ± 0.16 <sup>def</sup>
BAL-12B	5.29 ± 0.03	1.01 ± 0.17 <sup>cde</sup>
BAL-21	5.24 ± 0.01	0.69 ± 0.34 <sup>ef</sup>
BAL-22	7.47 ± 0.01	1.44 ± 0.16 <sup>ab</sup>
BAL-25	7.43 ± 0.01	1.22 ± 0.24 <sup>bcd</sup>
BAL-26	5.89 ± 0.05	1.04 ± 0.15 <sup>cde</sup>
BAL-27A	7.47 ± 0.01	1.39 ± 0.23 <sup>bc</sup>
BAL-28	6.04 ± 0.07	1.79 ± 0.13 <sup>a</sup>

La desconjugación del taurocolato de sodio se determinó por la cantidad de ácido cólico liberado, el cual varió desde 0.53 hasta 1.79 mM. demostrando que las 11 bacterias ácido lácticas fueron capaces de desconjugar esa sal biliar.

En general se observó mayor capacidad de la BAL-28, seguido de las BAL- 22 y BAL-27; mientras que las de menor capacidad de desconjugación de dicha sal biliar fueron las BAL-07 y BAL-21.

Esto es debido a que las células viables de las bacterias ácido lácticas deben tener la capacidad de sobrevivir a la difícil condición de acidez y a la concentración de bilis comúnmente encontradas en el tracto gastrointestinal de los seres humanos, trayendo consigo la capacidad de liberar ácido cólico.

Los ácidos biliares libres formados por la desconjugación de taurocolato de sodio son menos solubles y tienen menos probabilidades de ser reabsorbido por el lumen intestinal en comparación con su equivalente de conjugado, y se pierde del cuerpo humano a través de las heces (Center y col., 1993).

Estos resultados son de gran importancia, debido al interés que ha crecido en la posibilidad de utilizar la desconjugación de sales biliares por las bacterias ácido lácticas, para bajar el nivel de colesterol en suero en pacientes con hipercolesterolemia y prevenir la hipercolesterolemia en personas ( De Smet y col., 1995).

## 5.6. Degradación de azúcares

Esta prueba fue evaluada empleando el kit API 50 CH (patrón de fermentación de 49 carbohidratos) y software API WEB para un número de 10 cepas, donde estas cepas fueron seleccionadas, como las mejores, debido a sus capacidades probiótica *in vitro*, con respecto a la evaluación de cada prueba (apartado 4.1 - 4.5).

La identificación de las bacterias ácido lácticas aisladas de la taberna, se realizaron por medio de la galería API 50 CH cada 24 y 48 h, estas bacterias lácticas presentaron como característica esencial un comportamiento bioquímico igual al fermentar azúcares, como lo son: L-Arabinosa, D-Ribosa, D-Galactosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Mannosa y entre otras que encuentran señaladas en el cuadro 9; debido a que estos resultados, nos permitieron identificar a cada una de las BAL con una probabilidad mayor del 99 % a excepción de la BAL 21 (53.5 %) y BAL 28 (59.1 %). Ruiz (2012) identificó bacterias probióticas por medio del kit API 50 CH, donde demostró una probabilidad mayor del 90 % en la mayoría de sus cepas. Jurado y col (2009) identificaron *Lactobacillus plantarum* 1, las cuales presentaron como característica especial un comportamiento bioquímico igual al fermentar el azúcar 2-cetogluconato potásico. Rondon y col., (2008) identificaron *Lactobacillus salivarius* (de 96 a 99.9 % de efectividad)

**Cuadro 9.** Degradación de azúcares

Tubo	Sustrato	BAL-03	BAL-09	BAL-10	BAL-12B	BAL-21	BAL-22	BAL-25	BAL-26	BAL-27A	BAL-28
0	TESTIGO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	LARA	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	RIB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	DXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	GAL	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
11	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	FRU	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
13	MNE	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
14	SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	MAN	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
19	SOR	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
20	MDM	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
21	MDG	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
22	NAG	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
23	AMY	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
24	ARB	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
25	ESC	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
26	SAL	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
27	CEL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
28	MAL	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
29	LAC	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
30	MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	SAC	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
32	TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	MLZ	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
35	RAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	AMD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	GLYG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	GEN	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
40	TUR	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
41	LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	TAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	GNT	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
48	2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los datos que se obtuvieron por las lecturas de las galerías API 50 CH, determinaron que el 80 % de las cepas estudiadas se registraron como *Lactobacillus plantarum* 1, mientras que la BAL-12B como *Lactobacillus fermentum* 2 y la BAL-21 como *Lactobacillus fermentum* 1 (cuadro 10). Cueto y col., (2010) encontraron con características probióticas a bacterias ácido lácticas aisladas del suero costeño, con la clasificación API 50 CH: *Enterococcus durans* 381, *E. faecium* 02, *Lactobacillus fermentum*, *L. fermentum* 72, *L. fermentum* 1-1, *L. fermentum* 75 y *L. rhamnosus* 73.

Dichos resultados son de gran interés, debido a que nos muestra la capacidad de las bacterias ácido lácticas para degradar azúcares, así también se observa específicamente que carbohidratos pueden fermentar, dando pauta que dicha característica pueda ayudar en la mejora del medio; debido a que, al adicionarles dichos azúcares podrían obtenerse mejores resultados en la producción de ácidos orgánicos, entre parámetros que le den mejores atributos a dichas bacterias probióticas.

**Cuadro 10.** Bacterias identificadas por el kit API 50 CH

<b>Cepa</b>	<b>Cepa Identificada</b>	<b>Probabilidad (%)</b>	<b>Nivel de identificación</b>
<b>BAL-03</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.1	Buena
<b>BAL-09</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.9	Buena
<b>BAL-10</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.1	Buena
<b>BAL-12B</b>	<i>Lactobacillus fermentum</i> 2	99.9	Buena
<b>BAL-21</b>	<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	53.5	Regular
<b>BAL-22</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.9	Buena
<b>BAL-25</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.9	Buena
<b>BAL-26</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.4	Buena
<b>BAL-27A</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.9	Buena
<b>BAL-28</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	59.1	Regular

En general, cada una de las 11 cepas evidenciaron cuando menos dos atributos probióticos sobresalientes, lo que las convierte en cepas importantes para ser evaluadas *in vivo*, como lo menciona Delgado en el (2005) que los estudios *in vivo*, tienen como finalidad relacionar las propiedades atribuidas a los probióticos con la condición de una mejoría clínica, bienestar, calidad de vida, reducción del riesgo a la enfermedad y rapidez de la recuperación de la enfermedad.

Esta hipótesis queda comprobada con los estudios que realizaron a porcinos para evaluar respuesta biológica de un probiótico (Ayala, 2005), así mismo, Colin y col., (1994) evaluó el efecto probiótico en pollos de engorda.

Por otra parte, los resultados obtenidos nos sugieren que es importante optimizar el medio y las condiciones del cultivo para que la producción de ácido láctico y exopolisacáridos sean cuantitativamente mayores, trayendo consigo mejores beneficios en el sabor, aroma, textura y el valor nutricional de los alimentos fermentados.





6

# CONCLUSIÓN

1. Se evaluaron 24 cepas de BAL, de las cuales 8 son de crecimiento rápido ( $T_d=1.2$  h), 10 de crecimiento moderado ( $T_d= 1.8$  h) y 6 de crecimiento lento ( $T_d= 3.6$  h).
2. Once cepas de BAL (03, 07, 09, 10, 12B, 21, 22, 25, 26, 27A, 28) son capaces de sobrevivir a condiciones gastrointestinales simuladas, asegurando cuando menos un 60 % de sobrevivencia.
3. Las once cepas que soportaron la simulación gastrointestinal son homofermentativas y producen entre 19 y 22.9 g/L empleando glucosa como sustrato principal contenida en medio MRS.
4. Las once cepas que soportaron la simulación gastrointestinal, producen exopolisacáridos a concentraciones entre 23 y 233 g/L.
5. Las once cepas que soportaron la simulación gastrointestinal son capaces de disociar el taurocolato de sodio, liberando entre 0.53 y 1.79 mM de ácido cólico.
6. Las once cepas que soportaron las evaluaciones descritas, sólo diez cepas fueron identificadas por medio del kit API en *Lactobacillus plantarum* 1(BAL 03, 09, 10, 22, 25, 26, 27A, 28), *Lactobacillus fermentum* 1(BAL 21) y *Lactobacillus plantarum* 2 (BAL12B).



7

# RECOMENDACIONES

- De acuerdo con varios autores, una marcada resistencia a concentraciones de sales biliares por parte de las BAL, podría estar asociada al descenso en los niveles de colesterol en el organismo. Por esta razón, y teniendo en cuenta los buenos resultados con estas cepas, se recomienda que se realicen más estudios para probar la capacidad como mediadoras de este tipo de procesos metabólicos.
- De acuerdo a los buenos resultados obtenidos, se recomienda utilizar medios suplementados con otras fuentes de carbono, para una mayor producción de biomasa y exopolisacáridos.
- Debido a la alta producción de ácido láctico de las cepas, se recomienda realizar la prueba de actividad antimicrobiana contra diferentes tipos de bacterias patógenas. Así mismo, se recomienda realizar la prueba de producción de bacteriocinas por parte de las BAL.
- Realizar la prueba de antibiograma, para observar si hay resistencia por parte de algunas cepas a diferentes antibióticos, si los resultados son positivos, se recomienda realizar estudios más específicos en este tema, que permitan detectar la presencia de plásmidos y genes relacionados con transferencia de resistencia, este punto es importante para darle continuidad a los estudios de potencial probiótico de las BAL.
- Se debe continuar con la evaluación de las cepas a nivel *in vivo*, para poder comprobar de manera efectiva el efecto benéfico de este tipo de microorganismos sobre la salud. Por esta razón se recomienda primero realizar ensayos en modelos animales, para posteriormente realizar ensayos de intervención en humanos.
- Debido a la identificación de las cepas por el método API 50 CH, es recomendable aplicar técnicas de biología molecular para conocer el género y especie de las cepas estudiadas.



8

# REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ✚ Adams, C. (2000). Asistencia con Resistencia: Avicultura y ácidos en la dieta. *Revista Alimentos Balanceados para Animales*. 7(2): 14 – 16.
- ✚ Adebayo, T. B. C.; Onilude, A.A.; Patrick, U. G. (2008). Mycofloral of Smoke-Dried Fishes sold in Uyo. *World Journal of Agricultural*, Eastern Nigeria. 4(3): 346-350.
- ✚ Agudelo, C.; Ortega, R.; Hoyos, J. L. (2010). *Determinación de parámetros cinéticos de dos inoculos lácticos: Lactobacillus plantarum A6 y Bacteria ácido lácticas del yogurt* .*Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8(2): 11.
- ✚ Ahn, Y. T.; Kim, G. B; Lim, K. S.; Back, Y. J.; Kim, H. U. (2003). Desconjugation of bile salt by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 1(13): 303-311.
- ✚ Almanza, F.; Barrera, E. (1991). *Tecnología de leche y derivados*, Santa Fé de Bogotá .Unisur. p. 61-66.
- ✚ Alvarado, C.; García A. B. E.; Martin, S. E.; Regalado, C. (2006). Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(3-4): 260-268.
- ✚ Alvarado, R. C.; Díaz, R. C. (2009). Estudio preliminar del potencial probiótico de *Lactobacillus* aislados de pastizal de una finca lechera.*Revista de Facultad de Farmacia y Bioanálisis*. Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela. 51(1): 8-14.
- ✚ Alvarez, O. M. I.; Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: *A modern perspective on a traditional therapy*. *Clinical Infectious Diseases*. 32(1): 1567-1576.
- ✚ Ando, M.; Kaneko, T.; Watanabe, R.; Kikuchi, S.; Goto, T.; Lida, T. (2006) High sensitive analysis of rat serum bile acids by liquid chromatography/electrosprayionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 40(1):1179-1186.
- ✚ Apiweb BioMérieux.2010  
[http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_SistemasAPI.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_SistemasAPI.pdf). (15 de enero de 2013).

- ✚ Arias, F. (2000). Programas de exclusión competitiva, una realidad mundial contra enteropatógenos en aviculture. *III Congreso Nacional de Avicultura*. Centro de Convenciones Plaza América, Varadero, Matanzas, CUBA. p. 22-26.
- ✚ Ayala, G. L. (2005). *Respuesta biológica de un probiótico comercial en categorías menores porcinas bajo condiciones tropical*. Tesis presentada en opción al título de maestro en producción animal para la zona tropical, Instituto de Ciencia Animal. República de Cuba, La Habana.
- ✚ Axelsson, L. T. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3<sup>rd</sup> rev. and exp. Ed. Marcel Dekker, New York p. 1-66.
- ✚ Bao, Y.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Wang, Y.; , Dong, X.; Wang, Y.; Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*. 21(5): 695-712.
- ✚ Begley, M.; Hill, C.; Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(1):1729-1738.
- ✚ Belviso, S.; Giordano, M.; Dolci, P.; Zeppa, G. (2009). In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO cheese. *Dairy Science Technology*. 89(2):169-176.
- ✚ Blom, H.; Mortvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food-associated microorganisms. *Biochemical Society Transactions*. 19(1): 694-698.
- ✚ Borquez, P. (2000). *Producción Continua y Purificación parcial de la bacteriocina de Carnobacterium piscicola L103, utilizando un fermentador modular*. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias.

- ✚ Brashears, M. M.; Gilliland, S. E.; Buck, L. M. (1998). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*. 81(1): 2103-2110.
- ✚ Carr, F. J.; Chill, M. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical reviews in microbiology*. 28. (4): 281-370.
- ✚ Casp, V. A.; Requena, J. A. (1999). *Procesos de Conservación de Alimentos*, Colección de Tecnología de Alimentos. (Eds). Mundi-Prensa, Madrid España. p. 97-98.
- ✚ Castro, B. L. A.; Restrepo, D. C. (2006). Probioticos: utilidad clínica. *Colomb. Med.* 37(4): 308-314.
- ✚ Cebeci, A.; Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*. 20(5): 511-518.
- ✚ Center, S. A. (1993). *Serum bile acid in companion animal medicine.: Gastroenterology: The 1990s*. S. L. Micheal (Ed.), Philadelphia: Saunder. p.625-657.
- ✚ Chaveerach, P.; Keuzenkamp, D. A.; Urlings, H. A.; Lipman, I. J.; Van Knapen, F. (2002). *In vitro* study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poultry Science*. 81(1): 621- 628.
- ✚ Chiu, H. H.; Tsai, C. C.; Hsieh, H. Y.; Tsen, H. Y. (2007). Screening from pickled vegetables the potencial probiotic strains of lactic acid bacteria able to inhibit the *Salmonella* invasion in mice. *Journal Applied of Microbiology*. 104(2): 605-612.
- ✚ Chou, L.; Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82(1): 23-31.
- ✚ Cintas, L. M.; Causaus, M. P.; Herranz, C.; Nes, L. F; Hernández, P. E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food science technology*. 7(4): 281-305.



- ✚ Colin, A. L.; Morales, B. E.; Avila, G. E. (1994). *Evaluación de promotores de crecimiento para pollos de engorda*. Parte de este trabajo corresponde a la tesis de licenciatura del primer autor, Instituto Nacional de de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Campo experimental Valle de México. Chapingo, Estado de México.
- ✚ Collado, A. M. C. (2004) .*Tesis: Caracterización de cepas del género Bifidobacterium con carácter probiótico*. Universidad Politécnica de Valencia (departamento de Biotecnología), Valencia.
- ✚ Conway, P. L.; Gorbach, S. L. Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*. 70(1): 1-12.
- ✚ Corzo, G.; Gilliland, S. E. (1999). Bile salt hydrolase ctivity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*. 82(1): 472-480.
- ✚ Criado, R.; Gutiérrez, J.; Martin, M.; Herranz, C.; Hernandez, P.; Cintas, L. (2006). Inmunochemical characterization of temperatura-regulated production of Enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), Enterocin P and Enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Applied and environmental microbiology*. 72(12): 7636-7643.
- ✚ Cueto, V. M. C.; Acuña, M. Y.; Valenzuela, R. J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades Biológicas*. 32(93): 129-138.
- ✚ Cueto, C.; Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*. 1: 45 – 50.
- ✚ Daeschel, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acidobacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. 43(1): 164-167.
- ✚ Dambekodi, P. C.; Gilliland, S. E. (1998). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci*. 81(1): 1818-1824.
- ✚ Delgado, P. S. (2005). *Microbiota intestinal humana: Análisis y Evolución de poblaciones representativas e Identificación de bacterias probiotica*,

Presentada en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) para obtener el grado de doctor Oviedo.

- ✚ De smet, I.; Van H. I.; Vande, W. M.; Christianens, H.; Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 79(1): 292-301.
- ✚ Duboc, P.; Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*. 11(1): 759-768.
- ✚ Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K; Rebers, P. A.; Smith, F. (1956). Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28(1): 350-356.
- ✚ Dunne, C. (2001). Adaptation of bacteria to the intestinal niche: probiotics and gut disorder. *Inflammatory Bowel Disease*. 7(1): 136-145.
- ✚ El Soda, M.; Ahmed, N.; Omran, N.; Osman, G.; Morsi, A. (2003). Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheesemaking. *Emir. J. Agric. Sci*. 15(2): 51-71.
- ✚ Ennahar, S.; Sashihara, T.; Sonomoto, K.; Ishiizaki, A. (2000). Cass IIa bacteriocins: biosíntesis, structure and activity. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*. 24(1): 85-106.
- ✚ Erkkilä, S; Petäjä E.(2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*. 55(3): 297-300.
- ✚ FAO-OMS. (2002). Guidelines for the Evaluati3n of Probiotics in Food. *Report of a Joint FAO/OMS Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluati3n of Probiotics in Food*. p. 1-52
- ✚ Fernández, E. E. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México pp. 105-110.
- ✚ Floch, M. H.; Binder, H. J.; Filburn, B.; Gershengoren, W. (1972). The effect of bile acids on intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition*. 25(1): 1418-1426.
- ✚ Forde, A., Fitzgerald, G. F. (1999). Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid,

- pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *International Dairy Journal*. 9(1): 465-472.
- ✚ Fuller, R. (1989). A review: probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*. 66(1): 365-378.
  - ✚ Garai, I. G. (2010). *Bacterias Lácticas de Sidra Natural: Implicación en alteraciones y potencial probiótico de cepas productoras de (1,3) (1,2)-β-D-Glucanos*. Tesis doctoral (67).Bogota, Colombia.
  - ✚ Garlich, J. D. (1999). Microbiología del tracto intestinal aviar. *Conferencia presentada en el XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura*.Lima, Perú.
  - ✚ Ghasemim, L. (2009.) Effect of different media on production of lactic acid from whey by *Lactobacillus bulgaricus*. *African journal of biotechnology*. 8(1): 081-084.
  - ✚ Gilliland, S. E.; Stanley, T. E.; Bush, L. J.(1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary. *Journal of Dairy Science*. 67(1): 3045-3051.
  - ✚ Giraud, E.; Champalier, A.; Raimbault, M. (1994). Degradation the raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(12): 4319-4323.
  - ✚ González, R. F.; González, M. B. (2006). Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *RESPYN*. 7(1). [En Internet]. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/vii/1/ensayos/criterios.htm>
  - ✚ Gould, G. W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. *Journal of Food Protection. Suppl.* p. 82-86.
  - ✚ Grajek W.; Olejnik, A.; Sir A. (2005). Review probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta biochimica polonica*. 52(1): 665-671.
  - ✚ Granato, D.; Perotti, F.; Masserey, I.; Rouvet, M.; Golliard, M.; Servin, A; Brassart, D. (1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human

- enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1): 1071-1077.
- ✚ Gravesen, A.; Jydegaard, A. A. M.; Mendes D. S. J.; Hansen, T.Y.; Knochel, S. (2002). Frequency of Bacteriocins Resistance Development and Associated Fitness Cost in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68. No.2. p. 756-764.
  - ✚ Guo, X. H.; Kim, J. M.; Nam, H. M.; Park, S. Y.; Kim, J. M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on *in vitro* functional properties. p. 1-6.
  - ✚ Holzapfel, W. H.; Haberer, P.; Snel, J.; Schillinger, S.; Jos H. J. (1998). Overview of gut and probiotics. *International Journal of Microbiology*. p. 85-101.
  - ✚ Huertas, R. A. (16 de Junio de 2010). *Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional de los alimentos*. Recuperado el 1 de Septiembre de 2012, de Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional de los alimentos: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S169235612010000100012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S169235612010000100012&script=sci_arttext)
  - ✚ Hummel A. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 73(1): 730-739.
  - ✚ Hwanhlem, N.; Watthanasakphuban, N.; Riebroy, S.; Benjakul, S.; Kittiku, A.; Maneerat, S. (2009). Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. *Food Science & Technology*. p. 594-601.
  - ✚ Jack, R. W.; Tagg J. R.; Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*. 59(1): 171-200.
  - ✚ Jay, J. M. (1992). *Microbiología moderna de los alimentos*. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España. p. 441-449.
  - ✚ Jay, J. M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos*. 4ª. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p. 19-27, 106-108- 441-475.

- ✚ Jin, L.; Hyun, S. Y.; Kyu, W. C.; Sejong, O.; Sae, H.K.; Taehoon, C.; Bongjoon, K.; Kwang, Y. W.(2001). Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* sp.: inmune modulation and longevity. *International Journal of food microbiology*. 148(2): 80-86.
- ✚ Jurado, G. H.; Aguirre, F. D.; Ramírez, T. C. (2009). Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. *Revista MVZ Córdoba*. 14(2).
- ✚ Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria *Antonie van Leeuwenhoek*. 49(1): 209-224.
- ✚ Klayraung, S.; Viernstein, H.; Sirithunyaung, J.; Okonogi, S. (2010). Probiotic Properties of *Lactobacillus* Isolated From Thai Traditional Food. *Science Pharmacology*. 76(1): 485-503.
- ✚ Lin W. H.; Hwang C. F.; Chenc L. W.; Tsen H. Y. (2006). Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*. 23(1): 74–81.
- ✚ Lindgren, S. E.; Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology reviews*. 87(1): 149-164.
- ✚ Liong, M. T.; Shah, N. P. (2005). Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of *Lactobacillus*. *International Dairy Journal*. 15(1): 391-398.
- ✚ Liu, S. N.; Han, Y.; Zhou, Z. J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*. 44(3): 643-651.
- ✚ López, M. J. E.; Ochoa, Z. A.; Santoyo, P. G.; Anaya L. J. L.; Medina, M. E.; Martínez, T. M.; Loeza, L. P. D.; (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Redalyc*. 39(3).
- ✚ Lye, H. S.; Rusul, G.; Liong, M. T. (2010). Removal of cholesterol by *lactobacillus* via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*. 93(4): 1383-1392.

- ✚ Lyhs U. (2002). *Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products*. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki.
- ✚ Macfarlane S.; Dillon J. F. (2007). Review, microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 102(5): 1177-1436.
- ✚ Malpartida, Z.; Garcia, K. (2005). *Lactobacilos nativos productores de exopolisacáridos de interés biotecnológico*. Tesis para optar por el Título profesional de: Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- ✚ Maragkoudakis, P. A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B.; Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*. p. 189-199.
- ✚ Marteau, P.; Vaerman, J. P.; Dehennin, J. P.; Bord, S.; Brassart, D.; Pochart, P.; Desjeux, J. F.; Rambaud, J. C. (1997). Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain Lal on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans. *Gastroenterology Clinical Biology*. 21(1): 293-300.
- ✚ Marteau, P.; Shanahan F. (2003). Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Gastroenterology Clinical Biology*. 17(1): 725-740.
- ✚ Martinez, A.; YulAn, C.; Villafafie, R.; Cardozo, M.; Vasek, O. (2009). Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis*. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/investigacion/com2009/CE-023.pdf>
- ✚ Mathara, J. M.; Schillinger, U; Guigas, C.; Franz, C.; Kutima, P. M.; Mbugua, S. K.; Shin, H. K.; Holzapfel, W. H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus spp.* from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*. p. 57-64.

- ✚ Moreira, M; Abraham, A.; Antoni, G. (2000). Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at sub-optimal temperature. *Journal dairy science*. 83(1): 395-400.
- ✚ Muñoz, A. (2006). *Optimización de la producción de la enterocina AS-48 y ensayo de su eficacia como biopreservante en alimentos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de microbiología. Granada. España.*
- ✚ Ness, I. F.; Diep, D. B.; Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J. Bacteriol.* 189(1): 1189–1198.
- ✚ Nigatu, A. (2000). Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from kocho and tef. *Journal of Applied Microbiology*. 89(1): 969-978.
- ✚ Ortiz, A.; Reuto, J.; Fajardo, E.; Sarmiento, S.; Aguirre, A.; Arbeláez, G.; Gómez, D.; Quevedo-Hidalgo, B. (2008). Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro”. “*Universitas Scientiarum*. p. 138-148.
- ✚ Ouwehand, A. C. (1993). *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y Von Wrigt A. (Eds). Marcel Dekker, Nueva York. p.139-154.
- ✚ Park, S.; Hwang, Y.; Kim, Y.; Kim, J.; Song, J.; Lee, K.; Jeong, K.; Rhee, M.; Kim, K.; Kim, T. (2006). Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(1): 35-37.
- ✚ Pascual, M.; Garriga, M.; Monfort, J. M. (1996). Los probióticos en la alimentación animal. *Eurocarne*. 44(1): 91 – 96.
- ✚ Pederson, T. H.; Nielsen, O. B.; Lamb, G. D.; Stephenson, D. G. (2004). Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science journals*. 305(5687): 1144-1147
- ✚ Pérez, M.; Piad, R.; Laurencio, M.; Milián, G.; Bocourt, R.; Savón, L.; Amigo, S. (2002). Evaluación de la actividad probiótica de un hidrolizado enzimático

de *Saccharomyces cerevisiae* en pollos de ceba. I. Indicadores fisiológicos, fermentativos y microbiológicos en el tracto gastrointestinal. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*. 26(1): 37-45.

- ✚ Picot, A.; Lacroix, C. (2004). Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based. *International Dairy Journal*. 14(1): 505-515.
- ✚ Prasad, J.; Gill, H.; Smart, J.; Gopal, P. K. (1998). Selección and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. *International Dairy Journal*. 8(1): 993-1002.
- ✚ Prescott, L.; Harley, J. (2000). *Microbiología*. quinta edición. Editores Mcgraw-Hill-internamericana, Madrid España.
- ✚ Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. (1999). *Microbiología*, Cuarta edición. Editores Mcgraw-Hill-internamericana, Madrid España.
- ✚ Pridmore, R.D.; Berger, B.; Desiere, F.; Vilanova, D.; Barretto, C.; Pittet, A. C.; Zwahlen, M.C.; Rouvet, M.; Altermann, E.; Barrangou, R.; Mollet, B.; Mercenier, A.; Klaenhammer, T.; Arigoni, F.; Schell, M. A. (2004). The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(1): 2512-2517.
- ✚ Ramírez, J. C. (2011). Bacterias Lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*. 1(2): 1-15.
- ✚ Rao, S. (2004). Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Science Direct, Bioresource Technology*. 94(1): 331-337.
- ✚ Reddy, G. (2008). Amyolytic bacterial lactic acid fermentation a review, en *Biotechnol Adv*. 26(1): 22-34.
- ✚ Rivera, E. Y.; Gallardo, Y. N. (2010). Non-diary probiotics products. *Food microbiology*. 27(1): 1-11.
- ✚ Rondón, A. J.; Samaniego, L. M.; Boucourt, R.; Rodríguez, S.; Milián, G.; Ranilla, M. J.; Laurencio, M.; Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas *Lactobacillus*



procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y tecnología alimentaria*. 6(1): 56-63.

- ✚ Roos, S.; Jonsson, H. (2002). A high molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*. 148(1): 433-442.
- ✚ Ruas, M. P.; Tuinier, M. K.; Zoon P. (2002). Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. *International Dairy Journal*. 12(1): 689–695.
- ✚ Ruiz, C. (2012). Activación e identificación bioquímica de los conglomerados de bacterias probióticas de abt-5, aby-3 y bc-7 utilizando el kit rápido API 50 CH, vol. 5 – N° 13, Perú, <http://www.eumed.net/rev/delos/13/cr.html>.
- ✚ Ruiz, M. S.; Martin, A.; Benito, M. J.; Nevado, F. P.; Córdova, M. G. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat science*. 80(1): 715-721.
- ✚ Sanz, Y.; Collado, M.; Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*. 61(9): 476-482.
- ✚ Savadogo, A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - A Minireview. *African journal of biotechnology*. 5(1): 678-683.
- ✚ Serna, C. L.; Naranjo E. J. (2005). Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones discontinuo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7(1): 32-38.
- ✚ Song, T. S.; Kim, J. Y.; Kim, K. H.; Jung, B. M.; Yun, S. S.; Yoon, S. S. (2010). In vitro evaluation of probiótico lactic acid bacteria isolated from dairy and non-dairy environments. *Food Science Biotechnology*. 2(1): 19-25.
- ✚ Stephenie, W. K.; Beir, B. M.; Huhimi, M. R.; Osfarizan, M.; Yazid, A. M. G. (2007). Rowth and optimization of a probiotic candidate, *Bifidobacterium Pseudocatenilatum* G4, in milk medium using response surface methodology. *Biotechnology Bioprocess*. 12(1): 106-113.
- ✚ Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. *International Journal Microbiology*. 70(1): 331-345.

- ✚ Tagg, J. R.; Dajani A. S.; Wanamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriology Reviews*. 40(1): 722–756.
- ✚ Tallon, R.; Bressollier, P.; Urdaci, M. C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*. 154(1): 705-712.
- ✚ Tamang, J. P; Tamang, B.; Schillinger, U.; Guigas, C.; Holzapfel, W. H. (2009). Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*. 2(1): 28-33.
- ✚ Tanaka, H.; Doesburg, K.; Iwasaki, T.; Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal o Dairy Science*. 82(2): 2530-2535.
- ✚ Tannock, G. W.; Dashkevitz, M. P.; Feighner, S. D. (1989). Lactobacilli and bile salt hydrolase in the murine intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(1): 1848-1851.
- ✚ Tavaría, F. (2002) “Amino Acid Catabolism and Generation of Volatiles by Lactic Acid Bacteria”, *Journal Dairy Science*. 85(1): 2462-2470.
- ✚ Tsai, C. C.; Hsih H. Y.; Chiu, H. H.; Lai, Y. Y.; Liu, J. H.; Yu, B.; Tsen, H.Y. (2005) Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*. 102 (2): 185-94.
- ✚ Torres, M. R. (2002). Flora intestinal, probióticos y salud. Segunda edición, formas finas (edit). Guadalajara, Jal.
- ✚ Urbanska, A. M.; Chen, H.; Prakash, S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. p.13684.
- ✚ Vallejo, M. R.; Marguet E. E.; Etchechoury, V. (2008). Potencial probiótico de ceps de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos patogénicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 9(4).

- ✚ Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*. 60(2): 407-438.
- ✚ Van, G. S.; Faber, G. H.; Smit, E. J.; Bonting, E.; Smith, K.; Brink D. M. R.; Kamerling, B.; Vliegthart, J. P.; Dijkhuizen, L. J. (1999). Caracterización bioquímica y estructurales de los exopolisacáridos glucanos y fructanos sintetizados por el *Lactobacillus reuteri* cepa de tipo salvaje y por las cepas mutantes. *Applied Environment Microbiology*. 65(1): 3008 -3014.
- ✚ Vázquez, J.; Murado, M. (2008). Enzymatic hydrolysates from food wastewaters as a source of peptones for lactic productions. *Enzyme and microbial technology*. 43(1): 66-72.
- ✚ Vázquez, S. M.; Suárez, H. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas por la bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*. 36(1): 64-71.
- ✚ Vuyst, L. (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks, *International Dairy Journal*. 13(1): 707-717.
- ✚ Waldir, E.; Mojmír, R.; Karel, M.; Elena, Q.; Erida, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Perú, Biología*. 2(14): 271 -275.
- ✚ Who (World Health Organization) [Internet]. 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*. Food and Agriculture Organization. Fecha de acceso: 17 de diciembre de 2010. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).
- ✚ Yang, B.; Zhang, Y.; Zhan, Y.; Liu, Y.; Wang, S.; Dong, X.; Wang, Y.; Zhang Y. H. (2010). "Screening of potential probiótico properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products". *Food Control*. 1(3): 695-701.

- ✚ Yang, Z. (2000). *Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria*: To be presented, with the permission of the Faculty of Agriculture and Forestry of the University of Helsinki, for public criticism in Auditorium XII of the University Main Building Structures and properties University of Helsinki.
- ✚ Zendo, T.; Eungruttanagorn, N.; Fujioka, S.; Tashiro, T.; Nomura, K.; Sera, Y.; Kobayashi, G.; Nakayama, J.; Ishizaki, A.; Sonomoto, K. (2005). Identification and production of a bacteriocin from E 2 isolated from soybean. *Journal Applied Microbiology*. 99(1): 1181–1190.
- ✚ Zourari, A.; Accolas, J. P; Desmazeaud, M. J. (1991). Metabolism and biochemical characteristics of yogurth bacteria. 72(1): 1-34.



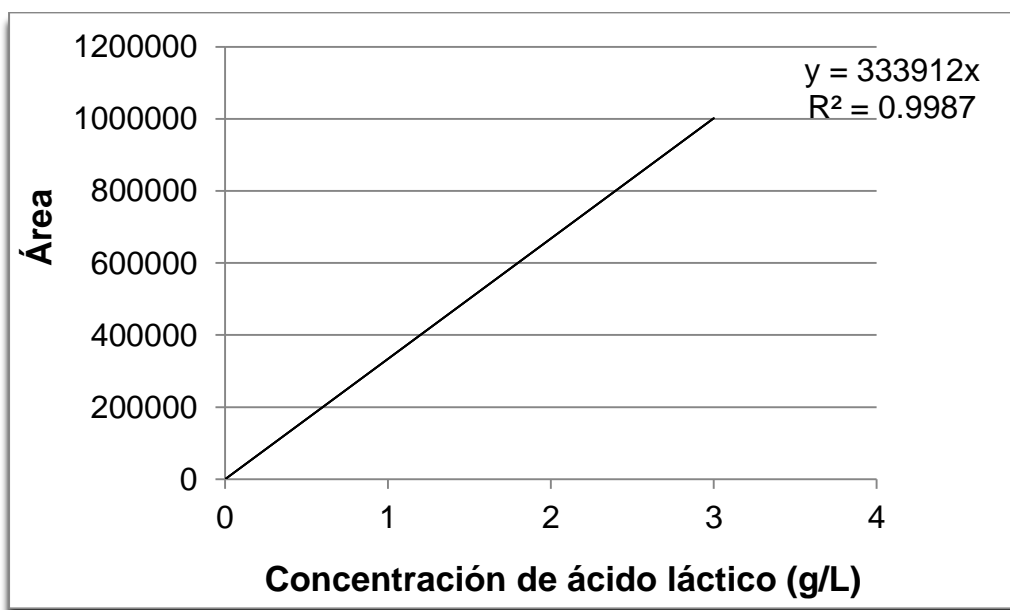
9

# ANEXOS

a) Curvas estándares para HPLC

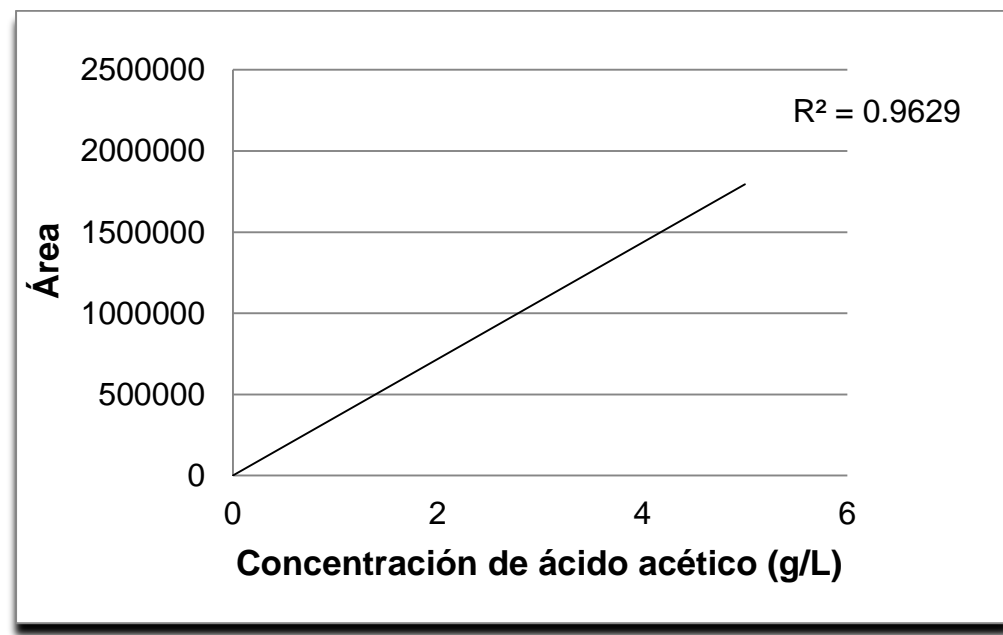
**ÁCIDO LÁCTICO**

Muestras	Concentración ácido láctico (g/L)	Área
1	0	0
2	0.5	138214
3	2	677460
4	2.5	839614
5	3	996074



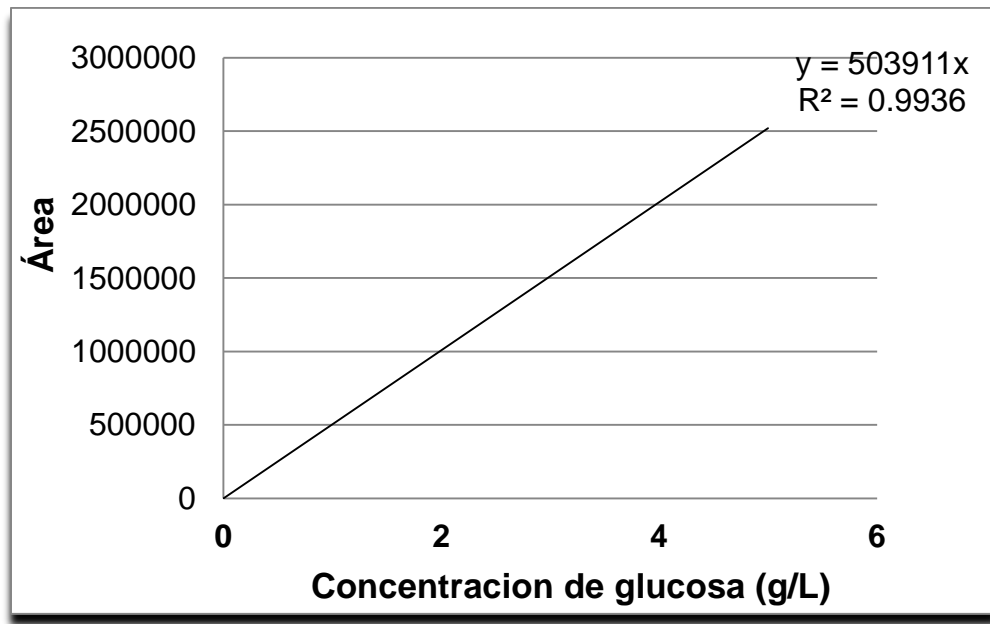
## ÁCIDO ACÉTICO

Muestra	Concentración ácido acético (g/L)	Área
1	0	0
2	1	241819.72
3	2	582608.5
4	3	890257.925
5	4	1430943.305
6	5	1986731.81



## GLUCOSA

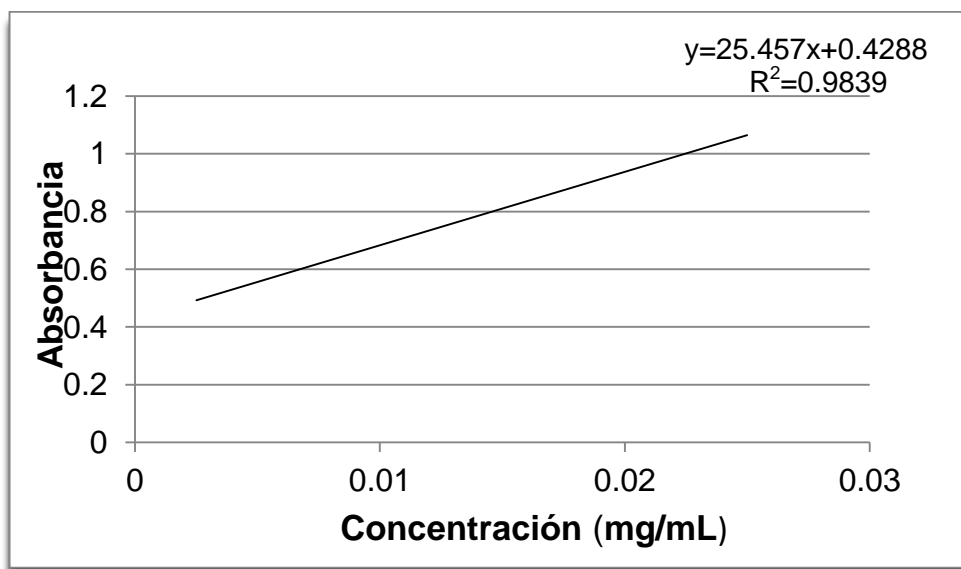
Muestra	Concentración glucosa (g/L)	Área
1	0	0
2	1	518077
3	2	986038.62
4	3	1360316.715
5	4	2057302.51
6	5	2582962.415





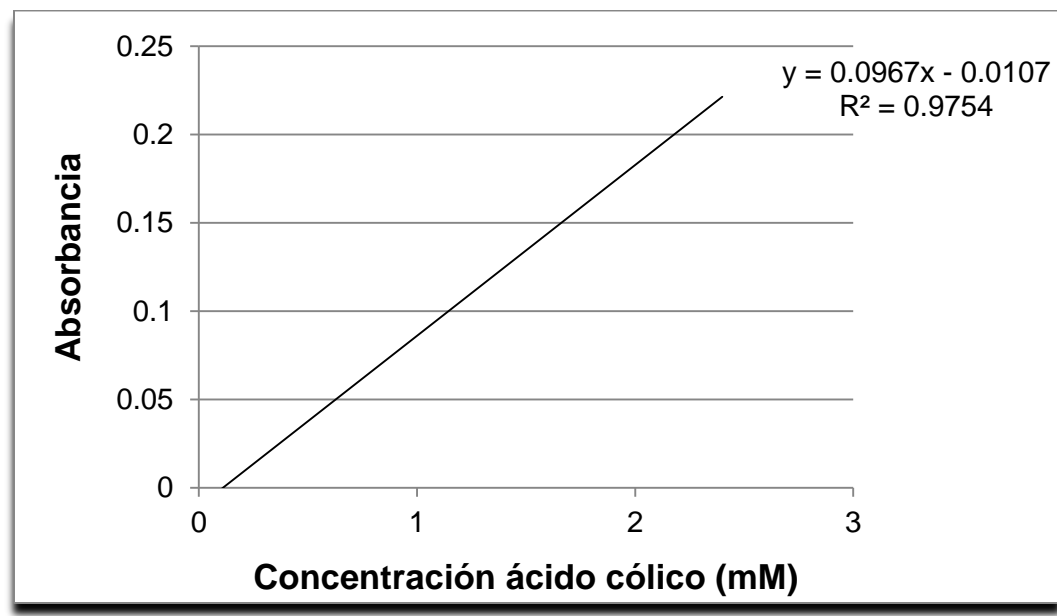
**b) Curva Patrón del método fenol sulfúrico**

Muestra	Concentración (mg/mL)	Absorbancia ( $\lambda=490$ nm)
1	0.0025	0.537
2	0.005	0.55
3	0.0075	0.61
4	0.01	0.651
6	0.015	0.7745
8	0.02	0.966
9	0.025	1.0555
10	0.025	1.087



C) Curva patrón de ácido cólico

Muestra	Concentración (mM)	Absorbancia ( $\lambda=660$ nm)
0	0	0
1	0.6	0.051
2	0.9	0.063
3	1.2	0.091
4	1.5	0.143
5	1.8	0.165
6	2.1	0.1785
7	2.4	0.238



#### d) Medios de cultivo utilizados en el desarrollo experimental

##### Caldo M.R.S.

El Caldo M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de Lactobacillus y de otras bacterias ácido lácticas.

Es utilizado para el cultivo, enriquecimiento Y aislamiento de Lactobacillus a partir de muestras clínicas y alimentos, especialmente lácteos.

##### *Fundamento*

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de Lactobacillus.

La peptona es fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de levadura es fuente de vitaminas y amino ácidos. La dextrosa es fuente de carbohidratos que proporciona carbono. El acetato de sodio y citrato de amonio, inhiben los estreptococos, hongos y otros microorganismos.

El sulfato de magnesio y sulfato de manganeso son fuente de iones inorgánicos. El tween 80° actúa como surfactante.

Componentes	g/L	Método de preparación
Peptona de proteosa N° 3	10.0	Rehidratar 55 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar de 10 a 15 minutos. Agitar frecuentemente hasta completa disolución. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.  pH final: 6.5 ± 0.2
Extracto de carne	10.0	
Extracto de levadura	5.0	
Dextrosa	20.0	
Polisorbato(Tween 80°)	1.0	
Fosfato disódico	2.0	
Acetato de sodio	5.0	
Citrato de amonio	2.0	
Sulfato de magnesio	0.1	
Sulfato de manganeso	0.05	