



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Estudio del efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp.**

**Mabel Nayibe Muñoz Caicedo**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2011



# **Estudio del efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp.**

**Mabel Nayibe Muñoz Caicedo**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Directora:

M.Sc., Microbióloga, Adelina del Pilar Meléndez

Línea de Investigación:

Calidad de los Alimentos

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2012



**NOTA DE ACEPTACION**

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Presidente del Jurado**

---

Jurado

---

Jurado

---

*A Dios por la oportunidad de cumplir un sueño más, a mi familia y muy especialmente a mi esposo por su comprensión, apoyo y amor.*

## **Agradecimientos**

El autor expresa sus agradecimientos a:

Los Profesores Pilar Meléndez y Javier Alméciga por su orientación, recomendaciones y compromiso en el presente estudio.

Cesar Ruiz y Guillermo Alba por su colaboración y asistencia en el Laboratorio de Microbiología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Felipe Guío por su colaboración y asistencia en el análisis de muestras por HPLC, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Ángela Mosquera y Alexander Rodríguez, del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración en la purificación y caracterización de los extractos proteicos y sus fracciones.

Oscar Sánchez por su apoyo, compromiso, recomendaciones y comentarios.





## Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto de los fructooligosacáridos (FOS) sobre el crecimiento y producción de bacteriocinas por cepas nativas de *Lactobacillus* aisladas de ensilaje de maíz y melaza. Se obtuvo un total de 28 aislados nativos que presentaron características bioquímicas comparables a especies comerciales de *Lactobacillus*. La presencia de FOS en el medio de cultivo mostró un efecto prebiótico frente a todos los aislados y cepas comerciales favoreciendo el aumento de la población viable en al menos un orden de magnitud frente al medio de cultivo con glucosa. Se obtuvo actividad antimicrobiana por parte de 9 extractos proteicos obtenidos del cultivo del mismo número de aislados, observándose un efecto positivo de la presencia de FOS durante el cultivo de los microorganismos. Esta actividad antimicrobiana, de acuerdo al método empleado para su medición, logró ser entre 1,25 y 4,60 veces mayor a la obtenida en medio de cultivo con glucosa. Los extractos proteicos producidos por los aislados LE5 y LE27 en medio enriquecido con FOS presentaron los mayores espectros de inhibición. Se observó actividad antimicrobiana sobre *L. innocua*, *L. monocytogenes*, y *E. faecalis* por el extracto producido por LE5; mientras que con el extracto producido por LE27 se observó adicionalmente la inhibición de *E. coli* y *S. enteritidis*.

**Palabras clave:** *Lactobacillus*, fructooligosacáridos, bacteriocinas, prebiótico, probiótico, ensilaje de maíz, melaza.

---

## Abstract

In this study was evaluated the effect of fructo-oligosaccharides (FOS) presence on the growth and bacteriocin production by native *Lactobacillus* strains isolated from corn silage and molasses. Twenty-eight native strains were isolated, which showed similar biochemical characteristics to those observed for commercial *Lactobacillus* strains. FOS presence in the culture medium caused the increment of viable cell counts for all the strains in at least one order of magnitude in comparison with the results obtained with glucose within the culture medium. Nine out of 28 of the crude protein extracts, produced by culturing the strains in a medium enriched with FOS, showed antimicrobial activity. According to the antimicrobial activity measuring method, this antibacterial activity was increased between ~1.25- and ~4.60-fold in regard to the antimicrobial activity exhibit by the crude protein extracts that resulted from culturing the strains into glucose media. The widest inhibitory spectrums were obtained by using the crude protein extracts from the strains LE5 and LE27 cultured in FOS-enriched medium. Antimicrobial activity against *L. innocua*, *L. monocytogenes*, and *E. faecalis* was obtained using the strain LE5, while using the strain LE27 inhibited in addition strains of *E. coli* and *S. enteritidis*.

**Keywords:** *Lactobacillus*, fructooligosaccharides, bacteriocins, prebiotic, probiotic, corn silage, molasses.

# Contenido

	Pág.
	<b>Resumen VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Estado del Arte.....</b>	<b>3</b>
1.1 Bacteriocinas.....	3
1.1.1 Características y clasificación .....	3
1.1.2 Mecanismo de acción.....	6
1.1.3 Usos .....	8
1.2 Probióticos .....	9
1.2.1 Bacterias ácido Lácticas (BAL) .....	9
1.3 Prebióticos .....	12
1.3.1 Fructooligosacáridos .....	13
1.4 Microorganismos Patógenos en Alimentos.....	17
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>25</b>
2.1 Muestras de melaza y ensilaje de maíz .....	25
2.2 Aislamiento de microorganismos .....	25
2.3 Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados.....	25
2.4 Efecto de fructooligosacáridos en la población de <i>Lactobacillus</i> .....	26
2.5 Producción del extracto crudo proteico.....	26
2.6 Crecimiento de los microorganismos patógenos .....	27
2.7 Prueba de actividad antimicrobiana .....	27
2.8 Selección de microorganismos promisorios.....	28
2.9 Purificación preparativa de bacteriocinas .....	28
2.10 Análisis de carbohidratos y ácidos orgánicos .....	29
2.11 Análisis estadístico.....	29
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>31</b>
3.1 Aislamiento e identificación bioquímica de <i>Lactobacillus</i> .....	31
3.2 Efecto de fructooligosacáridos en la población de <i>Lactobacillus</i> .....	33
3.3 Producción del extracto crudo proteico.....	36
3.3.1 Efecto del tiempo de cultivo sobre la población de <i>Lactobacillus</i> .....	36
3.3.2 Consumo de carbohidratos y producción de ácidos orgánicos.....	40

X Estudio del efecto de los fructooligosacáridos en la producción de bacteriocinas por aislados nativos de *Lactobacillus* spp.

---

3.3.3	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos ..	44
3.4	Selección de aislados promisorios y caracterización del extracto proteico producido .....	49
3.5	Caracterización de los extractos proteicos .....	58
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>61</b>
4.1	Conclusiones .....	61
4.2	Recomendaciones .....	62
<b>A.</b>	<b>Anexo: Curva de calibración de nisina frente <i>L. innocua</i> ATCC 33090.....</b>	<b>63</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>64</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1.</b> Grupo funcional lantionina, característico de las bacteriocinas de la Clase I o lantibioticos. ....	4
<b>Figura 1-2.</b> Prototipo de bacteriocina Clase I (Nisina). Formación de anillos (A, B, C, D, y E) en su estructura debido a los enlaces típicos de las lantioninas presentes (Modificado de Breukink and de Kruijff (2006)). ....	4
<b>Figura 1-3.</b> Esquema de la síntesis de lantibioticos. 1: Formación de la prebacteriocina. 2: Modificación de la prebacteriocina por LanB y LanC, translocada a través del transportador-ABC LanT y procesada por LanP, liberando la bacteriocina madura. 3: Sensado de la presencia de la bacteriocina y autofosforilación por la HPK (histidine protein kinase). 4: Transferencia del grupo fosforilo al regulador de respuesta (RR). 5: Activación de transcripción de genes regulados por el regulador de respuesta. 6: Producción de protector (Tomado de Hoover and Chen, (2005)). ....	5
<b>Figura 1-4.</b> Prototipo de bacteriocina Clase II (Pediocina) (Hoover and Chen 2005). ....	6
<b>Figura 1-5.</b> Esquema de la síntesis de bacteriocinas Clase II. 1: Formación de la prebacteriocina y prepeptido del factor de inducción (IF). 2: La prebacteriocina y el prepeptido-IF son procesados y translocados a través del transportador-ABC, liberando la bacteriocina madura y a IF. 3: Sensado de la presencia de IF y autofosforilación por la HPK (histidine protein kinase). 4: Transferencia del grupo fosforilo al regulador de respuesta (RR). 5: Activación de transcripción de genes regulados por el regulador de respuesta. 6: Producción de protector (Tomado de Hoover & Chen, (2005)). ....	7
<b>Figura 1-6.</b> Modelo del mecanismo de acción dual de la nisina de <i>Lactococcus lactis</i> (Tomado de Lopez,(2008)).Etapa 1, la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Etapa 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular. Etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular. ....	8
<b>Figura 1-7.</b> Principales rutas metabólicas de la glucosa. Ruta fermentativa homoláctica (a), y ruta fermentativa heteroláctica (b) (Tomado de Axelsson (2004)). ....	12
<b>Figura 1-8.</b> Estructura química de fructooligosacáridos. (a) 1-kestosa, (b) nistosa, (c) 1-β-fructofuranosilnistosa (adaptado de Guio <i>et al.</i> (2009)). ....	14
<b>Figura 1-9.</b> Diagrama general para la producción de FOS empleando el extracto crudo enzimático o la biomasa (Tomado de Guío <i>et al.</i> (2009)). ....	17

<b>Figura 1-10.</b> Informe etiológico de brotes de ETA en Colombia en el 2007 (Tomado del reporte SIVIGILA Instituto Nacional de Salud).....	20
<b>Figura 1-11.</b> Mecanismo patogénico de intoxicación con enterotoxina de <i>S. aureus</i> (Tomado de Ray y Bhunia, (2008 )) y microscopia de contraste de fases de la bacteria.	21
<b>Figura 1-12.</b> Diagrama de la secuencia de eventos para <i>E. coli</i> enteropatogénico durante la infección de enterocitos. 1. Expresión de los factores de adhesión, 2. Inicia la adhesión localizada, 3. Señal de transducción y contacto íntimo, y 4. Rearreglo del citoesqueleto y formación del pedestal. (Adaptado de Clark <i>et al.</i> (2003)).	22
<b>Figura 1-13.</b> Secuencia de la patogénesis de la diarrea inducida por Salmonella entérica (Adaptado de Bhunia, (2008)).	22
<b>Figura 1-14.</b> Mecanismo de acción de la BoNT (Tomado de Arnon <i>et al.</i> (2001)).	23
<b>Figura 1-15.</b> Microscopía de contraste de fases de <i>B. cereus</i> , las flechas indican esporas (Tomado de Bhunia, (2008)).	24
<b>Figura 3-1.</b> Diferencia de DO <sub>600</sub> de las cepas de referencia y de los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS y MRS-FOS (■,1%; ■,2%; □,5%) al cabo de 48 h de cultivo.	34
<b>Figura 3-2.</b> Unidades formadoras de colonia (UFC mL <sup>-1</sup> ) de las cepas de referencia y de los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS (■) y MRS-FOS (■,1%; ■,2%; □,5%) al cabo de 48 h de cultivo.	35
<b>Figura 3-3.</b> Efecto del tiempo de cultivo (□,24h; ■,48 h) sobre el pH final y las unidades formadoras de colonia Log <sub>10</sub> (UFC mL <sup>-1</sup> ) de las cepas de referencia y de los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS.	37
<b>Figura 3-4.</b> Efecto del tiempo de cultivo (□,24h; ■,48 h) sobre el pH final y las unidades formadoras de colonia Log <sub>10</sub> (UFC mL <sup>-1</sup> ) de las cepas de referencia y de los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS-FOS al 2%.	38
<b>Figura 3-5.</b> Consumo de FOS (■,1-kestosa; ■,nistosa; □,1-fructofuranosil nistosa) por las cepas de referencia y los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS-FOS al 2% al cabo de 48 h de cultivo.	41
<b>Figura 3-6.</b> Producción de ácido láctico por las cepas de referencia y de los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS (□) y MRS-FOS al 2% (■) al cabo de 48 h de cultivo.	42
<b>Figura 3-7.</b> Producción de ácido acético por las cepas de referencia y de los aislados nativos de <i>Lactobacillus</i> cultivadas en MRS (□) y MRS modificado con FOS 2% (■) al cabo de 48 h de cultivo.	43
<b>Figura 3-8.</b> Efecto de la concentración de ceftriaxona (a) y ampicilina (b) sobre la inhibición del crecimiento sobre los microorganismos patógenos seleccionados.	45
<b>Figura 3-9.</b> Actividad antimicrobiana de la ceftriaxona (C) y ampicilina (A) mediante la prueba de difusión en gel para <i>S. marcescens</i> (a) y <i>E. coli</i> (b), respectivamente. Las concentraciones (μg mL <sup>-1</sup> ) evaluadas de cada antibiótico fueron: 1: 7,81 (C) – 500 (A); 2: 3,95 (C) – 200 (A); 3: 1,95 (C) – 100 (A); 4: 0,97 (C) – 50 (A); 5: control negativo, agua estéril.	46
<b>Figura 3-10.</b> Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos producidos por aislados nativos, frente a <i>L. innocua</i> (a), actividades en los pozos 1 a 6 corresponden	

a extractos proteicos obtenidos por diferentes aislados nativos cultivados en MRS y MRS-FOS, pozo 7 control positivo con nisina; *E. faecalis* (b), actividades en los pozos 1 (LE5), 6 (LE27), 3 (LE5), y 4 (LE5), corresponden al extractos proteicos obtenido de cultivos en MRS-FOS, ausencia de actividad en los pozos 2 (LE5) y 5(LE27) por extractos obtenidos de cultivos en MRS, pozo 7 control negativo; *E. faecalis* (c) pozos 1 a 6 con extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo de LE5 en MRS-FOS, pozo 7 control positivo con nisina; *L. monocytogenes* (d) pozos 1 y 2 con extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo de LE5 en MRS, pozos 3 a 6 con extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo de LE5 en MRS-FOS, pozo 7 control positivo con nisina; *S. enteritidis* (e) pozos 1 a 4 con extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo de LE27 en MRS-FOS, pozo 5 control positivo con ceftriaxona; *L. innocua* (f) prueba de diluciones del 50% sobre el extracto proteico obtenido por el cultivo de LE27 en MRS-FOS para obtener las unidades arbitrarias (UA).

.....47

**Figura 3-11. (a)** Perfiles de Log<sub>10</sub> (UFC mL<sup>-1</sup>), (–); DO<sub>600</sub>, (—); y pH, (símbolos llenos) obtenidos del cultivo del aislado LE5 (a) en presencia de glucosa, (○); FOS 1%, (◇); FOS 2%, (Δ); y FOS 5% (□). **(b)** Actividad antimicrobiana exhibida por los extractos proteicos frente *L. innocua* (glucosa, (■); FOS 2%, (□); y FOS 5%, (■)). ..... 51

**Figura 3-12. (a)** Perfiles de Log<sub>10</sub> (UFC mL<sup>-1</sup>), (–); DO<sub>600</sub>, (—); y pH, (símbolos llenos) obtenidos del cultivo del aislado LE27 (a) en presencia de glucosa, (○); FOS 1%, (◇); FOS 2%, (Δ); FOS 5% (□). **(b)** Actividad antimicrobiana exhibida por los extractos proteicos frente *L. innocua* (glucosa, (■); FOS 2%, (□); y FOS 5% (■)). ..... 52

**Figura 3-13.** Perfiles de producción de ácidos orgánicos (ácido láctico (■) y ácido acético (▲)), consumo de glucosa (a, □), FOS 2%, (b) y FOS 5%, (c); (Δ,1-kestosa; □, nistosa; ○, fructofuranosil nistosa; ◇, sacarosa) durante el crecimiento del aislado LE5. .... 54

**Figura 3-14.** Perfiles de producción de ácidos orgánicos (ácido láctico (■) y ácido acético (▲)), consumo de glucosa (a, □), FOS 2%, (b) y FOS 5%, (c); (Δ,1-kestosa; □, nistosa; ○, fructofuranosil nistosa; ◇, sacarosa) durante el crecimiento del aislado LE27. .... 55

**Figura 3-15.** Caracterización de los extractos crudos y ultrafiltrados (UF) de los aislados LE5 y LE27. Los extractos y ultrafiltrados fueron analizados por SDS-PAGE y la actividad fue evaluada mediante ensayo de inhibición colocando el gel de electroforesis en sobre agar BHI previamente contaminado con *L. innocua*. La flecha indica la zona de inhibición observada tras 48 h de incubación. M = marcador de masa molecular en kDa. .... 59

**Figura A-1.** Efecto de la concentración sobre la actividad antimicrobiana para la nisina frente a *L. innocua* ATCC 33090. .... 63

## Lista de tablas

### Pág.

<b>Tabla 1-1.</b> Ejemplo de bacteriocinas, fuentes, actividad y aplicación biomédica. ....	9
<b>Tabla 1-2.</b> Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas (Tomado de Axelsson (2004)). ....	10
<b>Tabla 1-3.</b> Subclasificación de las especies del género <i>Lactobacillus</i> (Axelsson 2004). .	11
<b>Tabla 1-4.</b> Características generales de los ONDs más comunes (Collins and Gibson 1999). ....	13
<b>Tabla 1-5.</b> Frutas y vegetales productores de FOS (adaptado de Yun (1996)) .....	14
<b>Tabla 1-6.</b> Microorganismos productores de FOS (adaptado de Yun (1996)) .....	15
<b>Tabla 1-7.</b> Microorganismos patógenos en alimentos (Tomado de Bhunia (2008)). ....	18
<b>Tabla 1-8.</b> Tiempo de vida sobre superficies inanimadas de microorganismos patógenos en alimentos (Adaptado de Bhunia, (2008)). ....	19
<b>Tabla 1-9.</b> Número de brotes reportados y casos de enfermedad de ETA en USA, 2007, y los promedios anuales para el periodo 2002-2006 (Tomado de Boore <i>et al.</i> (2010)). ....	19
<b>Tabla 3-1.</b> Resultados de las pruebas físico-químicas y bioquímicas realizadas a los aislados nativos y cepas de referencia de <i>Lactobacillus</i> . ....	32
<b>Tabla 3-2.</b> Relación molar entre los ácidos acético y láctico producidos al cabo de 48 h de cultivo en medios MRS y MRS-FOS por las diferentes cepas. ....	44
<b>Tabla 3-3.</b> Actividad antimicrobiana evaluada mediante difusión en gel por los extractos proteicos producidos por el cultivo de aislados nativos en MRS y MRS-FOS al cabo de 24 y 48 h. Los datos se presentan como la media de 6 lecturas, ( $\phi_{\text{final}} - \phi_{\text{pozo}}$ ) junto con la desviación estándar. ....	48
<b>Tabla 3-4.</b> Parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos para los aislados promisorios cultivados en MRS o MRS-FOS. ....	57



# Introducción

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas (Monroy-Dosta et al. 2009), resistentes al calor e hidrolizadas por las proteinasas gástricas, lo que permite su posible utilización como conservadores naturales de los alimentos (González-Martínez et al. 2003). El empleo de productos biológicos como las bacteriocinas para inhibir o destruir a microorganismos patógenos, es un método de gran interés en la industria alimentaria que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), cada una con espectros de inhibición particulares. Esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables estrechamente relacionadas con el productor de la bacteriocina y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos como *Staphylococcus sp.* y *Listeria sp.*, respectivamente (González-Martínez et al. 2003). El uso de cepas probióticas productoras de bacteriocinas resulta una estrategia interesante para restringir o reducir el uso de antibióticos, debido a que estos han provocado marcadas resistencias bacterianas, destrucción de los ecosistemas y elevados costos de producción (Monroy-Dosta et al. 2009).

Actualmente, se está desarrollando un fuerte interés por la identificación, purificación y producción de bacteriocinas para su aplicación en el campo de la producción animal. Sin embargo, se requieren de más estudios sobre la identificación de bacteriocinas de cepas utilizadas como probióticas (Monroy-Dosta et al. 2009), las cuales son afectadas de forma favorable por los prebióticos, al aumentar la población de los probióticos. Los prebióticos son considerados carbohidratos no digeribles y constituyen parte de la formulación de los alimentos funcionales. Dentro de los diferentes prebióticos los más destacados son los fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y la lactulosa (Guio et al. 2009; OMGE 2008).

Colombia es uno de los países del mundo con mayor diversidad de organismos debido a las diferentes condiciones climáticas y sistemas ecológicos que se pueden encontrar (Melgarejo et al. 2002). Lo que ha generado que varios estudios y desarrollos biotecnológicos se lleven a cabo debido al aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos con diferentes perfiles metabólicos. Esto unido a la existente necesidad de controlar de forma natural microorganismos oportunistas y patógenos que descomponen alimentos y son causantes de enfermedades y que prosperan en ambientes con poco control sanitario o donde se pueda presentar una contaminación cruzada por mala manipulación de alimentos y/o utensilios; así, como el interés industrial de preservar los alimentos mediante métodos físicos y su combinación con sustancias naturales con poder antimicrobiano de fuentes no patógenas y consideradas seguras o

GRAS (*Generally Recognized as Safe*), ha generado la necesidad de buscar microorganismos potenciales tales como los *Lactobacillus*.

La búsqueda y caracterización de estos aislados nativos que produzcan metabolitos con actividad antimicrobiana, específicamente bacteriocinas, se presenta como una etapa inicial para el futuro desarrollo de procesos industriales y productos naturales para la conservación de alimentos. Al ser los *Lactobacillus* considerados como probióticos, es de interés evaluar la posible potencialización o no de la actividad antimicrobiana de estas bacteriocinas, producidas por el cultivo del microorganismo en medios modificados, donde la fuente de carbono sea un prebiótico como lo son los fructooligosacáridos.

A pesar de que se han publicado varios estudios evaluando el efecto de algunos prebióticos sobre la población de microorganismos probióticos, y se ha evaluado la cinética de hidrólisis de prebióticos como los fructooligosacáridos, poco se ha estudiado el efecto que los prebióticos puedan tener sobre la producción de bacteriocinas de estos microorganismos probióticos. El objetivo general del presente estudio es evaluar el efecto de fructooligosacáridos en la producción y actividad de bacteriocinas de aislados nativos de *Lactobacillus* spp de melazas y ensilaje de maíz. Se aislaron cepas de *Lactobacillus* spp. a partir de melazas y ensilaje de maíz, se identificaron cepas de *Lactobacillus* spp. productoras de bacteriocinas, se evaluó el efecto de los fructooligosacáridos sobre la producción de bacteriocinas y el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* spp identificadas, y evaluó *in vitro* la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas obtenidas sobre algunos patógenos potenciales en alimentos.

Con el aislamiento e identificación de potenciales microorganismos productores de bacteriocinas especialmente *Lactobacillus* aislados de melazas y ensilaje de maíz, y la evaluación de los fructooligosacáridos en la producción de estas bacteriocinas, se pretende dar una alternativa al control de microorganismos patógenos que pueden estar presentes en los alimentos, así como alargar la vida de preservación del mismo. De igual forma, es una etapa inicial en la búsqueda de un producto con aplicación industrial.

# 1. Estado del Arte

## 1.1 Bacteriocinas

En la actualidad los consumidores se encuentran más interesados en adquirir productos naturales, con un mayor valor nutricional y menor cantidad de aditivos químicos. Debido a esto, el consumo de alimentos fermentados ha surgido como una alternativa debido a las propiedades de textura, sabor y conservación que microorganismos, como las bacterias ácido lácticas (BAL), le confieren al alimento (Caplice and Fitzgerald 1999; McKay and Baldwin 1990). Estas propiedades benéficas se han visto incluso con el crecimiento de BAL en alimentos no fermentados (Castellano et al. 2004; Vold et al. 2000).

La biopreservación, referida como el incremento de la vida propia del alimento o a la mejora de su seguridad usando microorganismos o sus metabolitos, ha surgido como producto de las tendencias antes mencionadas y a las propiedades de los alimentos fermentados por BALs (Ross et al. 2002). Como reporta Cotter *et al.* (2005), las bacteriocinas se pueden emplear para conferir inmunidad innata a los alimentos. Desde hace varios años las bacteriocinas, al igual que los BALs, han sido consumidos por el hombre como subproductos de los BALs. Por esta razón son considerados como ingredientes naturales en los alimentos (Settanni and Corsetti 2008), y tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir son consideradas como seguras para la salud (Monroy-Dosta et al. 2009).

Las bacteriocinas son definidas como péptidos que presentan propiedades antimicrobianas (Papagianni 2003). Siendo su principal función la defensa del huésped contra microorganismos patógenos (Papagianni 2003). Las bacteriocinas se diferencian de los antibióticos en al menos dos características: 1) mientras las bacteriocinas son péptidos, los antibióticos son metabolitos secundarios, y 2) el espectro de inhibición de las bacteriocinas es estrecho ya que usualmente son activas contra microorganismos cercanos al microorganismo que las produce (Riley and Wertz 2002a; Rodriguez et al. 2002).

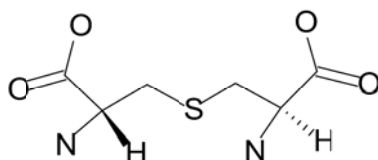
### 1.1.1 Características y clasificación

De forma general se pueden establecer una serie de características de las bacteriocinas producidas tanto por microorganismos Gram-positivos como Gram-negativos. Dentro de estas se encuentra su síntesis en el ribosoma con tamaños de entre 30 y 40 aminoácidos y acción frente bacterias estrechamente relacionadas con el organismo productor aunque también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Monroy-Dosta et al. 2009). Adicionalmente, algunas bacteriocinas son estables al calor, activas en intervalos amplios de pH y fácilmente degradadas por proteasas intestinales

(Hill 2010). De esta manera, la gran mayoría de las bacteriocinas cumplen con las características que requiere un producto para utilizarse como bioconservador.

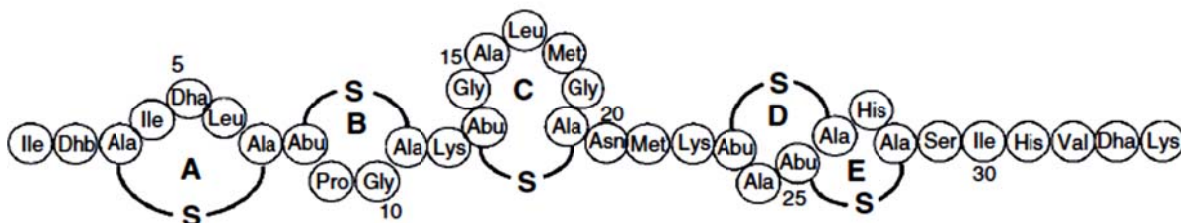
Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, que son más abundantes y poseen mayor diversidad estructural en relación con las producidas por otros grupos bacterianos, presentan un espectro de acción amplio y pueden inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, virus, e incluso de células eucariotas como eritrocitos humanos y bovinos (López-M. et al. 2008).

Debido a que las bacteriocinas son producidas en una mayor proporción por microorganismos Gram-positivos, especialmente BALs, reviste un mayor interés la clasificación de este tipo de bacteriocinas. Aunque se han propuesto diferentes clasificaciones, la más reciente y sencilla es propuesta por Cotter *et al.* (2005), quien propone únicamente dos grupos o clases: la Clase I, o lantibióticos, a la cual pertenecen las bacteriocinas que contienen lantionina (Fig. 1-1), y la Clase 2 para las demás bacteriocinas.



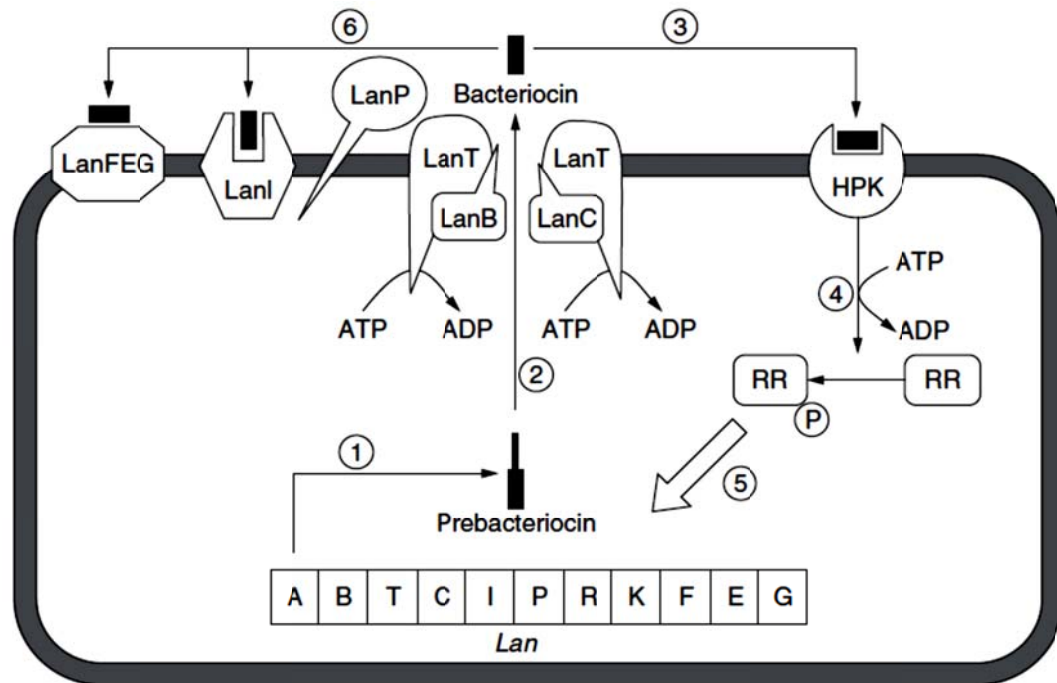
**Figura 1-1.** Grupo funcional lantionina, característico de las bacteriocinas de la Clase I o lantibióticos.

La Clase I se ha subdividido en tres subclases de acuerdo a su actividad antimicrobiana y mecanismo de acción. Los lantibióticos se caracterizan por ser péptidos termoresistentes de entre 19 a 39 aminoácidos. Contienen residuos de lantionina o metil-lantionina formados por modificaciones postraduccionales, tales como la deshidratación de residuos de serina y treonina a 2,3-dehidroalanina y (Z),2,3-dehidrobutirina, que se unen de forma covalentemente con la cisteína para dar origen a la lantionina y metillantionina, respectivamente. Estas interacciones dan origen a la configuración característica de los anillos estructurales de los lantibióticos (Fig. 1-2). Dentro de esta clase de bacteriocinas se encuentra la Nisina, Mutacina, Salivaricina, Estreptococina, Planataricina y Bovicina, entre otras (Muñoz et al. 2011 (In press)).



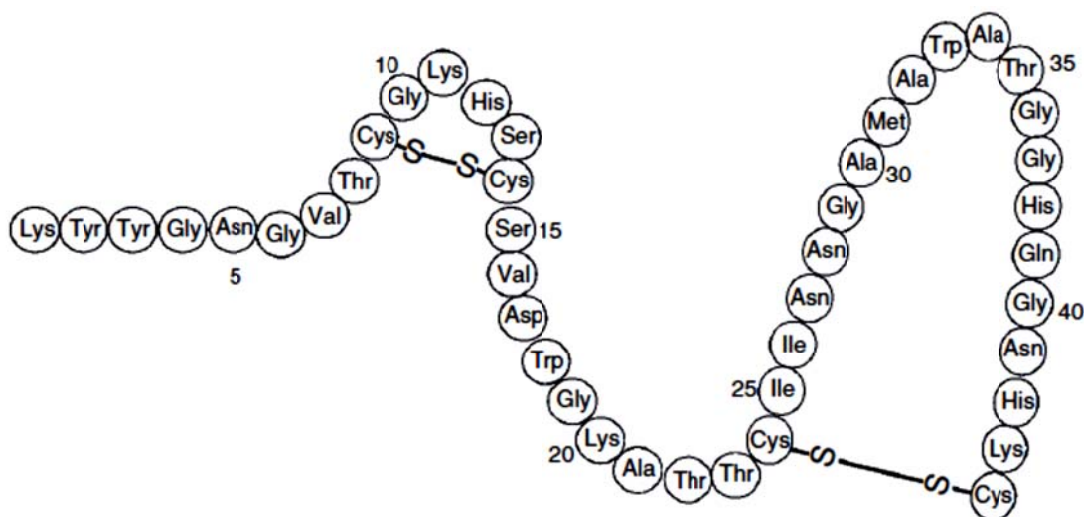
**Figura 1-2.** Prototipo de bacteriocina Clase I (Nisina). Formación de anillos (A, B, C, D, y E) en su estructura debido a los enlaces típicos de las lantioninas presentes (Modificado de Breukink and de Kruijff (2006)).

La ruta biosintética de producción de lantibioticos se realiza en varias etapas que incluyen: 1) generación de un prepéptido inactivo, 2) modificaciones postraduccionales, 3), escisión proteolítica del péptido líder, y 4) la translocación del prepéptido modificado o del propéptido maduro a través de la membrana citoplasmática (Fig. 1-3). La escisión del péptido líder puede ocurrir antes, durante o luego de la exportación desde la célula. Durante este proceso participan las enzimas LanB, LanC, LanP, transportador ABC LanT encargadas de la reacción de deshidratación, formación de tioeter, serin proteasa y translocación, respectivamente (Fig. 1-3) (Hoover and Chen 2005).



**Figura 1-3.** Esquema de la síntesis de lantibioticos. 1: Formación de la prebacteriocina. 2: Modificación de la prebacteriocina por LanB y LanC, translocada a través del transportador-ABC LanT y procesada por LanP, liberando la bacteriocina madura. 3: Sensado de la presencia de la bacteriocina y autofosforilación por la HPK (histidine protein kinase). 4: Transferencia del grupo fosforilo al regulador de respuesta (RR). 5: Activación de transcripción de genes regulados por el regulador de respuesta. 6: Producción de protector (Tomado de Hoover and Chen, (2005)).

Las bacteriocinas de la Clase II, se caracterizan por ser pequeñas, termoresistentes y no contienen lantionina por lo cual no están sometidas a grandes cambios postraduccionales. La mayoría de estas bacteriocinas son activas en concentraciones nanomolares y el mecanismo de acción principalmente se basa en la formación de poros en la membrana celular. Cotter *et al.* (2005) propone cuatro subclases: subclase a para las bacteriocinas similares a la pediocina (Fig. 1-4), subclase b para las que contienen dos péptidos, subclase c para las cíclicas, y subclase d para las bacteriocinas lineales y que difieren a la pediocina.



**Figura 1-4.** Prototipo de bacteriocina Clase II (Pediocina) (Hoover and Chen 2005).

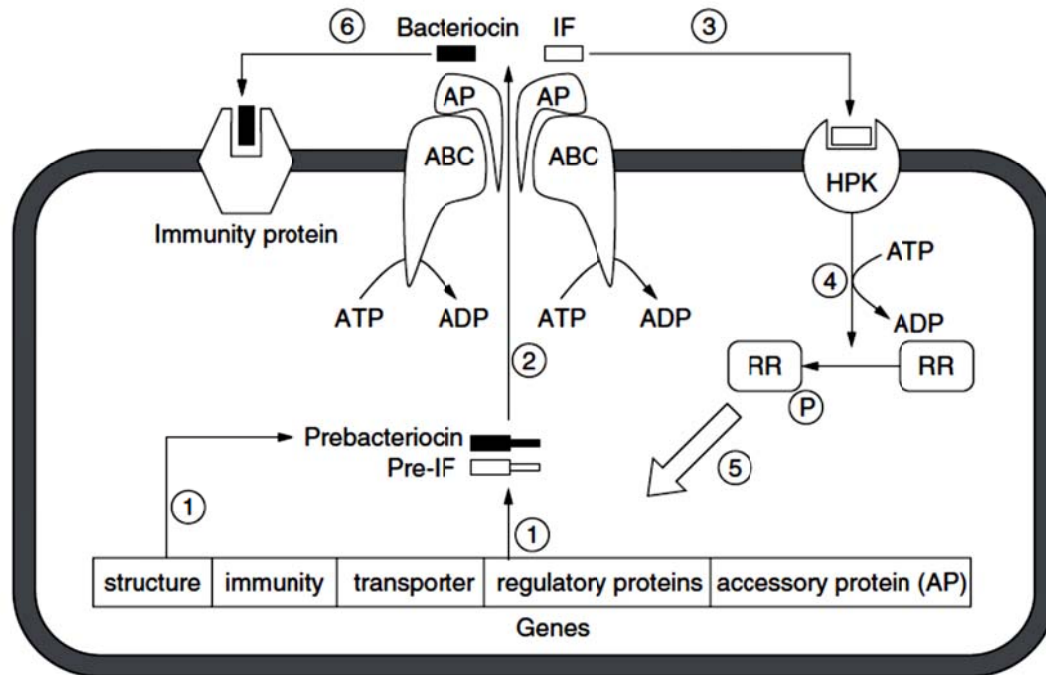
De estas cuatro subclases, las Clases IIa y IIb han sido las más estudiadas y revisten gran importancia debido a su abundancia. Las bacteriocinas de la Clase IIa tienen un tamaño de entre 27 a 48 aminoácidos y presentan un espectro de acción reducido, aunque son potentes contra *Listeria monocytogenes*. Los genes que codifican para este tipo de bacteriocinas se encuentran localizados en plásmidos, a excepción de los genes que codifican para la enterocina A y sakacina P, los cuales se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano. Las bacteriocinas de la Clase IIb, se caracterizan por presentar un efecto de sinergia por la presencia de los dos péptidos complementarios. Se diferencian de otras bacteriocinas, dado que los dos péptidos se encuentran codificados por un mismo operón. Es común que uno de los dos péptidos, o los dos, no presenten actividad cuando se encuentran separados (Eijsink et al. 2002).

La ruta biosintética de las bacteriocinas de la Clase II es similar a la de los lantibióticos, donde se presenta la producción de un prepeptido inactivo que se caracteriza por tener un péptido líder N-terminal altamente conservado y una doble glicina en el sitio proteolítico. A diferencia de los lantibióticos no se presentan altos procesos post-translacionales. Una vez formado el prepeptido, este es procesado para remover el péptido líder y simultáneamente es exportado a través del transportador ABC y su proteína accesoria (Fig. 1-5) (Hoover and Chen 2005)).

### 1.1.2 Mecanismo de acción

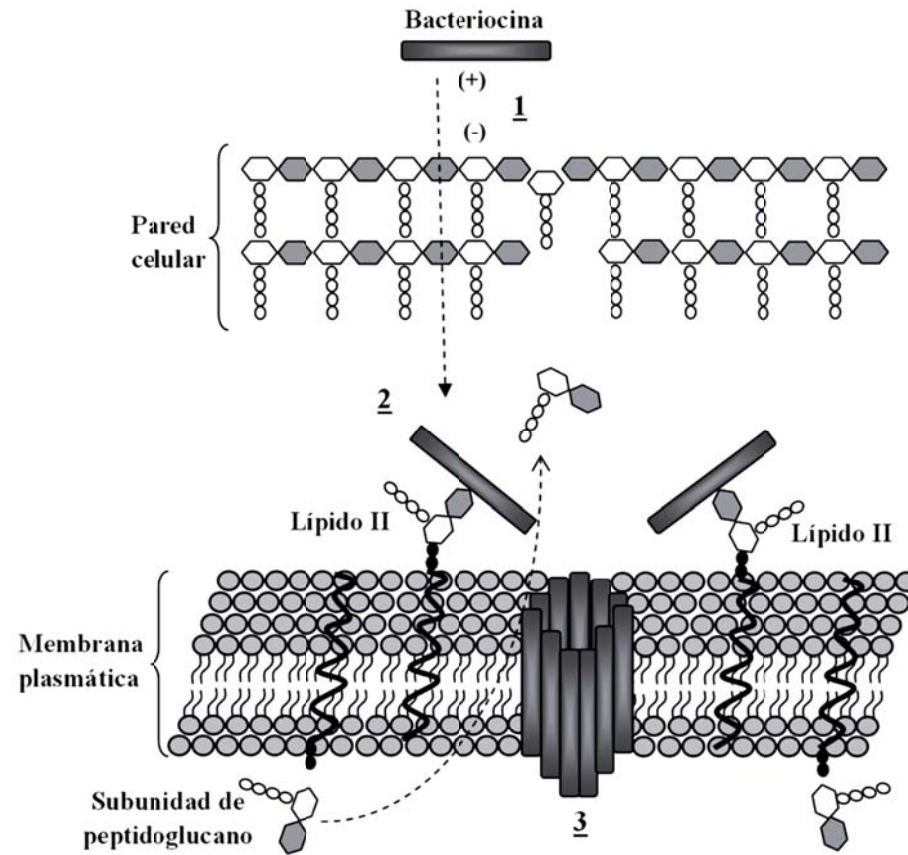
Entre los mecanismos de acción reportados para las bacteriocinas se destacan varias características esenciales para que puedan llevar a cabo su actividad antimicrobiana independiente del blanco celular, membrana o pared celular, así como por la interacción con algunas proteínas importantes en el metabolismo de la célula. Las bacteriocinas poseen una carga neta positiva que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram-negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram-positivas. La hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, así como su flexibilidad, que le permite realizar un cambio conformacional de un estado

soluble a uno de interacción con la membrana. Estas características varían de molécula a molécula, no obstante, todas son importantes para la actividad antimicrobiana (López-M. et al. 2008).



**Figura 1-5.** Esquema de la síntesis de bacteriocinas Clase II. 1: Formación de la prebacteriocina y prepeptido del factor de inducción (IF). 2: La prebacteriocina y el prepeptido-IF son procesados y translocados a través del transportador-ABC, liberando la bacteriocina madura y a IF. 3: Sensado de la presencia de IF y autofosforilación por la HPK (histidine protein kinase). 4: Transferencia del grupo fosforilo al regulador de respuesta (RR). 5: Activación de transcripción de genes regulados por el regulador de respuesta. 6: Producción de protector (Tomado de Hoover & Chen, (2005)).

Los mecanismos de acción incluyen: 1) la formación de poros en la membrana celular, lo que causa la pérdida del contenido celular, éste es el mecanismo descrito para las bacteriocinas nisina y lactoquinina A de *L. lactis* (Fig. 1-6); 2) la inhibición de la síntesis de la pared celular, mecanismo de acción descrito para la mersacidina, que involucra la unión al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano (UDPMur-Nac-pentapéptido-GlcNAc); y 3) la inhibición de la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2, que participa en la reparación de membranas, mecanismo reportado para la cinamicina de *Streptomyces cinnamoneus* (López-M. et al. 2008; Monroy-Dosta et al. 2009; OMGE 2008).



**Figura 1-6.** Modelo del mecanismo de acción dual de la nisina de *Lactococcus lactis* (Tomado de Lopez,(2008)).Etapa 1, la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Etapa 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular. Etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular.

### 1.1.3 Usos

Con el desarrollo comercial de la nisina (bacteriocina producida por *L. lactis*), y el uso de herramientas de la biología molecular e ingeniería genética, ha surgido un interés en el estudio de las bacteriocinas, particularmente en sus aplicaciones biomédicas y en la bioconservación de alimentos (López-M. et al. 2008). Debido a la demanda de alimentos libres de microorganismos patógenos, con una larga vida de almacenamiento y sin conservadores químicos, las bacteriocinas son una opción atractiva que podría ofrecer al menos parte de la solución. Su interés radica en que estas moléculas inhiben numerosos microorganismos patógenos en alimentos, son estables al calor y son activas en intervalos amplios de pH. La carencia de toxicidad demostrada por las bacteriocinas hacia el hombre y animales, pero con una actividad dirigida hacia bacterias patógenas de éstos, ha permitido que se investiguen sus potenciales aplicaciones en terapias



biomédicas. En particular, los mecanismos de acción de las bacteriocinas y su actividad en contra de patógenos resistentes a las terapias convencionales con antibióticos, las convierten en una opción atractiva como posibles agentes antimicrobianos. La Tabla 1-1 presenta las principales aplicaciones biomédicas de algunas bacteriocinas.

**Tabla 1-1.** Ejemplo de bacteriocinas, fuentes, actividad y aplicación biomédica.

<b>Bacteriocina y Cepa productora</b>	<b>Actividad</b>	<b>Aplicaciones biomédicas potenciales</b>
<b>Nisina</b> <i>Lactococcus lactis</i>	Inhibe bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo <i>Helicobacter pylori</i>	Mastitis bacteriana, higiene bucal, tratamiento de <i>S. aureus</i> resistente a metilina, infecciones enterococales, formulaciones tópicas, desodorantes y cosméticos, tratamiento de úlceras pépticas y enterocolitis.
<b>Epidermina</b> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Inhibe <i>Propionibacterium acnes</i> , estafilococos, estreptococos	Acné, foliculitis, impétigo
<b>Mersacidina</b> <i>Bacillus spp</i>	Inhibe cepas de estafilococos y estreptococos	Tratamiento de <i>S. aureus</i> resistentes a metilina e infecciones estreptococales
<b>Cinamicina</b> <i>Streptomyces cinnamoneus</i>	Inhibidor de fosfolipasa A2, enzima convertidora de angiotensina y virus de herpes simple	Disminución de la inflamación, regulación de la presión sanguínea y tratamiento por infecciones virales

## 1.2 Probióticos

Los probióticos han sido definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), como aquellos microorganismos vivos cuya ingestión en cierta cantidad tiene un efecto benéfico, más allá de un efecto nutricional, sobre la salud del huésped (Hori 2010). Los lactobacilos y bifidobacterias son los más empleados como probióticos. Sin embargo, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y algunas cepas de *Escherichia coli* son también empleadas para este fin (Hori 2010).

### 1.2.1 Bacterias ácido Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BALs) están constituidas por un grupo de bacterias Gram-positivas unidas por características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción más general de las bacterias incluidas en este grupo es que son bacterias Gram-positivas, no esporulantes, cocos o bacilos anaerobios pero aerobios tolerantes, catalasa negativas, ácido tolerantes y productoras ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos (Axelsson 2004). El término BAL está asociado

íntimamente con las bacterias presentes en las superficies mucosas del hombre y animales.

### ▪ Clasificación

Los grupos que históricamente se han considerado como BALs desde el punto de vista de la tecnología de alimentos son los pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Aunque el género *Bifidobacterium* es considerado como BAL filogénicamente no se encuentra relacionado con las anteriores, y tiene un único modo de fermentar el azúcar. La clasificación de las BAL en diferentes géneros se ha basado en la morfología, en el modo de fermentar la glucosa, en el crecimiento a diferentes temperaturas, en la configuración del ácido láctico producido, en la habilidad para crecer en altas concentraciones de sal y tolerancia ácida o alcalina (Axelsson 2004). Recientemente se ha empleado para su clasificación la secuenciación del gen 16S del rRNA, y el patrón de proteínas solubles. La Tabla 1-2 presenta las características generales para la clasificación de las BAL.

**Tabla 1-2.** Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas (Tomado de Axelsson (2004)).

Característica	Bacilos				Cocos				
	<i>Carno b</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc</i>	<i>Lactoc Vagoc.</i>	<i>Leucon. Oenoc</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc</i>
Formación de tetradas	—	—	+	—	—	—	+	—	+
CO <sub>2</sub> a partir de glucosa <sup>a</sup>	— <sup>b</sup>	±	—	—	—	+	—	—	—
Crecimiento 10°C	+	±	+	+	+	+	±	—	+
Crecimiento 45 °C	—	±	—	+	—	—	±	±	—
Crecimiento 6.5 % NaCl	ND <sup>c</sup>	±	+	+	—	±	±	—	+
Crecimiento 18 % NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—	+
Crecimiento pH 4.4	ND	±	—	+	±	±	+	—	—
Crecimiento pH 9.6	—	—	+	+	—	—	—	—	+
Ácido Láctico <sup>d</sup>	L	D,L,DL <sup>e</sup>	L	L	L	D	L,DL <sup>e</sup>	L	L

+, positivo; —, negativo; ±, la respuesta varía entre especies; ND, no determinada

<sup>a</sup> Prueba para homo- o heterofermentación de glucosa, negativo y positivo denota para homofermentativos y heterofermentativos, respectivamente.

<sup>b</sup> Pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> pueden ser producidas, dependiendo del medio

<sup>c</sup> No se ha reportado crecimiento al 8 % de NaCl

<sup>d</sup> Configuración del ácido láctico producido a partir de glucosa

<sup>e</sup> Producción de D-, L-, o DL ácido láctico varía entre especies

### ▪ Género *Lactobacillus*

De los diferentes grupos de BALs, el género que presenta más especies es el de *Lactobacillus*. De igual forma es el más heterogéneo, debido principalmente al rango del porcentaje molar de Guanina + Citocina en el DNA de las especies presentes en este grupo. De forma general, este género se ha subdividido en tres dependiendo de la presencia o no de las enzimas claves para la fermentación de azúcar de forma homo- ó heterofermentativa, la fructosa-1,6-difosfato aldolasa y/o la fosfoacetolasa, respectivamente. Entre otras pruebas clásicas como la configuración del ácido láctico producido, hidrólisis de arginina y crecimiento a ciertas temperaturas, hoy en día se realiza una clasificación más apropiada realizando adicionalmente el análisis del peptidoglicano, movilidad electroforética del LDH, % molar de G y C del DNA, y estudios de homología DNA-DNA (Axelsson 2004). La Tabla 1-3 presenta algunas características generales para la subclasificación de bacterias del género *Lactobacillus*.

**Tabla 1-3.** Subclasificación de las especies del género *Lactobacillus* (Axelsson 2004).

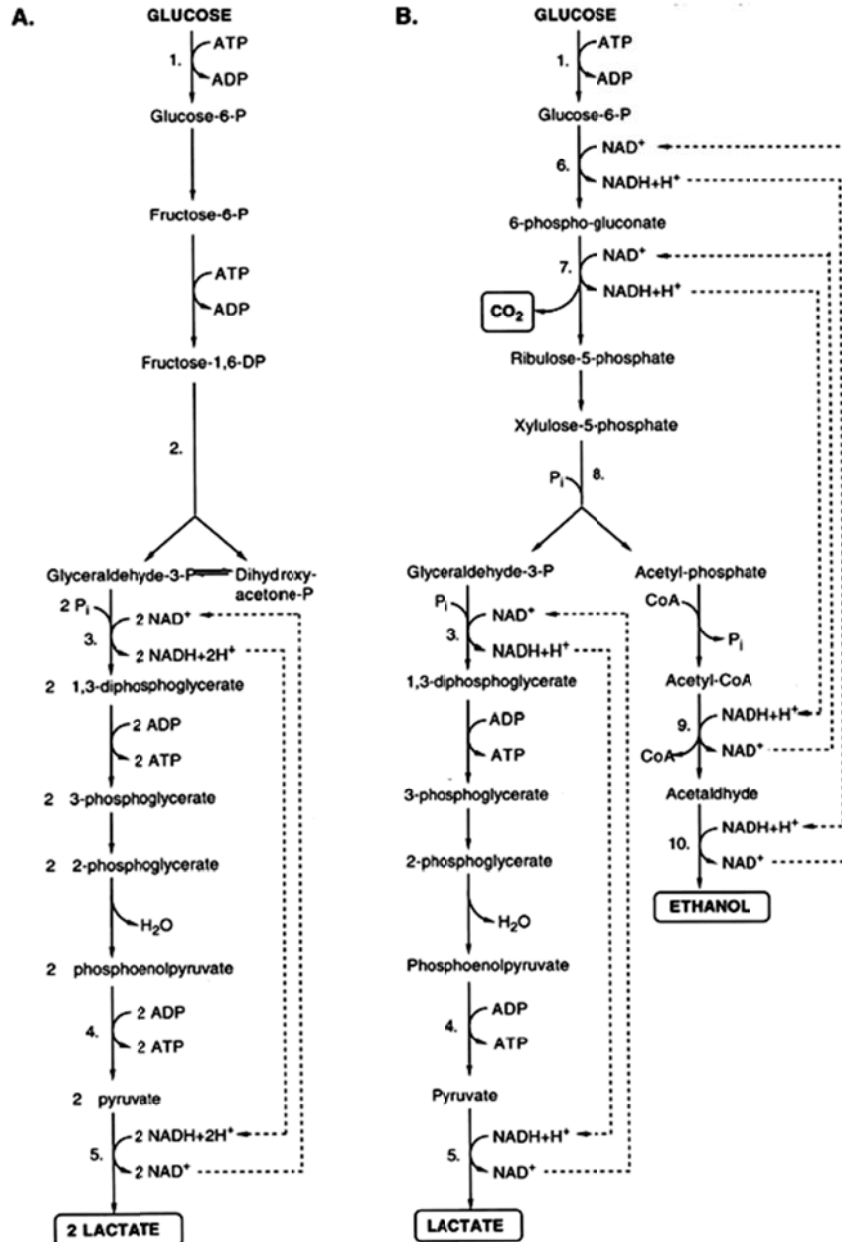
Característica	Grupo I, Homofermentativo Obligado	Grupo II, Heterofermentativo Facultativo	Grupo III, Heterofermentativo Obligado
Fermentación de Pentosa	—	+	—
Producción de CO <sub>2</sub> a partir de glucosa	—	—	+
Producción de CO <sub>2</sub> a partir de gluconato	—	+	+
FDP aldolasa presente	+	+	—
Fosfocetolasa presente	—	+	+
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
	<i>L. delbrückii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. reuteri</i>

### ▪ Metabolismo de las bacterias ácido lácticas

La característica general del metabolismo eficiente de carbohidratos por BAL está asociada a la relación sustrato-nivel de fosforilación. El ATP generado es empleado con fines biosintéticos. El grupo de las BAL presenta una gran capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos afines, dando como producto predominante el ácido láctico. El transporte y fosforilación de la glucosa puede ocurrir mediante el transporte libre y fosforilación por una glucocinasa ATP dependiente. En algunas especies se usa el sistema fosfoenolpiruvato:azúcar fosfotransferasa (PTS), en el cual el fosfoenolpiruvato es la molécula donadora del grupo fosforilo (Axelsson 2004).

La principal ruta metabólica de las hexosas, por ejemplo la glucosa, es la glicolisis, o ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, usado por la mayoría de BALs (Fig. 1-7). Se caracteriza por la formación de fructosa-1,6-difosfato (FDP) el cual es separado por una FDP aldolasa en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (GAP). Luego el GAP y el DHAP son convertidos en piruvato en una secuencia metabólica que incluye la fosforilación del sustrato en dos sitios. En condiciones de exceso de azúcar y acceso limitado de oxígeno, el piruvato se reduce a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa NAD dependiente (nLDH). De ese modo se reoxida el NADH formado durante las etapas iniciales de la glicolisis. Dado que prácticamente el producto final del metabolismo de la glucosa es el ácido láctico, la ruta se denomina como fermentación homoláctica (Axelsson 2004).

La otra ruta metabólica empleada por las BALs es denominada la ruta pentosa fosfato, hexosa monofosfato, pentosa fosfocetolasa o 6-fosfogluconato fosfocetolasa (6-PG/PK) (Fig. 1-7). Esta ruta se caracteriza por una deshidrogenación inicial con la formación de 6-fosfogluconato, seguido por una descarboxilación. La pentosa-5-fosfato remanente es dividida posteriormente por la fosfocetolasa en GAP y acetil fosfato. La GAP es metabolizada de la misma forma que en la ruta de glicolisis, dando como resultado ácido láctico. Cuando no hay aceptores de electrones disponibles, el acetil fosfato es reducido a etanol vía acetil CoA y acetaldehído. Dado que en esta ruta se forman cantidades apreciables de otros productos finales (CO<sub>2</sub> y etanol), adicionales al ácido láctico, es referida como una fermentación heteroláctica (Axelsson 2004). Cuando hexosas diferentes a la glucosa son fermentadas por BAL, estas entran a las rutas metabólicas descritas a nivel de glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato posterior a la isomerización y/o fosforilación. Una excepción a este procedimiento esta en el metabolismo de la galactosa por las BAL, donde usa PTS para poder tomar este carbohidrato.



**Figura 1-7.** Principales rutas metabólicas de la glucosa. Ruta fermentativa homoláctica (a), y ruta fermentativa heteroláctica (b) (Tomado de Axelsson (2004)).

### 1.3 Prebióticos

Los compuestos prebióticos son ingredientes de los alimentos que no son digeribles por los mamíferos y que afectan de forma benéfica al huésped estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o actividad de una o un limitado número de especies bacterianas que residen en el colón (Gibson and Roberfroid 1995). Para que un compuesto alimenticio sea clasificado como prebiótico no debe ser hidrolizado ni adsorbido en el tracto gastrointestinal alto, debe ser un sustrato selectivo para uno o un

límitado número de bacterias potencialmente benéficas, como Lactobacilos y Bifidobacterias, estimulando su crecimiento en el colón y volviéndolas activas metabólicamente. Por lo tanto, un prebiótico debe ser capaz de alterar la microflora del huésped hacia una microflora más saludable (Collins and Gibson 1999; Gibson and Roberfroid 1995). Como prebióticos se han clasificado los oligosacáridos no digeribles (ONDs), dentro de los que se encuentran la inulina, fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), soya-oligosacáridos (SOS), xilooligosacáridos (XOS), pirodextrinas e isomaltooligosacáridos (IMO). La Tabla 1-4 presenta características generales de estos ONDs.

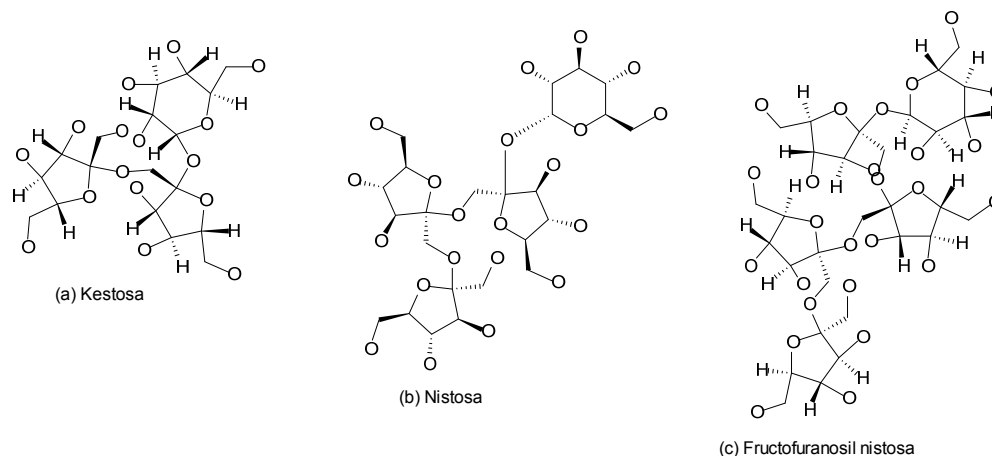
**Tabla 1-4.** Características generales de los ONDs más comunes (Collins and Gibson 1999).

Nombre	Composición	Método de Manufactura	Grado de polimerización
Inulina	$\beta(2-1)$ fructanos	Extraído de la raíz de achicoria	11-65
FOS	$\beta(2-1)$ fructanos	Transfructosilación de sacarosa ó hidrólisis de inulina de achicoria.	2-10 3-5
GOS	Oligo-galactosa (85%) con glucosa y lactosa Mezcla de rafinosa (fructosa-galactosa-glucosa) y estaquiosa (fructosa-galactosa-galactosa-glucosa)	Producido por la $\beta$ -galactosidasa usando lactosa como sustrato	2-5
SOS	Xilosas unidas por enlaces $\beta(1-4)$	Se extrae de la harina de soya	3-4
XOS	Mezcla de glucosa y oligosacáridos	Hidrólisis enzimática del xilano	2-4
Pirodextrinas	$\alpha(1-4)$ glucosas y ramificaciones $\alpha(1-6)$ de glucosa	Pirolisis del almidón de papa o maíz	Varios
IMO		Transgalactosilación de maltosa	2-8

### 1.3.1 Fructooligosacáridos

#### ▪ Características químicas y fuentes de obtención

Los fructooligosacáridos (FOS) ó fructanos, son oligopolímeros formados por la unión de una cadena  $\beta$ -2,1 de D-fructosa (F) a una unidad de D-glucosa (G) (Fig. 1-8). Entre los principales FOS la 1-kestosa (GF2), nistosa (GF3) y 1- $\beta$ -fructofuranosilnistosa (GF4), los cuales varían en el número de unidades de fructosa presentes en el polímero (Fig. 1-8) (Sangeethaa et al. 2005; Yun 1996). Una variedad estructural que presentan los FOS consiste en la unión de la cadena de fructosa por un enlace  $\beta$ -2,6 a la unidad de sacarosa, dando origen a los neofructooligosacáridos (Roberfroid 1997). Para la 1-kestosa, se ha reportado una rotación específica  $[\alpha]_D^{20}$  de +28.5 y una temperatura de fusión entre 199–200°C. De igual forma, la dulzura relativa de la 1-kestosa, nistosa y 1- $\beta$ -fructofuranosilnistosa (FFN), frente a una solución al 10% de sacarosa, es del 31, 22 y 16% respectivamente (Yun 1996).



**Figura 1-8.** Estructura química de fructooligosacáridos. (a) 1-kestosa, (b) nistosa, (c) 1- $\beta$ -fructofuranosilnistosa (adaptado de Guio *et al.* (2009)).

Los fructanos pueden ser producidos por bacterias, hongos y plantas que presentan la enzima fructosiltransferasa encargada de su síntesis (Sangeetha *et al.* 2005; Yun 1996). En plantas mono y dicotiledóneas como *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Gramineae* y *Compositae*, son sintetizados como mecanismo de almacenamiento de carbohidratos y se encuentran en órganos como bulbos, raíces y tallos (Roberfroid and Delzenne 1998). De igual forma, los FOS están disponibles en alimentos vegetales (Tabla 1-5).

**Tabla 1-5.** Frutas y vegetales productores de FOS (adaptado de Yun (1996))

Fuente	Nombre	Contenido FOS (mg/g)
Frutas	Kiwi	0.1
	Manzana roja	0.6
	Banano	6.0
	Zarzamora	1.2
	Toronja	1.1
	Naranja	2.8
	Melocotón	3.5
	Pera	0.8
	Ciruela	2.0
	Frambuesa	1.5
	Sandía	3.0
Vegetales	Espárragos	0.3
	Judía	0.1
	Remolacha	0.1
	Zanahoria	2.2
	Apio	0.6
	Berenjena	0.6
	Ajo	10.3
	Jengibre	0.1
	Alcachofa Jerusalén	286.2
	Cebolla	47.7
	Guisante	8.4
	Tomate	0.1
Patata	0.8	

Los microorganismos con capacidad de sintetizar fructanos (Tabla 1-6), usan como sustrato sacarosa para realizar la transferencia de fructosa que aumenta el tamaño de las cadenas de los compuestos producidos (Heyer and Wendenburg 2001). Las bacterias y hongos que los sintetizan, también los pueden degradar rápidamente hidrolizándolos mediante la fructanhidrolasa y posteriormente fermentarlos a ácidos una vez agotado en el medio de cultivo la fuente de carbono (Song and Jacques 1999).

En bacterias los FOS hacen parte de los exopolisacáridos de alto peso molecular (principalmente de tipo levana), actuando como protector celular a la desecación y como factor de adherencia a las superficies modulando la composición de biofilms (Heyer and Wendenburg 2001). Entre tanto los hongos sintetizan FOS en medios que contienen sacarosa como una forma de almacenar glucosa y como método para eliminar la fructosa libre que retarda el crecimiento del hongo (Yun 1996).

**Tabla 1-6.** Microorganismos productores de FOS (adaptado de Yun (1996))

Organismo
<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Aureobasidium sp.</i>
<i>Arthrobacter sp</i>
<i>Aspergillus japonicus</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Aspergillus phoenicis</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>
<i>Claviceps purpurea</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Penicillium frequentans</i>
<i>Penicillium spinulosum</i>

#### ▪ Aplicaciones y propiedades

Los FOS han sido empleados en la industria de alimentos y farmacéutica como prebióticos y edulcorantes (Crittenden and Playne 1996; Sangeetha et al. 2005; Yun 1996). Debido a su amplio uso, se ha generado un gran interés en los estudios de seguridad alimentaria. Varias investigaciones *in vivo* e *in vitro*, han evaluado el potencial tóxico, genotóxico y carcinogénico de los fructanos, demostrando que estos no presentan ningún efecto adverso sobre la salud humana. Sin embargo, el único efecto notado después del consumo de grandes cantidades diarias (44 g en hombres, 49 g en mujeres o 5% de la dieta total diaria en ratas) es la producción de deposiciones blandas y diarrea, efecto característico de los oligosacáridos de baja digestión (Roberfroid and Delzenne 1998; Sangeetha et al. 2005).

Las investigaciones realizadas desde 1958 han permitido determinar diferentes dosis, siendo el NOEL (Not Observed Effect Level) de  $2.170 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ , de acuerdo con los estudios de toxicidad crónica y subcrónica en ratas, y el EDI (Estimated Daily Intake) de  $806 \text{ mg día}^{-1}$ . Debido a la evidencia histórica sobre su uso y a estudios realizados por la FDA, los FOS han sido clasificados como GRAS (Generally Recognized as Safe), garantizando que son seguros en las condiciones de uso propuestas (Yun 1996).

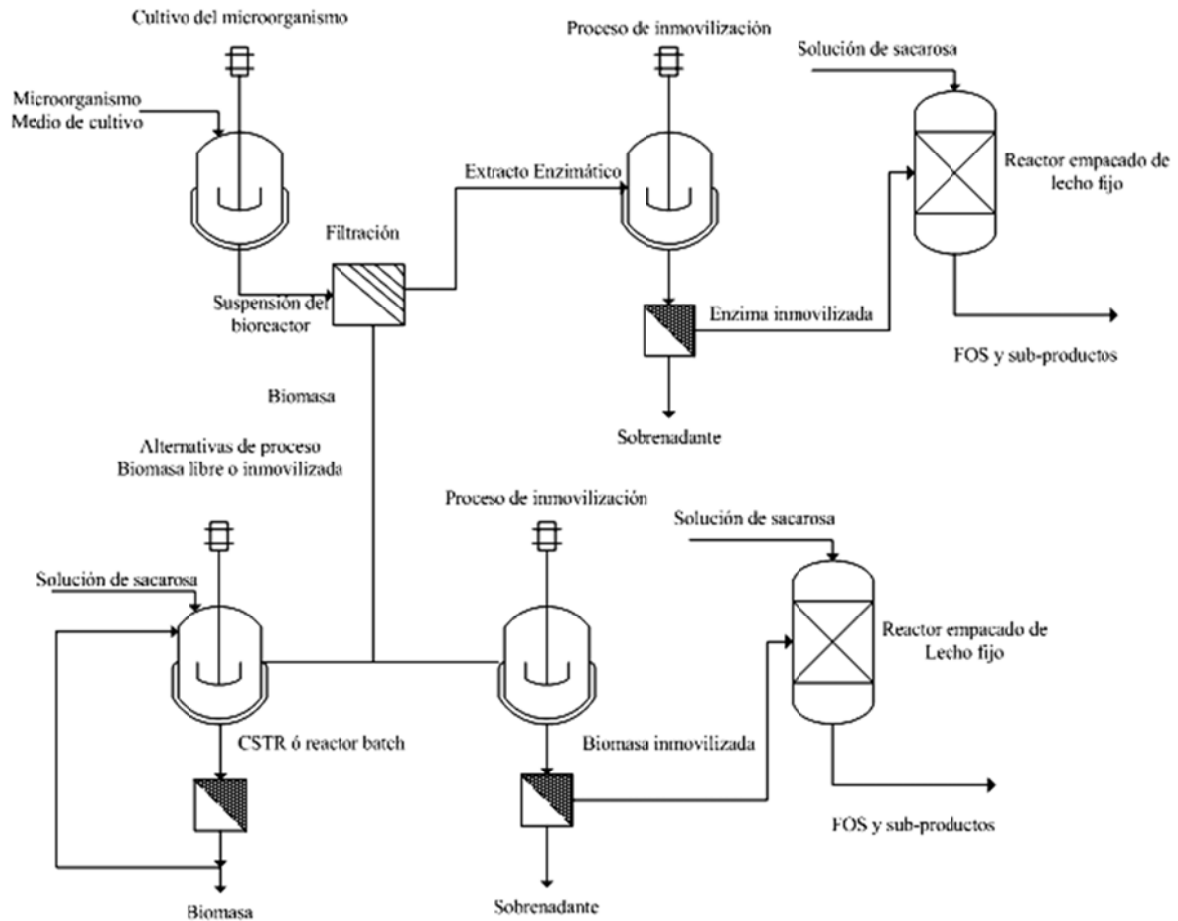
Debido a la configuración  $\beta$  del segundo carbón anomérico de la fructosa, los FOS son resistentes a la hidrólisis realizada por enzimas digestivas como  $\alpha$ -glucosidasa, maltasa, isomaltasa y sacarasa, que son específicas para enlaces  $\alpha$ -glicosídicos. La baja digestión de los fructanos en el tracto digestivo humano, hace que estos sean eliminados por la orina en un 97%, razón por la cual son considerados como ingredientes alimenticios de bajo aporte calórico ( $1,5 \text{ Kcal g}^{-1}$ ) (Roberfroid and Delzenne 1998). La proporción de FOS que es metabolizada depende del proceso de fermentación llevado a cabo por las bífido-bacterias presentes en el tracto digestivo. Estos son utilizados selectivamente por *L. acidophilus*, *B. bifidus* y *S. faecium* para mantener su adherencia, viabilidad y crecimiento; de forma recíproca, no son metabolizados por bacterias patógenas como *E. coli*, *Clostridium perfringers*, *Yersinia pseudotuberculosis*, entre otras (Roberfroid and Delzenne 1998). La fermentación de esta clase de carbohidratos, se realiza en la última porción del intestino grueso donde existe la mayor colonización bacteriana y culmina en la producción de lactato y ácidos carboxílicos de cadena corta, principalmente ácido acético, propiónico y butírico, a lo que se atribuye el descenso en el pH fecal que favorece la absorción de calcio y magnesio (Roberfroid and Delzenne 1998).

De igual forma a nivel clínico, se ha detectado efecto sobre la regulación de la glicemia y el metabolismo de triglicéridos causada por la ingesta de FOS. Estos efectos se explican, respectivamente, mediante las siguientes hipótesis: (a) su influencia en la absorción de macronutrientes, especialmente carbohidratos que disminuye el vaciado gástrico y/o el tiempo de tránsito en el intestino delgado y (b) la modificación del metabolismo hepático de la glucosa reduciendo la gluconeogénesis hepática (Roberfroid and Delzenne 1998); y (a) la modulación de la lipogénesis y (b) incremento en la concentración de propionato en el intestino grueso, siendo éste un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos (Roberfroid and Delzenne 1998).

#### ▪ **Producción de fructooligosacáridos**

La producción de fructooligosacáridos, se encuentra enmarcada por los desarrollos en la enzimología. Es así como su obtención, se realiza principalmente en lotes empleando la enzima soluble ó el microorganismo (Sangeetha et al. 2005; Yun et al. 1993), ó en sistemas continuos empleando la enzima ó el microorganismo inmovilizado bien sea en perlas de polímeros o sobre membranas. Los pioneros a nivel mundial en la producción industrial de FOS, se encuentran en Tokio (Japón) con la compañía Meiji Seika Kaisha Ltda., que ha patentado el proceso de inmovilización de la fructosiltransferasa (FTasa) proveniente del *Aspergillus niger* ATCC 20611; y la compañía Nihon Shokuhin Kako Ltd., que ha patentado el proceso de fabricación empleando tanto el micelio como la FTasa proveniente del *Aspergillus sydowi* (Guio et al. 2009). La Fig. 1-9 presenta las alternativas para la producción de FOS a nivel industrial.





**Figura 1-9.** Diagrama general para la producción de FOS empleando el extracto crudo enzimático o la biomasa (Tomado de Guío *et al.*(2009)).

## 1.4 Microorganismos Patógenos en Alimentos

La microbiología de los alimentos se puede dividir en tres: los microorganismos benéficos, de degradación y causantes de enfermedades. Los microorganismos benéficos son aquellos empleados para producir alimentos fermentados como quesos, vinos, carnes y vegetales fermentados. En estos alimentos fermentados los microorganismos metabolizan sustratos complejos para producir enzimas, compuestos con sabor, ácidos y agentes antimicrobianos. Adicionalmente, algunos microorganismos rompen compuestos indigeribles haciéndolos más aceptables y digeribles (Bhunia 2008). Entre tanto, los microorganismos que degradan alimentos son aquellos que al crecer en un alimento, dan origen a sabores, texturas y olores no deseados, haciendo el alimento no apropiado para su consumo. Algunos microorganismos benéficos al crecer de forma no controlada sobre un alimento puede generar la descomposición del mismo.

Los microorganismos causantes de enfermedad ó patógenos al crecer en un alimento no necesariamente altera la presencia física del alimento, lo que hace que la valoración de la seguridad del alimento se logre mediante múltiples ensayos microbiológicos. Los microorganismos patógenos en alimentos son los responsables de la intoxicación por

alimentos, donde la toxina se ha formado antes de la ingesta del alimento, de las toxi-infecciones, donde la toxina es formada al interior del huésped una vez ha ingerido el alimento contaminado con el microorganismo, y las infecciones por alimentos, donde hay ingestión de patógenos (Bhunia 2008). La Tabla 1-7 presenta un listado de los patógenos más comunes en alimentos.

La mayoría de los microorganismos patógenos en los alimentos se encuentran en la naturaleza, suelo, agua, animales y plantas. Siendo estos introducidos a una planta de procesamiento de alimentos a través de las materias primas, el hombre y equipos. Estos microorganismos patógenos presentan diferentes tiempos de vida sobre superficies inanimadas, las cuales pueden servir también como fuente de contaminación (Bhunia 2008). La Tabla 1-8 presenta el tiempo de vida de diferentes microorganismos patógenos sobre superficies inanimadas.

Según la fuente del alimento, es normal encontrar algunos microorganismos patógenos durante su preprocesamiento. De esta manera en productos cárnicos se puede encontrar *E. coli* por contaminación durante el sacrificio, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *Moraxella* y *Pseudomonas*, entre otros. En carnes empacadas al vacío se pueden encontrar *Pseudomonas*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Yersinia enterocolitica* y *S. aureus*. La carne de aves es fuente de *Salmonella enterica* especies *enteritidis*, *typhimurium*, *infantis*, *reading*, *blockley*; *Clostridium perfringens*; *Campylobacter jejuni*; y *E. coli*. Frutas y verduras contaminadas por aguas de riego, abonos, heces de animales pueden ser fuente de coliformes fecales, estreptococos fecales, *Pseudomonas* spp., *Erwinia* spp., *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Cyclospora cayatanensis*, *L. monocytogenes*; de algunas especies protozoarias como *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli*, y *Cyclospora cayatanensis*; y de virus como el de la Hepatitis A (Bhunia 2008).

**Tabla 1-7.** Microorganismos patógenos en alimentos (Tomado de Bhunia (2008)).

Bacterias	Virus	Parasitos
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Astrovirus	<i>Cryptosporidium parvum</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	Virus de la Hepatitis A	<i>Cyclospora cayatanensis</i>
<i>Bacillus cereus/subtilis/licheniformis</i>	Virus de la Hepatitis E	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Brucella/abortus/melitensis/suis</i>	Norovirus	<i>Giardia intestinalis</i>
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	Rotavirus	<i>Isospora belli</i>
<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Taenia solium/saginata</i>
<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Escherichia coli</i>		<i>Trichinella spiralis</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>		
<i>Salmonella enterica</i>		
<i>Shigella</i> spp.		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Vibrio cholerae</i>		
<i>V. cholerae</i> non-01		
<i>V. parahemolyticus</i>		
<i>V. vulnificus</i>		
<i>V. fluvialis</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		

**Tabla 1-8.** Tiempo de vida sobre superficies inanimadas de microorganismos patógenos en alimentos (Adaptado de Bhunia, (2008)).

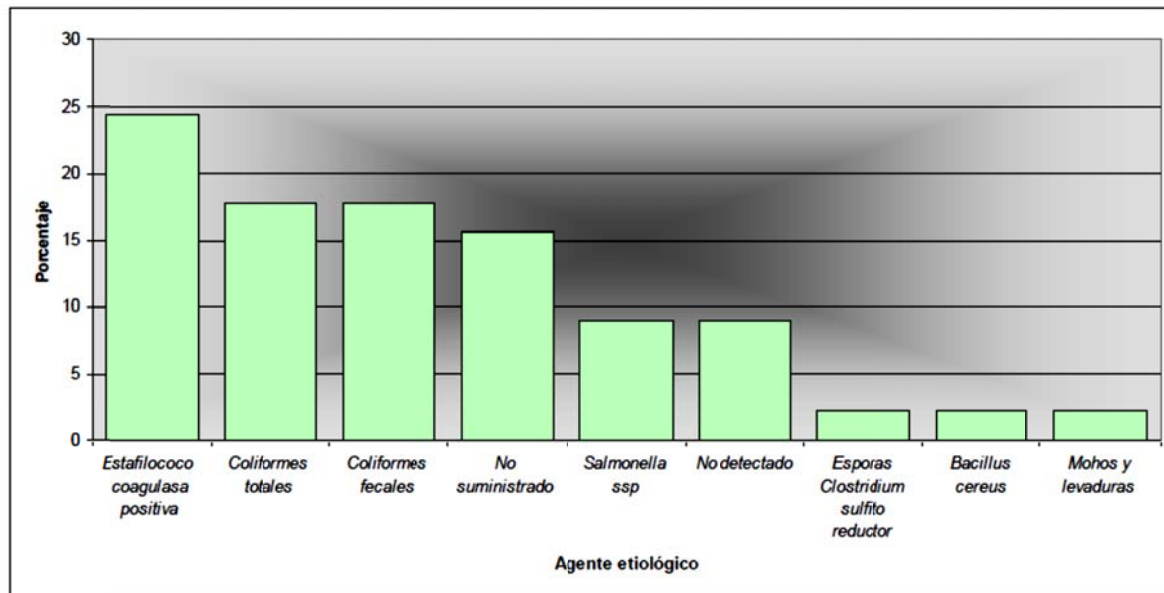
Organismo	Tiempo de supervivencia
<b>Bacterias</b>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hasta 6 días
<i>Escherichia coli</i>	1.5 h–16 meses
<i>Listeria</i> sp.	24 h–varios meses
<i>Salmonella</i> serovar Typhi	6 h–4 semanas
<i>Salmonella</i> serovar Typhimurium	10 días–4.2 años
<i>Shigella</i> sp.	2 días–5 meses
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 días–7 meses
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 días–6.5 meses
<i>Vibrio cholerae</i>	1–7 días
<b>Virus</b>	
Astrovirus	7–90 días
Adenovirus	7 días–3 meses
Norovirus	8 h–7 días
Influenza virus	1 día–2 días
Rotavirus	6 días–60 días
Hepatitis A virus	2 h–60 días

**Tabla 1-9.** Número de brotes reportados y casos de enfermedad de ETA en USA, 2007, y los promedios anuales para el periodo 2002-2006 (Tomado de Boore *et al.* (2010)).

Etiología	Brotes						Casos de enfermedad					
	2007			2002--2006			2007				2002—2006	
	Etiología confirmada	Sospecha de Etiología	Total		Total promedio anual		Etiología confirmada	Sospecha de Etiología	Total		Total promedio anual	
			No.	(%)	No.	(%)			No.	(%)	No.	(%)
<b>Bacteria</b>												
<i>Salmonella</i>	136	6	142	(20)	144	(11)	3,465	50	3,515	(23)	3,475	(12)
<i>Clostridium perfringens</i>	31	14	45	(6)	34	(4)	1,304	302	1,606	(10)	2,062	(7)
<i>Staphylococcus</i>	11	10	21	(3)	25	(4)	242	44	286	(2)	554	(2)
<i>Escherichia coli</i>	40	2	42	(6)	28	(2)	593	10	603	(4)	375	(1)
<i>Campylobacter</i>	21	6	27	(4)	22	(2)	346	26	372	(2)	624	(2)
<i>Bacillus cereus</i>	4	15	19	(3)	10	(2)	67	97	164	(1)	130	(0)
<i>Shigella</i>	10	1	11	(2)	12	(1)	338	17	355	(2)	495	(2)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	---	1	1	(0)	5	(1)	---	5	5	(0)	114	(0)
<i>Listeria</i>	1	---	1	(0)	2	(0)	5	---	5	(0)	22	(0)
<i>Clostridium botulinum</i>	3	1	4	(1)	3	(0)	12	4	16	(0)	11	(0)
<i>Brucella</i> spp	1	---	1	(0)	0	(0)	3	---	3	(0)	1	(0)
<i>Escherichia coli</i>	1	1	2	(0)	2	(0)	66	76	142	(1)	106	(0)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	---	---	---	(0)	2	(0)	---	---	---	(0)	5	(0)
Otras bacterias	---	4	4	(1)	10	(1)	---	43	43	(0)	122	(0)
<b>Total</b>	<b>259</b>	<b>61</b>	<b>320</b>	<b>(46)</b>	<b>299</b>	<b>(41)</b>	<b>6,441</b>	<b>674</b>	<b>7,115</b>	<b>(46)</b>	<b>8,098</b>	<b>(28)</b>

De forma general la incidencia de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), se debe principalmente al incumplimiento de buenas prácticas de manufactura, prácticas inadecuadas y malos hábitos de higiene de parte de las personas que manipulan alimentos (Bhunja 2008). La similitud o no de los microorganismos patógenos en los diferentes brotes de ETA, tiene también una incidencia cultural, asociada a los hábitos alimenticios del consumidor. La Tabla 1-9 y Fig. 1-10 presentan los reportes etiológicos de agentes causantes de ETAs ocurridos en el 2007 en USA y Colombia, respectivamente. Los reportes fueron tomados para el caso de USA del reporte semanal de morbilidad y mortalidad (MMWR) creado por Boore *et al.* (2010) para el Centro de Prevención y Control de Enfermedades, y en Colombia del reporte SIVIGILA del Instituto Nacional de Salud.

Se observa de forma general, que la incidencia de los microorganismos causantes de mayores casos de ETAs en USA para el 2007 está encabezada por *Salmonella*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Shigella*, *Staphylococcus*. Entre tanto, en Colombia para el mismo periodo, los microorganismos predominantes en los brotes de ETAs registrados son *Staphylococcus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Bacillus cereus*. Lo que muestra una diversidad de agentes patógenos probablemente debido a hábitos culturales y tecnologías de procesamiento de los alimentos.



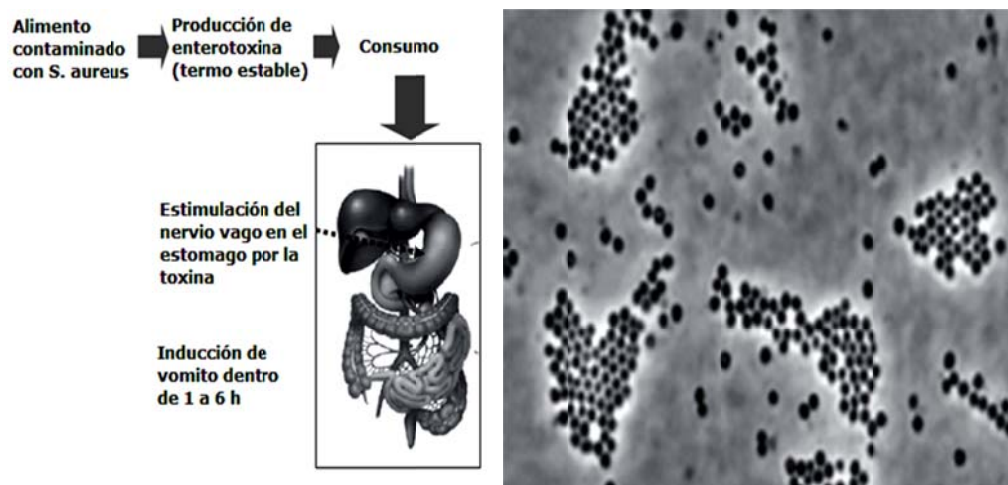
**Figura 1-10.** Informe etiológico de brotes de ETA en Colombia en el 2007 (Tomado del reporte SIVIGILA Instituto Nacional de Salud).

A continuación se presentan las características más importantes de los siguientes microorganismos *Staphylococcus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium* y *Bacillus cereus*.

- ***Staphylococcus aureus***

Este es un microorganismo Gram-positivo, habitante natural de la piel humana y animal. Son no móviles y producen colonias de color dorado ó amarillo oro. Se caracterizan por ser catalasa positiva, anaerobios facultativos, crece abundantemente en condiciones

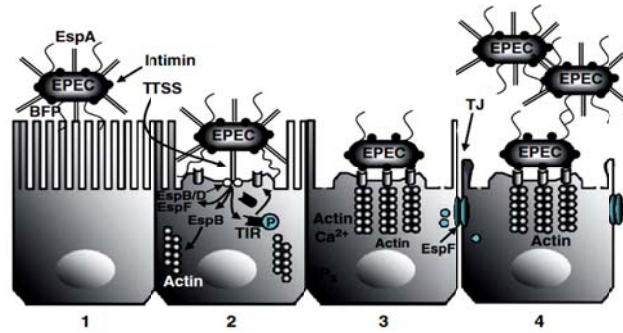
aerobias produciendo acetoina como producto final del metabolismo de la glucosa. Fermenta manitol, coagula el plasma de conejo de forma rápida, produce termoneucleasas, y es sensible a la lisostafina. Es halotolerante (10 – 15 % NaCl), y relativamente resistente al calor y medios secos. Produce una serie de factores virulentos como adhesinas, enterotoxinas, hemolisinas, proteasas y toxinas ADP-ribosilantes (Bhunia 2008). Las ETAs causadas por este microorganismo están asociadas principalmente a productos cremosos, salsas, carnes, jamones, pescado y productos lácteos. Mediante cultivo convencional se puede detectar la presencia de la bacteria por cultivo en agar Baird-Parker (Bhunia 2008). La Fig. 1-11 muestra el mecanismo patogénico de intoxicación con enterotoxina de *S. aureus* y la microscopia de contraste de fases de la bacteria.



**Figura 1-11.** Mecanismo patogénico de intoxicación con enterotoxina de *S. aureus* (Tomado de Ray y Bhunia, (2008 )) y microscopia de contraste de fases de la bacteria.

#### ▪ *Escherichia coli*

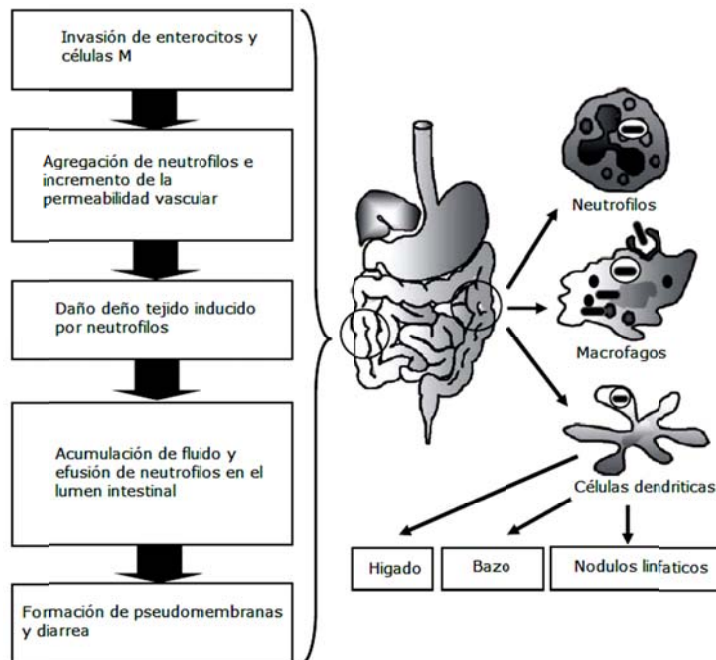
Es un bacilo corto entre 1 y 2  $\mu\text{m}$ , Gram-negativo, aerobio y móvil, la mayoría de cepas patogénicas son ácido tolerantes. Dentro de las patologías causadas por *E. coli* se encuentra gastroenteritis, disentería, síndrome urémico hemolítico, infección del tracto urinario, septicemia, neumonía y meningitis. En la actualidad los brotes enterohemorrágicos por *E. coli* son los más frecuentes, causados por el consumo de frutas y vegetales contaminados por abonos no tratados. De igual forma, al encontrarse en las heces puede encontrarse presente en agua, suelo, y durante el sacrificio de los animales contaminar la carne. Se caracterizan por producir adhesinas, toxinas tanto termo lábiles como estables. Por excelencia el medio de cultivo empleado para aislar selectivamente diferentes cepas de *E. coli* son modificaciones del medio MacConkey (Bhunia 2008). La Fig. 1-12 muestra el mecanismo de acción de las adhesinas producidas por *E. coli*.



**Figura 1-12.** Diagrama de la secuencia de eventos para *E. coli* enteropatógeno durante la infección de enterocitos. 1. Expresión de los factores de adhesión, 2. Inicia la adhesión localizada, 3. Señal de transducción y contacto íntimo, y 4. Rearreglo del citoesqueleto y formación del pedestal. (Adaptado de Clark *et al.* (2003)).

### ▪ *Salmonella*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gram-negativo, no formador de esporas, móviles, presencia de flagelos peritricos, son anaerobios facultativos y crecen entre 5 y 45 °C, pueden crecer a pHs ácidos, pero son sensibles a concentraciones de sal. La *Salmonella* se encuentra presente en el tracto digestivo de aves, reptiles, tortugas, insectos, animales de granjas y en el hombre. La principal fuente de contaminación para el hombre son las aves y los huevos de aves contaminadas. Es causa principal de fiebre tifoidea y gastroenteritis. Se adhiere a las células epiteliales intestinales o Células-M mediante diferentes tipos de fimbrias. Se identifica por su crecimiento en medios selectivos como Hektoen agar entérico, xilosa-lisina- deoxicolato (Bhunja 2008). La Fig. 1-13 presenta el mecanismo enteropatógeno de la *Salmonella*.



**Figura 1-13.** Secuencia de la patogénesis de la diarrea inducida por *Salmonella* entérica (Adaptado de Bhunja, (2008)).

▪ **Clostridium**

Las especies de *Clostridium* pueden causar envenenamiento por alimentos, gangrena gaseosa, desordenes neurológicos, etc. En general estos microorganismos generan exotoxinas y enzimas que causan el daño local de tejidos y la patogénesis. Dentro de estas toxinas se destaca la neurotoxina termolábil botulinun. Las especies de *Clostridium* son anaerobios estrictos, bacilos Gram-negativos, móviles, formadores de esporas, no crece a pHs inferiores a 4,6 y sus esporas son termoresistentes. La mayoría de las especies de *Clostridium* sobreviven en el suelo y crecen en el intestino de los animales. La fuente de esporas más común es en alimentos enlatados cuyo proceso es deficiente. Especies, hiervas y hongos deshidratados pueden ser fuente de esporas. En el caso de la especie *C. botulinum* este organismo genera tres clases de toxinas, la neurotoxina botulínica que actúa sobre las neuronas y la C2 y C3, que causan daño celular. Este microorganismo se puede aislar selectivamente en agar yema de huevo bajo condiciones anaerobias (Bhunja 2008). La Fig. 1-14 presenta el mecanismo de acción de la neurotoxina botulínica (BoNT).

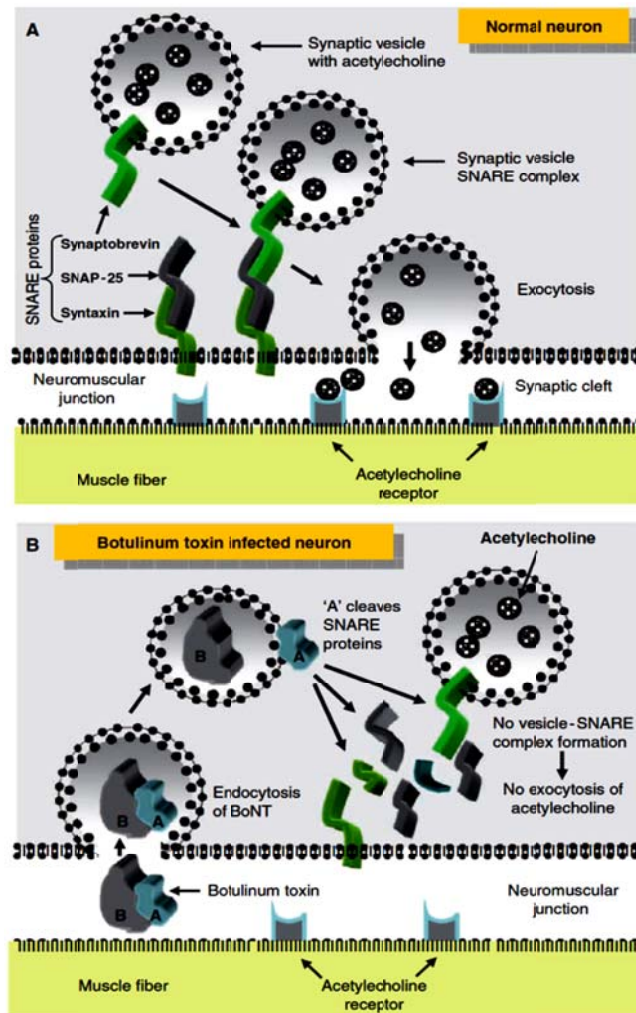
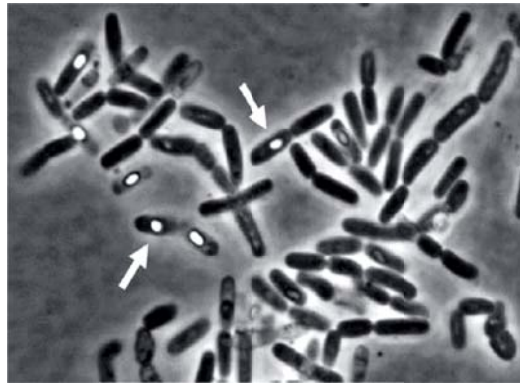


Figura 1-14. Mecanismo de acción de la BoNT (Tomado de Arnon *et al.* (2001)).

- ***Bacillus cereus***

Los *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza incluyendo suelos, plantas, animales y humanos. La mayoría de *Bacillus* son no patogénicos. Sin embargo, la especie *B. cereus* es causal de vomito y diarrea en hombres y animales por envenenamiento con alimentos. Las especies *Bacillus* son Gram-positivos, aerobias, formadoras de esporas, la mayoría son móviles, algunos de estos organismos son psicrotolerantes y termófilos. La mayoría de alimentos se pueden contaminar con endoesporas las cuales son difíciles de inactivar. Los alimentos que generalmente causan brotes de intoxicación por *Bacillus* son cereales, sopas, arroz y cremas lácteas. Las toxinas que producen estos microorganismos son principalmente eméticas y enterotoxinas diarreicas. Se puede aislar selectivamente en agar bromotimol-manitol-yema de huevo (Bhunja 2008). La Fig. 1-15 muestra células vegetativas y esporuladas de *B. cereus*.



**Figura 1-15.** Microscopía de contraste de fases de *B. cereus*, las flechas indican esporas (Tomado de Bhunia, (2008)).



## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Muestras de melaza y ensilaje de maíz

La melaza fue obtenida en Puerto López (Meta, Colombia), donada por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. El ensilaje de maíz fue preparado en CORPOICA, Tibaitata (Bogotá, Colombia) donado por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. La melaza y en ensilaje fueron muestreados en ambiente aséptico, considerando tres regiones físicas de la muestra, la parte superior o inicial, intermedia y final o fondo del respectivo contenedor o bolsa de ensilaje. Se tomaron alrededor de 2 mL ó 2 g de muestra, respectivamente, en recipientes estériles.

### 2.2 Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de los microorganismos se realizó previa disolución de las muestras en 5 mL de buffer de fosfato 100 mM, pH 5,0, estéril. La muestra con buffer fue mezclado por vortex durante 5 min y se permitió el reposo de las mismas durante 10 min. De cada muestra se tomó una alícuota de 1 mL y se inoculó en 100 mL de medio de leche en polvo descremada al 12 %  $P/V$ , pasteurizado a 85 °C por 15 min. Los medios inoculados se incubaron a 37 °C por 72 h, bajo condiciones anaerobias.

Al finalizar el cultivo se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L del suero obtenido y se sembraron por extensión en cajas de petri con agar MRS (*Man, Rogosa, and Sharpe*; composición (g L<sup>-1</sup>) peptona, 10; extracto de carne, 8; extracto de levadura, 4; glucosa, 20; fosfato dipotásico, 2; acetato de sodio, 5; citrato de amonio, 2; sulfato de magnesio, 0,2; sulfato de manganeso, 0,05; agar 13; Tween 80, 1 mL; ajustar a pH final 6,4 $\pm$ 0,2). Posteriormente se incubaron a 37 °C por 72 h en una cámara de anaerobiosis (Oxoid). De las diferentes cajas se aislaron colonias al azar las cuales fueron nuevamente cultivadas en agar MRS a las condiciones anteriormente descritas.

Siguiendo el procedimiento descrito, a partir del cultivo en leche, se activaron cepas comerciales de *Lactobacillus* como referencia para la caracterización bioquímica y control en los diferentes ensayos. Las cepas activadas fueron *Lactobacillus reuteri* (Glutapak<sup>®</sup> R), *L. rhamnosus* LC705 (LC705<sup>®</sup>), *L. helveticus* (Hylak Forte<sup>®</sup>), y *L. acidophilus* (Bacid<sup>®</sup>); las cuales se adquirieron en el comercio local (Bogotá, Colombia).

### 2.3 Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados

Se verificó de forma preliminar que las cepas aisladas correspondan al género *Lactobacillus* mediante pruebas bioquímicas y físico-químicas descritas en el Manual de

Bacteriología Sistemática de Bergey's (Holt 1994). Las pruebas realizadas incluyeron tinción de Gram, crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37, 40 y 45 °C), tolerancia a la sal (NaCl 7 y 10 %<sup>p/v</sup>), tolerancia a la acidez (pH 3.9), metabolismo del ácido pirúvico a acetil metil carbinol (Voges-Proskauer), presencia de catalasa, indol y oxidasa. Los ensayos se realizaron con colonias aisladas de agar MRS ó colonias cultivadas en caldo MRS bajo las condiciones requeridas y en anaerobiosis.

## **2.4 Efecto de fructooligosacáridos en la población de *Lactobacillus***

El efecto de los fructooligosacáridos sobre la población de los aislados nativos de *Lactobacillus* se determinó mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) por mL al cabo de 48 h de cultivo. Para esto se prepararon 10 mL de caldo MRS como control y 10 mL de caldo MRS modificado con concentraciones de FOS (composición 31, 54 y 15% de 1-kestosa, nistosa y 1-fructofuranosil nistosa, respectivamente, Wako, Japon) de 1, 2 y 5%<sup>p/v</sup>. Estas concentraciones de FOS se seleccionaron con base a diferentes reportes donde se indica que el efecto prebiótico en adultos se presenta por ingesta de 1 a 10 g por día en adultos (Bouhnik et al. 1999; Mussatto and Mancilha 2007; Tokunaga et al. 1993), sin embargo en infantes se ha reportado este efecto con ingestas entre 0,4 y 0.8 g por día (Moro et al. 2002). El caldo MRS modificado adicionalmente a los FOS está compuesto por (g L<sup>-1</sup>): 10, peptona; 5, extracto de carne; 5, extracto de levadura; 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O; 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.05 MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 2, citrato de triamonio; y 1 mL de Tween 80, ajustado a pH 6.5±0.1 con HCl 1 N. El cultivo de cada microorganismo se realizó en cámara de anaerobiosis (Oxoid) a 35 °C durante 48 h en medio MRS y MRS modificado, previa inoculación de cada medio con 100 µL de un preinoculo obtenido en MRS y de densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) ajustada a 0,1 mediante dilución con caldo MRS. Al finalizar el tiempo de cultivo, se tomaron dos alícuotas de 1 mL de cada microorganismo, las cuales se emplearon en la determinación de células viables (UFC mL<sup>-1</sup>) mediante dilución seriada y siembra por profundidad en agar MRS. Las cajas obtenidas se incubaron en cámara de anaerobiosis (Oxoid) a 35 °C durante 48 h. Con el medio de cultivo restante se determinó la densidad óptica. Este procedimiento se realizó por triplicado.

## **2.5 Producción del extracto crudo proteico**

Se prepararon preinóculos de los *Lactobacillus* aislados, para lo cual se tomó una colonia de las cepas identificadas y se inocularon de forma independiente en tubos de ensayo con 10 mL caldo MRS o caldo MRS modificado. Los cultivos se incubaron a 35 °C durante 36 h bajo condiciones de anaerobiosis. El caldo MRS modificado presenta una composición en g por L de: 20, FOS; 10, peptona; 5, extracto de carne; 5, extracto de levadura; 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O; 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.05 MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 2, citrato de triamonio; y 1 mL de Tween 80, ajustado a pH 6.5±0.1 con HCl 1 N. Una vez finalizado el cultivo se ajustaron todos los medios a una densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>) de 0,1 mediante dilución con caldo MRS.

Los diferentes extractos proteicos se produjeron tomando 500 µL del respectivo preinoculo ajustado a una DO<sub>600nm</sub> de 0,1 y adicionándolo a 50 mL de caldo MRS ó MRS modificado, según corresponda, y se incubaron a 35 °C por un tiempo de 24 h y 48 h

bajo condiciones de anaerobiosis. Pasado el tiempo de incubación se tomó una alícuota de 2 mL con la cual se le determinaron las células viables mediante protocolos estándar por siembra en profundidad empleando agar MRS e incubando durante 48 h a 35 °C bajo condiciones anaerobias. Al medio de cultivo restante se le determinó el pH final y ajustó a pH 6,5 con NaOH 2N. Posteriormente el medio de cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y finalmente se filtró a través de una membrana de 0,22 µm. El sobrenadante obtenido, extracto crudo proteico, se empleó en los diferentes ensayos de actividad antimicrobiana frente a los microorganismos patógenos y análisis de carbohidratos. Los extractos proteicos de cada microorganismo se produjeron por triplicado.

## 2.6 Crecimiento de los microorganismos patógenos

Los microorganismos patógenos empleados en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos producidos, fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia (sede Bogotá) y por el cepario de bacterias de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Se emplearon como microorganismos patógenos *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Los microorganismos seleccionados se sembraron en medios selectivos para garantizar la pureza del microorganismo. A partir de estos cultivos se realizó un preinóculo de cada microorganismo, para lo cual se tomó una colonia e inoculó en tubo de ensayo con 10 mL de caldo BHI incubándolos a 35 °C durante 16 h. Posteriormente se propagaron los diferentes microorganismos, para lo cual se tomó 1 mL del preinóculo e inocularon 100 mL de caldo BHI a 35 °C durante 16 h. A esta condición se establecerá la población final de viables como UFC mL<sup>-1</sup>, para su posterior ajuste en la prueba de actividad antimicrobiana de los extractos proteicos. Durante el tiempo que duraron los ensayos cada 15 días se realizó el repique de los microorganismos patógenos de interés.

## 2.7 Prueba de actividad antimicrobiana

La prueba de actividad antimicrobiana se realizó mediante la prueba de difusión en gel. Para esto, se adicionó de acuerdo al volumen a preparar de agar Müller-Hinton, (AMH) una alícuota del microorganismo patógeno tal que su concentración final en el agar fuera de 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Una vez, mezclado el microorganismo en el AMH se adicionaron 25 mL de agar en cajas de petri (90 × 15) adecuadas con 5 pozos de 0,7 mm de diámetro. Una vez solidificado el agar, se adicionaron en cada pozo 80 µL del respectivo extracto proteico obtenido de los *Lactobacillus* aislados y se determinó el diámetro del halo obtenido. Se tuvieron como controles positivos soluciones de nisina (Sigma-Aldrich, USA) y/o antibiótico (ceftriaxona o Ampicilina, Merck). El control negativo se realizó empleando caldo MRS y caldo MRS modificado con FOS estériles. Los ensayos se realizaron por duplicado, empleando los microorganismos patógenos mencionados anteriormente y los diferentes extractos proteicos obtenidos.

Para los extractos proteicos que mostraron actividad antimicrobiana, se realizaron ensayos proteínasa K (Sigma-Aldrich, USA), y catalasa (Sigma-Aldrich, USA) de acuerdo al procedimiento reportado por Ivanova *et al.* (1998) y De Kwaadsteniet *et al.* (2005) empleando como microorganismo indicador *L. innocua*. De igual forma se determinó la actividad antimicrobiana luego de someter los extractos proteicos a calentamiento a 60 °C por 30 min, empleando como microorganismo indicador *L. innocua*. Esto con el fin de establecer la naturaleza proteica, descartar la actividad antimicrobiana por la presencia de peróxido de hidrógeno, y sensibilidad al calor del agente antimicrobiano. Los ensayos se realizaron por duplicado.

## 2.8 Selección de microorganismos promisorios

Los aislados de *Lactobacillus* cuyos extractos proteicos, obtenidos en caldo MRS y/o MRS modificado, generaron los mayores halos de inhibición sobre los diferentes microorganismos patógenos, se seleccionaron para su caracterización.

Cada *Lactobacillus* seleccionado se sembró en 6 frascos tapa rosca de 100 mL con 50 mL de caldo MRS y/o MRS-FOS al 2 o 5%. Los microorganismos se incubaron a 35 °C durante 48 h, siguiendo el procedimiento descrito en el numeral 2.4. En diferentes intervalos de tiempo, durante la incubación, se retiró un frasco por microorganismo y se realizó la producción del extracto crudo proteico como se describe en el numeral 2.4 y evaluó la actividad antimicrobiana como se describe en el numeral 2.6. Adicionalmente se tomó una alícuota para su posterior análisis de carbohidratos. Cada cultivo se realizó por duplicado.

Para los microorganismos seleccionados, la actividad antimicrobiana se estableció siguiendo la definición de unidad arbitraria (UA mL<sup>-1</sup>) la cual es establecida con la máxima dilución seriada al 50% del extracto proteico que presente actividad antimicrobiana, y se puede calcular como  $(1000/d) D$ , donde  $d$  es el volumen en  $\mu\text{L}$  dispuestos en los pozos y  $D$  es la máxima dilución que presentó actividad (Bellei *et al.* 2011; Deraz *et al.* 2005; Parente *et al.* 1995) ó  $a^{b*100}$  donde  $a$  es el factor de dilución empleado para este caso 2 y  $b$  la máxima dilución que mostró actividad de al menos 2 mm de diámetro (Pieterse *et al.* 2010; Todorov *et al.* 2007b). De manera comparativa, se estableció la concentración de equivalencia entre los extractos proteicos y la nisina, basado en la comparación de los halos de inhibición, para lo cual se construyó una curva de calibración de halo de inhibición *versus* logaritmo de la concentración de nisina, se empleó como microorganismo de referencia *L. innocua* (Ignatova *et al.* 2009; Leroy and de Vuyst 1999).

## 2.9 Purificación preparativa de bacteriocinas

Los extractos que exhibieron los mayores niveles de actividad antimicrobiana, fueron purificados parcialmente mediante ultrafiltración. Para este fin se tomaron 20 mL del extracto crudo, previamente centrifugado a 5000 rpm por 20 min y 4 °C. Estos extractos se filtraron secuencialmente por membranas de celulosa de 0,45 y 0,22  $\mu\text{m}$ , y finalmente se ultrafiltraron a través de una membrana de celulosa regenerada con tamaño de poro de 10 kDa (Millipore). La actividad antimicrobiana de las dos fracciones obtenidas, ultrafiltrado y retentado, se evaluó como se describió en el numeral 2.6. El extracto crudo

y las fracciones de ultrafiltrado y retentato fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (*SDS-PAGE*) en condiciones no denaturantes siguiendo el protocolo reportado por Schagger (2006). Así mismo, para establecer el tamaño aproximado de la bacteriocina, los geles resultantes de la electroforesis fueron lavados con agua estéril e incubados en agar BHI previamente contaminado con *L. innocua* (Todorov and Dicks 2005; Todorov et al. 2010b). La proteína del extracto y las fracciones se determinó mediante el método de Bradford.

## 2.10 Análisis de carbohidratos y ácidos orgánicos

El análisis de carbohidratos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La composición de FOS presentes en el caldo MRS modificado se analizó en una columna CARBOsep CHO 411 (7.8 × 300 mm, Transgenomic, USA) empleando como fase móvil agua a un flujo de 0.4 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>, temperatura de la columna 75 °C, y detector de índice de refracción a 40 °C. La presencia de glucosa y ácidos orgánicos se analizó en una columna RSpak KC-811 (8 × 300 mm, Shodex, USA) empleando como fase móvil H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,1% a un flujo de 0.8 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>, temperatura de la columna 30 °C, y detector de índice de refracción. Curvas de calibración se elaboraron con patrones grado HPLC de FOS (Wako, Japón) y de glucosa (Merck, USA).

## 2.11 Análisis estadístico

Todos los datos se presentaron como la media ± desviación estándar. La prueba de comparación de datos se realizó mediante prueba de *t*-student. Una diferencia estadísticamente significativa fue considerada con valores de  $P < 0,05$ . Para el análisis estadístico se empleó el software Statgraphics® Centurion.



## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Aislamiento e identificación bioquímica de *Lactobacillus*

BALs han sido aisladas de ensilajes de maíz y melazas. Dentro de estas BALs sobresale el aislamiento de microorganismos hetero- y homofermentativos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (principalmente *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. amylovorus*), *Weissella*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc* (Brusetti et al. 2006; Cai 1999; Kitahara et al. 2010; Nakamura 1981; Todorov and Dicks 2005). A partir del cultivo en agar MRS del suero de leche obtenido de la incubación de los extractos de las muestras de ensilaje de maíz y melaza en leche descremada al 12%, se seleccionaron al azar 50 colonias. Las colonias aisladas del ensilaje de maíz fueron identificadas como LE, mientras que las aisladas de las melazas fueron identificadas como LM. Junto con estos aislados nativos se activaron las cepas de referencia *Lactobacillus reuteri* (LC6), *L. rhamnosus* LC705 (LC10), *L. helveticus* (LC7), y *L. acidophilus* (LC9). Tanto a los aislados nativos como a las cepas de referencia se les realizaron repiques en caldo MRS para el análisis bioquímico.

De los ensayos bioquímicos y físicoquímicos descritos en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's (Holt 1994) se realizaron tinción de Gram, crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37, 40 y 45 °C), halotolerancia (NaCl 7 y 10 %), tolerancia a la acidez (pH 3.9), metabolismo del ácido pirúvico a acetil metil carbinol (Voges-Proskauer), presencia de catalasa, indol y oxidasa. En la primera etapa se seleccionaron aislados con tinción Gram-positiva y forma de bacilo. En algunos casos dichos bacilos eran cortos. Este tamizaje permitió la selección de 28 aislados de los cuales 19 pertenecían al grupo LE y 9 al grupo LM.

La Tabla 3-1 resume los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los 28 aislados nativos seleccionados y a las cepas de referencia. Se observó que para los *Lactobacillus* de referencia las pruebas de indol, catalasa, oxidasa, Voges-Proskauer y oxidación-fermentación de la glucosa fueron negativos. Al analizar los resultados obtenidos para los aislados nativos se observó que un 52 y 100% de los aislados de LE y LM, respectivamente, presentaban estas mismas características. No obstante, de los 9 aislados que presentaron reacción positiva frente a las pruebas bioquímicas, nueve de estas dieron positivo a la prueba de catalasa.

El comportamiento de cada microorganismo a la tolerancia a la sal, acidez, y temperatura se determinó con base a la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) desarrollada por cada uno a las condiciones establecidas. Se definieron entonces tres grupos de microorganismos: aislados con crecimiento aceptable (+) aquellos con una  $DO_{600}$  entre 0.15 y 0.35 unidades

de absorbancia (U.A), aislados con un crecimiento bueno (++) aquellos con una DO<sub>600</sub> entre 0.36 y 0.70 U.A, y aislados con un crecimiento excelente (+++) aquellos con una DO<sub>600</sub> > a 0.70 U.A. Con respecto a la prueba de halotolerancia se observó un crecimiento aceptable para todos los aislados y las cepas de referencia en concentraciones del 7 y 10% de NaCl, sobresaliendo de forma particular el aislado LE5 que presentó un crecimiento bueno en 7% NaCl (Tabla 3-1). En cuanto a la tolerancia a la acidez, las cepas de referencia presentaron un crecimiento excelente en condiciones ácidas, mientras que 11 (39,3%), 6 (21,4%) y 11 (39,3%) de los aislados presentaron un crecimiento excelente, bueno y aceptable, respectivamente. De forma general se observó que tanto los aislados nativos como las cepas de referencia presentaron un crecimiento entre bueno y excelente a 35 °C, mientras que a 45 °C el crecimiento fue aceptable para la mayoría de los casos. Entre tanto a 30 °C el crecimiento presentado varió de forma particular encontrando un mayor caso de microorganismos que crecían de forma aceptable a esta temperatura (42,8% de los aislados nativos).

**Tabla 3-1.** Resultados de las pruebas físico-químicas y bioquímicas realizadas a los aislados nativos (LE y LM) y las cepas de referencia de *Lactobacillus* (LC).

Cepa	Indol <sup>a</sup>	Catalasa <sup>a</sup>	Oxidasa <sup>a</sup>	MR-VP <sup>a</sup>	30°C <sup>b</sup>	35°C <sup>b</sup>	40°C <sup>b</sup>	45°C <sup>b</sup>	NaCl 7% <sup>b</sup>	NaCl 10% <sup>b</sup>	pH 3.9 <sup>b</sup>
LC10	-	-	-	-	+++	++	+++	+	+	+	+++
LC6	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	+++
LC7	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	+++
LC9	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	+++
LE11	-	+	-	+	++	++	++	+	+	+	++
LE12	-	-	-	+	+++	+++	+++	+	+	+	+++
LE13	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	+
LE14	-	+	-	+	+++	++	++	+	+	+	+
LE15	-	+	-	+	++	++	+	+	+	+	++
LE19	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	+++
LE2	-	+	-	+	++	++	+	+	+	+	+
LE20	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	+
LE24	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	+
LE26	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	+++
LE27	-	-	-	-	+++	+++	++	+	+	+	+++
LE28	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	+++
LE29	-	-	-	-	+++	+++	++	+	+	+	+++
LE3	-	+	-	+	+	++	+	+	+	+	++
LE30	-	+	-	-	+++	+++	+++	++	+	+	+++
LE31	-	+	-	-	+++	+++	++	+	+	+	+++
LE32	-	+	-	-	+++	+++	++	++	+	+	+++
LE5	-	-	-	-	+++	+++	+++	+	++	+	+++
LE8	-	+	-	+	++	++	+	+	+	+	+
LM1	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	+
LM2	-	-	-	-	+	++	+	+	+	+	+
LM3	-	-	-	-	+	+++	++	++	+	+	+
LM4	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	+
LM5	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	+
LM6	-	-	-	-	+	+++	++	+	+	+	++
LM7	-	-	-	-	+	+++	++	++	+	+	++
LM8	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	++
LM9	-	-	-	-	+	+++	+	+	+	+	+++

<sup>a</sup> (+), Prueba positiva (+); (-), prueba negativa.

<sup>b</sup> (+), crecimiento aceptable (DO<sub>600</sub> 0.15 - 0.35 U.A); (++) crecimiento bueno (DO<sub>600</sub> 0.36 - 0.70 U.A); (+++) crecimiento excelente (DO<sub>600</sub> > a 0.70 U.A).



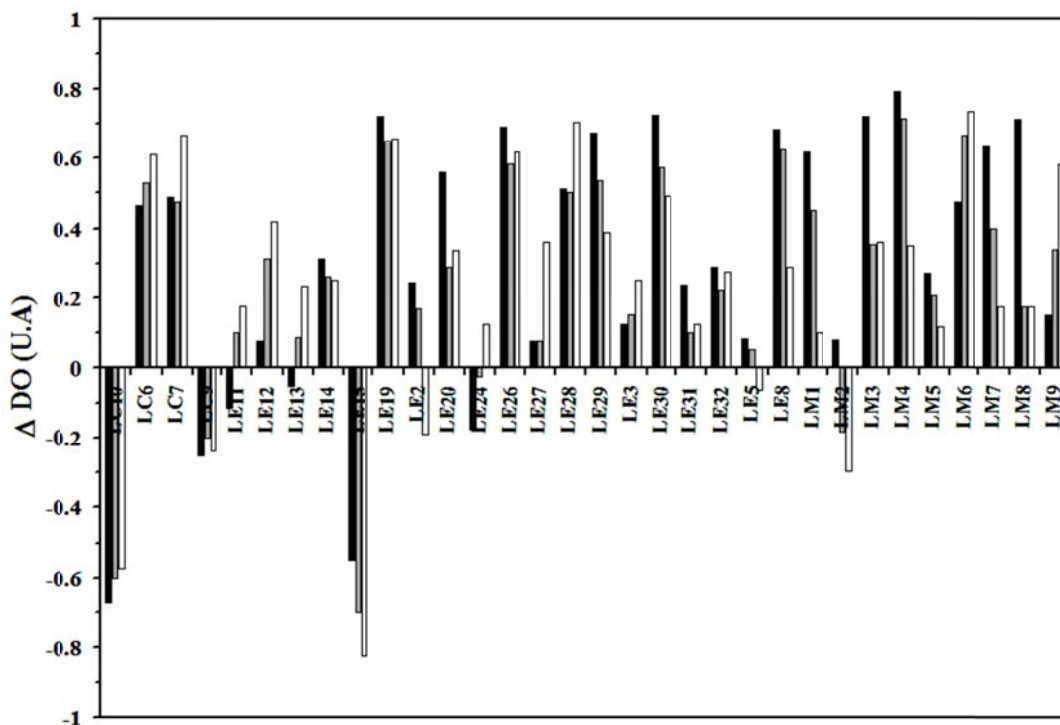
Las características obtenidas de los aislados nativos corresponden morfológicamente al género *Lactobacillus* los cuales se catalogan como microorganismos Gram-positivos, bacilos no formadores de esporas, que pueden variar desde cocabacilos hasta bacilos largos y delgados (Tannock 1999). Los *Lactobacillus* son típicamente catalasa y oxidasa negativos, sin embargo hay especies que pueden presentar actividad pseudocatalasa dando resultado positivo a la prueba de catalasa (Felis and Dellaglio 2007; Tannock 1999). Sin embargo, esta morfología y características son compartidas por microorganismos del género *Bifidobacterium* (Felis and Dellaglio 2007). Adicionalmente, los *Lactobacillus* se caracterizan por presentar crecimiento a pH ácido (3.9-4.9), ser indol negativo, a la prueba de Voges-Proskauer pueden dar positivo o negativo, y ser halo-tolerantes (Hammes and Hertel 2006; Jurtshuk and McQuitty 1976; Wheater 1955). Fue notable para la prueba de crecimiento en medio ácido, que mientras la mayoría de los aislados, 10 (52,6%), obtenidos del ensilaje de maíz presentaron un crecimiento catalogado como excelente, entre tanto solamente un aislado (11.1%) de los aislados de melaza presento un crecimiento comparable. Esta tendencia puede deberse a la naturaleza de la fuente de aislamiento, ya que mientras el ensilaje de maíz presento un pH entre 3.7 y 4.0, las melazas presentaron un pH entre 5.0 y 6.0. Bajo las características metabólicas generales establecidas para los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* es probable que los aislados LE2, LE8, LE11, LE14, LE15, LE30, LE31 y LE32, pertenezcan a géneros diferentes al *Lactobacillus* al ser catalasa positivos. Sin embargo, estos aislados no fueron excluidos del estudio por tratarse de posibles *Lactobacillus* aislados con actividad pseudocatalasa.

### **3.2 Efecto de fructooligosacáridos en la población de *Lactobacillus***

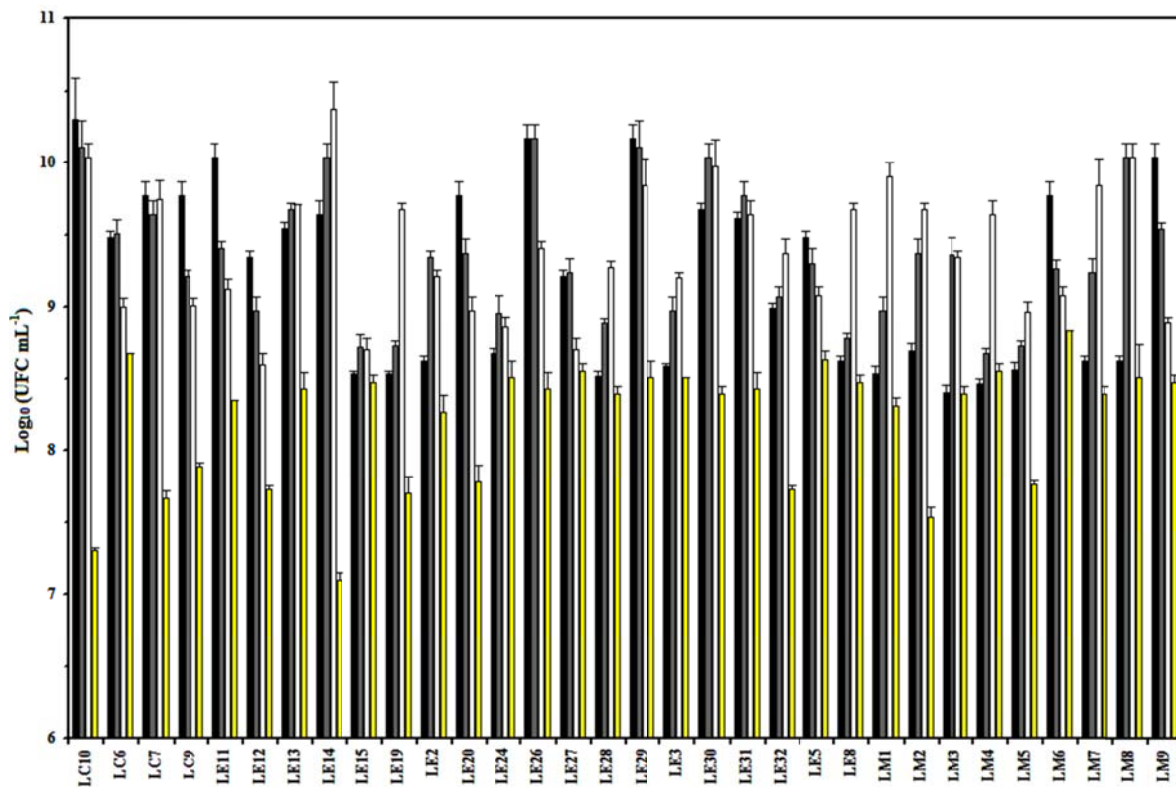
Una vez se aislaron y seleccionaron los aislados nativos con características del género *Lactobacillus* se evaluó el efecto de la concentración de FOS sobre su crecimiento y el de las cepas de referencia. Para este fin se determinó la densidad óptica ( $DO_{600}$ ), las unidades formadoras de colonia (UFC) y el pH final del medio de cultivo. Como control se realizó el cultivo de los microorganismos en caldo MRS, cuya fuente de carbono es glucosa.

En los ensayos realizados con un volumen de medio de cultivo de 10 mL, se calculó la diferencia de la  $DO_{600}$  obtenida al finalizar el cultivo en caldos MRS y MRS modificado con FOS (MRS-FOS). La Fig. 3-1 presenta las diferencias de  $DO_{600}$  obtenidas para cada una de las concentraciones de FOS empleadas (1, 2 y 5%). En la mayoría de los casos se observó una mayor  $DO_{600}$  en caldo MRS que en caldo MRS-FOS para cualquiera de las concentraciones de FOS empleadas. Sin embargo, se observó un aumento en la  $DO_{600}$  en el medio MRS-FOS ( $\Delta DO_{600}$  negativa) para el aislado LE15 y las cepas de referencia LC10 y LC9 para las tres concentraciones de FOS empleadas. Otros aislados presentaron una mayor  $DO_{600}$  en caldo MRS-FOS a concentraciones específicas de FOS. Los aislados LE13, LE11 y LE 24 mostraron una mayor  $DO_{600}$  en caldo MRS-FOS al 1%, mientras que el aislado LE24 y LM2 mostraron una mayor  $DO_{600}$  en caldo MRS-FOS al 2%, y los aislados LE5 y LM2 mostraron una mayor  $DO_{600}$  en caldo MRS-FOS al 5%. Estos resultados muestran una mayor capacidad de la mayoría de los aislados nativos para consumir glucosa frente a los FOS.

A diferencia de lo observado mediante la medición de la  $DO_{600}$ , la evaluación de unidades formadoras de colonia ( $\text{Log}_{10} \text{UFC mL}^{-1}$ ) mostró un comportamiento individual para cada aislado. Adicionalmente, se observó una relación directamente proporcional entre  $DO_{600}$  y  $\text{Log}_{10} \text{UFC mL}^{-1}$  para los aislados crecidos a las diferentes concentraciones de FOS. La Fig. 3-2 presenta las  $\text{UFC mL}^{-1}$  obtenidas para los aislados nativos y las cepas de referencia en caldo MRS y MRS-FOS. En la mayoría de los aislados se observó un aumento de al menos un orden de magnitud de la población de células viables en presencia de FOS como sustrato, comparado con los resultados obtenidos con el medio con glucosa. El aumento de las células viables se observó en función de la concentración de FOS. Sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) en las  $\text{UFC mL}^{-1}$  entre el medio con 2% de glucosa y el de FOS al 1% para los aislados nativos LE15, LE24, LE28, LM3 y LM4. Como caso excepcional se presentó un mayor número de células viables en el medio con glucosa al 2% que con FOS al 1% para el aislado LM4. En función de la concentración de FOS en el medio se observaron al menos tres comportamientos claramente definidos. Un primer comportamiento similar a una inhibición por sustrato, en donde el aumento en la concentración de FOS causa una disminución en las  $\text{UFC mL}^{-1}$ , como se observa con LC6, LC9, LE5, LE11, LE12, LE20, LE26, LE27, LM6 y LM9. Un segundo comportamiento que se ajusta al modelo de sustrato como reactivo limite, en el cual a medida que aumenta la concentración de FOS se presenta un aumento en las  $\text{UFC mL}^{-1}$ , como se observa con LE3, LE8, LE14, LE19, LE28, LE32, LM1, LM2, LM4, LM5 y LM7. Por último se observa un grupo de microorganismos en el cual el aumento de la concentración de FOS no presenta un aumento significativo ( $P > 0.05$ ) en las  $\text{UFC mL}^{-1}$ , como se observa con LC7, LC10, LE13, LE15, LE24, LE29, LE30 y LE31.



**Figura 3-1.** Diferencia de  $DO_{600}$  de las cepas de referencia y de los aislados nativos de *Lactobacillus* cultivadas en MRS y MRS-FOS (■, 1%; ▒, 2%; □, 5%) al cabo de 48 h de cultivo.



**Figura 3-2.** Unidades formadoras de colonia (UFC mL<sup>-1</sup>) de las cepas de referencia y de los aislados nativos de *Lactobacillus* cultivadas en MRS (■) y MRS-FOS (■, 1%; ■, 2%; □, 5%) al cabo de 48 h de cultivo.

A pesar que la mayoría de los estudios que reportan el efecto prebiótico de los FOS sobre *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se basan en el análisis de la densidad óptica o de las unidades formadoras de colonias, pocos estudios han evaluado en conjunto estos dos parámetros. Los resultados obtenidos presentan un comportamiento similar a los reportados por Goderska et al. (2008) y Pennacchia et al. (2006). Goderska et al. (2008) reportaron el efecto de diferentes fuentes de carbono [glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, FOS (Raftilosa<sup>®</sup>P95, 95% de pureza), inulina (Raftilina<sup>®</sup>, 100% pureza)] a una concentración de 3,33% sobre el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* (DSM 20079 and DSM 20242) y *Bifidobacterium bifidum* (DSM 20082, DSM 20215, DSM 20239 y DSM 20456). Los resultados mostraron que al cabo de 48 h los *Lactobacillus* crecidos en medio con glucosa presentaban una DO<sub>600</sub> de 1,8 U.A. y un Log<sub>10</sub> (UFC mL<sup>-1</sup>) entre 8,3 y 9,4; mientras que en medio con Raftilosa<sup>®</sup>P95 presentaban una DO<sub>600</sub> de 1.4 U.A. y un Log<sub>10</sub> (UFC mL<sup>-1</sup>) entre 6,8 y 8,1. Por otro lado, los *Bifidobacterium* obtuvieron al cabo de 48 h en medio MRS con glucosa una DO<sub>600</sub> entre 0,3 y 1,2 U.A. y un Log<sub>10</sub> (UFC mL<sup>-1</sup>) de 8.6; mientras que para los cultivos realizados en medio MRS con Raftilosa<sup>®</sup>P95 obtuvieron una DO<sub>600</sub> entre 0,10 y 0,8 U.A. con un Log<sub>10</sub> (UFC mL<sup>-1</sup>) entre 8,66 y 9,11. Pennacchia et al. (2006) evaluaron el efecto de diferentes prebióticos sobre el crecimiento de 12 cepas nativas de *Lactobacillus* aisladas de salsas italianas fermentadas. Los prebióticos seleccionados fueron FOS, GOS, inulina, IMO y lactulosa, a una concentración final del 2% en un medio de MRS libre de carbohidratos, mientras que medios de MRS con glucosa o sacarosa fueron empleados como control. Al cabo de 30 h de cultivo la DO<sub>600</sub> promedio fue de 3,31 U.A en el medio de control con glucosa, mientras que en el medio MRS-FOS obtuvieron una DO<sub>600</sub> en un rango entre 0,40 y 2,82

U.A, mostrando así una diferencia entre las  $DO_{600}$  del cultivo en MRS y MRS-FOS entre 0.49 y 2.91 U.A. Resultados similares a los descritos han sido reportados para especies de *L. vaginales*, *L. crispatus* y *L. jensenii* (Rousseau et al. 2005).

Contrario a los resultados obtenidos, Georgieva et al. (2009) reportan para una especie de *Lactobacillus plantarum* aislada de queso, un deficiente crecimiento en medio MRS-FOS al 2% al cabo de 48 h con respecto al medio con glucosa o con GOS al 2%. Esto demuestra la diversidad metabólica que puede estar presente en los diferentes aislados de *Lactobacillus* y el efecto que puede tener la adaptación a un sustrato específico. Lo que confirma una dependencia de la especie para el metabolismo de los prebióticos como los FOS.

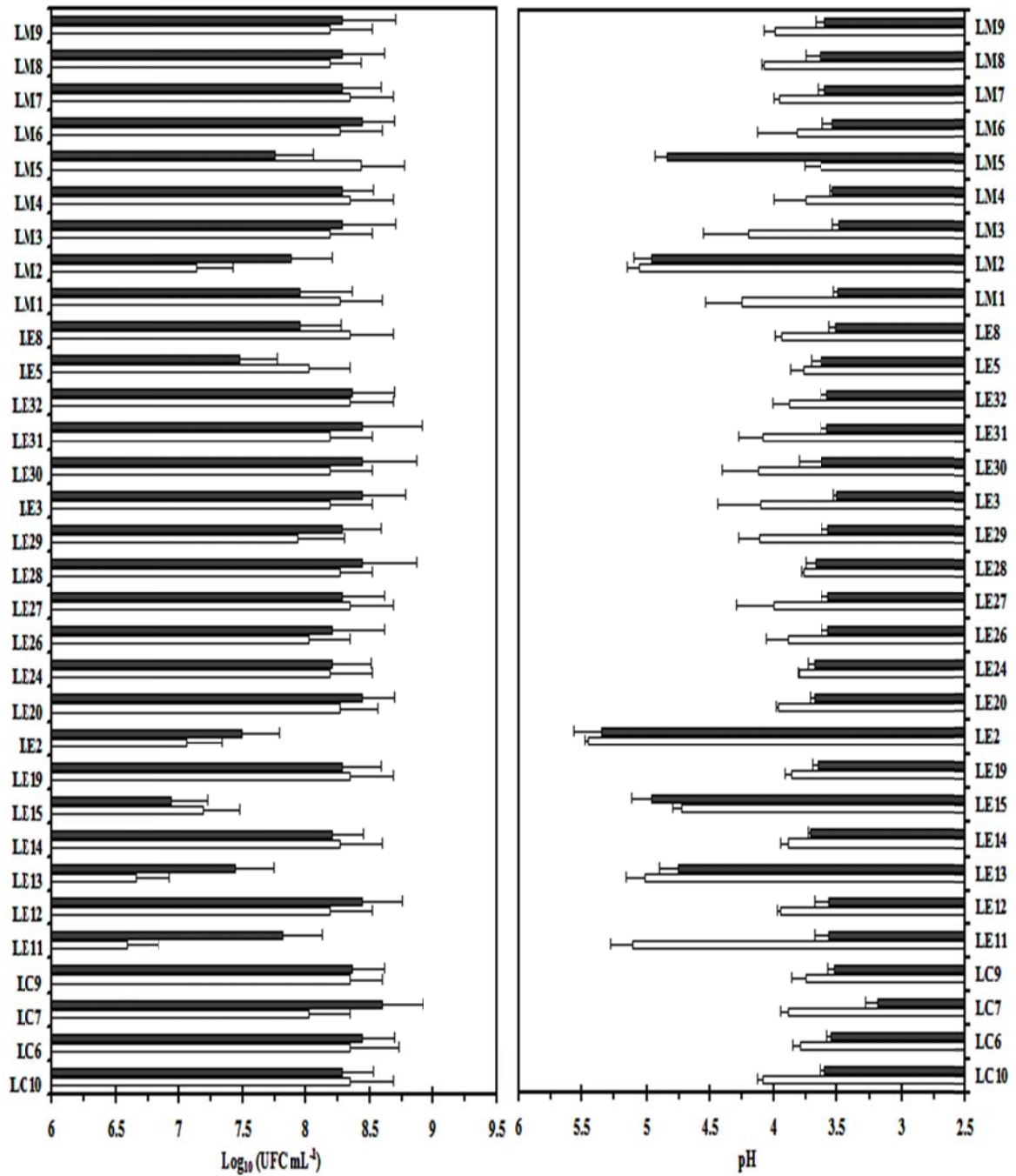
La variación observada entre la  $DO_{600}$  y las UFC en los dos medios de cultivo, podría estar relacionada con aspectos morfológicos de los *Lactobacillus* al pasar del medio MRS en el cual se han aislado y repicado, a un medio modificado MRS-FOS, medio en el cual el cambio de la fuente de carbono puede generar alguna modificación en su estructura y forma. Neysens et al. (2003) reportaron cambios morfológicos de forma y tamaño al someter a estrés *L. amylovorus* DCE 471 por suplemento con NaCl en el medio de cultivo. Obteniendo para una misma densidad óptica diferencias en el conteo de células viables entre 2 y 2.5 veces el conteo obtenido bajo condiciones óptimas de cultivo. Jacques et al. (1980) reportaron cambios morfológicos que iban desde formas de cocos hasta bacilos ramificados y filamentosos para *L. salivarius*, al realizar modificaciones en las condiciones de cultivo, como pH y anaerobiosis, y componentes en el medio, usando MRS y MRS modificado.

### **3.3 Producción del extracto crudo proteico**

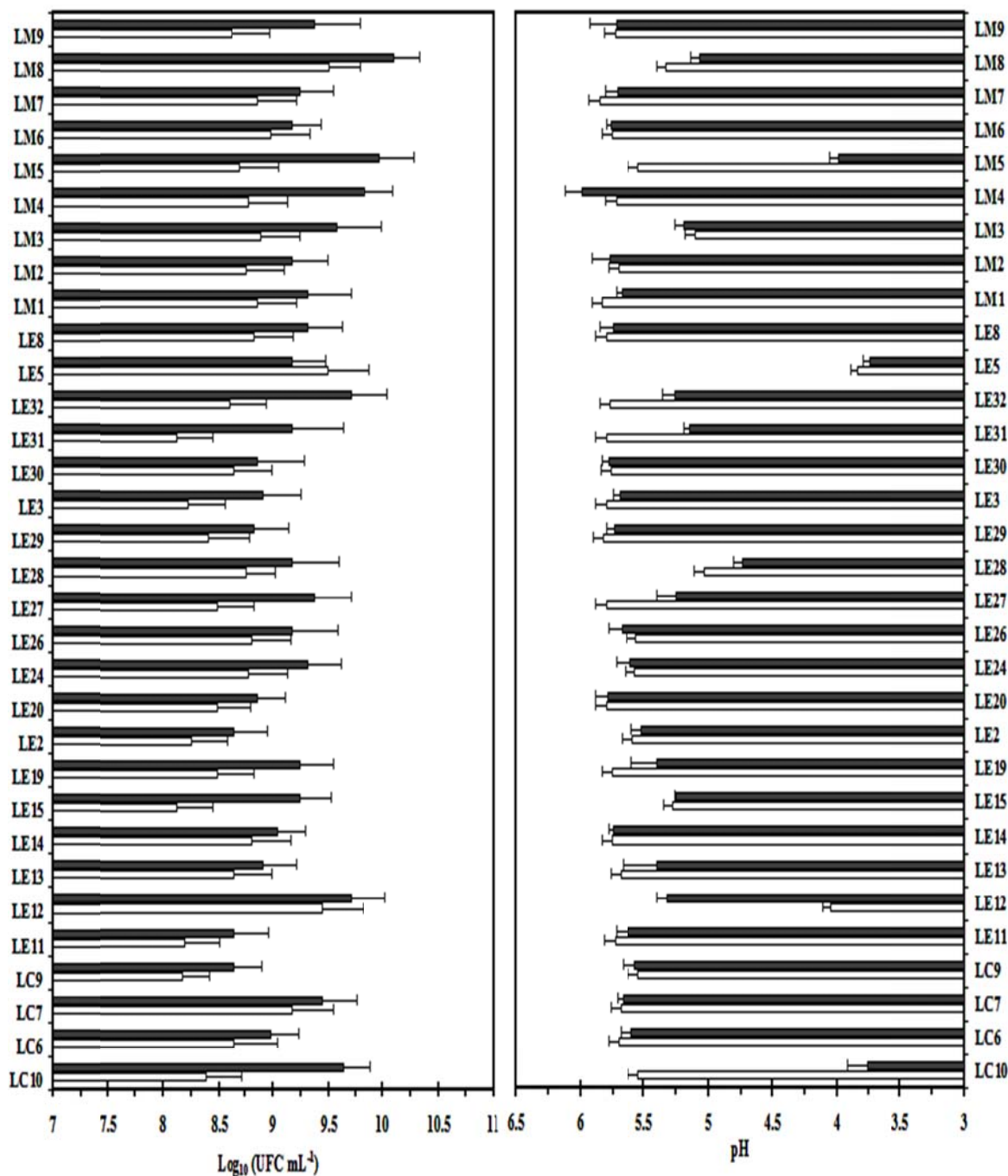
#### **3.3.1 Efecto del tiempo de cultivo sobre la población de *Lactobacillus***

Durante la producción de los extractos proteicos con los medios MRS y MRS-FOS al 2%, concentración que se seleccionó con el fin de comparar el efecto de la fuente de carbono y no de la concentración sobre la actividad antimicrobiana, se evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre las UFC  $mL^{-1}$ , y pH final.

Las Fig. 3-3 y 3-4 presentan las UFC  $mL^{-1}$  y pH final obtenido para las cepas de referencia y los aislados nativos cultivados en caldo MRS y MRS-FOS al 2%, respectivamente. Se seleccionaron 24 y 48 h de cultivo ya que se espera obtener la mayor cantidad de bacteriocina hacia el final de la fase exponencial y esta producción se suele mantener durante la fase estacionaria temprana, usualmente decaendo en la fase estacionaria tardía donde se presenta muerte celular y puede presentarse una mayor presencia de proteasas (Cintas et al. 2001; Corr et al. 2007; Dortu et al. 2009; Riley and Wertz 2002b). Estas observaciones concuerda con reportes de producción de proteasas por *Lactobacillus*, las cuales presentan su mayor actividad proteolítica en la fase estacionaria, entre las 36 y 48 h de cultivo en MRS (Ikram-UI and Mukhtar 2007; Kholif et al. 2011; Sharmin et al. 2004).



**Figura 3-3.** Efecto del tiempo de cultivo (□, 24h; ■, 48 h) sobre el pH final y las unidades formadoras de colonia  $\text{Log}_{10}(\text{UFC mL}^{-1})$  de las cepas de referencia (LC) y de los aislados nativos (LE y LM) de *Lactobacillus* cultivadas en MRS.



**Figura 3-4.** Efecto del tiempo de cultivo (□,24h; ■,48 h) sobre el pH final y las unidades formadoras de colonia Log<sub>10</sub>(UFC mL<sup>-1</sup>) de las cepas de referencia (LC) y de los aislados nativos (LE y LM) de *Lactobacillus* cultivadas en MRS-FOS al 2%.

Con excepción de los aislados LE11, LE13, LM2, y LM5, de forma general se observó que el cultivo de las diferentes cepas en caldo MRS (Fig. 3-3) no presentó cambios estadísticamente significativos ( $P > 0,05$ ) en el Log<sub>10</sub>(UFC mL<sup>-1</sup>) durante las 24 y 48 h de

cultivo, con valores entre 6,5 y 8,5. Sin embargo, con excepción del aislado LE5, se apreció que un aumento en el tiempo de cultivo produce un aumento en el  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Esto podría deberse a que los microorganismos se encuentren cerca del final de la fase exponencial a las 24 h y en la fase estacionaria al cabo de 48 h de cultivo. Para diferentes *Lactobacillus* se ha reportado el inicio de la fase estacionaria entre las 14 y 30 h de cultivo, así como valores de  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) entre 4 y 10 dependiendo del medio y condiciones de cultivo, especie y origen del aislado (Dave and Shah 1997; Goderska et al. 2008; Koch et al. 2008; Passos et al. 1994; van den Berg et al. 1995; Zhang et al. 2011, In press).

Con respecto al pH se observó una disminución para la mayoría de los casos de al menos 2 unidades con respecto al pH inicial ( $6,5 \pm 0,2$ ) (Fig. 3-3). Disminuciones de por lo menos 0.4 unidades se observaron entre las lecturas de pH a 24 h y 48 h de cultivo, siendo para la mayoría de los casos estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ). El pH final en los cultivos con caldo MRS, se presentó típicamente en un intervalo entre 3,2 y 4,2, exceptuando las cepas LE2, LE11, LE13, LE15, LM2 y LM3 que presentaron un pH entre 4,7 y 5,5, para uno o los dos tiempos de cultivo.

Se observó un comportamiento diferente de algunas de las cepas de referencia y aislados nativos al ser sembradas en medio MRS-FOS al 2% (Fig. 3-4), obteniendo una mayor diferencia entre el  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) de 48 h y 24 h. De forma general se observó un aumento en la población viable con el aumento del tiempo, con un gran número de aislados presentando diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores de  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) de 48 h y 24 h, a diferencia de lo observado en los cultivos con MRS. Tal es el caso de los aislados LC10, LE15, LE19, LE27, LE31, LM4, LM5, y LM9. A diferencia del cultivo del cultivo en MRS, el cultivo en MRS-FOS no presentó una disminución marcada del pH inicial ( $6,5 \pm 0,2$ ) siendo de alrededor de 0,8 unidades, encontrándose para la mayoría entre 5,8 y 5,3. Para la mayoría de las cepas no se presentó diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre las lecturas de pH a las 24 y 48 h de cultivo. Sin embargo, para las cepas LC10, LE12, LE19, LE27, LE28, LM1, LM4, LM5, LM8 se observó una diferencia de pH significativa. Como característica particular, las cepas LC10, LE5, LE12 y LM5, para uno o los dos tiempos de cultivo presentaron un  $\text{pH} \geq 4,0$ .

En la sección 3.2 se discutió el efecto de los FOS sobre la población de *Lactobacillus*. Estos resultados, de forma general, se encuentran de acorde a lo reportado por otros autores. Georgieva et al. (2009) obtuvieron para *L. plantarum*, cultivado en MRS y MRS-FOS 2%, el inicio de la fase estacionaria alrededor de las 18 h de cultivo, presentando una disminución del pH inicial (7,0) de 3,5 y 0,5 unidades, y un  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) de 9,1 y 8,0, respectivamente. Esta disminución de pH y población viable permaneció prácticamente invariable entre las lecturas de 24 y 48 h de cultivo. Dave and Shah (1997) obtuvieron para *L. acidophilus* LA-1 cultivado en MRS una disminución del pH inicial (6,5) de 2,7 unidades y un  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) final de 8,7, valores que se mantuvieron invariables entre 24 y 48 h de cultivo. Goderska et al. (2008) reportaron un comportamiento contradictorio al descrito anteriormente para los mismos tiempos de cultivo entre dos especies de *L. acidophilus*, obteniendo para *L. acidophilus* DSM 20079 una disminución de la población viables de 1,0 y 0,25 unidades de  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), en caldo MRS y MRS modificado con 2% FOS, respectivamente; mientras que *L. acidophilus* DSM 20242 presentó un aumento de 1,5 y 0,3 en el conteo de viables en los medios y tiempos de cultivo mencionados. Sin embargo, el pH final al cabo de 48 h de cultivo se encontró entre 3,68 y 3,81 en los cultivos con FOS y entre 3,67 y 3,72 en los

cultivos con MRS, partiendo de un pH inicial de 6.5. Una disminución en el pH similar a la reportada por Goderska et al. (2008) para el cultivo de *Lactobacillus* en medio MRS y MRS modificado con FOS fue reportada por Bañuelos et al. (2008), quienes obtuvieron un pH final de 4,0 partiendo de un pH inicial 6,0 para el cultivo de *L. gasseri* CECT5714 y *L. fermentum* CECT5716 tanto en MRS y MRS modificado con Raftilosa® al 2%. Este descenso de pH se alcanzó luego de 24 h de cultivo y permaneció invariable hasta alcanzar las 48 h de cultivo.

En resumen, estos resultados muestran que los diferentes resultados obtenidos para los microorganismos aislados en el presente trabajo se encuentran enmarcados frente a los resultados reportados para microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus*.

### **3.3.2 Consumo de carbohidratos y producción de ácidos orgánicos**

Debido al efecto del tiempo sobre el crecimiento de los microorganismos, donde de forma general se ha establecido el estado estacionario para las diferentes cepas entre las 24 y 48 h de cultivo, se realizó un análisis de carbohidratos y ácidos orgánicos, específicamente ácido láctico y acético, al cabo de las 48 h de cultivo.

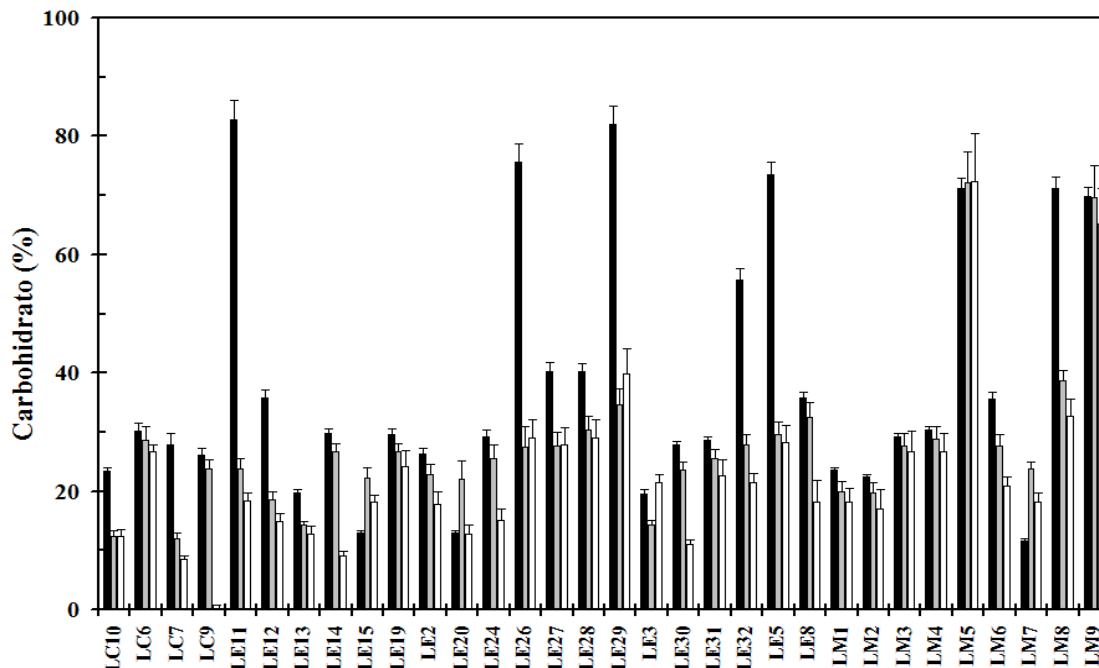
Para un 84% de las cepas evaluadas, incluyendo las cepas de referencia y los aislados nativos, se logró un consumo superior 90% de la glucosa presente en el caldo MRS. Sin embargo, las cepas LC6, LC10, LE3, LE13, y LM7 presentaron un consumo entre el 65 y 90% de la glucosa inicial.

La Fig. 3-5 presenta el consumo de los diferentes fructooligosacáridos presentes en la mezcla comercial de FOS por los diferentes aislados nativos y cepas de referencia. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, esta mezcla comercial de FOS se encuentra compuesto por 31, 54 y 15% de 1-kestosa, nistosa y 1-fructofuranosil nistosa, respectivamente. El consumo de FOS por la mayoría de las cepas se caracterizó por un mayor consumo de 1-kestosa, seguido por el consumo de nistosa y 1-fructofuranosil nistosa (Fig. 3-5). El consumo de 1-kestosa presentó variaciones entre el 11,5 y 82,8% de la concentración inicial, el consumo de nistosa se presentó entre el 12,0 y 72,0% de la concentración inicial, y finalmente el consumo de 1-fructofuranosil nistosa se presentó entre el 0,8 y 72,3% de la concentración inicial. Sin embargo, se pueden agrupar los diferentes aislados en cuatro grupos. Un primer grupo donde el consumo de los tres FOS es similar, como lo exhibieron los aislados LC6, LE2, LE3, LE19, LE31, LM1, LM2, LM3, LM4, LM5, y LM9. Un segundo grupo en el cual se observa una preferencia por el consumo de 1-kestosa, como lo presentaron los aislados LC7, LC10, LE5, LE11, LE12, LE13, LE26, LE27, LE28, LE29, LE32, LM6, y LM8. Un tercer grupo donde el consumo de 1-kestosa y nistosa es similar y superior al consumo de 1-fructofuranosil nistosa, como lo exhibieron las cepas LC9, LE8, LE14, LE24, y LE30. Y finalmente, un cuarto grupo donde el consumo de nistosa o 1-fructofuranosil nistosa prevalece sobre el consumo de 1-kestosa, como lo presentaron las cepas LE15, LE20, y LM7. Estos resultados muestran las diferencias metabólicas y de preferencia por el consumo de los FOS presentes en el medio. Sin embargo, se destaca una mayor preferencia por el consumo de FOS con menores grados de polimerización (DP), ya que cerca del 56% de las cepas consumieron en mayor proporción 1-kestosa y/o nistosa, FOS con DP 2 y 3 unidades de fructosa, respectivamente. Entre tanto, el 34,6% y 9,4%



de las cepas evaluadas presentaron un consumo similar de los tres FOS y de los FOS con DP 3 y 4 (nistosa y 1-fructofuranosilnistosa), respectivamente. Estos resultados sugieren diferencias en la producción de  $\beta$ -fructosidasas y/o  $\beta$ -fructofuranosidasas, enzimas encargadas de hidrolizar los FOS, por las diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Goh et al. 2007).

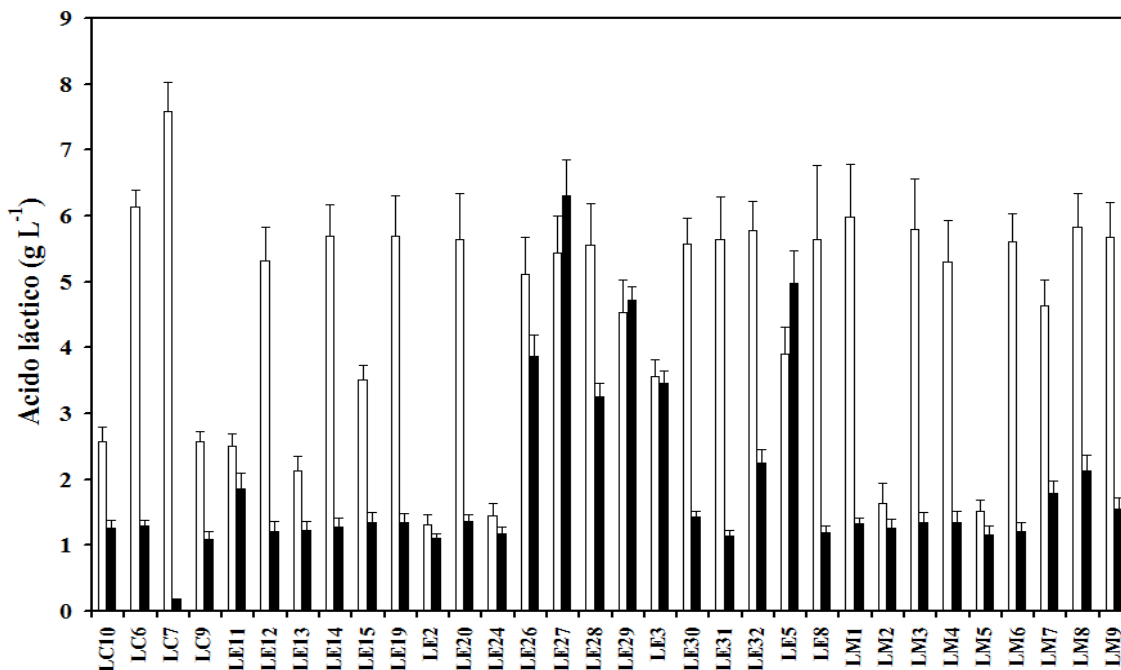
Los resultados obtenidos están acorde con los reportados por otros autores. Bañuelos et al. (2008) reportaron un consumo de 1-kestosa del 44,3% luego de 48 h de cultivo y del 100% luego de 12 h de cultivo por *L. gasseri* CECT5714 y *L. fermentum* CECT5716, respectivamente. Mientras que el consumo de nistosa y 1-fructofuranosil nistosa durante las 48 h de cultivo fue similar para los dos *Lactobacillus*, siendo del 25 y del 0%, respectivamente. Entre tanto, Ignatova et al. (2009) reportó para diferentes especies de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* preferencias diferentes frente al consumo de prebióticos (FOS, GOS, y glucooligosacáridos) con diferente grado de polimerización. Los resultados reportados al cabo de 48 h de cultivo, empleando un medio de MRS modificado con 2% de FOS (Raftilose®, 5% glucosa, fructosa, y sacarosa; 12% DP2, 48% DP4, y 35% DP7), mostraron la capacidad de la cepa *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B8 para consumir completamente el FOS de DP7 seguido por el consumo de un 50% del DP2 y DP4 inicial. Entre tanto la cepa *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B5 presentó un consumo de 58% de DP2, 64% de DP4, y 80% de DP7. Rousseau (2005) reportaron un consumo del 100% de glucosa luego de cultivar durante 48 h en caldo MRS *L. vaginalis*, *L. crispatus*, y *L. jensenii*; de igual forma presentaron consumos de FOS diferentes dependiendo del microorganismo y el DP. El consumo de los diferentes FOS para cada microorganismo lo obtuvieron entre un 10 y 81%, presentando el mayor consumo los de DP3, entre 76 y 81%; seguido por los de DP4 entre 10 y 24%, y por último los DP5 con un consumo cercano al 10%.



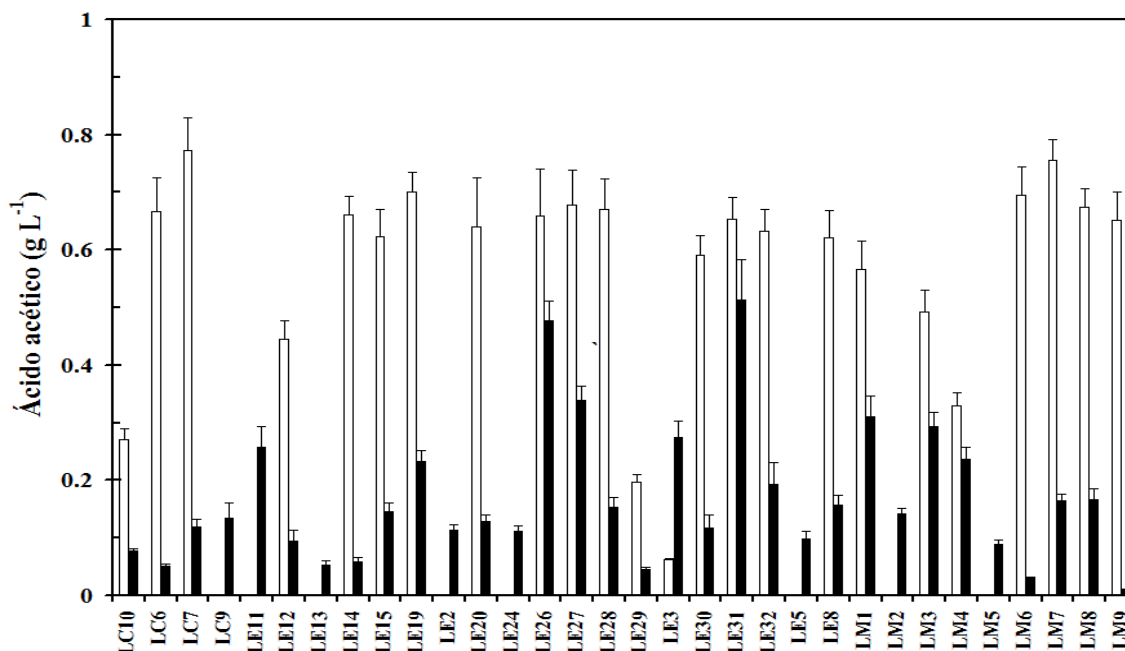
**Figura 3-5.** Consumo de FOS (■,1-kestosa; ■,nistosa; □,1-fructofuranosil nistosa) por las cepas de referencia y los aislados nativos de *Lactobacillus* cultivadas en MRS-FOS al 2% al cabo de 48 h de cultivo.

Durante el análisis de los extractos proteicos se observó la producción de ácidos orgánicos y etanol, este último no cuantificable. Las Figs. 3-6 y 3-7 presentan la producción ácido láctico y acético, respectivamente, al cultivar las cepas de referencia y los aislados nativos en caldo MRS y MRS modificado con 2% de FOS al cabo de 48 h de cultivo. Se observó que para la mayoría de las cepas se produjo una mayor cantidad de ácido láctico cuando se cultivaron en medio con glucosa que con FOS ( $P < 0.05$ ). Exceptuando las cepas LE5, LE11, LE24, LE27, y LE29 que no presentaron diferencia ( $P > 0.05$ ) en la producción de ácido láctico con las diferentes fuentes de carbono. El ácido láctico obtenido en los cultivos de las cepas en medio con glucosa varío entre 0,13 y 7,48 g L<sup>-1</sup>, mientras que su cultivo en medio con FOS permitió obtener concentraciones de ácido láctico entre 0,17 y 6,76 g L<sup>-1</sup>. En medio MRS 59% de los aislados lograron una producción superior a 5,0 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico, mientras que en el medio MRS-FOS se destacó una alta producción de ácido láctico ( $> 4,0$  g L<sup>-1</sup>) tan solo para los aislados LE5, LE27 y LE29. Esta baja producción de ácido láctico en medio con FOS concuerda con los resultados de pH, en los que se observó una menor reducción del pH en el medio MRS-FOS con respecto al observado en el medio MRS.

En cuanto a la producción de ácido acético se observó diferencia ( $P < 0.05$ ) al cultivar las diferentes cepas en medio MRS con glucosa o con FOS (Fig. 3-7). El ácido acético producido en los cultivos de las cepas en medio con glucosa varío entre 0,0 y 0,77 g L<sup>-1</sup>, mientras que el obtenido en los cultivos con FOS permitió obtener concentraciones de ácido láctico entre 0,01 y 0,51 g L<sup>-1</sup>. De forma particular sobre sale la ausencia en la producción de ácido acético en medio con glucosa por las cepas LC9, LE2, LE5, LE11, LE13, LE24, LM2, y LM5 en ambos medios por las cepas.



**Figura 3-6.** Producción de ácido láctico por las cepas de referencia y de los aislados nativos de *Lactobacillus* cultivadas en MRS (□) y MRS-FOS al 2% (■) al cabo de 48 h de cultivo.



**Figura 3-7.** Producción de ácido acético por las cepas de referencia y de los aislados nativos de *Lactobacillus* cultivadas en MRS (□) y MRS modificado con FOS 2% (■) al cabo de 48 h de cultivo.

La Tabla 3-2 presenta la relación molar entre el ácido acético y ácido láctico obtenido durante el cultivo de las diferentes cepas en MRS y MRS-FOS. Se observó para los cultivos realizados en medios con glucosa ratios molares de los ácidos acético y láctico entre 0,0:1 a 0,27:1; mientras que en los cultivos realizados en medios con FOS el ratio de estos ácidos se encontró entre 0,01:1 y 1.04:1. Esto muestra el uso combinado de las rutas metabólicas hexosa monofosfato y pentosa fosfato para metabolizar la glucosa y la fructosa, sin embargo se observa para la mayoría de las cepas la tendencia a oxidar el acetil fosfato a ácido acético y no a acetil coA, precursor en la posterior producción de etanol (Endo et al. 2009). Adicionalmente, no se observa un comportamiento o tendencia general entre el ratio de los ácidos orgánicos y la fuente de carbono.

Las cantidades de ácido láctico y acético obtenidos por los diferentes microorganismos concuerda con los resultados reportados por otros autores durante el cultivo de diferentes especies de *Lactobacillus* entre 24 y 48 h. Producciones de ácido láctico entre 3,3 y 17 g L<sup>-1</sup> han sido reportadas para cultivos en MRS, mientras que concentraciones de 0 a 4,1 g L<sup>-1</sup> han sido reportadas para cultivos en MRS modificado con 2% de FOS. Para el ácido acético se han reportado concentraciones entre 0 y 2,27 g L<sup>-1</sup> para *Lactobacillus* cultivados en MRS, mientras que concentraciones entre 0,781 y ~1,01 g L<sup>-1</sup> han sido reportadas para cultivos en MRS modificado con 2% de FOS 48 h (Beards et al. 2010; Georgieva et al. 2009; Ignatova et al. 2009; Liong and Shah 2005; Rousseau et al. 2005; Stewart et al. 2008). Entre tanto, para diferentes especies de *Lactobacillus* cultivadas con diferentes fuentes de carbono, glucosa, fructosa, sacarosa, han sido reportadas variaciones en la relación molar entre el ácido acético y láctico que van desde 0,0:1 a 1.17:1 en especies homofermentativas, y desde 0,08:1 hasta 4,50:1 es especies heterofermentativas (Christensen et al. 1958). Bañuelos et al. (2008) realizaron el seguimiento a la producción de ácidos grasos de cadena corta en cultivos de

*Lactobacillus* en medio con FOS durante 8 y 48 h de cultivo, sin observar una correlación entre el patrón de ácidos producidos y la fuente de carbono.

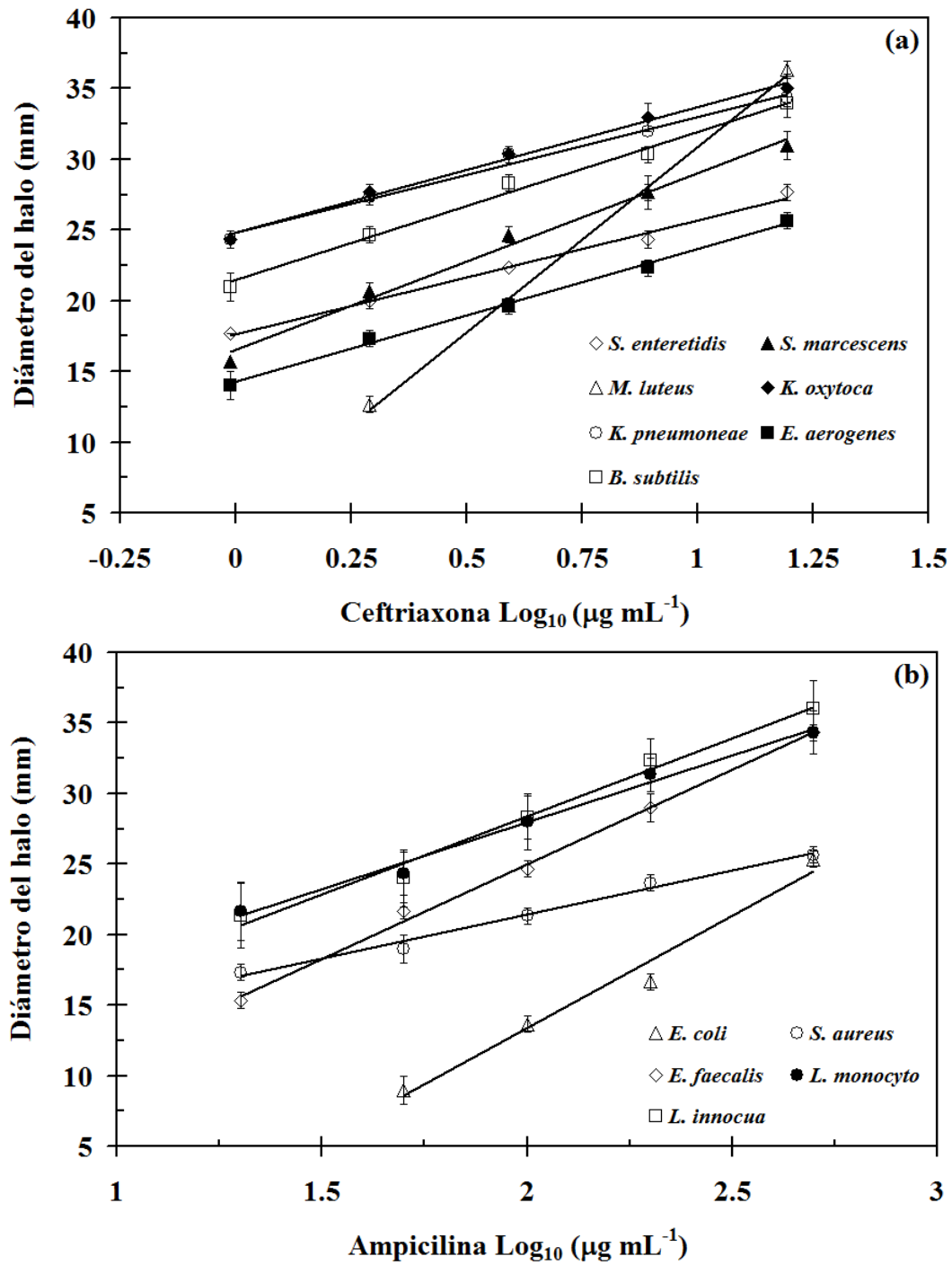
**Tabla 3-2.** Relación molar entre los ácidos acético y láctico producidos al cabo de 48 h de cultivo en medios MRS y MRS-FOS por las diferentes cepas.

	MRS	FOS		MRS	FOS
LC10	0.16	0.09	LE29	0.06	0.01
LC6	0.16	0.06	LE3	0.03	0.12
LC7	0.15	1.04	LE30	0.16	0.12
LC9	0.00	0.19	LE31	0.17	0.67
LE11	0.00	0.21	LE32	0.16	0.13
LE12	0.13	0.12	LE5	0.00	0.03
LE13	0.00	0.06	LE8	0.17	0.20
LE14	0.17	0.07	LM1	0.14	0.35
LE15	0.27	0.16	LM2	0.00	0.17
LE19	0.18	0.26	LM3	0.13	0.33
LE2	0.00	0.15	LM4	0.09	0.26
LE20	0.17	0.14	LM5	0.00	0.12
LE24	0.00	0.14	LM6	0.19	0.04
LE26	0.19	0.19	LM7	0.24	0.14
LE27	0.19	0.08	LM8	0.17	0.12
LE28	0.18	0.07	LM9	0.17	0.01

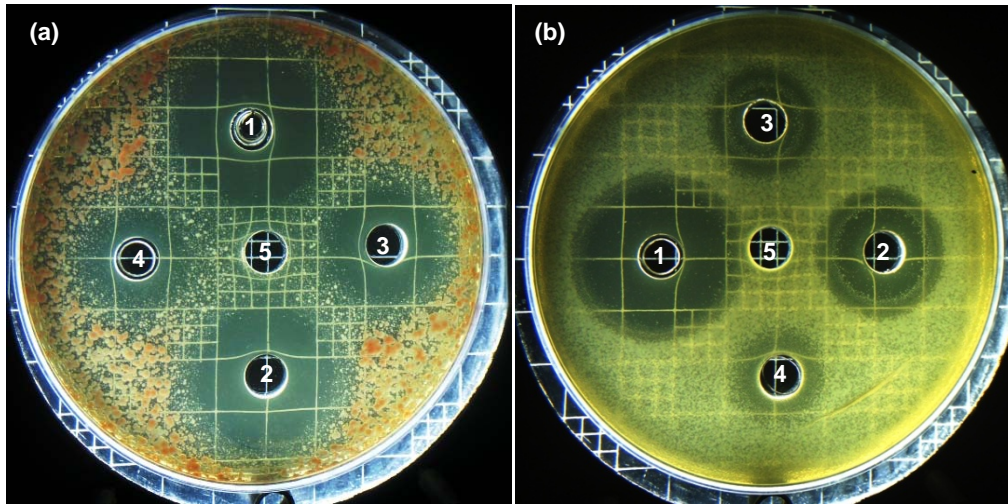
### 3.3.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos

Previo a la evaluación de la actividad antimicrobiana por los extractos proteicos, se evaluó el efecto de la concentración de antibiótico, ampicilina y/o ceftriaxona, sobre los microorganismos patógenos seleccionados (*Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 35152, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. oxytoca*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes*, y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). La selección del antibiótico sobre los respectivos microorganismos patógenos se realizó con base en el espectro de inhibición de cada antibiótico y la guía de selección de antibióticos de Kuper (2006). Esto se realizó con el fin de establecer la relación entre el diámetro de los halos de inhibición y la concentración de antibiótico, y evitar la selección de cepas que pueden causar falsos negativos a la prueba de actividad microbiana con los extractos proteicos debido a resistencias adquiridas por el microorganismo. Las Figs. 3-8 y 3-9 presentan resultados de la prueba de difusión en gel del antibiótico y la relación entre el diámetro del halo y la concentración de antibiótico, respectivamente. Para todos los perfiles de diámetro *versus* concentración de antibiótico se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) superior a 0.98.

De los microorganismos patógenos seleccionados se observó que frente a la ceftriaxona tanto *K. oxytoca* como *K. pneumoniae* presentaron la mayor sensibilidad (Fig. 3-8a), mientras que *L. innocua* y *L. monocytogenes* presentaron la mayor sensibilidad ante ampicilina (Fig. 3-8b). Caso contrario ocurrió con *M. luteus* y *E. coli* que requirieron de una mayor concentración de antibiótico para poder observar un halo de inhibición.



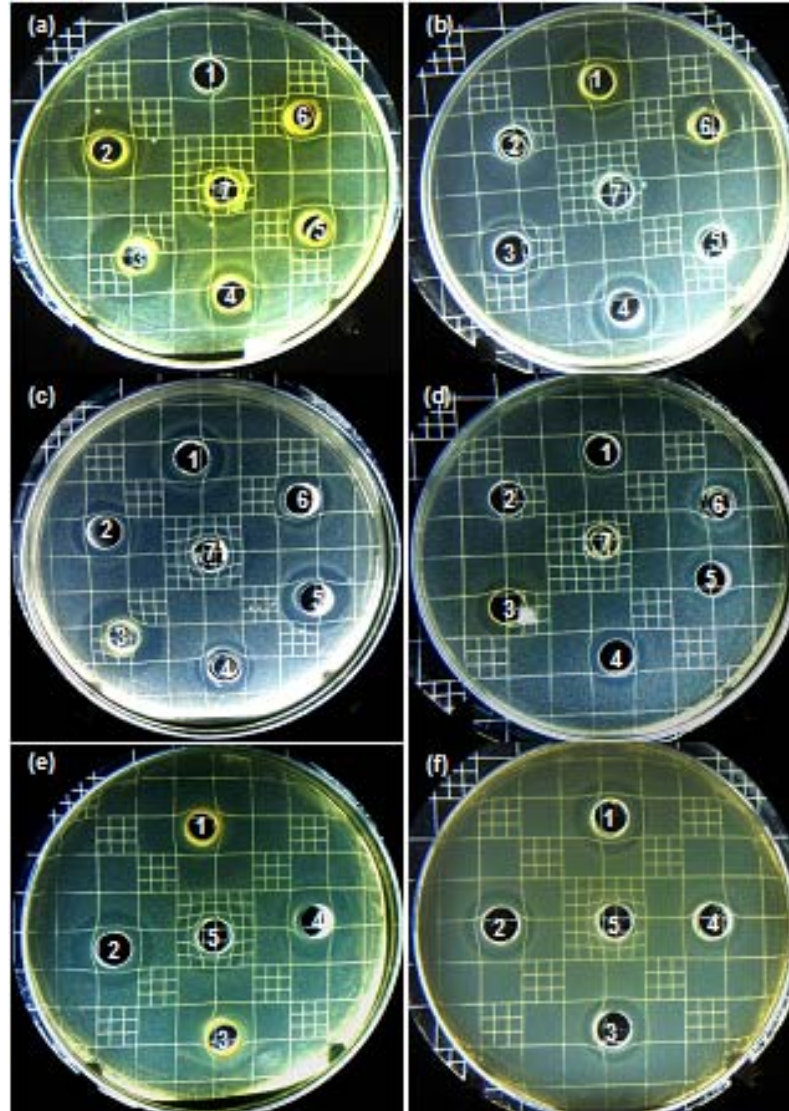
**Figura 3-8.** Efecto de la concentración de ceftriaxona (a) y ampicilina (b) sobre la inhibición del crecimiento sobre los microorganismos patógenos seleccionados.



**Figura 3-9.** Actividad antimicrobiana de la ceftriaxona (C) y ampicilina (A) mediante la prueba de difusión en gel para *S. marcescens* (a) y *E. coli* (b), respectivamente. Las concentraciones ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) evaluadas de cada antibiótico fueron: 1: 7,81 (C) – 500 (A); 2: 3,95 (C) – 200 (A); 3: 1,95 (C) – 100 (A); 4: 0,97 (C) – 50 (A); 5: control negativo, agua estéril.

Los extractos proteicos obtenidos al cabo de 24 y 48 h de cultivo en medios MRS y MRS-FOS no presentaron actividad antimicrobiana frente a *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. marcescens* y *E. aerogenes*. Sin embargo, se observó actividad antimicrobiana para algunos extractos proteicos frente *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli*, y *E. faecalis* (Fig. 3-10). La Tabla 3-2 presenta los resultados de actividad obtenidos por los diferentes extractos proteicos.

De acuerdo al tipo de microorganismos que fueron inhibidos por los diferentes extractos proteicos se obtuvieron dos espectros de inhibición. El primer espectro de inhibición presentó actividad contra microorganismos Gram-positivos, mientras que el segundo espectro presentó actividad contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Todos los extractos proteicos que presentaron actividad antimicrobiana fueron activos en diferente proporción frente a *L. innocua* (Tabla 3-2). Sin embargo, únicamente los extractos producidos por los aislados LE5 y LE27, presentaron actividad frente a *L. monocytogenes*, mostrando que los extractos de estos aislados poseen una mayor actividad antilisteria. Adicionalmente, el extracto proteico proveniente del aislado LE5 presentó actividad antimicrobiana frente *E. faecalis* lo que muestra una posible acción particular frente a microorganismos Gram-positivos. A diferencia del extracto proteico producido por LE5, el extracto producido por LE27 adicionalmente a la actividad antilisteria y la actividad contra *E. faecalis*, mostró actividad frente *E. coli* y *S. enteritidis*, bacilos Gram-negativos.



**Figura 3-10.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos producidos por aislados nativos, frente a *L. innocua* (a), *E. faecalis* (b), *E. faecalis* (c), *L. monocytogenes* (d), *S. enteritidis* (e), y *L. innocua* (f). Identificación de los extractos proteicos empleados en los diferentes ensayos: En (a) los pozos 1 a 6 contenían extractos proteicos del aislado LE5 cultivado en MRS-FOS (pozos 1 al 3) y en MRS (pozos 4 al 6), pozo 7 control positivo con nisina. En (b) los pozos 1 y 3, 6 y 4 contenían extractos proteicos de los aislados LE5 y LE27 cultivados en MRS-FOS, respectivamente, la ausencia de actividad en los pozos 2 y 5 se observó para los extractos obtenidos del cultivo de LE5 y LE27 en MRS, el pozo 7 control negativo, medio MRS estéril. En (c) los pozos 1 a 6 contenían los extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo del aislado LE5 en MRS-FOS, el pozo 7 contenía un control positivo con nisina. En (d) los pozos 1 y 2 contenían los extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo del aislado LE5 en MRS, los pozos 3 a 6 contenían los extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo del aislado LE5 en MRS-FOS, y el pozo 7 contenía el control positivo con nisina. En (e) los pozos 1 a 4 contenían los extractos proteicos obtenidos a diferentes tiempos de cultivo (12, 24, 36 y 48 h) del aislado LE27 en MRS-FOS, el pozo 5 contenía el control positivo con ceftriaxona. En (f) se presenta la prueba de diluciones del 50% sobre el extracto proteico obtenido por el cultivo del aislado LE27 en MRS-FOS para obtener las unidades arbitrarias (UA).

**Tabla 3-3.** Actividad antimicrobiana evaluada mediante difusión en gel por los extractos proteicos producidos por el cultivo de aislados nativos en MRS y MRS-FOS al cabo de 24 y 48 h. Los datos se presentan como la media de 6 lecturas, ( $\phi_{\text{final}} - \phi_{\text{pozo}}$ ) junto con la desviación estándar.

Aislado	Medio	Microorganismo patógeno				
		<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
LM1	MRS	—	—	—	—	—
	MRS-FOS	11±2 <sup>a</sup> , 9±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LM2	MRS	—	—	—	—	—
	MRS-FOS	*7±1 <sup>a</sup> , 5±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LM3	MRS	—	—	—	—	—
	MRS-FOS	*6±2 <sup>a</sup> , 3±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LE5	MRS	11±1 <sup>a</sup> , 12±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
	MRS-FOS	13±1 <sup>a</sup> , 15±2 <sup>b</sup>	*9±1 <sup>a</sup> , 6±1 <sup>b</sup>	*8±1 <sup>a</sup> , 6±1 <sup>b</sup>	—	—
LE8	MRS	—	—	—	—	—
	MRS-FOS	10±1 <sup>a</sup> , 9±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LE12	MRS	—	—	—	—	—
	MRS-FOS	12±1 <sup>a</sup> , 10±2 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LE19	MRS	—	—	—	—	—
	MRS-FOS	8±2 <sup>a</sup> , 7±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LE28	MRS	9±1 <sup>a</sup> , 7±2 <sup>b</sup>	—	—	—	—
	MRS-FOS	15±1 <sup>a</sup> , 14±2 <sup>b</sup>	—	—	—	—
LE27	MRS	*11±1 <sup>a</sup> , 13±1 <sup>b</sup>	—	—	—	—
	MRS-FOS	16±1 <sup>a</sup> , 16±1 <sup>b</sup>	*9±1 <sup>a</sup> , 7±1 <sup>b</sup>	*8±2 <sup>a</sup> , 5±1 <sup>b</sup>	*7±1 <sup>a</sup> , 4±1 <sup>b</sup>	*8±2 <sup>a</sup> , 5±1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Diámetro de halo (mm) obtenido empleando extractos proteicos proveniente de cultivos de 24 h.

<sup>b</sup> Diámetro de halo (mm) obtenido empleando extractos proteicos proveniente de cultivos de 48 h.

\* Diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antimicrobiana obtenida con extractos proteicos producidos con 24 o 48 h de cultivo ( $P < 0.05$ ).

Los resultados presentan el efecto del tiempo de cultivo y fuente de carbono para la obtención de los extractos proteicos (Tabla 3-2). La actividad antimicrobiana obtenida al emplear glucosa ó FOS como sustrato mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ), siendo mayor en todos los casos la actividad de los extractos proteicos obtenidos a partir del cultivo de los aislados en medio con FOS al 2 %. Adicionalmente, se observó que en algunos casos la actividad antimicrobiana no fue detectada en extractos obtenidos a partir de cultivos realizados en glucosa. Esto puede deberse al requerimiento de una mayor población de células viables para poder obtener un efecto antimicrobiano detectable, efecto que se logra con la presencia de FOS en el medio de cultivo al lograr mayor número de células viables de los aislados nativos, como se discutió anteriormente. Esto indicaría la necesidad de cultivos celulares de alta densidad que permitan una mayor actividad antimicrobiana cuando la fuente de carbono empleada es glucosa. Con respecto al tiempo de cultivo, 24 o 48 h, empleado para la obtención de los extractos proteicos, se observó que para la mayoría de los casos donde se observo actividad contra *L. innocua* la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, es notable la tendencia a disminuir o mantener el tamaño del halo de inhibición. Entre tanto, todas las actividades antimicrobianas observadas al emplear los extractos proteicos frente a los demás microorganismos patógenos si se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), siendo menor el tamaño del halo con los extractos obtenidos al cabo de 48 h de cultivo.

Con el fin de confirmar que la actividad antimicrobiana obtenida es producto de la actividad de bacteriocinas, se realizaron pruebas de actividad luego de incubar los extractos proteicos en presencia de proteinasa K, catalasa, y calentamiento por 30 min a



60 °C. Para todos los casos se observó la pérdida de la actividad antimicrobiana luego de la incubación con proteinasa K, y actividad en presencia de catalasa lo que indica la naturaleza proteica del agente antimicrobiano. Entre tanto, los diferentes extractos exhibieron actividad antimicrobiana luego de ser sometidos a calentamiento, lo que muestra una tolerancia a la temperatura, 60 °C, por parte del péptido.

Los resultados obtenidos muestran un claro efecto positivo en la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos producidos al emplear FOS como sustrato durante el cultivo de los aislados nativos, así como espectros y potencias diferentes entre los extractos producidos. Resultados y tendencias similares se han reportado en la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos producidos por diferentes especies de *Lactobacillus*. Ignatova *et al.* (2009) obtuvo un incremento significativo en el diámetro de los halos de inhibición sobre *E. coli* causado por extractos proteicos obtenidos del cultivo de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B5 en medio MRS suplementado con FOS, GOS y glucooligosacáridos, frente a los halos de inhibición obtenidos al emplear glucosa como sustrato. De igual forma obtuvo para los extractos proteicos producidos por *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* B8 al ser cultivado en medios MRS-FOS y MRS-GOS actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, actividad que no observada cuando el extracto proteico fue producido en medio MRS. De igual forma los extractos proteicos obtenidos por Ignatova *et al.* (2009) exhibieron espectros de inhibición diferentes, inhibiendo especies de *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. Leroy *et al.* (2006) reportaron el efecto de la combinación de diferentes fuentes de carbono como glucosa, fructosa y maltosa sobre la producción de amilovurina por *Lactobacillus amylovorus* DCE 471, observando una producción similar de la bacteriocina cuando cada fuente de carbono era empleada por separado. Sin embargo, el cultivo del microorganismo en medios con dos o tres fuentes de carbono causó un incremento en la producción de la bacteriocina. Chen *et al.* (2007) reportaron para *Lactobacillus animalis* C060203, *Enterococcus durans* L28-1, *Lactococcus lactis* ssp. *L. lactis* C101910, *Lactococcus* sp. GM005, y *Enterococcus faecium* MR006, el efecto de la presencia de FOS, rafinosa o trehalosa en el medio de cultivo, sobre la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos producidos por estos microorganismos frente *Lactobacillus sakei*. Los resultados mostraron un aumento en la densidad óptica para la mayoría de los microorganismos al ser crecidos en el medio con glucosa, pero una mayor actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos del cultivo en medios enriquecidos con FOS, rafinosa o trehalosa

En resumen, estos resultados muestran que el uso de un medio modificado MRS-FOS se presenta como una alternativa para incrementar la actividad antimicrobiana BAL, específicamente *Lactobacillus*, ampliando su actividad y espectro de inhibición. Sin embargo, las razones para el incremento de actividad y ampliación del espectro de inhibición tras el cultivo de los microorganismos en un medio suplementado con FOS, siguen siendo desconocidas y deben ser motivo de futuras investigaciones.

### **3.4 Selección de aislados promisorios y caracterización del extracto proteico producido**

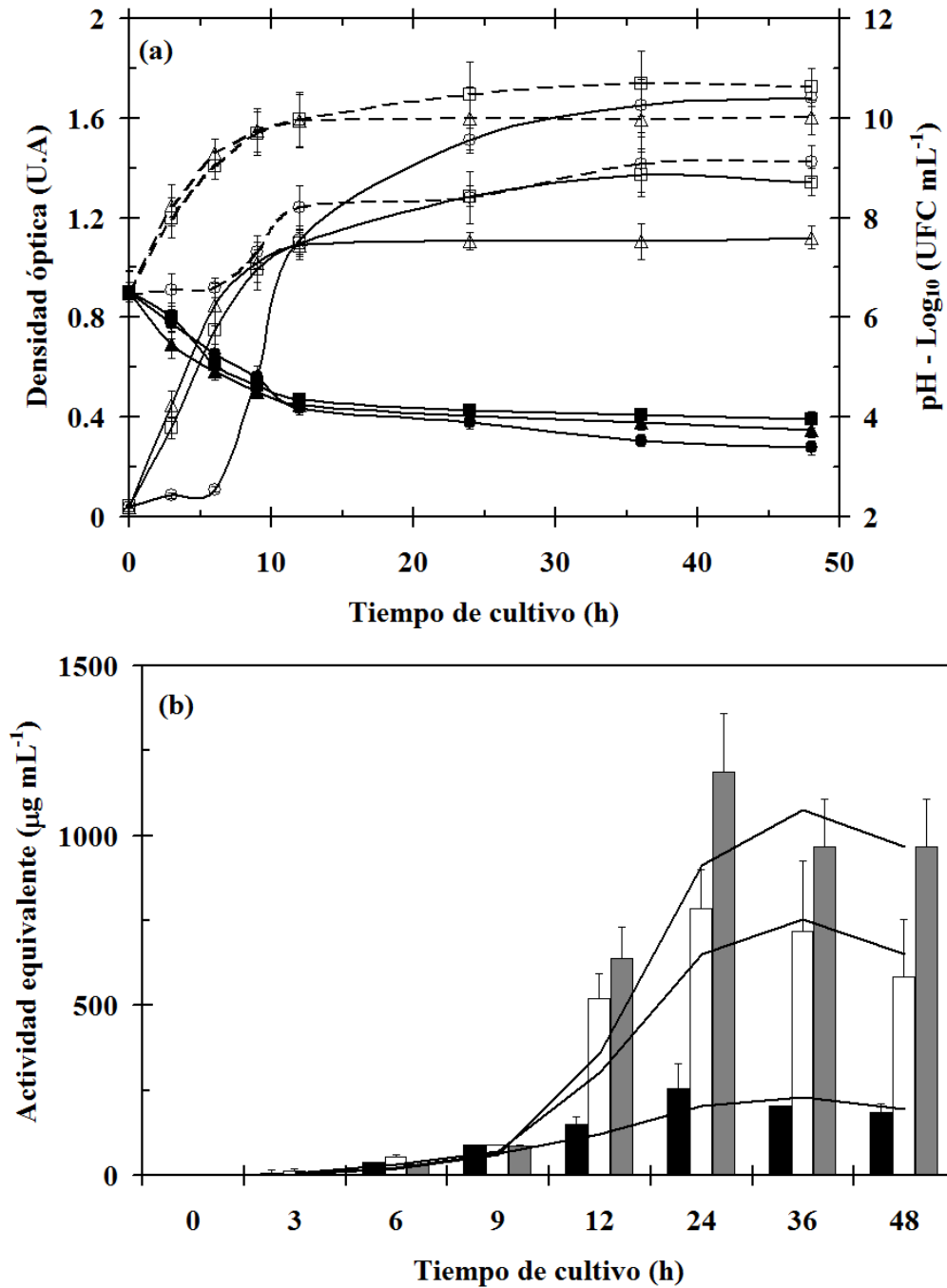
Con base en los resultados de los halos de inhibición producidos frente *L. innocua* y al espectro de inhibición obtenido frente a los microorganismo patógenos, se seleccionaron

como aislados promisorios para la caracterización de la bacteriocina producida los aislados LE5 y LE27. Estos aislados fueron cultivados en medio MRS o MRS-FOS al 2 y 5%, y se realizó el seguimiento durante 48 h al  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ),  $\text{DO}_{600}$ , pH, y la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos obtenidos (Figs. 3-11 y 3-12). De igual forma se realizó seguimiento a la fuente de carbono glucosa ó FOS (1-kestosa, nistosa y fructofuranosil nistosa), y a la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético) (Figs. 3-13 y 3-14).

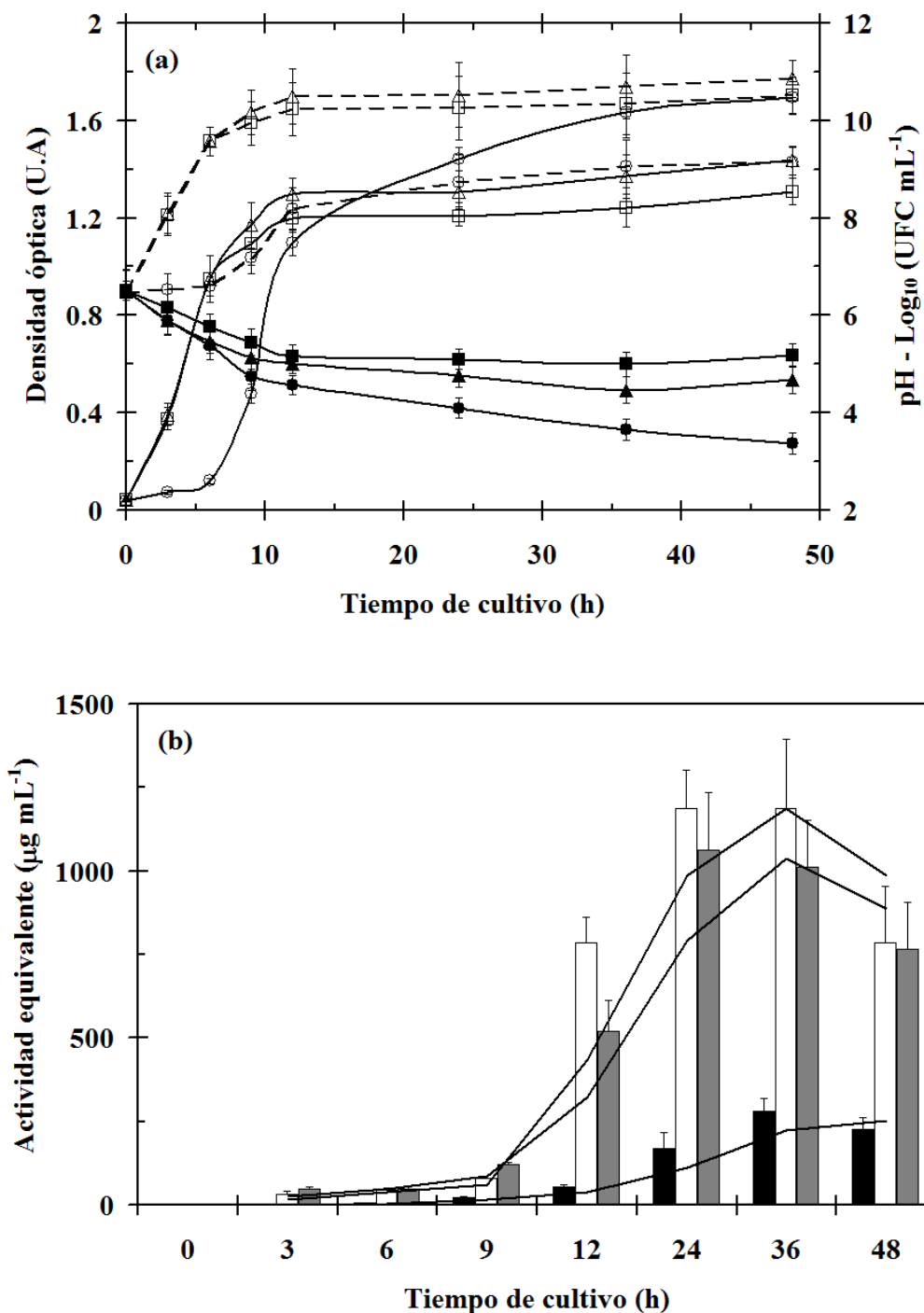
Para los dos aislados nativos se observó que al cabo de 12 y 24 h de cultivo estos se encuentran en la etapa final de la fase exponencial cuando el sustrato empleado es FOS y glucosa, respectivamente. El inicio tardío de la fase estacionaria en el medio con glucosa puede deberse a la fase *lag* observada, la cual fue para ambos aislados de aproximadamente 6 h. Los cultivos que contenían FOS, no mostraron una fase *lag* para los tiempos de muestreo seleccionados, lo que sugiere que la fase *lag* para este caso es inferior a las 3 h de cultivo.

El comportamiento observado del  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ),  $\text{DO}_{600}$  y pH, fue similar al descrito previamente en los ensayos de 24 y 48 h. La densidad óptica del cultivo con glucosa supera los valores observados con FOS como fuente de carbono luego de las 12 h de cultivo. Sin embargo, el conteo de células viables durante todo el cultivo es superior en los medios que contienen FOS en al menos una unidad de  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Aunque los valores finales del número de viables alcanzados a las dos concentraciones de FOS evaluadas, no presentan una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ), se observó una tendencia al aumentar en la población viable con concentraciones del 5 y 2% de FOS para los aislados LE5 y LE27, respectivamente. Con respecto al pH, se observó su disminución en la medida que aumenta la población y su estabilización una vez se alcanzó la fase estacionaria. Es notoria la disminución de pH en los cultivos con glucosa, mostrando una mayor capacidad acidulante para el aislado LE5, dado que el pH final de los cultivos tanto en glucosa como en FOS fue de alrededor de 3.8. Los cultivos del aislado LE27 en glucosa con respecto a los de FOS presentaron una disminución de pH de aproximadamente 1.0 unidad.

Los perfiles de actividad antimicrobiana, en términos de concentración equivalente de nisina (Anexo A), obtenidos para los aislados nativos presentaron características propias de cada aislado. De forma general, la máxima actividad se alcanzó con el extracto obtenido del cultivo de 24 h. Sin embargo, dada la tendencia a alcanzar el estado estacionario entre 12 y 24 h de cultivo es probable que la máxima actividad se hubiese logrado antes de las 24 h de cultivo. Para los dos aislados se logro una mayor actividad cuando los aislados fueron cultivados en medio con FOS que con glucosa. El perfil de actividad del extracto proteico del aislado LE 5 fue FOS 5% > FOS 2% > Glucosa, mientras que para el aislado LE27 fue FOS 2% > FOS 5% > Glucosa. Sin embargo, a pesar de no observar una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0,05$ ), entre las actividades obtenidas al cabo de 24, 36 y 48 h de cultivo, tiempo en el cual los aislados nativos se encuentran en estado estacionario, es notable la tendencia a la disminución de la actividad. Este efecto posiblemente puede estar asociado a la presencia de proteasas en el medio, como se discutió anteriormente.



**Figura 3-11. (a)** Perfiles de  $\text{Log}_{10}$  (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), (---);  $\text{DO}_{600}$ , (—); y pH, (símbolos llenos) obtenidos del cultivo del aislado LE5 (a) en presencia de glucosa, ( $\circ$ ); FOS 1%, ( $\diamond$ ); FOS 2%, ( $\Delta$ ); y FOS 5% ( $\square$ ). **(b)** Actividad antimicrobiana exhibida por los extractos proteicos frente *L. innocua* (glucosa, ( $\blacksquare$ ); FOS 2%, ( $\square$ ); y FOS 5%, ( $\blacksquare$ )).

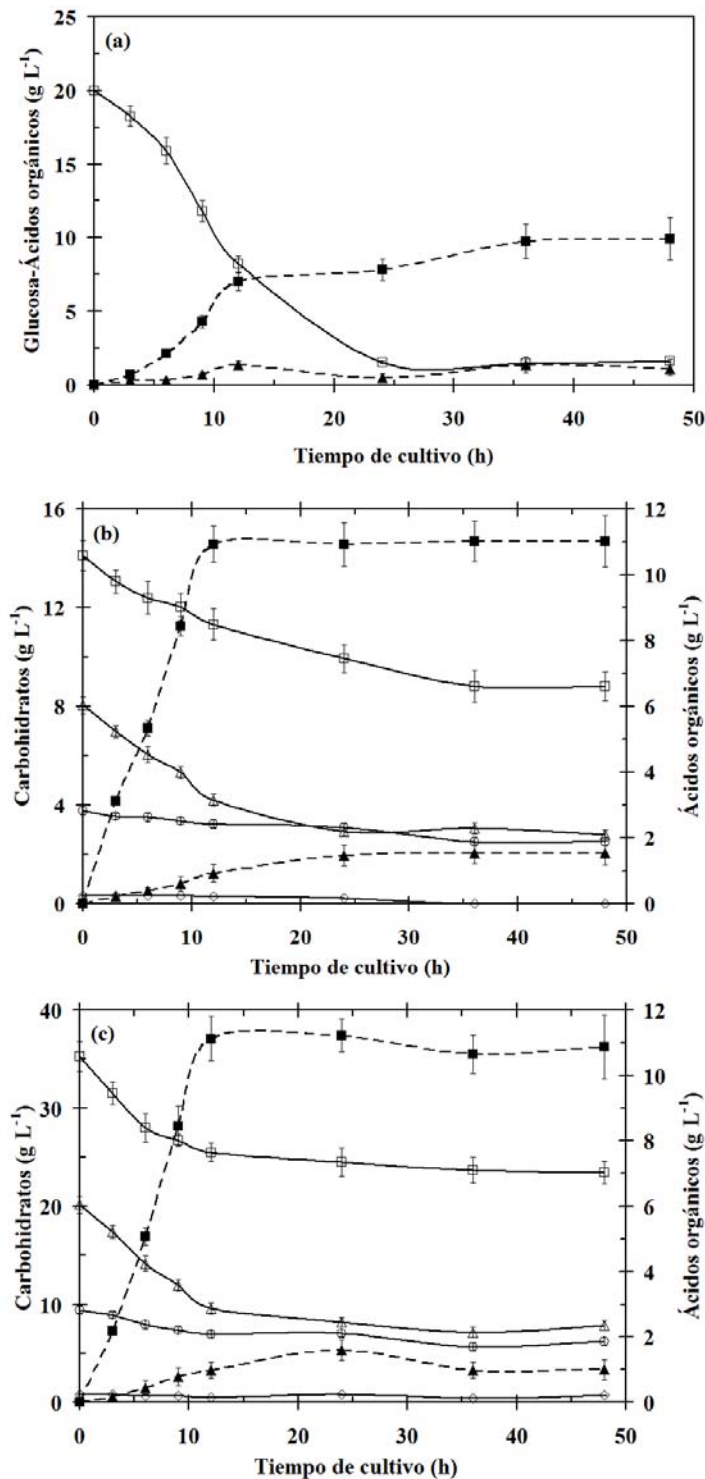


**Figura 3-12. (a)** Perfiles de  $\text{Log}_{10}$  ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ), (---);  $\text{DO}_{600}$ , (—); y pH, (símbolos llenos) obtenidos del cultivo del aislado LE27 (a) en presencia de glucosa, (○); FOS 1%, (◇); FOS 2%, (Δ); FOS 5% (□). **(b)** Actividad antimicrobiana exhibida por los extractos proteicos frente *L. innocua* (glucosa, (■); FOS 2%, (□); y FOS 5% (■)).

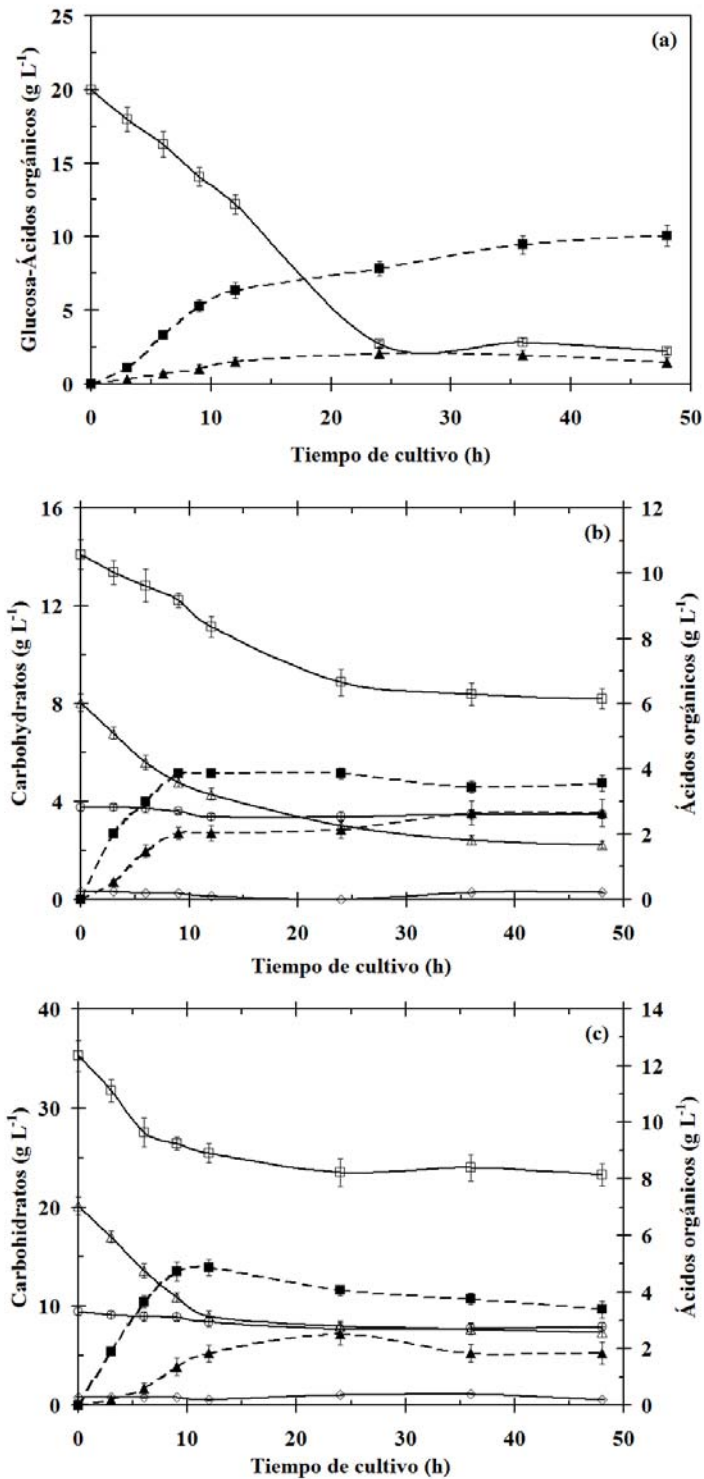
La mayor actividad alcanzada por ambos aislados en términos de concentración equivalente de nisina fue de  $1187 \pm 172 \mu\text{g mL}^{-1}$ , siendo hasta 4.6 y 4.2 veces mayor que la actividad obtenida en cultivos con glucosa ( $\sim 270 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para LE5 y LE27, respectivamente. En términos de unidades arbitrarias se observó actividad antimicrobiana hasta la quinta dilución realizada para los extractos proteicos de LE5 y LE27, (Fig. 3-10f). Estos resultados son equivalentes a valores de actividad, para los dos aislados, de  $62,5 \text{ UA mL}^{-1}$  (calculado como  $(1000/d) D$ ), ó  $3200 \text{ UA mL}^{-1}$  (calculado como  $a^{b*100}$ ), (Bellei et al. 2011; Deraz et al. 2005; Parente et al. 1995; Pieterse et al. 2010; Todorov et al. 2007b). Bajo estas definiciones de unidades arbitrarias, se observó un incremento en la actividad antimicrobiana del extracto proteico producido en presencia de FOS con respecto a la actividad obtenida en presencia de glucosa de 1,25 y 2 veces, respectivamente para cada aislado, ya que la actividad del extracto proteico de cada aislado obtenido en el medio con glucosa fue observable hasta la tercera dilución, dando una actividad de 50 y  $1600 \text{ UA mL}^{-1}$  para cada definición, respectivamente.

Tendencias similares a las obtenidas han sido reportadas por otros autores en cuanto a la producción de bacteriocinas en medio MRS. Sin embargo, perfiles de producción de bacteriocina empleando MRS-FOS no han sido reportados. Dave and Shah *et al.* (1997) reportaron la máxima actividad, en términos del diámetro del halo de inhibición, al cabo de 12 h de cultivo, para la acidofilicina LA-1 producida por *L. acidophilus* cultivado en medio MRS. Esta actividad se mantuvo invariable durante las siguientes 12 h, disminuyendo posteriormente. Zhang *et al.* (2011, In press) reportaron una máxima producción de reutericina de  $1400 \text{ UA mL}^{-1}$  por dos especies de *L. reuteri*, ATCC55730 y L22, luego de 14 y 18 h de cultivo en MRS, respectivamente.

El consumo de la fuente de carbono, glucosa ó FOS, y la producción de ácidos orgánicos (Figs. 3-13 y 3-14), concuerdan con lo observado durante el crecimiento del microorganismo; donde para todos los casos a partir del inicio del estado estacionario, 12 o 24 h de cultivo en presencia de FOS o glucosa, respectivamente, se logra el máximo consumo de la fuente de carbono y producción de ácidos orgánicos, permaneciendo casi invariables a partir de ese momento. Los aislados LE5 y LE27 presentaron un consumo máximo de glucosa del 92 y 86% de glucosa inicial, respectivamente. Para los cultivos con FOS al 2% se presentó un consumo total de 37 (LE5) y 41% (LE27), mientras que en FOS al 5% se presentó un consumo total de 31 (LE5) y 39% (LE27). A pesar de que se observó una tendencia al consumo de 1-kestosa > nistosa > 1-fructofuranosil nistosa para ambos aislados, se observaron diferentes porcentajes de consumo para los dos aislados, de acuerdo a la concentración inicial de FOS. Cuando la concentración de FOS fue del 2% se observó para LE5 un consumo de 65% de 1-kestosa, 37% de nistosa y 33% de 1-fructofuranosil nistosa, mientras que para LE27 se observó un consumo del 72% de 1-kestosa, 42% de nistosa y 8% de 1-fructofuranosil nistosa. Entre tanto, para una concentración de FOS del 5% se observó para LE5 un consumo de 62% de 1-kestosa, 34% de nistosa y 34% de 1-fructofuranosil nistosa, mientras que para LE27 se observó un consumo del 63% de 1-kestosa, 34% de nistosa y 10% de 1-fructofuranosil nistosa. En todos los casos se observó la presencia de bajas concentraciones de sacarosa a lo largo del cultivo, posiblemente como subproducto generado del consumo de FOS.



**Figura 3-13.** Perfiles de consumo de carbohidratos (glucosa, **a**; FOS 2%, **b**; FOS 5%, **c**) y producción de ácidos orgánicos durante el cultivo del aislado LE 5. Nomenclatura: glucosa (□); 1-kestosa (Δ); nistosa (□); fructofuranosil nistosa (○); sacarosa (◇); ácido láctico (■); y ácido acético (▲).



**Figura 3-14.** Perfiles de consumo de carbohidratos (glucosa, **a**; FOS 2%, **b**; FOS 5%, **c**) y producción de ácidos orgánicos durante el cultivo del aislado LE 27. Nomenclatura: glucosa (□); 1-kestosa (Δ); nistosa (◻); fructofuranosil nistosa (◊); sacarosa (◇); ácido láctico (■); y ácido acético (▲).

Estos resultados muestran dos comportamientos metabólicos diferentes, donde LE5 mantiene un consumo similar de los diferentes FOS de forma indistinta de la concentración inicial, tendencia similar a la que se observa en los sistemas donde el sustrato actúa como reactivo límite. Por otro lado, LE27 muestra una disminución en el consumo de 1-kestosa y nistosa, incrementando levemente el consumo de 1-fructofuranosil nistosa, lo que indica un posible efecto inhibitorio por sustrato. Perfiles y tendencias similares en el consumos de FOS con diferentes grado de polimerización como se discutió anteriormente, han sido reportados por Bañuelos *et al.* (2008) e Ignatova *et al.* (2009).

En cuanto a la producción de ácidos orgánicos, es notable que el aislado LE5 mantuvo la producción de ácido láctico y acético en la misma concentración independiente de la fuente de carbono, lo que se ve reflejado en un comportamiento similar en los perfiles de pH. Sin embargo, el aislado LE27, presentó una disminución de la concentración del ácidos láctico producido en el medio con FOS respecto a la concentración alcanzada con glucosa, causando un descenso menos marcado del pH en los medios con FOS (Fig. 3-12).

La Tabla 3-4 presenta parámetros cinéticos y de productividad obtenidos durante el cultivo y producción de bacteriocinas por los aislados promisorios LE5 y LE27. La velocidad específica de crecimiento  $\mu$  ( $\text{h}^{-1}$ ) se determinó como la pendiente de la fase exponencial de crecimiento. Para los dos aislados nativos no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ) en la velocidad de crecimiento en diferentes medios. Sin embargo, se observó una mayor velocidad de crecimiento del aislado LE27 frente al aislado LE5 en los medios MRS-FOS. A pesar de que pocos estudios reportan la velocidad específica de crecimiento de *Lactobacillus* crecidos en medio MRS-FOS, estos resultados concuerdan con lo reportado por Kaplan y Hutkins (2000), quienes obtuvieron para *L. acidophilus* NCFM una disminución en la fase *lag* al ser cultivado en MRS-FOS frente a los cultivos en MRS, manteniendo la velocidad específica de crecimiento en los dos medios constantes. Velocidades específicas de crecimiento entre 0,26 y 0,70  $\text{h}^{-1}$ , y entre 0,10 y 0,68  $\text{h}^{-1}$  han sido reportadas para cuatro especies de *Lactobacillus* en medio MRS y MRS-FOS, respectivamente. Obteniendo para todos los casos una mayor velocidad de crecimiento en medio con glucosa que con FOS, la diferencia de velocidades específicas se encontró entre 0,02 y 0,022  $\text{h}^{-1}$  (Saminathan *et al.* 2011).

Las constantes cinéticas de consumo de glucosa y FOS se determinaron siguiendo una cinética de primer orden. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) obtenido para todos los casos fue superior a 0.92. Se observó para el aislado LE5 una mayor velocidad de consumo en medio con glucosa que con FOS, entre tanto el aislado LE27 mostró una mayor velocidad de consumo de 1-kestosa que de glucosa. Para ambos aislados se observó una mayor velocidad de consumo de 1-kestosa, seguido por nistosa y 1-fructofuranosil nistosa. Para los dos aislados no se observó diferencia ( $P > 0.05$ ) entre las constantes cinéticas calculadas en medio con 2 ó 5% de FOS. A pesar de que no hay reportes cinéticos del consumo de FOS por *Lactobacillus* las constantes cinéticas se encuentran en



concordancia con la tendencia a consumir preferencialmente los FOS con bajos grados de polimerización como se discutió anteriormente.

**Tabla 3-4.** Parámetros cinéticos y rendimientos obtenidos para los aislados promisorios cultivados en MRS o MRS-FOS.

Parámetro		LE5	LE27
Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ , $h^{-1}$ )	MRS	0,269±0,057	0,263±0,058
	MRS-FOS 2%	0,252±0,006	0,343±0,012
	MRS-FOS 5%	0,281±0,008	0,316±0,010
Constante cinética de consumo de la fuente de carbono al 2% ( $\kappa$ , $h^{-1}$ )	Glucosa	0,065±0,001	0,050±0,001
	1-Kestosa	0,046±0,003	0,055±0,001
	Nistosa	0,016±0,002	0,018±0,001
	1-Fructofuranosil nistosa	0,009±0,002	0,006±0,001
Constante cinética de consumo de FOS al 5% ( $\kappa$ , $h^{-1}$ )	1-Kestosa	0,051±0,003	0,055±0,001
	Nistosa	0,021±0,002	0,023±0,002
	1-Fructofuranosil nistosa	0,011±0,001	0,008±0,001
Rendimiento de la producción de ácido láctico al cabo de 48 h de cultivo ( $Y_{L/S}$ )	MRS	0,54±0,02	0,56±0,03
	MRS-FOS 2%	0,93±0,02	0,29±0,03
	MRS-FOS 5%	0,39±0,03	0,13±0,02
Rendimiento de la producción de ácido acético al cabo de 48 h de cultivo ( $Y_{A/S}$ )	MRS	0,06±0,01	0,08±0,01
	MRS-FOS 2%	0,13±0,02	0,27±0,02
	MRS-FOS 5%	0,04±0,01	0,07±0,01
Productividad del agente antimicrobiano en concentración equivalente de nisina al cabo de 24 h de cultivo ( $\mu g mL^{-1} h^{-1}$ )	MRS	10,6±3,07	7,05±2,03
	MRS-FOS 2%	32,7±4,76	49,4±7,20
	MRS-FOS 5%	49,4±7,20	44,2±11,4

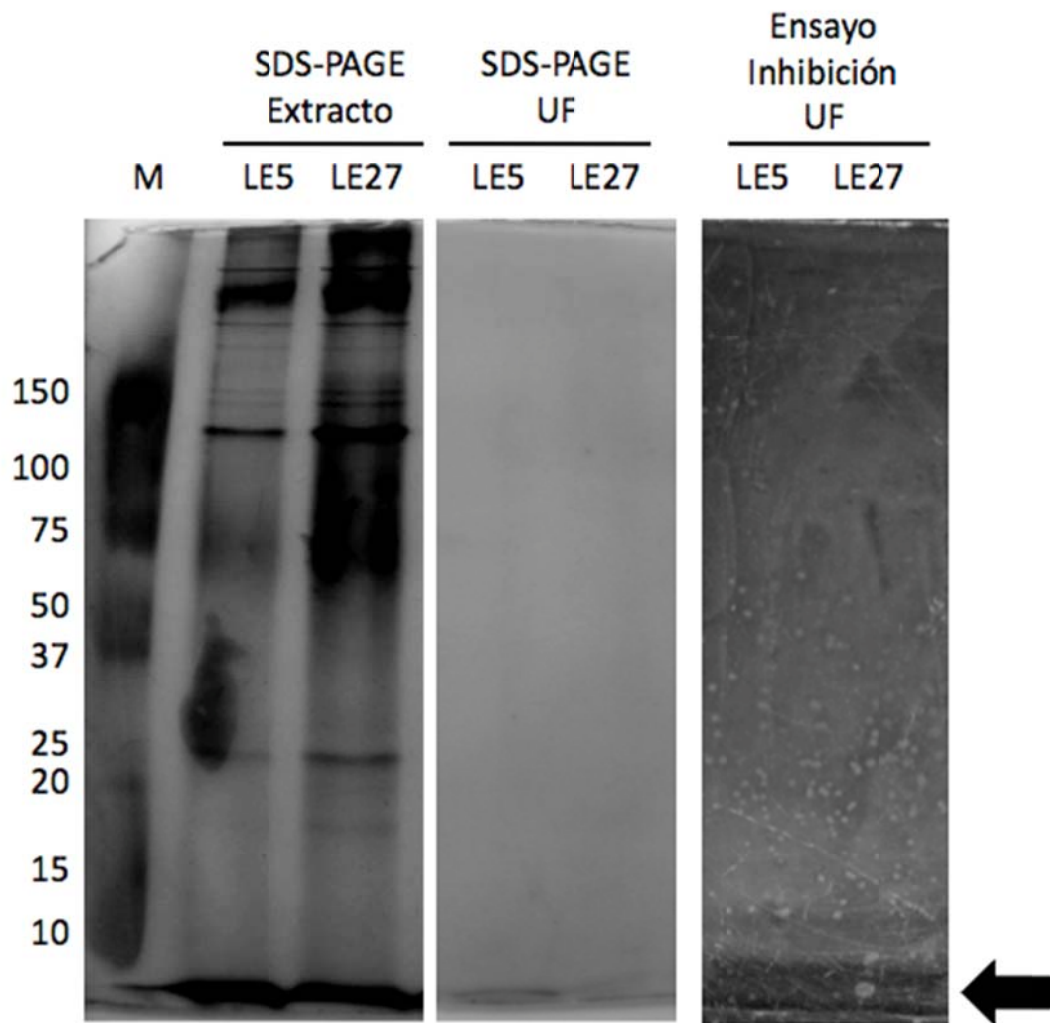
Los rendimientos en la producción de ácidos orgánicos se definieron como  $Y_{\text{Acido Organico/sustrato}}$  (Ácido orgánico producido / Sustrato consumido). El rendimiento obtenido en la producción de ácido láctico fue mayor para el aislado LE5 que LE27, sin embargo el comportamiento contrario fue observado en el rendimiento de la producción de ácido acético. Los rendimientos en la producción de ácidos orgánicos se vieron favorecidos en medio MRS-FOS al 2%, exceptuando el rendimiento del ácido láctico para el aislado LE27, el cual fue mayor en medio con glucosa. Una fuerte dependencia del rendimiento en la producción de ácido láctico de la fuente de carbono ha sido reportada por Georgieva (2009), obteniendo rendimientos desde 0,321 a 0,917 al emplear FOS, GOS, lactosa y glucosa. Debido a que no se tienen identificadas y purificadas las bacteriocinas, se realizó una equivalencia entre la actividad antimicrobiana observada por los diferentes extractos proteicos producidos por los aislados nativos y diferentes concentraciones de nisina. Esta equivalencia se realizó por correlación entre los halos de inhibición. La productividad se definió como la concentración equivalente de nisina por tiempo de cultivo necesario para producir el extracto proteico. Para los extractos proteicos obtenidos por los aislados LE5 y LE27 se observa que la productividad de bacteriocina en concentración equivalente de nisina al realizar el cultivo de los aislados en MRS es equiparable. No obstante se obtuvo una mayor productividad al realizar el cultivo de los aislados en medio MRS-FOS. Adicionalmente, se observa que para el aislado LE5 el aumento de concentración de FOS favorece la productividad de la bacteriocina, obteniendo la mayor productividad cuando se realizó el cultivo con FOS al 5%. Entre tanto, la productividad de bacteriocina observada para el aislado LE27 no mostro una

diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) al realizar el cultivo en medio MRS-FOS al 2 y al 5% (Tabla 3-4).

### 3.5 Caracterización de los extractos proteicos

Con el objetivo de realizar caracterización parcial de la bacteriocina producida por los dos aislados seleccionados (LE5 y LE27), los extractos crudos fueron sometidos a un proceso de ultrafiltración empleando una membrana de 10 kDa. La ultrafiltración de los extractos proteicos a través de la membrana de 10 kDa, permitió obtener dos fracciones: un ultrafiltrado con moléculas de tamaño molecular  $< 10$  kDa y un retentato con moléculas de tamaño  $> 10$  kDa. A cada fracción se le evaluó su actividad antimicrobiana por difusión en gel empleando como microorganismo indicador *L. innocua*. De igual forma se realizó una electroforesis bajo condiciones no denaturante de las dos fracciones, con el fin de establecer el tamaño de la proteína responsable de la actividad antimicrobiana. Se observó que para los dos aislados el retentato no exhibió actividad antimicrobiana, mientras que con el ultrafiltrado si fue posible obtener los halos de inhibición. Esto indica que el agente antimicrobiano presenta un tamaño inferior a 10 kDa. Entre tanto, electroforesis de los ultrafiltrados de los aislados LE5 y LE27 (Fig. 3-15), mostró que la actividad antimicrobiana para los dos aislados está dada por una proteína con una masa molecular menor de 10 kDa.

Los resultados obtenidos concuerdan con reportes publicados para bacteriocinas que presentan actividad antilisteria como la bacteriocina producida *L. plantarum* Acr2 (~4.6 kDa) (Devi and Halami 2011), sakacinas (~4 y 9.5 kDa) producida por *L. sakei* 2512 y *L. sakei* sub. *sakei* 23a (de Carvalho et al. 2010; Simon et al. 2002), no obstante también se han reportado bacteriocinas con actividad antilisteria producidas por especies de *Lactobacillus* como *L. brevis* FPTLB3 que presentan masas moleculares altas (~54 kDa) (Banerjee et al. In press). De forma general para diferentes especies de *Lactobacillus* se ha reportado la producción de bacteriocinas con masas moleculares que van desde menos de 3 hasta 122 kDa (Lash et al. ; Liu et al. 2008; Todorov et al. 2010a; Todorov et al. 2007a; Todorov et al. 2011; Yamato et al. 2003).



**Figura 3-15.** Caracterización de los extractos crudos y ultrafiltrados (UF) de los aislados LE5 y LE27. Los extractos y ultrafiltrados fueron analizados por SDS-PAGE y la actividad fue evaluada mediante ensayo de inhibición colocando el gel de electroforesis sobre agar BHI previamente inoculado con *L. innocua*. La flecha indica la zona de inhibición observada tras 48 h de incubación. M = marcador de masa molecular en kDa.



## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

1. Se aislaron 28 cepas que comparten un perfil bioquímico similar o igual al de diferentes especies del género *Lactobacillus*.

2. Los aislados nativos mostraron un comportamiento individual frente a las diferentes fuentes de carbono evaluadas, glucosa y FOS, observándose para todos los casos el efecto prebiótico de los FOS al aumentar la población de las células viables con respecto a las obtenidas al emplear la glucosa como fuente de carbono. A pesar de este efecto prebiótico, es notable que cada aislado responde de forma independiente a la concentración de FOS presente en el medio, mostrando en algunos casos un efecto inhibitorio ó una ausencia de efecto al aumentar la concentración de FOS en el medio.

3. Frente a los microorganismos patógenos seleccionados, se obtuvo actividad antimicrobiana por parte de 9 aislados nativos. Se evidenció el efecto positivo en la actividad antimicrobiana al realizar los cultivos en presencia de FOS; ya que se logró aumentar la actividad antimicrobiana y en algunos casos obtener actividad que no se evidenciaba al realizar los cultivos en medios con glucosa.

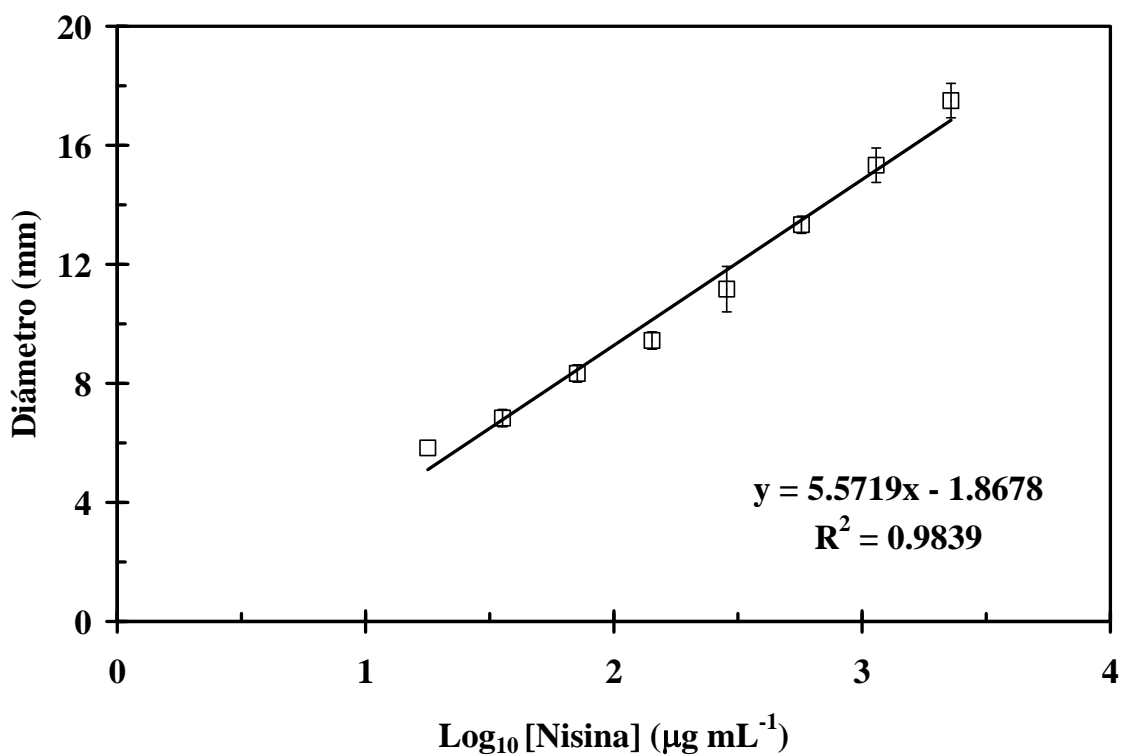
4. Los aislados LE5 y LE27, se presentan como especies promisorias para el estudio de la producción y evaluación de la actividad antimicrobiana de bacteriocinas, al presentar un espectro de inhibición amplio con respecto a los otros aislados. Particularmente se destaca el aislado LE27, que mostrar actividad contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos.

## 4.2 Recomendaciones

1. Realizar la identificación mediante técnicas de biología molecular de los aislados nativos que presentaron actividad bacteriocida, con el fin de establecer plenamente la especie y el género de los mismos.
2. Realizar la purificación y la caracterización bioquímica de la bacteriocina, así como el análisis molecular de los genes que la codifican.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos producidos y bacteriocinas purificadas frente a un mayor número y diversidad de especies de microorganismos patógenos con el fin de establecer con mayor certeza los respectivos espectros de inhibición.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana en matrices alimentarias de los extractos proteicos que presentaron actividad frente a los microorganismos patógenos que fueron sensibles a estos.
5. Evaluar el efecto de otras fuentes de carbono en la producción y actividad antimicrobianas de las bacteriocinas producidas por los diferentes aislados.

## A. Anexo: Curva de calibración de nisina frente *L. innocua* ATCC 33090

La Fig. A-1 presenta la curva de calibración empleada para determinar la equivalencia entre la actividad antimicrobiana de los extractos proteicos y la concentración de nisina.



**Figura A-1.** Efecto de la concentración sobre la actividad antimicrobiana para la nisina frente a *L. innocua* ATCC 33090.

## Bibliografía

- Arnon SS, Schechter R, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Hauer J, Layton M and others. 2001. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285(8):1059-70.
- Axelsson L. 2004. Chap 1. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Lactic Acid Bacteria Marcel Dekker, Inc.
- Banerjee S, Dora K, Chowdhury S. In press. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis*; FPTLB3 isolated from freshwater fish. *Journal of Food Science and Technology*:1-9.
- Bañuelos O, Fernández L, Corral JM, Valdivieso-Ugarte M, Adrio JL, Velasco J. 2008. Metabolism of prebiotic products containing  $\beta(2-1)$  fructan mixtures by two *Lactobacillus* strains. *Anaerobe* 14(3):184-189.
- Beards E, Tuohy K, Gibson G. 2010. Bacterial, SCFA and gas profiles of a range of food ingredients following in vitro fermentation by human colonic microbiota. *Anaerobe* 16(4):420-425.
- Bellei B, Miguel M, Mere Del Aguila EM, Silva JT, Paschoalin VMF. 2011. Purification of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* and its effectiveness for preservation of fresh-cut lettuce. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3(5):119-125.
- Bhunja AK. 2008. Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis. Springer.
- Boore A, Herman K, Perez A, Chen C, Cole D, Mahon B, Griffin P, Williams I, Hall A. 2010. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks --- United States, 2007 Morbidity and Mortality Weekly Report 59(31):973-979.
- Bouhnik Y, Vahedi K, Achour L, Attar A, Salfati J, Pochart P, Marteau P, Flourié B, Bornet F, Rambaud J-C. 1999. Short-Chain Fructo-Oligosaccharide Administration Dose-Dependently Increases Fecal Bifidobacteria in Healthy Humans. *The Journal of Nutrition* 129(1):113-116.
- Breukink E, de Kruijff B. 2006. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov* 5(4):321-323.



- Brusetti L, Borin S, Mora D, Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Daffonchio D. 2006. Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiology Ecology* 56(1):154-164.
- Cai Y. 1999. Identification and characterization of *Enterococcus* species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *J Dairy Sci* 82(11):2466-71.
- Caplice E, Fitzgerald GF. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol* 50(1-2):131-49.
- Castellano PH, Holzapfel WH, Vignolo GM. 2004. The control of *Listeria innocua* and *Lactobacillus sakei* in broth and meat slurry with the bacteriocinogenic strain *Lactobacillus casei* CRL705. *J Food Microbiol* 21:291-298.
- Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International* 7(4):281-305.
- Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16(3):365-78.
- Collins MD, Gibson GR. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69(5):1052S-1057S.
- Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CGM. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(18):7617-7621.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3(10):777-88.
- Crittenden RG, Playne MJ. 1996. Production, properties and applications of food grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 7(11):353-361.
- Chen YS, Srionnual S, Onda T, Yanagida F. 2007. Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* 45(2):190-3.
- Christensen MD, Albury MN, Pederson CS. 1958. Variation in the acetic acid-lactic acid ratio among the lactic acid bacteria. *Applied Microbiology* 6(5):316-318.
- Dave RI, Shah NP. 1997. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. *International Dairy Journal* 7(11):707-715.
- de Carvalho K, Bambirra F, Kruger M, Barbosa M, Oliveira J, Santos A, Nicoli J, Bemquerer M, de Miranda A, Salvucci E and others. 2010. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37(4):381-390.

- De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H, Dicks LMT. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 105(3):433-444.
- Deraz SF, Karlsson EN, Hedström M, Andersson MM, Mattiasson B. 2005. Purification and characterisation of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology* 117(4):343-354.
- Devi S, Halami P. 2011. Detection and characterization of pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria. *Current Microbiology* 63(2):181-185.
- Dortu C, Fickers P, Franz C, Ndagano D, Huch M, Holzapfel W, Joris B, Thonart P. 2009. Characterisation of an antilisterial bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 isolated from raw poultry meat and determination of factors controlling its production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 1(1):75-84.
- Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H, Nes IF. 2002. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4):639-54.
- Endo A, Futagawa-Endo Y, Dicks LMT. 2009. Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Systematic and Applied Microbiology* 32(8):593-600.
- Felis GE, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Intest Microbiol* 8(2):44-61.
- Georgieva R, Koleva P, Nikolova D, Yankov D, Danova S. 2009. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23(2):861-865.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125(6):1401-12.
- Goderska K, Nowak J, Czarnecki Z. 2008. Comparison of growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 7(2):5-20.
- Goh YJ, Lee J-H, Hutkins RW. 2007. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol.* 73(18):5716–5724.
- González-Martínez BE, Gómez-Treviño M, Jiménez-Salas Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición* 4(2).
- Guio F, Rodríguez MA, Almeciga-Díaz CJ, Sánchez OF. 2009. Recent trends in fructooligosaccharides production. *Recent Pat Food Nutr Agric* 1(3):221-30.
- Hammes W, Hertel C. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*: Springer New York. p 320-403.

- Heyer AG, Wendenburg R. 2001. Gene cloning and functional characterization by heterologous expression of the fructosyltransferase of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Appl Environ Microbiol* 67(1):363-70.
- Hill C. 2010. Probiotics and pharmabiotics: Alternative medicine or an evidence-based alternative? *Bioengineered Bugs* 1(2):79-84.
- Holt JG. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Ninth Edition.
- Hoover DG, Chen H. 2005. Bacteriocins with potential for use in foods. In: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL, editors. *Antimicrobials in food*: Taylor & Francis. p 389-428.
- Hori T. 2010. Chap 9. Probiotics recent human studies using *Lactobacillus casei* strain *Shirota*. *Handbook of Prebiotics and Probiotics Ingredients, Health Benefits and Food Applications*.
- Ignatova T, Lliev L, Kirilov N, Vassileva T, Dalgalarondo M, Haertl T, Chobert J-M, Ivanova I. 2009. Effect of oligosaccharides on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from dairy products. *J. Agric. Food Chem.* 57(20):9496-9502.
- Ikram-UI HAQ, Mukhtar H. 2007. Protease biosynthesis from *Lactobacillus* species: fermentation parameters and kinetics. *Journal of Food Processing and Preservation* 31(1):102-115.
- Ivanova I, Miteva V, Stefanova T, Pantev A, Budakov I, Danova S, Moncheva P, Nikolova I, Dousset X, Boyaval P. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology* 42(3):147-158.
- Jacques NA, Hardy I, Knox KW, Wicken AJ. 1980. Effect of Tween 80 on the morphology and physiology of *Lactobacillus salivarius* strain IV CL-37 grown in a chemostat under glucose limitation. *Journal of General Microbiology* 119(1):195-201.
- Jurtshuk P, McQuitty DN. 1976. Use of a quantitative oxidase test for characterizing oxidative metabolism in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 31(5):668-679.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66(6):2682-4.
- Kholif AM, Mahran GA, -Nawawy MAE, Ismail AA, Salem MME, Zaky WM. 2011. Evaluation of proteolytic activity of some dairy *Lactobacilli*. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 6(1):21-26.
- Kitahara M, Sakamoto M, Benno Y. 2010. *Lactobacillus similis* sp. nov., isolated from fermented cane molasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60(1):187-190.
- Koch S, Eugster-Meier E, Oberson G, Meile L, Lacroix C. 2008. Effects of strains and growth conditions on autolytic activity and survival to freezing and lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* isolated from cheese. *International Dairy Journal* 18(2):187-196.
- Kuper JJ. 2006. 2005-2006 Field guide to antibiotic therapy.

- Lash BW, Mysliwiec TH, Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiology* 22(2-3):199-204.
- Leroy F, de Vuyst L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(3):974-981.
- Leroy F, De Winter T, Adriany T, Neysens P, De Vuyst L. 2006. Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology* 112(2):102-111.
- Liong MT, Shah NP. 2005. Production of organic acids from fermentation of mannitol, fructooligosaccharide and inulin by a cholesterol removing *Lactobacillus acidophilus* strain. *Journal of Applied Microbiology* 99(4):783-793.
- Liu G, Lv Y, Li P, Zhou K, Zhang J. 2008. Pentocin 31-1, an anti-listeria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control* 19(4):353-359.
- López-M. JE, Ochoa-Z. A, Santoyo-P. G, Anaya-L. JL, Medina-M. E, Martínez-T. M, Loeza-L. PD. 2008. Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 39(3):49-57.
- McKay LL, Baldwin KA. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 7(1-2):3-14.
- Melgarejo LM, Sánchez J, Chaparro A, Newmark F, Santos-Acevedo M, Burbano C, Reyes C. 2002. Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia. *Cargraphics*, 2002. 334p. (Serie de Documentos Generales INVEMAR No.10)
- Monroy-Dosta MdC, Castro-Barrera T, Fernández-Perrino FJ, Mayorga-Reyes L. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos* 73:63-72.
- Moro G, Minoli I, Mosca M, Fanaro S, Jelinek J, Stahl B, Boehm G. 2002. Dosage-Related Bifidogenic Effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 34(3):291-295.
- Muñoz M, Jaramillo D, Melendez AdP, Alméciga-Díaz CJ, Sánchez OF. 2011 (In press). Native and heterologous production of bacteriocins from Gram-positive microorganisms. *Recent Patents on Biotechnology* 5(3).
- Mussatto SI, Mancilha IM. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* 68(3):587-597.
- Nakamura LK. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a new starch-hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. *Int J Syst Bac teriol* 31:56-63.

- Neysens P, Messens W, Gevers D, Swings J, De Vuyst L. 2003. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 occur under stress conditions. *Microbiology* 149(4):1073-1082.
- OMGE. 2008. Probióticos y prebióticos. Organización Mundial de Gastroenterología:1-22.
- Papagianni M. 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv* 21(6):465-99.
- Parente E, Brienza C, Moles M, Ricciardi A. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods* 22(1):95-108.
- Passos FV, Fleming HP, Ollis DF, Felder RM, McFeeters RF. 1994. Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7):2627-2636.
- Pennacchia C, Vaughan EE, Villani F. 2006. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: further investigations on their probiotic properties. *Meat Science* 73(1):90-101.
- Pieterse R, Todorov SD, Dicks LMT. 2010. Mode of action and in vitro susceptibility of mastitis pathogens to macedocin ST91KM and preparation of a teat seal containing the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology* 41:133-145.
- Ray B, Bhunia AK. 2008 *Fundamental food microbiology* 4th edition, CRC, Boca Raton.
- Riley MA, Wertz JE. 2002a. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* 84(5-6):357-64.
- Riley MA, Wertz JE. 2002b. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology* 56(1):117-137.
- Roberfroid MB. 1997. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. *Adv Exp Med Biol* 427:211-9.
- Roberfroid MB, Delzenne NM. 1998. Dietary fructans. *Annu Rev Nutr* 18:117-43.
- Rodriguez JM, Martinez MI, Kok J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 42(2):91-121.
- Ross RP, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *Int J Food Microbiol* 79(1-2):3-16.
- Rousseau V, Lepargneur JP, Roques C, Remaud-Simeon M, Paul F. 2005. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal *Lactobacilli* and pathogenic microorganisms. *Anaerobe* 11(3):145-153.
- Sangeetha PT, Ramesha MN, Prapullaa SG. 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology* 16(10):442-457.
- Schagger H. 2006. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protocols* 1(1):16-22.
- Settanni L, Corsetti A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *Int J Food Microbiol* 121(2):123-38.

- Sharmin S, Hossain MT, Anwar MN. 2004. Proteolytic activity of a *Lactobacillus* species isolated from rumen. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7(12):2105-2108.
- Simon L, Fremaux C, Cenatiempo Y, Berjeaud JM. 2002. Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(12):6416-6420.
- Song DD, Jacques NA. 1999. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Biochem J* 341 ( Pt 2):285-91.
- Stewart ML, Timm DA, Slavin JL. 2008. Fructooligosaccharides exhibit more rapid fermentation than long-chain inulin in an in vitro fermentation system. *Nutrition research (New York, N.Y.)* 28(5):329-334.
- Tannock GW. 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Curr Issues Mol Biol* 1(1-2):53-64.
- Todorov SD, Dicks LMT. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 36(2-3):318-326.
- Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M, Dicks LMT. 2010b. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science* 84(3):334-343.
- Todorov SD, Nyati H, Meincken M, Dicks LMT. 2007a. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. *Food Control* 18(6):656-664.
- Todorov SD, Powell JE, Meincken M, Witthuhn RC, Dicks LMT. 2007b. Factors affecting the adsorption of *Lactobacillus plantarum* bacteriocin bacST8KF to *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*. *International Journal of Dairy Technology* 60(3):221-227.
- Todorov SD, Prévost H, Lebois M, Dousset X, LeBlanc JG, Franco BDGM. 2011. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International* 44(5):1351-1363.
- Tokunaga T, Nakada Y, Yasuhito T, Hirayama M, Hidaka H. 1993. Effects of fructooligosaccharides intake on the intestinal microflora and defecation in healthy volunteers. *Bifidus* 6:143-150.
- van den Berg D, Robijn G, Janssen A, Giuseppin M, Vreeker R, Kamerling J, Vliegthart J, Ledebor A, Verrips C. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(8):2840-2844.
- Vold L, Holck A, Wasteson Y, Nissen H. 2000. High levels of background flora inhibits growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 56:219–225.
- Wheater DM. 1955. The characteristics of *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus* and *L. casei*. *Journal of General Microbiology* 12(1):133-139.

- Yamato M, Ozaki K, Ota F. 2003. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiological Research* 158(2):169-172.
- Yun JW. 1996. Fructooligosaccharides--Occurrence, preparation, and application *Enzyme and Microbial Technology* 19 (2):107-117.
- Yun JW, Noh JS, Lee MG, Song SK. 1993. Production of fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase. *Journal of the Korean Institute Chemical Engineers* 31:846–851.
- Zhang D, Li R, Li J. 2011, In press. *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and L22 display probiotic potential in vitro and protect against *Salmonella*-induced pullorum disease in a chick model of infection. *Research in Veterinary Science*(0).